

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-3-19-27>

Уровни антител к маннозе у больных раком желудка (обзор литературы и клинико-экспериментальное исследование)

М.П. Никулин¹, Н.В. Шилова², А.Д. Липатников², А.В. Семьянихина¹, И.С. Стилиди¹,
Н.В. Бовин², Н.Н. Тупицын¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ГНЦ «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН; Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Контакты: Максим Петрович Никулин maximetrovich@mail.ru

Введение. Гликаны играют важную роль в патогенезе злокачественных новообразований, в том числе при раке желудка. В последние годы внимание многих исследователей привлечено к маннозе (Man) – гексозе, которая является неперенным компонентом всех N-цепей гликопротеинов, участвующих как в нормальных физиологических, так и в патологических процессах.

Цель исследования – изучение роли факторов врожденного иммунитета и способов воздействия на них посредством маннозы и маннозосодержащих гликанов у больных раком желудка.

Материалы и методы. Представлены данные источников литературы с 2006 г. о роли маннозы – одного из ключевых моносахаридов при формировании N-цепей гликопротеинов – и связывающих ее рецепторов (маннозный рецептор, маннозосвязывающий лектин, антитела) при раке желудка. Исследования антигликановых антител в образцах сыворотки крови 235 больных раком желудка и 76 условно здоровых доноров выполнены с помощью гликоципа.

Результаты. Показано, что уровень антител IgM-класса к Man β – коровой части N-гликанов – у больных раком желудка достоверно ниже по сравнению с донорской группой независимо от возраста ($p = 0,0001$). Для оценки влияния возраста на уровни антигликановых антител больные были разделены на 2 подгруппы – моложе и старше 45 лет. В группе моложе 45 лет достоверные различия по уровням антигликановых антител к Man сохранялись, в то время как достоверных различий по уровням антигликановых антител к Man β 1-4GlcNAc β не наблюдали. При сравнении групп больных и доноров старше 45 лет уровни антител к Man β и Man β 1-4GlcNAc β были достоверно выше только у доноров.

Заключение. Дефицит гуморального иммунитета может быть одним из ключевых звеньев инициации или прогрессии канцерогенеза у человека. В нашей работе у больных раком желудка мы выявили дефицит антигликановых антител к Man β и к Man β 1-4GlcNAc β – коровым фрагментам N-цепей гликопротеинов, причем с возрастом дефицит нарастал. Представленные результаты – многообещающая платформа для дальнейших исследований, направленных не только на изучение роли антиманнозных антител, но и на разработку подходов к иммунопрофилактике.

Ключевые слова: рак желудка, манноза, антигликановые антитела, N-цепи, IgM

Для цитирования: Никулин М.П., Шилова Н.В., Липатников А.Д. и др. Уровни антител к маннозе у больных раком желудка (обзор литературы и клинико-экспериментальное исследование). Российский биотерапевтический журнал 2023;22(3):19–27. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-19-27

Mannose antibody levels in gastric cancer patients (literature review and clinical and experimental study)

Maxim P. Nikulin¹, Nadya V. Shilova², Alexander D. Lipatnikov², Alexandra V. Semyanikhina¹, Ivan S. Stilidi¹,
Nicolai V. Bovin², Nicolai N. Tupitsyn¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

²Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, 16/10 Miklukho-Maclay St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Maxim Petrovich Nikulin maximpetrovich@mail.ru

Introduction. Glycans play an important role in the pathogenesis of malignant neoplasms, including stomach cancer. In recent years, the attention of many researchers has been drawn to mannose (Man) – hexose, which is an indispensable component of all N-chains of glycoproteins involved in both normal physiological and pathological processes.

Aim. To investigate the role of innate immunity factors and ways to influence them through mannose and mannose-containing glycans in gastric cancer patients.

Materials and methods. Data on the role of mannose – one of the key monosaccharides in the formation of glycoprotein N-chains – and its binding receptors (mannose receptor, mannose-binding lectin, antibodies) in gastric cancer since 2006 are presented. Levels of anti-glycan antibodies in blood serum samples of 235 gastric cancer patients and 76 healthy donors were evaluated using a glycochip.

Results. It has been shown that the level of IgM-class antibodies to Man β – the core part of N-glycans – in gastric cancer patients is significantly lower compared to the donor group, regardless of age ($p = 0.0001$). To assess the effect of age on the levels of antiglycan antibodies, patients were divided into two subgroups – before and after 45 years. In the group under 45 years of age, significant differences in the levels of antiglycan antibodies to Man β persisted, while significant differences in the levels of antiglycan antibodies to Man β 1-4GlcNAc β were not observed. When comparing groups of patients and donors older than 45 years, the levels of antibodies to Man β and Man β 1-4GlcNAc β were significantly higher only in donors.

Conclusion. Deficiency of humoral immunity may be one of the key factors in the initiation and progression of carcinogenesis in humans. In our work, in patients with stomach cancer, we revealed a deficiency of antiglycan antibodies to Man β and to Man β 1-4GlcNAc β – core fragments of N-chains of glycoproteins, and the deficiency increased with age. The results of the study are a promising platform for further research aimed not only at studying the role of anti-mannose antibodies, but also at developing approaches to adoptive immunoprophylaxis.

Keywords: gastric cancer, mannose, anti-glycan antibodies, N-chains, IgM

For citation: Nikulin M.P., Shilova N.V., Lipatnikov A.D. et al. Mannose antibody levels in gastric cancer patients. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(3):19–27. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-19-27

Введение

Рак желудка (РЖ) остается одним из самых распространенных смертоносных заболеваний. Ежегодно в мире раком желудка заболевает около 1 млн и умирает почти 800 тыс. человек [1]. Хирургическое лечение РЖ достигло своего предела. Успехи иммунологии и выявление молекул эпидермального фактора роста (EGFR) на клетках РЖ позволили улучшить результаты лечения, однако метастатическая форма заболевания по-прежнему неизлечима.

Злокачественная трансформация нормальной слизистой желудка – сложный процесс, в котором определенную роль играет инфекция *Helicobacter pylori*. Нормальная слизистая желудка покрыта длинными углеводными цепями, которые терминируются в том числе молекулами, определяющими группы крови системы Льюиса. Адгезия *H. pylori* к этим группоспецифическим антигенам приводит к развитию хронического воспаления, которое сопровождается укорочением гликанов, а также появлением сиализированной формы (SLeA) наряду с «нормальным» антигеном LeA. Также процесс канцерогенеза сопровождается гиперэкспрессией муциновых опухлеассоциированных антигенов Tn и STn, которые играют ключевую роль в повышенной мобильности и инвазии опухлевых клеток [2]. Структурный мотив GalNAc является

неотъемлемым участком всех нормальных муцинов человека, как антиген он спрятан глубоко внутри углеводных цепей, однако в процессе онкотрансформации демаскируется и приобретает злокачественный потенциал вследствие укорочения углеводных цепей. Подобный неполный синтез, а также неосинтез – ключевые механизмы онкотрансформации [3]. Неполный синтез гликанов с укорочением углеводных цепей и появлением опухлеассоциированных антигенов (как, например, упомянутые выше STn и Tn) чаще встречается на ранних стадиях рака, неосинтез (например, SLeA) – на поздних стадиях [4]. Гликаны способны изменять конформацию белков, усиливать адгезию опухлевых клеток, повреждать передачу сигнала внутрь клеток, изменять транспорт гормонов, белков внутри клеток, участвовать в ангиогенезе [5]. Исследования, посвященные опухлеассоциированным гликанам, их биосинтезу и рецепторам, привлекают внимание клиницистов с позиции поиска как маркеров злокачественной трансформации, так и потенциальных мишеней для терапии [3].

В последние годы внимание многих исследователей привлечено к маннозе (Man) – гексозе, которая является непременным компонентом всех N-цепей гликопротеинов, участвующих как в нормальных физиологических, так и в патологических процессах.

Man в составе олигосахаридных цепей распознается маннозным рецептором (MR), экспрессированным на дендритных клетках и макрофагах, позволяя им распознавать маннозосодержащие гликополимеры [6], а также мембранонесвязанным маннозосвязывающим лектином (MBL) — компонентом системы врожденного иммунитета, относящимся к семейству коллектинов (суперсемейства лектинов С-типа) [7]. В данной работе речь пойдет о роли свободной маннозы и о ее рецепторах, в том числе антителах крови человека, при раке желудка.

Роль маннозы и маннозосодержащих гликанов в прогрессировании рака желудка

В 2018 г. в журнале *Nature* вышла статья об эффективности использования свободной D-маннозы в подавлении роста злокачественных клеток *in vivo* и *in vitro* [8]. Мыши, получавшие доксорубин интраперитонеально и маннозу *per os*, демонстрировали лучшую выживаемость по сравнению с животными, которых лечили только доксорубином или маннозой. Авторы предположили, что Man транспортируется в клетку с помощью тех же механизмов, что и глюкоза, но нарушает ее (глюкозы) метаболизм внутри клетки, что снижает экспрессию белков семейства Bcl-2, приводя к гибели опухолевых клеток. Кроме того, авторы показали, что чувствительность к Man зависит от уровня фермента фосфоманнозоизомеразы (PMI). Клетки с низким уровнем PMI чувствительны к маннозе, с высоким уровнем — резистентны к введению этого моносахарида; при этом резистентность можно снизить подавлением функции указанного фермента. Эффекта от добавления других моносахаридов, таких как галактоза, фруктоза, фукоза и глюкоза, не наблюдали.

Аденокарцинома пищевода чаще всего развивается в нижней трети пищевода на фоне гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и по своим биологическим свойствам напоминает аденокарциному желудка. Основываясь на своих предыдущих работах, D. Gu и соавт. [9] провели углубленное изучение содержания свободной (не входящей в состав сложных гликанов) D-маннозы, L-пролина и 3-гидроксипирата (BHBA) в сыворотке крови 159 больных аденокарциномой пищевода методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Ранее при исследовании сыворотки крови 30 больных раком пищевода и 30 контрольных случаев авторы выявили повышение уровней указанных метаболитов. Большинство пациентов были мужчинами (91,2 %) и курильщиками (74,8 %). Неoadъювантную химиолучевую терапию получили 112 (70,4 %) пациентов. Больные с высоким уровнем D-маннозы в сыворотке крови демонстрировали пониженный риск смерти по сравнению с пациентами с низким уровнем

(отношение рисков (OR) 0,44; 95 % доверительный интервал (ДИ): 0,25–0,77, $p < 0,01$). В этих группах 5-летняя выживаемость составила 66,4 % и 44,6 % соответственно. Медиана общей выживаемости (ОВ) была значительно более длительной — больше 123,4 мес — в группе больных с высоким содержанием маннозы по сравнению с пациентами с низким уровнем маннозы — 36,9 мес ($p = 0,01$). При анализе безрецидивной выживаемости (БРВ) наблюдали схожую тенденцию: риск рецидива был в 2 раза ниже у пациентов с высоким уровнем содержания D-маннозы в крови (OR 0,51; 95 % ДИ 0,29–0,91, $p = 0,02$), 5-летняя БРВ составила 69,8 и 46,6 % соответственно, а медиана БРВ — более 123,4 мес против 32,9 мес ($p < 0,01$). Кроме того, авторы провели анализ ОВ в зависимости от стадий и индекса массы тела (ИМТ). Положительное влияние повышенного содержания маннозы на прогноз сохранялось в зависимости от стадии (ранние/поздние): OR 0,40; 95 % ДИ 0,16–0,98, $p = 0,05$ для ранних стадий и OR 0,45; 95 % ДИ 0,21–0,92, $p = 0,03$ для поздних стадий. У пациентов с ИМТ < 30 повышенное содержание уровня D-маннозы ассоциировалось с лучшей выживаемостью (OR 0,46; 95 % ДИ 0,22–0,93, $p = 0,03$), в то время как в группе с ИМТ ≥ 30 такой ассоциации не было.

Интересно, что ранее авторы сообщали о повышенном содержании D-маннозы при раке пищевода по сравнению со здоровыми донорами и у пациентов с поздними стадиями [10]. Авторы пытались объяснить этот факт тем, что LC-MS, с помощью которой определяли маннозу, выявляет как свободный моносахарид, так и связанный с MBL. Поскольку низкий уровень MBL ассоциировался ранее с низкой выживаемостью у онкологических пациентов [11], авторы предлагают провести исследования по определению свободной маннозы и MBL при раке пищевода и других опухолях.

Несколько исследований было посвящено изучению влияния маннозы на опухолевые клетки *in vitro* и *in vivo*. В работе J. Sha и соавт. [12] клетки аденокарциномы легкого инкубировали с маннозой, карбоплатином и маннозой + карбоплатином. Установлено, что манноза достоверно ингибирует пролиферацию клеток A549, потенцирует противоопухолевый эффект карбоплатина и усиливает апоптоз опухолевых клеток.

В качестве примера комбинированного применения химиопрепаратов и маннозы можно привести исследование Z. Fan и соавт. [13] по использованию конъюгатных наночастиц метотрексат-маннозы (MTX-Man NPs). Авторы полагают, что такая молекула должна легко распознаваться опухолевой клеткой *in vitro* и *in vivo*. Было продемонстрировано, что MTX-Man NPs лучше накапливаются в опухолевой ткани и усиливают эффекты друг друга [13].

Известно также, что конъюгаты маннозы с фоточувствительными молекулами использовали в качестве фотосенсибилизатора для воздействия на клеточную линию рака молочной железы [14], а также рака предстательной железы [15].

Маннозосвязывающие рецепторы и их роль при раке желудка

Макрофагальный маннозный рецептор. MR играет важную роль во врожденном и приобретенном иммунитете [16]. Внеклеточная часть этого рецептора состоит из нескольких доменов: CR-домена, связывающего сульфатированные углеводы, и 8 лектиновых повторов С-типа, лигандами которого являются в первую очередь (хотя и не только) манно-гликоконъюгаты [17].

В исследовании D. Liu и соавт. [18] изучали экспрессию MR в опухоли желудка и прилегающей нормальной слизистой у 120 пациентов с РЖ иммуногистохимическим методом. Была продемонстрирована сильная реакция в ядрах и цитоплазме опухолевых клеток и слабая или негативная реакция в окружающей слизистой желудка. Пациенты были разделены на 2 группы: со слабой и сильной экспрессией MR. Экспрессию MR на клетках РЖ наблюдали у 45,8 % ($n = 54$) пациентов, его экспрессию в окружающей ткани – у 20,0 % ($n = 36$) пациентов ($p = 0,012$). Для подтверждения этих результатов сравнили уровни микроРНК, ответственной за экспрессию MR, в 30 случаях РЖ и в окружающей слизистой: 19 из 30 случаев РЖ продемонстрировали 2-кратное превышение экспрессии этой микроРНК в опухоли при максимальном превышении в 14,7 раза. Анализ БРВ и ОВ показал, что у пациентов с выраженной экспрессией MR в опухоли результаты были значительно хуже по сравнению с пациентами со слабой экспрессией ($p = 0,001$ и $p = 0,003$ соответственно). В однофакторном анализе нарастание экспрессии MR прямо коррелировало с размером опухоли, стадией, наличием регионарных метастазов. Не было связи с полом, возрастом, локализацией, классификацией по Лаурену (Lauren), отдаленными метастазами, лимфоваскулярной инвазией. В многофакторном анализе на БРВ влияли стадия, статус лимфатических узлов и экспрессия MR, на ОВ – статус лимфатических узлов и экспрессия MR. Авторы подчеркивают, что экспрессия MR в обычной слизистой остается неясной, однако может отражать предраковые изменения.

S.S. Liu и соавт. [19] изучали экспрессию маннозосодержащих гликанов и макрофагального MR на клетках РЖ и макрофагах в опухоли на парафиновых блоках с помощью иммуногистохимического анализа. Непораженная слизистая желудка служила в качестве контроля. Гликаны выявляли с помощью лек-

тина *Narcissus pseudonarcissus* (NPL), а маннозный рецептор – антителом к CD206. Установлено, что количество NPL-позитивных и MR-позитивных макрофагов достоверно больше в опухоли, чем в нормальной прилегающей слизистой. Экспрессия маннозосодержащих гликанов также достоверно превалировала в опухолевой ткани. Была выявлена слабая отрицательная корреляция между уровнем экспрессии и гликанов, и рецептора на макрофагах в опухоли ($r = -0,363$, $p = 0,009$). Повышенное количество NPL-позитивных макрофагов в опухоли явилось достоверным благоприятным фактором отдаленной выживаемости, а повышенное количество MR-позитивных макрофагов – неблагоприятным. Интересно отметить, что определялось лучшее проникновение NPL-позитивных макрофагов внутрь опухоли, чем MR-позитивных макрофагов. В многофакторном анализе пораженные лимфатические узлы ($p = 0,004$) и избыточное количество MR-позитивных макрофагов ($p = 0,033$) в опухоли явились негативными факторами прогноза ОВ. В то же время уровень экспрессии маннозосодержащих гликанов на клетках РЖ не влиял на ОВ.

D. Ding и соавт. [20] измеряли концентрацию растворимого маннозного рецептора (sMR) и растворимого скавенджер-рецептора (sCD163) в сыворотке крови 143 больных РЖ, 66 пациентов с доброкачественными заболеваниями желудка и 59 здоровых доноров. Уровни указанных белков были достоверно выше у больных РЖ в сравнении с контрольной группой ($p < 0,0001$). Высокие предоперационные уровни sMR и sCD163 достоверно коррелировали с худшим прогнозом, наличием регионарных и отдаленных метастазов, а также с уровнями опухолевых маркеров CEA, CA199, CA72–4, CA125. Авторы подчеркивают, что причины полученных результатов не совсем понятны, но они могут отражать слушивание рецепторов с поверхности активных макрофагов и попадание их в кровоток. Похожие результаты по повышению sMR и sCD163 авторы получили, изучив данные 163 больных колоректальным раком, при этом маркеры определяли не только в крови, но и на парафиновых срезах опухоли иммуногистохимическим методом [21]. Авторы предположили, что повышенная экспрессия MR в опухоли отражает стимуляцию M2-макрофагов, которые ответственны за усиление опухолевого роста. Эти данные согласуются с исследованиями H. Zhang и соавт. [22], которые изучали M1-(CD11c+) и M2-макрофаги (CD206+) в опухолях 180 больных РЖ. Повышенное содержание M1-макрофагов в опухоли ассоциировалось с достоверно лучшей выживаемостью, а повышение количества M2-макрофагов достоверно ухудшало прогноз. Интересно отметить, что экспрессия CD206 также коррелировала с классификацией РЖ по Лаурену.

В целом же большинство исследований M1-макрофагов, свидетельствуют о негативном прогнозе при увеличении соотношения указанных клеток в опухолях желудка [23].

Маннозосвязывающий лектин. MBL — это лектин С-типа, синтезируемый в печени в виде мономеров, а в зрелой форме образующий мультимеры вплоть до 18-меров [7]. Уровень сывороточной полимеризации MBL — критический фактор, определяющий его биологическую активность [24]. Как и другие кол-лектины, MBL состоит из домена, богатого остатками цистеина (cysteine-rich domain), коллагеноподобного домена (collagen-like region), соединительного домена (neck region) и домена, связывающего углеводы (carbohydrate recognition domain, CRD) [25]. Этот лектин является одним из центральных звеньев в реализации механизмов врожденного иммунитета и задействован в первой линии противоинфекционной защиты организма человека (лектиновый путь активации комплемента).

Одним из первых сообщений, посвященных генетическим полиморфизмам MBL у больных РЖ, можно считать публикацию А. Вассарелли и соавт. [26], в которой приводятся данные о сравнении 305 случаев РЖ с 427 случаями контроля в польской популяции. Дефицит MBL изучали при 6 различных гаплотипах выявлением аллелей в промоутере гена *MBL2*. Гаплотип HYD ассоциировали с повышенным риском развития РЖ по сравнению с наиболее распространенным гаплотипом HYA (отношение шансов (ОШ) = 1,9; 95 ДИ 1,1–3,2; $p = 0,021$). При анализе диплотипов носители YA/D демонстрировали наиболее высокий риск развития РЖ по сравнению с диплотипом YA/YA (ОШ 3,0; 95 % ДИ 1,2–7,1; $p = 0,015$). Дальнейший анализ по изучению синергизма влияния дефекта *MBL2* и интерлейкина 1В (IL-1В) показал 3,5-кратное увеличение риска (ОШ 3,5, 95 % ДИ 1,6–7,6; $p = 0,001$) при сочетании HYD *MBL2*-гаплотипа и IL-1В-генотипа. Авторы полагают, что между инфекцией *H. pylori*, основного канцерогена при РЖ, полиморфизмом интерлейкина и геном *MBL2* существует тесная взаимосвязь, которая требует углубленного изучения.

F.Y. Wang и соавт. [27] изучали полиморфизм гена *MBL2* у 388 больных РЖ и 144 здоровых доноров в японской популяции. Полиморфизм в 54-м кодоне 1-го экзона исследовался с помощью полимеразной цепной реакции. Значимых отличий между когортой больных и донорами выявлено не было, однако носители аллеля А чаще встречались при распространенных стадиях РЖ (ОШ 1,68; 95 % ДИ 1,05–2,67; $p = 0,03$) и у пациентов моложе 65 лет (ОШ 1,6; 95 % ДИ 1,01–2,52, $p < 0,05$).

В то же время Z. Xie и соавт. [28] в своем мета-анализе, включавшем 43 опубликованных исследо-

вания, не обнаружили ассоциации между полиморфизмом гена *MBL* и РЖ.

Таким образом, результаты исследований роли маннозы и маннозосвязывающих белков человека показали важность этих компонентов в развитии и прогрессии злокачественных опухолей, в частности РЖ. В качестве одного из объяснений воздействия Man на опухолевый рост может служить предположение о повышении экспрессии маннозосодержащих структур на поверхности мембраны опухолевых и других клеток, что облегчает распознавание с помощью как MR, так и MBL. Последний запускает лектиновый путь активации комплемента, приводящий к распознаванию опухолевой клетки. Также надо иметь в виду способность MBL распознавать не только маннозу, но и более широкий круг гликоконъюгатов (согласно исследованиям Консорциума по функциональной гликомике: <http://www.functionalglycomics.com/>), что может отражаться на его функциональной активности [7]. Одно из первых исследований уровня экспрессии маннозосвязывающего лектина при РЖ показало зависимость развития заболевания от полиморфизма гена *MBL*, что, вероятно, сказывается на генетической предрасположенности к этому виду онкологии, хотя это и не подтвердилось по результатам метаанализа [28]. Выраженная экспрессия MR в опухолях желудка являлась фактором неблагоприятного прогноза в китайском исследовании [28]. Экспрессия маннозосодержащих гликанов на макрофагах являлась благоприятной для пациентов, а экспрессия MR, наоборот, связана с неблагоприятным прогнозом, что указывает на наличие дополнительных факторов, которыми могут быть антигликановые антитела.

Антигликановые антитела

В организме человека существуют естественные антитела, которые являются частью врожденного иммунитета. Многие из этих антител направлены к гликанам [29], в том числе и к опухолеассоциированным Tn, TF, SiaTn, которые в избытке экспрессируются на опухолях желудочно-кишечного тракта [30]. Ранее нами были изучены профили антигликановых антител на представительной когорте из групп доноров и больных РЖ с помощью PGA (printed glycan array) [31]. Среди прочего обнаружено, что значимая разница между группами наблюдается по антителам класса М, направленным к производному α Man-R ($R = \text{NHCOCH}_2\text{NH}$; $p = 0,0038$), и антителам, направленным к дисахариду Man α 1-6Man β ($p = 0,0033$). При этом уровень IgM к дисахариду пациентов был ниже, чем у здоровых доноров, а к α Man-R — выше. Man α 1-6Man β — коровая часть N-цепей гликопротеинов, в норме скрыта бисектным GlcNAc, количество которого снижается при патологиях желудочно-кишечного тракта, оголяя коровую Man β . Было высказано

предположение о снижении надзорной функции естественных антител к Man β -содержащему дисахариду.

Материалы и методы

В исследование включены 235 пациентов с морфологически верифицированным РЖ (исследуемая группа) и 76 доноров (контрольная группа). Доля мужчин в 1-й группе составила 53 % ($n = 125$), во второй – 67 % ($n = 51$). Средний возраст пациентов на момент постановки диагноза – 61 год (22 больных были моложе 45 лет, 213 больных – старше 45 лет), доноров – 35 лет (моложе 45 лет – 68 человек, старше 45 лет – 8 человек). У 16 % больных ($n = 37$) заболевание диагностировано на I стадии, у 25 % ($n = 58$) – на II стадии, у 33 % ($n = 79$) – на III стадии и у 26 % ($n = 61$) – на IV стадии.

Для изучения антигликановых антител методом PGA у всех пациентов до начала противоопухолевого лечения проводили забор периферической крови с последующим выделением сыворотки крови. Периферическая кровь здоровых доноров предоставлена локальным биобанком. Добровольное информированное согласие получено от всех включенных в исследование больных и доноров.

Сбор образцов. Образцы сывороток крови собирали в вакуумные пробирки VACUETTE® объемом 4 мл, размером 13 × 75 мм с активатором свертывания. После выдерживания в течение 1 ч при +4 °C образцы центрифугировали в течение 10 мин при 2000 × g, полученную сыворотку аликвотили и хранили при –20 °C.

Анализ с помощью гликочипа. В работе использовали гликочип, содержащий 309 гликанов («Семиотик», Россия), который был напечатан, как описано О. Blixt и соавт. [32], с некоторыми изменениями. Гликочипы печатали с помощью бесконтактного робота sciFLEXARRAYER S5 (Scienion, Германия) из буфера для печати (300 мМ фосфат натрия, pH 8,5, содержащий 0,005 % Tween-20) на NHS-активированные слайды Slides H (Schott Nexterion, Германия), объем капли – 0,9 нл. Концентрация гликанов в буфере для печати была 20 мкМ. Все лиганды печатали в 10 повторях. Согласно протоколу производителя для блокировки оставшиеся после печати NHS-группы блокировали в 25 мМ этанолаmine в 100 мМ борате, содержащем 0,2 % Tween-20, pH 8,5, в течение 1,5 ч. Факт иммобилизации лигандов на активированные слайды подтверждали с помощью стандартной плазмы крови человека, а также набора растительных лектинов (данные не приведены).

Сыворотку крови разбавляли 1:15 в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1 % Tween-20 (0,15 М, PBS 0,1 %, pH 7,4) и 1 % BSA, после чего наносили на гликочип (предварительно выдержанный в течение 15 мин в PBS 0,1 %) и инкубировали при повышенной влажности в течение 1 ч при 37 °C. Чип промывали

PBS 0,05 % и инкубировали с антителами козы, узнающими IgG человека, меченными Alexa647 (разбавление 1:800 в PBS 0,1 %, содержащем 1 % BSA) и IgM человека, меченными Cy3 (разбавление 1:1000 в PBS 0,1 %, содержащем 1 % BSA) (Jackson ImmunoResearch, США), в течение 1 ч при 37 °C. Чип промывали PBS 0,05 % и деионизованной водой, высушивали центрифугированием. Флуоресцентные сигналы, выраженные в относительных флуоресцентных единицах (RFU) и отражающие уровень антител, считывали с помощью флуоресцентного сканера микрочипов InnoScan 1100 AL (Innopsys, Франция) с разрешением 10 мкм. Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ScanArray Express 4.0 (метод фиксированных колец) и Microsoft Excel. Для последующего статистического анализа использовали медиану 10 повторных измерений и отклонение медианы.

Статистический анализ. Межгрупповые сравнения проводили, используя U-тест Манна–Уитни с помощью программного обеспечения SPSS версии 17.0 (США). Значимыми считали различия, если величина p была меньше, чем 0,05.

Собственные результаты

В исследование были включены 235 пациентов с морфологически верифицированным раком желудка (исследуемая группа) и 76 доноров (контрольная группа), которых делили по возрасту (моложе и старше 45 лет). Анализ профиля антигликановых антител выполняли с помощью гликочипа (PGA) и проводили сравнение полученных результатов в различных группах. Поскольку ведущую роль в естественной защите организма играют антитела класса M, то далее рассматривали только IgM. В таблице и на рисунке приведены результаты измерений уровня IgM к Man β -содержащим гликанам.

Как видно из таблицы, уровень антигликановых антител к Man β и Man β 1-4GlcNAc β в общей группе больных был достоверно ниже, чем у доноров ($p = 0,0001$ и $0,0075$ соответственно). Для оценки влияния возраста на уровни антигликановых антител у больных РЖ и доноров мы разделили обе группы на 2 подгруппы – до и после 45 лет. В группе до 45 лет достоверные различия по уровням антигликановых антител к Man β сохранялись (у 68 доноров выше, чем у 22 больных), в то время как достоверных различий по уровням антигликановых антител к Man β 1-4GlcNAc β не наблюдалось (см. таблицу и рисунок). При сравнении групп больных и доноров старше 45 лет ($n = 213$ и $n = 8$ соответственно) уровни антител Man β и Man β 1-4GlcNAc β были достоверно выше только у доноров (см. таблицу и рисунок).

Ведущим естественным фактором, влияющим на концентрацию антигликановых антител у человека,

Медиана RFU уровня антител класса М к Man β и к Man β 1-4GlcNAc β в образцах сыворотки крови больных и здоровых доноров до и после 45 лет

RFU level median of M class antibodies to Man β and Man β 1-4GlcNAc β in blood serum samples of patients and healthy donors under and over the age of 45

Гликан Glycan	Медиана RFU* (MAD**) Median RFU* (MAD**)		p
	Пациенты (n = 235) Patients (n = 235)	Доноры (n = 76) Donors (n = 76)	
Man β	3018 (257)	5590 (443)	0,0001
Man β 1-4GlcNAc β	3940 (291)	6375 (445)	0,0075
<45 лет <45 years	Пациенты (n = 22) Patients (n = 22)	Доноры (n = 68) Donors (n = 68)	—
Man β	3563 (339)	6818 (497)	0,0331
Man β 1-4GlcNAc β	7382 (444)	6791 (490)	0,4851
>45 лет >45 years	Пациенты (n = 213) Patients (n = 213)	Доноры (n = 8) Donors (n = 8)	—
Man β	688 (71)	2819 (245)	0,0026
Man β 1-4GlcNAc β	1366 (176)	3796 (283)	0,0005

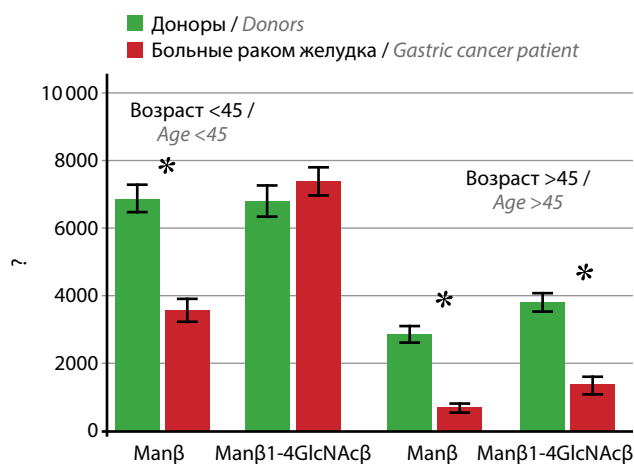
*RFU — относительные единицы флуоресценции, отражающие уровень антител; **MAD — абсолютное отклонение медианы.

*RFU — relative fluorescence units reflecting the level of antibodies; **MAD — median absolute deviation.

Примечание. Жирным выделены $p < 0,05$.

Note. Bold indicates $p < 0,05$.

является не только возраст, но и пол, однако, учитывая малочисленность выборки здоровых доноров, проведение более детального анализа не представлялось возможным. Также отметим, что анализ проводился без учета поправки на множественность сравнений.



Уровни антител (выраженные в RFU) к Man β -содержащим гликанам в группах доноров и пациентов с РЖ в возрасте до 45 и после 45 лет. * $p < 0,05$

Antibody levels to Man β -containing glycan in groups of donors and patients with gastric cancer under and over the age of 45. * $p < 0,05$

Заключение

Врожденные антитела класса IgM, продуцируемые В1-клетками, — это особая категория антител, которые характеризуются полиреактивностью и отсутствием V(D)J-рекомбинации по сравнению с антителами, продуцируемыми В2-лимфоцитами. Более того, появление врожденных антител не связано с иммунизацией. Аберрантное гликозилирование, заключающееся, как правило, в укорочении углеводных цепочек на мембране опухолевых клеток, — частое явление у больных РЖ и колоректальным раком [2]. В процессе нарушения гликозилирования при опухолевой прогрессии на поверхности клеток появляются опухолеассоциированные гликаны, такие как STn, TF, являющиеся коровыми структурами обычных муциновых О-цепей, не подвергшиеся дальнейшей элонгации. У здорового индивидуума измененные олигосахариды распознаются врожденными антителами, инициируя элиминацию постоянно появляющихся трансформированных клеток (функция надзора). При этом у пациентов с онкологическими заболеваниями, в том числе желудочно-кишечного тракта, уровень антител к аберрантным гликанам часто снижен [30].

В нашей работе у больных РЖ мы выявили дефицит антигликановых антител к Man β и Man β 1-4GlcNAc β — коровым фрагментам N-цепей гликопротеинов, причем с возрастом дефицит нарастал. Такие гликаны,

по-видимому, можно отнести к опухолеассоциированным. Обнаруженный низкий уровень антиманнозных IgM у больных РЖ подтверждает наши более ранние сообщения [31, 33], а также согласуется с данными других исследователей о дефиците врожденного звена иммунитета, связанного с маннозой, при этой патологии [26].

Представленные данные в совокупности позволяют предположить, что пациенты с РЖ испытывают дефицит естественного иммунитета, что приводит к нарушению элиминации опухолевых клеток, которое можно скорректировать с помощью специфических врожденных иммуноглобулинов.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 countries. Доступно по: <https://gco.iarc.fr/>
- Ferreira J., Magalhães A., Gomes J. et al. Protein glycosylation in gastric and colorectal cancers: Toward cancer detection and targeted therapeutics. *Cancer Lett* 2017;387:32–45. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.044
- Hakomori S., Kannagi R. Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst* 1983;71(2):231–51.
- Kannagi R., Yin J., Miyazaki K. et al. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants – Hakomori's concepts revisited. *Biochim Biophys Acta* 2008;1780(3):525–31. DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.10.007
- Pinho S.S., Reis C.A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015;15(9):540–55. DOI: 10.1038/nrc3982
- Engering A., Cella M., Fluittsma D. et al. Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 1997;417:183–7. DOI: 10.1007/978-1-4757-9966-8_31
- Scorza M., Liguori R., Elce A. et al. Biological role of mannose binding lectin: From newborns to centenarians. *Clin Chim Acta* 2015;451(Pt A):78–81. DOI: 10.1016/j.cca.2015.03.007
- Gonzalez P.S., O'Prey J., Cardaci S. et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy. *Nature* 2018;563(7733):719–23. DOI: 10.1038/s41586-018-0729-3
- Gu J., Liang D., Pierzynski J.A. et al. D-mannose: a novel prognostic biomarker for patients with esophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2017;38(2):162–7. DOI: 10.1093/carcin/bgw207
- Sanchez-Espiridion B., Liang D., Ajani J.A. et al. Identification of serum markers of esophageal adenocarcinoma by global and targeted metabolic profiling. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:1730–7. DOI: 10.1016/j.cgh.2015.05.023
- Ytting H., Christensen I.J., Jensenius J.C. Preoperative mannan-binding lectin pathway and prognosis in colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:265–72. DOI: 10.1007/s00262-004-0594-9
- Sha J., Cao D., Cui R. et al. Mannose Impairs Lung Adenocarcinoma Growth and Enhances the Sensitivity of A549 Cells to Carboplatin. *Cancer Manag Res* 2020;12:11077–83. DOI: 10.2147/CMAR.S278673
- Fan Z., Wang Y., Xiang S. et al. Dual-self-recognizing, stimulus-responsive and carrier-free methotrexate-mannose conjugate nanoparticles with highly synergistic chemotherapeutic effects. *J Mater Chem B* 2020;8(9):1922–34. DOI: 10.1039/d0tb00049c
- Zhang Q., Cai Y., Li Q.Y. et al. Targeted delivery of a mannose-conjugated BODIPY photosensitizer by nanomicelles for photodynamic breast cancer therapy. *Chemistry* 2017;23(57):14307–15. DOI: 10.1002/chem.201702935
- Bouffard E., Mauriello Jimenez C., El Cheikh K. et al. Efficient photodynamic therapy of prostate cancer cells through an improved targeting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Int J Mol Sci* 2019;20(11):2809. DOI: 10.3390/ijms20112809
- Sheikh H., Yarwood H., Ashworth A. et al. Endo180, an endocytic recycling glycoprotein related to the macrophage mannose receptor is expressed on fibroblasts, endothelial cells and macrophages and functions as a lectin receptor. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 6):1021–32. DOI: 10.1242/jcs.113.6.1021
- Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol* 2012;92(6):1177–86. DOI: 10.1189/jlb.0512231
- Liu D.R., Guan Q.L., Gao M.T. et al. Mannose receptor as a potential biomarker for gastric cancer: a pilot study. *Int J Biol Markers* 2017;32(3):278–83. DOI: 10.5301/ijbm.5000244
- Liu S.S., Gao Y., Yin S.P. et al. Expression of Narcissus pseudonarcissus lectin and mannose receptor positive macrophages predict progression and prognosis of patients with gastric cancer. *Transl Cancer Res* 2020;9(10):5979–93. DOI: 10.21037/tcr-20-1459
- Ding D., Song Y., Yao Y. et al. Preoperative serum macrophage activated biomarkers soluble mannose receptor (sMR) and soluble haemoglobin scavenger receptor (sCD163), as novel markers for the diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Oncol Lett* 2017;14(3):2982–90. DOI: 10.3892/ol.2017.6547
- Ding D., Yao Y., Yang C. et al. Identification of mannose receptor and CD163 as novel biomarkers for colorectal cancer. *Cancer Biomark* 2018;21(3):689–700. DOI: 10.3233/CBM-170796
- Zhang H., Wang X., Shen Z. et al. Infiltration of diametrically polarized macrophages predicts overall survival of patients with gastric cancer after surgical resection. *Gastric Cancer* 2015;18(4):740–50. DOI: 10.1007/s10120-014-0422-7
- Räihä M.R., Puolakkainen P.A. Tumor-associated macrophages (TAMs) as biomarkers for gastric cancer: A review. *Chronic Dis Transl Med* 2018;4(3):156–63. DOI: 10.1016/j.cdtm.2018.07.001
- Dommett R.M., Klein N., Turner M.W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 2006;68(3):193–209. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2006.00649.x
- Turner M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996;17(11):532–40. DOI: 10.1016/0167-5699(96)10062-1
- Baccarelli A., Hou L., Chen J. et al. Mannose-binding lectin-2 genetic variation and stomach cancer risk. *Int J Cancer* 2006;119:1970–5. DOI: 10.1002/ijc.22075
- Wang F.Y., Tahara T., Arisawa T. et al. Mannan-binding lectin (MBL) polymorphism and gastric cancer risk in Japanese population. *Dig Dis Sci* 2008;53(11):2904–8. DOI: 10.1007/s10620-008-0249-3
- Xie Z., Wang B., Chai Y. et al. Estimation of associations between 10 common gene polymorphisms and gastric cancer: evidence from a meta-analysis. *J Clin Pathol* 2020;73(6):318–21. DOI: 10.1136/jclinpath-2019-206189

29. Huflejt M.E., Vuskovic M., Vasiliu D. et al. Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges. *Mol Immunol* 2009;46(15):3037–49. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.06.010
30. Smorodin E.P., Sergeyev B.L., Kurtenkov O.A. The characterization of IgG antibodies to GalNAc beta-terminated glycans of gastric cancer survivors. *Exp Oncol* 2014;36(1):38–43. PMID: 24691283
31. Shilova N., Nikulin M., Navakovskiy M. et al. Antibodies to α MAN in gastric cancer. *Hematopoiesis Immunology* 2021;19(1):30–6.
32. Blixt O., Head S., Mondala T. et al. Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(49):17033–8. DOI: 0.1073/pnas.0407902101
33. Tupitsyn N. Immunological concept of cancer prevention. *Hematopoiesis Immunology* 2019;17(2):14–32.

Вклад авторов

М.П. Никулин, Н.В. Шилова: обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

А.Д. Липатников: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

А.В. Семьянихина: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

И.С. Стилиди: административная поддержка; редактирование рукописи;

Н.В. Бовин: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Н.Н. Тупицын: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи, административная поддержка.

Author's contributions

M.P. Nikulin, N.V. Shilova: review of publications on the topic of the article, research design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

A.D. Lipatnikov: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

A.V. Semyanikhina: review of publications on the topic of the article, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

I.S. Stilidi: administrative support; editing of the article;

N.V. Bovin: research design development, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

N.N. Tupitsyn: research design development, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript, administrative support.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.П. Никулин / M.P. Nikulin: <https://orcid.org/0000-0002-9608-4696>

Н.В. Шилова / N.V. Shilova: <https://orcid.org/0000-0001-6003-071X>

А.Д. Липатников / A.D. Lipatnikov: <https://orcid.org/0000-0003-2925-9924>

А.В. Семьянихина / A.V. Semyanikhina: <https://orcid.org/0000-0001-8783-8874>

И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-5229-8203>

Н.В. Бовин / N.V. Bovin: <https://orcid.org/0000-0001-8669-4477>

Н.Н. Тупицын / N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 22-24-00398.

Sponsorship. The study was supported by the RGNF grant No. 22-24-00398.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. All the patients signed the informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 21.04.2023. Принята в печать: 12.07.2023

Article received: 21.04.2023. Accepted for publication: 12.07.2023