

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ИНСТИТУТ БИОХИМИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

Выпуск 2

Границы биологических наук
Сигналинг и метаболизм

Frontiers in Life Science
Signalling and Metabolism

*СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ КОНФЕРЕНЦИИ
(8–9 ноября 2018 г., Гродно)*

Минск
«ИВЦ Минфина»
2018

3. Demidchik V., Straltsova D., Medvedev S.S., Pozhvanov G.A., Sokolik A., Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K^+ -permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment / V. Demidchik // Journal of experimental botany. – 2014. – Vol. 65. – P. 1259–1270.
4. Garcia-Mata C., Wang J., Gajdanowicz P., Gonzalez W., Hills A., Donald N., Riedelsberger J., Amtmann A., Dreyer I., Blatt M.R. A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K^+ channel of *Arabidopsis* by the reactive oxygen species H_2O_2 / C. Garcia-Mata // Journal of biological chemistry. – 2010. – Vol. 285. – P. 29286–29294.

Novoselsky I. Yu., Griusevich P. V., Sokolik A. I., Demidchik V. V.

ROLE OF ROS SENSOR OF POTASSIUM CHANNEL GORK IN ACTIVATION OF OUT-DIRECTED K^+ CONDUCTIVITY UNDER THE ACTION OF HYDROXYL RADICAL-GENERATING MIXTURES

*Belarusian State University, Minsk, Belarus
email: dzemidchyk@bsu.by*

Summary Our data demonstrate participation of the outward-rectifying potassium channel GORK in the reception of the ROS signal. The role of cysteine in 151 position as an ROS sensor in the potassium channel GORK, whose modification is capable of switching off ROS-sensitive out-directed potassium conductivity.

Нетронина О.В.¹, Маслак А.С.¹, Сирко А.Г.^{2,3}, Романуха Д.Н.³

ГЛИКОЗИЛИРОВАННОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ БОЛЬНЫХ С НОВООБРАЗОВАНИЯМИ МОЗГА

¹*ГУ «Днепропетровская медицинская академия МОЗ Украины» Днепр, Украина*

²*Кафедра нервных болезней и нейрохирургии ФПО, Днепропетровская медицинская академия МЗ Украины, Днепр, Украина*

³*Отделение церебральной нейрохирургии № 2, Днепропетровская областная клиническая больница им. И.И. Мечникова, Днепр, Украина*

Резюме. В статье представлены результаты исследования, показывающие изменения углеводных компонентов лейкоцитов крови больных с новообразованиями головного мозга. Методом проточной цитофлуориметрии с помощью конъюгированных с флюоресцеин изотиоцианатом лектинов разной специфичности показано перераспределение фракций гранулоцитов, которые содержат на своей поверхности структуры с биантенными N-гликанами

Введение. Большинство белков человека модифицируется путем ковалентного присоединения сложных олигосахаридов – гликанов. Углеводная и полипептидная части белка вносят свой вклад в его структуру и функцию. Однако, если строение полипептида кодируется в соответствующем гене, то структура гликанов зависит от комплексного динамического взаимодействия между различными ферментами, факторами транскрипции, ионными каналами и другими белками. Таким образом, на сегодняшний день считается, что нарушения в структуре гликанов отображают течение патологического процесса в целом [4].

Изменения гликобиологических показателей, таких как гликом, гликопротеом, глико-гены показаны при многих воспалительных и онкологических заболеваниях [9], а с появлением новых методик и технологий в производстве антител и других агентов, количество данных при патологиях растет [8].

Следует также отметить, что лектины, белки, которые специфично взаимодействуют с определенными углеводными последовательностями, распознавая, не только их мономерный состав, но и пространственную конфигурацию, на сегодняшний день являются дешевым и эффективным инструментом исследования гликанов.

Исследования новообразований мозга проводятся в основном с использованием иммуногистохимических методов или клеточных культур, в то время как наиболее доступной средой для исследований на сегодняшний день является кровь больного [3]. Так, согласно экспериментам голландских ученых, на различных стадиях опухолевого процесса наблюдается перераспределение уровней микроРНК в мононуклеарных клетках крови [7]. Эти исследования проведены методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, их воспроизводимость в условиях клинической лаборатории, к сожалению, затруднена и недешева для больного. Исходя из этого, перед украинскими учеными стоит задача поиска достоверных, легковоспроизводимых инструментов для диагностики новообразований мозга, тем более, что выделение лектинов и их метка осуществляется НПП «Лектинотест» в городе Львов, Украина.

Целью работы было исследование уровней лейкоцитов (лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов) в крови, которые содержат на своей поверхности гликаны комплексного типа, выявляемые определенным набором лектинов.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования были лейкоциты крови больных с новообразованиями головного мозга (n=10). Группу контроля составили 10 условно здоровых доноров. Количество гликозилированных клеток крови определяли методом проточной цитофлуориметрии с помощью конъюгированных с флюоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ) лектинов разной специфичности. Исследование терминальных остатков N-ацетилнейраминовой кислоты проводили с помощью лектинов – *Sambucus nigra* (SNA), который афинен к $\alpha(2\rightarrow6)$ -связям N-гликанов, и *Maackia amurensis* (MAA), специфичен к $\alpha(2\rightarrow3)$ -сиалированным гликозидными связями. Экспонирование биантенных N-гликанов на лейкоцитах определяли с использованием лектина ландыша мечевидного (ConA). Анализ проводили на проточном цитометре Coulter Epics XL, а расчет, полученных результатов – с помощью программы FCS Express 3. Клиническое обследование пациентов проводили согласно стандартам медицинской помощи в условиях специализированного стационара – нейрохирургическое отделение Днепропетровской областной клинической больницы им. И.И. Мечникова. Пациенты давали письменное согласие на участие в исследовании.

Результаты исследования и их обсуждение. Согласно иммунологическому анализу в исследуемой группе количество лимфоцитов было в пределах нормы и составило 37,6%, моноцитов – 7,7%, гранулоцитов: эозинофилов – 3%, базофилов – 0,7%, незрелых гранулоцитов 0,3%, сегментоядерных нейтрофилов – 50,7%. Таким образом, лейкоцитарная формула, а именно, соотношение лимфоциты/моноциты/гранулоциты в группе больных с новообразованиями головного мозга составило 39/8/53 (рис 1.)

Анализ соотношения лектин-позитивных клеток периферической крови показал значительное увеличение количества лектин-связывающих гранулоцитов в крови исследуемой группы. Наибольшая разница отмечалась при использовании ConA: соотношение лимфоциты/моноциты/гранулоциты было – 20/4/76 (см. рис 1.)



Рисунок 1 – Распределение лейкоцитов крови (А) и ConA-связывающих (Б) лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов у больных с новообразованиями мозга

Таким образом, не смотря на то, что лейкоцитарная формула крови больных исследуемой группы не отличалась от нормы, при использовании ФИТЦ-меченых лектинов отмечалось перераспределение клеток, причем в сторону увеличения фракции лектин-связывающих гранулоцитов в 1,5 раза. Исходя из специфичности выбранного набора лектинов, гранулоциты содержали на своей поверхности структуры с биантенными N-гликанами, обе ветки, которых были сиалированными.

Поскольку большинство трансмембранных белков, таких как дифференцировочные CD маркеры, являются гликопротеинами, можно предположить, что рост уровня гликозилированных гранулоцитов в исследуемой группе свидетельствует про повышенную экспрессию незрелых клеток, которая часто является признаком развития онкологического процесса. Известно, например, что на стволовых недеференцированных клетках из мозжечка больного глиобластомой повышается экспонирование GalNAc и GlcNAc, а лектин *Dolichos biflorus agglutinin* может быть использован как маркер CD133⁺клеток [10]. На основании этих результатов разработаны эффективные CD133-специфические эпитопные вакцины для лечения опухолей нервной системы [2].

Недавние исследования показывают, что лейкоциты могут распространяться в ЦНС даже при отсутствии неповрежденного гематоэнцефалического барьера и что антигены ЦНС могут достигать периферических лимфатических узлов путем слива цереброспинальной жидкости через пространства Вирхова-Робина [6]. Особенная роль при этом отводится нейтрофильной фракции лейкоцитов, функция которой в опухолегенезе неоднозначна [5]. Важно отметить, что на сегодняшнее время показано перераспределение нейтрофильной фракции по субтипам как в крови, так в опухолевой ткани [1]. Например, повышение фракции CD11b/ CD18⁺-активированных нейтрофилов, является ранним предиктом прогрессирования опухоли [11], а гликозилированность этого мембранного гликопротеина определяет способность нейтрофилов к адгезии и цитотоксическим функциям, известно также, что он N-гликозилирован [12].

Закключение. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о перераспределении фракций гранулоцитов в крови больных с новообразованиями мозга, что может быть подтверждено с использованием CD-маркеров отдельных субтипов этих клеток при помощи двухпараметрического анализа методом проточной цитометрии, что планируется сделать в дальнейшем.

Список использованных источников:

1. Иммунотерапия злокачественных опухолей головного мозга (обзор) / К.С. Яшин, И.А.Медяник // СТМ. - 014. – Т.6, №4. – С.189-200.
2. Blood baseline neutrophil count predicts bevacizumab efficacy in glioblastoma / A.Bertaut, C.Truntzer, R.Madkouri [et al.] // Oncotarget. – 2016. – V.25. №7(43). – P. 70948–70958.
3. Cancer related circulating and tumor-associated neutrophils - subtypes, sources and function / M.EShaul, Z.G.Fridlender – FEBS J. – 2018. doi:10.1111/febs.14524.
4. Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation / M.Novokmet, E.Lukic, F.Vuckovic [et al.] // Sci. Rep. – 2014. — V.4 — P. 4347.
5. Enhanced neutrophil activity is associated with shorter time to tumor progression in glioblastoma patients / A.Rahbar, M.Cederarv, N.Wolmer-Solberg [et al.] // Oncoimmunology. – 2015. – V. 24, № 5(2). – c1075693 (9pages)
6. Epigenetic regulation of glycosylation is the quantum mechanics of biology / G.Lauc, A.Vojta, V.Zoldos // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – V.1840. – P. 65-70.
7. Identification of Novel Human Leukocyte Antigen-A 0201-Restricted, Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes on CD133 for Cancer Stem Cell Immunotherapy / J. Ji, V.A. Judkowski, G.Liu [et al.] // Stem Cells Transl Med. – 2014. – V.3 (3). – P. 356–364.
8. Lectins Identify Glycan Biomarkers on Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells / C.Tucker-Burden, P.Chappa, M.Krishnamoorthy [et al.] // Stem Cells – 2012. – V. 21(13). – P.2374–2386.
9. Mechanisms of disease: The human N-glycome / G. Laucab, M.Pezerb, I.Rudanc [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects. – 2016 – V. 1860, №8. – P. 1574 – 1582.
10. Neutrophils in Gliomas / M.Massara, P.Persico, O.Bonavita [et al.] // Front Immunol. – 2017. V.8 (13490). – Published online 2017 Oct 26.doi:10.3389/fimmu.2017.01349
11. Progenitor marker CD133 mRNA is elevated in peripheral blood of cancer patients with bone metastases / N.Mehra, M.Penning, J.Maas [et al.] // Clin Cancer Res. – 2006. – V.12 (16). – P.4859-4866.
12. The movers and shapers in immune privilege of the CNS / B.Engelhardt, P.Vajkoczy, R.O.Weller // Send to Nat Immunol. – 2017. – V.18 (2). – P.123-131.

Netronina O.V.,¹ Maslak G.S.,¹ Romanukha D.M.², Sirko A.G.^{2,3}

BLOOD CELLS GLYCOSYLATION IN PATIENTS WITH BRAIN NEOPLASMS

¹*Department of Biochemistry and Medical chemistry of SE "Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine"*

²*Nervous Diseases and Neurosurgery Department. Postgraduate Education Division, Dnipropetrovsk Medical Academy, the Ministry of Health of Ukraine, Dnipro, Ukraine*

³*Cerebral Neurosurgery Department No. 2, Mechnikov Dnipropetrovsk Regional Clinical Hospital, Dnipro, Ukraine*

Summary. The article presents the results of a study showing changes in the carbohydrate components of blood leukocytes in patients with brain neoplasms. Flow cytometry using fluorescein