

И.А. Гнедкова
 Н.И. Лисяный
 Д.Н. Станецкая
 В.Д. Розуменко
 А.Я. Главацкий
 А.А. Шмелева
 Т.А. Малышева
 О.Г. Черненко
 М.А. Гнедкова

ГУ «Институт нейрохирургии
 им. акад. А.П. Ромоданова
 НАМН Украины», Киев,
 Украина

Ключевые слова: глиома С6,
 углеводсодержащие структуры
 клеточных мембран, лектины,
 адгезивность, туморогенность.

ЛЕКТИНСВЯЗЫВАЮЩИЕ И ТУМОРОГЕННЫЕ СВОЙСТВА КЛЕТОК ГЛИОМЫ С6

Цель: изучение адгезии клеток глиомы С6 к пластиковым поверхностям с сорбированными лектинами с различной углеводной специфичностью и оценка *in vivo* туморогенной активности выделенных адгезивных фракций. **Методы:** адгезивную активность клеток С6 к 11 лектинам (PNA, ConA, GNA, HPL, SBA, PNA, Mil, PFL, LABA, WGA, SNA) оценивали спектрофотометрически. Клетки адгезивных фракций вводили интракраниально нелинейным крысам в дозе $5 \cdot 10^5$. Туморогенность фракций оценивали по средней продолжительности жизни (СПЖ) животных. **Результаты:** при инкубации клеток С6 на пластике с сорбированными лектинами в течение 1 и 3 ч маннозоспецифичные лектины PNA и ConA (50–10 мкг) усиливали адгезию этих клеток на 30–50%, тогда как лектины, связывающие нейраминовую кислоту (SNA и WGA), достоверно снижали адгезивную активность клеток С6 во всех используемых дозах. Введение *in vivo* фракций клеток С6, сорбированных на поверхностях с лектинами PNA, SBA (связывающими N-гликозидные цепи), PNA (галактозосвязывающий лектин) и LABA (фукозоспецифичный лектин) приводило к достоверному сокращению СПЖ по сравнению с животными контрольной группы, которым были инокулированы клетки исходной культуры С6. Наименьшая СПЖ крыс с глиомой С6 отмечена при введении фракции клеток, адгезированной на лектине LABA. Сниженной туморогенностью (увеличение СПЖ по сравнению с контрольной и другими опытными группами в 1,7–2,2 раза) обладали клетки С6, адгезированные на лектине омелы (Mil). **Выводы:** клетки глиомы С6 экспрессируют определенные углеводные эпитопы, из которых с повышением туморогенности клеток и сокращением СПЖ ассоциируются рецепторы, содержащие D-галактозу, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, α -фукозу и нейраминовую кислоту, что важно учитывать при разработке методов иммунотерапии.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, в состав опухолевых антигенов входят углеводные структуры мембранных гликопротеинов, гликолипидов и полисахаридов. Установлено, что при онкогенезе изменяется структура мембранных гликоконъюгатов как опухолевых, так и иммунокомпетентных клеток, причем отмечают опережающую изменчивость гликоконъюгатов на опухолевых клетках (ОК). Эти изменения связывают с нарушением синтеза специфических гликозилтрансфераз [1]. Изменения в сиалировании терминальных углеводных молекул гликопротеинов клеточных мембран могут определять инвазивный рост опухолей, в частности глиом. На этот процесс можно повлиять трансфекцией гена гликозилтрансферазы, что способствует восстановлению сиалирования клеточной мембраны [2].

При опухолевом процессе отмечают тенденцию к утрате дисахарида N-ацетилнейраминовой кислоты-N-ацетилглюкозамина (NAcNeuNAcGlc) — рецептора лектина зародышей пшеницы (WGA) и увеличение количества на мембранах злокачественных клеток различного происхождения рецепторов к лектину сои (SBA),

арахиса (PNA) и чечевицы (LCL), связывающих соответственно N-ацетилгалактозамин, D-галактозу, D-маннозу [3]. В наших предыдущих исследованиях установлено, что на клетках глиом различной степени анаплазии экспрессируются рецепторы ко многим лектинам [4]. Так, повышению степени анаплазии опухолей мозга пропорционально увеличение количества клеток глиомы с рецепторами, содержащими D-маннозу, связываемую лектином чечевицы (LCL) [5]. Далее показано, что если рецепторы к лектинам преобладали на лимфоцитах периферической крови по сравнению с аутологичными ОК, то ремиссия при опухолях головного мозга была достоверно более длительной, чем при преобладании соответствующих рецепторов на ОК [6]. В клетках глиом изменяется состав ганглиозидов — уменьшается количество моносиалированных GM3 и GM2 и выявляются дисиалированные GD3, GD2. Содержание GD3 коррелирует со степенью злокачественности глиомы. В глиобластомах определяют Gal α 1–4 Gal-цепи лактоцерамида [7].

Одним из направлений в иммунотерапии глиом является использование опухолеассоциированных углеводных антигенов, в частности для пригото-

ления вакцин. К углеводным эпитомам получают антитела с комплементзависимой цитотоксичностью, а также обеспечивающие антителозависимую клеточную цитотоксичность. Наиболее интересны 4 из 75 используемых с этой целью антигенов: ганглиозиды GD2, GD3, FucosylGM1 и N-acetylGM3. Следует также отметить, что эпитопы рецепторов ростовых факторов, играющих важную роль в опухолевом росте, — эпидермального (EGFR) и фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) взаимодействуют с ганглиозидами [8].

Рецепторы к лектинам определяются на стволовых клетках, в том числе опухолей мозга [9]. Так, рецептор к фитогемагглютинуину (phytohemagglutinin — PHA) слабо экспрессирован на эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) ($14,0 \pm 4,4\%$) и значительно — на нейральных и мезенхимальных стволовых клетках (МСК) ($99,0 \pm 0,4\%$) [10]. С помощью лектина *Vicia villosa*, связывающего терминальные молекулы N-ацетил-D-галактозамина, удалось выделить нервные клетки-предшественники из смеси ЭСК и МСК [10].

При выявлении особенностей рецепторного аппарата дифференцированных и недифференцированных клеток было изучено 79 гликопротеинов с помощью лектинов ConA, WGA, PNA. Обнаружено 18 гликопротеинов в лизосомах, участвующих в дифференцировке клеток. Установлено, что в процессе дифференцировки нейрональных клеток увеличивалось содержание лизосомальных гликопротеинов [11].

Ряд исследователей использовали панель из 20 лектинов, связывающих определенные терминальные углеводы или олигосахариды. Показано, что углеводы N-ацетилгалактозамин (GalNAc) и N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) экспрессированы на поверхности недифференцированных клеток и не выявляются на 12-й день эмбрионального развития. Агглютинин *Dolichos biflorus* (DBA), специфичный к GalNAc, селективно связывал стволовые клетки глиом. Установлено, что терминальные молекулы GalNAc и GlcNAc экспрессированы на стволовых клетках, содержащихся в глиобластомах [12]. DBA использовали также для выделения ЭСК у мышей [13].

Показано, что экстраклеточный домен рецептора муцина подоплин (PDPN) высокогликозилирован $\alpha 2,3$ -сиаловыми цепями, связанными с галактозой. PDPN активирует эндогенные лиганды, индуцирует рост и метастазирование опухоли. Лектины, которые связывают протеины с терминальными молекулами α -2,3-сиаловой кислоты, подавляют рост опухоли [14]. Лектин *Maackia amurensis* (MASL) связывает O-цепи, содержащие сиаловую кислоту. PDPN экспрессирован на 40% клеток рака молочной железы, 50% клеток рака глотки, 80% клеток рака кожи. PDPN содержит 150 аминокислот. Полагают, что связывание PDPN лектином MASL может подавлять пролиферацию трансформированных

клеток. Кроме того, под действием MASL описана индукция каспаз, вызывающая гибель клеток меланомы. Использование данного лектина на 99% подавляло миграцию клеток гепатомы [14].

Гиалуроновая кислота (ГК) относится к глюкозамингликанам, которые обладают различными физиологическими функциями: участвуют в регуляции эмбриогенеза, морфогенезе, миграции, пролиферации клеток; определяет резистентность к терапии [15]. Функции ГК регулируют рецепторы CD44, LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor), HARE (hyaluronan receptor for endocytosis), ламелин и RHAMM (hyaluronan mediated motility receptor). ГК входит в состав полисахарида клеточного матрикса и клеточных мембран, дисахарида глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина. ГК играет определенную роль в канцерогенезе и индукции ангиогенеза. Многие функции ГК связаны с HARE, который известен как трансмембранный рецептор стабиллин-2, протеин, содержащий C-тип лектина и ГК. Этот рецептор в норме определяет процесс обмена гиалуроната в глюкозамингликанах (GAGs) и деградацию ГК в лизосомах.

Нейрон-глиальный антиген протеогликан — NG2, хондроитинсульфат (CSPG4) клеточной поверхности активируют сигнальный путь RTK через MAPK. Активация этого сигнального пути CSPG4/NG2 регулирует большое число клеточных функций, включая туморогенность, реорганизацию цитоскелета, адгезию, миграцию, рост, выживаемость, химиорезистентность. Интегрин $\alpha 4\beta 1$ (фибронектин) активируется в присутствии CSPG4/NG2, выделенного из ОК. Опухолеассоциированные перicytes стимулируют миграцию эндотелиальных клеток [16]. Экспрессия на поверхности клеток CSPG4/NG2 сопровождается коротким периодом клинической ремиссии, опосредует резистентность к химио- и лучевой терапии, является мишенью для иммунотерапии. Так, иммунотерапия антителами к NG2/CSPG4 92,27/mAb9227 увеличивала среднюю продолжительность жизни (СПЖ) животных с опухолями [17].

Ламелиноподобный HARE — трансмембранный протеин, гомологичный C-типу лектинов. Полагают, что ГК на ЭСК является центральной молекулой в процессе эмбрио- и морфогенеза [15]. Экспрессия углеводных структур на мембранах ОК может оказывать существенное и разнонаправленное влияние на противоопухолевые реакции, так как в одних случаях они могут быть мишенью для распознавания ОК и индуцировать специфический иммунологический противоопухолевый ответ, а в других — вызывать иммунологическую толерантность [18].

Экспериментальная глиома крыс С6 соответствует наиболее злокачественной опухоли мозга — глиобластоме, содержит Р-гликопротеин и рецептор стволовых клеток CD133 — проминин. CD133⁺ клетки глиомы С6 устойчивы к апоптозу, при культивировании образуют нейросферы [19, 20].

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В этой связи важно было изучить и сопоставить адгезивные и лектинсвязывающие особенности клеток глиомы С6 и их опухолевые свойства.

Целью нашего исследования было изучение адгезивных свойств крысиной глиомы С6 к различным лектинам и оценка их опухолевой активности при внутримозговом введении животным.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на нелинейных крысах (массой 80 г) разведения вивария научно-исследовательского Института нейрохирургии им. А.П. Ромоданова НАМН Украины. Условия содержания животных и проведения экспериментов соответствовали Международным правилам работы с лабораторными животными [36]. Клетки крысиной глиомы С6 были любезно предоставлены сотрудниками Национального банка клеточных линий из тканей животных и человека Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины. Клетки глиомы С6 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 150 мкг гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки в пластиковых флаконах в атмосфере 5% CO₂. Пассировали культуру С6 1 раз в 3 дня. Через 24 ч культивирования клетки глиомы С6 образовывали сфероиды. Наблюдения вели в течение 20 сут культивирования.

Изучали способность клеток С6 к адгезии на пластиковых поверхностях (планшетах и чашках Петри) с сорбированными лектинами. В пластиковые планшеты вносили лектины в исходной концентрации 1 мг/мл в забуференном растворе хлорида натрия (ЗФР): от 100 мкг в первой лунке до 5 мкг в последней. Планшеты помещали в холодильник (4 °С) на 24 ч. Затем содержимое лунок удаляли, дважды отмывали их ЗФР. Планшеты высушивали, далее вносили в каждую лунку 2 · 10⁵ клеток глиомы С6 в среде Игла и культивировали их, в зависимости от задачи эксперимента, 1; 3 и 24 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе. После культивирования клетки встряхивали на шейкере 10 мин, надсадок с неприлипшими клетками удаляли. После двукратного отмывания ЗФР монослой высушивали, фиксировали 96° этанолом 10 мин и окрашивали азур-эозином по Романовскому. После высушивания в каждую лунку добавляли растворитель: 40 мМ HCl в изопропиловом спирте на 10 мин.

Адгезивную активность ОК оценивали по оптической плотности, которую измеряли на спектрофотометре согласно рекомендациям [21] при длине волны 620 нм и референсной волне 492 нм. Рассчитывали коэффициент адгезии (КА) для каждого лектина, который представляет собой соотношение величины экстинкции в лунке с адгезированными клетками с сорбированным лектином и величины экстинкции адгезии клеток в лунке без лектина:

$$K = E(\text{ад} + \text{лек}) / E(\text{адгезия}).$$

Аналогично в стерильных условиях настилали лектины на чашки Петри (d = 3 см) в дозе 100 мкг/мл (200 мкг на чашку). Лектины сорбировали в холодильнике 18 ч. Чашки дважды отмывали в ЗФР и высушивали в стерильных условиях. Были использованы лектины научно-производственного объединения «Лектинотест» (Львов, Украина). Углеводные последовательности на клетках глиомы С6 изучали с помощью лектинов, связывающих соответствующие детерминанты (табл. 1).

Таблица 1
Специфичность и сокращенные наименования лектинов, представленные в соответствии с Международной номенклатурой [22]

Углеводные детерминанты	Связывающие их лектины
GlcNAcβ1–2ManIR	Лектин фасоли обычной – Phaseolus vulgaris agglutinin (PHA)
α-манноза-R	Конканавалин А – Concanavalin A (ConA)
6-деокси-маннопиранозид	Лектин подснежника – Galantus nivalis agglutinin (GNA)
Galβ1–3GalNAc	Лектин арахиса – Peanut agglutinin (PNA)
Galβ1–3GalNAc	Лектин омелы белой – Mistletoe lectin (Mil)
NeuAcα2–6 Gal	Лектин бузины черной – Sambucus nigra agglutinin (SNA)
Fuca1–2Galβ1–3GalNAc	Лектин бобовника – Laburnum anagyroides agglutinin (LABA)
Fuca11–4 Fuca1–3-R	Лектин икры окуня – Perca fluviatilis lectin (PFL)
NeuAc–NAcGlc-R	Лектин из зародышей пшеницы – Wheat germ agglutinin (WGA)
GalNAcα1–3GalR	Лектин сои – Soybean lectin (SBA)
αGalNAc–αGlcNAc-R	Лектин улитки виноградной – Helix pomatia lectin (HPL)

На стерильные чашки с лектинами и без лектинов (контроль) наносили клетки глиомы С6 (8 · 10⁶ на чашку), культивировали их в CO₂-инкубаторе 24 ч. После этого неадгезированные клетки удаляли, а фракцию адгезированных клеток снимали стерильным резиновым шпателем и холодным ЗФР. Клетки отмывали и ресуспендировали в среде ДМЕМ, после этого в концентрации 5 · 10⁵ вводили крысам в левую теменную долю в объеме 0,1 мл под эфирным наркозом. Опухолевость адгезивных фракций и исходной культуры С6 оценивали по СПЖ крыс с перевивными глиомами. В каждой экспериментальной группе было по 7 животных.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи стандартного компьютерного пакета программ «Анализ данных» Microsoft Excel для Windows 1995, v. 7.0a, 1996. Достоверность отличий оценивали по критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения экспрессии различных углеводных эпитопов на клетках глиомы С6 изучены особенности адгезии ОК С6 на пластиковых поверхностях с сорбированными лектинами [23]. Проанализировано влияние 11 лектинов. КА >1 отражал усиление адгезии на пластиковой поверхности с сорбированным лектином по отношению к контрольным значениям (процент адгезирован-

КА к пластику с сорбированными лектинами клеток глиомы крыс С6

Сроки культивирования с лектином, ч (n = 5)	КА в зависимости от дозы лектина, мкг				
	100	50	25	10	5
PNA, 1	0,9 ± 0,01*.**	1,26 ± 0,11*	1,36 ± 0,15*.**	1,5 ± 0,31**	0,9 ± 0,11
3	1,12 ± 0,11**	1,47 ± 0,21**	1,41 ± 0,25	1,34 ± 0,23**	0,95 ± 0,15
24	0,89 ± 0,11**	0,69 ± 0,3**	0,71 ± 0,18**	0,58 ± 0,31**	1,0 ± 0,01
ConA, 1	1,0 ± 0,11*	1,63 ± 0,18*.**	1,42 ± 0,09*.**	1,51 ± 0,11*.**	0,88 ± 0,12**
3	1,19 ± 0,21	1,48 ± 0,03*.**	1,59 ± 0,31**	1,26 ± 0,12**	0,65 ± 0,09**
24	0,89 ± 0,11	0,69 ± 0,3**	0,71 ± 0,18**	0,58 ± 0,31**	1,0 ± 0,01
GNA, 1	0,82 ± 0,12*.**	1,19 ± 0,07	1,22 ± 0,29	1,5 ± 0,34*.**	0,9 ± 0,11**
3	1,13 ± 0,09**	1,52 ± 0,31	1,21 ± 0,25	0,65 ± 0,07*.**	0,58 ± 0,10*.**
24	1,27 ± 0,19**	1,26 ± 0,18	0,99 ± 0,05	1,12 ± 0,05	1,0 ± 0,05
HPL, 1	0,95 ± 0,07	0,77 ± 0,12	0,92 ± 0,05	1,08 ± 0,12	1,02 ± 0,08
3	0,76 ± 0,11**	0,86 ± 0,07	0,59 ± 0,11*.**	0,80 ± 0,03	0,92 ± 0,05
24	1,08 ± 0,10**	1,08 ± 0,02	1,07 ± 0,08	0,96 ± 0,01	0,95 ± 0,04
SBA, 1	0,51 ± 0,21	0,51 ± 0,17**	0,41 ± 0,24**	0,35 ± 0,14*.**	0,88 ± 0,09**
3	0,43 ± 0,09**	0,58 ± 0,11	0,59 ± 0,09	0,61 ± 0,17	0,58 ± 0,02**
24	0,87 ± 0,12*.**	0,94 ± 0,08**	1,18 ± 0,05**	1,23 ± 0,05*.**	1,57 ± 0,12**
PNA, 1	0,65 ± 0,11	0,54 ± 0,09	0,61 ± 0,19	0,33 ± 0,12*.**	0,88 ± 0,18
3	0,43 ± 0,09*.**	0,41 ± 0,11*.**	1,51 ± 0,06**	1,51 ± 0,14*.**	0,95 ± 0,07**
24	1,01 ± 0,08*.**	1,12 ± 0,09**	1,22 ± 0,07*.**	1,24 ± 0,11*.**	1,21 ± 0,01**
MII, 1	0,8 ± 0,04*	1,12 ± 0,09**	1,2 ± 0,03**	1,23 ± 0,07*	0,74 ± 0,11
3	1,17 ± 0,14	0,65 ± 0,07**	0,68 ± 0,15**	0,64 ± 0,03	0,63 ± 0,09**
24	0,99 ± 0,11	0,91 ± 0,12	0,89 ± 0,12	0,91 ± 0,11	0,94 ± 0,09**
PFL, 1	1,35 ± 0,10	1,49 ± 0,21**	1,40 ± 0,29	1,29 ± 0,15	1,28 ± 0,18
3	1,07 ± 0,14*	1,39 ± 0,09*	1,51 ± 0,06*.**	1,51 ± 0,14**. **	0,95 ± 0,07
24	1,23 ± 0,08	1,09 ± 0,03**	1,09 ± 0,05	0,91 ± 0,04**	0,96 ± 0,01
LABA, 1	0,45 ± 0,09*.**	0,55 ± 0,08*	0,50 ± 0,15**	0,59 ± 0,11**	0,91 ± 0,07*
3	0,58 ± 0,05**	0,51 ± 0,03	0,49 ± 0,08**	0,57 ± 0,01**	0,38 ± 0,03*.**
24	1,03 ± 0,07**	0,84 ± 0,3	0,84 ± 0,10**	0,94 ± 0,14**	1,2 ± 0,12**
WGA, 1	0,46 ± 0,17*.**	0,44 ± 0,18*.**	0,44 ± 0,12*.**	0,47 ± 0,15*	0,82 ± 0,08*
3	0,62 ± 0,09	0,67 ± 0,11	0,71 ± 0,07	0,63 ± 0,03	0,56 ± 0,15**
24	1,09 ± 0,10*.**	1,05 ± 0,03**	0,98 ± 0,05**	1,44 ± 0,11*.**	1,21 ± 0,14**
SNA, 1	0,47 ± 0,17**	0,55 ± 0,12**	0,44 ± 0,15**	0,76 ± 0,12**	0,75 ± 0,10**
3	0,55 ± 0,11**	0,91 ± 0,07**	0,79 ± 0,09**	0,42 ± 0,03**	0,51 ± 0,05**
24	1,25 ± 0,10**	1,49 ± 0,12*.**	1,18 ± 0,08**	1,25 ± 0,11**	1,07 ± 0,04*.**

*Достоверность отличий между значениями КА при инкубации с различными дозами лектинов $p < 0,001$.

**Достоверность отличий между значениями КА при различных сроках инкубации $p < 0,01$.

ных клеток на пластике без лектина). Установлено, что в зависимости от дозы лектинов и времени культивирования клеток С6 изменялась направленность КА (табл. 2).

При изучении интенсивности адгезии на пластике с сорбированным РНА отмечено, что после 1 ч культивирования происходит увеличение КА при использовании доз РНА 50; 25 и 10 мкг на лунку. После 3-часового культивирования также отмечали увеличение количества прилипших клеток: КА > 1 установлен при исходной дозе РНА 100; 50; 25; 10 мкг. После культивирования в течение 24 ч отмечено уменьшение количества адгезированных клеток (КА < 1), особенно в лунках с 50–10 мкг лектина. Аналогичные изменения КА отмечали при культивировании ОК в планшетах с сорбированным ConA. Оба лектина (в дозе 50–10 мкг) при культивировании ОК в течение 1 и 3 ч усиливали адгезию, примерно на 30–50%. Лектины РНА и ConA связывают сложные олигосахаридные структуры с терминальными молекулами Gal1–4GlcNAcβ1–2Man1R, соединенные с α (1–6) маннозой. Другой эпитоп для связывания РНА — GlcNAcβ12 Man, тогда как ConA

связывает ди- и трисахариды D-маннозы, с α 1–2-связями.

Лектин подснежника (GNA) также является маннозоспецифичным, однако он связывается с α-метил-D-маннопиранозидом и дисахаридом туранозой, наиболее специфически — с углеводными остатками с терминальными Man α (1–3). Исследования показали, что специфичность к маннозе GNA отличается от таковой ConA: GNA связывается с полисахаридами, имеющими разветвленную α (1–3), α (1–6) или (1–2) цепи, содержащие маннозу [24]. При культивировании в течение 1 ч GNA так же, как и ConA, в дозе 50–10 мкг/мл усиливал адгезию клеток С6, однако достоверное увеличение КА отмечено лишь в пробах с 10 мкг лектина. При культивировании на протяжении 3 ч GNA в дозе 100–25 мкг усиливал адгезию, тогда как дозы 10–5 мкг подавляли ее. После 24 ч культивирования отмечена слабая тенденция к увеличению адгезии ОК к пластику с сорбированным GNA в дозе 100–50 мкг и практически не был изменен показатель адгезии при дозе лектина 25–5 мкг (см. табл. 2).

Таким образом, анализ адгезии клеток С6 на пластиковых поверхностях с маннозосвязывающими

лектинами (PNA, ConA, GNA) продемонстрировал определенные отличия их эффекта в зависимости от дозы лектина и времени культивирования клеток, что, возможно, связано с особенностями распределения маннозных рецепторов на клетках глиомы С6 и с особенностями связывания таких рецепторов исследованными лектинами.

Лектин виноградной улитки (HPL) связывает терминальную молекулу α -метил-Na-цетил-D-галактозамина ($\text{GalNAc}\alpha$), в том числе в пентасахариде, определяющем групповую принадлежность крови человека (AII), взаимодействует с антигеном Форсмана ($\text{GalNAc}\alpha 1-3\text{GalNAc}$). Молекулу $\text{GalNAc}\alpha$ и олигосахаридные остатки с терминальными молекулами $\text{GalNAc}\alpha$ связывает также лектин сои (SBA) [24]. HPL практически не влиял на адгезию клеток глиомы С6 при инкубации в течение 1 ч; незначительно снижал КА при 3-часовой инкубации, что в определенной степени может отражать связывание молекул $\text{GalNAc}\alpha$ этим лектином. Лектин SBA на 40–50% подавлял адгезивную активность ОК С6 в исходной дозе 100–10 мкг при культивировании на протяжении 1 и 3 ч. Результаты проведенных ранее исследований показали, что подавление адгезии ОК при культивировании на пластике с сорбированным лектином связано с его прямым цитотоксическим действием [18, 25]; установлено, что к такому действию SBA наиболее чувствительны клетки злокачественных опухолей человека: анапластических астроцитом, глиобластом, медуллобластом [18]. После культивирования в течение 24 ч HPL и SBA практически не влияли на адгезивную активность клеток С6. Однако после культивирования клеток С6 в пластиковых чашках с SBA при пересеве адгезивной фракции отмечено более интенсивное образование сфероидов ОК, чем в контроле. Это косвенно может отражать способность лектина SBA обогащать адгезивную фракцию стволовыми CD133 клетками.

Лектин арахиса (PNA) взаимодействует с Т-антигеном и родственными структурами, имеющими терминальные молекулы D-галактозы, связанные с N-ацетилгалактозамином или N-ацетилглюкозамином, а также асиало-GM1 тетрасахаридом [24]. Из омелы выделено три лектина: M1 — D-галактозоспецифичный, M2 связывает дисахарид D-галактоза-N-ацетилгалактозамин (D-Gal-NGalNAc) и M3 — NGalNAc . Установлено, что последовательности типа $\text{Gal}\beta 1-3\text{Gal}$ и $\text{Gal}\beta 1-1\text{Gal}$ имеют большую аффинность к лектину Mil, чем D-галактоза (D-Gal) [24]. Галактозосвязывающие лектины PNA и Mil воздействовали на клетки С6 по-разному. PNA, связывающий D-галактозу, при культивировании на протяжении 1 ч в дозах 100–5 мкг и 3 ч в дозах 100–50 мкг подавлял адгезию. В проведенных нами ранее исследованиях установлено, что PNA оказывает прямое цитотоксическое действие на клетки глиомы [18]. При исходной дозе 25–10 мкг после культивиро-

вания в течение 3 ч отмечено достоверное увеличение КА (до 1,51). При культивировании 24 ч зафиксировано усиление адгезии клеток С6 при исходных дозах PNA 25–5 мкг. Таким образом, краткосрочное культивирование ОК на пластиковых поверхностях с лектином PNA подавляло их адгезию, тогда как культивирование в течение 24 ч усиливало ее, что может быть связано с чувствительностью клеток С6 к определенной дозе лектина и особенностями структуры углеводсодержащих рецепторов.

Влияние лектина омелы (Mil) несколько отличалось от описанного. После 1 ч культивирования на планшете с сорбированным Mil отмечали подавление адгезии при исходных дозах лектина 100 и 5 мкг на лунку (КА составил $0,80 \pm 0,04$ и $0,74 \pm 0,11$ соответственно). 3-часовое культивирование сопровождалось достоверным снижением КА (до $0,63-0,68$) при исходных дозах 50–5 мкг. После 24 ч культивирования Mil практически не влиял на показатель адгезии клеток С6.

Лектины бобовника (LABA) и икры окуня (PFL) являются фукозоспецифичными. LABA лучше реагирует с молекулами трисахаридов $\text{Fuc}1-2\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}$, с дифукозиллактозой ($\text{Fuc}1-2\text{Gal}\beta 1-4[\text{Fuc}\alpha 1-3]\text{Glc}$) и трисахаридом Le^a . Лектин PFL взаимодействует с раково-эмбриональным антигеном (РЭА) и антигеном Льюиса Le^b и не взаимодействует с Le^a , Le^x , Le^c ; агглютинирует эритроциты человека группы крови H (0I) [24]. Лектин LABA подавлял адгезию клеток С6 при всех использованных дозах после культивирования 1 и 3 ч. В то же время PFL в течение 1 и 3 ч культивирования увеличивал адгезию клеток С6. Через 24 ч культивирования действие обоих лектинов на адгезию клеток глиомы С6 к пластику было примерно одинаковым (значения КА приближались к 1) и незначительно колебалось в зависимости от дозы лектинов. Возможно, это обусловлено особенностями связывания тетрасахаридных остатков фукозоспецифичными лектинами. Известно, что PFL взаимодействует с тетрасахаридом группового вещества H, но не A, тогда как LABA — с обоими группоспецифичными антигенами [24].

Связывающий нейраминовую кислоту лектин бузины черной (SNA) и лектин зародышей пшеницы (WGA), связывающий дисахарид нейраминовая кислота-N-ацетилглюкозамин (NeuAc-NAcGlc-R), достоверно снижали адгезивную активность клеток С6 при всех используемых дозах при инкубации 1 и 3 ч. И, напротив, усиливали адгезию после 24 ч культивирования: WGA в концентрации 10 и 5 мкг, SNA во всех изученных концентрациях. Эти результаты косвенно могут отражать преобладание на клетках глиомы С6 рецепторов, содержащих нейраминовую кислоту. Известно, что на ОК С6 экспрессируется рецептор CD133 — промиелин, содержащий терминальные молекулы нейраминовой кислоты, связанной N-олигосахаридными цепями. Через 24 ч культивирования глиомы С6 в пластиковых чашках в стерильных стандартных условиях

выявляют нейросферы, образованные стволовыми клетками глиомы.

Лектин SNA можно использовать для оценки степени сиалирования глиомы С6. Лектин WGA взаимодействует с множеством гликопротеинов: РЭА, овомукоидом, гликопротеинами мембран эритроцитов; установлена его цитотоксичность по отношению к клеткам гепатомы человека, хориокарциномы и остеосаркомы крыс [24].

Для оценки роли углеводных рецепторов в опухолевых свойствах клеток глиомы С6 проведено предварительное культивирование ОК на пластиковых чашках с сорбированным определенным лектином в течение 24 ч. Затем клетки адгезивной фракции в объеме 0,1 мл вводили в левую теменную долю головного мозга крыс. Опухолеродные свойства и злокачественность клеток адгезивных фракций, выявляемых по связыванию с различными лектинами, оценивали по показателю СПЖ (табл. 3). СПЖ крыс с глиомой С6 составила $29,3 \pm 1,5$ сут; при введении ОК, адгезированных к необработанному пластику (контроль 2), СПЖ достоверно не изменилась ($p > 0,1$), хотя и отмечена тенденция к ее уменьшению. Адгезия к маннозосвязывающему лектину ConA не изменяла достоверно показатель СПЖ по сравнению с контролями 1 и 2. При введении фракций ОК, сорбированных на PNA, SBA и PNA, СПЖ была достоверно меньше, чем в контроле 1. Наименьшая СПЖ крыс с глиомой С6 отмечена при введении фракции ОК, адгезированных на лектине LABA, связывающем α -фукозу ($p < 0,05$ по сравнению с контролями 1 и 2).

Таблица 3
СПЖ крыс после введения фракций клеток глиомы С6, адгезированных на пластике с сорбированными лектинами

Введенные клетки	СПЖ, сут
ОК глиомы С6 (контроль 1)	$29,3 \pm 1,5$
Клетки С6, адгезированные к пластику (контроль 2)	$27,5 \pm 2,9$
Клетки С6, адгезированные к пластику с ConA	$27,5 \pm 2,5$
Клетки С6, адгезированные к пластику с PNA	$24,5 \pm 1,9^*$
Клетки С6, адгезированные к пластику с SBA	$24,8 \pm 2,5^*$
Клетки С6, адгезированные к пластику с LABA	$22,8 \pm 1,5^{*, **}$
Клетки, адгезированные к пластику с PNA	$23,5 \pm 2,1^*$
Клетки, адгезированные к пластику с Mil	$49,5 \pm 4,5^{*, **}$

*Отличия достоверны по сравнению с группой контроля 1.

**Отличия достоверны по сравнению с группой контроля 2.

Галактозоспецифичные лектины PNA и Mil поразному влияли на СПЖ. В то время как при введении крысам PNA-фракции клеток С6 СПЖ достоверно сокращалась, при введении ОК, сорбированных на Mil, СПЖ составила $49,5 \pm 4,5$ сут, что достоверно больше ($p < 0,01$), чем в остальных группах. По-видимому, PNA и Mil обладают различным механизмом воздействия на ОК. Так, лектин PNA связывает преимущественно мембранные терминальные углеводные молекулы, тогда как Mil содержит гликопротеины, вискотоксины, энзимы, способные не только связывать мембранные гликоконъюгаты, но и ингибировать рибосомальный синтез белка, индуцировать апоптоз, способствовать высвобождению фактора некроза опухоли, IL-1, -2, -6

[1, 12]. Инкубирование ОК с лектином омелы может индуцировать апоптоз и подавлять жизнеспособность клеток глиомы. Эти предположения, в определенной степени, подтверждаются полученными нами результатами.

Как мы уже упоминали, углеводные эпитопы используют в качестве мишеней для проведения иммунотерапии. В частности, на клетках глиом человека обнаружен сиалиллактотетрацерамид [26]. В клетках нормального мозга млекопитающих выявлен нейростатин — ингибитор O-ацетилирования, который имеет общие эпитопы с EGFR и антигенами групп крови [27]. Нейростатин — O-ацетилированная форма ганглиозидов GD1b и GT1b — обладает цитостатическим действием на нормальные астроциты и цитолитическим эффектом по отношению к клеткам глиомы С6 и глиом человека III и IV степени анаплазии. Нейростатин не подавляет нейроны или фибробласты в дозе ≥ 4 мМ/мл. Клетки, активированные нейростатином, опосредованно оказывали противоопухолевое действие — подавляли неоваскуляризацию опухоли, активировали микроглию и естественные киллеры. Был синтезирован тетрасахарид α DGalNAc (1-3)- β DGal1-4- α -Fuc(1-3)- β -DGlcMe(TS4) — аналог нейростатина, специфический ингибитор нейробластов, который обладал цитолитическим действием по отношению к клеткам глиомы С6 [28].

На основании накопленных многочисленных данных об экспрессии углеводных рецепторов на ОК разрабатывают различные стратегии воздействия на мишени, в качестве которых используют поверхностные мембранные гликопротеины и гликолипиды [29]. В частности, наиболее выраженным действием при развитии внутримозговой опухоли обладают рецепторные структуры, содержащие D-галактозу, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин и α -фукозу и нейраминную кислоту. При изучении влияния лектинов *in vivo* и *in vitro* установлено, что связывание указанных рецепторов обуславливает только частичный цитотоксический эффект, не превышающий 50% [3, 17]. Этот факт важен для разработки методов иммунотерапии глиом, так как связывание только определенного углеводного эпитопа или даже прямое цитотоксическое действие на ОК и уничтожение 50% клеток с данным рецептором приводит к формированию клона, устойчивого к действию определенного лектина [30].

В настоящее время на основании изучения углеводных эпитопов на ОК разрабатываются новые подходы к иммунотерапии глиом [31, 32, 35]. Так, проходит III фазу изучения для клинического использования вакцина, содержащая NeGc-ганглиозид (антиидиотипические антитела Vaxiga и NeGcGM3/VSSP ганглиозид в протеосоме). Эта вакцина в сочетании с рекотумомабом (recotumomab) оказывала определенный клинический эффект при меланоме [8, 33, 34].

ВЫВОДЫ

1. Проявление адгезивных и туморогенных свойств глиомы С6 связано с особенностями структуры мембранных олигосахаридных цепей.
2. Лектины, связывающие нейраминовую кислоту (SNA, WGA), угнетают адгезию к пластику клеток глиомы С6 при культивировании в течение 1–3 ч во всех изученных дозах.
3. Введение адгезивных фракций PNA+, SBA+, LABA+, PNA+ клеток С6 экспериментальным животным приводило к достоверному снижению СПЖ по сравнению с контрольной группой, что косвенно может отражать обогащение этих фракций (особенно клеток, сорбированных на LABA) стволовыми ОК.
4. Фракции клеток глиомы С6, сорбированные на лектине омелы MII, обладали наименьшей туморогенностью: СПЖ крыс этой группы была достоверно большей по сравнению с остальными группами животных.
5. Изучение лектинсвязывающих особенностей клеток глиомы С6 является адекватной моделью для разработки подходов к иммунотерапии глиом головного мозга.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingoglycolipid metabolism. *Cancer Res* 1996; **56** (23): 5309–18.
2. Dawson G, Moskal JR, Dawson SA. Transfection of 2,6 and 2,3 transferase genes and GlcNac-transferase genes into human glioma cell line U-373 MG affects glycoconjugate expression and enhances cell death. *J Neurochem* 2004; **89**: 1436–44.
3. Педкова ИА. Использование лектинов для модификации клеток глиом головного мозга к цитотоксическому действию лимфоцитов крови. XI 3^й з'їзд онкологів України: матеріали з'їзду. Судак, АР Крим, 29 травня – 2 червня 2006; 15.
4. Педкова ИА, Педкова МА, Розуменко ВД и др. Лектины в диагностике, изучении патогенеза и лечении глиом головного мозга различной степени анаплазии. Матеріали IV 3^й з'їзду нейрохірургів України. 27–30 травня. Дніпропетровськ, 2008; 206–207.
5. Педкова ИА, Лисяный НИ, Ромоданов СА и др. Распределение иммунорегуляторных рецепторов к лектинам на мембранах клеток глиом и аутологических периферических мононуклеарах у нейроонкологических больных в зависимости от степени анаплазии опухоли мозга. *Бюлл эксперим биол мед* 1996; (10): 441–5.
6. Лисяный НИ, Педкова ИА, Бычкова СА и др. Особенности иммунологических нарушений при глиомах головного мозга в период ремиссии. *Укр нейрохірург журн* 2004; (2): 55–61.
7. Lou YW, Wang P-Y, Yeh SCh, et al. Stage-specific embryonic antigen-4 as a potential therapeutic target in glioblastoma multiforme and other cancers *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111** (7): 2482–7.
8. Krengel U, Bousquet PA. Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. *Front Immunol* 2014; **5**: 325. PMID: PMC 41048338.
9. Лисяный НИ, Педкова ИА, Розуменко ВД и др. Получение популяции опухолевых клеток, обогащенной стволовыми клетками CD133 и CD15 с сорбированными лектинами. «Вплив науково-технічного прогресу на розвиток медичної

науки та практики: реалії сьогодення». Збірн мат міжнар наук-практ конф, 8–9 серпня 2014, Київ, 2014: 10–15.

10. Dodla MC, Young A, Venable AI, et al. Differencing lectin binding profiles among human embryonic stem cells and derivatives aid in the isolation of neural progenitor cells. *PLoS One* 2011; **6** (8): e23266.
11. He J, Liu Y, Zhu TS, et al. Glycoproteomic analysis of glioblastoma stem cell differentiation. *J Proteome Res* 2011; **10** (1): 330–8.
12. Tucker-Burden C, Chappa P, Krishnamoorthy M, et al. Lectins identify glycan biomarkers on glioblastoma-derived cancer stem cells. *Stem Cells Dev* 2012; **21** (13): 2374–86.
13. Venable A, Metalipova M, Lyons I, et al. Lectin binding profiles of SSEA4 enriched pluripotent human embryonic stem cell surfaces. *Cell Dev Biol* 2005 (Published online).
14. Oho-Alvarez JA, Krishnan H, Shen Y, et al. Plant lectin can target receptors containing sialic acid exemplified by pappalysin-1 to inhibit transformed cell growth and migration. *PLoS One* 2012; **7** (7): e41845.
15. Solis MA, Chen Y-H, Wang TY, et al. Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells. *Biochem Res Int* 2012; e346972.
16. Price MA, Wanshuu LEC, Yang J, et al. CSPG4, a potential therapeutic target facilitates malignant progression of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; **24** (6): 1148–57.
17. Rygh CB, Wang J, Thuen M, et al. Dynamic contrast enhanced MRI. Detects early response to adoptive NK cellular immunotherapy targeting the NG2 proteoglycan in a rat model of glioblastoma. *PLoS One* 2014; **9** (9): e108414.
18. Лисяный НИ, Педкова ИА, Педкова МА и др. Влияние лектинов на цитотоксическую активность лимфоцитов, по отношению к клеткам глиом различной степени анаплазии. *Імунологія алергологія* 2008; (1): 83–8.
19. Schraen-Maschke S, Zanetta JP. Role of oligomannosidic N-glycans in the proliferation, adhesion and signaling of C6 glioblastoma cells. *Biochimie* 2003; **85** (1–2): 219–29.
20. Angelastro JM, Lame MW. Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells. *Mol Cancer Res* 2010; **8** (8): 1105–15.
21. Бутаков АА, Огаиезов ВГ, Пинегин БВ и др. Спектрофотометрическое определение адгезивной способности полиморфоядерных лейкоцитов периферической крови. *Імунологія* 1991; (5): 71–3.
22. Lectins biology, biochemistry, clinical biochemistry (eds. TC Bog-Hansen, GA Spangler) *Proc. V Lectin Meeting*. Berlin, 1983; 3: 87–327.
23. Dai L, Liu Y, He J, et al. Differential profiling studies of N-linked glycoproteins in glioblastoma cancer stem cells upon treatment with γ -secretase inhibitor. *Proteomics* 2011; **11** (20): 4021–8.
24. Антошук ВО. Лектины та їх сировинні джерела. Львів: 2005. 554 с
25. Лисяный НИ, Педкова ИА, Педкова МА. Иммунологические особенности злокачественных глиом головного мозга. *Нейроиммунологія* 2012; **10** (3–4): 4–10.
26. Heimburg-Molinari J, Lum M, Vijay G, et al. Cancer vaccines and carbohydrate epitopes. *Vaccine* 2011; **89** (48): 8802–26.
27. Murrey HE, Hsieh-Wilson LC. The chemical neurobiology of carbohydrates. *Chem Rev* 2008; **105** (5): 1708–31.
28. Barone A, Saljo K, Benktander J, et al. Sialyl-lactotetra a novel cell surface marker of undifferentiated human pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 2014; **289** (27): 18846–59.
29. Nieto-Sampedro M, Valle-Argos B, Gomes-Nicola D, et al. Inhibitors of glioma growth that reveal the tumor to the immune system. *Clin Med Inoghts Oncol* 2011; (5): 265–314.
30. Jackson Ch, Rezevik JR, Brem H, Lim H. Vaccine strategies for glioblastoma: progress and future directions. *Immunotherapy* 2013; **5** (2): 155–67.

31. Nduom ERT, Hadjipanavis CG, Meir EG. Glioblastoma cancer stem like cells — implications for pathogenesis and treatment. *Cancer J* 2012; **18** (1): 100–106.

32. Ji J, Black KL, Yu J. Glioma stem cell research for the development of immunotherapy. *Neurosurg Clin N Am* 2011; (1): 1–6.

33. Wang JCh, Nakagawa M, Garitaonandia I, et al. Specific lectin biomarkers for isolation of human pluripotent stem cells identified through array — based glycomic analysis. *Cell Res* 2011; **21** (11): 1551–63.

34. Son MJ, Woolard K, Nam DH, et al. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 2009; **4** (5): 440–52.

35. Tateno H, Toyota M, Saito Sh, et al. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J Biol Chem* 2011; **286** (23): 20346–53.

36. Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Communities* 2010; L276: 33–79.

LECTIN-BINDING AND TUMORIGENIC PROPERTIES OF GLIOMA C6 CELLS

I.A. Gnedkova, N.I. Lisyany, D.N. Stanetskaya, V.D. Rozumenko, A.Y. Glavatskiy, A.A. Shmeleva, T.A. Malysheva, O.G. Chernenko, M.A. Gnedkova

Summary. *The aim of this study was to investigate adhesive and tumorigenic activity of glioma C6 cells fractions with different adhesive properties. Objects and methods: Adhesive activity glioma C6 cells to 11 lectins was estimated by means of spectrophotometry. The cells of adhesive fractions were injected intracranially to the rats in dose of $5 \cdot 10^5$ cells. Tumorigenic activity of the fractions was determined by median survival of life of ani-*

mals. Results: Sorbed on plastic plane tables in definite doses of PHA and ConA lectins reinforced adhesion glioma C6 cells to 30–50% by approximation while binding neuraminic acid (SNA and WGA) lectins reduced adhesive activity of glioma C6 cells in all used doses upon the incubation for 1 and 3 hours really. Binding N-glycosidic chains PHA and SBA lectins increased tumorigenic properties of glioma C6 cells and reduced median survival of rats. It was noted that the injection of adhesives on lectine of LABA, which bind α -fucose, the fraction cells caused least of all median survival of life. Adhesives on mistletoes lectin glioma C6 cells had least of all tumorigenic properties. Conclusion: Glioma C6 cells express specific epitops. Keeping D-galactosa, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, α -fucosa and neuraminic acid receptors have the most tumorigenic effect for growth of the proliferative brain tumor. This should be considered in choosing the methods of immunotherapy.

Key Words: glioma C6, carbohydrate containing structures of the cell membrane, lectins, adhesive activity, tumorigenic activity.

Адрес для переписки:

Гнедкова И.А.
04050, Киев, ул. Платона Майбороды, 32
ГУ «Институт нейрохирургии
им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины»
E-mail: irinagned@mail.ru

Получено: 26.01.2015