



УКРАЇНА

(19) UA (11) 93816 (13) C2

(51) МПК

C12Q 1/34 (2011.01)

C12M 1/34 (2011.01)

G01N 21/64 (2011.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ НЕЙРАМІНІДАЗНОЇ АКТИВНОСТІ В КЛІТИНАХ ТА ВНУТРІШНЬОКЛІТИННИХ КОМПАРТМЕНТАХ

1

(21) a201003168

(22) 19.03.2010

(24) 10.03.2011

(46) 10.03.2011, Бюл.№ 5, 2011 р.

(72) БІЛИЙ РОСТИСЛАВ ОЛЕКСАНДРОВИЧ, ТО-  
МІН АНДРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, СТОЙКА РОСТИ-  
СЛАВ СТЕПАНОВИЧ

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ

(56) US 6555698 B1, 29.04.03.

WO 99/31280, 24. 06. 99.

UA25688 U, 10.08.07.

UA28546 U, 10.12.07.

Nakano V. et al. A rapid assay of the sialidase activity in species of the Bacteroides fragilis group by using peanut lectin hemagglutination. Anaerobe, 2006, 12, 238-41.

Warren L. Thiobarbituric acid assay of sialic acids. J.Biol.Chem., 1959. Volume 234, 1971-75.

Landolfi N. et al. Activation of T lymphocytes results in an increase in H-2-encoded neuraminidase. Immunogenetics, 1985, 22, 159-67.

Francois J. et al. Study of the lysosomes by vital stains in normal keratocytes and in keratocytes from macular dystrophy of the cornea. Invest Ophthalmol, 1976, 15, 599-605.

Nayak D.P. and Reichl U. Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus. J Virol. Methods, 2004, 122, 9-15 (abstract).

2

Warner T.G. and O'Brien J.S. Synthesis of 2'-(4-methylumbelliferyl)-alpha-D-N-acetylneuraminic acid and detection of skin fibroblast neuraminidase in normal humans and in sialidosis. Biochemistry, 1979, 18, 2783-87 (abstract).

UA 200814519 A, 26.01.09.

KR 20090031362 A, 25.03.09.

WO0029419 A1, 25.05.2000.

KR 20070062467 A, 15.07.07.

(57) 1. Спосіб виявлення нейрамінідазної активності в окремих клітинах та їх компартментах, який включає вирощування клітин, їх інкубацію з флуорогенним субстратом нейрамінідази, який **відрізняється** тим, що для дослідження компартментів клітинну мембрану роблять проникною (пермебілізують), детектують флуоресцентний продукт нейрамінідазної реакції за допомогою флуоресцентного мікроскопу, а рівень нейрамінідазної активності оцінюють за інтенсивністю флуоресценції хромогенного субстрату нейрамінідази в різних компартментах клітини.2. Спосіб виявлення нейрамінідазної активності в окремих клітинах та їх компартментах за п. 1, який **відрізняється** тим, що флуорогенним субстратом нейрамінідази є будь-яке похідне сілової кислоти та флуоресцентної сполуки, що може реєструватися за допомогою флуоресцентного мікроскопу з використанням оптимальної довжини хвиль збудження та емісії флуоресценції.

Винахід відноситься до галузі клітинної біології, вірусології, клінічної діагностики і може використовуватись для визначення клітинної локалізації ензиматичної активності еукаріотичних, прокаріотичних та вірусних нейрамінідаз.

Нейрамінідази (КФ 3.2.1.18) - це ензими, які належать до класу глікозилгідролаз, які каталізують відщеплення термінальних  $\alpha$ -глікозидзв'язаних залишків сілових кислот від глікопротеїнів та гліколіпідів, що є першим етапом у дегра-

дації таких глікокон'югантів. Вважається, що сілової кислоти (відомі також як нейрамінові кислоти) відіграють важливу роль у біологічних процесах через їх гідрофільність і кислотну реакцію, що впливає на фізико-хімічні властивості глікокон'югантів, у яких вони містяться.

Відомий спосіб виявлення нейрамінідазної активності вірусних клітин [Nakano, Fontes Piazza and Avila-Campos, A rapid assay of the sialidase activity in species of the Bacteroides fragilis group by using peanut lectin hemagglutination. Anaerobe,

(13) C2

(11) 93816

(19) UA

2006. 12.238-41], що базується на аглютинації людських еритроцитів лектином арахісу. Суть способу полягає в тому, що аглютинація відбувається внаслідок взаємодії лектину із субтермінальними залишками глікопротеїнів, які експонуються внаслідок дії нейрамінідази. Недоліком даного способу є його напів-кількісний характер та необхідність використання свіжо виділених клітин крові, що ускладнює умови аналізу та потребує забору крові для кожного аналізу.

Відомий також тіобарбітуровий спосіб [Warren, Thiobarbituric acid assay of sialic acids. *Methods in Enzymology*, 1963. Volume 6.463-465] виявлення нейрамінідазної активності в культурі бактерій чи зразках біологічних рідин, що базуються на періодатному окисненні сіалових кислот і наступній реакції з тіобарбітуровою кислотою. Даний спосіб використовувався у винаходах [Патент України UA25688 від 10.12.2007, МПК A61K31/44, Застосування 4-(n-бензил)амінокарбоніл-1-метилпіридинію йодиду (амізону) як інгібітора нейрамінідазної активності вірусу грипу; Патент України UA28546 від 10.08.2007, МПК A61P31/16. Застосування акридонів як інгібіторів нейрамінідазної активності вірусу грипу // Бюл.№12, 2007р.] для оцінки активності противірусних препаратів-інгібіторів нейрамінідази. Суть способу полягає в тому, що окиснена сіалова кислота, утворена під дією нейрамінідази, зв'язується з тіобарбітуровою кислотою з утворенням забарвленого продукту реакції. Недоліком даного способу є його низька специфічність, оскільки тіобарбітурова кислота здатна реагувати з цілим рядом сполук, зокрема альдегідами. Крім того, низькою є чутливість методу (детекція мг сіалової кислоти), що зумовлює необхідність використання великої кількості матеріалу для аналізу.

Відомий спосіб хемілюмінесцентного визначення нейрамінідазної активності [Патент США US6,555,698, від 29.03.2003, МПК C07D305/00, C07D321/00, C12N9/24, C12Q1/70, Chemiluminescent substrates for neuraminidase, assays for detection of neuraminidase and kits therefor], що базується на хімічній реакції нейрамінідази із хемілюмінесцентними похідними 1,2-диоксиетану. Суть способу полягає в тому, що реакція нейрамінідази із хемілюмінесцентними похідними 1,2-диоксиетану супроводжується вивільненням оптичної енергії, що детектується хемілюмінесцентними методами. Недоліком способу є необхідність використання складного обладнання для детекції хемілюмінесценції та можливість виявляти нейрамінідазу лише у зразку, що являють собою суміш речовин, клітин чи вірусних частинок, і неможливість виявляти нейрамінідазу в окремих клітинах.

Відомий спосіб флуоресцентного визначення нейрамінідазної активності в культурі бактерійних клітин [Potier, Mameli, Belisle, Dallaire and Melancon, Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl-alpha-D-N-acetylneuraminate) substrate. *Anal Biochem*, 1979. 94.287-96] та в культурі еукаріотичних клітин [Warner and O'Brien, Synthesis of 2'-(4-methylumbelliferyl)-alpha-D-N-acetylneuraminic acid

and detection of skin fibroblast neuraminidase in normal humans and in sialidosis. *Biochemistry*, 1979. 18.2783-7, Landolfi, Leone, Womack and Cook, Activation of T lymphocytes results in an increase in H-2-encoded neuraminidase. *Immunogenetics*, 1985. 22.159-67], що базується на хімічній реакції нейрамінідази із флуорогенними чи флуоресцентними сполуками, що утворюються внаслідок розщеплення нейрамінідазою відповідних попередників флуорогенних чи флуоресцентних сполук із їх наступним визначенням за допомогою флуорометра чи спектрофлуорометра; серед останньої групи найбільшу відтворюваність та чутливість забезпечує використання як субстрату 4-метилумбеліферил- $\alpha$ -D-N-ацетилнейрамінової кислоти (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid чи 4-MU-NANA) [Nayak and Reichl, Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus. *J Virol Methods*, 2004. 122.9-15]. Суть способу полягає в тому, що лізат клітин бактерійних чи еукаріотичних клітин або культуральне середовище, що містить бактерійні клітини, інкубують з флуорогенним похідним нейрамінової кислоти, розщеплення якого призводить до накопичення флуоресцентного продукту реакції, поява останнього свідчить про наявність нейрамінідазної активності. Недоліком даного способу є неможливість проведення аналізу на окремих клітинах чи їх компартментах, оскільки описаний метод вимагає процедури накопичення клітин чи вірусних частинок у зразку та їх подальшого руйнування шляхом лізису. При цьому можуть виникати операційні похибки на етапі руйнування клітин. Спосіб включає стадію накопичення субстрату в ході реакції - від 1 до 4 годин, для аналізу спосіб потребує використання флуорометра, метод є дорогим і вимагає спеціальних навичок персоналу.

Найбільш близьким за технічною суттю до запропонованого є спосіб виявлення нейрамінідазної активності у середовищах, що містять частинки вірусу грипу, де виявлення нейрамінідазної активності здійснюється шляхом забору популяції вірусних частинок із подальшим їх руйнуванням. Реакція виявлення нейрамінідазної активності здійснюється шляхом взаємодії дослідного зразка з флуорогенним субстратом нейрамінідази - 4-метил-умбеліферол нейрамінової кислоти; гідроліз останнього призводить до вивільнення флуоресцентного продукту - 4-метил-умбеліферолу, що детектується флуорометром, а нейрамінідазну активність оцінюють за інтенсивністю флуоресценції хромогенного субстрату нейрамінідази у зразку популяції клітин чи вірусних частинок [Міжнародна заявка WO 99/31280 від 18.12.1998, МПК C12Q1/70, G01N3/53, Screening assays for the detection and diagnosis of influenza virus // Опубл. 24.06.99]. Недоліком даного способу є неможливість проведення аналізу на окремих частинках вірусу грипу, спосіб вимагає процедури накопичення вірусних частинок у зразку і тривалого часу для проходження нейрамінідазної реакції і накопичення нейрамінідазного субстрату, що детектується. Для аналізу метод потребує використання флуорометра, метод є дорогим і вимагає спеціа-

льних навичок персоналу.

В основу винаходу поставлено завдання удосконалити спосіб виявлення нейрамінідазної активності в окремих клітинах та їх компартментах шляхом використання флуорогенного субстрату нейрамінідази - 4-метил-умбеліферол нейрамінової кислоти та флуоресцентного мікроскопу, що дозволить забезпечити швидку ідентифікацію нейрамінідазної активності на рівні окремих клітин та їх органел.

Поставлене завдання вирішується так, що у способі виявлення нейрамінідазної активності в окремих клітинах та їх компартментах, який включає вирощування клітин, інкубацію їх з флуорогенним субстратом нейрамінідази, згідно з винаходом, для дослідження компартментів поверхню клітин роблять проникною (пермебіалізують), детектують флуоресцентний продукт нейрамінідазної реакції за допомогою флуоресцентного мікроскопу, а нейрамінідазну активність оцінюють за інтенсивністю флуоресценції хромогенного субстрату нейрамінідази у різних компартментах клітини.

Спосіб виявлення нейрамінідазної активності в окремих клітинах та їх компартментах полягає в наступному. Авторами вперше для визначення нейрамінідазної активності запропоновано швидкий спосіб її виявлення на окремих клітинах та в клітинних компартментах, що базується на розщепленні нейрамінідазою флуорогенного субстрату із наступним виявленням флуоресцентного продукту реакції за допомогою флуоресцентного мікроскопу.

Клітини, на поверхні яких, чи у компартментах яких, необхідно визначити нейрамінідазну активність, попередньо вирощуються на покривних скельцях для мікроскопії (у випадку субстрат-залежних клітин) чи у суспензії у випадку суспензійних клітин. Клітини промиваються забуференим фізіологічним розчином (ЗФР, 100мл розчину містить 0,9г натрію хлориду) та поміщаються у розчин Рінгера (100мл розчину містить 0,9г натрію хлориду, 0,02г калію хлориду, 0,02г кальцію хлориду, 0,02г натрію гідрокарбонату), або ЗФР що містить 1мМ іонів кальцію, та додають 4-MU-NANA до кінцевої концентрації 15мікроМ. З метою виявлення нейрамінідазної активності у внутрішньоклітинних компартментах, клітини пермебіалізують, додаючи до зразку детергент NP-40 до кінцевої концентрації 0,01%. Готують тимчасовий препарат для мікроскопії і досліджують його за допомогою флуоресцентного мікроскопу за умов збудження флуоресценції при 350нм, чи близьких значеннях, та детектують нейрамінідазну активність за флуоресценцією при 450нм, чи близьких значеннях, - що відповідає максимумам збудження та емісії 4-метилумбеліферону. Для дослідження використовували мікроскоп Carl Zeiss AxioImagerAI обладнаний монохроматичною камерою Carl Zeiss AxioCam MRm (Carl Zeiss, Німеччина). Запропонований метод відрізняється від раніше описаних тим, що:

нейрамінідазну активність детектують на окремих клітинах чи їх компартментах, клітини поміщають в середовище, що містить

флуорогенний субстрат нейрамінідази,

нейрамінідазна активність виявляється за флуоресценцією 4-метилумбеліферолу, що детектується за допомогою флуоресцентного мікроскопу використовуючи відповідні довжини збудження (365нм) та емісії (450нм).

для виявлення нейрамінідазної активності у внутрішньоклітинних компартментах клітини поміщають у середовище що містить ноніл феноксил-поліетоксилетанол (Nonidet NP-40), або інший агент (детергент), що забезпечує проникність клітинної мембрани.

для виявлення нейрамінідазої активності потрібен короткий час інкубації - від 1 до 5хв.

На Фіг.1. зображено: А - визначення нейрамінідазної активності на клітинах лінії Jurkat лейкемії людини (інтактні та апоптичні, дія етопозиду імікроМ, 2год.) після інкубації у присутності флуорогенного субстрату нейрамінідази 4-MU-NANA упродовж 5хв. (детекція за допомогою флуоресцентної мікроскопії); апоптичні клітини характеризувались підвищеною нейрамінідазною активністю на поверхні клітин. Б - результати визначення нейрамінідазної активності на цих же клітинах здійсненого за допомогою флуорометричного методу. 1 - інтактні клітини, 2 - апоптичні клітини.

На Фіг.2. зображено клітини лінії L929 (фіброласти миші), які інкубували у присутності флуорогенного субстрату нейрамінідази 4-MU-NANA (синя флуоресценція), NP-40 для пермебіалізації клітин та виявлення нейрамінідазної активності у клітинних компартментах та маркера лізосом - акридинового оранжевого (червона флуоресценція). Клітини фотографували за допомогою високочутливої монохроматичної камери. Для візуалізації флуоресцентного сигналу зображення псевдо-зафарбовували відповідно до кольору емісії відповідного барвника. Ко-локалізацію сигналу лізосом (червоний сигнал) і нейрамінідазної активності (зелений сигнал) виявляли як жовтий сигнал (повна ко-локалізація). Кольори наведено лише для наочності, математичні обрахунки здійснюють використовуючи вихідні монохроматичні зображення. Результати аналізу ко-локалізації: Pearson's correlation  $R_r=0.822134$ ; Overlap coefficient  $R=0.839476$ , Co-localization ( $ch2>0$ )  $m1=0.949454$ , Co-localization ( $ch1>0$ )  $m2=0.700341$ .

Можливість реалізації способу показано на наступних прикладах.

Приклад 1. Виявлення нейрамінідазної активності на поверхні клітин.

Як модель використовували інтактні та апоптичні лімфоцити людини, в останніх нами було показано зростання нейрамінідазної активності на поверхні клітини.

Лімфоцити людини лінії Jurkat вирощували в середовищі RPMI-1640 (Flow Laboratories, Шотландія) в присутності декомплементованої сироватки крові великої рогатої худоби ("Sigma", США) і 50мкг/мл гентаміцину ("Sigma", США). Клітини пасажували через кожні два-три дні розведенням клітинної суспензії у співвідношенні 1:5 - 1:2. Клітини вирощували у зволоженій атмосфері при 37°C та 5% CO<sub>2</sub>. Клітини відмивали (в кінцевій концентрації 3 млн/мл) і поміщали в середовище,

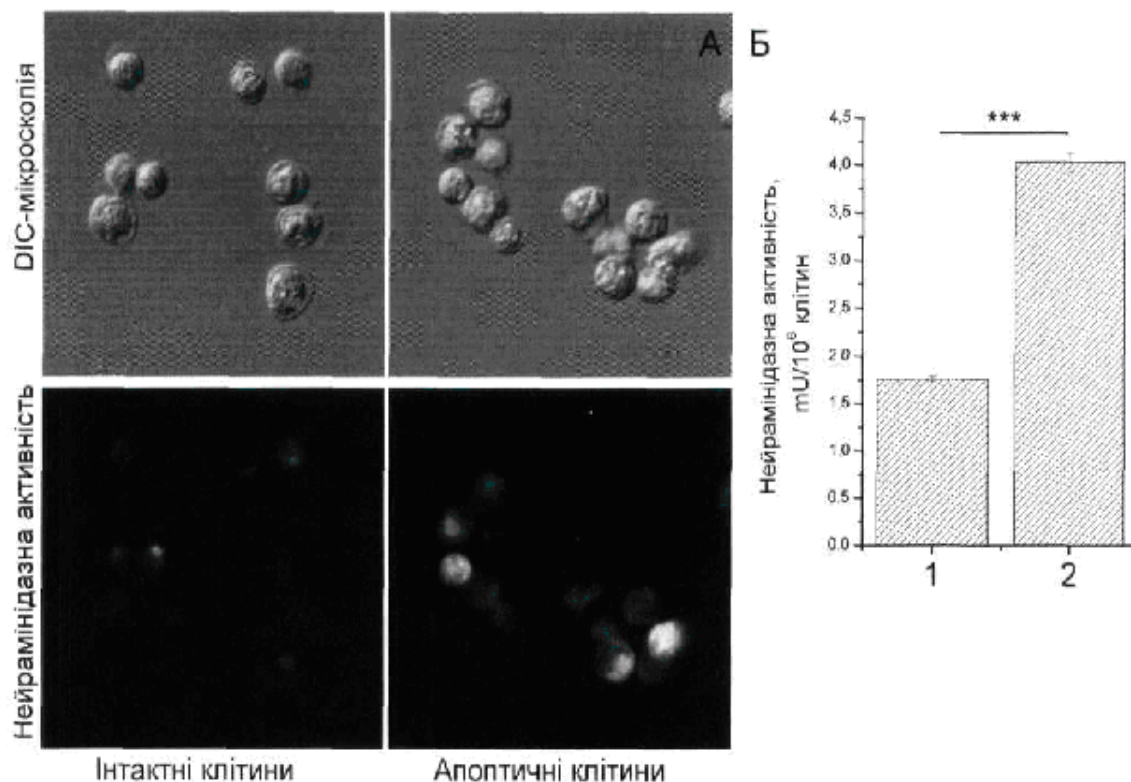
що містило 15 мікроМ 4-MU-NANA, та досліджували флуоресценцію 4-метилумбеліферолу - продукту нейрамінідазної активності - використовуючи збудження - 350нм, емісію - 450нм (Фіг.1). Як видно на Фіг.1, на поверхні апоптичних клітин відбувається зростання нейрамінідазної активності у порівнянні з інтактними клітинами, що описано нами [Bilyy, Antoniuk, Mayor, Hellman and Stoika, Detection and study of apoptotic cells by using glycobiological approaches. IX Український біохімічний з'їзд, 2006. 2.3-3], як незалежний контроль використовували визначення нейрамінідазної активності за допомогою спектрофлуориметричного методу [Potier, Mameli, Belisle, Dallaire and Melancon, Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl-alpha-D-N-acetylneuraminic acid) substrate. Anal Biochem, 1979. 94.287-96, Warner and O'Brien, Synthesis of 2'-(4-methylumbelliferyl)-alpha-D-N-acetylneuraminic acid and detection of skin fibroblast neuraminidase in normal humans and in sialidosis. Biochemistry, 1979. 18.2783-7], використовуючи даний метод, підтверджено зростання нейрамінідазної активності (Б).

Приклад 2. Виявлення нейрамінідазної активності у клітинних компартментах.

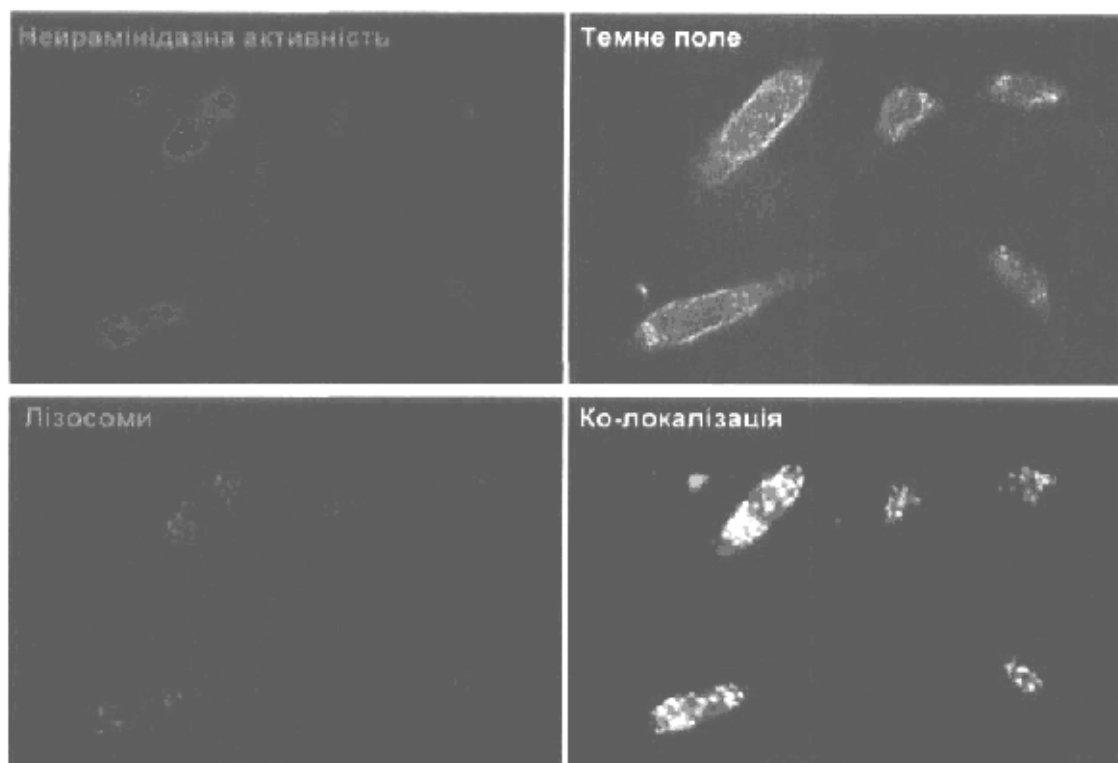
Як модель використовували мишачі фібробласти лінії L929; як відомо у лізосомах фібробластів локалізується нейрамінідаза [Meyer, Lemonnier and Bourrillon, Human liver neuraminidase. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1981. 103.1302-1309].

Фібробласти лінії L929 миші вирощували у середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (DMEM,

"Sigma", США) в присутності декомплементованої сироватки крові великої рогатої худоби ("Sigma", США) і 50мкг/мл гентаміцину ("Sigma", США). Клітини пасажували через кожні два-три дні. Клітини вирощували у зволоженій атмосфері при 37°C та 5% CO<sub>2</sub>. Клітини відмивали (в кінцевій концентрації 3млн/мл) і поміщали в середовище, що містило 15мікроМ 4-MU-NANA та 0,01% NP-40 для пермеабілізації клітинної поверхні, або інший пермеабілізуючий агент (нами було протестовано детергенти Tween-20, Triton X-100, NP-40 у різній концентрації і одержано найкращі результати для детергенту NP-40 в концентрації 0,01%). Досліджували флуоресценцію 4-метилумбеліферолу - продукту нейрамінідазної активності при збудженні 350нм, та емісії 450нм. (Фіг.2). Як видно на Фіг.2, нейрамінідазна активність виявляється в лізосомах, що підтверджено за допомогою додаткового фарбування лізосом акридинним оранжевим [Francois, Victoria-Troncoso, Maudgal and Victoria-Ihler, Study of the lysosomes by vital stains in normal keratocytes and in keratocytes from macular dystrophy of the cornea. Invest Ophthalmol, 1976. 15.599-605, Bjork, Peter, Lenner, Kagedal, Persson, Inganas and Jonasson, Conjugated polythiophene probes target lysosome-related acidic vacuoles in cultured primary cells. Mol Cell Probes, 2007. 21.329-37] та детекції флуоресценції останнього при збудженні 550нм та емісії 600-630нм. Аналіз колокалізації сигналу нейрамінідазної активності та сигналу лізосом, проведений за допомогою програмного забезпечення ImageJ, показав сильну кореляцію за Пірсоном, рівню 0,85.



Фіг. 1



Фіг. 2