

УДК 612.438:57.083.3+581.192
<https://doi.org/10.17816/MAJ19357-70>

СКРИНИНГ ПАНЕЛИ ЛЕКТИНОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТАДИЙ АПОПТОЗА ТИМОЦИТОВ МЫШИ

М.К. Серебрякова¹, А.А. Доценко^{1,2}, И.В. Кудрявцев¹, А.В. Полевщиков¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург;

² СПбГУЗ «Городская Мариинская больница», Санкт-Петербург

Для цитирования: Серебрякова М.К., Доценко А.А., Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В. Скрининг панели лектинов для оценки стадий апоптоза тимокитов мыши // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19. – № 3. – С. 57–70. <https://doi.org/10.17816/MAJ19357-70>

Поступила: 19.07.2019

Одобрена: 12.08.2019

Принята: 29.08.2019

Цель исследования состояла в изучении взаимодействия лектинов с различными популяциями созревающих Т-лимфоцитов мыши, а также с тимокитами на разных стадиях апоптоза.

Материалы и методы. Типирование тимокитов 80 мышей линии СВА проведено методом проточной цитометрии. Оценивали также связывание лектинов с клетками в раннем и позднем апоптозе, индуцированном введением гидрокортизона.

Результаты. Установлена пригодность лектинов арахиса и виноградной улитки для дифференцирования зрелых и незрелых тимокитов мыши. С живыми клетками связывались 11 лектинов, при переходе клеток в состояние раннего апоптоза тимокиты окрашивались 16 лектинами, при переходе в поздний апоптоз с клетками связывались 20 из 23 лектинов.

Заключение. Использование меченых лектинов для оценки стадий апоптоза тимокитов мыши не имеет очевидных преимуществ по сравнению с другими методиками. Степень связывания всех лектинов с тимокитами в апоптозе возрастает по мере снижения заряда на мембране и повышения ее проницаемости. Для типирования тимокитов на ранних стадиях созревания возможно использование лектинов арахиса и виноградной улитки. Лектины подснежника и амариллиса не пригодны для дифференцирования тимокитов по зрелости.

Ключевые слова: дифференцировка тимокитов; лектины; ранний апоптоз; поздний апоптоз; проточная цитометрия.

LECTIN PANEL SCREENING FOR EVALUATING OF MURINE THYMOCYTES APOPTOSIS STAGES

M.K. Serebriakova¹, A.A. Dotsenko^{1,2}, I.V. Kudryavtsev¹, A.V. Polevshchikov¹

¹ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

² Mariinsky Hospital, Saint Petersburg, Russia

For citation: Serebriakova MK, Dotsenko AA, Kudryavtsev IV, Polevshchikov AV. Lectin panel screening for evaluating of murine thymocytes apoptosis stages. *Medical Academic Journal*. 2019;19(3):57-70. <https://doi.org/10.17816/MAJ19357-70>

Received: July 19, 2019

Revised: August 12, 2019

Accepted: August 29, 2019

The aim of the study was to investigate the interaction of lectins with various populations of maturing murine T-lymphocytes, as well as with thymocytes at different stages of apoptosis.

Materials and methods. Thymocyte typing of 80 CBA mice was performed by flow cytometry. The binding of lectins to cells in early and late apoptosis induced by the administration of hydrocortisone was also evaluated.

Results. The suitability of peanut and *Helix pomatia* lectins for differentiation of mature and immature mouse thymocytes has been established. 11 lectins bound to living cells, during the transition of cells to the state of early apoptosis, thymocytes were stained with 16 lectins, and upon transition to late apoptosis, 20 of 23 lectins bound to the cells.

Conclusion. The use of labeled lectins to assess the stage of murine thymocyte apoptosis does not have obvious advantages over existing methods. The degree of binding of all lectins to thymocytes in apoptosis increases as the charge on the membrane decreases and its permeability increases. For typing thymocytes in the early stages of maturation, peanut and *Helix pomatia* lectins can be used. Snowdrop and amaryllis lectins are not suitable for differentiation of thymocytes by maturity.

Keywords: thymocyte differentiation; lectins; early apoptosis; late apoptosis; flow cytometry.

Список сокращений

ГК — гидрокортизон; ЗФР — забуференный физиологический раствор; 7-AAD — 7-аминоактиномицин D; DN — double negative cells; DP — double positive cells; FITC — флуоресцеинизотиоцианат; FCS — эмбриональная телячья сыворотка (от англ. fetal calf serum); SP — single positive cells; TMRM — тетраметилродамин; TcR — T-клеточный рецептор (от англ. T-cell receptor)

Введение

Тимус — центральный орган иммунной системы, в котором происходит созревание и дифференцировка Т-лимфоцитов. Весь процесс созревания тимоцитов из ранних предшественников до зрелой Т-клетки может быть разделен на ряд последовательных стадий, характерных для разных компартментов тимуса и связанных с определенным набором маркеров на поверхности клетки.

Принято определять основные популяции тимоцитов в соответствии с экспрессией корцепторных молекул CD4 и CD8. Клетки, негативные по антигенам CD4 и CD8 (CD4⁻CD8⁻, double negative cells, DN), самые незрелые и по дополнительным признакам могут быть разделены на субпопуляции DN1-4 [1–3]. По мере созревания и формирования элементов Т-клеточного рецепторного комплекса [4] тимоциты начинают экспрессировать обе указанные молекулы (CD4⁺CD8⁺, double positive cells, DP), но в дальнейшем, после реаранжировки α -цепи Т-клеточного рецептора (TcR), один из корцепторов утрачивается, и зрелые клетки, готовые к выходу в кровотоки (single positive cells, SP), несут на своей поверхности уже только один антиген — либо CD4 (Т-хелперы), либо CD8 (цитотоксические Т-клетки) [5]. Неотъемлемая черта процесса дифференцировки Т-лимфоцитов — селекционные процессы, в ходе которых значительная часть созревающих клеток гибнет путем апоптоза. По ходу всех дифференцировочных событий существенно меняется состав мембранных рецепторов тимоцитов. Поскольку практически все рецепторы являются гликопротеинами, можно с уверенностью говорить и об одновременной смене состава полисахаридов гликокаликса тимоцитов [6].

Процесс созревания и дифференцировки Т-лимфоцитов также сопровождается изменением гликозилирования белков мембраны, связанным с изменением активности гликозилтрансфераз. Общий уровень гликозилирования выше в зрелых тимоцитах, и, вероятно, процесс О-гликозилирования направлен главным образом на эту часть клеток тимуса [7, 8].

Важным семейством углеводов, вовлеченных в процесс созревания тимоцитов, являются сиаловые кислоты (NAcNeu). Чаще всего производные нейраминовой кислоты располагаются в терминальных положениях комплексных углеводных структур и, благодаря отрицательному заряду, оказываются задействованы в процессах распознавания, миграции и другие межклеточные взаимодействия. Кроме того, сиаловые кислоты маскируют гликаны, располагающиеся

в лежащих ниже слоях гликокаликса, и таким образом блокируют связывание с ними эндогенных лектинов, специфичных к несиалированным углеводам, выполняя функцию важных регуляторов в иммунной системе [9].

Тимоциты в ходе селекции гибнут путем апоптоза, уровень которого является одним из важных показателей интенсивности процессов, протекающих в ходе дифференцировки клеток тимуса. Согласно господствующей гипотезе в результате селекции в ходе формирования TcR уничтожается большая часть популяции тимоцитов и не более 5 % всей популяции DP дифференцируется в SP-timoциты [10]. Это косвенно подтверждают данные о крайне низком количестве зрелых Т-клеток, выходящих из тимуса на периферию, на фоне высокого пролиферативного потенциала тимоцитов на разных стадиях их созревания [11, 12]. При этом стоит отметить, что реально наблюдаемый уровень апоптоза в интактном тимусе не всегда совпадает с теоретическими данными. Так, исследования эмбрионального тимуса крыс, проведенные методом проточной цитофлуориметрии, показали, что уровень апоптоза в данном органе достигает своего максимума на 18-й день эмбрионального развития и составляет лишь 25 % общего числа тимоцитов, после чего снижается до 5 % и сохраняется на этом уровне [13]. Гистологическая картина интактного тимуса также не подтверждает столь масштабной картины апоптоза [14, 15].

Одной из общепринятых моделей, применяемых для изучения процессов апоптоза в тимусе *in vivo*, является стресс-индуцированная атрофия тимуса, вызванная путем введения животным глюкокортикоидов, в частности гидрокортизона (ГК) [16–18]. При этом разные субпопуляции тимоцитов в разной степени чувствительны к воздействию глюкокортикоидов. Самые восприимчивые — DP-клетки, большая часть которых (90 %) гибнет в результате введения животным высоких доз ГК или дексаметазона [19, 20].

При физиологических условиях глюкокортикоиды в тимусе необходимы для перехода тимоцитов из стадии DN в стадию DP и дальнейшего их выживания в ходе позитивной и негативной селекции [21]. Другим результатом воздействия ГК на клетки оказывается изменение молекулярного состава плазматической мембраны, затрагивающее как белковую, так и углеводную компоненту поверхностного аппарата клетки [22, 23]. Однако индуцированные глюкокортикоидами изменения поверхностной мембраны не ограничиваются эффектами от запуска апоптоза. Обработка дексаметазоном различных типов клеток вызывает увеличение экс-

прессии β -галактозид- α_2 -6-сиалилтрансферазы, что отражается на степени сиалирования поверхностных гликанов [24–26]. Воздействие глюкокортикоидов, кроме того, уменьшает количество некоторых гликолипидных компонент мембраны [23].

Исследование углеводных компонент мембраны — очень важный шаг к пониманию многих процессов, происходящих в клетке. Одним из подходов к изучению изменения экспрессии тех или иных углеводных детерминант является использование лектинов — углеводсвязывающих белков или гликопротеинов неиммунной природы. Лектины являются моделью для исследования белковоуглеводных взаимодействий, а также инструментом для изучения углеводов как в свободной форме, так и в связанных с липидами или белками состояниях [27–29]. Благодаря специфическому связыванию с углеводами лектины используют для идентификации опухолевых клеток. Различные методы, основанные на применении лектинов, позволяют более точно поставить диагноз, подобрать адекватное лечение и дать более реалистичный прогноз [30, 31].

Так же как и в случае моноклональных антител, для визуализации связывания лектинов с молекулами-мишенями используют их конъюгаты с флуоресцентными красителями, ферментами (например, пероксидазой хрена), биотином, ферритином или частицами золота, при этом лектины пригодны для работы как с суспензиями клеток, так и с гистологическими срезами. Кроме того, благодаря способности лектинов к агглютинации возможно их применение для выделения тех или иных популяций клеток [32].

Одним из первых лектинов, использованных для выделения различных популяций тимоцитов, был лектин арахиса (PNA). Данный лектин на протяжении многих лет широко используется для выделения популяции незрелых кортикальных тимоцитов, чувствительных к действию радиации и стероидных гормонов [33–35]. Лектин соевых бобов (SBA) позволяет выделить популяцию крупных blast в субкапсулярной зоне тимуса [36]. Для типирования разных популяций тимоцитов использовали лектины бузины черной (SNA) и акации амурской (MAA), специфичные к разным сиаловым кислотам [37]. Нередко результаты окрашивания лектинами в проточной цитометрии и гистохимии не совпадают, что указывает на необходимость дальнейших исследований и стандартизации схемы прободготовки [38, 39].

Таким образом, лектины различной углеводной специфичности могут применяться для

изучения углеводных детерминант, присутствующих на поверхности клеток тимуса на разных стадиях их созревания, а также для исследования влияния препаратов на структуру гликокаликса клеток тимуса [40–43]. Отдельное направление исследования представляет использование лектинов как маркеров разных стадий апоптоза [44, 45]. Несмотря на большой объем представленных в литературе данных, касающихся применения лектинов для типирования клеток разных стадий дифференцировки или оценки уровня апоптоза, все они разрозненны и весьма противоречивы, что говорит о необходимости дополнительных исследований.

Цель данной работы заключалась в изучении взаимодействия лектинов с различными популяциями тимоцитов и оценке возможности их использования для выявления клеток тимуса, находящихся на разных стадиях апоптоза.

Материалы и методы

Животные. Объектом исследования являлись мыши (самки) линии СВА массой 18–20 г, полученные из питомника «Рапполово», в количестве 80 шт. Животных содержали в стандартных условиях (температура и освещенность) при неограниченном доступе к воде и пище. Условия содержания, экспериментальной работы и вывода животных из эксперимента 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 22 лектина растительного происхождения и один лектин животного происхождения. Все меченные флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) лектины были приобретены у НПК «Лектинотест» (Украина). Панель исследуемых лектинов и их углеводная специфичность приведены в табл. 1.

Антитела и реагенты. Эксперименты осуществляли с применением моноклональных антител производства BioLegend (США):

- против CD4 мыши, меченные PE/Cy5, clone GK1.5;
- против CD8a мыши, меченные PE/Cy7, clone 53-6.7;
- против CD45 мыши и человека, меченные APC/Cy7, clone 30-F11.

Для выявления ранних стадий апоптоза использовали потенциалзависимый липофильный митохондриальный краситель метиловый эфир тетраметилродамина (TMRM) (Invitro-

Использованные в работе лектины и их специфичность
The lectins used in the work and their specificity

Название	Международное обозначение	Углеводная специфичность
Лектин коры акации желтой	CABA	NAcDGal
Конканавалин А	ConA	α DMan/ α DGlc
Лектин крокуса	CVA	α DMan
Лектин подснежника	GNA	α DMan
Лектин амариллиса	HNA	α DMan
Агглютинин виноградной улитки	HPA	NAc α DGal
Лектин коры бобовника анагирилистного	LABA	α LFuc
Лектин семян лимской фасоли	LBA	NAcDGal
Лектин из семян чечевицы	LCA	α DMan/ α DGlc
Лектин белоцветника весеннего	LVA	α DMan/ α DGlc
Лектин банана	MBA	α DMan
Лектин нарцисса	NPA	α DMan
Эритроагглютинин семян фасоли	PHA-E	NAc β Glc
Лектин купены многоцветной	PMRA	α DMan
Лектин из семян арахиса	PNA	β DGal
Лектин из семян гороха	PSA	α DMan/ α DGlc
Лектин из семян клещевины	RCA	β DGal
Лектин коры бузины черной	SNA	NAcNeu
Лектин коры бузины красной	SRA	NAcNeu
Лектин из клубней картофеля	STA	NAcDGlc
Лектин корневища крапивы	UDA	NAcDGlc
Лектин омелы белой	VAA	β DGal
Агглютинин зародышей пшеницы	WGA	NAcDGlc

gen, США), для выявления поздних стадий апоптоза — ДНК-связывающий краситель 7-аминоактиномицин D (7AAD) (BioLegend, США).

В работе также использовали забуференный физиологический раствор (ЗФР), включавший 0,14 М раствор NaCl, 1 л которого был дополнен 0,2 г KCl, 1,44 г Na₂HPO₄, 0,24 г KH₂PO₄, pH 7,4 («Биолот», Санкт-Петербург), эмбриональную телячью сыворотку (FCS) («Биолот», Санкт-Петербург), а также суспензию гидрокортизона для инъекций, 125 мг/5 мл (Gedeon Richter, Венгрия).

Выделение тимоцитов. Для получения тимоцитов животных умерщвляли путем цервикальной дислокации и сразу же извлекали тимус. Органы измельчали в гомогенизаторе Поттера, полученную клеточную суспензию каждого тимуса фильтровали через нейлоновый фильтр и дважды отмывали избытком ЗФР путем центрифугирования при 330 г в течение 8 мин при

охлаждении до 15 °С. Клеточный осадок ресуспендировали и переводили в 3 мл ЗФР.

Оценка связывания лектинов с различными популяциями тимоцитов. Для оценки возможности связывания различных лектинов с популяциями тимоцитов 100 мкл суспензии клеток, полученной описанным выше способом, переносили в пробирки для цитофлуориметрического учета 12 × 75 мм (Beckman Coulter, США). В каждый образец вносили по 10 мкл раствора одного из лектинов, конъюгированного с FITC, в итоговой концентрации 50 мкг/мл. Затем в пробы добавляли антитела против CD4 и CD8 для выделения различных популяций тимоцитов и анти-CD45-антитела для отделения тимоцитов от клеток стромы. Антитела окрашивали в соответствии с инструкцией производителя, контрольную пробу — только антителами без добавления лектинов. Все образцы выдерживали 20 мин в темноте при комнатной

температуре. В дальнейшем образцы отмывали избытком ЗФР с добавлением 2 % FCS, полученный осадок ресуспендировали в 300 мкл ЗФР и анализировали на проточном цитометре Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов анализировали не менее 30 000 одиночных клеток, исключая из анализа клеточные агрегаты путем учета данных по времени нахождения частицы в точке детекции в осях прямого (FS) или бокового (SS) светорассеяния. Полученные по итогам цитометрического учета результаты выражали в виде процента позитивных по лектину тимоцитов каждой популяции.

Оценка уровня апоптоза при помощи проточной цитометрии. Для оценки уровня апоптоза 100 мкл суспензии тимоцитов, полученной описанным выше способом, переносили в пробирки для цитофлуориметрического учета. В каждый образец вносили по 10 мкл раствора конъюгированного с FITC лектина в концентрации 50 мкг/мл. Для отделения тимоцитов от клеток стромы в каждую пробу вносили анти-CD45-антитела в соответствии с инструкцией производителя. С целью анализа общего уровня апоптоза (суммарно раннего и позднего) использовали методику, основанную на применении метилового эфира тетраметилпродамина (TMRM), который спонтанно проникает через плазматическую мембрану клеток и специфически накапливается в поляризованных мембранах митохондрий живых клеток, позитивных по TMRM (TMRM⁺) [46]. Клетки на ранних и более поздних стадиях апоптоза отличаются заметным снижением уровня флуоресценции красителя (TMRM⁻). В ходе эксперимента в пробу добавляли 6,5 мкл TMRM в рабочей концентрации 1,5 мкг/мл.

После внесения реагентов клетки инкубировали 20 мин при 37 °С в защищенном от света месте. По завершении инкубации для удаления из суспензии избытка красителя TMRM и подавления неспецифического связывания образцы отмывали избытком ЗФР с добавлением 2 % FCS путем центрифугирования при 330 g в течение 8 мин при охлаждении до 15 °С. Полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл ЗФР и к суспензии добавляли 10 мкл 7-AAD для детекции позднего апоптоза [47]. Пробы выдерживали в течение 5 мин в защищенном от света месте при комнатной температуре, после чего в каждую пробу добавляли по 250 мкл ЗФР и образцы анализировали на проточном цитометре Navios™ описанным выше способом. Контрольные пробы по каждому животному включали клетки, прошедшие все этапы пробоподготовки, но без внесения растворов лектинов.

Для положительного контроля метода оценки уровня апоптоза у части животных индуцировали апоптоз тимоцитов путем внутрибрюшинного введения 2,5 мг ГК в объеме 0,5 мл ЗФР за 3 или 6 ч до эксперимента. Дальнейший анализ проводили по описанной выше методике.

Результат выражали в виде процента клеток, позитивных по TMRM (живые клетки), слабопозитивных и негативных по TMRM, но негативных по 7AAD (ранний апоптоз) и позитивных по 7AAD (поздний апоптоз/некроз).

Статистические методы. В ходе работы вычисляли средние арифметические и ошибки среднего. Выборки сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Обработку данных проводили при помощи пакета программ и приложений Microsoft Office Excel (Microsoft, США). Во всех экспериментах различия между контролем и опытом считали статистически достоверными для $p < 0,05$.

Результаты

Данные, полученные в результате совместного окрашивания тимоцитов мыши лектинами и антителами к CD4- и CD8-антигенам, приведены в табл. 2. Из таблицы видно, что практически все лектины связываются с тимоцитами всех основных популяций, однако количество позитивных по лектинам клеток различных популяций сильно варьирует. При этом лектины подснежника (GNA) и амариллиса (HNA) демонстрируют максимальное (близкое к 100 %) связывание с тимоцитами всех популяций, кроме DN, для которых эта величина несколько ниже: $69,58 \pm 8,14$ % для GNA и $86,00 \pm 4,17$ % для HNA.

Отдельного внимания заслуживают лектины арахиса (PNA) и виноградной улитки (HPA), для которых количество меченных ими клеток на ранних стадиях созревания (DN и DP) заметно превышает соответствующую величину в популяциях SP. Так, для HPA в популяциях DN и DP количество окрашенных лектином клеток составляет около 50 %, а в обеих популяциях SP-тимоцитов не превышает 15 %. Для PNA эта величина составляет около 25 % позитивных по лектину клеток в популяциях SP-тимоцитов, почти 45 % — в популяции DN-тимоцитов и свыше 90 % в популяции DP-тимоцитов.

Для всех остальных лектинов процент связывания с клетками разных популяций варьировал в достаточно широком диапазоне. Однако можно проследить общую закономерность: уровень связывания лектинов с DN-клетками гораздо выше, чем с DP-тимоцитами (см. табл. 2).

Таблица 2 / Table 2

Связывание лектинов (lectin⁺) с различными популяциями тимоцитов мыши, процент каждой популяции ($X \pm s$, $n \geq 4$) по каждой точке

Binding of lectins (lectin⁺) to different populations of mouse thymocytes, % of each population, $X \pm s$, $n \geq 4$ at each point

Наименование лектина	CD4 ⁻ CD8 ⁻	CD4 ⁺ CD8 ⁺	SP CD4 ⁺	SP CD8 ⁺
Без лектинов	1,07 ± 0,07	88,23 ± 1,52	7,15 ± 0,59	1,24 ± 0,33
САВА	28,25 ± 5,45	5,22 ± 0,77	8,42 ± 3,09	14,40 ± 8,12
ConA	27,67 ± 8,95	5,58 ± 2,31	9,50 ± 3,90	15,50 ± 7,11
СVA	39,18 ± 2,82	9,20 ± 3,38	9,65 ± 2,25	19,92 ± 4,53
GNA	69,58 ± 8,14	99,56 ± 0,18	93,63 ± 2,06	96,36 ± 1,09
ННА	86,00 ± 4,17	97,99 ± 0,61	97,87 ± 1,59	96,45 ± 1,60
НРА	50,99 ± 2,29	58,35 ± 11,00	15,93 ± 3,87	16,16 ± 3,41
LABA	44,59 ± 6,43	9,91 ± 3,66	8,29 ± 2,00	12,93 ± 3,18
LBA	28,77 ± 5,78	7,26 ± 1,69	11,03 ± 2,77	16,55 ± 6,29
LCA	20,10 ± 2,96	4,08 ± 0,95	7,79 ± 1,86	13,47 ± 4,86
LVA	10,24 ± 4,38	1,82 ± 0,81	2,99 ± 1,09	6,28 ± 3,48
MBA	0,57 ± 0,27	0,83 ± 0,31	1,21 ± 0,33	1,51 ± 0,75
NPA	44,16 ± 4,22	6,93 ± 1,94	21,29 ± 6,52	30,04 ± 5,71
PHA	44,19 ± 3,98	14,05 ± 4,32	13,55 ± 2,56	26,85 ± 4,58
PMRA	13,48 ± 3,87	2,72 ± 0,57	4,38 ± 0,72	6,37 ± 2,07
PNA	44,94 ± 6,09	90,61 ± 1,29	24,73 ± 2,18	26,63 ± 5,85
PSA	38,99 ± 4,23	6,82 ± 2,48	11,84 ± 2,76	22,98 ± 4,81
RCA	38,10 ± 9,48	14,07 ± 3,65	12,62 ± 3,75	23,78 ± 7,90
SNA	27,14 ± 9,63	7,79 ± 1,06	10,31 ± 2,81	13,57 ± 6,51
SRA	50,53 ± 5,89	34,03 ± 6,83	21,89 ± 4,06	25,47 ± 6,30
STA	26,96 ± 12,00	2,92 ± 0,83	6,06 ± 1,69	8,77 ± 3,64
UDA	30,81 ± 6,43	4,67 ± 1,46	8,91 ± 2,10	22,39 ± 8,95
VAA	1,98 ± 1,20	0,50 ± 0,26	2,79 ± 2,47	2,08 ± 1,83
WGA	69,14 ± 2,75	36,90 ± 4,53	26,09 ± 3,26	34,00 ± 6,11

Особенно четко такой характер связывания прослеживается для лектина картофеля (STA) и лектина крапивы (UDA), специфичных к N-ацетилглюкозамину. Соотношение lectin⁺ DN- и DP-timoцитов для этих лектинов составляет 9 : 1 для STA и 6 : 1 для UDA. Практически такое же соотношение (5 : 1, 6 : 1) наблюдается и для большинства маннозоспецифичных лектинов — конканавалина А, лектинов чечевицы (LCA), гороха (PSA), белоцветника (LVA), нарцисса (NPA) и купены (PMRA).

Для более зрелых тимоцитов также прослеживается определенная тенденция в связывании с лектинами: количество лектин-позитивных клеток в популяции SP CD8⁺ почти для всех лектинов оказывается в 1,5–2 раза выше, чем в SP CD4⁺. В целом, несмотря на некоторую вариабельность, связывание большинства лектинов с разными популяциями тимоцитов является весьма однородным, то есть

связывание или равномерно маленькое, как для лектина белоцветника весеннего (lectin⁺ в SP CD4⁺ — 2,99 ± 1,09 %, в SP CD8⁺ — 6,28 ± 3,48 %, в DN — 1,82 ± 0,81 %, в DP — 10,24 ± 4,38 %), или равномерно высокое, как для лектина бузины красной (lectin⁺ в SP CD4⁺ — 21,89 ± 4,06 %, в SP CD8⁺ — 25,47 ± 6,30 %, в DN — 50,53 ± 5,89 % и в DP — 34,03 ± 6,83 %).

Для оценки уровня апоптоза и выделения разных стадий этого процесса в тимусе клетки окрашивали липофильным митохондриальным красителем тетраметилпроламином (TMRM) и ДНК-связывающим красителем 7-аминоактиномицином D (7-AAD). Данные, полученные в результате определения доли связавшихся с лектинами TMRM⁺ (живых) клеток интактного тимуса и тимуса, подверженного воздействию ГК за 3 и 6 ч до оценки, приведены в табл. 3. Согласно данным табли-

Таблица 3 / Table 3

Доля TMRM⁺-лимфоидных клеток тимуса мыши, связавшихся с лектинами, через 3 и 6 ч после введения животным 2,5 мг гидрокортизона, процент от количества TMRM⁺-timoцитов ($X \pm s, n \geq 4$) по каждой точке
 The number of TMRM⁺ lymphoid cells of the mouse thymus bound to lectins 3 and 6 hrs after the animals were injected with 2.5 mg of hydrocortisone, % of the number of TMRM⁺ thymocytes, $X \pm s, n \geq 4$ at each point

Наименование лектина	Контроль (до введения гидрокортизона, 0 ч)	Через 3 ч после введения гидрокортизона	Через 6 ч после введения гидрокортизона
Без лектинов	90,65 ± 1,98	78,20 ± 2,18	59,07 ± 3,60
САВА	4,09 ± 1,03	1,92 ± 0,37	3,82 ± 0,86
ConA	1,00 ± 0,06	1,84 ± 0,47	2,07 ± 0,69
СVA	1,21 ± 0,51	0,49 ± 0,09	1,50 ± 0,24
GNA	99,71 ± 0,06	97,68 ± 0,52**	98,34 ± 0,39*
ННА	99,76 ± 24,94	98,83 ± 0,35	99,41 ± 0,15
НРА	77,86 ± 4,22	53,65 ± 2,87**	70,67 ± 4,21
LABA	0,13 ± 0,10	1,26 ± 0,19**	0,81 ± 0,16*
LBA	0,27 ± 0,16	3,04 ± 0,32***	3,05 ± 0,39***
LCA	0,45 ± 0,13	1,12 ± 0,23	2,41 ± 0,82
LVA	0,88 ± 0,16	0,53 ± 0,19	97,46 ± 0,85***
MBA	0,69 ± 0,10	1,20 ± 0,15*	98,69 ± 0,86***
NPA	0,50 ± 0,17	0,24 ± 0,05	7,70 ± 4,86
РНА	0,65 ± 0,03	0,55 ± 0,01**	4,35 ± 2,24
PMRA	1,16 ± 0,43	1,93 ± 0,53	2,09 ± 0,74
PNA	81,29 ± 2,42	67,45 ± 11,50	86,26 ± 6,17
PSA	0,06 ± 0,02	0,89 ± 0,13***	1,37 ± 0,26**
RCA	0,09 ± 0,03	8,03 ± 0,19***	8,12 ± 3,32
SNA	1,37 ± 0,93	10,91 ± 3,04*	2,74 ± 0,59
SRA	1,03 ± 0,41	15,46 ± 2,78**	20,41 ± 5,65*
STA	0,27 ± 0,10	1,40 ± 0,21**	0,79 ± 0,13*
UDA	0,23 ± 0,15	0,90 ± 0,08**	0,97 ± 0,25*
VAA	2,84 ± 0,51	0,38 ± 0,08	35,49 ± 17,04
WGA	9,30 ± 0,96	15,18 ± 3,83	13,84 ± 3,09

Примечание: *различия с контролем до введения гидрокортизона достоверны по *t*-критерию Стьюдента при $p < 0,05$, **при $p < 0,01$, ***при $p < 0,001$.

цы с TMRM⁺-timoцитами интактных мышей в значительном количестве связываются лектины подснежника (GNA) и амариллиса (ННА) (99,71 ± 0,06 и 99,76 ± 24,94 % соответственно). При этом на фоне индукции апоптоза *in vivo* за счет воздействия ГК связывание GNA с тимоцитами достоверно уменьшается уже через 3 ч после инъекции. Для лектина ННА количество связавшихся с ним клеток остается стабильным через 3 и 6 ч после введения ГК. Немного меньшее связывание наблюдается для лектинов арахиса (PNA) и виноградной улитки (НРА) — 81,29 ± 2,42 и 77,86 ± 4,22 % соответственно. Уровень связывания этих лектинов с клетками снижается через 3 ч после воздействия ГК, но через 6 ч восстанавливается до

прежней величины (изменения достоверны для лектина НРА и недостоверны для PNA).

Лектин желтой акации (САВА) связывается с 4 % живых тимоцитов интактных животных. Изменение количества взаимодействующих с лектином тимоцитов через 3 и 6 ч после инъекции ГК является недостоверным. Для лектина WGA также показано заметное связывание с живыми тимоцитами (9,30 ± 0,96 %), увеличивающееся недостоверно через 3 ч после введения животным ГК. Остальные лектины демонстрируют слабое связывание с живыми тимоцитами, не превышающее 1,5 % всей фракции TMRM⁺-клеток.

Заметное изменение количества лектин-позитивных TMRM⁺-клеток было выявлено

для лектина банана (MBA) через 6 ч после введения ГК. Количество MBA⁺TMRM⁺-клеток в тимусе интактных животных составило $0,69 \pm 0,10 \%$, а в тимусе животных через 6 ч после инъекции ГК эта величина увеличилась почти до 100 % ($98,69 \pm 0,86 \%$).

Для лектина бузины красной (SRA) было отмечено изменение содержания lectin⁺TMRM⁺-клеток уже через 3 ч после введения ГК, которое сохранялось и на сроке 6 ч ($1,03 \pm 0,41 \%$ — контроль, $15,46 \pm 2,78 \%$ — 3 ч, $20,41 \pm 5,65 \%$ — 6 ч). Для рицина (RCA) и лектина черной бузины (SNA) также наблюдалось достоверное увеличение доли lectin⁺TMRM⁺-клеток после воздействия ГК уже на сроке 3 ч после инъекции ($8,03 \pm 0,19 \%$ для RCA и $10,91 \pm 3,04 \%$ для SNA, при контроле $0,09 \pm 0,03$ и $1,37 \pm 0,93 \%$ соответственно). При этом изменение связывания на сроке 6 ч после воздействия ГК не является достоверным. Обращает на себя внимание, что изменение связывания лектинов с живыми TMRM⁺-клетками тимуса на фоне воздействия глюкокортикоидов по отношению к интактному контролю оказывается более явным через 3 ч после введения животным ГК, чем через 6 ч.

Данные оценки связывания лектинов с клетками тимуса, находящимися на ранних стадиях апоптоза (TMRM⁻7AAD⁻), приведены в табл. 4. Из представленных результатов видно, что большая часть таких клеток связывается с лектинами подснежника (GNA) и амариллиса (HNA) ($93,03 \pm 1,20$ и $89,98 \pm 22,42 \%$ соответственно). Лектины виноградной улитки (HPA) и семян арахиса (PNA) связываются более чем с половиной клеток тимуса, находящихся на ранних стадиях апоптоза (TMRM⁻7AAD⁻): 61 % в случае HPA и 56 % в случае PNA. Для HPA достоверные отличия в количестве оцениваемых тимоцитов наблюдаются на сроке 3 ч после инъекции ГК (61 % — контроль и 41 % — через 3 ч после инъекции). Немногим более 25 % тимоцитов, находящихся на стадии раннего апоптоза, связывается с лектином зародышей пшеницы (WGA). Введение животным ГК достоверно не влияет на количество WGA⁺-timoцитов среди клеток, находящихся на ранних стадиях апоптоза. Стоит отметить, что в тимусе интактных животных количество WGA-позитивных клеток во фракции TMRM⁻7AAD⁻-timoцитов почти в 3 раза превышает количество связавшихся с этим лектином клеток фракции TMRM⁺. Для остальных лектинов показано, что среди тимоцитов, находящихся на ранних стадиях апоптоза, лектинпозитивных клеток больше, чем среди живых. Однако в большинстве случаев эта величина не превышает 8 % общего

числа TMRM⁻7AAD⁻-клеток. Исключением является лектин коры бузины черной (SNA), для которого содержание позитивных по лектину клеток составляет $15,08 \pm 8,81 \%$ общего числа TMRM⁻7AAD⁻-timoцитов.

Обращает на себя внимание, что для лектина банана доля MBA⁺TMRM⁻7AAD⁻-timoцитов увеличивается до 52 % через 6 ч после введения ГК, в то время как через 3 ч оно не превышало 3 %. Эти данные хорошо соотносятся с данными табл. 4, в соответствии с которыми связывание MBA с живыми тимоцитами мыши также увеличивалось через 6 ч после введения животным ГК.

Практически для всех остальных лектинов уже через 3 ч после введения животным ГК показано достоверное увеличение связывания с клетками тимуса, находящимися на ранних стадиях апоптоза. Отмеченные изменения сохраняются и на сроке 6 ч после инъекции ГК. Исключение составляют лектины нарцисса желтого (NPA), купены (PMRA) и крапивы (UDA), для которых изменения можно считать недостоверными в соответствии с *t*-критерием Стьюдента, и лектин омелы белой (VAA), связывание которого с клетками на ранних стадиях апоптоза снижается через 3 ч после введения глюкокортикоидов.

Результаты оценки связывания лектинов с тимоцитами, находящимися на поздних стадиях апоптоза (7AAD⁺), приведены в табл. 5. Большая часть лектинов лучше всего связывается именно с этой фракцией тимоцитов. Лектины подснежника (GNA) и амариллиса (HNA) связывают максимальное количество TMRM⁻7AAD⁺-timoцитов ($98,49 \pm 0,54 \%$ для GNA и $89,25 \pm 22,80 \%$ для HNA). Лектины виноградной улитки (HPA) и арахиса (PNA) связывают $96,47 \pm 1,06$ и $89,71 \pm 1,96 \%$ тимоцитов, относящихся к фракции TMRM⁻7AAD⁺. Уровень связывания в данном случае практически не зависит от воздействия глюкокортикоидов (достоверное изменение наблюдается для HPA через 6 ч после введения ГК — $91,62 \pm 1,59 \%$ TMRM⁻7AAD⁺-клеток). Наименьшее связывание с TMRM⁻7AAD⁺-timoцитами интактных животных, не превышающее 4 %, показано для лектинов бобовника (LABA) и банана (MBA).

Связывание всех лектинов с клетками, находящимися на поздних стадиях апоптоза, заметно увеличивается после воздействия ГК, хотя в некоторых случаях это изменение недостоверно. Единственным исключением является лектин омелы белой (VAA), для которого наблюдается достоверное уменьшение связывания на сроке 3 ч после инъекции ГК, что коррелирует с данными, представленными в табл. 4.

Таблица 4 / Table 4

Доля TMRM-7AAD⁻-лимфоидных клеток тимуса мыши, связавшихся с лектинами, через 3 и 6 ч после введения животным 2,5 мг гидрокортизона, процент от количества TMRM-7AAD⁻-timoцитов ($X \pm s, n \geq 4$) по каждой точке
 The number of TMRM-7AAD⁻ lymphoid cells of mouse thymus bound to lectins 3 and 6 hrs after the administration of 2.5 mg HC to animals, % of the number of TMRM-7AAD⁻ thymocytes, $X \pm s, n \geq 4$ at each point

Наименование лектина	Контроль (до введения гидрокортизона, 0 ч)	Через 3 ч после введения гидрокортизона	Через 6 ч после введения гидрокортизона
Без лектинов	3,42 ± 0,44	12,81 ± 0,76	19,16 ± 1,15
САВА	5,2 ± 1,07	18,38 ± 3,87**	20,20 ± 1,85***
ConA	6,18 ± 1,68	20,58 ± 2,70**	20,03 ± 0,74***
СVA	3,85 ± 1,30	13,13 ± 2,95*	10,88 ± 2,22*
GNA	93,03 ± 1,20	74,01 ± 2,10***	49,96 ± 4,03***
HNA	89,98 ± 22,42	71,95 ± 1,98	60,02 ± 2,07
HPA	61,35 ± 6,14	40,87 ± 4,07*	46,73 ± 5,41
LABA	0,74 ± 0,54	23,24 ± 4,20**	24,42 ± 0,01***
LBA	1,75 ± 0,85	23,92 ± 2,61***	26,61 ± 2,10***
LCA	7,77 ± 2,40	18,20 ± 2,49*	17,89 ± 3,71
LVA	2,13 ± 0,25	10,45 ± 1,73**	58,74 ± 10,81**
MBA	2,86 ± 0,86	1,93 ± 0,44	52,43 ± 7,63***
NPA	3,01 ± 0,67	10,65 ± 6,99	31,85 ± 9,60*
PHA	4,59 ± 0,12	16,87 ± 3,78*	15,61 ± 0,51***
PMRA	2,86 ± 0,71	10,76 ± 2,01**	2,94 ± 1,90
PNA	55,86 ± 4,96	57,78 ± 10,86	57,85 ± 4,32
PSA	6,53 ± 1,57	30,77 ± 2,54***	28,96 ± 3,88**
RCA	5,98 ± 1,47	25,50 ± 5,15*	24,63 ± 6,82*
SNA	15,08 ± 8,81	37,43 ± 4,20*	27,52 ± 5,12
SRA	2,35 ± 0,52	18,74 ± 2,89**	26,42 ± 3,79***
STA	3,28 ± 1,09	29,92 ± 2,44***	18,46 ± 2,43**
UDA	5,28 ± 4,50	12,87 ± 1,44	11,08 ± 0,72
VAA	2,95 ± 0,44	0,43 ± 0,32**	45,03 ± 8,07**
WGA	26,37 ± 2,01	30,35 ± 1,91	34,30 ± 5,25

Примечание. См. пояснения к табл. 3.

Таблица 5 / Table 5

Доля TMRM-7AAD⁺ лимфоидных клеток тимуса мыши, связавшихся с лектинами, через 3 и 6 ч после введения животным 2,5 мг гидрокортизона, процент от количества TMRM-7AAD⁺-timoцитов ($X \pm s, n \geq 4$) по каждой точке
 The number of TMRM-7AAD⁺ lymphoid cells of mouse thymus bound to lectins 3 and 6 hrs after the animals were injected with 2.5 mg of HC, % of the number of TMRM-7AAD⁺ thymocytes, $X \pm s, n \geq 4$ for each point

Наименование лектина	Контроль (до введения гидрокортизона, 0 ч)	Через 3 ч после введения гидрокортизона	Через 6 ч после введения гидрокортизона
Без лектинов	5,71 ± 1,52	8,80 ± 1,41	21,57 ± 2,57
САВА	19,12 ± 3,98	81,81 ± 4,49***	82,84 ± 1,35***
ConA	34,15 ± 10,18	71,62 ± 5,00*	78,39 ± 3,05**
СVA	5,01 ± 1,06	80,17 ± 4,08***	77,87 ± 3,00***
GNA	98,49 ± 0,54	91,62 ± 2,44*	69,32 ± 7,26**
HNA	89,25 ± 22,80	84,09 ± 1,38	60,58 ± 9,05
HPA	96,47 ± 1,06	91,74 ± 2,39	91,62 ± 1,59*
LABA	3,94 ± 1,13	88,37 ± 1,89***	74,05 ± 4,88***

Окончание табл. 5 / Continued tabl. 5

Наименование лектина	Контроль (до введения гидрокортизона, 0 ч)	Через 3 ч после введения гидрокортизона	Через 6 ч после введения гидрокортизона
LBA	18,78 ± 9,10	82,39 ± 2,59***	84,62 ± 3,43***
LCA	9,06 ± 1,49	85,52 ± 4,29***	80,57 ± 4,27***
LVA	11,32 ± 2,18	44,82 ± 6,84**	74,86 ± 5,48***
MBA	3,52 ± 0,53	12,92 ± 0,07***	52,26 ± 13,83*
NPA	23,25 ± 3,10	29,52 ± 2,96	45,84 ± 4,30**
PHA	25,11 ± 6,61	97,38 ± 0,14***	56,16 ± 6,68*
PMRA	15,22 ± 5,09	60,54 ± 11,47**	15,26 ± 14,31
PNA	89,71 ± 1,96	89,73 ± 5,17	81,32 ± 5,90
PSA	21,24 ± 4,91	90,88 ± 2,47***	86,49 ± 1,56***
RCA	22,62 ± 6,57	87,16 ± 3,53***	73,68 ± 12,06**
SNA	54,86 ± 16,86	98,09 ± 1,91*	83,14 ± 5,59
SRA	15,51 ± 3,49	44,21 ± 4,06**	65,74 ± 3,73***
STA	13,31 ± 1,85	76,27 ± 4,91***	71,17 ± 4,62***
UDA	7,66 ± 1,94	75,07 ± 6,42***	71,83 ± 1,49***
VAA	18,41 ± 3,7	1,14 ± 0,04**	59,45 ± 5,19***
WGA	69,90 ± 4,62	80,44 ± 7,38	58,19 ± 7,50

Примечание. См. пояснения к табл. 3.

Исходя из табл. 3–5, можно сделать вывод, что связывание лектинов подснежника, амариллиса, виноградной улитки и арахиса не зависит от жизнеспособности исследуемых тимоцитов мыши. Остальные лектины проявляют тропность к клеткам, находящимся на поздних стадиях апоптоза. Кроме того, полученные результаты позволяют говорить о возможности изменения углеводного состава плазматической мембраны клеток в результате воздействия глюкокортикоидов.

Обсуждение

Изменение гликозилирования плазматической мембраны сопровождается различными процессами, протекающими в клетке, такие как дифференцировка, активация и запуск апоптоза. Подобные изменения могут быть выявлены при помощи лектинов разной углеводной специфичности. В литературе представлены данные об изменении связывания различных лектинов с тимоцитами разной степени зрелости, а также клетками, находящимися на разных стадиях апоптоза [34, 36, 48].

На основании приведенных в табл. 2 результатов можно предположить, что как минимум два исследуемых лектина могут быть пригодны для типирования различных популяций тимоцитов. Лектины арахиса и виноградной улитки преимущественно связывают тимоциты на ранних стадиях созревания. Этот резуль-

тат полностью соответствует данным многих исследований, подтверждающих возможность использования лектина арахиса для выделения незрелых кортикальных тимоцитов [39, 40]. Данные табл. 2 также демонстрируют возможность применения этих лектинов для маркировки незрелых тимоцитов не только в гистохимических исследованиях [49], но и при проведении цитометрического анализа. Лектин виноградной улитки, специфичный к NAcGal, меньше востребован для изучения клеток тимуса, но уже широко применяется при выявлении малигнизированных клеток [50].

Согласно полученным в ходе работы данным большая часть исследованных лектинов связывается с тимоцитами, находящимися на поздних стадиях апоптоза (табл. 6). Этот феномен может иметь по меньшей мере три объяснения. Во-первых, в ходе апоптоза на поверхности клеток появляются разные углеводные структуры, не выявляемые на жизнеспособных клетках из-за их маскировки структурами гликокаликса. Так, многие углеводные детерминанты на поверхности клеток скрыты под сиаловыми кислотами [37]. Сиализация представляет собой последний этап модификации гликопротеинов, и многие осуществляющие ее сиалотрансферазы локализованы в транс-цистернах аппарата Гольджи [51, 52]. Нарушение работы аппарата Гольджи в результате запуска апоптоза может служить одной из причин возникновения на поверхности тимоцитов гликопротеи-

нов и гликолипидов, не прошедших последний этап гликозилирования. Возможным механизмом выхода частично не гликозилированных молекул на поверхность клетки может быть слияние некоторых участков аппарата Гольджи с плазматической мембраной [53].

Во-вторых, возможным механизмом проявления в ходе апоптоза специфических углеводных детерминант на поверхности клетки являются изменения физических свойств плазматической мембраны, в частности заряда на ней. Изменение заряда на мембране митохондрий (что отражает окрашивание красителем

TMRM [54]) и сопутствующее снижение синтеза АТФ неизбежно приведут к изменению заряда на клеточной поверхности. Не исключено, что по мере уменьшения заряда, обусловленного как составом гликокаликса, так и работой ионных каналов клетки, возникают дополнительные возможности для взаимодействия лектинов со структурами поверхностного аппарата (см. табл. 6, графа «Ранний апоптоз»).

Наконец, третий вариант трактовки полученных результатов — проникновение меченых лектинов внутрь клетки за счет повышения проницаемости мембраны на стадии позднего

Таблица 6 / Table 6

Индексы стимуляции связывания лектинов с тимоцитами мыши различной жизнеспособности через 3 и 6 ч после введения животным 2,5 мг гидрокортизона по отношению к исходной точке (0 ч)
Indices of stimulation of binding of lectins to mouse thymocytes of different viability 3 and 6 hrs after administration of 2.5 mg of HC to animals relative to the starting point (0 hrs)

Наименование лектина	Жизнеспособность					
	Живые		Ранний апоптоз		Поздний апоптоз	
	Через 3 ч после введения ГК	Через 6 ч после введения ГК	Через 3 ч после введения ГК	Через 6 ч после введения ГК	Через 3 ч после введения ГК	Через 6 ч после введения ГК
Без лектинов	0,86	0,65	3,75	5,60	1,54	3,78
САВА	0,40	0,61	13,24	21,76	6,59	16,37
ConA	1,58	1,35	12,47	18,16	3,23	8,67
CVA	0,34	0,81	12,77	15,83	24,66	58,71
GNA	0,84	0,64	2,98	3,01	1,43	2,66
HNA	0,85	0,65	3,00	3,74	1,45	2,56
HPA	0,59	0,59	2,50	4,27	1,47	3,59
LABA	8,36	4,06	117,63	184,88	34,57	71,00
LBA	9,71	7,36	51,20	85,19	6,76	17,02
LCA	2,14	3,49	8,77	12,90	14,55	33,59
LVA	0,51	72,17	18,38	154,50	6,10	24,98
MBA	1,50	93,20	2,53	102,70	5,66	56,08
NPA	0,41	10,04	13,25	59,28	1,96	7,45
PHA	0,73	4,36	13,77	19,05	5,98	8,45
PMRA	1,44	1,17	14,09	5,76	6,13	3,79
PNA	0,72	0,69	3,87	5,80	1,54	3,42
PSA	12,80	14,88	17,65	24,85	6,59	15,38
RCA	76,97	58,79	15,97	23,07	5,94	12,30
SNA	6,87	1,30	9,30	10,22	2,76	5,72
SRA	12,95	12,91	29,87	62,98	4,39	16,01
STA	4,47	1,91	34,17	31,53	8,83	20,20
UDA	3,38	2,75	9,13	11,76	15,10	35,42
VAA	0,12	8,14	0,55	85,52	0,10	12,20
WGA	1,41	0,97	4,31	7,29	1,77	3,14

Примечание. Серым цветом выделены случаи повторения лектинами динамики окраски, выявленной стандартными реагентами («без лектинов»). ГК — гидрокортизон.

апоптоза и их связывание там с новыми многочисленными лигандами. Такой механизм действия схож с механизмом окрашивания красителем 7AAD [54]. Последняя трактовка механизмов наблюдаемых эффектов косвенно подтверждается расширением круга лектинов, пригодных для оценки уровня апоптоза на его поздних сроках (см. табл. 6). Так, если динамику жизнеспособности «живых» клеток отражают 11 из 23 использованных лектинов (серые графы в таблице), то для оценки «раннего» апоптоза пригодны уже 16 лектинов, а для оценки «позднего» апоптоза — 20 из 23. Таким образом, связывание лектинов различной специфичности с тимоцитами, находящимися на поздних стадиях апоптоза, отражает происходящие с клеткой процессы.

Отдельного внимания заслуживает то, что отмеченный в ходе работы уровень апоптоза лимфоидных клеток тимуса значительно отличается от общепринятого значения и даже спустя 6 ч после введения глюкокортикоидов не достигает теоретических 96 %. Для интактных животных уровень общего (раннего и позднего) апоптоза в тимусе не превышает 6 % [14].

Анализируя полученные результаты и данные, представленные в литературе, можно говорить о перспективности использования лектинов различной углеводной специфичности для типирования различных популяций клеток тимуса. Особенно актуальным это может быть при переходе к сравнительному изучению процессов дифференцировки и созревания тимоцитов у животных разного систематического положения в отсутствие доступных коммерческих моноклональных антител.

Другим актуальным направлением применения лектинов является детекция разных стадий апоптоза. При этом весьма перспективным представляется использование лектинов, конъюгированных с различными флуорохромами, что позволяет одновременно оценивать наличие различных углеводных маркеров на поверхности клетки.

Выводы

1. Применение меченых лектинов для оценки стадии апоптоза тимоцитов мыши не имеет очевидных преимуществ по сравнению со стандартизированными синтетическими коммерческими препаратами. Степень связывания всех лектинов с тимоцитами в апоптозе возрастает по мере снижения заряда на мембране и повышения ее проницаемости.
2. Для типирования тимоцитов на ранних стадиях созревания возможно использова-

ние лектинов арахиса (PNA) и виноградной улитки (HPA). Лектины подснежника (GNA) и амариллиса (HNA) не пригодны для дифференцирования тимоцитов по зрелости.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Godfrey DI, Kennedy J, Suda T, Zlotnik A. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3⁺CD4⁺CD8⁻ triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol.* 1993;150(10):4244-4252.
2. Lesley J, Schulte R, Trotter J, Hyman R. Qualitative and quantitative heterogeneity in Pgp-1 expression among murine thymocytes. *Cell Immunol.* 1988;112(1):40-54. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(88\)90274-2](https://doi.org/10.1016/0008-8749(88)90274-2).
3. Pearse M, Wu L, Egerton M, et al. A murine early thymocyte developmental sequence is marked by transient expression of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(5):1614-1618. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.5.1614>.
4. Saint-Ruf C, Ungewiss K, Groettrup M, et al. Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science.* 1994;266(5188):1208-1212. <https://doi.org/10.1126/science.7973703>.
5. Sinclair C, Bains I, Yates AJ, Seddon B. Asymmetric thymocyte death underlies the CD4:CD8 T-cell ratio in the adaptive immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(31):E2905-2914. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304859110>.
6. Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am.* 1993;268(1):82-89. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0193-82>.
7. Buzás EI, György B, Pásztői M, et al. Carbohydrate recognition systems in autoimmunity. *Autoimmunity.* 2006;39(8):691-704. <https://doi.org/10.1080/08916930601061470>.
8. Alvarez G, Lascurain R, Hernández-Cruz P, et al. Differential O-glycosylation in cortical and medullary thymocytes. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760(8):1235-1240. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.024>.
9. Moody AM, Chui D, Reche PA, et al. Developmentally regulated glycosylation of the CD8α_h coreceptor stalk modulates ligand binding. *Cell.* 2001;107(4):501-512. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00577-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00577-3).
10. Palmer E. Negative selection-clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):383-391. <https://doi.org/10.1038/nri1085>.
11. Egerton M, Scollay R, Shortman K. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(7):2579-2582. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2579>.
12. Scollay RG, Butcher EC, Weissman IL. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur J Immunol.* 1980;10(3):210-218. <https://doi.org/10.1002/eji.1830100310>.
13. Мельникова В.И., Афанасьева М.А., Сапожников А.М., Захарова Л.А. Динамика апоптоза и пролиферации в ти-

- мусе и селезенке крыс в перинатальном онтогенезе // Онтогенез. – 2006. – Т. 37. – №. 4. – С. 286–291. [Melnikova VI, Afanasyeva MA, Zakharova LA, Sapozhnikov AM. Dynamics of apoptosis and proliferation in rat thymus and spleen during perinatal development (Ontogenesis). *Russian Journal of Developmental Biology*. 2006;37(4):237-241. (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/s1062360406040059>.
14. Старская И.С., Кудрявцев И.В., Гусельникова В.В., и др. Уровень апоптоза Т-лимфоцитов, созревающих в интактном тимусе // Доклады Академии наук. – 2015. – Т. 462. – № 2. – С. 238–240. [Starskaya IS, Kudryatsev IV, Guselnikova VV, et al. Apoptosis level in developing T-cells in the thymus. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2015;462(1):163-165. (In Russ.). <https://doi.org/10.1134/s1607672915030060>.
 15. Surh CD, Sprent J. T-cell apoptosis detected *in situ* during positive and negative selection in the thymus. *Nature*. 1994;372(6501):100-103. <https://doi.org/10.1038/372100a0>.
 16. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*. 2002;67(6):529-534. [https://doi.org/10.1016/s0039-128x\(01\)00171-4](https://doi.org/10.1016/s0039-128x(01)00171-4).
 17. Cohen JJ, Duke RC. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol*. 1984;132(1):38-42.
 18. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980;284(5756):555-556. <https://doi.org/10.1038/284555a0>.
 19. Screpanti I, Morrone S, Meco D, et al. Steroid sensitivity of thymocyte subpopulations during intrathymic differentiation. Effects of 17 beta-estradiol and dexamethasone on subsets expressing T-cell antigen receptor or IL-2 receptor. *J Immunol*. 1989;142(10):3378-3383.
 20. Wieggers GJ, Knoflach M, Buck G, et al. CD4⁺CD8⁺TCR^{low} thymocytes express low levels of glucocorticoid receptors while being sensitive to glucocorticoid-induced apoptosis. *Eur J Immunol*. 2001;31(8):2293-2301. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200108\)31:8%3C2293::aid-immu2293%3E3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200108)31:8%3C2293::aid-immu2293%3E3.0.co;2-i).
 21. King LB, Vacchio MS, Dixon K, et al. A targeted glucocorticoid receptor antisense transgene increases thymocyte apoptosis and alters thymocyte development. *Immunity*. 1995;3(5):647-656. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90135-3](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90135-3).
 22. Cima I, Corazza N, Dick B, et al. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T-cell activation. *J Exp Med*. 2004;200(12):1635-1646. <https://doi.org/10.1084/jem.20031958>.
 23. Iwamori M, Iwamori Y. Changes in the glycolipid composition and characteristic activation of GM3 synthase in the thymus of mouse after administration of dexamethasone. *Glycoconj J*. 2005;22(3):119-126. <https://doi.org/10.1007/s10719-005-0363-9>.
 24. Vandamme V, Pierce A, Verbert A, Delannoy P. Transcriptional induction of beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in rat fibroblast by dexamethasone. *Eur J Biochem*. 1993;211(1-2):135-140. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb19879.x>.
 25. Taniguchi A, Hasegawa Y, Higai K, Matsumoto K. Transcriptional regulation of human beta-galactoside alpha2, 6-sialyltransferase (hST6Gal I) gene during differentiation of the HL-60 cell line. *Glycobiology*. 2000;10(6):623-628. <https://doi.org/10.1093/glycob/10.6.623>.
 26. Wang XC, O'Hanlon TP, Lau JT. Regulation of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene expression by dexamethasone. *J Biol Chem*. 1989;264(3):1854-1859.
 27. Bies C, Lehr CM, Woodley JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(4):425-435. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.030>.
 28. Liener IE, Sharon N, Goldstein IJ. The lectins properties functions and applications in biology and medicine. Orlando: Academic Press, Inc; 1986.
 29. Wu AM, Lisowska E, Duk M, Yang Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj J*. 2009;26(8):899-913. <https://doi.org/10.1007/s10719-008-9119-7>.
 30. Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation-potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(6):477-488. <https://doi.org/10.1038/nrd1751>.
 31. Mody R, Joshi S, Chaney W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1995;33(1):1-10. [https://doi.org/10.1016/1056-8719\(94\)00052-6](https://doi.org/10.1016/1056-8719(94)00052-6).
 32. Reisner Y, Sharon N. Cell fractionation by lectins. *Trends Biochem Sci*. 1980;5(2):29-31. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(80\)80090-9](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(80)80090-9).
 33. Irlé C, Pigué PF, Vassalli P. *In vitro* maturation of immature thymocytes into immunocompetent T-cells in the absence of direct thymic influence. *J Exp Med*. 1978;148(1):32-45. <https://doi.org/10.1084/jem.148.1.32>.
 34. London J, Berrih S, Bach JF. Peanut agglutinin. I. A new tool for studying T lymphocyte subpopulations. *J Immunol*. 1978;121(2):438-443.
 35. 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):129-134. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(76\)90103-9](https://doi.org/10.1016/0008-8749(76)90103-9).
 36. Raedler A, Raedler E, Becker WM, et al. Subcapsular thymic lymphoblasts expose receptors for soy bean lectin. *Immunology*. 1982;46(2):321-328.
 37. Alvarez G, Lascurain R, Pérez A, et al. Relevance of sialoglycoconjugates in murine thymocytes during maturation and selection in the thymus. *Immunol Invest*. 1999;28(1):9-18. <https://doi.org/10.3109/08820139909022719>.
 38. Baum LG, Derbin K, Perillo NL, et al. Characterization of terminal sialic acid linkages on human thymocytes. Correlation between lectin-binding phenotype and sialyltransferase expression. *J Biol Chem*. 1996;271(18):10793-10799. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.18.10793>.
 39. Balcan E, Tuğlu I, Sahin M, Toparlak P. Cell surface glycosylation diversity of embryonic thymic tissues. *Acta Histochem*. 2008;110(1):14-25. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2007.07.003>.
 40. Balcan E, Gümüş A, Sahin M. The glycosylation status of murine [corrected] postnatal thymus: a study by histochemistry and lectin blotting. *J Mol Histol*. 2008;39(4):417-426. <https://doi.org/10.1007/s10735-008-9180-3>.

41. Fernandez JG, Sanchez AJ, Melcon C, et al. Development of the chick thymus microenvironment: a study by lectin histochemistry. *J Anat.* 1994;184(Pt 1):137-145.
42. Gheri G, Gheri Bryk S, Riccardi R, et al. 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. <https://doi.org/10.14670/HH-17.9>.
43. Paessens LC, Garcia-Vallejo JJ, Fernandes RJ, van Kooyk Y. The glycosylation of thymic microenvironments. A microscopic study using plant lectins. *Immunol Lett.* 2007;110(1):65-73. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.03.005>.
44. Franz S, Frey B, Sheriff A, et al. Lectins detect changes of the glycosylation status of plasma membrane constituents during late apoptosis. *Cytometry A.* 2006;69(4):230-239. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20206>.
45. Heyder P, Gaipf US, Beyer TD, et al. Early detection of apoptosis by staining of acid-treated apoptotic cells with FITC-labeled lectin from *Narcissus pseudonarcissus*. *Cytometry A.* 2003;55(2):86-93. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.10078>.
46. Ehrenberg B, Montana V, Wei MD, et al. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J.* 1988;53(5):785-794. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(88\)83158-8](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(88)83158-8).
47. Schmid I, Uittenbogaart CH, Giorgi JV. Sensitive method for measuring apoptosis and cell surface phenotype in human thymocytes by flow cytometry. *Cytometry.* 1994;15(1):12-20. <https://doi.org/10.1002/cyto.990150104>.
48. Bilyy RO, Antonyuk VO, Stoika RS. Cytochemical study of role of alpha-d-mannose- and beta-d-galactose-containing glycoproteins in apoptosis. *J Mol Histol.* 2004;35(8-9): 829-838. <https://doi.org/10.1007/s10735-004-1674-z>.
49. Jörns J, Mangold U, Neumann U, et al. Lectin histochemistry of the lymphoid organs of the chicken. *Anat Embryol (Berl).* 2003;207(1):85-94. <https://doi.org/10.1007/s00429-003-0331-8>.
50. Schumacher U, Brooks SA, Mester J. The lectin Helix pomatia agglutinin as a marker of metastases – clinical and experimental studies. *Anticancer Res.* 2005;25(3A):1829-1830.
51. Bast BJ, Zhou LJ, Freeman GJ, et al. The HB-6, CDw75, and CD76 differentiation antigens are unique cell-surface carbohydrate determinants generated by the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Cell Biol.* 1992;116(2):423-435. <https://doi.org/10.1083/jcb.116.2.423>.
52. Roth J, Taatjes DJ, Lucocq JM, et al. Demonstration of an extensive transubular network continuous with the Golgi apparatus stack that may function in glycosylation. *Cell.* 1985;43(1):287-295. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90034-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90034-0).
53. Morris RG, Hargreaves AD, Duvall E, Wyllie AH. Hormone-induced cell death. 2. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am J Pathol.* 1984;115(3):426-436.
54. Кудрявцев И.В., Головкин А.С., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. Современные методы и подходы к изучению апоптоза в экспериментальной биологии // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14. – № 6. – С. 461–482. [Kudryavtsev IV, Golovkin AS, Zurochka AV, Khaidukov SV. Modern technologies and approaches to apoptosis studies in experimental biology. *Med Immunol.* 2012;14(6):461-482. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2012-6-461-482>.

Сведения об авторах / Information about the authors

Мария Константиновна Серебрякова — научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0003-2596-4220>. SPIN-код: 3332-8732. E-mail: m-serebryakova@yandex.ru.

Анна Андреевна Доценко — соискатель отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», руководитель лаборатории клинической эмбриологии отделения вспомогательных репродуктивных технологий СПбГБУЗ «Городская Мариинская больница», Санкт-Петербург. E-mail: annadotsenkoem@gmail.com.

Игорь Владимирович Кудрявцев — канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>. SPIN-код: 4903-7636. E-mail: igorek1981@yandex.ru.

Александр Витальевич Полевщиков — д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург. <https://orcid.org/0000-0002-3342-178X>. SPIN-код: 9627-6694. E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru.

Maria K. Serebriakova — Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-2596-4220>. SPIN-code: 3332-8732. E-mail: m-serebryakova@yandex.ru.

Anna A. Dotsenko — Applicant, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, Head of the Clinical Embryology Laboratory, Department of Assisted Reproductive Technologies, City Mariinsky Hospital, Saint Petersburg, Russia. E-mail: annadotsenkoem@gmail.com.

Igor V. Kudryavtsev — PhD, Senior Researcher, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0001-7204-7850>. SPIN-code: 4903-7636. E-mail: igorek1981@yandex.ru.

Alexander V. Polevshchikov — PhD, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-3342-178X>. SPIN-code: 9627-6694. E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru.

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Александр Витальевич Полевщиков / Alexander V. Polevshchikov
E-mail: ALEXPOL512@yandex.ru