

YKL-40 - A POTENTIAL PROGNOSTIC FACTOR IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA?

Maria Kazakova¹, Rossiza Vladimirova², Elena Vikentieva², Dora Popova², Victoria Sarafian¹

1 – Medical University - Plovdiv; Medical Faculty; Department of Medical Biology

2 – Military Medical Academy - Sofia; Clinical laboratory and immunology

ABSTRACT

Understanding the biology and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia is obligatory for the identification of novel molecular targets and the development of more efficient therapies.

YKL-40 is a glycoprotein, belonging to the glycosyl hydrolase family 18, lacking enzymatic functions. It is expressed and secreted by tumor and inflammatory cells. High serum YKL-40 is associated with poor prognosis in solid carcinomas.

The objective of this study was to determine serum YKL-40 levels in patients with chronic lymphocytic leukemia and to search a relationship with prognosis according to the Rai staging system.

YKL-40 was measured by ELISA in the serum of 55 patients recently diagnosed with chronic lymphocytic leukemia before chemotherapy. Forty age-matched healthy volunteers were also examined.

Our study revealed that the median serum concentration of YKL-40 in patients was 110,99 ng/ml and was significantly higher compared to the levels in healthy controls - 84,19 ng/ml ($P < 0.05$).

In patients with YKL-40 levels higher than 80 ng/ml, a positive correlation with Rai staging ($P = 0,03$; $r = +0,412$) and different risk groups ($P = 0,006$; $r = +0,453$) was discovered.

In conclusion, serum YKL-40 might be used as a prognostic biomarker in chronic lymphocytic leukemia patients.

Key words: YKL-40, chronic lymphocytic leukemia, biomarker

Въведение

Хроничната лимфоцитна левкемия (ХЛЛ) е заболяване с голяма вариабилност по отношение на клинична картина и курс на протичане. Може да протече като агресивно животозастрашаващо заболяване или като индолентна форма, която не се нуждае от лечение в продължение на много години. Малигнените В лимфоцити се развиват в специфична тъканна микросреда в костния мозък и вторичните лимфоидни органи, където взаимодействат с различни клетъчни популации (мезенхимални стромални клетки, тъканно-асоциирани макрофаги, фоликуларни дендритни клетки, Т-клетки). За разлика от циркулиращите в периферната кръв неделящи се клетки, тъканните В-клетки пролиферират (0.1–1 % от клона за ден) (10). Пролиферацията се осъществява в микроанатомични места, наречени пролиферационни центрове (псевдофоликули) - отличителна черта на хистопатологията на ХЛЛ (4).

Псевдофоликули не се установяват при други В-клетъчни малигнени заболявания, но се наблюдават във възпалителни тъкани на пациенти със системни автоимунни/възпалителни заболявания, като ревматоиден артрит и мултипла склероза. Въпреки значителния напредък в терапевтичните подходи, част от пациентите не могат да понесат агресивността на прилаганото лечение (5, 9).

YKL-40 е гликопротеин с аминокиселинна последователност, сходна с тази на бактериалните хитинази, но без ензимна активност (7). Предполага се, че протеинът играе роля в остро и хронично възпаление, както и в патологични процеси, водещи до тъканна фиброза. Изследвания разкриват, че високите експресионни и серумни нива на YKL-40 в

редица солидни тумори са диагностичен и прогностичен показател (2, 13). В литературата липсват детайлни данни относно ролята на гликопротеина при хематологичните неоплазии.

Целта на проучването е да се изследва серумната концентрация на YKL-40 при пациенти с ХЛЛ в сравнение със здрави индивиди и да се потърси връзка със стадиращата система на Rai, като основен клиничен прогностичен фактор и оформените спрямо нея рискови групи.

Материал и Методи

Материал: Изследвани са 55 новодиагностицирани, нелекувани пациенти с ХЛЛ (36 мъже и 19 жени, на възраст от 37 до 84 год.), стадирани за оценка на риска според Rai стадиращата система: стадий 0 (14 пациента), стадий I (10 пациента), стадий II (10 пациента), стадий III (11 пациента), стадий IV (10 пациента). Разпределени в 3 групи: с нисък (Rai 0 - 14 пациента), среден (Rai I + II - 20 пациента) и висок риск (Rai III + IV - 21 пациента). Абсолютният лимфоцитен брой е между $7,90 - 405,95 \cdot 10^9/L$.

Контролната група включва 40 клинично здрави индивиди (24 жени и 16 мъже, на възраст от 18 до 87 год.), асимптомни лица от българска националност, отговорили на всички критерии за подбор. Проведени са стандартни клинично-лабораторни изследвания за оценка на здравния им статус. Всички участници са подписали информирано съгласие.

Методи: Количествена детекция на YKL-40 в серума на здравите индивиди и пациенти е извършена чрез ензимно-свързан имуносорбентен анализ ELISA. Всички проби са изработени в минимум две повторения, както и съответните стандарти и контроли. Иmunната реакция е отчетена спектрофотометрично на ELISA-reader SUNRISE, при дължина на вълната 450 nm и референтен филтър 570 nm.

Статистическият анализ е извършен с двупосочен Mann-Whitney (Wilcoxon rank-sum), Shapiro-Wilk W и Spearman тест. Статистическата обработка на получените резултати е направена с компютърната програма SPSS 21.0. Като ниво на статистическа значимост е прието $p < 0,05$.

Резултати и обсъждане

Резултати: При сравняване на медианните нива на гликопротеина между пациентите с ХЛЛ и контролната група, се установява повишение на концентрацията му, както в общата група пациенти, така и в трите рискови групи (Таблица 1).

YKL-40 ng/ml	Контролна група	ХЛЛ	Rai 0	Rai I + II	Rai III + IV
	84,19	110,99	130,96	99,24	186,79

Таблица 1. Медианни нива на YKL-40 при здрави индивиди и пациенти с ХЛЛ, в цялата група и рисковите групи според стадиите по Rai.

При сравнение концентрациите на YKL-40 между стадиите по Rai, въпреки малкия брой пациенти в групите, прави впечатление ниската експресия в стадий Rai II, съпоставима с контролните нива 59,62 (36,81-123,41) ng/ml, дължаща се вероятно на органната локализация на малигнените клетки в черния дроб и/или слезка (Фигура 3А). При концентрация на гликопротеина над 80 ng/ml (37 пациента) (Фигура 3Б), YKL-40 показва положителни корелации със стадия по Rai ($p = 0,03$; $\rho = +0,412$) и групите по риск ($p = 0,006$; $\rho = +0,453$) (Фигура 3А).

Фигура 3. Концентрации на YKL-40 според рисковите групи (А) и стadiите по Rai (Б). Концентрации на YKL-40 според рисковите групи (Б), стadiите по Rai (Г) и при нива на YKL-40 > 80%.

Обсъждане: Пациентите с ХЛЛ се категоризират в прогностични групи основани на клинични стadiращи системи, разработени от Rai *et al.* (12) и Binet *et al.* (3). В нашето проучване сме използвали системата на Rai (Таблица 2.).

СТАДИРАЩА СИСТЕМА ПО RAI		РИСК	СТАДИРАЩА СИСТЕМА ПО BINET	
стадий	показатели		показатели	стадий
0	лимфоцитоза	НИСЪК	Hb ≥ 100 g/l, Plt < 100 × 10 ⁹ l. Ангажиране на < от 3 лимфни области	А
I	лимфоцитоза и лимфаденомегалия	МЕЖДИНЕН	Hb ≥ 100 g/l, Plt ≥ 100 × 10 ⁹ l. Ангажиране на ≥ от 3 лимфни области	В
II	лимфоцитоза и спленомегалия и/или хепатомегалия ± лимфаденомегалия			
III	лимфоцитоза и анемия (Hb < 110 g/l или Hct < 0,33) ± лимфаденомегалия или органомегалия	ВИСОК	Hb < 100 g/l и/или Plt < 100 × 10 ⁹ l. Независимо от лимфаденомегалията или органомегалията	С
IV	лимфоцитоза и тромбоцитопения (Plt < 100 × 10 ⁹ l)			

Таблица 2: Съпоставка на Rai и Binet стadiращите системи за оценка на риска при ХЛЛ.

Предполага се, че YKL-40 играе роля в пролиферацията и диференциацията на злокачествените клетки, стимулира ангиогенезата и има ефект върху извънклетъчното тъканно ремоделиране (14).

В световната литература данните за YKL-40 при ХЛЛ са изключително оскъдни. В две проучвания се съобщават по-високи серумни концентрации на гликопротеина при пациенти с тази патология в сравнение със здрави контроли (1).

При други хематологични неоплазии е доказано е, че серумното количество на YKL-40 при пациенти с мултиплен миелом и Ходжкинов лимфом са по-високи в сравнение със здравите контроли (11).

Смята се, че покачането на серумното ниво на гликопротеина при остра миелоидна левкемия се дължи на активираните макрофаги в белите дробове, вследствие на протичаща пневмония (6).

In vivo, YKL-40 иРНК и белтък се експресират от макрофаги в различни тъкани като възпалителната синовиална мембрана при пациенти с ревматоиден артрит, атеросклеротични плаки, саркоидни лезии при белодробна саркоидоза и др. (6). YKL-40 експресия отсъства в нормални човешки моноцити. Индуцира се *in vitro* по време на късните стадии на диференциация на макрофагите. YKL-40 се освобождава от специфични гранули в активираните неутрофили (14).

Имуноцитохимичен анализ за експресията на YKL-40 върху натривка от периферна кръв потвърждава, че биологично активния протеин YKL-40 се произвежда от туморните клетки на ХЛЛ (8).

Вероятно високите нива на YKL-40 се дължат на повишената му секреция, както от тъканно асоциираните макрофаги в пролиферационните центрове, така и на самата левкемична клетка. Значително понижената концентрация на гликопротеина в стадия с хепато/спленомегалия би могла да бъде отражение на включващи се други механизми на клетъчна активация и пролиферация в резултат на спецификата на клетките на микросредата в тези органи.

В заключение, нашето изследване е първото за страната, което установява сигнификантно по-високи стойности на гликопротеина в прицелната група в сравнение с контролната група. Корелацията му със стадирането по Rai и групите по риск, определя потенциалната роля на YKL-40 като независим прогностичен фактор при ХЛЛ.

Благодарности: Проучването е осъществено с финансовата подкрепа на МУ-Пловдив по проект ДП – 08/2012 и частично по проект ДУНК-01-2/2009 от МОНМ.

Литература:

1. Bergmann, OJ., JS. Johansen, TW. Klausen, AK. Mylin, JS. Kristensen, E. Kjeldsen, HE. Johnsen, 2005. High serum concentration of YKL-40 is associated with short survival in patients with acute myeloid leukemia, 11, 8644-8652
2. Bi, J., S. Lau, Z. Lv, D. Xie, D. Li, L. Lai, et al., 2009. Overexpression of YKL-40 is an independent prognostic marker in gastric cancer, Hum Pathol, 40, 1790–1797
3. Binet, J., et al, 2006. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia, Blood, 107, 859–861
4. Burger, J., P. Ghia, A. Rosenwald, F. Caligaris-Cappio, 2009. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies, Blood, 114, 3367–3375
5. Cheng, M., B. Goulart, D. Veenstra, D. Blough, E. Devine, 2012. A network meta-analysis of therapies for previously untreated chronic lymphocytic leukemia, Cancer Treat Rev, 38, 1004-1011
6. Johansen, JS., 2006. Studies on serum YKL-40 as a biomarker in diseases with inflammation, tissue remodelling, fibroses and cancer, Dan Med Bull, 53, 172-209
7. Hakala, BE., C. White, AD. Recklies, 1993. Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family, J Biol Chem, 268, 25803-25810
8. Hurmale, A., S. Choudhary, S. Bhaskar, S. Jatawa, M. Yadav, A. Tiwari, 2013. Overexpression of chitinase like protein YKL-40 in leukemia patients, J BioSci Biotech, 2, 215-220
9. Isfort, S., P. Cramer, M. Hallek, 2012. Novel and emerging drugs for chronic lymphocytic leukemia, Curr Cancer Drug Targets, 12, 471-483
10. Messmer, BT., D. Messmer, SL, Allen, et al, 2005. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells, J Clin Invest, 115, 755–764

11. Mylin, AK., NF. Andersen, JS. Johansen JS et al., 2009. YKL-40 and bone marrow angiogenesis in multiple myeloma, *Int J Cancer*, 124, 1492–1494
12. Rai, K., 1987. Research in chronic lymphocytic leukemia: recent progress and future directions, eds Gale, R. P. & Rai, K. R., 253–264
13. Roslind, A., JS. Johansen, 2009. YKL-40: a novel marker shared by chronic inflammation and oncogenic transformation, *Methods Mol Biol*, 2009, 511,159–184
14. Shao, R., 2013. YKL-40 acts as an angiogenic factor to promote tumor angiogenesis, *Frontiers in Physiology*, doi: 10.3389/fphys.2013.00122