

КАРПОВА І. С.<sup>1✉</sup>, ШУБА І. М.<sup>2✉</sup>, ЛИЛО В. В.<sup>1</sup>, ГЛАВАЦЬКИЙ О. Я.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150, ORCID: 0000-0002-8472-6452, 0000-0001-8626-328

<sup>2</sup> Державна установа «Інститут нейрохірургії ім. Акад. А. П. Ромоданова НАМН України»,

Україна, 04050, м. Київ, вул. П. Майбороди, 32, ORCID: 0000-0003-4385-4877, 0000-0003-0889-9762

✉ [karpovair79@gmail.com](mailto:karpovair79@gmail.com), [shuba.iryana@gmail.com](mailto:shuba.iryana@gmail.com)

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЛЕКТИНОВИХ РЕЦЕПТОРІВ НА МЕМБРАНАХ ЕРИТРОЦИТІВ ПАЦІЄНТІВ, ХВОРИХ НА ГЛІОБЛАСТОМУ

**Мета.** Пошук відхилень реакції рецептор-лектин, асоційованих з діагнозом гліобластома, які б могли мати значення для діагностики. **Методи.** Зразки еритроцитів були отримані у 22 осіб, розподілених на дві когорти: донори без онкологічного діагнозу, пацієнти з гліобластомою (ГБ). Використовували панель із 9 комерційних лектинів (LECTINOTEST, Львів, Україна): ConA, WGA, РНА-Р; РНА-Е; РНА-Л, SNA, VAA, STA та LABA. Також був використаний оригінальний лектин з чашолистків хурми під назвою ЛЧХ (PSL). Його було отримано шляхом ізоелектричного фокусування та фракціонування сульфатом амонію. Інтенсивність лектин-рецепторних взаємодій визначали у реакції гемаглютинації. **Результати.** Два лектини виявили певні спрямовані відхилення у пацієнтів, порівнюючи з донорами. Для аглютиніну зародків пшениці (WGA) зміни інтенсивності зв'язування лектину з рецептором були спрямовані у бік зниження. У випадку Л хурми (PSL) спостерігався альтернативний результат: інтенсивність гемаглютинації виявила тенденцію до перевищення рівня контролю. **Висновки.** У всіх обстежених спостерігаються індивідуальні особливості реакції еритроцитів з набором лектинів. У пацієнтів з підтвердженим діагнозом гліобластома для двох досліджуваних лектинів, а саме WGA та лектину хурми, спостерігалися односпрямовані відхилення у реакції еритроцитів хворих на ГБ, порівнюючи з особами без онкологічного діагнозу.

**Ключові слова:** панель лектинів, гліобластома, еритроцити, односпрямовані відхилення.

Мультиформна гліобластома (ГБ) – найбільш розповсюджена і найбільш агресивна форма пухлини мозку, яка становить до 52 % первинних пухлин мозку і до 20 % всіх внутрішньочерепних пухлин. ГБ є злоякісною гліальною пухлиною головного мозку – найбільш поширеною

формою онкологічної патології головного мозку з вкрай несприятливим прогнозом. Фатальність несприятливого прогнозу при злоякісних гліомах у більшості випадків, високий рівень інвалідизації й смертності в короткі терміни від початку захворювання надають особливу медико-соціальну значущість визначенню оптимальної тактики лікування, заснованої на міждисциплінарному підході. Комплексне лікування гліом супратенторіальної локалізації передбачає проведення хірургічного втручання, спрямованого на максимально можливе видалення пухлини в межах фізіологічної дозволеності, зі збереженням високої якості життя пацієнтів з наступними променевою і хіміотерапією.

Увага до лектинів (Л) – великої групи білків рослинного і тваринного походження, які здатні селективно й нековалентно зв'язувати вуглеводи, а також глікокон'югати (глікопротеїни, гліколіпіди, полісахариди) на поверхні клітинних мембран, базується на їх великому діагностичному і прогностичному потенціалі [1–4]. В онкоморфології Л використовуються як селективні гістохімічні маркери. Встановлено також важливе значення Л у дослідженнях механізмів злоякісної трансформації. За допомогою екзогенних Л можна охарактеризувати зміни профілю глікозилування рецепторів клітинної поверхні у відповідь на зміни, асоційовані з бластоматозною трансформацією [5].

Серед усіх типів клітин мембрани еритроцитів особливо насичені вуглеводами і глікокон'югатами, що зв'язують Л. Це зробило реакцію гемаглютинації універсальним і доступним тестом для виявлення аномалій у структурі рецепторів клітинної поверхні, які супроводжують розвиток патологічного процесу [6, 7].

Для характеристики профілю гліканів і глікокон'югатів еритроцитарних мембран хворих на гліобластома (ГБ) застосували розроблений

нами раніше лектинотест, який пройшов апробацію при обстеженні ліквідаторів аварії на ЧАЕС. Еритроцити ліквідаторів характеризувались направленими відхиленнями інтенсивності реакції з певними Л, що корелювали зі змінами показників імунного й ендокринного статусу [7].

### Матеріали і методи

У цьому дослідженні було застосовано оригінальний еритроцитарний лектинотест [7] з використанням 9 комерційних Л виробництва вітчизняної фірми ЛЕКТИНОТЕСТ, Львів, Україна: Конканавалін А (ConA); лектин зародків пшениці (WGA); ізолектини квасолі звичайної ФГА-Р; ФГА-Е; ФГА-Л; лектин кори бузини чорної (SNA); лектин омели білої (VAA); лектин картоплі (STA); лектин кори золотого дощу (LABA). Також був використаний оригінальний лектин з чашолистків хурми східної (*Diospyros kaki* Th.), умовно позначений як ЛЧХ (PSL).

Л хурми було виділено за умов ізоелектрофокусування, де мажорна (кількісно найбільша) фракція білка концентрувалася у слабкокислій зоні (рН 4,5–5,0) з наступним висолуванням 0,5 М сульфатом амонію. Препарат виявляв гемаглютинувальну активність щодо еритроцитів людини в мінімальній концентрації 4 мкг/мл. Він виявив специфічність до сіалових кислот. За результатами електрофорезу в 10 %-му ПААГ препарат утворює одну смугу, яка відповідає мол. масі ~30 кДа.

Суспензію нативних людських еритроцитів отримували з крові пацієнтів, які проходили лікування в період з 2021 до 2022 року в ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України». Всі хворі були інформовані щодо проведення досліджень та їхньої мети. У випадку хірургічного лікування гістологічний діагноз встановлювали у відділі патоморфології в ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України» згідно WHO-класифікації пухлин центральної нервової системи (ЦНС) 2016 року [8] з уточненнями згідно WHO-класифікації пухлин ЦНС 2021 року [9]. Групу порівняння складала пацієнти без підтвердженого онкологічного діагнозу.

Периферичну кров збирали у стерильні центрифужні пробірки, до яких попередньо додавали гепарин у співвідношенні 1:10 (гепарин : цільна кров) і центрифугували 10 хв при 1000 обертів / хв. Верхній шар плазми видаляли. До осаду, що містив еритроцитарну фракцію, додавали рівні об'єми забуференого фізіологічного

розчину (ЗФР, рН 7,4), обережно перемішували та центрифугували 10 хв при 1000 обертів / хв. Процедуру повторювали двічі.

Перед використанням лектини розчиняли у фізіологічному розчині (0,15 М NaCl) до концентрації 100 мкг/мл і готували серію дворазових розведень в імунологічному 96 лунковому планшеті з U-подібним дном. Гемаглютинувальну активність (ГАА) лектинів оцінювали візуально, додаючи 2 % суспензію нативних людських еритроцитів в ЗФР з рН 7,4 у кожен лунку 96-лункового полістирольного планшета. Результати реакції гемаглютинації представляли як цілі числа (умовні одиниці), що відображають діаметр осаду еритроцитів, де 1 одиниця еквівалентна діаметру 1 мм з просвітом в центрі, 2 одиниці – 2 мм і 3 одиниці – 3 мм, відповідно. За відсутності реакції на дні лунки формувалася щільний осад у вигляді крапки. Інтенсивність ГАА (позначається як N) розраховували для кожного лектину шляхом підсумовування значень в умовних одиницях уздовж відповідного ряду лунок аж до останнього розведення лектинів, де ще спостерігалася гемаглютинація [7].

### Результати та обговорення

Відомо, що за багатьох патологічних станів відбуваються зміни профілю поверхневих гліканів і глікокон'югатів, які у пацієнтів з однаковим діагнозом можуть набувати односпрямованого характеру, що важливо для діагностичних цілей. Звідси розвиток патології може супроводжуватись зміною інтенсивності взаємодії поверхні еритроцитів пацієнта, яка надзвичайно насичена вуглеводними групами, з вуглеводзв'язувальними білками – лектинами.

У таблиці представлено характеристику пацієнтів, які увійшли у дослідження, після проведеної подальшої діагностики та отриманих результатів лікування були розділені на дві групи: пацієнти-донори та пацієнти, у яких було підтверджено діагноз гліобластома (IDH-wild type 4 ступеня анаплазії).

Як видно з даних таблиці, принципівих відмінностей щодо статі, віку та групи крові системи АВО у хворих на ГБ і представників групи порівняння не виявлено.

Діагностичне значення має тенденція до зниження або збільшення інтенсивності взаємодії Л і відповідного рецептора, яка реєструється в реакції гемаглютинації (рис. 1).

Таблиця. Характеристика когорти досліджуваних (пацієнтів-донорів і пацієнтів хворих на гліобластому)

	Пацієнти-донори			Хворі на гліобластому		
	Стать	Вік	Група крові, резус-фактор	Стать	Вік	Група крові, резус-фактор
1	чол	61	A (+)	чол	67	AB (-)
2	чол	36	A (-)	чол	26	A (+)
3	чол	43	O (+)	чол	64	O (+)
4	жін	50	A (+)	жін	55	A (+)
5	чол	59	O (+)	чол	48	A (-)
6	чол	60	O (+)	жін	42	A (+)
7	жін	57	A (+)	чол	56	B (+)
8	жін	49	B (+)	чол	52	A (+)
9	жін	60	O (+)	жін	49	O (+)
10	жін	46	A (+)	чол	39	A (+)
11	чол	26	A (+)	чол	63	B (+)

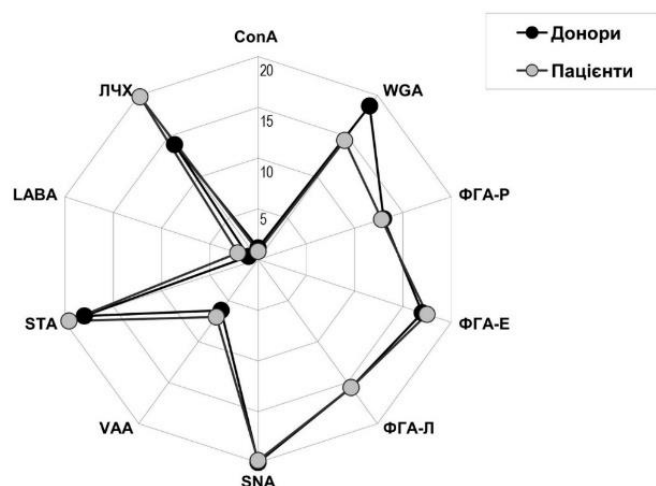


Рис. 1. Пелюсткова діаграма результатів зіставлення середніх значень показника інтенсивності гемаглютинації (N) для кожного дослідженого лектину в групі пацієнтів хворих на ГБ і групі донорів. На шкалі відкладено значення N в умовних балах.

Як видно з даних невеликого пілотного дослідження, представлених на рисунку, у двох випадках лектинів – WGA та ЛЧХ (PSL) виявлено односпрямовані відхилення. У хворих на ГБ у реакції їх еритроцитарних рецепторів і WGA спостерігалось зниження лектинової активності. У випадку ЛЧХ виявлено збільшення інтенсивності взаємодії з відповідними рецепторами. Отже, знайдено певні особливості в реакції еритроцитів пацієнтів з ГБ, порівнюючи з особами без онкологічного діагнозу.

У ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України» проводились пріоритетні багаторічні дослідження, присвячені

характеристикам і розподілу лектинових рецепторів на мембранах клітин, отриманих з пухлин головного мозку різного ступеня анаплазії, та паралельно на лімфоцитах периферичної крові одних і тих же пацієнтів [4, 5]. Результати продемонстрували вибірковість і різноспрямованість (більша або менша інтенсивність) взаємодії певного Л з поверхневими рецепторами як пухлинних клітини, так і лімфоцитів. Це може відображати різну індивідуальну чутливість / резистентність до різних лектинів. Цікаво, що у випадку астроцитом привернув увагу WGA. Після інкубації клітин з WGA спостерігалось зниження їхньої загальної кількості на 50 %. Загалом на підставі

порівняльної оцінки цитотоксичності певних лектинів щодо культивованих клітин гліом автори передбачають можливість застосування деяких із них у розробці нових імунотерапевтичних вакцин.

У нашому дослідженні лектин WGA характеризувався зниженням інтенсивності реакції з відповідними рецепторами еритроцитарної мембрани у пацієнтів проти такої у донорів. Можливо, зміни якісного складу або кількісного розподілу еритроцитарних рецепторів, здатних зв'язуватись з WGA, у хворих на гліому, не є випадковими і виявляться корисними при попередньому обстеженні пацієнтів.

Мажорний лектин із чашолистків хурми виявився сіалоспецифічним глікопротеїном. У наших попередніх дослідженнях *in vivo* на білих нелінійних щурах ЛЧХ спричиняв 3-кратне зростання вмісту мРНК інтерферону  $\alpha$  (ІФНа), а також активував експресію трьох генів-мішеней інтерферону [10]. Отже, рецептори цього лектину асоційовані з ІФНа – важливим компонентом системи вродженого імунітету, який виявляє імуномодулюючу й антипроліферативну активність і використовується в медичній практиці як допоміжний засіб при онкологічних захворюваннях. Розкриття можливого зв'язку рецепторів ЛЧХ із

розвитком онкологічного процесу є темою для подальших досліджень.

Для підтвердження діагностичних можливостей реакції рецептор-лектин у хворих на ГБ потрібно обстеження більшого контингенту осіб і розширення спектру лектинів з акцентом на лектини лікарських рослин.

### Висновки

1. У всіх обстежених осіб спостерігаються індивідуальні особливості в реакції еритроцитів з набором комерційних лектинів.

2. Односпрямованих відхилень у пацієнтів із підтвердженим діагнозом гліобластома в реакції еритроцитарних рецепторів з панеллю комерційних лектинів (ConA, РНА-Р, РНА-Е, РНА-Л, SNA, VAA, STA, LABA) не виявлено.

3. Для двох досліджуваних лектинів, а саме WGA та ЛЧХ (PSL) спостерігали односпрямовані відхилення в реакції еритроцитів пацієнтів хворих на ГБ, порівнюючи з особами без онкологічного діагнозу.

*Це дослідження проводилося як фрагмент науково-дослідної роботи «Дослідити ефективність ад'ювантних імунотерапевтичних та радіотерапевтичних технологій в комплексному лікуванні злоякісних гліальних пухлин головного мозку» (шифр: В/І.К. 26.02.04.20 та номер держреєстрації № 0119U103900, КПКВ: 6561040).*

### References

1. Hamid R., et al. Lectins: proteins with diverse applications. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2013. Vol. 3. P. 93–103. doi: 10.7324/JAPS.2013.34.S18•1.
2. Sze Kwan Lam, Tzi Bun Ng. Lectins: production and practical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. Vol. 89. P. 45–55. doi: 10.1007/s00253-010-2892-9.
3. Yamazaki N., et al. Endogenous lectins as targets for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000. Vol. 43. P. 225–244. doi: 10.1016/s0169-409x(00)00071-5.
4. Lisyany N. I., Gnedkova I. A., Gnedkova M. A., Rozumenko V. D., Glavatsky A. Ya., Malysheva T. A., Shmeleva A. A. Study of the antitumor effect of plant lectins on glioma cells of varying degrees of anaplasia. *Ukr. Neurosurg J.* 2009. No. 1. P. 30–36. [in Ukrainian]
5. Lisyany N. I., Gnedkova I. A., Rozumenko V. D., Glavatsky A. Ya., Malysheva T. A., Features of immunological disorders in brain gliomas during remission. *Ukr Neurosurg J.* 2004. No. 2. P. 55–61. [in Ukrainian]
6. Golynska E. L., Petrusha N. O., Shatunova I. V. Method for diagnosing new creation. Pat. 3060 UA, C 1 G 01 N 33/53; published on 26.12.1994, Bul. No°5. 1 p. [in Ukrainian]
7. Karpova I. S. Specific interactions between lectins and red blood cells of Chernobyl cleanup workers as indicator of some late radiation effects. *Exp. Oncol.* 2016. Vol. 38. P. 261–266. Retrieved from: <http://dspace.nbuv.gov.ua/handle/123456789/137747>.
8. Louis D. N., Perry A., Reifenberger G. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016. Vol. 131, No. 6. P. 803–820. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
9. Louis D. N., Perry A., Wesseling P. et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology.* 2021. Vol. 23, No. 8. P. 1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106.
10. Dragushchenko O. O., Minya I. Y., Polezhaeva T. A., Starosyla D. B., Karpova I. S., Obolenska M. Yu., Rybalko S. L. The effect of antiviral substances of different chemical nature on gene expression IFN $\alpha$ , OAS1a, RNase L. *Ukr. Biochem. J.* 2012. Vol. 84, No. 4. P. 32–40. Retrieved from: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem\\_2012\\_84\\_4\\_5](http://nbuv.gov.ua/UJRN/BioChem_2012_84_4_5).

KARPOVA I. S.<sup>1</sup>, SHUBA I. M.<sup>2</sup>, LYLO V. V.<sup>1</sup>, GLAVATSKYI O. Y.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine,  
Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotnogo str., 150

<sup>2</sup> The State Institution "Romodanov Neurosurgery Institute, NAMS of Ukraine",  
Ukraine, 04050, Kyiv, Mayborody str., 32

#### CHARACTERISTICS OF LECTIN RECEPTORS ON ERYTHROCYTE MEMBRANES OF PATIENTS WITH GLIOBLASTOMA

**Aim.** This work is devoted to the search the abnormalities of the receptor-lectin reactions associated with glioblastoma for diagnostic purposes. **Methods.** Red blood cell (RBC) specimens were taken from 22 persons distributed into the two cohorts: donors without an oncological diagnosis; patients with glioblastoma (GB). Panel of 9 commercial lectins (LECTINOTEST, Lviv, Ukraine) was used: ConA, WGA, PHA-P; PHA-E; PHA-L, SNA, VAA, STA, and LABA. Also the original lectin from persimmon sepals (named PSL) was used. It was obtained by isoelectric focusing and ammonium sulfate fractionation. Intensity of lectin-receptor interactions was determined in reaction of hemagglutination. **Results.** Two lectins showed some directed divergence in patients from donors. For wheat germ agglutinin (WGA) changes in the intensity of lectin-receptor binding were downward. In the case of persimmon L (PSL) the alternative result was observed: the intensity of hemagglutination showed a trend to exceed the level of control. **Conclusions.** Some individual features in the reaction of erythrocytes with a set of lectins are observed in all examined persons. For two studied lectins, namely WGA and PSL, unidirectional deviations were observed in the reaction of erythrocytes of patients with GB compared to individuals without an oncological diagnosis.

**Keywords:** panel of lectins, glioblastoma, red blood cells, unidirectional deviations.