



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94920 (13) C2
(51) МПК
G01N 33/53 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ШВИДКОГО ВИЯВЛЕННЯ, ВИДІЛЕННЯ ТА ПІДРАХУНКУ АПОПТИЧНИХ КЛІТИН, ЩО БАЗУЄТЬСЯ НА АГЛЮТИНАЦІЇ

1

2

(21) a200807435

(22) 31.10.2006

(24) 25.06.2011

(86) PCT/US2006/042582, 31.10.2006

(31) 60/731,768

(32) 31.10.2005

(33) US

(46) 25.06.2011, Бюл.№ 12, 2011 р.

(72) СТОЙКА РОСТИСЛАВ СТЕПАНОВИЧ, БІЛИЙ РОСТИСЛАВ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, АНТОНЮК ВОЛОДИМИР ОЛЕКСАНДРОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ

(56) BILYY R.O. ET AL.: 'Lectinocytochemical Detection of Apoptotic Murine Leukemia L1210 Cells' CYTOMETRY PART A vol. 56A, 2003, pages 89 - 95. BILYY R O ET AL: "Cytochemical study of role of alpha-d-mannose- and beta-d-galactose-containing glycoproteins in apoptosis" JOURNAL OF MOLECULAR HISTOLOGY, vol. 35, no. 8-9, November 2004 (2004-11), pages 829-838.

BILYY R. ET AL.: 'In vivo expression and characterization of novel alpha-D-mannose-rich glycoprotein markers of apoptotic cells' CELL BIOLOGY INTERNATIONAL vol. 29, November 2005, pages 920 - 928.

Білий Р.О. Мембранні глікопротеїни клітин за умов апоптозу: виявлення, характеристика, біомедичні аспекти дослідження. 03.00.11-цитологія, клітинна біологія, гістологія. Автореф... к.б.н. Львів-2007.

WO97/31107 28.08.1997.

DE10053521A1 8.05.2002.

US5834196 10.11.1998

BILYY R.O. ET AL.: 'Some New Approaches to the Detection of Programmed Cell Death' PROC. OF SPIE vol. 6163, 21 July 2006, page 61630J-1.

COHEN G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem. J. (1997) 326 (1-16).

Stuart L.M. et al. Mannose-Binding Lectin-Deficient Mice Display Defective Apoptotic Cell Clearance but No Autoimmune Phenotype The Journal of Immunology, 2005, 174: 3220-3226.

NAUTA A.J. ET AL.: 'Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells' EUR. J. IMMUNOL. vol. 33, October 2003, pages 2853 - 2863.

KIM M.S. ET AL.: 'Activation of caspase cascades in Korean mistletoe (Viscum album var. coloratum)

lectin-II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells' GENERAL PHARMACOLOGY vol. 34, 2000, pages 349 - 355.

BATISSE C. ET AL.: 'Lectin-Based Three-Color Flow Cytometric Approach for Studying Cell Surface Glycosylation Changes That Occur During Apoptosis' CYTOMETRY PART A vol. 62A, 2004, pages 81 - 88.

HEYDER P. ET AL.: 'Early Detection of Apoptosis by Staining of Acid-Treated Apoptotic Cells With FITC-LABELED Lectin From Narcissus pseudonarcissus' CYTOMETRY PART A vol. 55A, 2003, pages 86 - 93.

(57) 1. Спосіб швидкого виявлення апоптичних клітин, що базується на аглютинації, який включає попередню підготовку зразка до досліджень шляхом внесення у суспензію досліджуваних клітин певної кількості лектинів, визначення кількості апоптичних клітин, який відрізняється тим, що лектини, взяті для аналізу, мають щонайменш дві вуглевод розпізнавальних ділянки, детекцію аглютинату клітин проводять в імунологічних мікропланшетах, наявність апоптичних клітин визначають за утворенням аглютинату методами візуалізації.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що кількість лектину, необхідна для утворення аглютинату апоптичних клітин, є меншою, ніж кількість лектину, що необхідна для утворення аглютинату інтактних клітин.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що лектин мічений маркером, вибраним з групи: ферментативна мітка, біотин, флуоресцентна мітка або їх комбінації.

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що додатково включає встановлення мінімальної концентрації лектину, необхідної для спостереження аглютинату клітин, порівняння мінімальних кількостей лектину, необхідних для спостереження аглютинату інтактних і апоптичних клітин, встановлення наявності апоптичних клітин у досліджуваному зразку у випадку, якщо спостереження аглютинату апоптичних клітин вимагає меншої концентрації лектину, ніж спостереження аглютинату інтактних клітин.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що лектин здатний одночасно зв'язувати щонайменш дві клітини.

(13) C2

(11) 94920

(19) UA

6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що лектин здатний зв'язувати α -D-манозовмісні глікопротеїни, β -D-галактозовмісні глікопротеїни або ж обидва типи глікопротеїнів.
7. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що лектин вибрано із наступної групи: *Pisum sativum* (PSL), *Polygonatum multiflorum* (PMRL), *Galanthus nivalis* (GNA), *Ricinus communis* (RCA-120), *Viscum album* (VAA) або їх поєднань.
8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що лектин взято із *Viscum album*.
9. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що виявлення апоптичних клітин включає визначення вмісту апоптичних клітин після 12 годин після індукції апоптозу.
10. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що використовують лектин *Pisum sativum* (PSL) і попередньо встановлена кількість лектину для спостереження аглютинату інтактних клітин у 8 разів перевищує таку кількість для апоптичних клітин.
11. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що використовують лектин з *Polygonatum multiflorum* (PMRL) і попередньо встановлена кількість лектину для спостереження аглютинату інтактних клітин у чотири рази перевищує таку кількість для апоптичних клітин.
12. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що використовують лектин *Viscum album* (VAA) і попередньо встановлена кількість лектину для спостереження аглютинату інтактних клітин перевищує таку кількість для апоптичних клітин у 4-128 разів.
13. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що зразок клітин представлений людськими лімфоцитами.
14. Спосіб швидкого виявлення апоптичних клітин, що базується на аглютинації, який додатково включає:
- а) встановлення мінімальної концентрації лектину, що спричинює аглютинацію клітин досліджуваного зразка,
 - б) порівняння встановлених в п. а) мінімальних концентрацій лектину для зразків інтактних та апоптичних клітин,
 - в) визначення залежності мінімальної концентрації лектину, за п. а), від відносного вмісту апоптичних клітин у зразку, визначеного з використанням стандартних суспензій, що містять відомий відсоток апоптичних клітин, та з використанням розчину лектину однієї партії,
 - г) визначення вмісту апоптичних клітин у зразку клітин за визначеною залежністю (за п. в).
15. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що лектин мічений маркером, вибраним з групи: ферментативна мітка, біотин, флуоресцентна мітка або їх комбінації.
16. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що лектин здатний одночасно зв'язувати щонайменш дві клітини.
17. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що лектин здатний зв'язувати α -D-манозовмісні глікопротеїни, β -D-галактозовмісні глікопротеїни або обидва типи глікопротеїнів.
18. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що лектин, вибрано із наступної групи: *Pisum sativum* (PSL), *Polygonatum multiflorum* (PMRL), *Galanthus*

nivalis (GNA), *Ricinus communis* (RCA-120), *Viscum album* (VAA) або їх поєднань.

19. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що лектин взято із *Viscum album* (VAA).

20. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що підрахунок кількості апоптичних клітин включає в себе встановлення їх кількості після 12 годин після індукції апоптозу.

21. Спосіб за п. 14, який **відрізняється** тим, що попередньо встановлена кількість лектину, яка спричиняє утворення аглютинату інтактних та апоптичних клітин на різних стадіях після індукції апоптозу, визначається з кореляції із кількостями лектину, що спричиняє утворення аглютинату контрольних зразків клітин із відомим вмістом апоптичних клітин.

22. Спосіб швидкого виділення апоптичних клітин, що базується на аглютинації, який включає забезпечення взаємодії зразку клітин із кон'югованим лектином, відрізняється тим, що забезпечує виділення фракції клітин, що зв'язані із кон'югованим лектином, і фракції клітин, що не зв'язані із кон'югованим лектином, та відділення фракцій клітин, що зв'язані із кон'югованим лектином, вивільнення їх із кон'югату і створення фракції клітин, що містять апоптичні клітини.

23. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що кон'югований лектин – це лектин-кон'югований носій.

24. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що лектин мічений маркером, вибраним з групи: ферментативна мітка, біотин, флуоресцентна мітка або їх комбінації.

25. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що лектин здатний одночасно зв'язувати щонайменш дві клітини.

26. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що лектин здатний зв'язувати α -D-манозовмісні глікопротеїни, β -D-галактозовмісні глікопротеїни або ж обидва їх типи.

27. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що лектин вибрано із наступної групи: *Pisum sativum* (PSL), *Polygonatum multiflorum* (PMRL), *Galanthus nivalis* (GNA), *Ricinus communis* (RCA-120), *Viscum album* (VAA) або їх поєднань.

28. Набір для швидкого виявлення апоптичних клітин, який базується на аглютинації, відрізняється тим, що містить певну кількість лектину, який має щонайменш два вуглеводрозпізнавальних домени, та вказівки для застосування цього лектину для виявлення і/або підрахунку апоптичних клітин.

29. Набір за п. 28, який **відрізняється** тим, що лектин здатний одночасно зв'язувати щонайменш дві клітини.

30. Набір за п. 28, який **відрізняється** тим, що лектин, здатний зв'язувати α -D-манозовмісні глікопротеїни, β -D-галактозовмісні глікопротеїни або ж обидва їх типи.

31. Набір за п. 28, який **відрізняється** тим, що містить лектин із наступної групи: *Pisum sativum* (PSL), *Polygonatum multiflorum* (PMRL), *Galanthus nivalis* (GNA), *Ricinus communis* (RCA-120), *Viscum album* (VAA) або їх поєднання.

32. Набір за п. 28, який **відрізняється** тим, що містить лектин, отриманий із *Pisum sativum* (PSL) чи *Viscum album* (VAA).

33. Набір за п. 28, який **відрізняється** тим, що вказівки до використання певної кількості лектину для виявлення апоптичних клітин зокрема включають вказівки до додавання кількості лектину до зразка клітин, виявлення аглютинату у зразку клітин, де кількість лектину менша, ніж така кількість, що викликає появу аглютинату інтактних клітин, а наявність апоптичних клітин визначають за утворення аглютинату методами візуалізації.

34. Набір за п. 33, який **відрізняється** тим, що вказівки зокрема включають визначення мінімальної кількості лектину, що спричинює утворення аглютинату клітин; порівняння найменшої кількості лектину із попередньо встановленими кількостями, що спричиняють утворення аглютинату інтактних та апоптичних клітин, де мінімальна кількість лектину менша, ніж попередньо встановлена кількість лектину, яка викликає утворення аглютинату інтактних клітин, а наявність апоптичних клітин визначають за утворенням аглютинату методами візуалізації.

35. Набір за п. 34, який **відрізняється** тим, що лектин отримують із *Pisum sativum* (PSL) і попередньо встановлена його кількість для утворення аглютинату інтактних клітин, у вісім разів вища, ніж аналогічна кількість для апоптичних клітин.

36. Набір за п. 34, який **відрізняється** тим, що лектин отримують із *Polygonatum multiflorum* (PMRL) і попередньо встановлена його кількість для утворення аглютинату інтактних клітин, у чотири-вісім разів вища, ніж аналогічна кількість для апоптичних клітин.

37. Набір за п. 34, який **відрізняється** тим, що лектин отримують із *Viscum album* (VAA) і попередньо встановлена його кількість для утворення аглютинату інтактних клітин, у 4-128 разів вища, ніж аналогічна кількість для апоптичних клітин.

38. Набір за п. 28, який **відрізняється** тим, що вказівки щодо використання певної кількості лектину для кількісного підрахунку апоптичних клітин зокрема включають вказівки до: визначення найменшої кількості лектину, що спричинює утворення аглютинату клітин; порівняння найменшої кількості лектину із попередньо встановленими кількостями, що спричиняють утворення аглютинату інтактних

та апоптичних клітин на різних стадіях після індукції апоптозу, з метою визначення кількості апоптичних клітин.

39. Набір за п. 38, який **відрізняється** тим, що попередньо встановлена кількість лектину, що спричиняє утворення аглютинату інтактних та апоптичних клітин на різних стадіях після індукції апоптозу визначається із порівняння з кількостями лектину, що спричиняють утворення аглютинату контрольних зразків клітин із відомим вмістом апоптичних клітин.

40. Спосіб швидкого виділення апоптичних клітин, що базується на їх взаємодії з лектином(ами), відрізняється тим, що виділення апоптичних клітин здійснюють за допомогою кон'югованих α -D-манозоспецифічних лектинів, β -D-галактозоспецифічних лектинів або обох типів лектинів.

41. Спосіб за п. 40, який **відрізняється** тим, що кон'югований лектин – це лектин-кон'югований носій.

42. Спосіб за п. 40, який **відрізняється** тим, що передбачає підготовку зразку клітин, взаємодії зразку клітин із кон'югованим лектином для утворення фракції клітин, що зв'язані із кон'югованим лектином, і фракції клітин, що не зв'язані із кон'югованим лектином; розділення фракцій клітин, що зв'язані із кон'югованим лектином та клітин, що не зв'язані із кон'югованим лектином; відділення фракції клітин, що зв'язані із кон'югованим лектином від кон'югованого лектину.

43. Спосіб за п. 40, який **відрізняється** тим, що містить лектин, мічений маркером, вибраним з групи: ферментативна мітка, біотин, флуоресцентна мітка або їх комбінації.

44. Спосіб за п. 40, який **відрізняється** тим, що містить лектин, здатний одночасно зв'язувати щонайменш дві клітини.

45. Спосіб за п. 40, який **відрізняється** тим, що містить лектин, здатний зв'язувати α -D-манозовмісні глікопротеїни, β -D-галактозовмісні глікопротеїни або ж обидва типи глікопротеїнів.

46. Спосіб за п. 40, який **відрізняється** тим, що містить лектин із наступної групи: *Pisum sativum* (PSL), *Polygonatum multiflorum* (PMRL), *Galanthus nivalis* (GNA), *Ricinus communis* (RCA-120), *Viscum album* (VAA) або їх поєднання.

Винахід відноситься до області біології та медицини та може знайти застосування для діагностичних цілей у медицині.

Апоптоз – це фізіологічний процес запрограмованої смерті клітини, котрий повинен підтримувати відповідну кількість клітин в живому організмі. Апоптоз характеризується чіткою послідовністю подій, які врешті призводять до загибелі клітини і є головним процесом, відповідальним за знищення існуючих клітин. Через це апоптоз відіграє ключову роль в оновленні застарілих клітин і видаленні "хворих" або вірус-інфікованих клітин. Порухення цього процесу можуть призводити до різноманітних патологічних станів, наприклад, автоімунних розладів або раку.

За останнє десятиліття було описано ряд характеристичних маркерів апоптозу, і бони використовуються у практичних цілях для виявлення апоптичного процесу. Більшість маркерів апоптозу належить до біохімічних маркерів, локалізованих у ядрі, цитоплазмі або мітохондріях клітини. (Trauth BC, Keesey J. Cell death. Guide to cell proliferation and apoptosis methods. Mannheim: Boehringer Mannheim; 1995. p. 34-62; Molecular Biology of the Cell, 4th ed, Alberts B.; Johnson A.; Lewis J.; Raff M., Roberts K.; Walter P., 2002, New York, Garland Science, 1536 p.). Найбільш характеристичними цитоморфологічними змінами, що можуть бути виявлені світловою мікроскопією, є конденсація цитоплазми, агрегація хроматину, "зморщування"

цитоплазматичної мембрани з формуванням апоптичних тілець, вкритих інтактною плазматичною мембраною і фрагментація ядра. Найтипівішими біохімічними маркерами апоптозу є: експресія специфічних каспаз і поява у цитоплазмі цитохрому c (Chang HY, Yang X. Proicases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64:821-846; Coher GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326:1-16; fujimura M, Morita-Fujimura Y, et al. Cyosolic redistribution of cytochrome c after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18:1239-1247; Perez-Pinzon MA, Xu GP, Born J, et al. Cytochrome C is released from mitochondria into the cytosol after cerebral anoxia or ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19:39-43), експресія про- і антиапоптичних білків родини Bcl-2 у мітохондріях (Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124:1), і фрагментація ДНК у ядрі (Wyllie A. Glucocorticoid-induce thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284:555-556). Цитоплазматична мембрана апоптичної клітини, як вважалося, залишається відносно інтактною.

На противагу цитоплазмі, ядру та мітохондріям, де виявлено численні зміни після індукції апоптозу, лише декілька маркерів апоптичного процесу було знайдено у плазматичній мембрані. Єдиною добре описаною зміною у плазматичній мембрані була транслокація фосфатидилсерину із внутрішнього на зовнішній бік плазматичної мембрани, яку можна виявити Аннексин V-специфічним зв'язуванням (Fadok VA, Voelker DR, Campbbell PA, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148:2207-2216; Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 1997; 23:525-531). Здатність білка Аннексину V специфічно зв'язувати фосфатидилсерин була використана для розвитку нових методів виявлення апоптозу (Патент 5834196 США від 11.10.1998, МПК G01N33/566; G01N33/569H. Method for detecting and/or optionally quantifying and/or separating apoptotic cells in or from a sample).

Недоліком даного методу є його висока вартість та складність проведення аналізу, Оскільки вимагає використання специфічного білка Аннексину V, отримання якого біотехнологічними методами є дорогим, а природні джерела (морська медуза) майже недоступні. Його вартість становить близько 500 доларів США за набір для 96 аналізів.

Відомі інші способи виявлення апоптозу, в основі яких є зміни плазматичної мембрани. Глікопротеїни плазматичної мембрани складають дуже складну систему, і експресія деяких глікопротеїнів плазматичної мембрани змінюється впродовж апоптозу. Встановлено, що короткочасна дія кислоти на апоптичні клітини, пізніше забарвлені FITC-міченим лектином з *Narcissus pseudonarcissus* може бути надійним інструментом для раннього виявлення апоптозу (Heyder P, Gaipl US, Beyer TD, Voll RE, Kern PM, Stach C, Kalden JR, Herrmann M, 2003. Early detection of apoptosis

by staining of acid-treated apoptotic cells with FITC-labeled lectin from *Narcissus pseudonarcissus*. *Cytometry* 55A:86-93). Обробка людських апоптичних лімфоцитів FITC-міченим ConA показала зростання рівня певних вуглеводів на плазматичній мембрані цих клітин (Chionna A, Dwikat M, Panzarini E, Tenuzzo B, Carla EC, Verri T, Pagliara P, Abbro L, Dini L, 2003. Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. *Eur J Histochem* 47:299-308).

Відомі білки, які специфічно зв'язуються із вуглеводами певної специфічності - лектини (Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектини. - Львов.: Вища школа, 1981. - 146 с.). Вони широко застосовуються у гістології і цитології для різноманітних цілей, як наприклад, ідентифікація вуглеводних залишків мембранних компонентів (Kawiak J, Skorski T, Ciechanowicz A, et al. Cytochemical characterization of mouse L1210 leukemia. *Immunol Invest* 1988; 17:543-550), руйнування пухлинних клітин (Khopade AJ, Nandakumar KS. Jain NK. Lectin-functionalized multiple emulsions for improved cancer therapy. *J Drug Target* 1998; 6:285-292), та індукція клітинного росту і диференціації (Lucas T, Krugluger W, Samorapompichit P, et al. Self-renewal, maturation, and differentiation of the rat myelomonocytic hematopoietic stem cell. *FASEB J* 1999; 13:263-272).

Найбільш близьким за технічною суттю до способу, що заявляється, є спосіб детектування апоптичних та некротичних клітин шляхом детектування методом проточної цитометрії взаємодії вуглеводів у складі глікокон'югатів, що містяться на мембрані апоптичних та некротичних клітин із лектинами, до яких приєднанні флуоресцентні мітки, такі як флуоресцеїнізотіоціанат (FITC), пропіді йодид, або трипановий синій (Патент EP1366362B1 від 13.12. 2003, МПК G01N33/50; G01N33/569. Method for the identification of apoptotic and necrotic cells. Також опублікований як Патент DE10053521A1 Німеччини від 8.05.2002, МПК C12Q1/02: C12N5/00. Verfahren zum Nachweis apoptotischer und necrotischer Zellen).

Спосіб здійснюється в наступні етапи. У зразок суспензії досліджуваних клітин вносять по чергову лектини, до яких приєднанні флуоресцентні мітки, спочатку, для збільшення кислотності розчину, мурашину кислоту у такій кількості, щоб мембрана апоптичних клітин стала проникливою, а мембрана живих клітин залишалась непроникливою, подальше, для збільшення величини рН або лужності розчину, фосфатний буфер або карбонатний розчин, та реєструють зміни кількості лектину, зв'язаного із мембраною досліджуваних клітин, методом проточної цитометрії.

Недоліком даною способу є його висока вартість аналізу і необхідність використання складних та громіздких приладів для виявлення, таких, як проточні цитометри, що потребує спеціально обладнаних лабораторій та технічно підготовленого персоналу для проведення такою аналізу. Пропонований спосіб перед операцією виявлення апоптичних клітин передбачає спочатку кислотну обробку клітин, а в подальшому збільшення лужності розчину, що ускладнює проведення аналізу і може привести до зростання на порядок похибок визна-

чення концентрації апоптичних клітин. Окрім того, пропонований метод вимагає суворого дотримання часових інтервалів додавання реактивів тривалістю у 10 с., що часто є перешкодою для точних та масових досліджень (Heyder P, Gaip US, Beyer TD, Voll RE, Kern PM, Stach C, Kalden JR, Herrmann M, 2003. Early detection of apoptosis by staining of acid-treated apoptotic cells with FITC-labeled lectin from *Narcissus pseudonarcissus*. *Cytometry* 55A:86-93).

В основу винаходу поставлено завдання удосконалити спосіб виявлення, виділення та підрахунку апоптичних клітин шляхом використання аглютинуючих властивостей лектинів та забезпечити швидке та надійне проведення аналізу без використання складного, громіздкого та дорогого обладнання.

Поставлене завдання вирішується так, що у відомому способі виявлення, виділення та підрахунку апоптичних клітин, що базується на аглютинації, який включає внесення у суспензію досліджуваних клітин певної кількості лектинів, і відрізняється тим, що лектини, взяті для аналізу, мають щонайменш дві вуглевод розпізнавальних ділянки (а отже, можуть зв'язувати принаймні дві клітини), а спостереження аглютинації клітин в досліджуваному зразку свідчить про наявність апоптичних клітин.

Даний винахід включає способи та набори реактивів для виявлення, підрахунку та виділення апоптичних клітин з використанням аглютинуючих властивостей лектинів. Винахідники встановили, що концентрація необхідного для аглютинації лектину обернено пропорційна кількості α -D-манноза та β -D-галактозовмісних глікокон'югатів у клітинній мембрані.

Різноманітні втілення даного винаходу забезпечують методи виявлення апоптичних клітин у зразках клітин. У одному з втілень метод виявлення апоптичних клітин в зразку включає взаємодію з лектином, що містить принаймні дві вуглевод-зв'язувальні ділянки; та додавання певної кількості лектину до зразка клітин, при цьому наявність аглютинації в зразку свідчить про присутність апоптичних клітин.

В одному з втілень кількість лектину може бути меншою за кількість лектину, здатну викликати аглютинацію інтактних клітин.

У одному з втілень лектин може бути мічений маркером ферментної природи, біотином, флуоресцентним маркером або комбінацією цих міток, і спосіб, у свою чергу, полягатиме у виявленні цієї мітки в досліджуваному зразку, що свідчитиме про присутність в ньому апоптичних клітин.

У іншому втіленні спосіб полягатиме у визначенні мінімальної кількості лектину, необхідної для аглютинації клітин, і порівняння її із мінімальною кількістю лектину, необхідною для аглютинації інтактних або апоптичних клітин, де мінімальна кількість лектину - це менша за попередньо встановлену кількість лектину, котра спричинює аглютинацію інтактних клітин, що свідчитиме про присутність апоптичних клітин у досліджуваному зразку.

У одному з втілень лектин може зв'язувати одночасно щонайменш дві клітини. У іншому втіленні

можна застосовувати лектин, що зв'язує α -D-маннозовмісні глікопротеїни, β -D-галактозовмісні глікопротеїни, або ж обидва ці типи глікопротеїнів. У іншому втіленні лектин можна підбирати із групи лектинів, що включає в себе наступні: *Pisum sativum* (PSL), *Polygonatum multiflorum* (PMRL), *Galanthus nivalis* (GNA), *Ricinus communis* (RCA-120), *Viscum album* (VAA), або ж їх комбінації. У іншому випадку використовуються лектини з *Pisum sativum* (PSL) або *Viscum album* (VAA).

У одному втіленні підрахунок кількості апоптичних клітин може включати в себе підрахунок кількості апоптичних клітин через 12 годин після індукції апоптозу.

У одному з втілень лектин можна отримувати з *Pisum sativum* (PSL) і попередньо відомі кількості лектину, необхідного для аглютинації інтактних клітин у вісім разів вищі, ніж для апоптичних. У іншому втіленні застосовувався лектин з *Polygonatum multiflorum* (PMRL) і попередньо відомі кількості лектину, необхідного для аглютинації інтактних клітин у чотири рази вищі, ніж для апоптичних. У іншому втіленні можна застосовувати лектин *Viscum album* (VAA) для якого попередньо відомі кількості лектину, необхідного для аглютинації інтактних клітин у 4-128 разів вищі, ніж такі для апоптичних клітин.

У одному з варіантів втілення винаходу можна для порівняння із зразком клітин використовувати людські лімфоцити.

Інші способи даного винаходу забезпечують визначення кількості апоптичних клітин. У одному із втілень спосіб кількісної оцінки вмісту апоптичних клітин включає в себе забезпечення лектином, що має щонайменш два вуглевод-зв'язуючих домени, визначення мінімальної кількості лектину, що спричинює аглютинацію досліджуваного зразка і порівняння отриманого значення із значенням для попередньо визначених концентрацій лектину, що аглютинували контрольні та апоптичні клітини на різних стадіях цього процесу. Це дозволяє встановити кількість апоптичних клітин у досліджуваному зразку.

У одному з втілень лектин може бути маркованим однією з наступних типів міток: ферментативна мітка, біотинова мітка, флуоресцентний маркер або їх комбінації, і спосіб, відповідно, ґрунтується на виявленні мітки, що свідчитиме про присутність апоптичних клітин.

У одному з втілень лектин повинен бути здатним одночасно зв'язуватись із двома клітинами.

У іншому втіленні можна застосовувати лектин, що зв'язує α -D-маннозовмісні глікопротеїни, β -D-галактозовмісні глікопротеїни, або ж обидва ці типи глікопротеїнів.

У іншому втіленні лектин можна підбирати із групи лектинів, що включає в себе наступні: *Pisum sativum* (PSL), *Polygonatum multiflorum* (PMRL), *Galanthus nivalis* (GNA), *Ricinus communis* (RCA-120), *Viscum album* (VAA), або ж їх комбінації. У одному втіленні можна використовувати лектин з *Viscum album* (VAA).

В одному втіленні підрахунок кількості апоптичних клітин може включати в себе підрахунок кількості апоптичних клітин за 12 годин після індукції апоптозу.

У одному втіленні наперед відомі кількості лектину, що спричиняють аглютинацію інтактних та апоптичних клітин на різних стадіях цього процесу, можуть визначатись із кореляції кількостей лектину, що спричиняє аглютинацію контрольних зразків клітин із відомою часткою апоптичних.

Інші втілення даного винаходу забезпечують способи виділення апоптичних клітин зі зразка клітин. В одному з втілень спосіб виділення клітин зі зразка включає в себе підготовку кон'югованого лектина, контакт зразку клітин із кон'югованим лектином для створення фракції клітин, що зв'язалась з лектином, і фракції клітин, незв'язаних із лектином. Згодом проводиться розділення цих клітинних фракцій і отримання фракції апоптичних клітин, які зв'язані з лектином.

У одному із втілень кон'югований лектин може бути лектин-кон'югованим носієм. В інших втіленнях кон'югат може бути міткою, наприклад, ферментативним маркером, біотином, флуоресцентним маркером або їх комбінацією, і спосіб може включати в себе виявлення мітки, а вже наявність мітки визначатиме наявність апоптичних клітин.

У одному з втілень лектин може зв'язувати одночасно щонайменш дві клітини. У іншому втіленні можна застосовувати лектин, що зв'язує α -D-маннозівмісні глікопротеїни, β -D-галактозівмісні глікопротеїни, або ж обидва ці типи глікопротеїнів. У іншому втіленні лектин можна підбирати із групи лектинів, що включає в себе наступні: *Pisum sativum* (PSL), *Polygonatum multiflorum* (PMRL), *Galanthus nivalis* (GNA), *Ricinus communis* (RCA-120), *Viscum album* (VAA), або ж їх комбінації.

Подальші втілення даного винаходу забезпечують тестові набори для виявлення і/або підрахунку апоптичних клітин у зразках клітин. Такі набори можуть включати в себе кількість лектину, що має щонайменш дві вуглевод-розпізнавальні ділянки, а також вказівки до застосування кількостей лектину для виявлення і/або підрахунку апоптичних клітин.

У одному з втілень лектин може зв'язувати одночасно щонайменш дві клітини. У іншому втіленні можна застосовувати лектин, що зв'язує α -D-маннозівмісні глікопротеїни, β -D-галактозівмісні глікопротеїни, або ж обидва ці типи глікопротеїнів. У іншому втіленні лектин можна підбирати із групи лектинів, що включає в себе наступні: *Pisum sativum* (PSL), *Polygonatum multiflorum* (PMRL), *Galanthus nivalis* (GNA), *Ricinus communis* (RCA-120), *Viscum album* (VAA), або ж їх комбінації. У іншому випадку використовуються лектини з *Pisum sativum* (PSL) або *Viscum album* (VAA).

У одному з втілень вказівки щодо використання кількості лектину для виявлення апоптичних клітин можуть включати в себе додавання до зразка клітин певної кількості лектину, і виявлення аглютинації клітин у зразку, де кількість лектину менша, аніж кількість, необхідна для спричинення аглютинації інтактних клітин, свідчитиме про присутність апоптичних клітин.

У іншому втіленні, вказівки можуть включати в себе: визначення мінімальної кількості лектину, що спричиняє аглютинацію клітин, і порівняння мінімальної кількості із наперед визначеними кількостями лектину, що спричиняють аглютинацію апоптичних та інтактних клітин, де мінімальна кількість

лектину це найменша попередньо визначена кількість лектину, що спричиняє аглютинацію і свідчить про наявність апоптичних клітин.

У одному з втілень, лектин можна отримувати з *Pisum sativum* (PSL) і попередньо відомі кількості лектину, необхідного для аглютинації інтактних клітин у вісім разів вищі, ніж для апоптичних. У іншому втіленні застосовувався лектин з *Polygonatum multiflorum* (PMRL) і попередньо відомі кількості лектину, необхідного для аглютинації інтактних клітин у чотири рази вищі, ніж для апоптичних. У іншому втіленні можна застосовувати лектин *Viscum album* (VAA) для якого попередньо відомі кількості лектину, необхідного для аглютинації інтактних клітин у 4-128 разів вищі, ніж для апоптичних.

Зразки втілення винаходу ілюстровані на описаних нижче рисунках, з наміром розкриття варіантів втілення, як ілюстрації, а не обмеження.

На Фіг. 1 зображено результати денситометричного аналізу (середнє±стандартна похибка) інтактних (прозорі стовпці) та апоптичних (чорні стовпці) мишачих лейкоцитних клітин лінії L1210S (апоптоз індукувався 100 мкг/мл метотрексату) відповідно до втілення даного винаходу. Клітини забарвлювались різноманітними лектинами, міченими пероксидазою хрому (HRP). І: цукор-інгібітор (35 mM; α MMa для PSL і лактоза для RCA-120). *P<0.05. **P<0.01. ***P<0.001.

На Фіг. 2 зображено лектиноцитохімічний аналіз клітин лінії L1210 відповідно до втілення даного винаходу. А: Інтактні клітини, забарвлені RCA-120. В: Апоптичні клітини, забарвлені RCA-120 у присутності лактози. D: Інтактні клітини, забарвлені PSL. E: Апоптичні клітини, забарвлені PSL. F: Диференційне фарбування апоптичних тілець лектином PSL. Від А до Е - контрастовано за допомогою NiCl₂.

На Фіг. 3 зображено результати денситометричного аналізу (середнє±стандартна похибка) інтактних (прозорі стовпці) та апоптичних (чорні стовпці) мишачих лейкоцитних клітин лінії L1210S (апоптоз індукувався 100 мкг/мл метотрексату) відповідно до втілення даного винаходу. Заштриховані стовпці репрезентують апоптоз, індукований цисплатином. Клітини забарвлювались різноманітними пероксидазо-міченими лектинами. А: клітини L1210S, в котрих апоптоз індукувався 0,5 мкг/мл цисплатином. Клітини L1210R за умов індукції апоптозу 100 мкг/мл метотрексату (В), 0,5 мкг/мл цисплатину, (С), і 5 мкг/мл цисплатину (D). *P<0,05. **P<0,01. ***P< 0,001.

На Фіг. 4 зображено гель-електрофорез в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію і лектиноблотинг з пероксидазо-міченим лектином PSL розчинної (доріжка 1) та мембранної (доріжка 2) фракцій клітин L1210S cells відповідно до втілення даного винаходу.

На Фіг. 5 зображено ДНК гель-електрофорез клітин лейкемії миші лінії L1210S (доріжки 1 і 2) та L1210R (доріжки 3-5) відповідно до втілення даного винаходу. Доріжки 1 і 3: інтактні клітини; доріжки 2 і 4: клітини, оброблені 0,5 мкг/мл цисплатином; доріжка 5: клітини, оброблені 5 мкг/мл цисплатином.

На Фіг. 6 зображено результати денситометричного аналізу ($M \pm m$) фібробластів миші лінії L929 під дією різних індукторів апоптозу і з використанням різних способів від'єднання клітин відповідно до втілення даного винаходу. Клітини забарвлювались різноманітними пероксидазо-міченими лектинами. (1): вуглевод-інгібітор (35 mM) (α MMap для PSL і лактоза для RCA-120).

На Фіг. 7 зображено експресію глікопротеїнів у нормальних та апоптичних клітинах ліній MCF-7 (дикого типу, wt; і стійких до доксорубіцину, DOXR) (A-C) та Jurkat (D-F) відповідно до втілення даного винаходу. (A, D) денситометричний аналіз клітин, забарвлених різними пероксидазо-міченими лектинами, демонструє зростання зв'язування маннозо- та галактозоспецифічних лектинів апоптичними клітинами. (B, E) Інтактні клітини. (C, F) Апоптичні клітини характеризуються більш інтенсивним зафарбовуванням. В і С зафарбовані HRP-WGA, E і F зафарбовані HRP-PSL. (I) вуглевод-інгібітор (35 mM) лектину α MMap для PSL.

На Фіг. 8 зображено ДНК гель-електрофорез клітин лінії Jurkat відповідно до втілення даного винаходу. (1) інтактні клітини; (2) клітини, оброблені дексаметазоном (1 мкМ, 24 год); (3) оброблені цисплатином (5 мкг/мл, 24 год).

На Фіг. 9 зображено дозову і часову залежність експресії глікопротеїнів під час апоптозу відповідно до втілення даного винаходу. (A) Вплив різних концентрацій цисплатину на кількість живих клітин L1210 в популяції. (B) Дія різних концентрацій цисплатину на експресію глікопротеїнів у клітин L1210. (C) Часова залежність експресії глікопротеїнів у апоптичних клітин лінії L929. Клітини було зафарбовано HRP-міченими лектинами PSL, RCA, VAA та WGA.

На Фіг. 10 зображено дію 2 годинної попередньої обробки лектинами RCA і VAA на клітини L1210, фарбування HRP-міченими лектинами RCA та VAA відповідно до втілення даного винаходу.

На Фіг. 11 зображено аглютинацію інтактних та апоптичних клітин лінії L1210 лектином PMRL відповідно до втілення даного винаходу.

На Фіг. 12 зображено виділення апоптичних клітин лінії L1210 відповідно до втілення даного винаходу. (A) Схема відділення апоптичних та інтактних клітин із змішаних популяцій. (B) Флуоресцентна мікроскопія клітин лінії L1210 після процедури відділення, з використанням PSL-кон'югованої агарози, негативна фракція (клітини, що не зв'язались до PSL-агарози) становить інтактні клітини. Позитивна фракція (клітини, зв'язані із PSL-агарозою при описаних умовах інкубації) становить "апоптичні" клітини.

На Фіг. 13 зображено аглютинація інтактних (I) та апоптичних (A) клітин L1210 лектинами PSL, VAA та PMRL відповідно до втілення даного винаходу. Апоптоз індукувався цисплатином (5 мкг/мл, 24 год).

На Фіг. 14 зображено аглютинацію інтактних (I) та апоптичних (A) клітин лінії Jurkat лектинами PSL, VAA, RCA та PMRL відповідно до втілення даного винаходу. Апоптоз індукувався етопозидом, 1 мкМ, 24 год.

На Фіг. 15 зображено використання VAA лектин-стимульованої аглютинації для виявлення

апоптозу в лімфоцитарній суспензії, виділеній із периферичної крові "здорового" донора та пацієнтів з автоімунними розладами відповідно до втілення даного винаходу. D: здоровий донор, <1% апоптичних клітин; 1: Пацієнт N.G., 1.06% апоптичних клітин; 2: Пацієнт T.O., 6.7% апоптичних клітин.

На Фіг. 16 зображено використання VAA лектин-стимульованої аглютинації для виявлення апоптозу в лімфоцитарній суспензії, виділеної із периферичної крові "здорового" донора (D) та пацієнта V.P. 1 із активною суглобовою формою поліартриту, перед (A) та після 14-денного курсу хіміотерапії (B) відповідно до втілення даного винаходу.

На Фіг. 17 зображено підрахунок числа живих і апоптичних клітин. Апоптоз у клітин лінії L1210 індукували цисплатином у різних концентраціях, а саме 0.05, 0.5 і 5 мкг/мл. Відсоток живих клітин у популяціях обчислювався після індукції апоптозу. Число апоптичних клітин дорівнює "% апоптичних клітин=100% клітин-% живих клітин". Концентрація лектину VAA, необхідна для аглютинації клітин у їх популяціях, реєструвалась. Відповідно, показано залежність між часткою живих клітин у популяції та концентрацією лектину, необхідною для аглютинації. Для опису залежності запропоновано математичну функцію.

На Фіг. 18 зображено використання FITC-міченого лектину PSL для виявлення апоптичних клітин у клітинах лінії людської аденокарциноми легенів A549 за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Апоптоз було індуковано різними концентраціями цисплатину. Можливість реалізації способу покажемо на наступних прикладах.

Тут і надалі, якщо інше не вказане, використані технічні та наукові терміни мають те ж значення, що й у випадку їх загального розуміння спеціалістами в області, до якої належить винахід. Наступні джерела подають загальний опис термінів, використаних в описі даного винаходу: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); and Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001).

Спеціаліст в даній галузі виявить багато методів та матеріалів, подібних чи еквівалентних до описаних нижче, що можуть бути використані при реалізації винаходу. Даний винахід в жодній мірі не обмежується описаними матеріалами та методами.

Приклади лектинів, що можуть бути використані при реалізації винаходу включають, але не обмежуються лектинами з Laburnum anagyroides аглютиніну з кори (LABA), аглютиніну з Phaseolus vulgaris (PHA-E), лектину з Pisum sativum (PSL), аглютиніну з Ricinus communis (RCA-120 чи RCA), аглютиніну з Solanum tuberosum (STA), аглютиніну з Triticum vulgaris (аглютиніну зародків пшениці, WGA), аглютиніну з Viscum album (VAA), лектину з Canavalia ensiformis (concanavalin A, ConA), лектину з Helix pomatia (HPL), аглютиніну з Galanthus nivalis (GNA), аглютиніну з Narcissus

pseudonarcissus (NPA), лектину з ризому *Polygonatum multiflorum* (PMRL), аглютиніну з *Levcojum verum* (LVA), аглютиніну з *Sambucus nigra* (SNA), аглютиніну з *Lens cilinaris* (LCA), аглютиніну з *Phytolacca americana* (PLA), та L-фукозо-специфічного лектину з кори окуня річкового. Особливо корисними лектинами можуть бути PSL, PMRL, VAA, RCA, і GNA, що зв'язують α -D-манноза-та/чи β -D-галактозовмісні глікокон'югати. Еквіваленти, синтетичні варіанти, хімічні аналоги чи інші замісники із описаних нижче, чи їх комбінації можуть бути використані для альтернативних втілень даного винаходу.

Приклад 1.

Винахідники використовували специфічні рослинні лектини щоб простежити експресію мембранних глікопротеїнів при апоптозі. Винахідники виявили, що рівні α -D-маннозовмісних глікокон'югатів, специфічних до лектину *Pisum sativum* (PSL) і β -D-галактозовмісних глікокон'югатів, специфічних до аглютиніну *Ricinus communis* (RCA-120; 120 kDa) значно зростали у плазматичній мембрані апоптичних клітин лінії L1210 лейкемії мишей.

Приклад 2.

Винахідники далі характеризували зміни у експресії глікопротеїнів під час апоптозу щоб визначити чи результати лектино-цитохімічної детекції апоптичних клітин лінії L1210 можна узагальнити для апоптичних клітин інших тканин чи видів. Винахідники також вивчали залежність цих змін від тривалості, дози або природи апоптоз-індукуючого агента, а також від способу від'єднання клітин від субстрату (трипсинізація або механічне зіскрб'ування). Відповідні рівні експресії глікопротеїнів у інтактних та апоптичних клітин було виявлено лектиноцитохімічним аналізом, з використанням 15-ти лектинів, мічених пероксидазою хрому (HRP), і аглютинаційним аналізом. Виділення апоптичних клітин проводилось на PSL-кон'югованій агарозі. Отримані результати дозволяють припустити, що зростання рівня α -D-маннозо- та β -D-галактозовмісних глікопротеїнів можна прийняти за універсальний маркер апоптичних клітин, а отже, його можна використати для подальшого виділення і підрахунку апоптичних клітин.

Винахідники показали, що зростання рівня згаданих глікопротеїнів є універсальною ознакою (маркером) апоптичних клітин, не залежно від тканинного походження чи способу індукції апоптозу. Ця ознака апоптичних клітин проявляється уже на 12 годину після індукції апоптозу.

Існуючі дані дозволяють припустити, що зростання експресії мембранних глікопротеїнів, що містять α -D-маннозу, β -D-галактозу, або N-ацетилглюкозамін, і одночасне спадання рівня експресії глікопротеїнів, що містять сіалову кислоту позитивно корелює із апоптозом у клітинах лейкемії миші лінії L1210. (Також див., Bilyu et al., In vivo expression and characteristics of novel α -D-mannose-rich glycoprotein markers of apoptotic cells. *Cell Biology International* 29 (2005) 920-928). Проте ConA також взаємодіє із α -D-маннозою, зв'язування цього лектину було незначним. Такий результат можна пояснити здатністю ConA зв'язувати не лише α -D манному, але ще й α -D-глюкозу (Reeke GN Jr, Becker JW, Cunningham BA, et al. Relationships

between the structure and activities of concanavalin A. *Ann NY Acad Sci* 1974; 234:369-382). Отже, лектини, специфічні до α -D-маннози та β -D-галактози можуть бути використані як специфічні маркери апоптичних клітин L1210, які широко застосовуються як експериментальна модель у дослідженнях протипухлинної дії ліків (Golab J, Zagazdzon R, Kozar K, et al. Potentiated anti-tumor effectiveness of combined therapy with interleukin-12 and mitoxantrone of L1210 leukemia in vivo. *Oncol Rep* 2000; 7:177-181). Відносно широкий спектр моносахаридної специфічності лектину WGA укладнає його застосування для специфічної детекції апоптичних клітин. Беручи до уваги, що лектини значно доступніші і простіші у застосуванні, ніж моноклональні антитіла, такий підхід є новим і зручним інструментом для виявлення апоптичних клітин.

Приклад 3.

Досліди з клітинами інших типів, а саме мишачих фібробластів лінії L929 та епітеліальних клітин аденокарциноми людини лінії MCF7, також показали зростання зв'язування лектинів із апоптичними клітинами у порівнянні з інтактними. Лектини PSL ($P < 0.001$), RCA-120 ($P < 0.01$), і WGA ($P < 0.001$) виявляли значно сильніше зв'язування із апоптичними клітинами лінії L929, а RCA-120 ($P < 0.001$) і VAA ($P < 0.001$) виявляли підвищене зв'язування із апоптичними клітинами лінії MCF7, тоді як ефект для PSL був статистично незначним ($P = 0.078$). Отже, результати лектиноцитохімічного виявлення апоптичних клітин лінії L1210 можуть бути узагальнені для інших типів клітин і клітин іншої видової приналежності.

Приклад 4.

Інгібування зв'язування лектинів специфічними вуглеводами та використання різних агентів (метотрексату та цисплатину) для індукції апоптозу вказує на те, що підвищений рівень фарбування HRP-міченими лектинами апоптичних клітин залежить від специфічного зв'язування лектину із глікопротеїнами плазматичної мембрани, що експресуються за умов апоптозу, і не залежить від природи апоптоз-індукуючого агента. Про зменшення зв'язування лектину WGA з анеуплоїдними варіантами клітинних ліній U87 та U373 із набутою лікарською стійкістю у порівнянні з вихідними клітинними лініями (Camby I, Salmon I, Rombaut K, et al. Influence of culture media and multidrug resistance on the wheat germ agghmnin (WGA) glycoeytochemical expression of two human glioblastoma cell lines. *Anticancer Res* 1996; 16:1719-1725). Проте, вважається, що резистентність до цисплатину у клітин лінії L1210R не пов'язана із механізмами множинної лікарської стійкості (Chu G. Cellular responses to cisplatin. *Cancer* 1994; 269:787-790). Слід зазначити, що вуглеводна специфічність лектинів WGA, RCA-120, та VAA не є абсолютною (Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. Лектини в гистохимії. - Львов.: Вища школа, 1989. - 144 с.), а отже вони можуть зв'язуватись із глікопротеїнами, що містять різні вуглеводні залишки. Цим можна пояснити посилене зв'язування лектинів WGA, RCA-120, та VAA із неапоптичними клітинами L1210. Лектини VAA та RCA-120 також є дуже токсичними для клітин ссавців (Yakymovych M, Yakymovych I, Antonyuk V, et al. Lectins'

cytotoxicity for L1210 murine leukemia cells with different sensitivity to anticancer drug cisplatin. *Exp Physiol Biochem* 1999; 2:39-44). Концентрації лектинів VAA, RCA-120, та ConA, що використовувалися в дослідженні були достатніми для вияву цитотоксичного ефекту та індукції апоптозу, якби дані лектини були додані до культури клітин лінії L1210 (а не застосовані як барвники для цитологічних препаратів) (Yakymovych M, Yakymovych I, Anlonyuk V, et al. Lectins' cytotoxicity for L1210 murine leukemia cells with different sensitivity to anticancer drug cisplatin. *Exp Physiol Biochem* 1999; 2:39-44; Lutsik MD. Antitumor properties of phytohemagglutinin from mistletoe. *Proc Acad Sci Ukr SSR* 1975; 6:541-543). Цікаво, що рівень цитотоксичності лектинів VAA, RCA-120, та ConA (Stasyk T, Antonyuk V, Yakymovych M, et al. A comparative study of cell surface glycosyl determinants in cisplatin-sensitive and resistant L1210 murine leukemia cells. *Exp Oncol* 1998; 20:204-209) корелював із здатністю цих лектинів фарбувати апоптичні клітини лінії L1210 (Фіг. 1). Лектини VAA та RCA-120 із сильною цитотоксичністю більш інтенсивно зв'язувались із апоптичними клітинами, ніж лектин ConA, що зв'язувався менш інтенсивно і є відносно нетоксичним для даних клітин.

Лектин PSL зв'язувався із мембранними глікопротеїнами клітин L1210, що мали молекулярну масу 32- та 49-кДа. В інших дослідженнях, здійснених у відділі винахідників (Stasyk T, Antonyuk V, Yakymovych M, et al. A comparative study of cell surface glycosyl determinants in cisplatin-sensitive and resistant L1210 murine leukemia cells. *Exp Oncol* 1998; 20:204-209), було описано специфічне зв'язування лектинів ConA та PNA (виділеного з арахісу, *Arachis sativum*) із мембранними глікопротеїнами клітин L1210 з молекулярною масою 220- та 240 кДа.

Приклад 5.

Можна припустити різні пояснення для зростання експресії специфічних глікопротеїнів. Не надаючи перевагу жодній конкретній теорії, винахідники вважають, що вони пов'язані із механізмами специфічного мічення апоптичних клітин та апоптичних тілець з метою подальшого їх фагоцитозу. Різними дослідженнями було показано, що фагоцитоз різних патогенів опосередковується α -маннозоспецифічними та β -глюкозоспецифічними рецепторами на макрофагах (Astarie-Dequeker C, N'Diaye EN, Le Cabec V, et al. The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun* 1999; 67:469-477; Suzuki T, Ohno N, Ohshima Y, Yadomae T. Soluble mannan and beta-glucan inhibit the uptake of *Malassezia furfur* by human monocytic cell line, THP-1. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 21:223-230). Додавання галактози, ацетил-N-галактозаміну, N-ацетил-D-глюкозаміну, манози та α MMap ініціювало поглинання патогенних бактерій поліморфодерними лейкоцитами (Register KB, Ackermann MR, Kehrli ME Jr. Non-opsonic attachment of *Bordetella bronchiseptica* mediated by CD11/CD18 and cell surface carbohydrates. *Microb Pathog* 1994; 17:375-385). Аміноцукри (аміно-похідні простих вуглеводів) на зразок глюкозаміну, N-ацетил-

глюкозаміну та галактоза міну інгібували поглинання апоптичних еозинофілів нативними та інтерлейкін-1 α -стимульованими епітеліальними клітинами дрібних дихальних шляхів (Walsh GM, Sexton DW, Blaylock MG, Convery CM. Resting and cytokine-stimulated human small airway epithelial cells recognize and engulf apoptotic eosinophils. *Blood* 1999; 94:2827-2835). Манозні рецептори (поверхневі лектини C-типу з молекулярною масою 175-кДа) макрофагів, дендритних клітин, клітин вистилки синусів селезінки та лімфатичних вузлів можуть відігравати вагомий роль у видаленні «зістарілих» клітин та фагоцитозі вкритих манозою частинок (Uccini S, Sirianni MC, Vincenzi L, et al. Kaposi's sarcoma cells express the macrophage-associated antigen mannose receptor and develop in peripheral blood cultures of Kaposi's sarcoma patients. *Am J Pathol* 1997; 150:929-938). Фагоцитоз людськими нейтрофілами еритроцитів, оброблених ConA, та неопсонізованих клітин *Escherichia coli* включає манозо-зв'язувальну адгезію, що опосередковується Fc γ рецептором (Salmon JE, Kapur S, Kimberly RP. Opsonin-independent ligation of Fc gamma receptors. Рецептори 3G8 на нейтрофілах опосередковують фагоцитоз еритроцитів, оброблених конканаваліном A та неопсонізованих клітин *Escherichia coli* (*J Exp Med* 1987; 166:1798-1813; Salmon JE, Kimberly RP. Phagocytosis of concanavalin A-treated erythrocytes is mediated by the Fc gamma receptor. *J Immunol* 1986; 137:456-462). Отже, збільшена експресія манозо- та галактозмісних глікопротеїнів на поверхні апоптичних клітин може бути важливою при фагоцитозі цих клітин та апоптичних тілець. Це добре узгоджується із збільшенням кількості манозомісних глікопротеїнів на поверхні апоптичних тілець, виявлене за допомогою лектин-цитохімічного аналізу при зв'язуванні лектину PSL апоптичними клітинами (Фіг. 2F).

Приклад 6.

Наведені дані свідчать, що зростання експресії α -D-манозо та β -D-галактозмісних мембранних глікопротеїнів позитивно корелює із проявом апоптозу у досліджуваних клітинах (клітинні лінії L929, L1210, MCF-7 (wt), MCF-7 (DOX/R), та Jurkat). Це було показано за збільшенням зв'язування манозоспецифічних лектинів (PSL, GNA, PMRL, NPA, LVA) та галактозоспецифічних лектинів (RCA, VAA) із апоптичними клітинами у порівнянні із їх зв'язуванням із неапоптичними клітинами. Лектиноцитохімічний аналіз інтактних та апоптичних клітин також показав збільшене зв'язування лектину WGA із апоптичними клітинами, хоч цей лектин здатний зв'язувати ряд вуглеводних залишків, наприклад (D-GlcNAc) $_n$, де $n = 1, 2, 3$, та NeuNAc (Луцук та ін. 1981). Зважаючи на те, що згадані вуглеводні залишки широко поширені у складі глікокаліксу, використання лектину WGA буде не найкращим вибором лектину для детекції апоптозу.

Окрім 13 лектинів, що широко використовуються при гістохімічному аналізі, 2 лектини (PMRL та LVA), були вперше виділені у лабораторії винахідників (Antoniuk L, Antoniuk V. Interaction of immobilized lectin from *Leucojum vernum* L. with polysaccharides and glycoproteins. *Ukr Biokhim Zh.*

1993; 65: 69-76; Antoniuk V. Purification and properties of lectins of *Polygonatum multiflorum* [L.] All. and *Polygonatum verticillatum* [L.] All. Ukr Biokhim Zh. 1993; 65: 41-48) та апробовані як засіб для дискримінації апоптичних та неапоптичних клітин. Один з них, PMRL, виявився ефективним маркером апоптичних клітин, зокрема при дослідженні апоптозу методом аглютинації. Рівень зв'язування інших лектинів, таких як LABA, HPL, STA, PHA-E, ConA, був схожий у апоптичних та неапоптичних клітин. Не надаючи перевагу жодній конкретній теорії, винахідники вважають, що під час апоптозу змінюється рівень експресії лише певних типів глікопротеїнів. Як виняток можна говорити про збільшене зв'язування лектину HPL із апоптичними клітинами лінії Jurkat; при цьому не слід забувати про можливість експресії антигенів груп крові у клітин Jurkat cells, до яких лектин HPL володіє високою афінністю (типсування груп крові) (Khan F, Khan R, Sherwani A, Mohmood S, Azfer M. Lectins as markers for blood grouping. Med Sci Monit 2002; 8: 293-300). Слід зазначити, що специфічність усіх лектиноцитохімічних реакцій контролювалась за інгібуванням зв'язування лектину у присутності відповідних вуглеводних інгібіторів.

Приклад 7.

Винахідники виявили, що зростання експресії α -D-манози та β -D-галактозовмісних глікопротеїнів плазматичної мембрани при апоптозі не залежить від типу клітинної лінії та від природи апоптоз-індукуючого чинника - хімічної (цисплатин, метотрексат, дексаметазон, етопозид) чи фізичної (рентгеновське опромінення, гіпертермія). Збільшення експресії апоптоз-залежних глікопротеїнів плазматичної мембрани також не залежало від способу від'єднання клітин - трипсинізації (що могла б потенційно ушкоджувати певні мембранні глікопротеїни) чи механічного зшкрябування, що могло б діяти іншим чином. Зростання експресії згаданих мембранних глікопротеїнів, виявлене за допомогою лектиноцитохімічного аналізу, залежало від концентрації апоптоз-індукуючого чинника. Таке зростання можна було чітко зафіксувати уже через 12 годин після обробки клітин апоптоз-індукуючими чинниками. Інші типи фіксації клітин (фіксація в парах формаліну, та використання нефіксованих клітин) не виявляли значного впливу на здатність клітин зв'язувати лектини PSL та RCA, у такий спосіб виключаючи можливий вплив перерозподілу внутрішньоклітинної сукупності вуглеводів під час етапу фіксування клітин.

Приклад 8.

Звертаючись до питання про природу глікопротеїнів із зміненою експресією на апоптичних клітинах, не надаючи перевагу жодній конкретній теорії, винахідники вважають, що вона є наслідком модифікації попередньо існуючих глікопротеїнів, а не синтезом *de novo* чи результатом перерозподілу в клітинах-мішенях. Було показано, що апоптоз, спричинений донорами оксиду азоту в ацинарних клітинах підязикової залози у культурі супроводжувався зменшенням синтезу глікопротеїнів (Slomiany BL, Slomiany A. Nitric oxide interferes with salivary mucin synthesis: involvement of ERK and p38 mitogen-activated protein kinase. J Physiol Pharmacol. 2002; 53: 325-336). Активність лізосо-

мальної нейрамінідази (сіалідази) Neu1 зростала після індукції апоптозу бугиригом натрію у клітинах раку товстої кишки людини (Kakugawa Y, Wada T, Yamaguchi K, Yamanami H, Ouchi K, Sato I, Miyagi T. Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 10718-23). Azuma та співавтори повідомляли про зростання зв'язування лектину RCA із апоптичними клітинами лінії Jurkat, спричинене їх експозицією з нейрамінідазою, чия активність індукувалась дією етопозиду (Azuma Y, Taniguchi A, Matsumoto K. Decrease in cell surface sialic acid in etoposide-treated Jurkat cells and the role of cell surface sialidase. Glycoconj J. 2000; 17: 301-306). Гідроліз сіалових кислот сіалідазою виражався в апоптичних тільцях у складі пухлин. Ця ознака була важливою для розпізнавання апоптичних тілець лектинами C-типу, присутніми на макрофагах, що поглинали апоптичні тільця (Uehara F, Ohba N, Miyagi T. Glycohistochemical analysis of apoptotic bodies in eyelid tumor. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 1997; 101: 611-6). Подальші експерименти, здійснені винахідниками, надали докази того, що інгібітори синтезу глікопротеїнів *de novo* (тунікаміцин, 2-деокси-D-глюкоза) та інгібітори транспорту глікопротеїнів із апарату Гольджі до плазматичної мембрани (монензин) не перешкоджають зростанню експресії мембранних α -D-манози та β -D-галактозовмісних глікопротеїнів апоптичних клітин. Також було показано, що апоптоз в досліджуваних клітинах супроводжувався 40-кратним зростанням активності мембрано-асоційованої нейрамінідази. Така активність не виявлялась у кондиціонованому середовищі після культивування клітин чи індукції апоптозу. Штучне десіалування глікопротеїнів плазматичної мембрани, здійснене за допомогою кислотного метанолізу, призвело до зростання рівнів α -D-манози та β -D-галактозовмісних глікопротеїнів. Отже, наявні дані свідчать, що за умов апоптозу глікопротеїни плазматичної мембрани можуть десіалуватись внаслідок активації мембрано-асоційованої нейрамінідазної активності. Відомо, що нейрамінідазна активність може призводити до експонування галактозильних та/чи манозильних залишків, які розпізнаються лектинами RCA, VAA, PSL, та GNA, використаними дослідниками в їх дослідженні.

Попередня обробка клітин упродовж 2-х годин немиченим лектином зменшувала фарбування плазматичної мембрани відповідними HRP-міченим лектином, що можна пояснити лектин-індукованою інтерналізацією певних мембранних глікопротеїнів. Групою Liu та ін. Повідомлялось, що флуоресцеїн-кон'югований лектин WGA транспортувався від поверхні клітини в при ядерну ділянку клітин L929 упродовж 30 хв, де впливав на певні сигнальні шляхи, що призводило до зупинки клітинного циклу (Liu W, Sze S, Ho J, Liu B, Yu M. Wheat germ lectin induces G2/M arrest in mouse L929 fibroblasts. J Cell Biochem. 2004; 91: 1159-1173). Інтерналізація рецепторів лектинів також може вказувати на їх участь у певних сигнальних шляхах.

Приклад 9.

Порівняння лектин-індукованої аглютинації інтактних та апоптичних клітин показало, що аглютинаційний тест може бути іншим простим та надійним методом виявлення змін у експресії певних глікопротеїнів апоптичних клітин, а також використовуватись для їх напів-кількісного визначення. Дослідники встановили, що концентрації лектину (PSL), необхідні для аглютинації інтактних клітин були у 8 разів вищі за ті, що потрібні для аглютинації апоптичних клітин. Дослідники вважають, що лектин PSL є не єдиним лектином, здатним дискримінувати інтактні та апоптичні клітини за допомогою аглютинаційного тесту. Слід наголосити, що аглютинаційний тест є набагато простішим за лектиноцитохімічний аналіз, і він не потребує мічення лектину та комп'ютерної денситометрії клітин, зафарбованих HRP-міченими лектинами. В роботі Bilyu et al., (Some New Approaches to the Detection of Programmed Cell Death. Proc. of SPIE Vol 6163 61630J-1, Fall 2005) наведено огляд підходів до визначення апоптозу, включаючи методи, описані в даному винаході. Аглютинаційні дослідження інтактних та апоптичних клітин підтвердили, що рецептори, з якими зв'язуються лектини, розташовані у плазматичній мембрані нефіксованих клітин, а їх поява не спричинена експонуванням внутрішньоклітинної сукупності вуглеводів, яка зв'язується лектинами, на поверхню клітини, що могла б потенційно мати місце в ході фіксації клітин.

Приклад 10.

Дослідники показали, що лектин-кон'югована агароза може використовуватись для виділення апоптичних клітин. Слід зазначити, що тривалість та температура інкубації клітин із лектин-кон'югованими гранулами агарози має визначальний вплив на ефективність виділення апоптичних клітин. Наскільки відомо винахідникам, це перший приклад такого підходу при вивченні апоптичних клітин.

Незважаючи на подібне зростання у експресії α -D-манозо- та β -D- галактозовмісних глікопротеїнів на апоптичних клітинах, їх денситометричні профілі при лектиноцитохімічному аналізі були не ідентичними.

Лектини, що були відкриті більш ніж 100 років тому, нещодавно знайшли нове застосування як нові маркери різних типів чи підтипів клітин, наприклад лектини GNA та з N. Pseudonarcissus специфічно зв'язуються з макрофагами, WGA (сукцинільований) - із пневмоцитами I типу (Barkhordari A, Stoddart RW, McClure SF, McClure J. Lectin histochemistry of normal human lung. J Mol Histol. 2004; 35(2):147-56), Amaranthus leucocarpus lectin - with naive T cells (Porras F, Lascrain R, Chavez R, Ortiz B, Hernandez P, Debray H, Zenteno E Isolation of the receptor for Amaranthus leucocarpus lectin from murine naive thymocytes. Glycobiology 2000; 10: 459-465). Пізні лектини також були використані як маркери певних пухлинних детермінант (Guillot J, Guerry M, Konska G, Caldefie-Chezet F, De Latour M, Penault-Llorca F. Modification of glycoconjugates during the carcinogenesis: the case of mammary carcinomas. Bull Cancer. 2004; 91:141-58. [inFrench]; Wu A. Polyvalency of Tn (GalNAcAlphal-Ser/Thr) glycotopes as a critical factor for Vicia villosa

B(4) and glycoprotein interactions. FEBS Lett. 2004; 562: 51-8).

Дослідники вважають, що біологічна роль зростання експресії α -D-манозо- та β -D- галактозовмісних глікопротеїнів під час апоптозу може бути важливою при міченні апоптичних клітин для їх наступного усунення макрофагами та/чи сусідніми епітеліальними клітинами. Здатність імункомпетентних клітин використовувати лектинні рецептори для взаємодії з глікопротеїнами клітин мішеней також підтверджує дане припущення (Geijtenbeek T, Van Vliet S, Engering A, 'T Hart B, Van Kooyk Y Self- and Nonself-Recognition by C-Type Lectins on Dendritic Cells. Annu Rev Immunol 2004; 22: 33-54; Van De Wetering J, Van Golde L, Batenburg J Collectins. Eur J Biochem. 2004; 271: 1229-1249; Nauta A, Raaschou-Jensen N, Roos A, Daha M, Madsen H, Borrias-Essers M, Ryder L, Koch C, Garred P. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells Eur. J. Immunol. 2003; 33: 2853-2863; Pittoni V, Valcsini G The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. Autoimmun Rev. 2002; 1: 154-161).

Приклад 11. Клітини.

Дві сублінії клітин мишачої лейкемії, L1210 цисплатин-чутлива (L1210) та цисплатин-резистентна (L1210R), було отримано із Колекції культур клітин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Е.Кавецького Національної Академії Наук України (Київ, Україна). Клітини підтримувались у суспензійній культурі, що містила мінімальне поживне середовище Дальбекко (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) із 10% термоінактивованою фетальною сироваткою великої рогатої худоби (Sigma Chemical Co.) та гентаміцином (50 мкг/мл; Sigma Chemical Co.). Метотрексат (100 мкг/мл; Lederle Parenterals, Carolina, PR) або цисплатин (0.5 або 5 мкг/мл; Ebewe, Austria) було використано для індукції апоптозу.

Крім того, клітини лейкемії миші лінії L1210, мишачих фібробластів лінії L929, людської аденокарциноми лінії MCF-7 дикого типу (wt) та доxorubicin-резистентні (DOX/R), клітини людської лейкемії лінії Jurkat було отримано із Колекції культур клітин Інституту біології клітини Національної Академії Наук України (Львів, Україна). Клітини ліній L1210, L929 та MCF-7 підтримувались на середовищі DMEM (Sigma Chemical Co., USA), а клітини лінії Jurkat підтримувались на середовищі RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) із 10% термоінактивованою фетальною сироваткою великої рогатої худоби (Sigma Chemical Co.) та гентаміцином (50 мкг/мл; Sigma Chemical Co.). Апоптоз клітин лінії L1210 індуктувався цисплатином (0,5 та 1,0 мкг/мл, або 5,0 мкг/мл, Ebewe, Austria); Апоптоз клітин L929 індуктувався гіпертермією 43°C (Tomasovic S, Vasey T, Story M, Stephens L, Klostergaard J. Cytotoxic manifestations of the interaction between hyperthermia and TNF: DNA fragmentation. Int J Hyperthermia. 1994; 10: 247-262; Yuen W, Fung K, Lee C, Choy Y, Kong S, Ko S, Kwok T. Hyperthermia and tumour necrosis factor-alpha induced apoptosis via mitochondrial damage. Life Sci 2000; 67: 725-732) та етопозидом

(10 мкМ, Bristol-Myers, USA) (Karpnich N, Tafani M, Rothman R, Russo M. The course of ctoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c JBC. 2002; 277: 16547-16552); апоптоз клітин лінії MCF-7 індукувався метотрексатом (100 мкг/мл, Lederle Parenterals, Carolina, Puerto Rico) (Ruiz-Ruiz M, Lopez-Rivas A. p53-mediated up-regulation of CD95 is not involved in genotoxic drug-induced apoptosis of human breast tumor cells. Cell Death Differ. 1999; 6: 271-280) або рентгенівським опроміненням (3.0 рентген, 2.25 рентген/хв, із наступним 24 годинним періодом відновлення) (Ding et al. 2001); Апоптоз клітин лінії Jurkat індукувався цисплатиною (5 мкг/мл) (Guchelaar H, Vermes I, Koopmans R, Reutelingsperger C, Haanen C. Apoptosis- and necrosis-inducing potential of cladribine, cytarabine, cisplatin, and 5-fluorouracil in vitro: a quantitative pharmacodynamic model. Cancer Chemother Pharmacol, 1998; 42: 77-83) або дексаметазоном (дексаметазон фосфат, 1 мкМ, Львівдіалік, Львів, Україна) (Strauss G, Osen W, Debatin KM. Induction of apoptosis and modulation of activation and effector function in T cells by immunosuppressive drugs. Clin Exp Immunol. 2002; 128: 255-266). Лімфоцити здорових донорів і пацієнтів із автоімунними розладами виділялись за допомогою LymphoPrep (Nikomed Pharma AS, Norway) згідно вказівок виробника у Відділі імунології та алергології Львівського національного медичного університету (Україна). Життєздатність клітин контролювалась за фарбуванням клітин трипановим синім (0.1% в/о розчин), що підраховувались у гемоцитометричній камері під світловим мікроскопом.

Приклад 12. Лектини.

У експериментах було використано наступні лектини: аглютинін кори *Laburnum anagyroides* (LABA), аглютинін *Phaseolus vulgaris* (PHA-E), PSL, RCA-120, аглютинін *Solarium tuberosum* (STA), аглютинін *Triticum vulgaris* (аглютинін зародків пшениці, WGA), аглютинін *Viscum album* (VAA), лектин *Canavalia ensiformis* (конканавалін A, ConA), лектин *Helix pomatia* (HPL), лектин II *Maackia amurensis* (MAL-II), LABA, GNA, PMRL, NPA та LVA. Усі лектини, за винятком ConA (Lectinola, Czech Republic) та MAL-II (Vector laboratories, USA) було виділено і очищено до електрофоретичної гомогенності у лабораторії винахідників, як попередньо описано у нижченаведених роботах (Khorade AJ, Nandakumar KS, Jain NK. Lectin-functionalized multiple emulsions for improved cancer therapy. J Drug Target 1998;6:285- 292). Лектини було мічено пероксидазою хрому (HRP), біотином або флуоресцеїнізотіоціанатом (FITC). α -Метил-D-маннопіранозид (α MMan; Sigma Chemical Co.) та 4-O-(α -D-галактозопіранозил)-D-глюкопіранозу (лактозу; Sigma Chemical Co.) було використано як вуглеводи-інгібітори зв'язування PSL та RCA-120, відповідно. Також у експериментах було використано наступні лектини: LABA, PHA-E, PSL, RCA, STA, WGA, VAA, ConA, HPL, GNA, PMRL та LVA. Лектини (електрофоретично гомогенні) було придбано у НБК «Лектинотест» (Львів, Україна). ConA було вироблено у Lectinola (Czech Republic). Для лектинохімічних досліджень

лектини було мічено HRP, а для аглютинаційного аналізу було використано немічені лектини.

Наступні лектини VAA, SNA, PMRL, LLA, PLA, L-фукозоспецифічний лектин річкового окуня, HPL, RCA, та PSL також використовувались у дослідженнях для оцінки їх здатності аглютинувати інтактні та апоптичні клітини.

Приклад 13. Пектинова цитохімія.

Лектиновий цитохімічний аналіз був пов'язаний із попередньо описаним Herrington & Me Gee (Herrington CS, McGee JO'D. Diagnostic molecular pathology. Oxford: IRL Press; 1992), із деякими модифікаціями. Клітинні мазки було фіксовано сумішшю ацетону, метанолу та формаліну (19:19:2) протягом 90 с при кімнатній температурі і згодом висушено на повітрі. Мазки двічі відмивались Трис-сольовим буфером (TSB) по 2 хв та інкубувались із HRP-міченими лектинами (50 мкг/мл) протягом 1 години при кімнатній температурі або протягом ночі при 4°C. Якщо було необхідно, відповідний вуглевод-інгібітор (0.1 М розчин) додавався до інкубаційної суміші. Мазки двічі відмивались TSB протягом 10 хв та інкубувались із 0,5 мг/мл 3,3'-діамінобензидином (Sigma Chemical Co.) та 4 мкл/мл H₂O₂ у TSB протягом 5 хв. У деяких дослідках до інкубаційної суміші додавали розчин NiCl₂ (у кінцевій концентрації 1 мг/мл) для покращення контрастування клітин.

Мазки відмивались у дистильованій воді, висушувались на повітрі і поміщались у канадський бальзам. Денситометрію таких мазків проводили за зображеннями, отриманими на мікроскопі Biolam (Lomo, St. Petersburg, Russia) із відеореєструвальним пристроєм. Денситометричний аналіз виконувався на комп'ютері IBM із застосуванням PhotoM 1.21 та UTHSCSA ImageTool, розробленої в University of Texas Health Science Center in San Antonio.

У іншому випадку мазки відмивались дистильованою водою, висушувались та фотографувались. Денситометричний аналіз проводили на комп'ютері IBM PC із використанням програмного забезпечення ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) та програми UTHSCSA ImageTool (University of Texas Health Science Center in San Antonio, Texas).

Приклад 14. Лектиноблотинг.

Для виділення мембранної фракції клітини L1210 відмивались і суспендувались у гіпотонічному буфері (10 мМ Tris-HCl, pH 7.5; 1.5 мМ MgCl₂, 1 мМ фенілметилсульфонілфториду, і 1 мМ бензамідину, коктейль інгібіторів протеаз (Sigma) було додано згідно вказівок розробника), витримувались протягом 10 хв при 0°C, і згодом гомогенізувались за допомогою гомогенізатора Потера. Відповідний об'єм 2 М сахарози додавався негайно до гомогенату до отримання кінцевої концентрації 0.25 М, і тоді суспензію центрифугували протягом 15 хв при 2,000g для осадження ядер та інтактних клітин. Осад гомогенізувався ще раз у гіпотонічному буфері. Супернатанти після трьох гомогенізацій об'єднувались і центрифугувались при 25000g протягом 60 хв. Усі операції проводились при 4°C. Електрофорез проводився у градієнті ПААГ від 5% до 17.3% із використання буферної системи Лемлі (Laemmli UK. Cleavage of structural proteins

during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 277:680-685). Мембранні білки електрофоретично переносились на нітроцелюлозні листки (0.45 мкм; тип HA, Millipore, Bedford, MA), або PVDF мембрану (BDH Lab Supplies, U.K.), як було описано раніше (Towbin M, Stehelin T, Gordon I. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:4350-4354). Глікопротеїни виявляли на блотах, використовуючи HRP-мічені лектини. як було описано попередньо (Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. Лектини в гистохимії. - Львов.: Вища школа, 3989. - 144 с.).

Приклад 15. Виділення і електрофорез ДНК.

Для виявлення полінуклеосомних фрагментів ДНК попередньо зібрані клітини двічі промивали холодним забуференим фізіологічним розчином і лізували додаванням буферу TE (50 mM Трис-Cl, pH 7,5, 20 mM етилендіамінтетраацетат натрію), який містив 1% NP-40. Після цього лізати центрифугували протягом 5 хв. при 12000 g. До надосадової рідини додавали додецилсульфат натрію ("Sigma", США, кінцева концентрація 1%) і РНКазу А ("Sigma", кінцева концентрація 1 мг/мл) та інкубували 1 год. при 37°C. Потім додавали протеїназу К ("Sigma", кінцева концентрація 1 мг/мл) та інкубували 1 год. при 37°C. Після інкубації до зразків додавали 10 M ацетат амонію (1/2 від об'єму зразка). ДНК осаджували додаванням 2-х об'ємів холодного ізопропанолу, залишаючи зразки на ніч при -20°C. Осад ДНК одержували центрифугуванням протягом 30 хв. при 12000 g і розчиняли в буфері TE. ДНК фракціонували електрофорезом в 1% (w/v) гелі агарози ("Sigma", США), використовуючи Трис-ацетатний електродний буфер (pH 8,0). Для виявлення ДНК до цього буферу додавали етидій бромід ("Serva", Німеччина). Зони ДНК виявляли за їх свіченням в ультрафіолетовому світлі, використовуючи трансілюмінатор (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., USA).

Приклад 16. Статистичний аналіз.

Досліди проводились у трьох паралелях і повторювались тричі. Статистична достовірність різниці в типовому експерименті визначалась за t-критерієм Сьюдента. Рівень значимості був встановлений як 0,05. Статистична інтерпретація даних денситометрії виконувалась за допомогою програмною забезпечення Microcal Origin (Microcal Software, Northampton, MA).

Приклад 17. Аглотинація.

20 μ l клітинної суспензії з 5×10^6 клітин/мл додавали до 20 μ l розчину лектину (розведення від 10000 до 10 мкг/мл) в аглютинаційній пробірці і центрифугували при 200 g протягом 60 с. Суміші ресуспендували і 10 μ l переносили на покривне скельце для аналізу під мікроскопом.

В іншому випадку, 20 μ l клітинної суспензії з 10^7 клітин/мл додавали до 20 μ l розчину лектину (розведення від 1.000 мкг/мл до 7.8 мкг/мл) у 96-луночковому імунолоїчному планшеті і 30 хв інкубували при кімнатній температурі. Аглоїнаги сканували у трансмісивному режимі при 3200 dpi на сканері Epson.

Цей аглютинаційний метод веде до значного спрощення процедури, десятикратного зменшення

кількості необхідного для аналіз лектину і дозволяє безпосередньо документувати результати, використовуючи сканування.

Приклад 18. Розділення клітин.

Клітинну суспензію (10^6 клітин/мл) двічі відмивали у TSB, pH 7.4 і 2 мл суспензії додавали до 2 мл PSL-кон'югованої крупнопористої агарози. (4.5 мг білка PSL на 1 мл агарози) і інкубували у 35 мм ішастикових чашках Петрі при 37°C протягом 30 хв. Пізніше суспензію переносили у колонку із фільтром з інертного металу, що пропускав клітини, але затримував агарозні частинки. Діаметр колонки підбирався таким чином, щоб шар агарози не перевищував 2-4 мм. Колонка відмивалась подвійним об'ємом TSB, pH 7.4, і збиралась фракція незв'язаних клітин. Пізніше колонку промивали подвійним об'ємом 0.05 M боратного буферу, pH 8.0, і збиралась фракція PSL-зв'язаних клітин. Потім клітини відмивалися у TSB або PBS, концентруючись за допомогою центрифугування і готові до подальшого вивчення (Див. Фіг. 12A).

Приклад 19. Флуоресцентна мікроскопія.

Акридин оранжевий (у кінцевій концентрації 1 мкг/мл, Sigma) додавався до клітинної суспензії на 30 хв. Клітини розглядали під флуоресцентним мікроскопом LUMAM-P2 (ЛОМО, СРСР) і фотографували.

Приклад 20. Зв'язування різних лектинів з інтактними та апоптичними клітинами L1210.

Оцінка зв'язування різних HRP-мічених лектинів (LABA, HPL, STA, PHA-E, ConA, PSL, WGA, VAA, і RCA-120) з компонентами плазматичної мембрани інтактних та апоптичних клітин лінії L1210 показала суттєву різницю між денситометричними профілями зв'язування інтактних та апоптичних клітин (апоптоз індукувався 100 мкг/мл метотрексату (Фіг. 1). Апоптичні клітини більш інтенсивно фарбувалися з PSL ($P < 0.05$), WGA ($P < 0.01$), VAA ($P < 0.05$), і RCA-120 ($P < 0.001$), ніж інтактні клітини. RCA-120, WGA, і VAA зафарбовували апоптичні і нормальні клітини, тоді як інші лектини не зафарбовували, або ж слабо зафарбовували інтактні клітини. Не було виявлено різниці між здатністю інтактних та апоптичних клітин зв'язувати такі лектини, як LABA, HPL, STA, PHA-E, і ConA. Далі, ці лектини дуже слабо зв'язувалися із інтактними клітинами. Специфічні цукри-інгібітори зв'язування лектинів, як наприклад α -MMAp для PSL і лактоза для RCA-120, показали сильне (для RCA-120) або й повне гальмування зв'язування лектинів (Фіг. 1). Мікроскопічне вивчення мазків клітин показало рівномірний розподіл глікозильних компонентів на плазматичній мембрані для зв'язування усіх лектинів, окрім PSL. Зв'язування HRP-мічного PSL показало більш інтенсивне скупчення зв'язаних компонентів у пухирцях, що спостерігаються на поверхні клітини. Ці пухирці можуть являти собою видимі апоптичні тільця (Фіг. 2F).

Індукція апоптозу цис-диамінодихлороплатиною (цисплаїн, 0.5 мкг/мл) зумовила зміни у фарбуванні клітин, подібні до таких за індукції апоптозу метотрексатом (Фіг. 3). RCA-120 і PSL значно краще зв'язувалися із апоптичними клітинами (Фіг. 2B і 2E) аніж із інтактними (Фіг. 2A і 2D; $P < 0.001$). У присутності специфічних цукри-інгібіторів пригнічувалося зв'язування лекти-

нів, воно було незначним, або й повністю відсутнім (Фіг. 2С). ПЛАГ-ДСН електрофорез і лектиноблоттинг показали, що рецептори для ліганду PSL присутні у мембранній фракції, і відсутні у розчинній (цитоплазмі; Фіг. 4). Переважно експресувались два глікопротеїни, здатні зв'язувати PSL, їх молекулярні маси 32 і 49 кДа.

Щоб визначити, які зміни в експресії рецепторів PSL були специфічними для апоптичних клітин, винахідники також використовували підліну клітин L1210R, що резистентна до дії цисплатину. Концентрація цисплатину (0.5 мкг/мл), котра не індукує апоптоз у резистентних клітин (Фіг. 5) також не змінює експресії їхніх специфічних мембранних глікопротеїнів (Фіг. 3С). Проте, вища концентрація цисплатину (5 мкг/мл), котра викликає апоптоз, спричиняє експресію глікопротеїнів, подібно до метотрексату (100 мкг/мл), який також індукує апоптоз у цих клітин (Фіг. 3D). Денситометричні характеристики зв'язування PSL ($P < 0.01$) і RCA-120 ($P < 0.05$) з апоптичними клітинами лінії L1210R подібні до характеристики апоптичних клітин лінії L1210S.

Приклад 21. Лектиноцитохімічне вивчення апоптичних клітин різних ліній.

Використання HRP-мічених лектинів LABA, PHA-E, PSL, RCA, STA, WGA, VAA, ConA, і HPL для лектиноцитохімічного аналізу неапоптичних і апоптичних (гіпертермія, 43°C, 3 год) трансформованих фібробластів лінії L929 показало зростання зв'язування лектинів PSL ($p < 0.001$) і WGA ($p < 0.001$) апоптичними клітинами у порівнянні із інтактними, клітини відокремлювали механічним зіскрябуванням. Подібні результати зв'язування отримали для клітин, що відокремлювались від культурального посуду трипсинізацією: апоптичні клітини зв'язували PSL, WGA та RCA значно сильніше ($p < 0.001$) аніж інтактні клітини. Апоптоз, що індукувався етопозидом (10 μ M, 72 год), показав результати, подібні до отриманих при індукції апоптозу гіпертермією. Було виявлено більш інтенсивне фарбування апоптичних клітин HRP-міченим PSL ($p < 0.05$), RCA ($p < 0.001$), WGA ($p < 0.001$) та VAA ($p < 0.05$) у порівнянні із фарбуванням неапоптичних клітин (Фіг. 6). Жодної різниці не спостерігалось між апоптичними та інтактними клітинами у здатності зв'язувати лектини LABA, HPL, STA, PHA-E, і ConA. У контролі замість міченого лектину використовували забуферений розчин. Специфічні цукри-інгібітори, як наприклад α -метил-манозид (α -MMan) та 4-O-(α -D-галактопіранозил)-D-глюкопіраноза (лактоза), також додавались при використанні лектинів PSL і RCA, відповідно.

Лектиноцитохімічний аналіз було застосовано для двох субліній клітин людської аденокарциноми MCF-7 - wt і DOX/R. Сенсинометричний аналіз показав подібні характеристики апоптичних клітин, в яких зростає рівень зв'язування α -D-манозоспецифічних лектинів (PSL, $p < 0.01$, і GNA, $p < 0.05$) та β -D-галактозоспецифічних лектинів (RCA, $p < 0.05$, та VAA, $p < 0.001$ внаслідок дії метотрексату), а також (D-GlcNAc)_n- та NeuNAc-специфічного лектина WGA ($p < 0.001$), до апоптичних клітин у порівнянні з неапоптичними. Ці зміни спостерігались як при індукції апоптозу метотрексатом (100 мкг/мл, 24 h), так і рентгенівським-

опроміненням (300 R-одиниць, 225 R-одиниць/хв, за якими слідував 24-годинний період відновлення) (Фіг. 7A-C).

Зв'язування лектинів PSL ($p < 0.001$), PMRL ($p < 0.05$) при дії дексаметазону (1 мкM, 24 год) та $p < 0.001$ при дії цисплатину (5 мкг/мл, 24 год), GNA ($p < 0.01$ при дії цисплатину), RCA ($p < 0.001$ при дії дексаметазону і $p < 0.05$ при дії цисплатину), і VAA ($p < 0.05$ при дії цисплатину) було сильнішим із апоптичними клітинами людської лейкемії лінії Jurkat, аніж з інтактними клітинами цієї ж лінії (Фіг. 7D-F). Прояви апоптозу контролювали за фрагментацією ДНК (Фіг. 8). Лектин HPL також зв'язувався із апоптичними клітинами лінії Jurkat сильніше, аніж з інтактними клітинами ($p < 0.05$).

Приклад 22. Дозовий ефект апоптоз-індукуючих агентів на експресію глікопротеїнів,

Дозовий ефект апоптоз-індукуючих агентів (цисплатину) на експресію глікопротеїнів під час апоптозу було показано на клітинах лейкемії миші L1210 (Фіг. 9A). Винахідники попередньо показали, що цисплатин в таких самих концентраціях індукує апоптоз (фрагментація ДНК) у цих клітинах (Stoika R, Yakymovych M, Yakymovych 1, Chekhun V. Cisplatin resistant derivatives of murine L1210 leukemia cells are not susceptible to growth-inhibiting and apoptosis-inducing actions of transforming growth factor b1. *Anti-Cancer Drugs*. 1999; 10: 457-463). Збільшення концентрації цисплатину призводило до зменшення кількості живих клітин (Фіг. 9A). і до зростання експресії манозо- та галактозвмісних ілікопроєїнів (Фіг. 9B), вимірної лектиноцитохімічним аналізом з використанням HRP-мічених лектинів (PSL і RCA чи VAA, відповідно).

Приклад 23. Часовий ефект індукції апоптозу на експресію глікопротеїнів.

Часовий ефект індукції апоптозу на експресію глікопротеїнів вивчався на клітинах L929, підданих гіпертермії (43°C, 3 год) (Фіг. 9C). Найраніші прояви зростання експресії і лікопротеїнів було достовірно зафіксовано через 6 годин після індукції апоптозу для глікопротеїнів, що зв'язують RCA, і за 12 годин - для глікопротеїнів, що зв'язують PSL та WGA.

Приклад 24. Ефект екстерналізації на експресію глікопротеїнів плазматичної мембрани у апоптичних клітин.

Обробка клітин L1210 протягом 2 годин лектинами RCA, VAA, WGA, PSL або PMRL і пізніше фарбування цих клітин відповідними HRP-міченими лектинами показало зменшення ($p < 0.05$ в усіх випадках) зв'язування лектину із обробленими клітинами у порівнянні із необробленими. Це можна пояснити інтерналізацією глікопротеїнових рецепторів відповідних лектинів. Слід зазначити, що попередня обробка клітин лектином RCA зменшує зв'язування не лише HRP-міченого RCA, але й HRP-міченого VAA, що має подібну вуглеводну специфічність до лектину RCA, і навпаки, попередня обробка лектином VAA зменшує зв'язування із VAA та RCA (Фіг. 10).

Приклад 25. Лектин-стимульована аглютинація нормальних та апоптичних клітин.

Аглютинація інтактних та апоптичних клітин (Фіг. 11) мишачої лейкемії лінії L121G виявлялась при різних мінімальних концентраціях лектину, не-

обхідних для індукції помітної аглютинації. Манозоспецифічні лектини PMRL та PSL зумовлювали аглютинацію інтактних клітин у концентраціях 625 та 1000 мкг/мл, відповідно, і аглютинацію апоптичних клітин у концентраціях 78 та 125 мкг/мл, відповідно (Фіг. 11). Тому, концентрація лектину, необхідною для аглютинації апоптичних клітин приблизно дорівнює 1/8 (625 проти 78 та 1000 проти 125) кількості, необхідної для аглютинації неапоптичних клітин. Вважається, що має місце восьмикратне зростання вмісту манозовмісних глікокон'югатів у апоптичних клітин в порівнянні із інтактними клітинами. Подібні результати було отримано для галактозоспецифічних лектинів.

Приклад 26. Лектиноафінне виділення аношичних клітин.

Виділення апоптичних клітин лінії L1210 було проведено з використанням PSL-кон'югованої круплнозернистої агарози (Фіг. 12A). Відділення інтактних клітин було проведено промиванням афінної колонки подвійним об'ємом TSB, pH 7.4; відділення апоптичних клітин було проведено промиванням PSL-афінної колонки подвійним об'ємом 0.05 М боратного буферу, pH 8.0. Відділення популяції інтактних клітин дозволило отримати фракцію PSL-агарозозв'язаних клітин (позитивних), що складали $1.45 \pm 0.44\%$ від загальної клітинної популяції, та негативної фракції ($98.5 \pm 0.45\%$ загальної популяції клітин). Коли апоптоз індукували цисплатином (5 мкг/мл, 24 год) частка апоптичних клітин становила $7.55 \pm 0.55\%$ від загальної клітинної популяції (позитивна фракція), тоді як негативна фракція становила $92.35 \pm 0.55\%$. Подальша епіфлуоресцентна мікроскопія (Фіг. 12B) виділених клітинних суспензій з використанням фарбування акридиновим оранжевим та світлова мікроскопія з гематоксиліновим фарбуванням (не показано) дозволила класифікувати клітини негативної фракції як "інтактні", а клітини позитивної фракції - як "апоптичні". Зростання експресії рівня манозовмісних глікокон'югатів може бути застосовано для виділення апоптичних клітин із популяцій із їх великим вмістом.

Приклад 27. Лектин-індукована агакпация інтактних та апоптичних клітин лінії L1210.

Винахідники також перевіряли інші лектини, наприклад, VAA, SNA, PMRL, LVA, PLA, L-фуктозоспецифічний лектин річкового окуня, HPL, RCA, та PSL на їх здатність аглютинувати інтактні та апоптичні клітини.

Було проведено прості тести у 96-лункових імунологічних планшетах. Було виявлено, що лектин VAA аглютинуює апоптичні клітини лейкемії миші L1210 у концентрації 7,8 мкг/мл, а інтактні клітини - у концентрації 1000 мкг/мл, що становить 128-кратну ($1000/7,8$) різницю в аглютинуючих концентраціях лектину (Фіг. 13). Лектин PMRL виявив 4-кратну концентраційну різницю в аглютинації інтактних та апоптичних клітин лінії L1210. Інші перевірені лектини не виявили помітної аглютинації інтактних та апоптичних клітин. Слід зазначити, що найвища перевірена концентрація лектину (1000 мкг/мл) дуже мала для аглютинаційної реакції; тоді як майже всі перевірені лектини у концентрації 10000 мкг/мл аглютинують як інтактні, так і апоптичні клітини. Винахідники вважають, що ме-

нша концентрація лектину, взятого для аглютинації (в межах від 1,000 до 7,8 мкг/мл з розведенням удвічі) забезпечить кращу специфічність.

Приклад 28. Лектин-індукована аглютинація інтактних та апоптичних клітин лінії Jurkat.

Використовувались людські Т лімфоцити лінії Jurkat. Також перевірялася здатність лектинів PSL, VAA, RCA і PMRL індукувати аглютинацію цих клітин (Фіг. 14). Було виявлено, що лектин VAA ефективно виявляє різницю між апоптичними та інтактними клітинами, аглютинуючи інтактні клітини у концентрації 1000 мкг/мл, тоді як апоптичні клітини аглютинувалися ним вже за концентрації 62,5 мкг/мл, виявляючи таким чином 16-кратну концентраційну різницю в аглютинаційній реакції.

Приклад 29. Лектин-індукована аглютинація свіжовиділених людських лімфоцитів із периферичної крові.

Метод, розроблений винахідниками для виявлення апоптичних клітин *in vitro*, був пізніше адаптований для виявлення апоптозу у свіжовиділених лімфоцитах периферичної крові, отриманих від «здорових» донорів та пацієнтів із специфічними аутоімунними захворюваннями. Для цього було використано лектин VAA. Було показано, що концентрація лектину 1000 мкг/мл не спричиняє помітної аглютинації лімфоцитів здорових донорів (Фіг. 15). Фарбування з DAPI таких лімфоцитів показало, що менш, ніж 1% клітин мали конденсовані ядра, що характеризує апоптичні клітини. У той же час, лімфоцити пацієнта N.G. (1) із діагнозом «ревматоїдний артрит» аглютинувалися лекином VAA в концентрації 1000 мкг/мл. Фарбування з DAPI показало, що 1.1% лімфоцитів в даному випадку були апоптичними. Лімфоцити пацієнта T.O. (2) із діагнозом «поліостеоартрит» аглютинувалися лектином VAA в концентрації 15,6 мкг/мл, а фарбування з DAPI виявило, що 6.7 % лімфоцитів були апоптичними (Фіг. 15). Тому, концентрація VAA, необхідна для аглютинації лімфоцитів пацієнта (2) була у 64 рази меншою, ніж така, необхідна для аглютинації лімфоцитів «здорового» донора. Між вмістом апоптичних клітин та мінімальною аглютинуючою концентрацією лектину спостерігалась сильна негативна кореляція ($r = -0.882$).

Було досліджено лімфоцити, виділені із периферичної крові 50 пацієнтів із аутоімунними розладами. У 93.75% випадків дослідження апоптозу (15 із 16 пацієнтів) було виявлено сильну позитивну кореляцію між аглютинуванням клітин лектином VAA і числом апоптичних клітин, виявлених за фарбуванням з DAPI.

Приклад 30. Лектин-індукована аглютинація свіжовиділених людських лімфоцитів із периферичної крові до і після хіміотерапевтичного лікування.

Метод, розроблений винахідниками для виявлення апоптичних клітин *in vitro*, був пізніше адаптований для виявлення апоптозу у свіжовиділених лімфоцитах периферичної крові, отриманих від «здорових» донорів та пацієнтів із специфічними аутоімунними захворюваннями до і після хемотерапії. Для цього було використано лектин VAA. Було показано, що концентрація лектину 1000 мкг/мл не спричиняє помітної аглютинації лімфоцитів здорових донорів (D) (Фіг. 16.A і B). Фарбування з DAPI таких лімфоцитів показало, що менш

ніж 1% клітин мали конденсовані ядра, що характеризують аи оптичні клітини. Лімфоцити пацієнта V.P. (1), із діагнозом "активна суглобова форма поліартриту" аглютинувалися лектином VAA в концентрації 7,8 мкг/мл. Фарбування з DAPI показало, що 5.74% лімфоцитів були апоптичними (Фіг. 16А). Після 14-денного курсу хіміотерапії лімфоцити пацієнта V.P. (1) аглютинувалися лектином VAA в концентрації 62,5 мкг/мл. Фарбування з DAPI показало, що 3,85% лімфоцитів були апоптичними (Фіг. 16В). Таким чином, анти-артритна хіміотерапія упродовж 14 днів призводила до збільшення мінімальної аглютинуючої концентрації лектину VAA і до одночасного зменшення вмісту апоптичних клітин у крові пацієнта разом із покращеннями інших клінічних параметрів.

Приклад 31.

Щонаймш два лектини з однаковими або подібними вуглеводними специфічностями, наприклад PSL і GNA, застосовувались для вивчення експресії маннозовмісних глікокон'югатів, а RCA та VAA використовувались для виявлення експресії галактозовмісних глікокон'югатів.

Приклад 32. Підрахунок живих та апоптичних клітин аглютинаційним методом.

Апоптоз клітин L1210 було індуковано цисплатином, застосованим у різних концентраціях, як от 0.05, 0.5 та 5 мкг/мл, протягом 24 годин. Відсоток живих клітин у кожній популяції після індукції апоптозу підраховувався за фарбування клітин барвником трипановим синім. Кількість апоптичних клітин дорівнювала:

$\% \text{ апоптичних клітин} = 100\% \text{ клітин} - \% \text{ живих клітин}$

Було встановлено концентрації лектину VAA, необхідні для аглютинації клітинних популяцій. Показано залежність між відсотковим вмістом живих клітин та мінімальною аглютинуючою концентрацією лектину (Фіг. 17). Для опису залежності дослідниками було запропоновано математичну функцію сигмоїдного типу. Описана залежність включала плато, яке показувало, що для аглютинації популяції із понад 90% живих клітин (10% апоптичних) необхідно застосувати лектин VAA у концентрації 250 чи 500 мкг/мл, тоді як концентрації лектину понад 2000 мкг/мл цілком достатньо для аглютинації інтактних клітин (100% живих, 0% апоптичних). Слід зазначити, що представлена залежність може змінюватись у залежності від типу клітини, індуктора апоптозу, часу індукції, і специфічності лектину. Тому, представлена залежність може слугувати прикладом. Із цього прик-

ладу, кожен специфічний аглютинаційний тест вимагає окремого калібрування, що може провести відповідний фахівець.

Приклад 33. Виявлення апоптичних клітин із застосуванням флуоресцентної мікроскопії та флуоресцентних кон'югатів лектинів.

FITC-PSL кон'югат використовувався для виявлення апоптичних клітин людської карциноми легень лінії A549. Цисплатин, як сильний дозозалежний індуктор апоптозу, було використано для індукції апоптозу. Необроблені клітини (див. Фіг. 18, верхній рядок) не зв'язували мічений лектин PSL, і в той же час, жодних ознак апоптозу не було виявлено у таких популяціях: ядра клітин не були фрагментовані і/або конденсовані при фарбуванні із DAPI і клітини були щільно прикріплені до субстрату (показано фазово-контрасною мікроскопією). Обробка клітин A549 5 мкг/мл цисплатином протягом 24 годин призводила до втрати щільного контакту між клітинами і субстратом і водночас конденсації ядер клітин, виявляючи початок апоптичного процесу. Клітини у цій популяції також зв'язували FITC-PSL значно краще, ніж необроблені клітини (див. Фіг. 18, середній рядок). Обробка клітин людської карциноми легень лінії A549 10 мкг/мл цисплатину протягом 24 годин зумовлювала апоптоз майже усіх клітин (клітини втрачали контакт із середовищем, і майже усі ядра були конденсованими і/або фрагментованими при фарбуванні з DAPI). Зв'язування FITC-PSL було значно вище у цих клітин порівняно із необробленими клітинами чи клітинами на початку апоптичного процесу (див. Фіг. 18, нижній рядок). В усіх випадках апоптоз також підтверджували фрагментацією ДНК, показаною ДНК гель-електрофорезом (дані не представлено). Цей приклад ілюструє ефективність і специфічність флуоресцентного лектинового фарбування у виявленні апоптичних клітин.

Хоча вищеподаний опис посиляється на конкретні втілення даною винаходу, для освічених у даній справі людей повинно бути очевидним, що ряд модифікацій можна зробити без відходу від суті винаходу. Супутні заявки мають на меті врахувати такі модифікації аби не применшити справжньої суті і можливостей даного винаходу. Подані втілення, отже, повинні розглядатись як ілюстративний матеріал, що не обмежує можливостей винаходу, який вказується приєднаною формулою винаходу, а не вищевикладеним описом. Усі зміни, що відбудуться в межах еквівалентності формулі винаходу охоплюються даним винаходом.

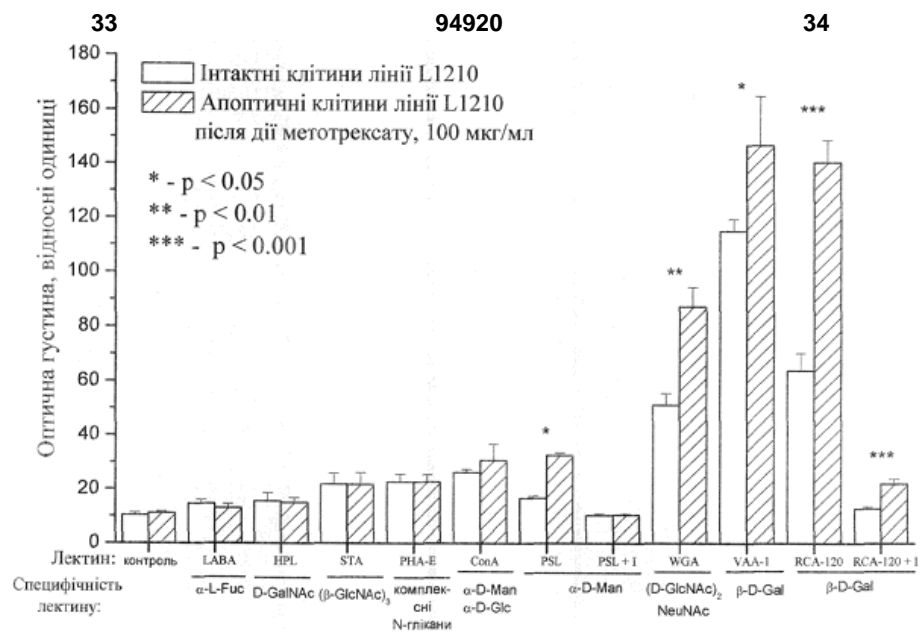


Fig. 1

35

94920

36

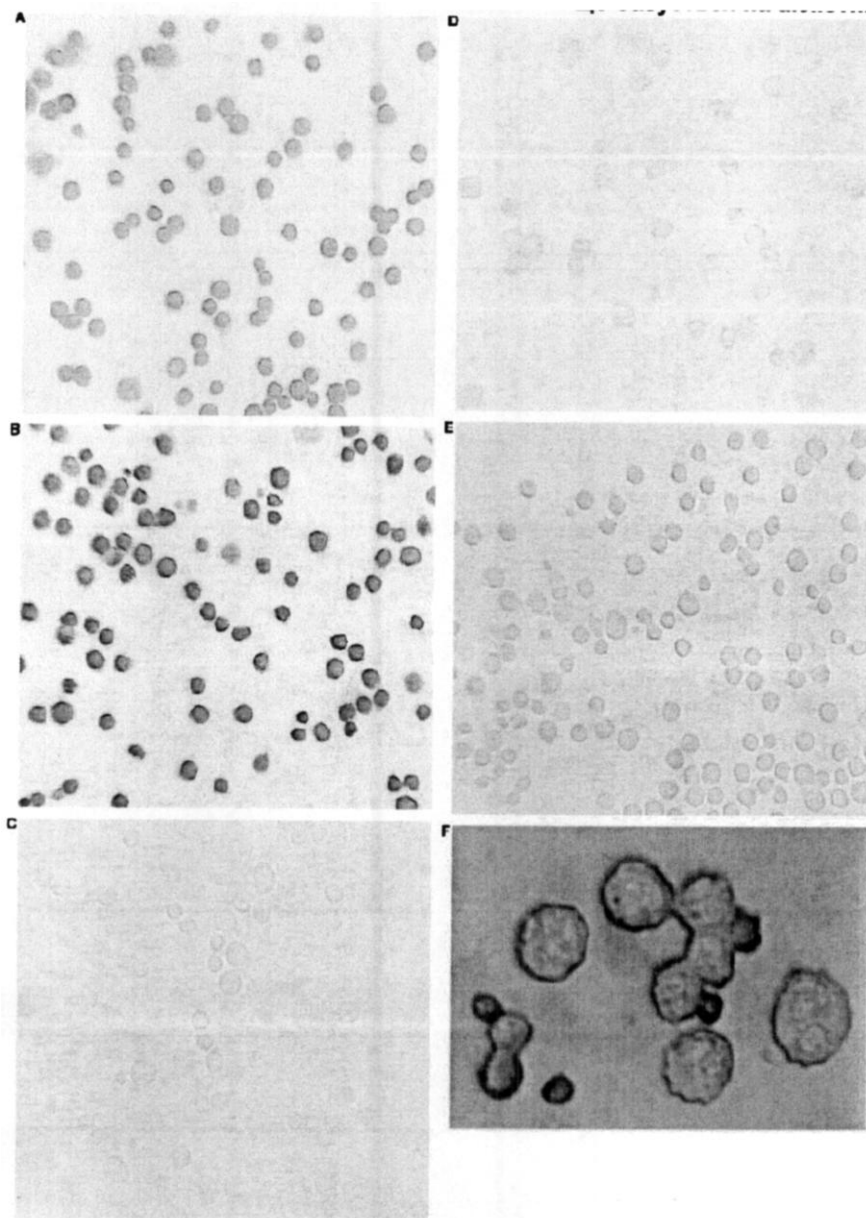
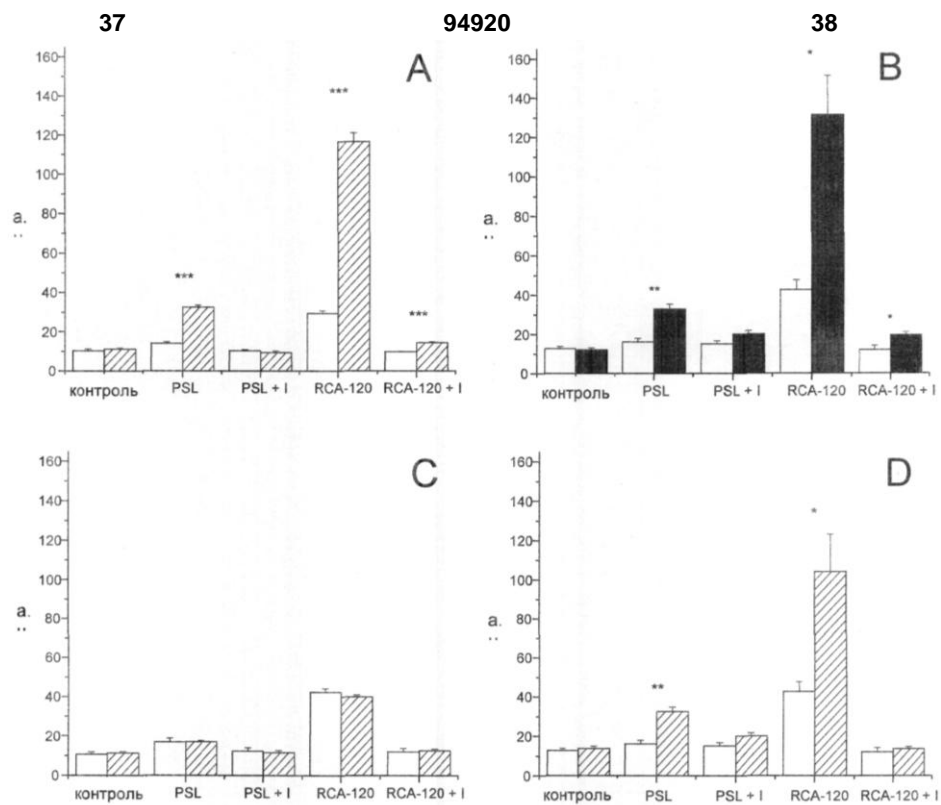
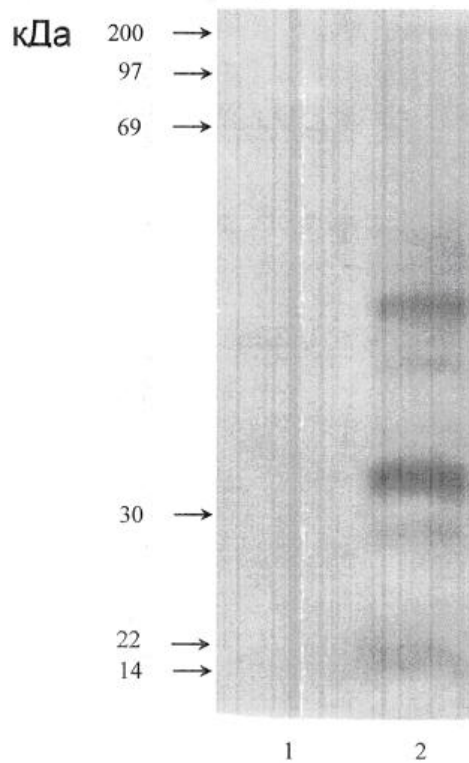


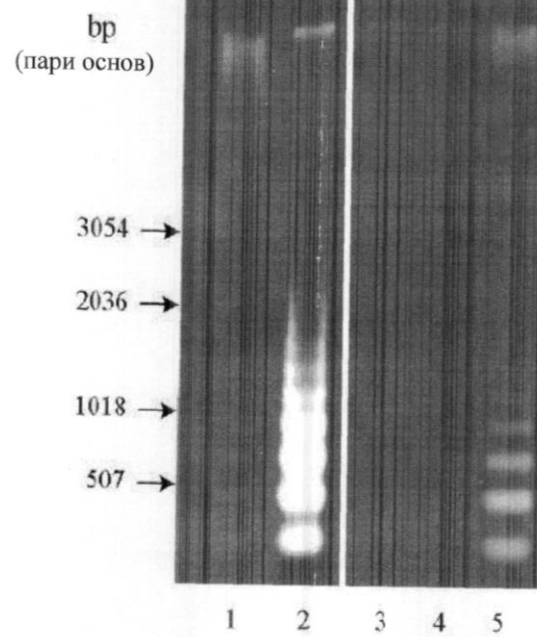
Fig. 2



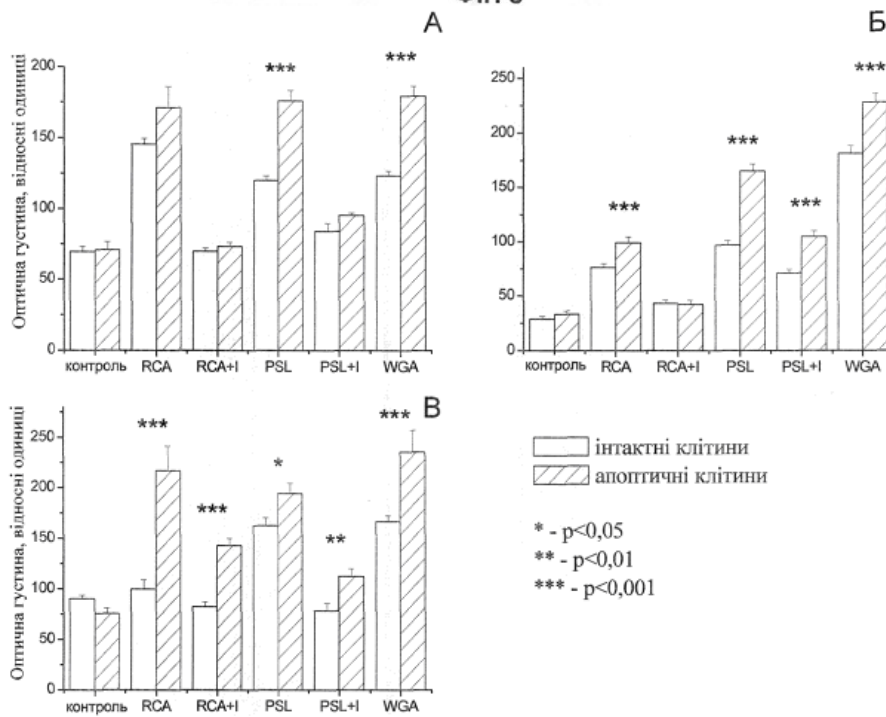
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

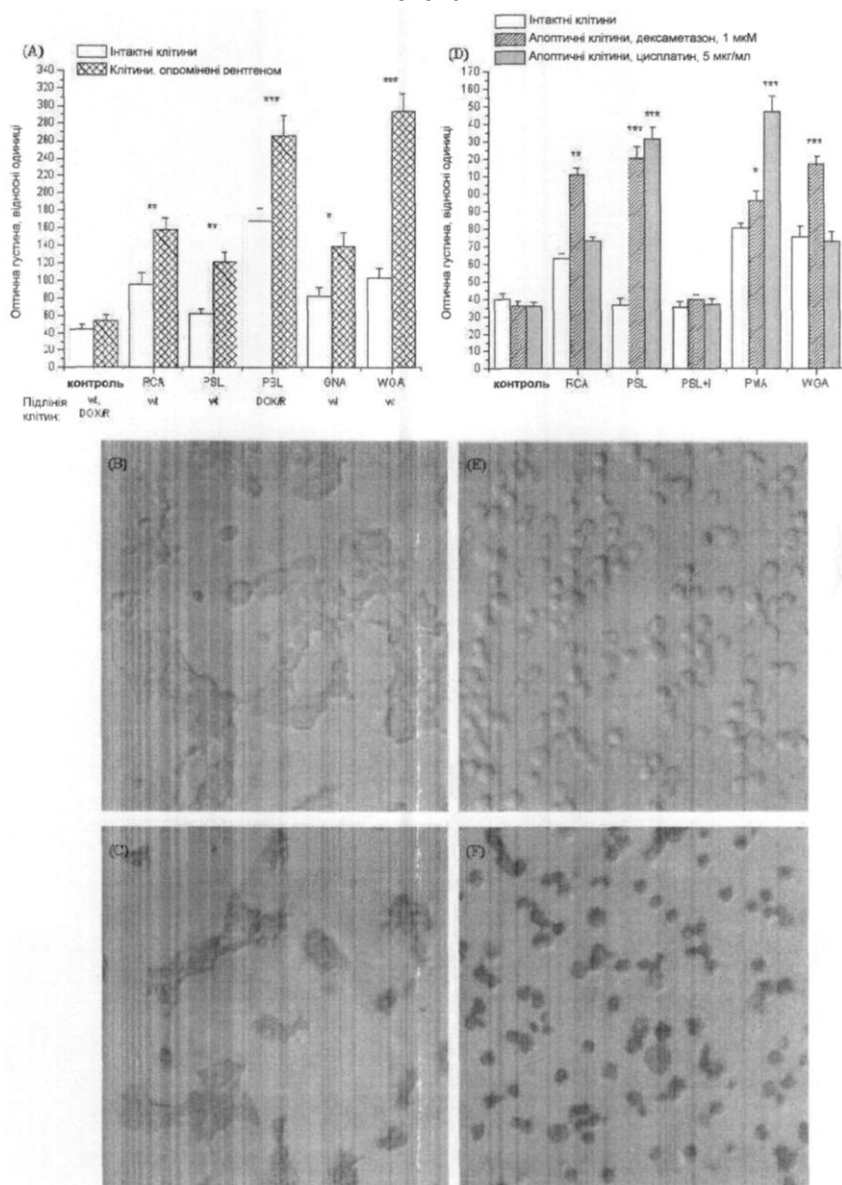
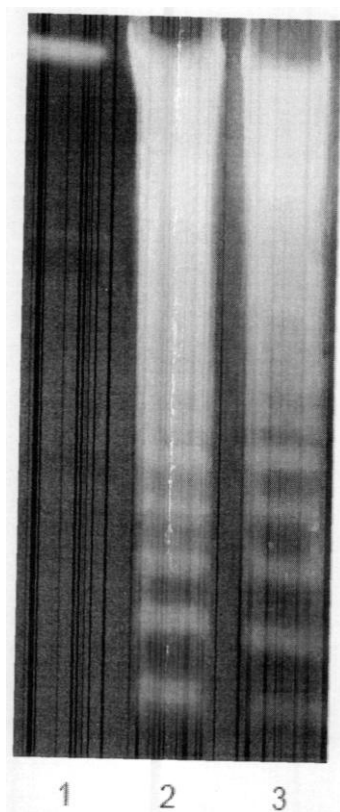
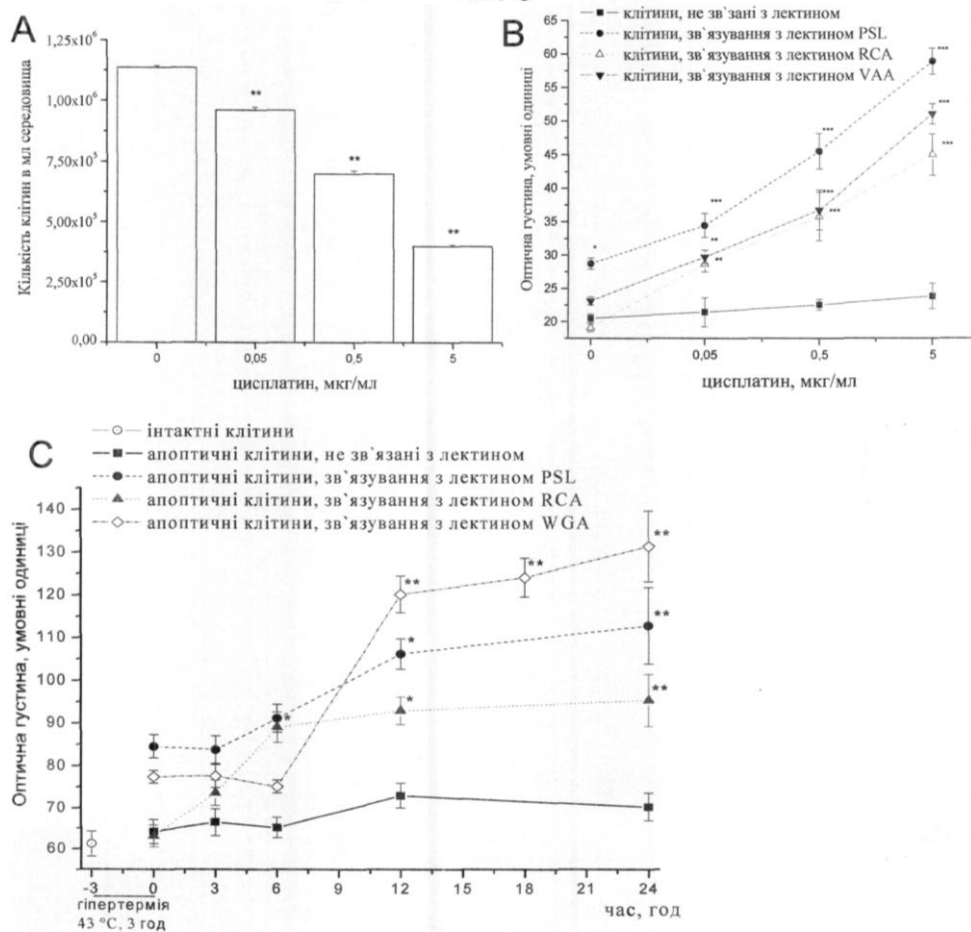


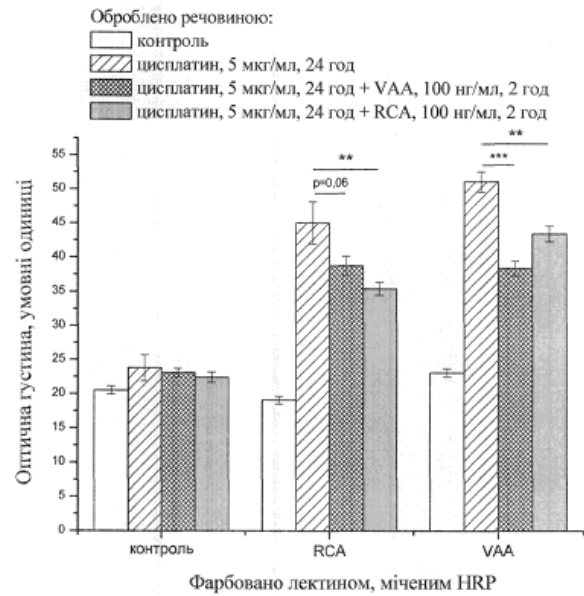
Fig. 7



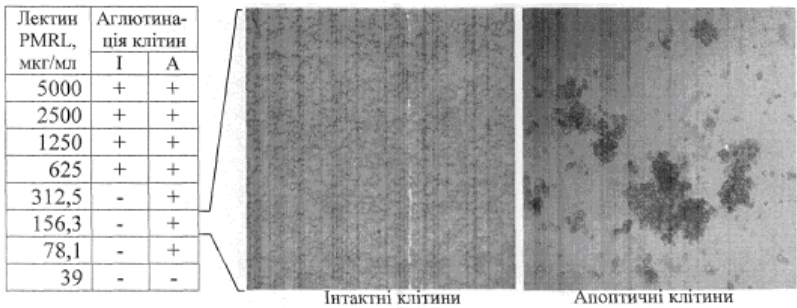
Фіг. 8



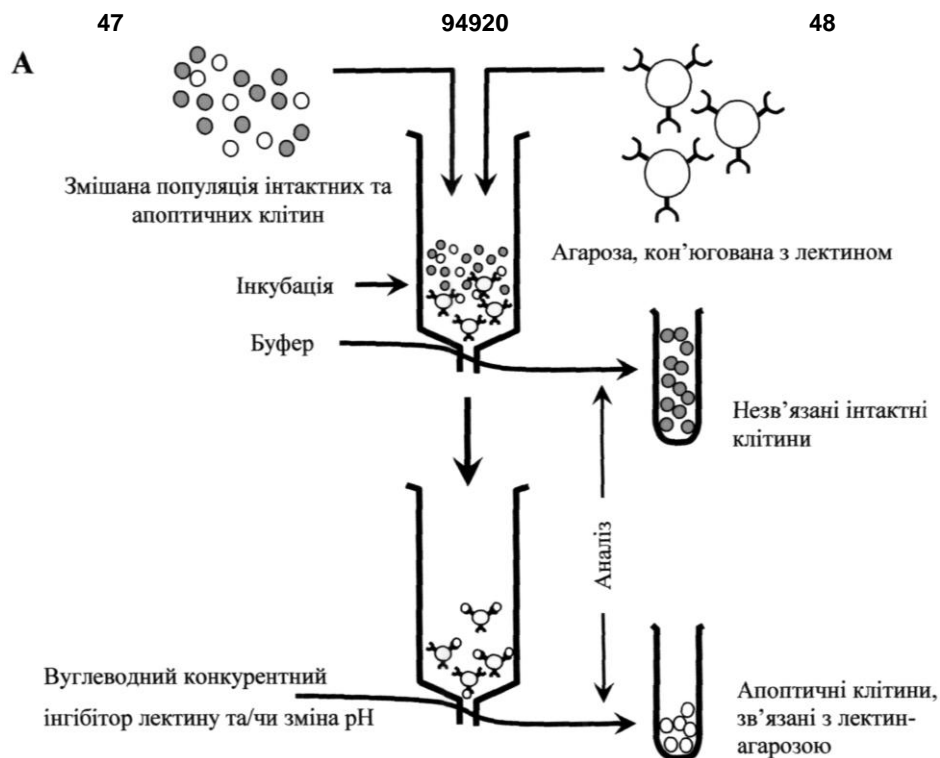
Фіг. 9



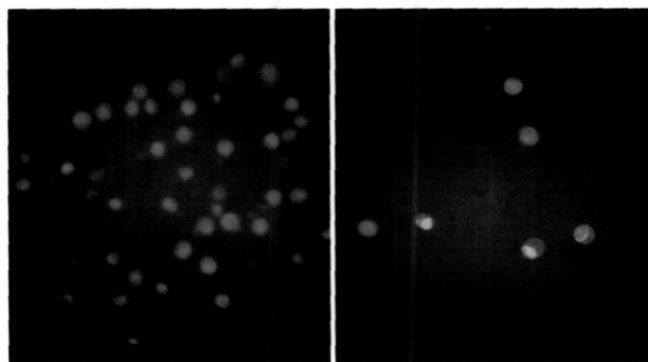
Фіг. 10



Фіг. 11



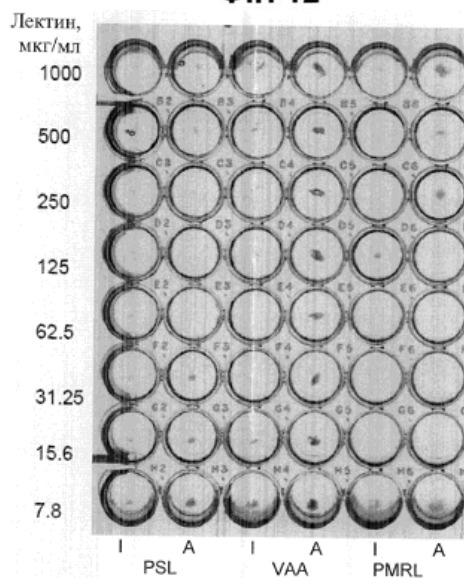
Б



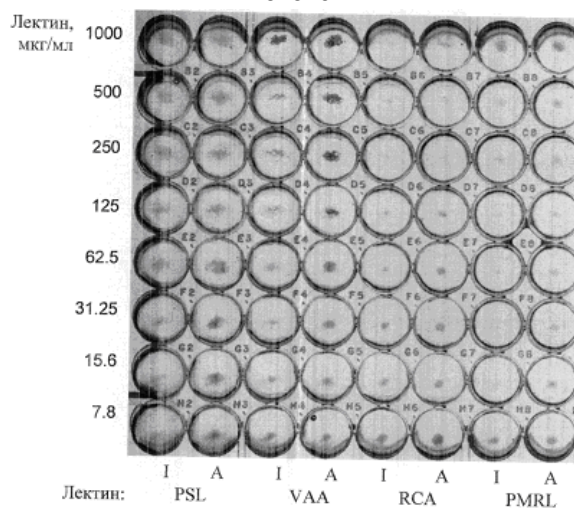
Негативна фракція, 92,5%
“інтактні” клітини

Позитивна фракція, 7,5%
“апоптичні” клітини

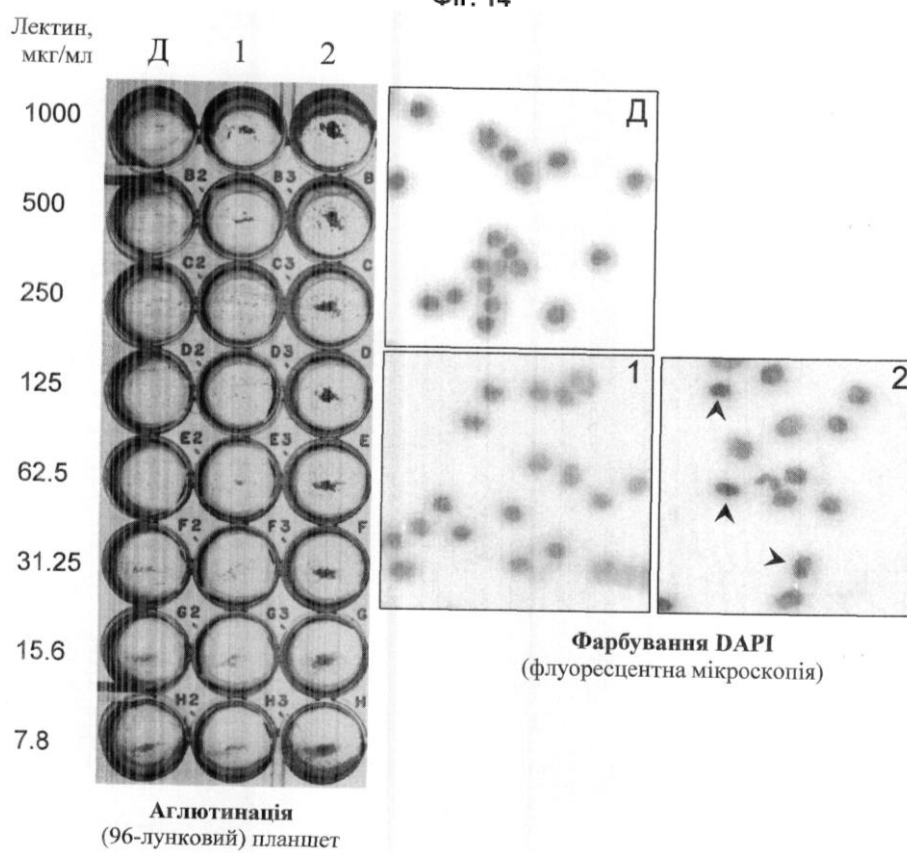
Фіг. 12



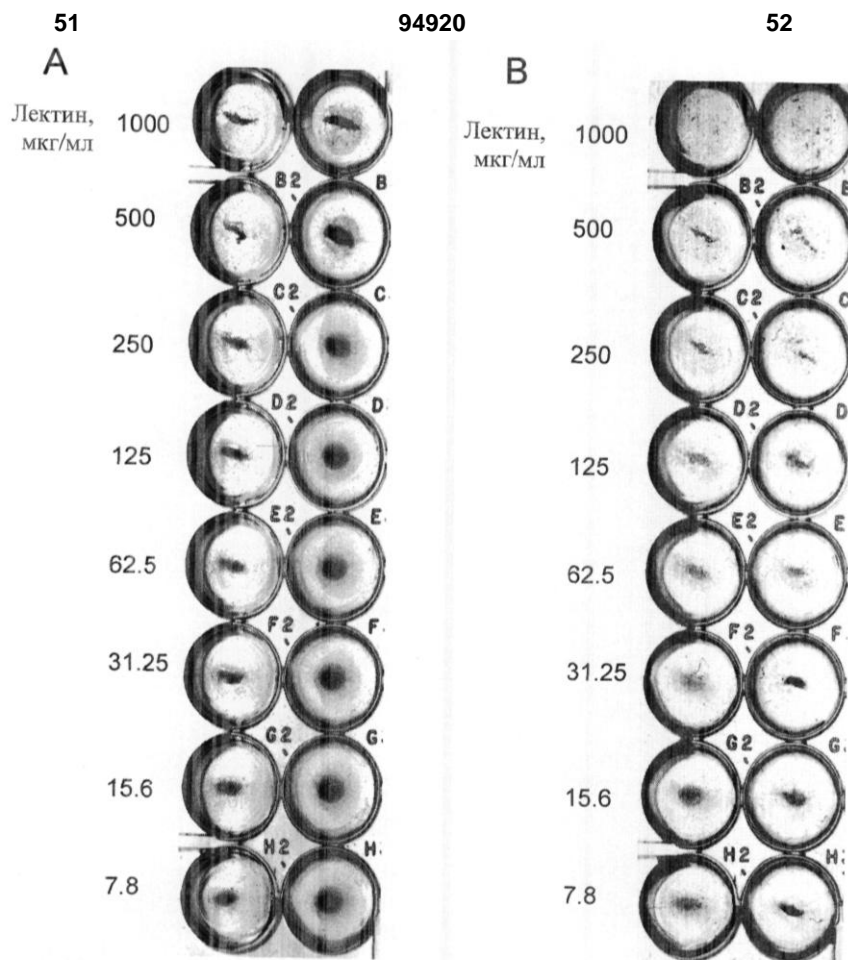
Фіг. 13



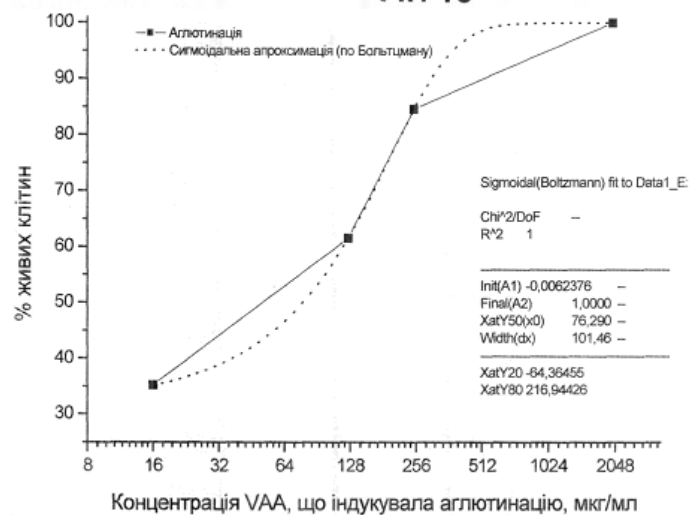
Фиг. 14



Фиг. 15



Фіг. 16



Фіг. 17

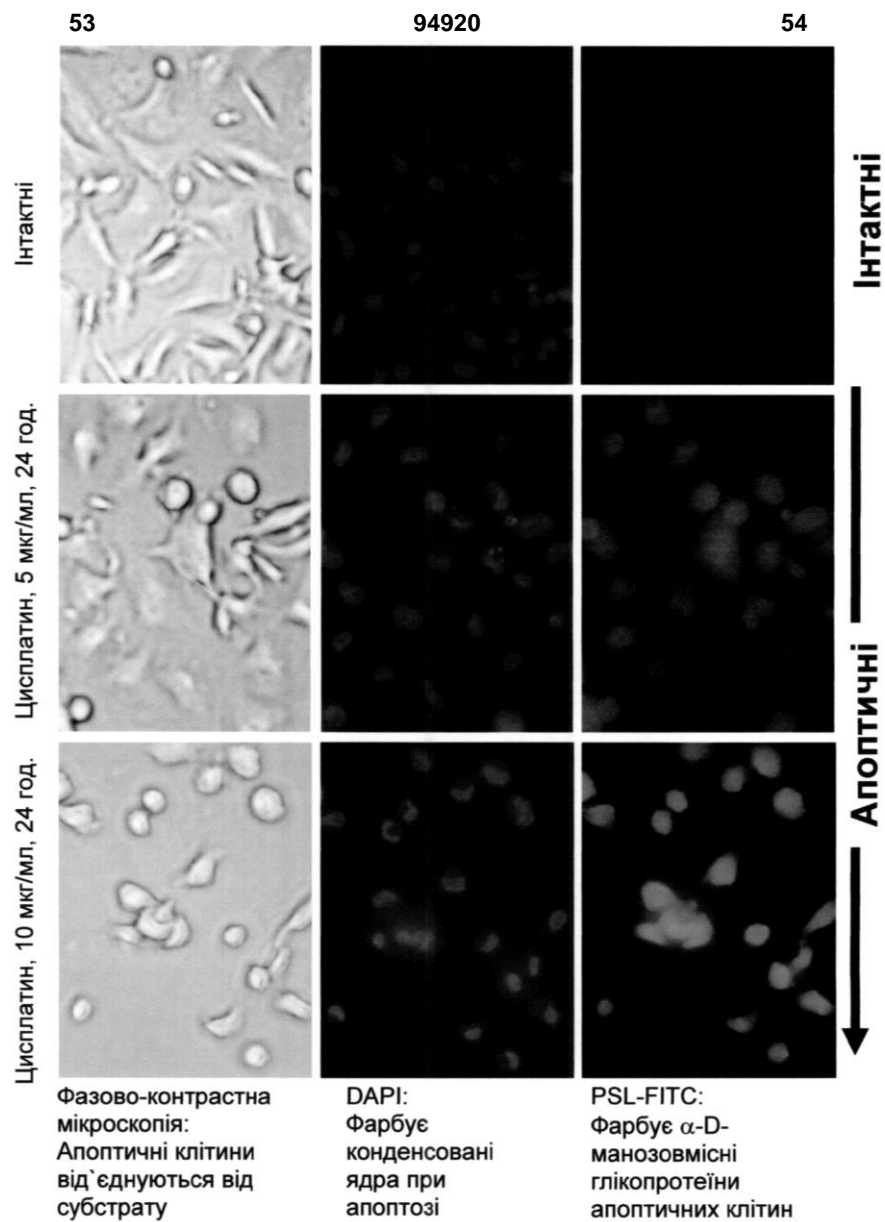


Fig. 18