© *Коллектив авторов, 2019*

Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В.

Цитометрическая оценка связывания лектинов с различными популяциями тимоцитов мыши

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» Минобрнауки России, 197376, г. Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Актуальность. Работа посвящена оценке возможности использования лектинов для типирования лимфоидных и нелимфоидных клеток тимуса, а также разделения тимоцитов на субпопуляции.

Материал и методы. В работе использованы 23 лектина, меченых флюоресцеинизотиоцианатом. Исследование проведено на тимоцитах 80 самок мышей линии CBA методом проточной цитометрии.

Результаты. Установлено, что ни один лектин не пригоден для идентификации нелимфоидных клеток тимуса, при этом результаты окрашивания лектинами подснежника и амариллиса практически точно соответствовали результатам использования антител к антигену CD45. Также ни один из лектинов не обеспечивал избирательного связывания с тимоцитами на любом из этапов их дифференцировки, хотя лектины виноградной улитки и белоцветника, но не арахиса, преимущественно связывались с незрелыми клетками.

Заключение. По-видимому, применение лектинов для типирования тимоцитов ограничивается областью сравнительной иммунологии и ветеринарии в случае отсутствия соответствующих моноклональных антител.

Ключевые слова: тимус; тимоциты; клетки стромы; субпопуляции тимоцитов; лектины; моноклональные антитела; проточная цитометрия

Статья поступила 02.08.2019. **Принята в печать** 16.10.2019.

Для цитирования: Серебрякова М.К., Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В. Цитометрическая оценка связывания лектинов с различными популяциями тимоцитов мыши. Иммунология. 2019; 40 (6): 41–49. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16006

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции
Полевщиков Александр Витальевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» Минобрнауки России, Санкт-Петербург, Россия
E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-3342-178X

Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Polevshchikov A.V.

Cytometric assessment of lectins binding to various populations of murine thymocytes

Institute of Experimental Medicine, Ministry of High Education and Science of the Russian Federation, 197376, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Background. The work is devoted to assessing the possibility of using lectins for typing lymphoid and non-lymphoid thymus cells, as well as the separation of thymocytes into subpopulations.

Material and methods. 23 FITC-labeled lectins were used in the work. The study was performed on thymocytes of 80 female CBA mice by flow cytometry.

Results. It was found that not one lectin is suitable for identification of non-lymphoid thymus cells, while the results of snowdrop (GNA) and amaryllis (HHA) lectin staining almost exactly corresponded to the results of using antibodies to the CD45 antigen. None of the lectins also provided selective binding to thymocytes at any of the stages of their differentiation, although the lectins of the Roman snail (HPA) and leucojum spring (LVA), but not peanuts (PNA), mainly associated with immature cells.

For correspondence
Polevshchikov Alexander V. – Dr. Sci., PhD, Professor, Head of the Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, Ministry of High Education and Science of the Russian Federation,
E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0002-3342-178X

Conclusion. Apparently, the use of lectins for typing thymocytes is limited to the field of comparative immunology and veterinary medicine in the absence of the corresponding monoclonal antibodies.

Keywords: thymus; thymocytes; stromal cells; subpopulations of thymocytes; lectins; monoclonal antibodies; flow cytometry

Received 02.08.2019. **Accepted** 16.10.2019.

For citation: Serebriakova M.K., Kudryavtsev I.V., Polevshchikov A.V. Cytometric assessment of lectins binding to various populations of murine thymocytes. Immunologiya. 2019; 40 (6): 41–9. doi: 10.24411/0206-4952-2019-16006

Funding. The study had no sponsor support.

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

Введение

Изменение поверхностного фенотипа в процессе дифференцировки играет ключевую роль в дальнейшей судьбе клетки. Исследование молекул, представленных на поверхности клеток, очень важно для понимания различных физиологических процессов, в том числе процесса созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов в тимусе. Однако если для человека и мыши в распоряжении исследователей имеется целый ряд коммерческих реагентов (моноклональных антител, МкАт), предназначенных для цитометрических и иммуногистохимических исследований, то переход практически к любому другому объекту сопряжен с существенными методическими трудностями.

В ходе созревания и дифференцировки тимоцитов изменяется не только состав белковых рецепторов и маркеров плазматической мембраны, но и ее углеводная компонента. Комплексные молекулы гликопротеинов и гликолипидов отвечают за разнообразные взаимодействия клетки и ее окружения [1]. Почти все ключевые молекулы, вовлеченные в реакции врожденного и приобретенного иммунитета, являются гликопротеинами, а такие процессы, как дифференцировка, активация и миграция, сопровождаются запрограммированным изменением состава углеводов на поверхности иммунокомпетентных клеток [2–4]. Углеводные компоненты молекул, задействованных в распознавании антигена, возможно, выполняют функцию позиционирования Т-клеточных рецепторов и молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС). Кроме того, углеводы способствуют стабилизации отдельных белковых молекул, ограждая их от действия протеаз [5, 6].

Формирование углеводных компонент клетки осуществляется за счет работы гликозилтрансфераз и гликозидаз – высокоспецифичных ферментов, избирательно модифицирующих углеводные структуры на поверхности клетки за счет добавления или удаления отдельных моносахаридов. Гены этих белков составляют более 1% всего генома, а их экспрессия четко регулируется в соответствии с клеточным метаболизмом, активацией, изменением микроокружения и возрастом [7, 8]

Исследование углеводных компонентов мембраны является очень важным шагом к пониманию многих процессов, происходящих в клетке. Одним из подходов к изучению изменения экспрессии тех или иных углеводных детерминант является использование широко распространенных в природе белков, получившим название лектинов, которые можно описать как углевод-связывающие белки или гликопротеины неиммунной природы, агглютинирующие или преципитирующие гликоконъюгаты, локализованные на клеточных поверхностях.

Как и при использовании антител, для визуализации связывания лектинов с молекулами-мишенями используются их конъюгаты с флюоресцентными красителями, ферментами (например, пероксидазой хрена), биотином, ферритином или частицами золота. При этом лектины могут использоваться при работе как с суспензиями клеток, так и с гистологическими срезами. Кроме того, благодаря способности лектинов к агглютинации, возможно их использование для выделения тех или иных популяций клеток [9].

Одним из первых лектинов, использованных для выделения различных популяций тимоцитов, был лектин арахиса (PNA). Данный лектин было предложено использовать для выделения популяции незрелых кортикальных тимоцитов, чувствительных к действию радиации и стероидных гормонов [10]. Для лектина соевых бобов (SBA) описано связывание с популяцией крупных бластов в субкапсулярной зоне тимуса [11], а также с В-лимфоцитами мыши [12].

Для типирования разных популяций тимоцитов также использовали лектины бузины черной (SNA) и акации амурской (MAA), специфичные к различным сиаловым кислотам (NeuNAc α2,6-Gal и NeuNAc α2,3-Gal) [13]. С помощью лектиногистохимии было показано, что тимоциты, окрашенные лектином SNA, располагаются преимущественно в центральной части кортекса. Единичные позитивные по SNA клетки обнаруживаются также в медулле и на кортикально-медуллярной границе. Позитивные по лектину амурской акации (MAA) клетки, напротив, сконцентрированы в медулле и в небольшом количестве присутствуют на границе с кортексом.

До разработки и повсеместного внедрения технологии МкАт лектины различной углеводной специфичности широко использовались для изучения углеводных детерминант, присутствующих на поверхности клеток тимуса на различных стадиях их созревания, и гликопротеинов, в состав которых они входят. Кроме того, разрабатывались методики использования различных лектинов для типирования клеток тимического микроокружения и исследования влияния лекарственных препаратов на структуру гликокаликса клеток тимуса [14–18]. В настоящее время в практике медико-биологических исследований лектины используются нечасто, однако для разработки методов типирования субпопуляций тимоцитов в рамках сравнительно-иммунологических и ветеринарных исследований они могут быть по-прежнему пригодны. Другой актуальной задачей является оценка эффективности использования лектинов по сравнению с МкАт в проточной цитометрии как наиболее распространенном методе типирования клеточных популяций в современной иммунологии. В связи с этим **целью** данной работы стало изучение взаимодействия лектинов с различными популяциями тимоцитов и возможности их использования для типирования клеток тимуса и идентификации клеток стромы в ходе цитометрического анализа.

Материал и методы

Животные. В качестве объектов исследования были использованы самки мышей линии CBA массой 18–20 г, полученные из питомника «Рапполово», в количестве 80 шт. Животных содержали в стандартных условиях по температуре и освещенности при неограниченном доступе к воде и пище. Условия содержания, экспериментальной работы и вывода животных из эксперимента полностью соответствовали Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986) и российскому законодательству (ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» от 01.07.2016).

Лектины. В работе исследовали 23 лектина различной углеводной специфичности. Все меченые флюоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) лектины в растворе (табл. 1) были приобретены у НПК «Лектинотест» (Украина).

Выделение тимоцитов и пробоподготовка. Тимусы мышей выделяли после цервикальной дислокации и с помощью гомогенизатора Поттера немедленно получали клеточную суспензию. Индивидуальные клеточные суспензии фильтровали через нейлоновый фильтр и дважды отмывали избытком 0,14 М раствора NaCl, забуференного фосфатами, pH 7,2–7,4 (забуференный физиологический раствор, ЗФР) путем центрифугирования при 330g в течение 8 мин при охлаждении до 15 °C. Клеточный осадок ресуспендировали и переводили в 3 мл ЗФР.

Для оценки возможности связывания различных лектинов с популяциями тимоцитов к 100 мкл суспензии клеток добавляли по 10 мкл раствора лектина, получая финальную концентрацию лектина 50 мкг/мл. Затем в пробы добавляли МкАт против мышиных антигенов CD4 (меченые PE/Cy5, clone GK1.5), CD8 (меченые PE/Cy7, clone 53-6.7) и CD45 (меченые APC/Cy7, clone 30-F11; все МкАт производства BioLegend, США). Окраску антителами производили в соответствие с инструкцией производителя в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Контрольную пробу окрашивали только антителами без добавления лектинов. После окрашивания образцы отмывали избытком ЗФР с добавлением 2% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург), полученный осадок ресуспендировали в 300 мкл ЗФР и анализировали на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов анализировали не менее 30000 одиночных клеток, исключая из анализа клеточные агрегаты. Полученный по итогам цитометрического учета результат выражали числом процентов позитивных по лектину тимоцитов каждой популяции.

Статистические методы. В работе применяли следующие статистические методы: вычисление средних арифметических и ошибки среднего, определение нормальности распределения по критерию Колмогорова-Смирнова. Сравнение выборок производили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Обработку данных вели при помощи пакета программ и приложений Microsoft Office

Таблица 1. Использованные в работе лектины и их специфичность

Лектин из…	Международное обозначение	Лигандная специфичность
коры акации желтой	CABA	DGalNAc
канавалии мечевидной	ConA	αDMan/αDGlc
крокуса	CVA	αDMan
подснежника	GNA	αDMan
амариллиса	HHA	αDMan
виноградной улитки	HPA	αDGalNAc
коры бобовника анагиролистного	LABA	αLFuc
семян лимской фасоли	LBA	DGalNAc
семян чечевицы	LCA	αDMan/αDGlc
белоцветника весеннего	LVA	αDMan/αDGlc
банана	MBA	αDMan
нарцисса	NPA	αDMan
семян фасоли	PHA-E	βGlcNAc
купены многоцветной	PMRA	αDMan
семян арахиса	PNA	βDGal
семян гороха	PSA	αDMan/αDGlc
семян клещевины	RCA	βDGal
коры бузины черной	SNA	NeuNAc
коры бузины красной	SRA	NeuNAc
клубней картофеля	STA	DGlcNAc
корня крапивы	UDA	DGlcNAc
омелы белой	VAA	βDGal
зародышей пшеницы	WGA	DGlcNAc

Примечание. *Gal – галактоза; Glc – глюкоза; Man – манноза; NAc.*

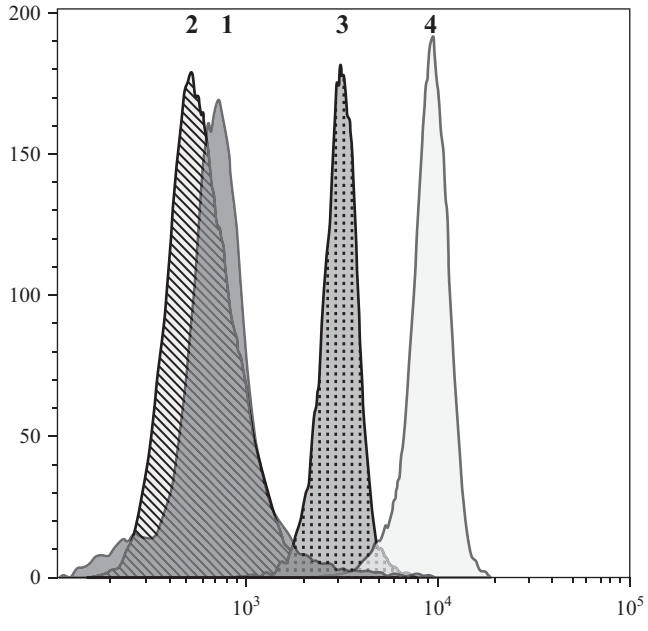

Рис. 1. Связывание лектинов подснежника (GNA), амариллиса (HHA) и омелы белой (VAA) с CD45$^+$-клетками тимуса мыши

По оси абсцисс – интенсивность флюоресценции лектинов, конъюгированных с ФИТЦ, усл. ед., по оси ординат – количество клеток. 1 – неокрашенный образец; 2 – клетки; окрашенные VAA; 3 – клетки, окрашенные HHA; 4 – клетки, окрашенные GNA.

Excel (Microsoft, США). Во всех экспериментах различия между контролем и опытом считались статистически достоверными только для $p < 0,05$.

Результаты

Оценка возможности использования лектинов для идентификации клеток стромы тимуса мыши. Анализ связывания лектинов с различными клетками тимуса показал, что ни один из лектинов использованной панели не окрашивает клетки стромы, негативные по маркеру CD45, и, следовательно, не может быть использован для их идентификации (табл. 2). Количество позитивных по лектину клеток стромы для всех лектинов, кроме лектина зародышей пшеницы (WGA), не достигает 1% от общего количества проанализированных клеток. Клетки стромы, позитивные по лектину WGA, составляют лишь 4,9±2,2% от общего количества тимоцитов при контрольном значении негативных по CD45 клеток, равном 19,0±0,3%, что ведет к достоверности отличий от контроля ($t = 6,3$, $p < 0,001$).

Количество клеток лимфоидного ряда (CD45$^+$), демонстрирующих флюоресценцию по зеленому каналу (лектин-ФИТЦ), сильно варьирует. Если для лектинов банана (MBA) и омелы белой (VAA) число связавших лектин клеток не превышает 1%, то для лектинов подснежника (GNA) и амариллиса (HHA) оно равно, соответственно, 83,6±5,5% и 83,3±4,4%, что достоверно не отличается от контроля (% CD45$^+$) и указывает на возможность использования этих лектинов для типирования тимоцитов мыши (рис. 1). Менее выраженное, но все же заметное связывание демонстрируют лектины арахиса – 66,4±3,1%, виноградной улитки – 44,8±5,7%, зародышей пшеницы – 28,0±4,9%, а также лектины коры бузины красной – 15,3±7,2% и крокуса – 12,3±2,4%. Для остальных лектинов количество связавшихся с ними тимоцитов варьирует в диапазоне от 2,5 до 8,5%, что при контрольном значении CD45$^+$-клеток, равном 81,1±0,3%, указывает на выявление этими лектинами лишь небольшой части популяции лимфоидных клеток тимуса и нецелесообразность использования этих белков для типирования тимоцитов мыши (см. табл. 2).

Оценка возможности использования лектинов для разделения CD45$^+$-клеток тимуса мыши на субпопуляции. Данные, полученные в результате совместного окрашивания тимоцитов мыши лектинами и антителами к антигенам CD4 и CD8, приведены в табл. 3. Из приведенных результатов видно, что практически все лектины в разной степени взаимодействуют с тимоцитами всех основных популяций, однако количество позитивных по лектинам клеток различных популяций сильно варьирует.

Лектин подснежника (GNA) демонстрирует максимально близкое к контролю связывание со всеми популяциями тимоцитов мыши (см. табл. 3). В литературе не удалось найти других свидетельств использования этого лектина для типирования тимоцитов мыши и проявленного им свойства к связыванию всех CD45$^+$-клеток тимуса, и хотя данный результат полностью совпадает с данными табл. 2, он требует дополнительной экспериментальной проверки. Весьма схожие с GNA свойства показал лектин амариллиса (HHA). Другой интересной находкой стало свойство лектина банана (MBA) связываться со значительной частью субпопуляции DN [double negative cells – дважды негативные (CD4$^-$CD8$^-$) незрелые тимоциты] при низком связывании с другими субпопуляциями. Однако на долю DN приходится всего около 1% всей популяции CD45$^+$-тимоцитов, в то время как на долю субпопуляции DP [double positive cells – дважды позитивные (CD4$^+$CD8$^+$) тимоциты] приходится около 90% от числа CD45$^+$-тимоцитов, связывание всего с 7,1±1,7% субпопуляции DP способно полностью замаскировать меченые MBA DN-тимоциты, что ставит под вопрос возможность использования лектина банана для идентификации самых незрелых клеток тимуса мыши (см. табл. 3).

Отдельного внимания заслуживают лектины арахиса (PNA) и виноградной улитки (HPA) как многократно упомянутые ранее в литературе инструменты для типирования лимфоцитов [19]. Несмотря на различную лигандную специфичность (αDMan в случае GNA и βDGal в случае PNA), лектин арахиса во многом повторяет характер связывания, описанный выше для лектина подснежника, за исключением взаимодействия с меньшей долей DP, поэтому потенциально при-

Таблица 2. Взаимодействие лектинов с лимфоидными ($CD45^+$) и нелимфоидными ($CD45^-$) клетками тимуса, % от общего количества клеток, X ± s, $n \geq 8$ по каждой точке

Лектин	$CD45^+$-тимоциты	$CD45^-$-тимоциты
Без лектина	81,1±0,3	19,0±0,3
CABA	8,4±2,9	0,8±0,2
ConA	4,7±1,6	0,2±0,1
CVA	12,3±2,4	0,1±0,1
GNA	83,6±5,5	0,6±0,1
HHA	83,3±4,4	0,4±0,1
HPA	44,8±5,7	0,3±0,1
LABA	4,6±1,5	0,2±0,1
LBA	5,2±2,0	0,3±0,1
LCA	3,7±0,6	0,3±0,1
LVA	3,2±1,3	0,3±0,1
MBA	1,0±0,1	0,3±0,2
NPA	6,4±2,8	0,2±0,1
PHA-E	7,3±1,7	0,6±0,3
PMRA	2,5±0,7	0,1±0,1
PNA	66,4±3,1	0,5±0,1
PSA	5,0±1,2	0,1±0,1
RCA	4,9±1,3	0,2±0,1
SNA	7,2±2,5	0,4±0,1
SRA	15,3±7,2	0,4±0,2
STA	3,4±0,6	0,2±0,1
UDA	4,8±1,3	0,3±0,1
VAA	0,6±0,3	0,1±0,1
WGA	28,0±4,9	4,9±2,2

***Примечание**. Здесь и в табл. 3: серый фон ячеек – случаи отсутствия достоверных различий от окрашивания МкАт (без лектинов); $p > 0,05$.*

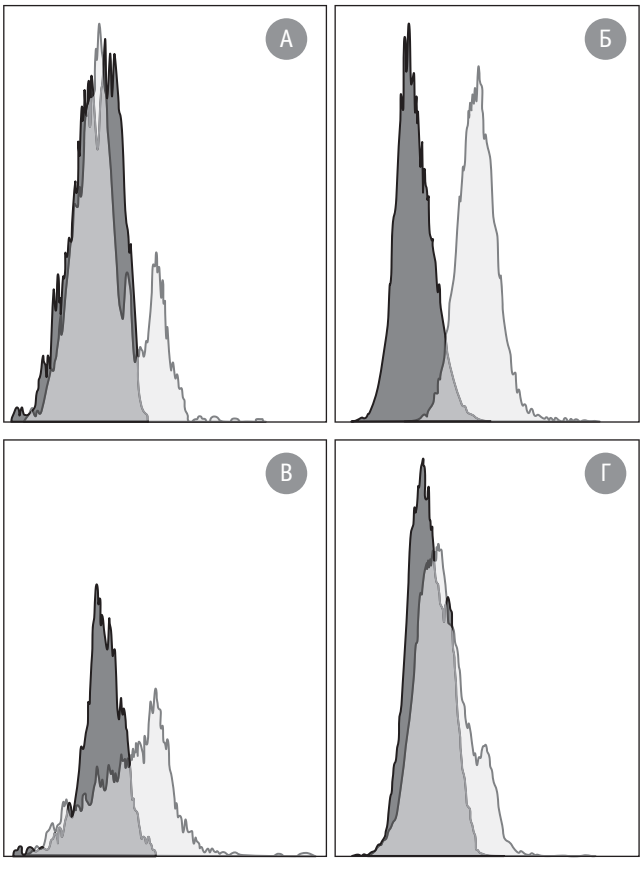

Рис. 2. Связывание лектина виноградной улитки (HPA) с разными популяциями тимоцитов мыши

По оси абсцисс – интенсивность флюоресценции HPA, конъюгированного с ФИТЦ, усл. ед.; по оси ординат – количество клеток. А – $CD4^-CD8^+$-тимоциты; Б – $CD4^+CD8^+$-тимоциты; В – $CD4^-CD8^-$-тимоциты; Г – $CD4^+CD8^-$-тимоциты. Светлый пик – клетки, окрашенные HPA; темный пик – биологический контроль – клетки, окрашенные VAA, показавшим фоновое связывание (см. рис. 1).

годен для идентификации и выделения $CD45^+$-клеток, но не для разделения тимоцитов на субпопуляции. Несколько иной характер связывания обнаружен для лектина виноградной улитки HPA: за счет слабого связывания с обеими субпопуляциями SP-тимоцитов (single positive cells – позитивные по CD4 или по CD8 зрелые тимоциты) он может выявлять суммарную фракцию DN и DP при очень небольшой примеси обеих субпопуляций SP (рис. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что PNA и HPA потенциально могут быть использованы для идентификации незрелых $CD45^+$-клеток тимуса.

Для всех остальных лектинов процент связывания с клетками различных популяций варьировал в достаточно широком диапазоне, однако можно проследить общую закономерность: как правило, объем связанной лектинами доли субпопуляции для DN-тимоцитов гораздо выше, чем для DP-тимоцитов (см. табл. 3). Более того, на основании приведенных результатов можно утверждать, что лектины потенциально пригодны для выявления незрелых (DN и DP) тимоцитов, но ни один из использованных лектинов не связывается с популяциями зрелых SP-тимоцитов сильнее, чем с незрелыми клетками. Этот факт наряду с очень слабым связыванием лектинов с высокоспециализированными нелимфоидными $CD45^-$-клетками стромы (см. табл. 2) позволяет предполагать, что по мере специализации любых тимоцитов (лимфоидных и нелимфоидных) плотность гликокаликсовых структур на клетке снижается.

Одним из немногих лектинов, который почти избирательно связывается с одной из субпопуляций тимоцитов, является лектин белоцветника LVA: он при фоновом связывании с тремя субпопуляциями обладает слабым, но все же выраженным связыванием с DP-клетками. Наконец, интересным свойством обладает лектин зародышей пшеницы WGA, который также упоминался в литературе как возможный инструмент для выделения субпопуляций Т-лимфоцитов [19]. Он выявляет практически всю популяцию DN, а также $CD8^+$-SP на том же уровне, что и соответствующие МкАт

Таблица 3. Связывание лектинов (lectin$^+$) с различными CD45$^+$-популяциями тимоцитов мыши, % от общего числа CD45$^+$-тимоцитов, X ± s, $n \geq 4$ по каждой точке

Лектин	DN	DP	CD4$^+$	CD8$^+$
Без лектинов	1,1±0,1	89,2±0,6	7,2±0,6	1,2±0,3
CABA	0,2±0,1	6,1±1,2	0,8±0,3	0,2±0,1
ConA	0,4±0,1	5,2±1,9	0,7±0,3	0,2±0,1
CVA	0,4±0,1	10,8±4,3	1,0±0,3	0,2±0,1
GNA	1,0±0,3	89,4±0,8	6,0±0,6	1,0±0,1
HHA	0,8±0,3	79,3±3,6	8,7+2,2	1,0±0,2
HPA	0,8±0,1	57,0±12,4	2,2±0,5	0,3±0,1
LABA	0,2±0,1	7,4±2,2	0,9±0,3	0,2±0,1
LBA	0,1±0,1	4,3±0,9	0,6±0,1	0,1±0,1
LCA	0,1±0,1	2,1±0,6	0,3±0,1	0,1±0,1
LVA	0,1±0,1	0,7±0,3	0,1±0,1	0,1±0,0
MBA	0,8±0,3	7,1±1,7	1,7±0,5	0,4±0,2
NPA	0,1±0,1	2,0±0,6	0,1±0,1	0,0±0,0
PHA-E	0,6±0,1	10,4±3,1	1,3±0,3	0,3±0,1
PMRA	0,2±0,1	2,8±0,5	0,3±0,1	0,1±0,1
PNA	1,1±0,1	75,9±2,4	4,5±1,1	0,7±0,1
PSA	0,5±0,2	6,0±2,2	1,0±0,2	0,2±0,1
RCA	0,4±0,2	12,8±3,3	0,9±0,2	0,2±0,1
SNA	0,4±0,1	26,7±19,6	2,8±1,8	0,3±0,1
SRA	0,5±0,1	15,8±4,7	1,2±0,4	0,2±0,1
STA	0,1±0,1	2,7±0,8	0,4±0,1	0,1±0,1
UDA	0,3±0,1	4,0±1,2	0,9±0,3	0,2±0,1
VAA	0,1±0,1	1,3±1,0	0,2±0,2	0,1±0,1
WGA	0,9±0,2	34,6±4,0	3,3±0,7	0,6±0,2

(см. табл. 3), однако и в этом случае заметное связывание с самыми многочисленными DP-тимоцитами (около 35%) резко снижает возможности практического применения лектина зародышей пшеницы (рис. 3).

Обсуждение

Полученные в ходе работы результаты во многом подтверждают данные литературных источников. Так, в работе Balcan и соавторов показано, что лектин подснежника равномерно окрашивает тимоциты мыши, расположенные как в кортексе, так и в медулле [20]. Проведенные нами исследования также показывают, что с лектином подснежника связываются практически все клетки тимуса, имеющие лимфоидное происхождение, что позволяет использовать данный лектин для выделения лимфоцитов тимуса (см. табл. 3). При этом заслуживает внимания тот факт, что, согласно имеющимся в литературе данным, оба вышеуказанных лектина не окрашивают лимфоидные клетки тимуса куриных эмбрионов [21].

На основании приведенных результатов можно предполагать, что еще как минимум два исследуемых лектина могут быть пригодны для типирования различных популяций тимоцитов. При этом если лектин арахиса окрашивает все субпопуляции CD45$^+$-клеток, то для лектина виноградной улитки подтверждаются литературные данные о преимущественном связывании с тимоцитами на ранних стадиях созревания, имея в виду суммарную популяцию DN и DP (см. табл. 3 и [22]).

Впервые получен результат, согласно которому для идентификации DP-клеток может применяться αDMan/αDGlc-специфичный лектин белоцветника весеннего (LVA). С учетом очень большого числа МкАт против антигенов CD4 и CD8 человека и мыши на рынке, после проведения дополнительных исследований данный лектин потенциально может найти свое применение при изучении структуры популяций тимоцитов рыб, земноводных, рептилий, а также сельскохозяйственных животных в отсутствие доступных коммерческих моноклональных антител.

Еще одной интересной находкой представляется получение свидетельств наличия более плотных и разнообразных структур гликокаликса на созревающих клетках и уменьшение его углеводного разнообразия (но не плотности гликокаликса и заряда на нем) при переходе к зрелым SP-тимоцитам (см. табл. 3). Методом проточной цитометрии с использованием панели лектинов этот факт показан впервые. Не исключено, что это справедливо и для нелимфоидных клеток стромы тимуса (см. табл. 2). Здесь речь может идти об общем случае, справедливом для различных клеток тканей внутренней среды. Изменения состава гликокаликса обычно сопровождают все процессы созревания и дифференцировки, активации и гибели клетки в норме и при патологии и могут выявляться при помощи лектинов разной

углеводной специфичности. Гликокаликс тимоцитов играет важную роль в процессах их распознавания стромальными клетками и в первую очередь, макрофагами, ответственными за элиминацию погибающих в ходе селекции клеток. Литература дает основания предполагать справедливость такого обобщения [11, 23, 24].

При аутоиммунных заболеваниях увеличивается количество эффекторных Т-клеток, несущих на своей поверхности терминальные NAcGal и Galβ(1-4)NAcGlc [25–27]. Например, GalNAc-T1-трансфераза, использующая в качестве акцепторного субстрата негликозилированные пептиды, наиболее активна в незрелых тимоцитах кортекса, а в медуллярных тимоцитах также появляется GalNAc-T2-трансфераза, способная продуцировать *de novo* дисахаридные О-гликопептиды [28, 29].

Важным семейством углеводов, вовлеченных в процесс созревания тимоцитов, являются сиаловые кислоты (NeuNAc). Чаще всего производные нейраминовой кислоты располагаются в терминальных положениях и, благодаря отрицательному заряду, оказываются задействованными в процессах распознавания, миграции и других межклеточных взаимодействиях. Кроме того, сиаловые кислоты маскируют гликаны, лежащие в гликокаликсе ниже, и таким образом блокируют связывание с ними эндогенных лектинов, выполняя важную регуляторную функцию [30].

Сиалотрансфераза ST3Gal I вовлечена в процесс созревания тимоцитов, поскольку является одним из факторов выживания Т-клеток. Отсутствие ее экспрессии приводит к повышению уровня апоптоза и заметному снижению количества $CD8^+$-Т-клеток на периферии [31]. С ее помощью осуществляется сиалирование О-гликанов на маркерах дифференцировки Т-клеток CD45 и CD8, а ее отсутствие может влиять на способность корецептора CD8 связываться с комплексом антиген/MHC на поверхности антиген-презентирующей клетки [32]. Другая сиалотрансфераза тимоцитов – C2GnT – экспрессируется на стадиях DN и DP. В клетках субкапсулярной зоны ее активность подавляется ST3Gal I [33].

Заключение

Использование проточной цитометрии лишь частично подтвердило возможность применения меченых лектинов для типирования тимоцитов мыши. Ни один из лектинов не обеспечивал избирательного окрашивания клеток стромы тимуса, при этом результаты окрашивания лектином подснежника (GNA) и лектином амариллиса (HHA) практически точно соответствовали результатам применения МкАт к антигену CD45. Также ни один из лектинов не обеспечивал избирательного связывания с клетками на любом из этапов дифференцировки тимоцитов (DN, DP, $CD4^+$-SP, $CD8^+$-SP). Лишь один лектин белоцветника (LVA) преимущественно связывался с популяцией DP-тимоцитов, хотя связывание было очень слабым и затрагивало не

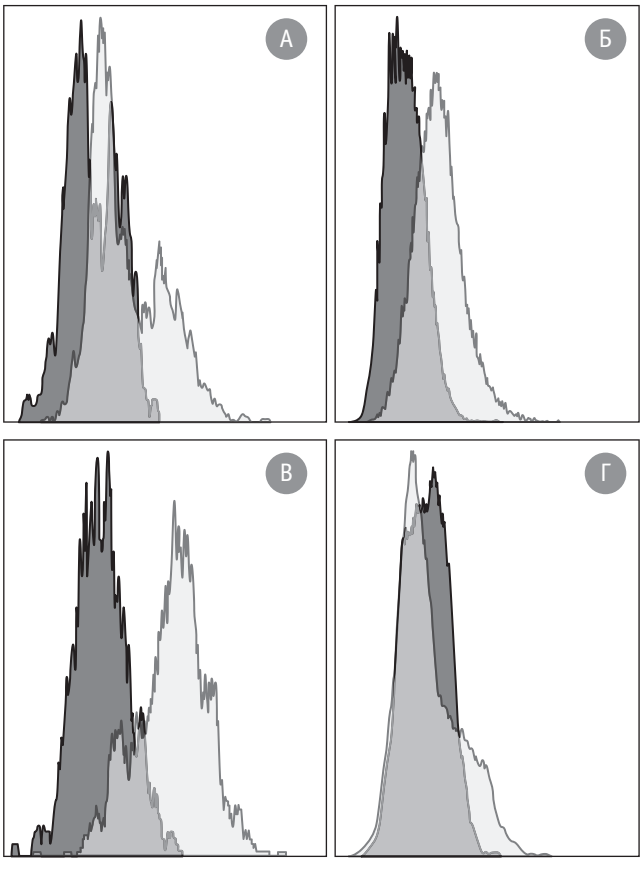

Рис. 3. Связывание лектина зародышей пшеницы (WGA) с разными популяциями тимоцитов мыши

По оси абсцисс – интенсивность флюоресценции WGA, конъюгированного с ФИТС, усл. ед., по оси ординат – количество клеток. А – $CD4^-CD8^+$-тимоциты, Б – $CD4^+CD8^+$-тимоциты, В – $CD4^-CD8^-$-тимоциты, Г – $CD4^+CD8^-$-тимоциты. Светлый пик – клетки, окрашенные WGA, темный пик – биологический контроль (см. подпись к рис. 2).

более 1% от всей субпопуляции DP. Частично подтвердились литературные данные о возможности использования лектинов арахиса (PNA) и виноградной улитки (HPA) для типирования тимоцитов: лектин арахиса связывает все DN-клетки, а лектин виноградной улитки преимущественно взаимодействует с незрелыми (DN и DP) тимоцитами. По-видимому, применение лектинов для типирования тимоцитов ограничивается областью сравнительной иммунологии и ветеринарии в случае отсутствия соответствующих моноклональных антител.

Вклад авторов. Сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста Серебрякова М.К. Концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка данных – Кудрявцев И.В. Концепция и дизайн исследования, редактирование и утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – Полевщиков А.В.

■ Литература

1. Sharon N., Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology. 2004; 14 (11): 53R–62R. doi: 10.1093/glycob/cwh122.

2. Comelli E.M., Sutton-Smith M., Yan Q., Amado M., Panico M., Gilmartin T. et al. Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. J. Immunol. 2006; 177 (4): 2431–40. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2431.

3. Daniels M.A., Hogquist K.A., Jameson S.C. Sweet'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. Nat. Immunol. 2002; 3 (10): 903–10. doi: 10.1038/ni1002-903.

4. Morgan R., Morgan R., Gao G., Pawling J., Dennis J.W., Demetriou M. et al. N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. J. Immunol. 2004; 173 (12): 7200–8. doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7200.

5. Bromley Sh.K., Burack W.R., Johnson K.G., Somersalo K., Sims T.N., Sumen C. et al. The immunological synapse. Ann. Rev. Immunol. 2001; 19 (1): 375–96. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.375.

6. Wormald M.R., Stanfield R.L., Huang M., Mattsson N., Speir J.A., DiGennaro J.A. et al. Roles for glycosylation of cell surface receptors involved in cellular immune recognition. J. Mol. Biol. 1999; 293 (2): 351–66. doi: 10.1006/jmbi.1999.3104.

7. Ohtsubo K., Marth J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell. 2006; 126 (5): 855–67. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.019.

8. Степаненко Р.Н., Львов В.Л., Андреев И.В., Новикова Е.М., Козырева О.В., Разваляева Н.А. и др. В(1-6)-D-глюкан из плодового тела гриба Lentinus edodes: структура и иммунобиологические свойства. Иммунология. 2019; 40 (4): 13–22.

9. Reisner Y., Sharon N. Cell fractionation by lectins. Trends Biochem. Sci. 1980; 5 (2): 29–31. doi: 10.1016/s0968-0004(80)80090-9.

10. Reisner Y., Linker-Israeli M., Sharon N. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. Cell. Immunol. 1976; 25 (1): 129–34. doi: 10.1016/0008-8749(76)90103-9.

11. Raedler A., Raedler E., Becker W.M., Arndt R., Thiele H.G. Subcapsular thymic lymphoblasts expose receptors for soy bean lectin. Immunology. 1982; 46 (2): 321–8.

12. Nakano T., Oguchi Y., Imai Y., Osawa T. Induction and separation of mouse helper T cells by lectins. Immunology. 1980; 40 (2): 217–22.

13. Alvarez G., Lascurain R., Pérez A., Degand P., Montaño L.F., Martinez-Cairo S. et al. Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. Immunol. Invest. 1999; 28 (1): 9–18. doi: 10.3109/08820139909022719.

14. Balcan E., Gümüş A., Şahin M. The glycosylation status of murine postnatal thymus: a study by histochemistry and lectin blotting. J. Mol. Histol. 2008; 39 (4): 417–26. doi: 10.1007/s10735-008-9180-3.

15. Fernandez J.G., Sanchez A.J., Melcon C., Chamorro C.A., Garcia C., Paz P. Development of the chick thymus microenvironment: a study by lectin histochemistry. J. Anat. 1994; 184 (Pt 1): 137–45.

16. Gheri G., Gheri Bryk S., Riccardi R., Sgambati E., Cirri Borghi M.B. The glycoconjugate sugar residues of the sessile and motile cells in the thymus of normal and Cyclosporin-A-treated rats: lectin histochemistry. Histol. Histopathol. 2002; 17 (1): 9–19. doi: 10.14670/HH-17.9.

17. Paessens L.C., García-Vallejo J.J., Fernandes R.J., van Kooyk Y. The glycosylation of thymic microenvironments: a microscopic study using plant lectins. Immunol. Lett. 2007; 110 (1): 65–73. doi: 10.1016/j.imlet.2007.03.005.

18. Киселевский М. В., Власенко Р.Я., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г. Прогностическая значимость опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов. Иммунология. 2019; 40 (1): 73–82. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11009.

19. Friemel H. (ed.). Immunologische Arbeitsmethoden. Jena : Gustav Fischer Verlag, 1984.

20. Balcan E., Tuğlu I., Şahin M., Toparlak P. Cell surface glycosylation diversity of embryonic thymic tissues. Acta Histochem. 2008; 110 (1): 14–25. doi: 10.1016/j.acthis.2007.07.003.

21. Jörns J., Mangold U., Neumann U., Van Damme E.J., Peumans W.J., Pfüller U. et al. Lectin histochemistry of the lymphoid organs of the chicken. Anat. Embryol. (Berl.). 2003; 207 (1): 85–94. doi: 10.1007/s00429-003-0331-8.

22. Hellström U., Hammarström S., Dillner M.L., Perlmann H., Perlmann P. Fractionation of human blood lymphocytes on Helix pomatia A haemagglutinin coupled to sepharose beads. Scand. J. Immunol. 1976; 5 (suppl 5): 45–55. doi: 10.1111/j.1365-3083.1976.tb03855.x.

23. Bilyy R.O., Antonyuk V.O., Stoika R.S. Cytochemical study of role of α-d-mannose-and β-d-galactose-containing glycoproteins in apoptosis. J. Mol. Histol. 2004; 35 (8–9): 829–38. doi: 10.1007/s10735-004-1674-z.

24. London J., Berrih S., Bach J. F. Peanut agglutinin I. A new tool for studying T lymphocyte subpopulations. J. Immunol. 1978; 121 (2): 438–43.

25. Buzás E.I., György B., Pásztói M., Jelinek I., Falus A., Gabius H.J. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. Autoimmunity. 2006; 39 (8): 691–704. doi: 10.1080/08916930601061470.

26. Dube D.H., Bertozzi C.R. Glycans in cancer and inflammation – potential for therapeutics and diagnostics. Nat. Rev. Drug Discov. 2005; 4 (6): 477–88. doi: 10.1038/nrd1751.

27. Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. Proc. Natl Acad. Sci. 2002; 99 (16): 10231–3. doi: 10.1073/pnas.172380699.

28. Alvarez G., Lascurain R., Hernández-Cruz P., Tetaert D., Degand P., Gorocica P. et al. Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. Biochim. Biophys. Acta. 2006; 1760 (8): 1235–40. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.024.

29. Сенников С. В., Хантакова Ю.Н. Роль субпопуляций Т-клеток в индукции иммунологической толерантности. Иммунология. 2017; 38 (4): 239–44. doi: 10.18821/0206-4952-2017-38-4-239-244.

30. Moody A.M., Chui D., Reche P.A., Priatel J.J., Marth J.D., Reinherz E.L. Developmentally regulated glycosylation of the CD8αβ coreceptor stalk modulates ligand binding. Cell. 2001; 107 (4): 501–12. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00577-3.

31. Priatel J.J., Chui D., Hiraoka N., Simmons C.J., Richardson K.B., Page D.M. et al. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. Immunity. 2000; 12 (3): 273–83. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80180-6.

32. Wu W., Harley P.H., Punt J.A., Sharrow S.O., Kearse K.P. Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes. J. Exp. Med. 1996; 184 (2): 759–64. doi: 10.1084/jem.184.2.759.

33. Baum L.G., Derbin K., Perillo N.L., Wu T., Pang M., Uittenbogaart C. Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression. J. Biol. Chem. 1996; 271 (18): 10 793–9. doi: 10.1074/jbc.271.18.10793.

■ References

1. Sharon N., Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology. 2004; 14 (11): 53R–62R. doi: 10.1093/glycob/cwh122.

2. Comelli E.M., Sutton-Smith M., Yan Q., Amado M., Panico M., Gilmartin T., et al. Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. J. Immunol. 2006; 177 (4): 2431–40. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2431.

3. Daniels M.A., Hogquist K.A., Jameson S.C. Sweet'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. Nat. Immunol. 2002; 3 (10): 903–10. doi: 10.1038/ni1002-903.

4. Morgan R., Morgan R., Gao G., Pawling J., Dennis J.W., Demetriou M., et al. N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5)-mediated N-glycosylation negatively regulates Th1 cytokine production by T cells. J. Immunol. 2004; 173 (12): 7200–8. doi: 10.4049/jimmunol.173.12.7200.

5. Bromley Sh.K., Burack W.R., Johnson K.G., Somersalo K., Sims T.N., Sumen C., et al. The immunological synapse. Ann. Rev. Immunol. 2001; 19 (1): 375–96. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.375.

6. Wormald M.R., Stanfield R.L., Huang M., Mattsson N., Speir J.A., DiGennaro J.A., et al. Roles for glycosylation of cell surface receptors

involved in cellular immune recognition. J. Mol. Biol. 1999; 293 (2): 351–66. doi: 10.1006/jmbi.1999.3104.

7. Ohtsubo K., Marth J.D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell. 2006; 126 (5): 855–67. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.019.

8. Stepanenko R.N., L'vov V.L., Andreev I.V., Novikova E.M., Kozyreva O.V., Razvalyaeva N.A., et al. B(1-6)-D-glucan from the fruit body of mushroom Lentinus edodes: structure and immunobiological properties Immunologiya. 2019; 40 (4): 13–22. (in Russian)

9. Reisner Y., Sharon N. Cell fractionation by lectins. Trends Biochem. Sci. 1980; 5 (2): 29–31. doi: 10.1016/s0968-0004(80)80090-9.

10. Reisner Y., Linker-Israeli M., Sharon N. Separation of mouse thymocytes into two subpopulations by the use of peanut agglutinin. Cell. Immunol. 1976; 25 (1): 129–34. doi: 10.1016/0008-8749(76)90103-9.

11. Raedler A., Raedler E., Becker W.M., Arndt R., Thiele H.G. Subcapsular thymic lymphoblasts expose receptors for soy bean lectin. Immunology. 1982; 46 (2): 321–8.

12. Nakano T., Oguchi Y., Imai Y., Osawa T. Induction and separation of mouse helper T cells by lectins. Immunology. 1980; 40 (2): 217–22.

13. Alvarez G., Lascurain R., Pérez A., Degand P., Montaño L.F., Martinez-Cairo S., et al. Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. Immunol. Invest. 1999; 28 (1): 9–18. doi: 10.3109/08820139909022719.

14. Balcan E., Gümüş A., Şahin M. The glycosylation status of murine postnatal thymus: a study by histochemistry and lectin blotting. J. Mol. Histol. 2008; 39 (4): 417–26. doi: 10.1007/s10735-008-9180-3.

15. Fernandez J.G., Sanchez A.J., Melcon C., Chamorro C.A., Garcia C., Paz P. Development of the chick thymus microenvironment: a study by lectin histochemistry. J. Anat. 1994; 184 (Pt 1): 137–45.

16. Gheri G., Gheri Bryk S., Riccardi R., Sgambati E., Cirri Borghi M.B. The glycoconjugate sugar residues of the sessile and motile cells in the thymus of normal and Cyclosporin-A-treated rats: lectin histochemistry. Histol. Histopathol. 2002; 17 (1): 9–19. doi: 10.14670/HH-17.9.

17. Paessens L.C., García-Vallejo J.J., Fernandes R.J., van Kooyk Y. The glycosylation of thymic microenvironments: a microscopic study using plant lectins. Immunol. Lett. 2007; 110 (1): 65–73. doi: 10.1016/j.imlet.2007.03.005.

18. Kiselevskiy M.V., Vlasenko R.Ya., Zabotina T.N., Kadagidze Z.G. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes. Immunologiya. 2019; 40 (1): 73–82. doi: 10.24411/0206-4952-2019-11009. (in Russian)

19. Friemel H. (ed.). Immunologische Arbeitsmethoden. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1984.

20. Balcan E., Tuğlu I., Şahin M., Toparlak P. Cell surface glycosylation diversity of embryonic thymic tissues. Acta Histochem. 2008; 110 (1): 14–25. doi: 10.1016/j.acthis.2007.07.003.

21. Jörns J., Mangold U., Neumann U., Van Damme E.J., Peumans W.J., Pfüller U., et al. Lectin histochemistry of the lymphoid organs of the chicken. Anat. Embryol. (Berl.). 2003; 207 (1): 85–94. doi: 10.1007/s00429-003-0331-8.

22. Hellström U., Hammarström S., Dillner M.L., Perlmann H., Perlmann P. Fractionation of human blood lymphocytes on Helix pomatia A haemagglutinin coupled to sepharose beads. Scand. J. Immunol. 1976; 5 (suppl 5): 45–55. doi: 10.1111/j.1365-3083.1976.tb03855.x.

23. Bilyy R.O., Antonyuk V.O., Stoika R.S. Cytochemical study of role of α-d-mannose-and β-d-galactose-containing glycoproteins in apoptosis. J. Mol. Histol. 2004; 35 (8–9): 829–38. doi: 10.1007/s10735-004-1674-z.

24. London J., Berrih S., Bach J. F. Peanut agglutinin I. A new tool for studying T lymphocyte subpopulations. J. Immunol. 1978; 121 (2): 438–43.

25. Buzás E.I., György B., Pásztói M., Jelinek I., Falus A., Gabius H.J. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. Autoimmunity. 2006; 39 (8): 691–704. doi: 10.1080/08916930601061470.

26. Dube D.H., Bertozzi C.R. Glycans in cancer and inflammation – potential for therapeutics and diagnostics. Nat. Rev. Drug Discov. 2005; 4 (6): 477–88. doi: 10.1038/nrd1751.

27. Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. Proc. Natl Acad. Sci. 2002; 99 (16): 10231–3. doi: 10.1073/pnas.172380699.

28. Alvarez G., Lascurain R., Hernández-Cruz P., Tetaert D., Degand P., Gorocica P., et al. Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. Biochim. Biophys. Acta. 2006; 1760 (8): 1235–40. doi: 10.1016/j.bbagen.2006.03.024.

29. Sennikov S. V., Khantakova J.N. Role of T-cell subpopulations in the immunologic tolerance induction. Immunologiya. 2017; 38 (4): 239–44. doi: 10.18821/0206-4952-2017-38-4-239-244. (in Russian)

30. Moody A.M., Chui D., Reche P.A., Priatel J.J., Marth J.D., Reinherz E.L. Developmentally regulated glycosylation of the CD8αβ coreceptor stalk modulates ligand binding. Cell. 2001; 107 (4): 501–12. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00577-3.

31. Priatel J.J., Chui D., Hiraoka N., Simmons C.J., Richardson K.B., Page D.M., et al. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. Immunity. 2000; 12 (3): 273–83. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80180-6.

32. Wu W., Harley P.H., Punt J.A., Sharrow S.O., Kearse K.P. Identification of CD8 as a peanut agglutinin (PNA) receptor molecule on immature thymocytes. J. Exp. Med. 1996; 184 (2): 759–64. doi: 10.1084/jem.184.2.759.

33. Baum L.G., Derbin K., Perillo N.L., Wu T., Pang M., Uittenbogaart C. Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression. J. Biol. Chem. 1996; 271 (18): 10 793–9. doi: 10.1074/jbc.271.18.10793.