

Оригінальна стаття

УДК 612.017.1:616-006.484-092.9:576.3/.4

Лисяний Н.И.¹, Гнедкова И.А.¹, Станецкая Д.Н.¹, Розуменко В.Д.², Главацкий А.Я.², Шмелева А.А.³, Малышева Т.А.³, Черненко О.Г.³, Гнедкова М.А.⁴

¹ Отдел нейроиммунологии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

² Отделение внутримозговых опухолей, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

³ Отдел нейропатоморфологии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

⁴ Отделение интенсивной терапии и анестезиологии №2, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, Киев, Украина

Использование лектинов для получения и изучения популяции клеток глиомы С6 со свойствами стволовых клеток

Аннотация

Цель. Обогащение суспензии клеток глиомы С6 крыс стволовыми опухолевыми клетками (СОК) с использованием лектинов, сорбированных на пластике.

Материалы и методы. Для разделения клеток глиомы С6 использовали лектины, связывающие определенную последовательность углеводов: лектин фасоли (*Phaseolus vulgaris* — PHA), конканавалин А (*concanavalin A* — ConA), лектин арахиса (*peanut agglutinin* — PNA), лектин омелы белой (*mistletoe lectin* — MiL), лектин бобовника (*laburnum anagyroides agglutinin* — LABA), лектин сои (*soybean lectin* — SBA). Клетки глиомы С6 культивировали в пластиковых чашках с сорбированными лектинами в течение 24 ч с последующим введением адгезированных клеток в головной мозг крыс.

Результаты. Установлена достоверно более высокая опухолеиндуцирующая активность фракций клеток, адгезированных на пластике с сорбированными лектинами PHA, ConA, PNA, LABA и SBA, что косвенно свидетельствовало об обогащении этих фракций СОК. Лектин MiL оказывал противоопухолевый эффект, что способствовало увеличению продолжительности жизни крыс.

Выводы. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности разделения клеток опухоли с помощью лектинов.

Ключевые слова: глиома С6; стволовые клетки опухоли; лектины.

Укр. нейрохірург. журн. — 2015. — №2. — С.11-16.

Поступила в редакцию 03.12.14. Принята к публикации 21.01.15.

Адрес для переписки: Гнедкова Ирина Александровна, Отдел нейроиммунологии, Институт нейрохирургии им. акад. А.П. Ромоданова НАМН Украины, ул. Платона Майбороды, 32, Киев, Украина, 04050, e-mail: irinagned@mail.ru

Гипотеза о стволовых опухолевых клетках постулирует наличие в различных опухолях субпопуляции недифференцированных клеток, индуцирующих рост опухоли СОК. С этими клетками связывают инвазивные свойства опухолей, а также их устойчивость к химио- и радиотерапии [1].

СОК выявляют из различных опухолей, в том числе глиобластомы [2]. Маркерами стволовых клеток глиобластомы являются CD133, CD15, интегрин α6, LСAM. СОК из опухолей другого происхождения экспрессируют CD44, CD24, CD20, эпителиальные молекулы адгезии: ЕpСAM, THY, B5 (ABCВ5) CD133 (пентаспан) [3, 4].

Экспериментальная глиома крыс С6 соответствует наиболее злокачественной опухоли головного мозга глиобластоме, содержит Р-гликопротеин и рецептор стволовых клеток CD133 промисин. Клетки глиомы С6 CD133⁺ устойчивы к апоптозу, при культивировании образуют нейросферы [5, 6].

Для идентификации прогениторных стволовых клеток из различных тканей используют специфические лектины [7], белки растительного и животного

происхождения, способные связывать специфические сложные углеводные структуры [8]. Нарушение гликозилирования, в частности, клеточной мембраны влияет на состав и характер распределения клеточных рецепторов к лектинам [9].

Стволовые прогениторные клетки также содержат поверхностные гликопротеины и гликолипиды, экспрессирующие трансферазы: фукозилтрансферазы и сиалилтрансферазы. При изучении стволовых клеток человека использовали панель из 14 лектинов, связывающих углеводные детерминанты, входящие в состав эмбрионального антигена (*storage-specific embryonic antigen* — SSEA-4), экспрессируемого эмбриональными стволовыми клетками [10, 11].

Лектины клещевины (*Ricinus communis agglutinin* — RCA), ландыша (*Concanavalin A* — ConA), помидора (*Lycopersicon* — tomato) — связывают SSEA-положительные структуры. Лектин долихоса (DBA) и лектин лотоса (*Lotus tetragonolobus* — LTL) не связывают эмбриональные стволовые клетки человека (hESC); лектин гороха (*Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin* — PHA-L), вики озимой (*Vicia villosa agglutinin* — VVA),

утесника европейского (*Ulex europeans agglutinin* — UEA), фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris erythro-agglutinin* — PNA-E), мааки амурской (*Maackia amurensis agglutin* — MAA) частично соединяются с клетками hESC [11].

Лектин утесника европейского (UEA-1) избирательно связывается с плюрипотентными эмбриональными клетками hESC, содержащими OKT4 и SSEA- антигены [12]. Прогениторные стволовые клетки человека изолировали из смешанной популяции эмбриональных клеток и фибробластов методом магнитной сепарации с использованием магнитных шариков, нагруженных лектином UEA. Фибробласты содержали кальцитин и не экспрессировали SSEA-4. Плюрипотентные клетки содержали SSEA-4. Магнитные шарики, нагруженные SSEA-4, эффективно разделяли смесь клеток на плюрипотентные клетки, экспрессирующие SSEA, и клетки, не содержащие этот антиген — фибробласты [13].

Разделение клеток опухолей человека и животных и выделение СОК, в том числе глиомы С6, недостаточно изучено.

Целью исследования было изучить возможность обогащения фракции клеток глиомы С6 СОК, путем их адгезии на пластике с сорбированными лектинами.

Материалы и методы исследования. опыты проведены на крысах выводка вивария Института нейрохирургии массой тела 80 г. Клетки глиомы С6 получены из коллекции Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины.

Клетки глиомы С6 культивировали в среде RPMI с добавлением 150 мкг гентамицина и 10% ЭТС в пластиковых флаконах в атмосфере 5% CO₂. Пасировали культуру С6 через каждые 3 дня. Через 24 ч культивирования клетки глиомы С6 образовывали сфероиды. Сорбцию лектинов проводили в пластиковых 96-луночных планшетах и пластиковых чашках Петри. Для изучения активности сорбции в пластиковые планшеты вносили лектины в дозах 5, 10, 25, 50, 100 мкг на 1 лунку в забуференном физрастворе (ЗФР). Лектины сорбировали в холодильнике в течение 24 ч. Затем содержимое лунок удаляли и дважды отмывали ЗФР. Планшеты высушивали, в каждую лунку вносили 2×10⁵ клеток глиомы С6 в среде Игла. Клетки культивировали в зависимости от задач эксперимента в течение 1, 3 и 24 ч в термостате при температуре 37°C. После культивирования клетки встряхивали на шекере в течение 10 мин, надсадок с неприлипшими клетками удаляли. После двукратного отмывания ЗФР монослой высушивали и фиксировали 96% этанолом в течение 10 мин, окрашивали азур-эозином по Романовскому. Окрашенный монослой высушивали, затем в каждую лунку добавляли растворитель: 40 ммоль HCl в изопропиловом спирте на 15 мин.

Адгезивную активность клеток опухоли оценивали по величине оптической плотности, которую измеряли на спектрофотометре при длине волны 620 нм и референтной волне 492 нм [14].

Рассчитывали коэффициент усиления или торможения адгезии для соответствующего лектина (К) — соотношение величин экстинкции в лунке с адгезированными клеткам с сорбированным лекти-

ном и в лунке без лектина: $K = E(\text{ад+лек})$; где E — адгезия.

Аналогично в стерильных условиях настилали лектины на стерильные чашки Петри диаметром 3 см в дозе 100 мкг/мл — 200 мкг на 1 чашку. Лектины сорбировали в холодильнике в течение 18 ч. Чашки дважды отмывали в ЗФР и высушивали в стерильных условиях. Использовали лектины НПО «Лектинотест» (Львов).

Последовательность углеводов гликолипидов и гликопротеидов на клетках глиомы С6 изучали с помощью лектинов, связывающих эти детерминанты. Для разделения клеток глиомы С6 использовали лектины, связывающие определенную последовательность углеводов: лектин фасоли (*Phaseolus vulgaris* — PNA), связывающий GlcNAcβ1-2Man1R), конканавалин А (*concanavalin A* — ConA) α-маннозу-R, лектин арахиса (*peanut agglutinin* — PNA) — Galβ1-3GalNAc, лектин омелы белой (*mistletoe lectin* — MiL) — Galβ1-3GalNAc, лектин бобовника (*laburnum anagyroides agglutinin* — LABA) — Fucα1-2Galβ1-3GalNAc, лектин сои (*soybean lectin* — SBA) — GalNAcα1-3GalR.

На стерильные чашки с лектинами и без них наносили клетки глиомы С6 в дозе 8×10⁶ на 1 чашку. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе в течение 24 ч. Затем не адгезированные к пластику клетки удаляли, а фракцию клеток, адгезированных к пластику или к пластику с сорбированным лектином, снимали стерильным резиновым шпателем и холодным ЗФР. Клетки отмывали, ресуспендировали в среде ДМЕМ и вводили крысам в левую теменную долю головного мозга в концентрации 5×10⁵ под наркозом эфиром. Туморогенность адгезивных фракций, сорбированных на лектинах опухоли С6, оценивали по средней продолжительности жизни (СПЖ) крыс, которым прививали опухоли. В опытах использовали 8 групп животных по 7 особей в каждой.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с помощью стандартного пакета программ «Анализ данных» Microsoft Excel для Windows 1995, версия 7.0a, 1996

Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. При исследовании адгезивной активности клеток глиомы С6 к различным лектинам установлено, что они по-разному сорбировались на лектинах в зависимости от дозы лектина и продолжительности сорбции (**табл. 1**). При малой исходной концентрации лектинов (5 мкг на лунку) в большинстве наблюдений не было достоверных различий адсорбции к пластику, не обработанному лектинами пластику. К составу 0,8–1,2, что близко к 1,0. Это позволяет считать, что доза 5 мкг/мл недостаточна для разъединения клеток на лектинах. Подобную ситуацию наблюдали и при очень высокой дозе лектинов (100 мкг на 1 лунку). Так, при использовании PNA, ConA и MiL не отмечено достоверного увеличения адгезии на лектинах, сорбированных в дозе 100 мкг на 1 лунку. К приближался к 1,0. Лектины SBA, LABA, PNA в исходной дозе 100 мкг на 1 лунку тормозили адгезию клеток глиомы С6 при культивировании в течение 1 и 3 ч, при использовании лектинов SBA и PNA в других дозах адгезия клеток глиомы С6 к пластику

Таблиця 1. Коэффициент адгезии к пластику с сорбированными лектинами клеток глиомы крыс С6

Продолжительность культивирования с лектином		К при исходной дозе сорбированного лектина на планшете, мкг (M±m)				
		100	50	25	10	5
PNA	1 ч	0,9±0,01*	1,26±0,11*	1,36±0,15*,**	1,5±0,31**	0,9±0,11
	3 ч	1,12±0,11**	1,47±0,21**	1,41±0,25	1,34±0,23**	0,95±0,15
	24 ч	0,89±0,11**	0,69 ±0,3**	0,71±0,18**	0,58±0,31**	1,0±0,01
ConA	1 ч	1,0±0,11*	1,63±0,18*,**	1,42±0,09*,**	1,51±0,11*,**	0,88±0,12**
	3 ч	1,19±0,21	1,48±0,03*,**	1,59±0,31**	1,26±0,12**	0,65±0,09**
	24 ч	0,89±0,11	0,69±0,3**	0,71±0,18**	0,58±0,31**	1,0±0,01
SBA	1 ч	0,51±0,21	0,51±0,17**	0,41±0,24**	0,35±0,14*,**	0,88±0,09**
	3 ч	0,43±0,09**	0,58±0,11	0,59±0,09	0,61±0,17	0,58±0,02**
	24 ч	0,87±0,12*,**	0,94 ±0,08**	1,18±0,05**	1,23±0,05*,**	1,57±0,12**
LABA	1 ч	0,45±0,09*,**	0,55±0,08*	0,50±0,15**	0,59±0,11**	0,91±0,07*
	3 ч	0,58±0,05**	0,51±0,03	0,49±0,08**	0,57±0,01**	0,38±0,03*,**
	24 ч	1,03±0,07**	0,84±0,3	0,84±0,10**	0,94±0,14**	1,2±0,12**
PNA	0,65±0,11	0,54±0,09	0,61±0,19	0,33±0,12*,**	0,88±0,18	0,65±0,11
	0,43±0,09*,**	0,41±0,11*,**	1,51±0,06**	1,51±0,14*,**	0,95±0,07**	0,43±0,09*,**
	1,01±0,08*,**	1,12±0,09**	1,22±0,07*,**	1,24±0,11*,**	1,21±0,01**	1,01±0,08*,**
Mil	0,8±0,04*	1,12±0,09**	1,2±0,03**	1,23±0,07*	0,74±0,11	0,8±0,04*
	1,17±0,14	0,65±0,07**	0,68±0,15**	0,64±0,03	0,63±0,09**	1,17±0,14
	0,99±0,11	0,91±0,12	0,89±0,12	0,91±0,11	0,94±0,09**	0,99±0,11

Примечание. * — достоверность различий K при инкубации с различными дозами одного лектина ($P<0,001$); ** — достоверность различий K при различной длительности инкубации одного лектина ($P<0,01$).

увеличивалась. Так, лектин SBA в исходной дозе от 25 до 5 мкг на 1 лунку через 24 ч достоверно увеличивал адгезию клеток глиомы С6 на пластике, по сравнению с таковой при культивировании в течение 1 и 3 ч, при этом K составлял 1,2–1,5. Лектин PNA достоверно увеличивал адгезию клеток опухоли после 3 ч культивирования в исходной дозе от 25 до 10 мкг на 1 лунку, несколько меньше — в этих дозах через 24 ч культивирования.

Дозы лектинов от 50 до 10 мкг на 1 лунку можно считать оптимальными, при их применении отмечено как усиление адгезии в 1,5 раза, так и ее уменьшение в 3 раза. Важным фактом также является установление зависимости адгезивной способности клеток от длительности инкубации: при использовании PNA, SBA она постоянно увеличивалась, PNA, ConA — уменьшалась.

Так, при использовании лектинов PNA и ConA в исходной дозе 5–10 мкг на 1 лунку отмечали увеличение сорбции в течение 1–3 ч с последующим уменьшением через 24 ч. Для 3 лектинов SBA, LABA, PNA характерна слабая адгезия в течение 3 ч (достоверно низкий K), через 24 ч отмечено увеличение адгезии — для лектинов SBA и PNA, K лектина LABA приближался к таковому без лектина.

Быстрая адгезия клеток глиомы С6 к определенному лектину свидетельствует о наличии на этих клетках определенных рецепторов, что способствует быстрому связыванию, тогда как слабое связывание с другими лектинами этих клеток может свидетельствовать об отсутствии соответствующих гликопротеидных рецепторов, а также наличии ингибирующего или цитотоксического действия этих лектинов на клетки глиомы. Конкретный механизм торможения адгезии клеток на определенных лектинах в течение 1 и 3 ч пока не установлен, необходимы специальные дополнительные исследования. В то же время можно утверждать, что для разделения клеток глиомы С6 оптимальны два лектина — PNA и ConA, на которых

в течение 1–3 ч происходит увеличение адгезии клеток в 1,5 раза по сравнению с таковой к чистому пластику.

Лектины PNA и ConA соединяют сложные олигосахаридные структуры с терминальными молекулами Gal1-4GlcNAcβ1-2Man1R, связанные с α(1–6) маннозой. Другой эпитоп для связывания PNA GlcNAcβ12 Man, ConA связывает ди- и трисахариды D маннозы с α(1–2) связями.

Таким образом, лектины PNA и ConA, сорбированные на пластиковых планшетах особенно в исходной дозе 50, 25 и 10 мкг, при культивировании в течение 1 ч и 3 ч усиливали адгезию клеток глиомы С6 примерно на 30–50%. Это позволяет предполагать, что среди клеток глиомы С6 есть популяция, содержащая эти гликопротеидные структуры, посредством которых осуществляется адгезия клеток на лектинах.

Галактозосвязывающие лектины PNA и Mil взаимодействовали с клетками глиомы С6 по-разному.

Культивирование клеток в течение 1 ч и 3 ч на пластиковых поверхностях с лектином PNA не способствовало адгезии клеток глиомы С6, при культивировании в течение 24 ч адгезия увеличивалась, что может быть обусловлено особенностями структуры углеводных рецепторов клеток и сродством к лектину.

Влияние лектина омелы (Mil) несколько отличалось от такового лектина арахиса (PNA). После культивирования в течение 1 ч на планшете с сорбированным лектином Mil отмечено незначительное уменьшение адгезии при исходной дозе лектина 100 и 5 мкг на 1 лунку. K составлял соответственно 0,8±0,04 и 0,74±0,11. Через 3 ч культивирования наблюдали достоверное уменьшение K до 0,63–0,68 при исходных дозах от 50 до 5 мкг. При использовании дозы 100 мкг отмечено незначительное увеличение адгезии клеток глиомы С6. Через 24 ч культивирования лектин омелы практически не влиял на показатель адгезии клеток глиомы С6.

Лектин бобовника (LABA) является фукозоспецифическим, то есть связывает терминальную молекулу фукозы.

LABA реагирует с молекулами трисахарида Fuc1-2Gal β 1-4Glc, дифукозиллактозой (Fuc1-2Gal β 1-4[Fuc α 1-3]Glc) и трисахаридом Le^a, входящими в состав клеточных гликоконъюгатов.

Лектин LABA, сорбированный на пластике, тормозил адгезию клеток глиомы С6 к во всех использованных дозах после культивирования в течение 1 ч и 3 ч. Через 24 ч культивирования действие лектина LABA на адгезию клеток глиомы С6 к пластику приближалось к контрольным значениям. К приближался к 1,0. Возможно, это обусловлено особенностями связывания тетрасахаридных остатков фукозоспецифическими лектинами.

Следовательно, клетки глиомы С6 наиболее интенсивно (на 30–50%) адгезировались на пластиковой поверхности с лектинами PNA и ConA в течение 1–3 ч, за этот же период под влиянием лектинов PNA и LABA, наоборот, количество сорбированных клеток уменьшалось. Повышение сорбционной способности клеток глиомы С6 за короткий период времени позволяет предполагать, что среди клеток этой опухоли содержится популяция клеток, экспрессирующих определенные гликоконъюгаты, обуславливающие эту сорбцию.

Полученные данные о различной способности клеток глиомы С6 к сорбции на лектинах явились основанием для изучения опухолеиндуцирующей активности сорбированных на лектинах клеток, которые вводили крысам (табл. 2).

СПЖ крыс с индуцированной глиомой С6 составила (29,3 \pm 1,5) дня. При введении клеток опухоли, адгезированных к пластику, СПЖ уменьшалась на 2 дня. При применении маннозосвязывающего лектина ConA СПЖ крыс с глиомой С6 также уменьшалась только на 2 дня, тогда как при введении фракции клеток опухоли, сорбированных на PNA, СПЖ уменьшилась до (24,5 \pm 1,9) дня. При применении лектинов PNA и SBA, связывающих N-гликозидные цепи, достоверно

повышалась туморогенность клеток глиомы С6 и уменьшалась СПЖ.

Наименьшая СПЖ у крыс с глиомой С6 отмечена при введении клеток опухоли, адгезированных на лектине LABA, связывающем α -фукозу.

Лектины арахиса и омелы по-разному влияли на адгезивную фракцию опухоли С6. Несмотря на то, что эти лектины являются галактозоспецифическими, по-видимому, механизмы их воздействия на опухолевые клетки различны. Так, лектин арахиса связывает преимущественно мембранные терминальные молекулы углеводов, лектин омелы — содержит гликопротеины, вискотоксины, ферменты, способные не только связывать мембранные гликоконъюгаты, но и ингибировать рибосомальный синтез белка, индуцировать апоптоз, способствовать высвобождению цитокинов, в частности, фактора некроза опухолей- α (ФНО- α) и интерлейкинов (ИЛ), в том числе ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6 [1, 12].

Возможно, инкубирование клеток опухоли с лектином омелы индуцирует апоптоз определенной популяции клеток и подавляет жизнеспособность клеток глиомы. Эти предположения, в определенной степени, подтверждают результаты инокуляции адгезивной фракции клеток глиомы С6 на лектине омелы. СПЖ крыс этой группы была максимальной — (49,5 \pm 4,5) дня, что достоверно больше, чем в остальных группах.

При сопоставлении результатов экспериментов по изучению показателей выживаемости животных с опухолью мозга, возникшей под влиянием различных популяций клеток глиомы С6, адгезированных на лектинах, установлено совпадение данных о повышенной адгезии клеток глиомы С6 к лектину PNA и достоверно низкую СПЖ крыс, которым вводили эти клетки. Эти результаты позволяют сделать предварительное заключение о том, что при использовании лектина PNA, по-видимому, происходит обогащение клетками с высокой опухолеиндуцирующей активностью, а именно СОК. Полученные результаты подтверждают данные предыдущих исследований о том, что на лектинах PNA, ConA можно выделить СОК [3, 8, 10, 15]. В то же время, фракции клеток, сорбированные на лектинах, в частности, LABA, PNA и SBA, также вызвали быстрый рост опухоли у экспериментальных животных. К этим лектинам клетки глиомы С6 слабо сорбировались, но эти клетки обладали высокой туморогенной способностью, что также не исключает предположение о наличии в этих фракциях СОК. Возможно, незначительная часть клеток, которые сорбировались на этих лектинах, получила определенный стимулирующий сигнал через связывание гликопротеидных рецепторов, что способствовало их активации и повышению туморогенной активности. Лектин омелы, связывающий галактозные рецепторы, наоборот, подавлял опухолеиндуцирующую способность клеток. Полученные нами результаты совпадают с данными других исследователей, показавших возможность разделения стволовых клеток на сорбентах с лектинами [7, 10, 16].

Таким образом, с помощью лектинов, в частности, PNA можно получить популяции клеток, обладающих высокой опухолеиндуцирующей способностью. При взаимодействии лектинов с соответствующими угле-

Таблица 2. Средняя продолжительность жизни крыс после введения фракции клеток опухоли, адгезированных на пластике с сорбированными лектинами

Вводимые клетки в концентрации 5×10^5	СПЖ крыс с глиомой С6, дней	
Контроль (суспензия клеток опухоли)	29,3 \pm 1,5	
Контроль (клетки, адгезированные к пластику)	27,5 \pm 2,9	
Клетки, адгезированные к пластику, с сорбированными лектинами	ConA	27,5 \pm 2,5
	PNA	24,5 \pm 1,9*
	SBA	24,8 \pm 2,5*
	LABA	22,8 \pm 1,5**,**
	PNA	23,5 \pm 2,1*
	Mil	49,5 \pm 4,5**,**

Примечание. * — достоверность различий СПЖ крыс, которым вводили адгезивные фракции глиомы С6 на лектинах и суспензию клеток опухоли ($P < 0,01$); ** — достоверность различий СПЖ крыс с клетками глиомы С6, адгезированными на лектинах, по отношению к группе животных, которым вводили суспензию клеток опухоли, адгезированных к пластику ($P < 0,01$).

водними рецепторами клеток опухолей возможно как усиление, так и торможение их опухолеиндуцирующей способности. Вероятно, при изучении сорбционной способности опухолей головного мозга различной степени анаплазии к лектинам можно в определенной степени прогнозировать биологические особенности глиом, в частности, способность к инфильтративному росту, рецидивированию, устойчивость к лучевой терапии, что характерно для СОК.

Выводы. 1. Клетки экспериментальной глиомы С6 обладают различной способностью связываться с сорбированными на пластике лектинами в зависимости от их дозы и продолжительности инкубации.

2. Клетки глиомы С6 при инкубации в течение 1 и 3 ч обладают большей адгезивной способностью к лектинам РНА и ConA, чем к другим лектинам.

3. Адгезированные к лектинам клетки глиомы С6 обладают большей опухоленосущностью, чем клетки, адгезированные к пластику, или интактные клетки глиомы, что свидетельствует о возможности обогащения и выделения на лектинах популяции клеток с высокой опухолеиндуцирующей способностью.

Список литературы

- Brescia P. Current strategies for identification of glioma stem cells: Adequate or unsatisfactory? / P. Brescia, Ch. Richichi, G. Pehcci // *J. Oncol.* — 2012. — e376894.
- Cancer stem cells: the final frontier for glioma virotherapy/ M. Dey, I.V. Ulasov, M.A. Tyler, A.M. Sonabend, M.S. Lesniak // *Stem. Cell Rev.* — 2011. — V.7, N1. — P.119–129.
- Differencing lectin binding profiles among human embryonic stem cells and derivatives aid in the isolation of neural progenitor cells /M.C. Dodla, A. Young., A.I. Venable, K. Hasneen, R.R. Rao, D.W. Machacek, S.L. Stice // *Plos One.* — 2011. — V.6, N8. — e23266.
- Christensen K. CD133 identifies perivascular niches in grade II–IV astrocytomas / K. Christensen, H.D. Schroder, B.W. Kristensen // *J. Neurooncol.* — 2008. — V.90, N2. — P.157–170.
- Schraen-Maschke S. Role of oligomannosidic N-glycans in the proliferation, adhesion and signaling of C6 glioblastoma cells / S. Schraen-Maschke, J.P. Zanetta // *Biochimie.* — 2003. — V.85, N1–2. — P.219–229.
- Angelastro J.M. Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells / J.M. Angelastro, M.W. Lame // *Mol. Cancer Res.* — 2010. — V.8, N8. — P.1105–1115.
- Lectins identify glycan biomarkers on glioblastoma-derived cancer stem cells / C. Tucker-Burden, P. Chappa, M. Krishnamoorthy, B.A. Gerwe, C.D. Scharer, J. Heimbürg-Molinari, W. Harris, S.N. Usta, C.D. Eilertson, C.G. Hadjipanayis, S.L. Stice, D.J. Brat, R.J. Nash // *Stem Cells Dev.* — 2012. — V.21, N13. — P.2374–2386.
- Differential profiling studies of N-linked glycoproteins in glioblastoma cancer stem cells upon treatment with γ -secretase inhibitor / L. Dai, Y. Liu, J. He, C.G. Flack, C.E. Talsma, J.G. Crowley, K.M. Muraszko, X. Fan, D.M. Lubman // *Proteomics.* — 2011. — V.11, N20. — P.4021–4028.
- Chen R. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma / R. Chen, M.C. Nishimura, S.M. Bumbaca // *Cancer Cell.* — 2010. — V.17, N4. — P.362–375.
- Specific lectin biomarkers for isolation of human pluripotent stem cells identified through array-based glycomic analysis / J.Ch. Wang, M. Nakagawa I. Garitaonandia, I. Slavin, G. Altun, R.M. Lacharite, K.L. Nazor, H.T. Tran, C.L. Lynch, T.R. Leonardo, Y. Liu, S.E. Peterson, L.C. Laurent, S. Yamanaka, J.F. Loring // *Cell Res.* — 2011. — V.21, N11. — P.1551–1563.
- SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma / M.J. Son, K. Woolard, D.H. Nam, J. Lee, H.A. Fine // *Cell Stem Cell.* — 2009. — V.4, N5. — P.440–452.
- Lectin binding profiles of SSEA4 enriched pluripotent human embryonic stem cell surfaces / A. Venable, M. Metalipova, I. Lyons, K. Jones, S. Shin, M. Pierce, S. Stice // *BMC. Dev. Biol.* — 2005. — V.5. — P.15.
- Stage-specific embryonic antigen-4 as a potential therapeutic target in glioblastoma multiforme and other cancers / Y.W. Lou, P.-Y. Wang, S.Ch. Yeh, P.K. Chuang, S.T. C.Y. Wu, K.H. Khoo, M. Hsiao, T.L. Hsu, C.H. Wong // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2014. — V.111, N7. — P.2482–2487.
- Бутаков А.А. Спектрофотометрическое определение адгезивной способности полиморфоядерных лейкоцитов периферической крови / А.А. Бутаков, В.Г. Оганезов, Б.В. Пинегин [и др.] // *Иммунология.* — 1991 — №5. — С.71–73.
- Антонюк В.О. Лектини та їх сировинні джерела / В.О. Антонюк/ — Львів: Кварт, 2005. — 554 с.
- Nduom E.R.T., Glioblastoma cancer stem like cells — implications for pathogenesis and treatment / E.R.T. Nduom, C.G. Hadjipanayis, E.G. Meir // *Cancer J.* — 2012. — V.18, N1. — P.100–106.

Лісяний М.І.¹, Гнедкова І.О.¹, Станецька Д.М.¹, Розуменко В.Д.², Главацький О.Я.², Шмельова Г.А.³, Малишева Т.А.³, Черненко О.Г.³, Гнедкова М.О.⁴

¹Відділ нейроімунології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

²Відділення внутрішньомозкових пухлин, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

³Відділ нейропатоморфології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

⁴Відділення інтенсивної терапії та анестезіології №2, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України, Київ, Україна

Використання лектинів для отримання і вивчення популяції клітин гліоми С6 з властивостями стовбурових клітин

Анотація

Мета. Збагачення суспензії клітин гліоми С6 щурів стовбуровими пухлинними клітинами з використанням лектинів, сорбованих на пластику.

Матеріали і методи. Для розподілу клітин гліоми С6 використані лектини, що зв'язують певну послідовність вуглеводів — лектин квасолі (*Phaseolus vulgaris* — PHA), конканавалін (*concanavalin A* — ConA), лектин арахісу (*peanut agglutinin* — PNA), лектин омели білої (*mistletoe lectin* — Mil), лектин бобівника (*laburnum anagyroides agglutinin* — LABA), лектин сої (*soybean lectin* — SBA). Клітини гліоми С6 культивували у пластикових чашках з сорбованими лектинами протягом 24 год з подальшим введенням адгезованих клітин у головний мозок щурів.

Результати. Встановлена достовірно більш висока пухлиноіндукуюча активність фракцій клітин, адгезованих на пластику з сорбованими лектинами PHA, ConA, PNA, LABA і SBA, що опосередковано свідчило про збагачення цих фракцій стовбуровими клітинами. Лектин Mil справляв протипухлинний вплив, що сприяло збільшенню тривалості життя щурів.

Висновки. Результати проведених досліджень свідчать про можливість розподілу клітин пухлини з використанням лектинів.

Ключові слова: гліома С6; стовбурові клітини пухлини; лектини.

Укр. нейрохірург. журн. — 2015. — №2. — С.11-16.

Надійшла до редакції 03.12.14. Прийнята до публікації 21.01.15.

Адреса для листування: Гнедкова Ірина Олександрівна, Відділ нейроімунології, Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданов, вул. Платона Майбороди, 32, Київ, Україна, 04050, e-mail: irinagned@mail.ru

Lisyany N.I.¹, Gnedkova I.A.¹, Stanetskaya D.N.¹, Rozumenko V.D.², Glavatskiy A.Ya.², Shmeleva A.A.³, Malysheva T.A.³, Chernenko O.G.³, Gnedkova M.A.⁴

¹Neuroimmunology Department, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov, NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

²Intracerebral Tumors Department, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov, NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

³Neuropathomorphology Department, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov, NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

⁴Department of Anesthesiology and Intensive Care #2, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov, NAMS of Ukraine, Kiev, Ukraine

Lectins use for receive and study of glioma C6 cells with stem cells properties

Abstract

The purpose — to enrich suspension of glioma C6 cells in rats with stem tumor stem cells using lectins sorbed on plastic.

Materials and methods. Lectins of beans (*Phaseolus vulgaris* — PHA), concanavalin (ConA), peanuts (*peanut agglutinin* — PNA), mistletoe (Mil), labrum anagyroides agglutinin (LABA), soybean (SBA) were used to separate glioma C6 cells.

Glioma C6 cells were cultivated with sorbed lectins for 24 h and were injected into the brain of the rats.

Results. Tumorigenic activity was significantly higher in fractions of cells adhered to plastic with adsorbed lectins PHA, ConA, PNA, LABA and SBA, that was an indirect evidence of these fractions enriched by tumor stem cells. Lectin Mil exert an antitumor effect that contributed to rats' lifetime increasing.

Conclusions. The results of the study indicate the possibility of tumor cells division using lectins.

Key words: glioma C6, stem cells of glioma, lectins.

Ukr Neurosurg J. 2015;2:11-6.

Received, December 03, 2014. Accepted, January 21, 2014.

Address for correspondence: Irina A. Gnedkova, Department of Neuroimmunology, Institute of Neurosurgery named after acad. A.P. Romodanov, 32 Platona Mayborody St., Kiev, Ukraine, 04050, e-mail: irinagned@mail.ru