

УДК 612:017.1:616.831-006.04.484-018

Изучение противоопухолевого действия растительных лектинов на клетки глиом различной степени анаплазии

Лисяньї Н.И., Гнедкова И.А., Гнедкова М.А., Розуменко В.Д.,
Главацкий А.Я., Малышева Т.А., Шмелева А.А.

Институт нейрохирургии им акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев

Одним из нерешенных в нейроонкологии является вопрос о причинах неэффективности противоопухолевого ответа. Полагают, что одной из причин неэффективности противоопухолевого иммунитета является слабость опухолеассоциированных антигенов [1, 3, 10].

В состав опухолевых антигенов входят углеводные структуры мембранных гликопротеидов, гликолипидов и полисахаридов. В процессе онкогенеза изменяется структура мембранных гликоконъюгатов как опухолевых, так и иммунокомпетентных клеток, причем, отмечают опережающую изменчивость гликоконъюгатов на клетках опухолей. Эти изменения связывают с нарушением синтеза специфических гликозилтрансфераз [14, 18].

Экспрессия углеводных структур на мембранах клеток опухолей может оказывать существенное и разнонаправленное влияние на противоопухолевые реакции, так как в одних ситуациях они могут быть мишенью для распознавания клетки опухоли и индуцировать специфический иммунный противоопухолевый ответ, в других — вызывать иммунную толерантность [4, 5, 8].

Лектины — белки растительного и животного происхождения, связывающие специфические углеводные группы [2, 14]. Нарушение гликозилирования клеточной мембраны влияет на состав и характер распределения рецепторов к лектинам [14].

Изменения в сиалировании терминальных углеводных молекул гликопротеинов клеточных мембран могут определять инвазивность опухоли, в частности, глиомы. На этот процесс можно повлиять путем трансфекции гена гликозилтрансферазы, что способствует восстановлению сиалирования клеточной мембраны [7, 20].

При опухолевом процессе отмечают тенденцию к утрате дисахарида N-ацетилнейрамина кислота-N-ацетилглюкозамин (NAcNeu-NAcGlc) — рецептора к лектину проростков пшеницы (WGA⁺) и увеличению на мембранах злокачественных клеток различного происхождения рецепторов к лектину сои (SBA⁺), арахиса (PNA⁺) и чечевицы (LCL⁺), связывающих соответственно N-ацетилгалактозамин, D-галактозу, D-маннозу [2]. В предыдущих исследованиях мы установили, что на клетках глиом различной степени анаплазии экспрессируются рецепторы ко многим лектинам [6]. Так, пропорционально повышению степени анаплазии опухолей мозга увеличивается количество клеток глиом с рецепторами, содержащими D-маннозу, связываемую лектином чечевицы (LCL) [6]. В последующих исследованиях показано, что, если рецепторы к лектинам преобладали на периферических лимфоцитах по отношению к аутологичным клеткам опухоли, то ремиссия опухолевой болезни была достоверно более длительной, чем при преобладании соответствующих рецепторов на клет-

ках опухоли [11]. В спинномозговой жидкости больных с глиомой выявлен углеводсодержащий белок, лектин — 29 kDa. Активность выделенного протеина ингибировалась асиалофетуином β-нитро-β-галактозой. Антисыворотка к этому лектину реагировала с сывороткой больных с глиомой и не реагировала с сывороткой пациентов с другими неврологическими заболеваниями. В связи с этим антитела к лектину предполагают использовать в лечении опухолей головного мозга [16].

В настоящее время многие растительные и животные лектины используют в качестве иммунокорректоров, иммуносорбентов, иммунотерапевтических средств в составе комбинированного лечения пациентов с онкологическими заболеваниями [1, 7, 10].

Целью исследования являлось изучение особенностей прямого цитотоксического действия (ЦД) лектинов на мембранные гликоконъюгаты клеток глиом различной гистоструктуры и степени анаплазии; модификация гликоконъюгатов мембран клеток глиом с помощью лектинов для повышения их чувствительности к ЦД лимфоцитов. В дальнейшем планируется изучение возможности использования модифицированных клеток опухоли в качестве иммунотерапевтических вакцин в составе комбинированного лечения пациентов с нейроонкологическими заболеваниями.

Материалы и методы исследования. Обследованы 45 больных с опухолями головного мозга различной гистоструктуры: у 5 из них диагностирована астроцитомы II степени анаплазии, у 4 — олигодендроглиома II степени анаплазии, у 20 — анапластическая астроцитомы III степени анаплазии, у 8 — глиобластома IV степени анаплазии, у 8 — медуллобластома, а также 20 практически здоровых доноров [19].

Периферическую кровь у больных забирали в день выполнения оперативного вмешательства. Клетки глиом выделяли из материала биопсии, полученного во время оперативного вмешательства. Кусочки ткани опухоли разделяли с помощью шприца с толстой иглой в стерильной среде Игла. Суспензию клеток опухоли проводили через нейлоновый фильтр и дважды центрифугировали для дезагрегации и отмывания клеток опухоли. Затем клетки разводили в полной среде RPMI в заданной концентрации.

Проведены три серии опытов. Прямое действие лектинов на клетки опухоли, выделенные из материала биопсии глиом различной степени анаплазии, изучали после совместного культивирования их суспензии с определенным лектином в центрифужных пробирках в течение 24 ч, а также на адгезированных лектинах в пластиковых плоскодонных планшетах в течение 4 ч. Жизнеспособность клеток опухоли до и после культивирования в центрифужных пробирках оценивали в стандартном цитотоксическом тесте с

использованием 0,1% раствора трипанового синего; после культивирования в плоскостонных планшетах — с помощью МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид] [15].

В первой серии опытов перед культивированием клеток опухоли в плоскостонные планшеты вносили лектины в дозе 20, 10, 5, 2,5 мкг в 0,1 мл в забуференный физиологический раствор (ЗФР). Планшеты с раститрованными лектинами культивировали в течение 18 ч при температуре 4°С. Использовали лектины производства НПО «Лектинотест» (Львов). Клетки опухоли вносили в каждую лунку в дозе 2×10^5 в 0,1 мл полной среды RPMI. В каждую лунку добавляли 0,05 мг МТТ. Через 4 ч культивирования при температуре 37°С интенсивность включения МТТ в клетки опухоли оценивали с помощью спектрофотометра при длине волны 522 нм. Для оценки действия лектина на клетки опухоли рассчитывали коэффициент, представляющий соотношение экстинкции проб, культивированных с определенным лектином в определенной дозе, величины экстинкции в соответствующей контрольной пробе — клетки опухоли без лектина ($K=O/K$).

Во второй серии опытов клетки опухоли параллельно культивировали в центрифужных пробирках в течение 24 ч в концентрации 4×10^6 в 1 мл. В опытные пробирки добавляли определенный лектин в дозе 20 мкг на 1 мл полной среды RPMI. Использовали лектины, связывающие определенные углеводы: сои (SBA) — связывающий в гликоконъюгатах терминальную молекулу N-ацетилгалактозамина (N-AcGal), бобовника (LABA) — α -фукозу (α -Fuc), арахиса (PNA) — β -галактозу (β -Gal), пшеницы (WGA) — связывающий N-ацетиллинейраминовую кислоту-N-ацетилглюкозамин (NAcNeu-NAcGlc), чечевицы (LCL) — α -маннозу (α -Man). Рассчитывали коэффициенты прямого действия лектинов на клетки глиом.

K1 — отношение количества жизнеспособных клеток после культивирования с лектином к количеству жизнеспособных клеток в пробе, культивированной без лектина.

K2 — отношение общего количества вносимых клеток до культивирования к количеству клеток в соответствующей пробе после культивирования с лектином.

В третьей серии экспериментов проводили модификацию клеток глиом с помощью лектинов арахиса и омелы белой в центрифужных пробирках и на пластиковых чашках с сорбированными лектинами в течение 1 и 24 ч в дозе 20 мкг/мл.

Лимфоциты, выделенные с помощью общепринятого метода в градиенте фиколл-верографина, отмывали и ресуспендировали в полной среде RPMI в концентрации 2×10^6 в 1 мл и добавляли в пробы совместного культивирования со свежесодерженными клетками опухоли.

Для оценки цитотоксической активности (ЦА) лимфоцитов применяли колориметрический метод с использованием МТТ при соотношении эффектор-мишень 10:1.

ЦА выражали цитотоксическим индексом (ЦИ) в %: $ЦИ=100-1 \times [(Op(\alpha+m) - Op\alpha)/Opm] \times 100$, где $Op(\alpha+m)$ — оптическая плотность (Op) в лунках, содержащих эффекторы+мишень;

$Op\alpha$ — Op в лунках, содержащих только клетки-эффекторы (лимфоциты);

Opm — Op в лунках, где находились только клетки-мишени.

Достоверность различия показателей определяли по критерию Стьюдента.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью стандартного компьютерного пакета программ «Анализ данных» Microsoft Excel для Windows 1995, версия 7.0a, 1996.

Результаты и их обсуждение. В первой серии опытов установлено, что после культивирования клеток опухоли с лектинами в пластиковых планшетах и при оценке их жизнеспособности с помощью МТТ отмечен определенный дозозависимый эффект лектина. При этом более высокая доза лектина в большинстве наблюдений оказывала более значимый цитотоксический эффект, что проявлялось снижени-

Таблица 1. ЦД лектинов на клетки глиом при культивировании в течение 4 ч и оценки жизнеспособности клеток с помощью МТТ

Опухоль	Доза лектина, мкг	Коэффициент влияния лектина по отношению к контролю; лектины и связываемые ими сахара				
		N-AcGal	α -Fucosa	β -Galact.	N-AcGlc	α -Mannosa
		SBA	LABA	PNA	WGA	LCL
Астроцитомы II степени анаплазии (n=5)	20	0,67±0,03	0,38±0,1	0,4±0,07	0,40±0,11	1,43±0,11
	10	0,73±0,8	0,54±0,9	0,8±0,01	0,68±0,5	0,69±0,43
	5	1,17±0,11	0,7±0,01	1,8±0,05	—	—
	2,5	1,28±0,03	0,8±0,05	1,8±0,45	—	—
Олигодендроглиома II степени анаплазии (n=4)	20	0,81±0,09	0,74±0,08	0,72±0,01	1,09±0,2	1,0±0,35
	10	0,7±0,04	0,82±0,01	0,76±0,12	1,02±0,3	1,5±0,31
	5	1,29±0,21	1,0 ±0,1	1,65±0,25	1,28±0,18	1,34 ±0,28
	2,5	1,1±0,11	1,1±0,1	1,5±0,35	1,42±0,24	1,62±0,41
Анапластическая астроцитомы III степени анаплазии (n=20)	20	0,46±0,2	1,29±0,35	0,41±0,18	0,8±0,10	0,16±0,09
	10	4,3±2,1	2,8±1,1	1,7±0,5	3,1±1,1	1,6±0,8
	5	3,3±1,2	2,4±0,9	2,0±0,9	1,7±0,7	2,8±0,9
	2,5	3,0±1,4	1,67±0,4	1,87±0,6	3,2±1,2	3,4±1,1
Глиобластома IV степени анаплазии (n=8)	20	1,16±0,8	—	1,09±0,6	0,53±0,31	1,3±0,7
	10	1,17±0,4	—	1,07±0,5	1,04±0,1	1,8±1,1
	5	1,1±0,3	—	—	—	—
	2,5	1,4±0,3	—	—	—	—
Медуллобластома IV степени анаплазии (n=8)	20	0,8±0,02	—	0,56±0,09	—	—

ем жизнеспособности клеток опухоли, определяемой по включению МТТ (табл. 1).

Так, после 4 ч культивирования клетки доброкачественной астроцитомы были чувствительны к прямому ЦД SBA, LABA, PNA, WGA лектинов в дозе 20 мкг. В дозе 10 мкг лектин оказывал менее выраженный цитотоксический эффект на клетки этих опухолей. Только лектин LABA в дозе 5 и 2,5 мкг оказывал цитотоксический эффект на клетки астроцитом, тогда как под влиянием лектинов SBA и PNA в этих дозах жизнеспособность клеток опухоли повышалась. На клетки олигодендроглиомы незначительное ЦД (19–28%) оказывали лектины SBA, LABA и PNA в дозе 20 и 10 мкг. Малые дозы лектинов либо не оказывали ЦД на клетки олигодендроглиом, либо незначительно повышали их жизнеспособность.

На клетки анапластических глиом прямое ЦД оказывали лектины SBA, PNA и LCL только в дозе 20 мкг на 100 мкл, в меньших дозах все лектины повышали жизнеспособность клеток опухоли при культивировании в течение 4 ч. Клетки глиобластом были нечувствительны к ЦД большинства указанных лектинов в исследованных дозах и только WGA в дозе 20 мкг вызывал торможение включения МТТ.

Таким образом, различные гистологические варианты глиом проявляют различную чувствительность к действию лектинов. С увеличением степени анаплазии клеток глиом снижается их чувствительность к токсическому действию лектинов. Так, клетки глиобластомы при культивировании с лектинами в течение 4 ч были чувствительны только к одному лектину WGA и лишь в большой дозе. На основании анализа результатов изучения воздействия лектинов на клетки опухоли в планшете выбрана оптимальная цитотоксическая доза лектинов — 20 мкг на 1 мл культивационной среды, для изучения ЦД и антипролиферативного действия лектинов на суспензию клеток опухоли, культивируемых в центрифужных пробирках в течение 24 ч.

Жизнеспособность клеток опухоли после культивирования с лектинами оценивали в тесте с трипановым синим при подсчете 100 клеток, а также по соотношению количества жизнеспособных клеток до

и после их обработки лектином (К1). Наряду с этим подсчитывали общее количество живых и мертвых клеток в 1 мл культивационной среды до и после добавления лектина, а также оценивали соотношение общего количества клеток опухоли до и после их обработки лектином (К2).

После культивирования с лектинами содержание жизнеспособных клеток опухоли (К1) и их количество (К2) изменялось по-разному. Так, после совместного культивирования суспензии клеток астроцитом с лектинами в центрифужных пробирках в течение 24 ч наиболее значительно — на 50–60% снижалась их жизнеспособность после культивирования только с лектинами PNA и LCL (табл. 2).

При культивировании с лектином PNA не только снижалась жизнеспособность клеток астроцитом, но и уменьшалось их общее количество.

При культивировании суспензии клеток астроцитом с лектином WGA отмечено увеличение относительного количества жизнеспособных клеток, тогда как их общее количество достоверно (на 50%) уменьшалось. После культивирования с лектином SBA снижалась жизнеспособность клеток астроцитом на 15–30%, однако количество клеток увеличивалось на 30–40%. Эти данные подтверждают предположение, что некоторые лектины могут избирательно воздействовать на клетки опухолей, имеющие к ним рецептор, и тем самым способствовать выживанию популяции клеток, нечувствительных к действию лектина. В связи с этим прямое ЦД лектинов можно считать значимым, когда на 50% снижается жизнеспособность клеток опухолей и уменьшается их количество.

Так, достоверное прямое ЦД на суспензию клеток доброкачественных астроцитом оказывали лектины PNA и LCL после культивирования в течение 24 ч в центрифужных пробирках. На клетки анапластических астроцитом значимое прямое ЦД оказывали лектины SBA и PNA, в меньшей степени — лектины LABA и WGA.

Клетки глиобластом после культивирования в течение 24 ч были чувствительны к прямому ЦД SBA, PNA, хотя после 4 ч культивирования в планшетах

Таблица 2. Влияние лектинов на жизнеспособность клеток глиом различной степени анаплазии (по отношению к контролю) после культивирования в центрифужных пробирках в течение 24 ч в тесте с трипановым синим

Опухоль	Коэффициент	Коэффициент влияния лектина по отношению к контролю, лектин				
		N-AcGal	α -Fucosa	β -Galact	N-AcGlc	α -Mannosa
		SBA	LABA	PNA	WGA	LCL
Астроцитомы (n=5)	K1	0,7±0,3	0,65±0,1	0,41±0,1	1,28±0,11	0,34±0,11
	K2	1,58±0,16	1,19±0,7	0,5±0,01	0,5±0,35	0,57±0,14
Олигодендроглиомы (n=4)	K1	1,64±0,29	0,69±0,22	0,17±0,09	0,64±0,3	—
	K2	1,07±0,04	0,87±0,11	0,5±0,22	0,66±0,3	—
Анапластическая астроцитомы (n=8)	K1	0,56±0,1	0,69±0,25	0,20±0,11	0,64±0,18	—
	K2	1,0±0,1	0,20±0,1	0,45±0,3	0,66±0,19	—
Глиобластомы (n=5)	K1	0,43±0,2	1,09±0,09	0,46±0,16	0,9± 0,21	0,51±0,3
	K2	0,91±0,14	0,83±0,11	0,47±0,15	1,04±0,1	0,48±0,12
Медуллобластомы (n=3)	K1	0,48±0,22	0,94±0,29	0,36±0,19	0,82±0,15	0,49±0,05
	K2	0,9±0,1	0,32±0,18	0,45±0,22	0,66±0,28	0,9±0,12

Примечание. K1 — отношение количества жизнеспособных клеток, культивируемых с трипановым синим с лектином, к количеству жизнеспособных клеток в пробе без лектина. K2 — отношение количества клеток в 1 мл пробы с лектином к количеству клеток в пробе без лектина.

прямой цитотоксический эффект этих лектинов не выявляли. Наиболее выраженное прямое ЦД на клетки глиобластомы оказывали лектины PNA, LCL, SBA. Клетки медуллобластом также были наиболее чувствительны к прямому ЦД лектинов PNA, LCL, SBA.

Таким образом, полученные результаты (см. табл. 2), дают основания предполагать, что наиболее значимым прямым ЦД на клетки глиом различной степени анаплазии при культивировании в течение 24 ч обладает лектин PNA. Так, при совместном культивировании с лектином PNA на 50–80% уменьшалось относительное количество жизнеспособных клеток глиом. На 40–50% снижалась жизнеспособность клеток глиом после совместного культивирования с лектином LCL. К прямому ЦД лектина SBA наиболее чувствительны клетки злокачественных опухолей — анапластической астроцитомы, глиобластомы и медуллобластомы. При культивировании в течение 24 ч нечувствительными к лектину SBA оказались клетки олигодендроглиомы.

Необходимо отметить, что при кратковременном действии лектинов на клетки злокачественных глиом их ЦД не проявляется, тогда как при культивировании в течение 24 ч клетки глиом становятся высокочувствительными к ЦД трех из пяти изученных лектинов. Это может быть обусловлено особенностями экспрессии углеводных лигандов на клетках опухолей при культивировании с повышением чувствительности к прямому ЦД лектинов. С другой стороны, это также может быть связано с трансдукцией сигнала от лектина к внутриклеточным механизмам апоптоза, которые реализуют свое действие в течение 24 ч, что выявляют в этот период при оценке жизнеспособных клеток [13]. Не исключены и другие механизмы гибели клеток опухолей, в частности, проникновение лектина в клетку, блокада митохондриального синтеза. На различных этапах развития представлений об иммунобиологии опухолевого роста постоянно изменялись взгляды на решающую роль определенных молекулярных структур в реализации взаимодействия опухоли и организма, и, в конечном итоге, в прогрессировании или подавлении роста опухоли.

В настоящее время с открытием ингибиторных рецепторов на клетках-киллерах предполагают их возможную роль в блокировании иммунного ответа путем взаимодействия с соответствующими лигандами на поверхности клеток опухолей. Установлена роль ингибиторных рецепторов в формировании толерантности эффекторных лимфоцитов по отношению к клеткам опухолей [3, 4]. Одним из трех типов ингибиторных рецепторов на клетках-киллерах являются рецепторы типа лектинов — это гетеродимерные CD94/NKG2A-B, которые распознают HLA-E у человека [20]. Гены NKG2 кодируют рецепторы С-типа лектинов и существуют либо в ингибиторной форме NKG2A/B, либо в активационной NKG2C, NKG2D, NKG2E. Открытие ингибиторных рецепторов указывает на возможность полного блокирования цитотоксической функции клеток-киллеров, тем самым позволяя поверхностным лигандам к ингибиторным рецепторам «уходить» от иммунобиологического надзора [8].

По данным экспериментальных исследований, при добавлении растительных лектинов, в частности, конканавалина А (КонА) и фитогемагглютинаина (ФГА) к смеси клеток-киллеров и клеток-мишеней изменяется специфичность действия эффекторных Т-лимфоцитов. В присутствии этих лектинов цитолитически активные Т-лимфоциты, взятые у животных, иммунизированных аллогенными клетками, приобретали способность убивать различные клетки-мишени, включая сингенные клетки. Этот процесс назван лектинзависимой клеточной цитотоксичностью [3, 9, 12].

В настоящее время во многих странах в состав комбинированного лечения пациентов с онкологическими заболеваниями включают препараты из омелы белой, одним из компонентов которых являются галактозосвязывающие лектины [1].

В связи с этим нами изучена роль галактозных рецепторов на клетках глиом относительно их чувствительности к ЦД периферических лимфоцитов. С этой целью суспензии клеток злокачественных глиом культивировали в центрифужных пробирках с β - галактозоспецифическими лектинами арахиса или омелы в течение 1 ч и 24 ч (табл. 3). ЦА

Таблица 3. Изменение ЦА лимфоцитов пациентов с нейроонкологическими заболеваниями и здоровых доноров по отношению к клеткам злокачественных глиом, модифицированных лектинами

Клетки	Количество исследований	ЦА лимфоцитов при длительности культивирования, ч			
		1		24	
		+ аллогенные лимфоциты больных	+ лимфоциты донора	+ аллогенные лимфоциты больных	+ лимфоциты донора
Глиомы III–IV (КГЛ) (в центрифужных пробирках)	18	21,5±5,7*	42,9±7,5*	41,5±4,5*	74,5±8,1*
КГЛ + лектин PNA (в пробирках)	18	32,0±3,4*	39,5±9,1	59,2±4,9*	65,1±9,1
КГЛ + лектин Mil (в пробирках)	15	49,8±2,7*	52,4±7,8	29,4±8,7*	42,1±3,5*
КГЛ, не прилипшие к пластику	9	19,5±2,4**	41,5±4,5**	15,4±2,7*	61,2±9,1*
КГЛ, не прилипшие к лектину PNA	9	11,5 ±1,1**, *	59,9±8,9**,**	12,4±3,1*	31,4±1,9**,**
КГЛ, не прилипшие к лектину Mil	9	23,5± 2,3	55,4 ±2,4*, **	11,2±2,9*	25,4±3,4**,**

Примечание. * — достоверность различий между значениями цитотоксической активности лимфоцитов к клеткам глиом (КГЛ), культивируемых с лектином и без лектина ($P < 0,01$).

** — достоверность различий между цитотоксической активностью (ЦА) лимфоцитов к клеткам, не прилипшим к пластику с сорбированным лектином, и опухолевыми клетками, не прилипшими к пластику ($P < 0,01$).

лимфоцитов больных с глиомами по отношению к аллогенным клеткам опухоли, культивированным в центрифужных пробирках в течение 1 ч, была невысокой и составляла (21,5±5)%, тогда как лимфоциты здоровых доноров оказывали достоверно более выраженное ЦД — ЦИ составлял (42,9±7,5)%.

При культивировании суспензии клеток злокачественных глиом в центрифужных пробирках в течение 24 ч добавления лектинов существенно (почти в 2 раза) повышалась их чувствительность к ЦД периферических лимфоцитов больных с глиомами и здоровых доноров.

Лектины добавляли в центрифужные пробирки к клеткам опухолей и культивировали в течение 1 ч и 1 сут. При культивировании клеток опухолей с лектином арахиса или омелы в течение 1 ч достоверно повышалась их чувствительность к ЦД аллогенных лимфоцитов больных и практически не изменялась ЦА лимфоцитов доноров. После культивирования в течение 24 ч с лектином арахиса (PNA) повышалась чувствительность клеток опухолей к ЦД аллогенных лимфоцитов больных с глиомой, тогда как под влиянием лектина омелы (MiL) этот показатель снижался по сравнению с ЦА лимфоцитов по отношению к клеткам опухолей, культивированным без лектина.

Можно высказать лишь предположение относительно механизма повышения чувствительности клеток глиом, обработанных лектином арахиса, к ЦД аллогенных лимфоцитов больных. Возможно, связывание терминальной D-галактозы, которая является проапоптотическим маркером лимфоцитов, способствует индукции ЦА лимфоцитов; возможно, лектин PNA связывается со специфическим лигандом на естественные киллеры (ЕК) — галактоцереброзидом (Gal-cer) (CD1d), известного как активатор пуризинзависимой цитотоксичности [3].

Однако, несмотря на то, что лектины арахиса и омелы являются галактозоспецифическими, они, по-видимому, обладают различными механизмами воздействия как на клетки опухолей, так и на лимфоциты. Так, лектин арахиса связывает преимущественно мембранные терминальные углеводные молекулы, тогда как лектин омелы содержит гликопротеины, вискотоксины, энзимы, способные не только связывать мембранные гликоконъюгаты, но и ингибировать синтез белка в рибосомах, индуцировать апоптоз, способствовать высвобождению фактора некроза опухолей- α , интерлейкинов (ИЛ), в том числе ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 [1, 12]. Возможно, при инкубировании клеток опухолей с лектином омелы в определенной популяции клеток индуцируется апоптоз и подавляется жизнеспособность клеток глиом после культивирования в течение 24 ч вследствие ингибирования рибосомального синтеза, что само по себе делает их устойчивыми к цитотоксическому действию аллогенных лимфоцитов больных и доноров.

В эксперименте установлено, что клетки глиомы человека U 373 экспрессировали CMP NeuAc; Gal β Glc Nac α 2,3. CMP NeuAc Gal β 1-4, GlcNAc α 2-6 сиалилтрансфераза (α 2,6ST) экспрессирована в зрелых астроцитах, в отличие от сиалилтрансферазы 2,3(ST2,3)(CMP NeuAc Gal β 1,3(4) GlcNAc α 2,3), активность которой снижена в непораженных нейтральных клетках и увеличена в клетках глиальных опухолей.

При изменении гликозилирования клеток опухолей путем модификации гена гликозилтрансферазы повышалась их чувствительность к этопсиду [17, 21].

В связи с этим представляло интерес разделить суспензию клеток глиом путем культивирования в пластиковых чашках с сорбированными D-галактозосвязывающими лектинами — арахиса или омелы, в целях изучения роли галактозосодержащих гликоконъюгатов на мембранах клеток опухолей в реализации ЦД аллогенных лимфоцитов больных и доноров.

Клетки опухоли, не прилипшие к пластику (обедненные молекулами адгезии), при культивировании в течение 1 ч не изменяли чувствительность к ЦД лимфоцитов больных с глиомой и доноров. После культивирования в течение 4 ч не прилипшие к пластику клетки опухоли обладали низкой чувствительностью к воздействию лимфоцитов больных, однако чувствительность к лимфоцитам доноров достоверно увеличивалась.

Клетки опухоли, не прилипшие к пластику с сорбированным лектином арахиса в течение 1 ч, были достоверно менее чувствительны к ЦД лимфоцитов больных и достоверно более чувствительны к лимфоцитам доноров. Не прилипшие к пластику с сорбированным лектином омелы клетки опухоли в течение 1 ч не изменяли чувствительность к ЦД лимфоцитов больных и приобретали достоверно большую чувствительность к ЦА лимфоцитов доноров.

Через 24 ч культивирования на прилипшая к пластику фракция клеток злокачественных глиом в целом обладала более низкой чувствительностью к ЦД лимфоцитов больных глиомами и доноров по сравнению с соответствующими показателями после культивирования клеток опухоли в суспензии. Через 24 ч культивирования в пластиковых чашках клетки опухоли, не прилипшие к лектинам арахиса и омелы, были менее чувствительны к ЦД лимфоцитов и больных, и доноров.

По-видимому, молекулы адгезии на клетках опухолей определяют их чувствительность к ЦД лимфоцитов. Вероятно также, что терминальные молекулы β -галактозы, включенные в состав мембранных гликоконъюгатов клеток опухолей, в некоторых ситуациях определяют их чувствительность к ЦД аллогенных лимфоцитов.

На основании анализа полученных фактов возникает предположение, что при фракционировании клеток опухолей на D-галактозоспецифических лектинах формируется популяция клеток, резистентных к ЦД лимфоцитов больных и доноров.

Таким образом, полученные результаты подтверждают данные литературы о возможности модификации лектинами биологических свойств клеток опухолей [1, 2, 12, 13]. В то же время, чувствительность клеток даже одного гистологического варианта глиом зависит от степени анаплазии, а также условий опыта. Более чувствительными к ЦД лектинов оказались доброкачественные опухоли — астроцитомы по сравнению с глиобластомами.

Наряду с ЦД лектинов выявлена возможность стимуляции пролиферации клеток опухолей при действии лектинов SBA и LCA на клетки астроцитом. В литературе обсуждается вопрос о механизмах

передачи цитотоксического сигнала от лектинсвязывающего рецептора на мембране клетки к внутриклеточным апоптоз-индуцирующим механизмам [5, 8]. Изучают также состав гликоконъюгатов, связанных с этими механизмами. В наших исследованиях показано, что только один лектин PNA вызывает стабильную, достоверную (более 50%) гибель клеток опухолей независимо от степени анаплазии и гистологических вариантов опухоли. Можно предположить, что через эти β -галактозосодержащие PNA⁺ рецепторы в клетку передается апоптотический сигнал. Наряду с этим установлено, что лектин PNA, а также лектин омелы повышают чувствительность клеток опухолей к ЦД лимфоцитов. Хотя эти изменения регистрируют лишь при кратковременной инкубации клеток опухоли и лектинов (1 ч), при длительной инкубации (24 ч) эффект стимуляции может изменяться в сторону угнетения ЦА, особенно при использовании лектина омелы. Это можно объяснить прямым ЦД лектинов омелы на лимфоциты, а также индукцией резистентности этих клеток к воздействию лимфоцитов, о чем косвенно свидетельствуют данные о снижении ЦД лимфоцитов на не прилипшие к лектинам клетки опухолей.

Выводы 1. Различные растительные лектины по-разному взаимодействуют с клетками глиом *in vitro* и могут как вызывать их повреждение и гибель, так и активировать метаболизм и усиливать пролиферацию.

2. ЦД лектинов арахиса, сои, бобовника зависит от типа, времени и их дозы, а также гистоструктуры и степени анаплазии опухоли мозга. Наиболее выраженное ЦД на клетки глиом оказывал лектин арахиса.

3. Лектин арахиса и, в меньшей степени, лектин омелы способны *in vitro* повысить при кратковременной инкубации чувствительность клеток опухолей к ЦД аллогенных лимфоцитов больных и здоровых доноров, что предполагает возможность их использования в целях иммунотерапии или иммунотерапии у пациентов при нейроонкологических заболеваниях.

Список литературы

1. Агеев А.И. Новая диагностика рака. Теория, диагностика, лечение, реабилитация. — М.: Медицина XXI в, 2004. — 408 с.
2. Антонюк В.О. Лектины та їх сировинні джерела. — Львів, 2005. — 554 с.
3. Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. — К.: Наук. думка, 2005. — 790 с.
4. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Г.Н., Кадагидзе З.Г. Изучение популяции CD16 лимфоцитов у онкологических больных на фоне вакцинотерапии // Мед. иммунология. — 2006. — Т.8, №2-3. — С.334.
5. Гнедкова И.А. Использование лектинов для модификации клеток глиом головного мозга к цитотоксическому действию лимфоцитов крови // XI з'їзд онкологів України: матеріали з'їзду (Судак, АР Крим 29 травня-2 червня 2006 р.). — С.15.
6. Гнедкова И.А., Лисяный Н.И., Ромоданов С.А. 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 // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1996. — №10. — С.441-445.
7. Гнедкова И.А., Гнедкова М.А., Розуменко В.Д. и др. Лектины в диагностике, изучении патогенеза и лечении глиом головного мозга различной степени анаплазии // Матеріали IV з'їзду нейрохірургів України (Дніпропетровськ, 27-30 травня 2008 р.). — С.206-207.
8. Закеева И.Р., Бережной А.Е., Гнучев И.В. и др. Ингибиторные рецепторы лимфоцитов и их роль в противоопухолевом иммунитете // Вопр. онкологии. — 2007. — Т.3, №2. — С.140-144.
9. Кадагидзе З.Г., Славина Е.Т., Черткова А.И. Регуляторные Т-клетки и опухолевый иммунитет // Мед. иммунология. — 2005. — №2-3. — С.198-199.
10. Курмышкина О.В., Раппопорт Е.М., Пазынина Г.В., Бовин Н.В. Галектины как мишень при лечении рака молочной железы // Мед. иммунология. — 2006. — Т.8, №2-3. — С.343.
11. Лисяный Н.И., Гнедкова И.А., Бычкова С.А. и др. Особенности иммунологических нарушений при глиомах головного мозга в период ремиссии // Укр. нейрохірург. журн. — 2004. — №2. — С.55-61.
12. Лисяный Н.И., Гнедкова И.А., Гнедкова М.А. и др. Влияние лектинов на цитотоксическую активность лимфоцитов по отношению к клеткам глиом различной степени анаплазии // Имунология та алергологія. — 2008. — №1. — С.83-88.
13. Раппопорт Е.М., Моисеева Е.В., Чаадаева А.Ю. и др. Модификация клеточной мембраны апоптотических телец приводит к изменению галектин-зависимого фагоцитоза // Мед. иммунология. — 2006. — №2-3. — С.170.
14. Фукс Б.Б. Ключевые вопросы противоопухолевого иммунитета и гликоконъюгаты // Арх. патологии. — 1991. — №11. — С.17-22.
15. Шпакова А.П., Павлова К.С., Булычева Т.И. МТТ колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток // Клин. лаб. диагностика. — 2000. — №2. — С.20-23.
16. Basu P.S., Majhi R., Ghosh S., et al. Immunodiagnosis of the primary brain tumor (glioma) by the endogenous lectin // Clin. Chim. Acta. — 2002. — V.317, N1-2. — P.177-180.
17. Dawson G., Moskal J.R., Dawson S.A. 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. — V.89. — P.1436-1444.
18. Nakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingoglycolipid metabolism // Cancer Res. — 1996. — V.56, N23. — P.5309-5318.
19. Kleihus P., Cavenee W.K., World Health Organization classification of tumors of the nervous system pathology and genetics of tumors of the nervous system. World Health Organization classification of tumours. — Lyon, France: IARC Press, 2000. — 345 p.
20. Wischnusen J.E., Friese M.A., Mittelbronn M. et al. HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses in vitro: implications for immune escape in vivo // J. Neuropathol. Exp. Neurol. — 2007. — V.64, N6. — P.523-528.
21. Yamamoto H., Kaneko Y., Rebbaa A. et al. Gal β 1,4GlcNAc and 2,6-sialyltransferase a,2,6,-ST gene transfection alters the integrin-mediated invasivity of the human glioma cell line U-373 // Proceeding 87 Ann. Amer. Assoc. for Cancer Res. April 20-24, 1996.— Washington D.S., 1996. — P.63.

Вивчення протипухлинної дії рослинних лектинів на клітини гліом різного ступеня анаплазії

Лисяний М.І., Гнедкова І.А., Гнедкова М.А., Розуменко В.Д., Главацький О.Я.,
Малишева Т.А., Шмельова Г.А.

Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П.Ромоданова АМН України, м.Київ

Вивчена пряма цитотоксична дія лектинів сої (SBA), золотого дощу (LABA), арахісу (PNA), паростків пшениці (WGA), сочевиці (LCL), омели (Mil) на клітини гліом різного ступеня анаплазії *in vitro* в тестах з трипановим синім і за даними колориметричного МТТ-методу. Вивчений також вплив модифікації лектинами мембран клітин пухлин на їх чутливість до цитотоксичної дії алогенних лімфоцитів хворих і донорів. Встановлено, що різні рослинні лектини, взаємодіючи з клітинами пухлин, можуть спричинити як їх загибель, так і проліферацію.

Найбільшого прямого цитотоксичного ефекту на клітини гліоми досягав лектин арахісу. За короткочасного культивування з клітинами гліом він підвищував їх чутливість до цитотоксичної дії алогенних лімфоцитів хворих і донорів, що передбачає можливість подальшого його вивчення для модифікації клітин пухлин і їх використання як імунотерапевтичної вакцини у складі комбінованого лікування нейроонкологічних хворих.

Ключові слова: гліоми, цитотоксична активність лімфоцитів, протипухлинний імунітет, лектини.

Изучение противоопухолевого действия растительных лектинов на клетки глиом различной степени анаплазии

Лисяний Н.И., Гнедкова И.А., Гнедкова М.А., Розуменко В.Д., Главацкий А.Я.,
Мальшева Т.А., Шмелева А.А.

Институт нейрохирургии им акад. А.П. Ромоданова АМН Украины, г. Киев

Изучены особенности прямого цитотоксического действия (ЦД) лектинов сои (SBA), бобовника (LABA), арахиса (PNA), проростков пшеницы (WGA), чечевицы (LCL), омелы (Mil) на клетки глиом различной степени анаплазии *in vitro* в тестах с трипановым синим и по результатам колориметрического МТТ-метода. Также изучено влияние модификации лектинами мембран клеток опухоли на их чувствительность к ЦД аллогенных лимфоцитов больных и здоровых доноров. Установлено, что различные растительные лектины, взаимодействуя с клетками опухоли, могут вызывать как их гибель, так и пролиферацию.

Наиболее выраженный прямой цитотоксический эффект на клетки глиомы оказывал лектин арахиса. При кратковременном культивировании с клетками глиом он повышал их чувствительность к ЦД аллогенных лимфоцитов больных и доноров, что предполагает возможность дальнейшего изучения его свойств для модификации клеток опухоли и их использования в качестве иммунотерапевтических вакцин в составе комбинированного лечения пациентов с нейроонкологическими заболеваниями.

Ключевые слова: глиомы, цитотоксическая активность лимфоцитов, противоопухолевый иммунитет, лектины.

Study of plant lectins anti-tumor action on glioma cells of different stages of anaplasia

Lisyanu N.I., Gnedkova I.A., Gnedkova M.A., Rozumenko V.D., Glavatsky A.Ya.,
Malysheva T.A., Shmeleva A.A.

Institute of Neurosurgery named after A.P.Romodanov of the AMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

A direct cytotoxicity effect of lectins: soybean (SBA), laburnum anagyroides agglutinin (LABA), peanut agglutinin (PNA), wheat germ agglutinin (WGA), lentil lectin (LCL), mistletoe lectin (Mil) on the glioma cells of different stages of anaplasia using a colorimetry MTT-method were studied. The influence of lectin modification of tumor cell membranes on their sensitiveness to cytotoxicity action of allogenic lymphocytes in patients and healthy donors was also studied. It was established that different plant lectins could cause both death or proliferation when interacting with tumor cells.

The most marked cytotoxicity effect on glioma cells was produced by peanut lectin. The peanut lectin boosted glioma cells sensitiveness to cytotoxicity action of allogenic lymphocytes in patients and donors during short-term cultivation with glioma cells, which offers a possibility of further study of its properties for the modification of tumor cells and their use as immunotherapeutic vaccines in combined treatment of neurooncological patients.

Key words: gliomas, cytotoxicity action of lymphocytes, antitumor immunity, lectins.

Комментарий

к статье Лисяного Н.И. и соавторов «Изучение противоопухолевого действия растительных лектинов на клетки глиом различной степени анаплазии»

Из современных методических приемов, направленных на оптимизацию морфологической диагностики различных патологических процессов, включая опухоли различного гистогенеза, все большее внимание уделяют иммуногистохимии с применением лектинов. Лектины — это группа белков растительного и животного происхождения, обладающих общим свойством селективно связывать терминальные углеводные остатки гликоконъюгатов (гликопротеинов, гликолипидов, полисахаридов) на поверхности клеточных мембран без изменения их химической структуры. В настоящее время доказана диагностическая и прогностическая ценность использования лектинов в качестве селективных гистохимических маркеров в онкоморфологии, изучении закономерностей роста, дифференцировки и функционирования клеток и тканей, а также при тестировании активности различных биологических соединений.

Установлено также важное значение использования лектинов в исследованиях механизмов опухолевого роста. Поскольку при бластоматозной трансформации клеток нарушаются молекулярно-биохимические характеристики клеточных мембран, возникают патологические изменения структуры и функции лектиновых рецепторов. На этот процесс оказывают влияние уровень клеточной анаплазии и активность пролиферации опухолей, а также степень их инвазии. При этом оценка характера связывания различных лектинов с мембранными углеводными комплексами клеток опухолей может служить молекулярно-биохимическим тестом диагностики метаболических нарушений в опухоли. Кроме того, мембранные лектиновые рецепторы можно использовать в качестве мишеней для иммунотерапевтического воздействия на опухоль. Важно подчеркнуть, что в связи с обнаружением иммунокорректирующих и иммунотерапевтических свойств многих растительных и животных лектинов некоторые из них в этом качестве стали включать в состав комбинированного противоопухолевого лечения пациентов с различными онкологическими заболеваниями.

Представленные в работе материалы являются логическим продолжением приоритетных многолетних исследований лаборатории отдела нейроиммунологии Института нейрохирургии по изучению особенностей количественного и качественного распределения лектиновых рецепторов на мембранах клеток различных опухолей мозга и лимфоцитов периферической крови этих же больных. В связи с этим, по нашему мнению, было бы уместно в обзоре литературы хотя бы суммарно привести основные результаты исследований, накопленные авторами по этой проблеме, с акцентом на выявленные закономерности. Наряду с этим, несомненный интерес могли бы представить и данные гистохимических исследований лектинов на тканевом уровне в глиомах различной степени злокачественности.

В статье представлены результаты новых экспериментальных разработок по изучению лектинов, направленные на выяснение возможности их использования в комплексном лечении глиом головного мозга. С этой целью авторами проведены многосторонние исследования характера прямого (контактного) воздействия различных лектинов на клетки 45 нейроэктодермальных опухолей мозга в краткосрочных культурах (суспензионных и фиксированных к адгезивному субстрату). На этих моделях *in vitro* в возрастающей концентрации (от 2,5 до 20 мкг в 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида) тестировано прямое селективное действие лектинов сои, бобовника, арахиса, пшеницы, чечевицы на клетки глиом различной степени анаплазии. Ответную реакцию клеток опухолей на воздействие лектинов оценивали количественно по результатам определения цитотоксичности стандартными методами (с трипановым синим и в МТТ-тесте) с учетом исходной гистоструктуры и степени анаплазии опухолей.

В специальной серии экспериментов авторы изучали также возможность модификации гликоконъюгатов клеточных мембран глиом лектинами в целях повышения чувствительности клеток опухолей к цитотоксическому действию аллогенных лимфоцитов больных и доноров. В дальнейшем при получении ожидаемых положительных результатов авторы планируют использовать модифицированные лектинами клетки опухолей для приготовления иммунотерапевтических вакцин, которые предполагают применять в комбинированном лечении пациентов с нейроонкологическими заболеваниями.

Уместно подчеркнуть, что для нейроонкологии разработка подобного аспекта исследований является новым перспективным направлением.

Результаты проведенных исследований показали разнонаправленный характер воздействия различных лектинов на жизнеспособность клеток опухолей в данных условиях эксперимента. Об этом свидетельствуют приведенные в табл. 1 и 2 величины относительных коэффициентов влияния лектинов на 4-часовые культуры прикрепленных к субстрату клеток глиом по отношению к контрольным. Однако эти цифровые данные трудно воспринимаемы, поскольку не приведена оценочная градация выявленных эффектов с конкретным заключением — для какой концентрации тех или иных лектинов и для каких опухолей регистрируется соответственно низкая, средняя или высокая степень снижения (или повышения) жизнеспособности клеток по отношению к контролю. Логично предположить возможность резистентности некоторых глиом к воздействию лектинов. Неясно также, в каких цифровых пределах следует считать значимым повышение жизнеспособности клеток опухолей после инкубации с некоторыми лектинами и в каких гистологических группах глиом этот феномен выявляли наиболее часто. Текстуальная интерпретация данных этой таблицы не вносит достаточной ясности в трактовку цифрового материала этих наблюдений. По нашему мнению, уточнение этих моментов имеет важное практическое значение, учитывая поставленную в работе цель — на основании сравнительной оценки цитотоксической активности ряда лектинов в отношении культивируемых глиом различной гистоструктуры и степени анаплазии определить возможность и целесообразность избирательного применения некоторых из них в разработке новых иммунотерапевтических вакцин.

Результаты тестирования лектинов в суспензионных клеточных 24-часовых культурах опухолей мозга в работе обсуждаются более детально, поскольку в этих опытах эффективность достижения цитотоксического эффекта более

высокая, что, вероятно, может быть связано, во-первых, с использованием одной наиболее высокой концентрации (20 мкг/мл) тестируемых лектинов, во-вторых, с более длительной их инкубацией с клетками культуры.

Большой интерес вызывают наблюдения астроцитом, в которых после инкубации с лектином пшеницы регистрируется увеличение относительного количества жизнеспособных клеток опухоли при одновременном снижении (на 50%) их общего количества. Однако после инкубации клеток астроцитом с лектином сои наблюдали обратный эффект — снижение жизнеспособности клеток (на 15–30%) при увеличении их количества. Это отражает феномен избирательности и разнонаправленности механизмов действия лектинов на клетки опухолей, обладающие, по-видимому, различной индивидуальной чувствительностью к разным лектинам, что необходимо учитывать в дальнейшем при их использовании в комплексной антибластической терапии опухолей мозга.

В связи с обнаружением в ряде наблюдений разнонаправленного характера реакции глиом на воздействие лектинов считаем целесообразным в дальнейшем проводить сопоставительный анализ полученных иммунологами результатов с оценкой гистоструктурных особенностей индивидуальных глиом, и прежде всего, с уровнем их митотической активности, а также выраженностью атипии клеток и сосудистого фона. Такие сведения, характеризующие гистобиологические особенности каждой из тестируемых в эксперименте глиом, будут полезны для углубленной индивидуальной интерпретации иммунологических показателей. Ведь хорошо известно, что даже в пределах одной гистологической группы анапластических глиом наблюдаются существенные различия пролиферативной активности. Оценка этого показателя наиболее доступна с помощью митотического индекса. Возможно, такие сопоставления окажутся полезными при пояснении феномена стимулирующего эффекта воздействия некоторых лектинов на клетки глиом в данном эксперименте.

По нашему мнению, из результатов проведенных экспериментальных исследований уже на данном этапе следует принципиально важный практически вывод о том, что при разработке протокола рекомендаций по внедрению некоторых лектинов в комплекс лечебных мероприятий в нейроонкологии целесообразно предусмотреть этап предварительного определения индивидуальной чувствительности клеток глиом к воздействию панели лектинов *in vitro* подобно стандартным методам тестирования противоопухолевых препаратов. Этот практически важный вывод целесообразно было бы включить в раздел выводов настоящей работы.

Исключительно интересны представленные в статье результаты экспериментов, показывающие реальную возможность модификации лектинами биологических свойств клеток опухолей в целях повышения их чувствительности к цитотоксическому действию аллогенных лимфоцитов больных с глиомами различной степени злокачественности. Такие разработки уже имеются в общей онкологии относительно новообразований различного гистогенеза. В работе авторами убедительно подтверждена такая возможность и в отношении глиом головного мозга.

*В.М. Семенова, доктор мед. наук
зав. лабораторией культивирования тканей
Института нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова АМН Украины*