

ХАРАКТЕРИСТИКА ВУГЛЕВОДНИХ ДЕТЕРМІНАНТ ПОВЕРХНІ КЛІТИН МИШИНОЇ ЛІМФОМИ НК/Лу ПО ЗВ'ЯЗУВАННЮ НАТИВНИХ ЛЕКТИНІВ ІЗ НАСТУПНИМ ЇХ ВИЯВЛЕННЯМ НЕПРЯМИМ ІМУНОЦИТОХІМІЧНИМ МЕТОДОМ

М. М. Луцик, В. І. Ковалишин, А. М. Яценко

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Охарактеризовано вуглеводні детермінанти поверхні клітин мишиної лімфоми НК/Лу з допомогою непрямого імуноцитохімічного методу виявлення зв'язування лектинів (Кон А, LcL, PNA, WGA) із застосуванням світлової і електронної мікроскопії. Префіксовані клітин обробляли нативними лектинами, після чого зв'язані лектини виявляли з допомогою отриманих специфічних антитіл (або пероксидази хрому для Кон А), мічених колоїдним золотом. Для візуалізації колоїдного золота при світлооптичній мікроскопії застосували метод фізичної проявки ацетатом срібла. Встановлено, що на поверхні клітин НК/Лу найбільш виражені вуглеводні детермінанти до WGA з високим спорідненням зв'язування, що свідчить про значний вміст сіалових кислот у складі гліканів N- і, особливо, O-типу. Лектин сочевиці виявляв найменшу кількість детермінант із низьким спорідненням зв'язування. Відносно високий вміст PNA⁺ клітин свідчить про десіалювання O-глікозильних ланцюгів і експонування T-F антигену. Обговорено переваги непрямого імунохімічного методу виявлення лектин-зв'язуючих сайтів у порівнянні з прямими методами, при яких застосовуються модифіковані міткою лектини.

Ключові слова: ЛІМФОМА НЕМЕТ-КЕЛЬНЕРА (НК/Лу), ВУГЛЕВОДИ КЛІТИННОЇ ПОВЕРХНІ, ЛЕКТИНИ

Серед компонентів клітинної мембрани найбільш мінливими можна вважати олігосахаридні ланцюги глікопротеїнів, які експоновані на зовнішній поверхні клітини. Зміни їх структури можуть виникати як в процесі біосинтезу, який не є строго детермінованим і залежить від умов існування клітини, так і внаслідок поступової деградації в процесі старіння клітини або під впливом зовнішніх факторів [1, 2].

Особливий інтерес представляють мембранні глікопротеїни пухлинних клітин, серед яких часто виявляються аномальні вуглеводні ланцюги, або які змінюються під впливом протипухлинних чинників [2]. Це може мати діагностичне, прогностичне значення [3–5], а також у процесі пошуку нових протипухлинних препаратів [6].

Клітини мишиної лімфоми НК/Лу, зокрема вуглеводна структура їх поверхні, у порівнянні з клітинами інших споріднених пухлин — лейкозу L 1210, P 388, HL-60 [6–8] досліджені і охарактеризовані явно недостатньо. Лише в одній публікації описано порушення цілісності клітинної мембрани на ультраструктурному рівні в процесі старіння клітин НК/Лу, виявлене з допомогою рутенієвого червоного [9]. Разом з тим, лімфома НК/Лу як модельна пухлина, представляє значний інтерес для експериментальної терапії, завдяки тривалості процесу росту можна більш детально дослідити зміни клітин у процесі росту або під впливом терапевтичних чинників [10].

Мета роботи полягала у дослідженні і характеристиці вуглеводних детермінант поверхні клітин НК/Лу і їх змін у процесі росту пухлини. В якості структурних зондів застосували нативні лектини із визначеною селективністю до олігосахаридних ланцюгів, а саме, конканавалін А (Con A), лектин сочевиці (LcL), специфічних до двохантених N-глікозильних ланцюгів, арахісу (PNA, специфічність до асіало-O-гліканів), зародків пшениці (WGA, специфічність до термінальних залишків сіалових кислот і N-ацетилглюкозаміну) [11–13]. Зв'язані з клітиною лектини виявляли з допомогою специфічних антилектинових антитіл, мічених колоїдним золотом.

Матеріали і методи

Дослідження проводили з асцитною формою лімфоми NK/Ly, штам пухлини люб'язно наданий д-р Придатко О. Ю. із колекції експериментальних пухлин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології НАН України (Київ). Штам підтримували перевиванням асциту мишам лінії C57Bl згідно з стандартною методикою [14]. Асцит для дослідження забирали на початковій (7–8 день) і термінальній (20–23 день) стадіях росту пухлини. Асцитні клітини промивали холодним забуференим фосфатом фізрозчином (ЗФР), рН 7,4, шляхом центрифугування 3 хв в пробірках Еппендорф при 1500 хв^{-1} , після чого фіксували 0,2 % розчином глютарового альдегіду у ЗФР при 4°C протягом 15–20 хв. Клітини промивали забуференим тріс фізрозчином (ЗТР), рН 7,4, суспендували у 0,1 М розчині гліцину в ЗТР для блокування залишкових альдегідних груп і залишали при 4°C від 1 до 12 годин.

Обробка клітин лектинами. До 450 мкл розчину лектину в ЗТР із добавкою 1 мМ CaCl_2 і MnCl_2 вносили 50 мкл 50 % суспензії клітин у ЗТР і витримували при 4°C 1–1,5 год, періодично перемішуючи. Концентрація лектинів становила для Con A 100 мкг/мл, LcL — 200 мкг/мл, PNA — 200 мкг/мл, WGA — 10 мкг/мл. Контрольні проби для визначення специфічності зв'язування інкубували без лектинів. Після двократного відмивання ЗТР осад клітин суспендували у 0,4 мл розчину відповідних антитіл, мічених колоїдним золотом, інкубували при 4°C 1,5–2 год, після чого двократно промивали ЗТР.

Частину осаду клітин фіксували 2 % розчином глютарового альдегіду, проводили через розчини ацетону і заливали в смолу Епон 812 згідно з інструкцією виробника (Fluka) для отримання напівтонких (1,5 мкм) і тонких зрізів. Другу частину клітин піддавали процесу фізичної проявки ацетатом срібла для візуалізації гранул колоїдного золота на світлооптичному рівні [15]. Для цього клітини суспендували у проявляючому розчині ацетату срібла і витримували при кімнатній температурі протягом часу, встановленого для кожного лектину (для LcL 10–15 хв, для WGA — 1 хв). Процес зупиняли шляхом осадження і промивання клітин водою при центрифугуванні 1 хв при 3000 хв^{-1} . Після цього клітини суспендували у ЗТР і підраховували кількість лектин-позитивних і лектин-негативних клітин у гемоцитометричній камері Горяєва.

Електронну мікроскопію здійснювали на мікроскопі УЭМБ-100 (Суми).

Напівтонкі зрізи забавлювали толуїдиновим голубим, сафраніном Т або їх комбінацією модифікованим методом, описаним Б. Уитли [16]. Зріз поміщали в краплю 1 % розчину толуїдинового синього на предметному склі в розчиннику 15 % етанол, 15 % гліцерин, 0,02 М тріс, витримували 60–70 хв у вологій камері, після промивання водою на зріз наносили 100 мкл 0,5 % розчину сафраніну Т і витримували 15 хв. Після видалення барвника і промивання водою зріз висушували і заключали в кедрове масло. Обробку напівтонких зрізів проводили під бінокулярною лупою.

Антитіла до лектинів отримували імунізацією кролів введенням 0,5–1 мг антигену в 0,5 мл повного ад'юванта Фрейнда в 3–4 точки на спині тварини. Імунізацію повторювали 3 рази з інтервалом 1 місяць. Очистку антитіл із сироватки крові проводили методом афінної хроматографії на Т-гелі [17]. Для виявлення Con A використовували пероксидазу хрому. Мітку антитіл і пероксидази колоїдним золотом проводили за методом [18]. Робочі розчини мічених антитіл для детекції зв'язаних лектинів готували *ex tempore* шляхом центрифугування при 12–18 тис. хв^{-1} протягом 40 хв і розчинення осаду частинок колоїдного золота в ЗТР із 0,02 % ПЕГ в об'ємі 1/5 від вихідного (із 2 мл вихідного розчину отримували 0,4 мл робочого розчину реагента для обробки препаратів).

Результати й обговорення

Із застосованих лектинів WGA зв'язувався з найбільшим відсотком клітин NK/Ly із високим спорідненням. Інтенсивне зв'язування цього лектину спостерігалось при концентрації 10 мкг/мл, у той час як для інших лектинів при концентрації 100–200 мкг/мл відмічалось слабше зв'язування і з меншим відсотком клітин. Слід відмітити значну гетерогенність популяції клітин NK/Ly зі зв'язування лектинів, як по співвідношенню лектин-позитивних і -негативних клітин (табл. 1), так і по інтенсивності зв'язування лектинів. Найбільш чітко різниця у інтенсивності відкладень срібла між лектин-позитивними

і негативними клітинами виявлялась при обробці PNA. Для Con A і LcL спостерігалась значна частина клітин із проміжною інтенсивністю забарвлення, що ускладнює віднесення клітин до групи лектин-позитивних чи лектин-негативних. Відмічено тенденцію до зменшення відсотка клітин, що зв'язують лектин сочевиці при старінні пухлини, однак статистично достовірних відмінностей у зв'язуванні лектинів на початковій і термінальній стадіях росту асцитної пухлини не виявлено.

Таблиця 1

Характеристика популяції клітин лімфони NK/Ly по зв'язуванню лектинів

Лектин	Відсоток лектин-зв'язуючих клітин у популяції, М±σ	
	Початкова фаза росту (7 день, n=4)	термінальна фаза росту (21 день, n=5)
Конканавалін А (Con A)	67,0±12,1	70,6±14,2
Лектин сочевиці (LcL)	13,6±2,2	9,2±1,9
Аглютинін пшениці (WGA)	81,8±7,3	78,4±7,6
Лектин арахісу (PNA)	29,8±5,9	24,5±4,9

Примітка: у контрольних зразках, в яких інкубація з лектином не проводилась, кількість лектин-позитивних клітин не перевищувала 0,5 %, що значно менше ніж стандартне відхилення, тому поправку на контроль не проводили

Більш повну якісну і кількісну характеристику зв'язування лектинів із клітинами NK/Ly дає дослідження напівтонких зрізів клітинної суспензії після фізичного проявлення. На рисунку 1 представлено цитологічну картину зв'язування WGA з клітинами NK/Ly тільки після фізичної проявки (рис. 1 А), а також після дофарбовування клітин сафраніном Т (рис. 1 Б). На зафарбованих півтонких зрізах чітко виявляються границі клітини, ядра і його внутрішня структура, що дає додаткову інформацію для цитометричних досліджень.

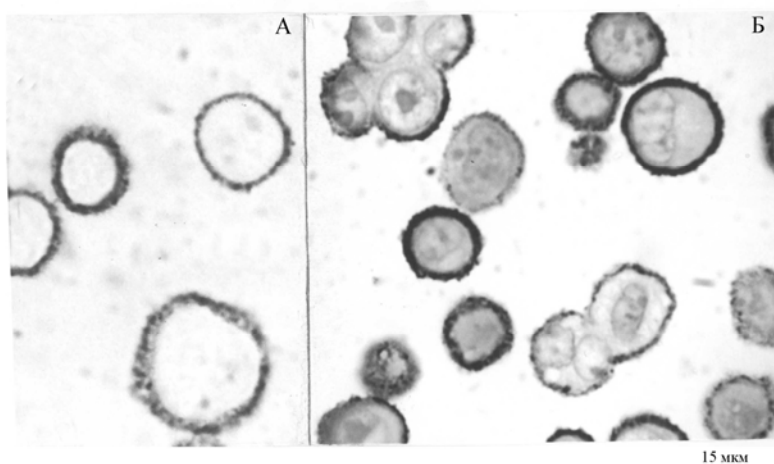


Рис. 1. Зв'язування аглютиніну зародків пшениці (WGA) з поверхнею клітин лімфони NK/Ly. Напівтонкий зріз (1,5 мкм) клітин у смолі Епон 812, обробка WGA, міченими колоїдним золотом антитілами, проявка ацетатом срібла (А); додаткове зафарбування зрізів сафраніном Т (Б). Об'єктив 90 х, окуляр 15х

На електроннограмах виявляється розподіл вуглеводних рецепторів лектинів на поверхні клітин. Для WGA характерний тісний рівномірний розподіл на поверхні лімфомної клітини (рис. 2). Інші лектини зв'язуються за кластерним типом, при цьому найменше рецепторів виявляється до лектину сочевиці. По мірі старіння пухлини кількість рецепторів лектинів, за винятком WGA, виявляє тенденцію до зменшення.

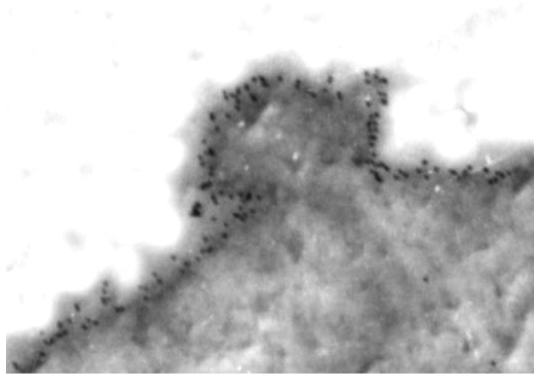


Рис. 2. Електронограма фрагменту клітини лімфоми NK/Ly після обробки WGA і відповідними антитілами, міченими колоїдним золотом. Збільшення 70 тисяч. Щільний і рівномірний розподіл частинок колоїдного золота по поверхні мембрани

Методичні підходи до виявлення зв'язаних з клітиною лігандів, зокрема лектинів, можна розділити на дві групи: прямі методи, в яких застосовуються мічені лектини (флюорохромом, біотином, ферментами тощо), і непрямі імунохімічні методи, в яких для виявлення зв'язаного лектину застосовують специфічні до них мічені антитіла або ліганди. Друга група методів є доцільніша з наступних міркувань. Первинна обробка об'єкта проводиться нативним лектином, що виключає можливість зміни вуглеводної специфічності останнього в процесі введення мітки. Висока якість контрольних проб внаслідок виключення обробки об'єкта лектином. У прямих методах для блокування зв'язування лектину застосовують високі концентрації вуглеводів-інгібіторів, які не завжди є ефективними, особливо коли лектин має високе споріднення до вуглеводної групи. Застосування в якості мітки колоїдного золота дає можливість проводити дослідження одночасно електроннооптичним і світлооптичним методами, які в комплексі дають значно повнішу інформацію про досліджуваний об'єкт.

Висновки

Значна частина вуглеводних детермінант поверхні клітин лімфоми NK/Ly представлена залишками сіалових кислот, переважно у складі O-гліканів, що зумовлює інтенсивне зв'язування WGA. Складні двохантні N-глікани виражені слабо. Має місце високий ступінь десіалювання O-глікозильних ланцюгів, про що свідчить відносно високий відсоток PNA⁺ клітин. PNA проявляє високу селективність до антигену Томсена-Фріденрейха, який утворюється після відщеплення сіалової кислоти від O-глікану. Представлені результати, отримані із застосуванням обмеженого числа лектинів, що обумовлено малим набором отриманих нами антитіл, можна розглядати як попередні.

Перспективи подальших досліджень. У перспективі передбачається розширити набір антитіл до лектинів із точно визначеною специфічністю до олігосахаридів, що дасть можливість більш повно інтерпретувати дані вуглеводневої структури клітинної поверхні. Стосовно пухлинних клітин це дозволить вивчати зміни клітинної поверхні при хіміотерапії, а також визначити придатність цих показників для оцінки активності нових протипухлинних препаратів.

M. Lutsyk, V. Kovalyshyn, A. Yashchenko

CHARACTERISTICS OF CARBOHYDRATE DETERMINANTS OF MURINE LYMPHOMA NK/Ly CELL SURFACE BY BINDING OF NATIVE LECTINS WITH SUBSEQUENT THEIR DETECTION BY INDIRECT IMMUNOCHEMICAL METHOD

S u m m a r y

Carbohydrate determinants on surface of murine lymphoma NK/Ly cells were characterized using indirect immunocytochemical detection of bound lectins (Con A, LcL, PNA, WGA) with the aid of light and electron microscopy. Prefixed cells were treated with native lectins, thereafter bound lectins were detected by specific antilectin antibodies (or horseradish peroxidase for Con A) labelled with colloidal gold. For light microscopy gold particles were visualized by procedure of physical development with silver acetate. On the surface of NK/Ly cells high affinity WGA-binding determinants were maximally exposed indicating on significant amount of sialic acids in glycans of N- and especially O-type. Lentil lectin detected the lowest number of determinants with low binding affinity. Relatively high percentage of PNA⁺ cells indicates on significant proportion of asialo-O-glycans, thus exposing T-F antigen. The advantages of indirect immunochemical method for detection of lectin-binding sites as compared with direct methods in which are used label modified lectins are discussed.

Г. Г. Луцук, В. И. Ковалишин, А. М. Яценко

ХАРАКТЕРИСТИКА УГЛЕВОДНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК МЫШИНОЙ ЛИМФОМЫ NK/Ly ПО СВЯЗЫВАНИЮ НАТИВНЫХ ЛЕКТИНОВ СО СЛЕДУЮЩИМ ИХ ВЫЯВЛЕНИЕМ КОСВЕННЫМ ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

А н н о т а ц и я

Охарактеризованы углеводные детерминанты поверхности клеток мышинной лимфомы NK/Ly с помощью косвенного иммуноцитохимического метода выявления связывания лектинов (Кон А, LcL, PNA, WGA) с применением световой и электронной микроскопии. Префиксованные клетки обрабатывали нативными лектинами, после чего связанные лектины выявляли с помощью полученных специфических антител (или пероксидазы хрона для Кон А), меченых коллоидным золотом. Для визуализации коллоидного золота при светооптической микроскопии применили метод физической проявки ацетатом серебра. Установлено, что на поверхности клеток NK/Ly наиболее выраженные углеводные детерминанты к WGA с высоким связыванием, что свидетельствует о значительном содержании сиаловых кислот в составе гликанов N- и, особенно, O-типа. Лектин чечевицы выявлял наименьшее количество детерминант с низким связыванием. Относительно высокое содержание PNA⁺ клеток свидетельствует о десиазировании O-гликозильных цепей и экспонирования T-F антигена. Обсуждены преимущества косвенного иммунохимического метода выявления лектин-связующих сайтов в сравнении с прямыми методами, при которых применяются модифицированные меткой лектины.

1. *Лахтин В. М.* Лектины в исследовании белков и углеводов / В. М. Лахтин // Итоги науки и техники. — М. : ВИНТИ, 1987. — Т. 2. — С. 25–28. — (Серия «Биотехнология»).

2. *Gabius H.-J.* Concepts of tumor lectinology / H.-J. Gabius // Cancer Investigation. — 1997. — Vol. 15, N 5. — P. 454–464.

3. *Шалай О. О.* Гліканові структури мембрани лімфоцитів у хворих на хронічну лімфоїдну лейкемію / О. О. Шалай, В. Є. Логінський // Онкологія. — 2005. — Т. 7, № 1. — С. 19–22.

4. *Логінський В. Є.* Лектинзв'язувальні вуглеводні компоненти мембрани бластних клітин при гострому мієлоїдному лейкозі / В. Є. Логінський, О. О. Шалай // Онкологія. — 2004. — Т. 6, № 3. — С. 231–235.

5. *Brooks S. A.* Histochemistry to detect *Helix pomatia* lectin binding in breast cancer: methodology makes a difference / S. A. Brooks, M. Lymboura, U. Schumacher, A. J. Leatham // J. Histochem. Cytochem. — 1996. — Vol. 44. — P. 519–524.

6. *Hindenburg A. A.* Effects of pyridine antagonists on sialic acid regeneration in HL-60 cells / A. A. Hindenburg, R. N. Taub, S. Grant et al. // Cancer Res. — 1985. — Vol. 45, N 7. — P. 3048–3052.

7. *Kessel D.* Cell surface alterations associated with exposure of leukemia L 1210 cells to fluorouracil / D. Kessel // *Cancer Res.* — 1980. — Vol. 40, N 2. — P. 322–324.
8. *De Graaf T. W.* Changes in glycosylation of L 1210 cells after exposure to various antimetabolites / T. W. De Graaf, S. S. Slot, G. J. Peters et al. // *Europ. J. Cancer.* — 1993. — Vol. 29 A, N 12. — P. 1760–1765.
9. *Kopper L.* Studies of the growth of an ascitic tumour. I. Cellular and subcellular changes during the tumour growth / L. Kopper, A. Jeney, J. Takacs et al. // *Europ. J. Cancer.* — 1978. — Vol. 14, N 1. — P. 59–73.
10. *Шеллеи К.* Лекарственное лечение опухолевых заболеваний / К. Шеллеи, Ш. Экхардт, Л. Немет. — Будапешт : Изд-во АН, 1975. — С. 46–48.
11. *Goldstein I.* The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals / I. Goldstein, C. Hayes // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* — 1978. — Vol. 35. — P. 127–340.
12. *Хомутовский О. А.* Углеводная специфичность лектинов / О. А. Хомутовский, М. Д. Луцик, О. Ф. Передерей // В кн. : Электронная гистохимия рецепторов клеточных мембран. — Киев : Наукова думка, 1986. — С. 8–33.
13. *Osawa T.* Fractionation and structural assessment of oligosaccharides and glycopeptides by use of immobilized lectins / T. Osawa, T. Tsuji // *Ann. Rev. Biochem.* — 1987. — Vol. 56. — P. 21–42.
14. *Софьина З. П.* Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США / Ред. З. П. Софьина, А. Б. Сыркин (СССР), А. Голдин, А. Кляйн (США). — М. : Медицина, 1980. — 295 с.
15. *Hacker G. W.* Silver acetate autometallography: an alternative enhancement technique for immunogold-silver staining (IGSS) and silver amplification of gold, silver, mercury and zinc in tissues / G. W. Hacker, L. Grimelius, G. Danscher et al. // *J. Histochem. Technol.* — 1988. — Vol. 11. — P. 213–221.
16. *Уикли Б.* Электронная микроскопия для начинающих / Б. Уикли. — М. : Мир, 1975. — С. 298–301.
17. *Oscarsson S.* Covalent chromatography and salt-promoted thiophilic adsorption / S. Oscarsson, J. Porath // *Analyt. Biochem.* — 1989. — Vol. 176. — P. 330–337.
18. *Geoghean W.* Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, WGA and immunoglobulin G on cell surface at the electron microscopic level / W. Geoghean, A. Ackerman // *J. Histochem. Cytochem.* — 1977. — Vol. 25. — P. 1187–1200.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення ВРХ, доктор біологічних наук, професор Янович В. Г.