

**ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕКТИНОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К ФУКОЗЕ И СИАЛОВОЙ КИСЛОТЕ, С ОПУХОЛЕВЫМИ В- И Т-ЛИМФОБЛАСТАМИ ЧЕЛОВЕКА  
IN VITRO****Ю.М. Гармаза<sup>1</sup>, Д.С. Мигун<sup>2</sup>, А.В. Тамашевский<sup>1</sup>**<sup>1</sup>*Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий,  
Минск, [tayzoe@gmail.com](mailto:tayzoe@gmail.com)*<sup>2</sup>*Белорусский государственный университет, Минск*

Гликозилирование – один из наиболее распространенных метаболических процессов, связанных с посттрансляционной модификацией во многих физиологических системах. В этом процессе различные типы сахаров и полисахаридов (например, N-, O-связанные гликаны, фосфорилированные гликаны, гликозаминогликаны и т.п.) присоединяются к структуре основной цепи (аминокислоте или глицерину) сахаридов, белков или липидов. Цепи сахаров, находящиеся на клеточной поверхности, играют важную роль в межклеточной коммуникации, каскадах передачи сигналов и регуляции иммунных ответов [1].

Одна из основных особенностей опухолевых клеток – это aberrантное гликозилирование. Принято считать, что этот процесс является ключевым в трансформации нормальных клеток в опухолевые. Он способен маскировать некоторые рецепторные системы клеток, и они перестают отвечать на внешние сигналы, в частности, на сигналы, индуцирующие процессы “апоптоза” (запрограммированную гибель клетки). В результате этого клетка теряет способность к естественной гибели и перерождается в “бессмертную” (раковую). Такими типичными углеводными изменениями, которые позволяют дифференцировать опухолевые и нормальные клетки, являются процессы фукозилирования и сиализации. Степень выраженности этих процессов позволяет “различать” патологические клетки от нормальных и открывает новые перспективы как для диагностики, так и для селективной терапии. В этом плане одним из перспективных направлений является использование лектинов – углеводосвязывающих белков, которые способны специфично взаимодействовать с различными сахарами и олигосахаридами на клеточной поверхности [1].

В настоящее время выделены и охарактеризованы многие лектины с различными свойствами. Очевидно, что лектины со специфичностью к фукозе и сиаловым кислотам могут рассматриваться в качестве селективных систем доставки лекарственных средств к опухолевым клеткам. Более того, некоторые лектины, сами по себе обладают антинеопластическими свойствами и способны индуцировать “апоптоз” опухолевых клеток. Одним из основных преимуществ использования лектинов в качестве апоптоз-индуцирующих факторов при терапии опухолей является их способность активировать внутренние механизмы клетки, приводящие ее к естественной гибели. Такой подход позволяет избежать мобилизации опухолевыми клетками детоксикационных защитных механизмов, приводящих впоследствии к развитию феномена множественной лекарственной резистентности [2, 3].

Показано, что противоопухолевая активность растительных лектинов опосредуется путем задействования различных механизмов клеточного ответа (генерация активных форм кислорода (АФК), дегрануляция, увеличение внутриклеточного пула ионов кальция, синтез цитокинов и др.), которые являются отдельными элементами сигнальных каскадов, приводящих впоследствии клетку к “апоптозу” [3, 4].

Цель работы – исследовать молекулярно-мембранные особенности взаимодействия лектинов, специфичных к фукозе и сиаловой кислоте, с опухолевыми клеточными линиями человека IM-9 и MOLT-4.

**Материалы и методы.** В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров, полученная из ГУ "Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий" Минздрава Республики Беларусь. Все образцы крови были в консерванте “гепарин”. В качестве модельных систем опухолевых клеток крови в работе использована коммерческая В-лимфобластоидная клеточная линия IM-9 (ATCC CCL 159) и Т-лимфобластоидная клеточная линия MOLT-4 (ATCC CRL 1582).

В качестве лектина, специфичного к фукозе, был использован лектин, выделенный из луковиц тюльпана (*Tulipa lectin*). В качестве лектина, специфичного к сиаловой кислоте, был использован лектин, выделенный из семян пшеницы *Triticum vulgare*, также известный как агглютинин зародышей пшеницы (*WGA lectin*). Все растворы лектинов были приготовлены в трис-НСl буфере рН

8,0, содержащем 0,1% азид натрия, которые для проведения эксперимента путем диализа переводились в PBS pH 7,4. Далее в работе были использованы концентрации лектинов от 10 нг/мл до 100 мкг/мл.

Изолированные периферические мононуклеарные клетки крови человека (ПМНК) и клеточные культуры инкубировали с лектинами в различных концентрациях в течение 20 ч, а затем использовались согласно экспериментальным протоколам исследования.

Чувствительность ПМНК и клеточных линий к лектинам определяли с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромида (МТТ-тест, Sigma). Он позволяет проводить сравнительную оценку метаболической (дегидрогеназной) активности митохондрий, степень которой коррелирует с жизнеспособностью клеток.

Оценка уровня содержания активных форм кислорода в исследуемых клетках проводилась методом проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентного зонда 5-хлорометил-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes).

Количественное определение содержания низкомолекулярных антиоксидантов (НА) в ПМНК и клеточных линиях проводили с использованием коммерческого набора Antioxidant Assay Kit (Sigma).

Для оценки модификации микровязкости липидного бислоя мембран ПМНК и клеточных линий до и после воздействия лектинов, в работе был использован липофильный флуоресцентный зонд 6-додеканол-2-диметиламинонафтален (лаурдан).

Результаты экспериментов (n=5-7) анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрических критериев Манна-Уитни и Уилкоксона. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  в программе STATISTICA 8.0.

**Результаты.** Для тестирования лектинов различной специфичности использовались клеточные линии человека MOLT-4 и IM-9, которые моделируют *in vitro* такие онкологические заболевания, как острый Т-лимфобластный лейкоз и множественную В-миелому, соответственно. Методом проточной цитометрии было определено процентное содержание специфических рецепторов, экспрессированных на поверхности клеточных линий человека MOLT-4 и IM-9, а также суммарной популяции периферических мононуклеаров, выделенных из крови условно здоровых доноров. С применением моноклональных антител к специфическим рецепторам CD3 (Т-лимфоциты) и CD19 (В-лимфоциты) показано, что содержание Т-клеток в клеточной линии MOLT-4 составило в среднем  $60,9 \pm 9,7\%$ , а количество В-клеток в линии IM-9 составило в среднем  $82,9 \pm 5,7\%$ . Содержание Т- и В-лимфоцитов в суммарной популяции периферических мононуклеаров, выделенных из крови условно здоровых доноров, составило, в среднем  $71,1 \pm 6,2\%$  и  $10,7 \pm 3,1\%$  соответственно.

Известно, что лектины – это белки и гликопротеины природного происхождения, обладающие способностью высокоспецифично связывать остатки углеводов на поверхности клеток, в частности, вызывая их агглютинацию. Они могут вызывать агглютинацию эритроцитов, а также обладают избирательной митогенной активностью в отношении различных субпопуляций клеток крови. Сотрудниками лаборатории медицинской биотехнологии Института биохимии им. Г. Бунятыана НАН Республики Армения (г. Ереван, Армения), были изолированы и очищены лектины со специфичностью к фукозе и сиаловой кислоте. Лектин, выделенный из луковиц тюльпана (*Tulipa*) проявляет сложную специфичность, тогда как его агглютинация с человеческими эритроцитами легко ингибируется N-ацетилгалактозамином, лактозой, фукозой и галактозой. Лектин, выделенный из семян пшеницы *Triticum vulgare*, также известный как агглютинин зародышей пшеницы (WGA), один из наиболее изученных и охарактеризованных лектинов, широко распространенных в питании. Он специфически связывается с N-ацетил-D-глюкозамином и, как было показано, способен взаимодействовать с остатками сиаловой кислоты.

На первом этапе работы была проведена серия экспериментов по определению процентного содержания апоптотических/некротических клеток в лимфоцитах условно здоровых доноров и опухолевых клеточных линиях MOLT-4 и IM-9 после 20 ч воздействия исследуемых лектинов *in vitro* в широком диапазоне концентраций. Установлено, что лектин, выделенный из зародышей пшеницы и обладающий специфичностью к сиаловой кислоте, проявлял максимальную цитотоксичность в отношении клеточной линии IM-9 и минимальную – в отношении суммарной популяции лимфоцитов доноров, а лектин, выделенный из луковиц тюльпана и обладающий специфичностью к фукозе, в максимальной степени снижал жизнеспособность клеточной линии MOLT-4 и в минимальной – суммарной популяции лимфоцитов доноров. Ранее было показано, что маннозо-специфичный лектин ConA из *Conavalin brasiliensis* L. также запускает процесс “апоптоза” в лей-

козных клетках человека MOLT-4 и HL-60, проявляя меньшую цитотоксичность по отношению к лимфоцитам периферической крови здорового человека [5].

С целью исследования молекулярно-мембранных клеточных процессов, являющихся элементами сигнальных каскадов, способных привести клетку к “апоптозу”, нами была проведена оценка накопления АФК в цитозоле клеток и модификация липидного бислоя клеточной мембраны до и после взаимодействия с лектинами. Для возможности сопоставления результатов, полученными при определении процентного содержания апоптотических/некротических клеток, диапазон концентраций и временной интервал инкубации клеток с лектинами были взяты такие же, как и в предыдущем этапе работы.

Определение содержания АФК в исследуемых клеточных популяциях после воздействия *in vitro* лектинов, специфичных к фукозе и сиаловой кислоте, в течение 20 ч в диапазоне концентраций от 10 нг/мл до 100 мкг/мл показало, что максимальное содержание АФК наблюдалось в опухолевых клеточных линиях MOLT-4 и IM-9, а минимальное – в лимфоцитах условно здоровых доноров после воздействия исследуемых лектинов. Более того, оценка содержания низкомолекулярных антиоксидантов выявила статистически достоверное их снижение в обеих опухолевых клеточных линиях практически на всем исследуемом диапазоне концентраций лектинов. Причем, для лектина *WGA* снижение содержания НА в клеточных линиях было выражено в большей степени относительно лектина *Tulipa*. В свою очередь, в ПМНК доноров содержание НА практически не отличалось от интактных клеток после воздействия обоих типов лектинов.

Оценка модификации микровязкости липидного бислоя мембран ПМНК доноров и клеточных линий IM-9/MOLT-4 после воздействия лектинов *in vitro* продемонстрировала, что при взаимодействии клеток с исследуемыми лектинами происходит смещение баланса между “жидкокристаллической” и “гелевой” липидными фазами в сторону последней, характеризующейся снижением молекулярной динамики фосфолипидов и проницаемости внешнего липидного монослоя в мембранах клеток. Причем данный эффект в большей степени был выражен именно в опухолевых клеточных линиях MOLT-4/IM-9 по сравнению с периферическими мононуклеарными клетками доноров.

**Заключение.** Исследовано влияние лектинов, специфичных к фукозе и сиаловой кислоте (*Tulipa* и *WGA*) на опухолевые клеточные линии человека IM-9 (В-лимфоциты)/MOLT-4 (Т-лимфоциты) и периферические мононуклеары условно здоровых доноров *in vitro*. Установлено, что отдельное применение именно фукозного лектина *Tulipa* способно индуцировать процессы “апоптоза” в опухолевых В- и Т- лимфоцитарных клетках, не затрагивая при этом здоровые клетки, но лишь в определенном диапазоне концентраций. Продемонстрирована ключевая роль окислительно-восстановительного баланса и модификации мембранных липидов в механизме развития процессов “апоптоза” в клеточных линиях IM9/MOLT-4 при их взаимодействии с лектинами.

**Благодарности.** Работа поддержана международным грантом ГКНТ Беларусь-Армения M21АРМГ-003 «Лектинсодержащие транспортные системы для селективной доставки лекарств к опухолевым и бактериальным клеткам» (2021–2023 гг.). Авторы благодарят сотрудников лаборатории медицинской биотехнологии Института биохимии им. Г. Бунятыана НАН Республики Армения (г. Ереван, Армения) под руководством к.б.н. В.К. Гаспаряна, которыми была проведена изоляция и очистка лектинов с различной специфичностью для возможности проведения данного исследования.

#### Список использованных источников

1. Гармаза Ю.М., Мигун Д.С., Тамашевский А.В. Роль гликозированных белков в диагностике и лечении онкозаболеваний // Новости медико-биологических наук. – 2023. – Т. 23, №2. – С. 98–108.
2. Bhutia S.K., Panda P.K., Sinha N., Praharaj P.P., Bhol C.S., Panigrahi D.P., Mahapatra K.K., Saha S., Patra S., Mishra S.R., Behera B.P., Patil S., Maiti T.K. Plant lectins in cancer therapeutics: Targeting apoptosis and autophagy-dependent cell death // Pharmacol. Res. – 2019. – Vol. 144. – P. 8–18.
3. Тимошенко А. В. Гликобиология и биомедицинское применение лектинов // Вестник Белорусского государственного университета. Сер. 2, Химия. Биология. География. – 1997. – № 2. – С. 38–47.
4. Buettner M.J., Shah S.R., Saeui C.T., Ariss R., Yarema K.J. Improving immunotherapy through glycodesign // Front. Immunol. – 2018. – Vol. 9:2485.
5. Faheina-Martins G.V., da Silveira A.L., Cavalcanti B.C., Ramos M.V., Moraes M.O., Pessoa C., Araújo D.A. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines // Toxicol. in Vitro. – 2012. – Vol. 26, n. 7. – P. 1161–1169.