

Оригинальные работы

УДК 576.31:577.112.85:576.385.5

М.М. ЛУЦИК¹, А.М. ЯЩЕНКО¹, В.И. КОВАЛИШИН¹,
О.Е. ПРИДАТКО³, Р.С. СТОЙКА², М.Д. ЛУЦИК²

¹ Львовский национальный медицинский университет
им. Д. Галицкого

² Институт биологии клетки НАН Украины, Львов

³ Институт экспериментальной патологии, онкологии
и радиобиологии НАН Украины, Киев

E-mail: loutsik@cellbiol.lviv.ua, stoika@cellbiol.lviv.ua

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК ЛИМФОМЫ НК/Ly И ЛЕЙКОЗА L-1210 ПО УГЛЕВОДНОЙ СТРУКТУРЕ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ: ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СВЯЗЫВАНИЯ ЛЕКТИНОВ



Изучали гетерогенность углеводных детерминант клеточной поверхности в популяции асцитных клеток лимфомы НК/Ly и лейкоза L-1210 по признаку связывания лектинов чечевицы, пшеницы, арахиса и конканавалина А. Связанные с клетками лектины выявляли непрямым иммунохимическим методом с помощью полученных авторами антилектиновых поликлональных антител, меченных коллоидным золотом, с последующей проявкой ацетатом серебра. Выявлены достоверные различия в уровне связывания конканавалина А клетками НК/Ly (67 % Con A^+) и L-1210 (7,2 % Con A^+). Различия между штаммами опухолевых клеток в связывании других лектинов не были статистически достоверными. Относительно высокое процентное содержание PNA⁺ клеток может свидетельствовать о значительной степени десикализации мембранных гликопротеинов.

© М.М. ЛУЦИК, А.М. ЯЩЕНКО, В.И. КОВАЛИШИН,
О.Е. ПРИДАТКО, Р.С. СТОЙКА, М.Д. ЛУЦИК, 2011

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2011. № 2

Введение. Для выявления и идентификации углеводных детерминант на клеточной поверхности в качестве зондов применяют лектины и моноклональные антитела. Существующие методические подходы для выявления лектинов, связанных с тканевыми и клеточными структурами, можно разделить на две группы: прямые методы, в которых используют лектины, меченные флюорохромами, биотином, ферментами и т.п. [1–3], и непрямые иммунохимические методы, в которых для выявления связанного лектина применяют специфичные меченые антитела или лиганды [4–6]. Вторая группа методов представляется более рациональной, так как первичную обработку образца проводят нативным лектином, что исключает возможность изменения его углеводной специфичности при синтезе меченых производных. Новые возможности этого подхода открылись при использовании коллоидного золота в качестве метки с последующим выявлением микрочастиц золота с помощью солей серебра (immunogold silver staining, IGSS), что позволяет проводить исследование с помощью светооптической и электронной микроскопии [7–10].

Применение названного метода ограничивается главным образом доступностью соответствующих антилектиновых антител. Наиболее полный набор антител к лектинам производит фирма «E.Y. Laboratories» (США). Антитела к нескольким лектинам также предлагает фирма «Sigma-Aldrich» (США).

Цель настоящей работы состояла в исследовании поверхностных углеводных детерминант клеток экспериментальных опухолей — лимфомы НК/Ly и лейкоза L-1210, а также их распределения в популяции с помощью непрямого иммуноцитохимического метода детекции связывания лектинов. Для этого нами были специально получены поликлональные антитела, меченные коллоидным золотом, к лектинам с хорошо охарактеризованной углеводной специфичностью (LCL, WGA, PNA) [11–14]. В работе описан метод, который позволяет определять соотношение лектин-позитивных и негативных клеток в популяции с помощью светооптической микроскопии, а также определить локализацию метки на клеточной поверхности с помощью электронной микроскопии.

Материалы и методы. Исследование проводили на асцитных клетках лимфомы НК/Ly

и лейкоза L-1210 мышей. Штаммы опухолей получены из коллекции экспериментальных опухолей Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии НАН Украины. Перевивку опухолей осуществляли по стандартной методике [15]. Асцит лимфомы NK/Ly забирали в начальной (7–8-й день), развитой (13–14-й день) и терминальной (19–23-й день) стадиях роста опухоли, асцитные клетки лейкоза L-1210 получали на 6–7-й день роста опухоли. В асцитической жидкости подсчитывали количество клеток и, в ряде случаев, анализировали их распределение по размеру, используя для этого гемоцитометрическую камеру Горяева [16].

Антитела к лектинам чечевицы, арахиса и зародышей пшеницы получали иммунизацией кроликов соответствующим лектином в полном адьюванте Фрейнда: 0,5–1 мг антигена в 0,5 мл адьюванта вводили в три-четыре точки на спине животного, иммунизацию проводили трехкратно с интервалом между введениями 1 мес. Через 2 нед после последнего введения антигена забирали пробы крови объемом 12–15 мл. Забор осуществляли несколько раз с интервалом 10 дней. Антитела изолировали аффинной хроматографией на Т-геле [17, 18]. Очищенные таким образом препараты антител обладали достаточно высокой чувствительностью выявления лектинов, поэтому дальнейшей очистки с помощью иммуносорбции на иммобилизованном антигене не требовалось.

Получение коллоидного золота и абсорбцию антител на частицах осуществляли по методу Geoghean et al. [19]. К 10 мл раствора коллоидного золота добавляли 100–130 мкг иммуноглобулина, рН 7,2–7,5, или 40 мкг высокоочищенной пероксидазы, рН 7,2 (лиганд для выявления конканавалина А). Полученные растворы стабилизировали добавлением полиэтиленгликоля (мол. масса 20 000 Да) до концентрации 0,02 %, растворы хранили при 4 °С. Перед использованием аликвоту раствора коллоидного золота концентрировали в 5 раз путем центрифугирования при 12–18 тыс. об/мин 30–40 мин, полученный осадок частиц коллоидного золота суспендировали в растворе TBS, содержащем 0,02 % полиэтиленгликоля [13].

Для исследования связывания лектинов асцитные клетки обрабатывали следующим об-

разом: двукратная промывка аликвоты асцитных клеток холодным физраствором, забуференным фосфатом (ЗФР) путем центрифугирования 3 мин в пробирках типа Эппендорф при 1500 об/мин, фиксирование 0,1–0,2 % раствором глутарового альдегида в ЗФР в течение 15–20 мин при 4 °С, двукратное промывание холодным TBS, рН 7,4, суспендирование в 0,1 М растворе глицина в TBS и выдерживание при комнатной температуре 30 мин или в течение ночи при 4 °С, двукратное промывание холодным TBS, суспендирование в TBS. Дальнейшую обработку клеток лектинами проводили либо немедленно, либо, учитывая продолжительность процесса, после хранения суспензии при 4 °С в присутствии 0,02 % азида натрия не более трех дней.

Обработка лектинами: к 450 мкл раствора лектина в TBS, содержащем 1 мМ CaCl₂ и 1 мМ MnCl₂, вносили 50 мкл 50%-ной суспензии клеток в TBS и инкубировали при 4 °С в течение 1,5–2 ч, периодически встряхивая. Конечная концентрация лектинов составляла для конканавалина А 100 мкг/мл, LcL – 200 мкг/мл, WGA – 10 мкг/мл, PNA – 200 мкг/мл. После двукратного промывания холодным TBS клетки суспендировали в 0,4 мл раствора коллоидного золота, сенсibilизированного соответствующим антителом (для конканавалина А – пероксидазой хрена), инкубировали в течение 1,5–2 ч при 4 °С при периодическом перемешивании. Затем клетки промывали два-три раза холодным TBS, из осадка клеток отбирали небольшую часть (5–10 мкл), к которой добавляли равный объем сыворотки крови мыши, и готовили мазки для светооптической микроскопии (фиксация метанолом).

Для визуализации отложений коллоидного золота осуществляли физическую проявку мазков или клеточной суспензии ацетатом серебра по описанной ранее методике [10]. Мазки доводили до воды, наносили несколько капель проявляющего раствора ацетата серебра и выдерживали при комнатной температуре, контролируя процесс проявки микроскопически. Обычно время проявки составляло от 45–60 с для WGA до 10–15 мин для LcL. Мазки споласкивали дистиллированной водой и высушивали. Микроскопирование и фотосъемку препаратов проводили в водной среде.

Для проявки в суспензии клетки помещали в проявляющий раствор ацетата серебра в пробирках Эппендорф на время, установленное для мазков. Процесс останавливали осаждением клеток центрифугированием в течение 1 мин при 1500 мин^{-1} и двукратным промыванием водой. Часть клеточной суспензии оставляли для подсчета в камере Горяева, остальную фиксировали 1%-ным глутаровым альдегидом и заливали в смолу Эпон-812 согласно инструкции производителя («Fluka», Швейцария) с целью приготовления ультратонких и полутонких (1 мкм) срезов для электронной и световой микроскопии (микротом фирмы LKB, Швеция). Электронную микроскопию осуществляли на микроскопе УЭМБ-100 (Сумы).

Полутонкие срезы для световой микроскопии окрашивали, как описано Уикли [20], с небольшой модификацией. Срез погружали в каплю 1%-ного раствора толуидинового синего в растворителе (15%-ный этанол, 15%-ный глицерин, 0,02 М трис), выдерживали в течение 60–70 мин во влажной камере. После удаления красящего раствора и промывания водой на срез наносили 50–100 мкл 0,5%-ного сафранина Т в 0,01 М трис и прокрашивали в течение 10–15 мин. После удаления красителя срез промывали водой, высушивали и заключали в кедровое масло. Эти операции осуществляли под бинокулярной лупой.

Цитометрический анализ и количественную оценку результатов проводили на мазках и суспензии клеток в гемоцитометрической камере Горяева. При анализе мазков несколько полей зрения фотографировали цифровой камерой при определенном увеличении, монтировали кадры в программе «Photoshop» с общим количеством клеток не менее 300 и подсчитывали число лектин-положительных (связывающих) и отрицательных клеток на фотографиях. При анализе суспензий водную взвесь клеток после проявки (см. выше) вносили в камеру Горяева и подсчитывали количество лектин-положительных и лектин-отрицательных клеток (общее число не менее 500). Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel, достоверность различий определяли, используя критерий *t* Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. На рис. 1 представлены примеры цитологи-

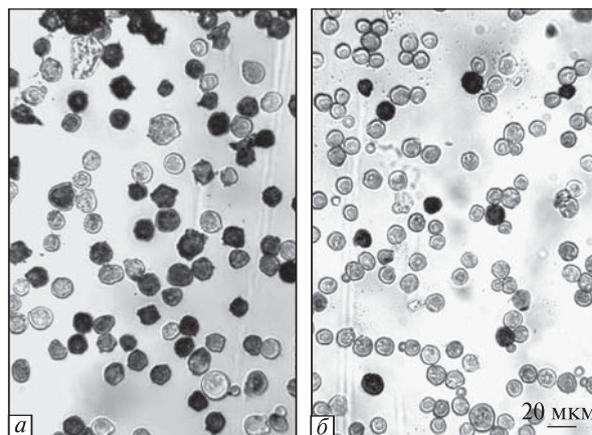


Рис. 1. Цитоморфологическая картина связывания лектина чечевицы с асцитными клетками NK/Ly (а) и L-1210 (б) при детекции связанного лектина с помощью антител, меченных коллоидным золотом, с последующим усилением путем проявки ацетатом серебра

Характеристика популяции асцитных клеток лимфомы NK/Ly и лейкоза L-1210 по связыванию лектинов

Лектин	Процентное содержание лектин-связывающих клеток, $M \pm \sigma$		
	NK/Ly, начальная стадия роста (n = 4)	NK/Ly, терминальная стадия роста (n = 5)	Лейкоз L-1210 (n = 5)
Конканавалин А	$67,0 \pm 12,1$	$70,6 \pm 14,2$	$7,2 \pm 1,4$
Лектин чечевицы	$13,6 \pm 2,2$	$9,2 \pm 1,9$	$8,5 \pm 1,7$
Агглютинин пшеницы	$81,8 \pm 7,3$	$78,4 \pm 7,6$	$95,7 \pm 9,4$
Лектин арахиса	$29,8 \pm 5,9$	$24,5 \pm 4,9$	$25,3 \pm 5,6$

Примечание. В контрольных образцах, где исключалась инкубация с лектином, количество псевдоположительных клеток не превышало 0,5 %, что намного меньше стандартного отклонения, поэтому поправки на контроль не делали.

ческой картины после обработки клеток лектинами предложенным методом. Наиболее четко различия между лектин-положительными и лектин-отрицательными клетками наблюдались после обработки PNA, что позволяет дифференцировать клетки по этому признаку с меньшей ошибкой. Интенсивность связывания Con A и LcL была более вариабельной: достаточно большая часть клеток (около 10–15 %) имели промежуточную между крайними

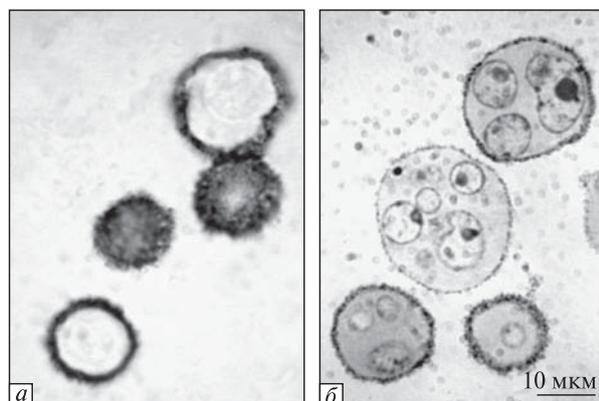


Рис. 2. Структура асцитных клеток NK/Ly в полутонких срезах (1,5 мкм) при различных способах их обработки: *а* – клетки NK/Ly на стадии интенсивного роста опухоли, обработка агглютинином пшеницы (WGA) без дополнительной окраски среза. Темные дисковидные структуры представляют собой срез апикальной части клетки, в которой наружная поверхность мембраны заполнена отложениями серебра; *б* – клетки NK/Ly в терминальной фазе роста опухоли, обработка WGA, окраска среза толуидиновым голубым. Четко проявляется структура ядер

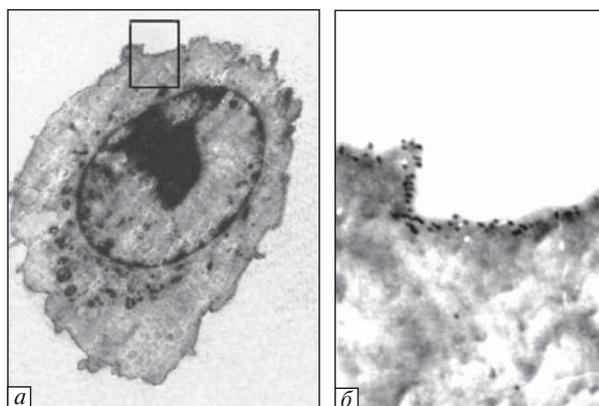


Рис. 3. Электронная микроскопия клетки NK/Ly после обработки WGA (проявку ацетатом серебра не проводили): *а* – увеличение $\times 8000$; *б* – фрагмент той же клетки после увеличения $\times 70\,000$, полученного с помощью компьютерной обработки первичного изображения

значениями интенсивность связывания этих лектинов. Это может быть причиной расхождений при субъективной оценке результатов различными исследователями. Результаты определения процентного содержания лектин-положительных клеток в асците лимфомы NK/Ly и

лейкоза L-1210 представлены в таблице. Отмечены достоверные различия в связывании Con A клетками исследованных опухолевых штаммов. Для клеток NK/Ly характерно связывание Con A с большей частью клеток популяции, что можно интерпретировать как экспонирование двухантенных N-гликозильных углеводных цепей на поверхности лектин-положительных клеток [11, 14]. В популяции клеток L-1210 содержание углеводных цепей этого типа существенно меньше. Не выявлено достоверных различий в связывании лектинов клетками NK/Ly в начальной и терминальной стадиях роста опухоли.

WGA связывался с большинством клеток обоих штаммов, более интенсивно с клетками L-1210, где практически все клетки являются WGA-положительными. Названный лектин проявлял высокое сродство к углеводам клеточной поверхности, интенсивное связывание наблюдалось при его концентрации 10 мкг/мл, в то время как для остальных лектинов эффективная концентрация составляла 100–200 мкг/мл. Интенсивное связывание WGA может быть обусловлено наличием большого количества терминальных остатков сиаловых кислот в углеводных цепях O- и N-типов [14].

Сравнительно высокий процент PNA-положительных клеток наблюдали в обеих популяциях, при этом он был большим у лимфомы NK/Ly. Это может быть обусловлено значительной степенью десиалирования углеводных цепей гликопротеинов преимущественно O-типа на клеточной поверхности. Отмечена обратная зависимость между связыванием WGA и PNA, что можно объяснить соответственно наличием (WGA +) или отсутствием (PNA +) терминальных остатков сиаловой кислоты в углеводных цепях гликопротеинов.

Особенность светооптического исследования структуры клеток на полутонких срезах (1–1,5 мкм), получаемых по технологии подготовки препаратов для электронной микроскопии, состояла в том, что проводку и заливку материала в эпоксидную смолу проводили после обработки суспензии клеток проявляющим раствором ацетата серебра. На неокрашенных срезах клетки четко контурированы отложениями серебра на цитоплазматической мембране (рис. 2, *а*). По интенсивности ободка можно

оценить содержание лектин-положительных клеток в популяции. После окрашивания срезов толудиновым голубым или же в комбинации его с сафранином очень хорошо выявлялась структура ядер (ядрышки, эухроматин и гетерохроматин) (рис. 2, б). Это позволяет осуществлять цитометрию структурных элементов ядер и анализировать их изменение при различных воздействиях, в частности, под влиянием химиотерапевтических препаратов на опухолевые клетки.

При электронно-микроскопическом исследовании тонких срезов установлено, что достаточную информацию о локализации частиц коллоидного золота на клетках можно получить при увеличении 7000 раз, что позволяет получать изображение всей клетки. Дальнейшее увеличение изображения до 50–70 000 раз с помощью фото- или компьютерной технологии позволяет четко увидеть локализацию отдельных частиц коллоидного золота (рис. 3, а, б), при этом нет особой необходимости применять дополнительную проявку для визуализации частиц золота. Результаты электронно-микроскопического исследования совпадают с данными светооптической микроскопии о локализации метки на клеточной поверхности и интенсивности связывания лектинов, однако определить количество лектин-связывающих клеток в популяции упомянутым методом не представляется возможным.

Таким образом, выявление связывания лектинов непрямой иммуногистохимическим методом с помощью меченых антилектиновых антител имеет следующие преимущества: а) первичная обработка клеток нативными лектинами исключает возможность изменения их углеводной специфичности вследствие химической модификации при введении метки или других воздействиях; б) чистота контроля, достигаемая благодаря исключению обработки клеток лектином. В прямых методах с использованием меченых лектинов редко удается достигнуть блокирования связывания лектина с углеводными детерминантами при помощи сравнительно простых углеводов-ингибиторов вследствие высокого сродства лектина к сложным углеводным группам гликопротеинов. Кроме этого, при использовании пероксидазы в качестве метки лектинов или антител существ-

венной проблемой является блокирование активности собственной пероксидазы объекта; в) метка коллоидным золотом с последующим усилением сигнала проявкой солями серебра позволяет проводить исследования параллельно электронной и световой микроскопией на тонких и полутонких срезах. Влияние методики гистохимической «окраски» лектинами на результат анализа очень хорошо продемонстрировано в работе Brooks et al. [4]. При анализе 373 случаев первичного рака груди авторами установлена очень высокая степень положительной корреляции между связыванием лектина улитки с опухолевой тканью и неблагоприятным прогнозом при непрямом методе «окраски». В то же время при использовании прямого метода «окраски» конъюгатом лектин – пероксидаза обнаружена слабая корреляция между этими показателями.

Существенной особенностью описанного нами метода является количественная оценка результата цитохимической реакции. При сравнении двух способов подсчета клеток – на фотоотпечатках мазков или в суспензии клеток в гемоцитометрической камере – нами установлено, что второй способ точнее соответствует действительности и дает меньшую ошибку. Это может быть обусловлено более равномерным распределением клеток в суспензии, чем на мазках в процессе их приготовления. Кроме этого, подсчет клеток в камере Горяева технически намного проще и быстрее, чем на фотоотпечатках, даже если не учитывать время, необходимое для съемки, монтажа и фотопечати изображения. Суспензия клеток хорошо сохраняется после окончательной обработки при 4 °С в присутствии 0,01 % азида натрия, и, кроме того, серебро является антисептиком.

Выводы. Оптимальным методом исследования углеводных детерминант клеточной поверхности является непрямой иммунохимический метод определения связывания лектинов с клетками при помощи антилектиновых антител, меченных коллоидным золотом. Из примененных нами лектинов более информативными в плане интерпретации структуры углеводных цепей являются конканавалин А, лектины чечевицы и арахиса. Агглютинин пшеницы вследствие высокого сродства к поверхности боль-

шинства клеток слабо выявляет различия в популяции по углеводным детерминантам клеточной поверхности. Разработанный нами метод можно применять для изучения изменений углеводных детерминант поверхности опухолевых клеток под воздействием химиотерапевтических препаратов, а также использовать для гистохимического выявления и характеристики углеводных групп тканевых структур.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Con A – конканавалин А
 LcL – лектин чечевицы
 PNA – лектин арахиса
 WGA – лектин зародышей пшеницы
 TBS – физиологический раствор + 10 мМ трис-буфер

*M.M. Lutsyk, A.M. Yashchenko, V.I. Kovalyshyn,
 O.E. Prydatko, R.S. Stoika, M.D. Lootsik*

HETEROGENEITY OF CELL POPULATION OF LYMPHOMA NK/Ly AND LEUKEMIA L-1210 ACCORDING TO CARBOHYDRATE STRUCTURE OF CELL SURFACE: IMMUNOCYTOCHEMICAL ANALYSIS OF LECTIN BINDING

The heterogeneity of tumor cell populations according to binding of lectins from lentil (LcL), wheat germs (WGA), peanut (PNA) and concanavalin A was investigated on a model of murine Nemeth-Kellner lymphoma (NK/Ly) and leukemia L-1210. Bound lectins were detected by indirect immunochemical method using home obtained polyclonal antilectin antibodies and immunogold silver staining (IGSS) technique. Significant differences in binding of Con A were revealed between NK/Ly (67 % Con A+) and L-1210 (7,2 % Con A+) cells, while the differences in binding of other lectins with both types of tumor cells were not significant. A relatively high percentage of PNA+ cells was registered that can indicate a high degree of desialization of membrane glycoproteins.

*M.M. Луцик, А.М. Яценко, В.И. Ковалишин,
 О.Ю. Придатко, Р.С. Стойка, М.Д. Луцик*

ГЕТЕРОГЕННІСТЬ ПОПУЛЯЦІЇ КЛІТИН ЛІМФОМИ НК/ЛЮ І ЛЕЙКОЗУ L-1210 ЗА ВУГЛЕВОДНОЮ СТРУКТУРОЮ КЛІТИННОЇ ПОВЕРХНІ: ІМУНОЦИТОХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЛЕКТИНІВ

Вивчали гетерогенність популяції асцитних клітин мишиної лімфоми Немета-Кельнера (НК/ЛЮ) і лейкозу L-1210 по зв'язуванню лектинів сочевиці, зародків пшениці, арахісу і конканаваліну А. Зв'язані з клітинами лектини виявляли непрямим імунохімічним ме-

тодом за допомогою отриманих нами поліклональних антилектинових антитіл, мічених колоїдним золотом, з наступною проявкою ацетатом срібла. Виявлено достовірні відмінності у зв'язуванні конканаваліну А клітинами НК/ЛЮ (67 % Con A⁺) і L-1210 (7,2 % Con A⁺), тоді як відмінності між штамами пухлинних клітин у зв'язуванні інших застосованих лектинів не були статистично достовірними. Зазначено порівняно високий вміст PNA⁺ клітин, що може свідчити про високий рівень десіалювання мембранних глікопротеїнів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Roth J., Binder M., Gerhard J. Conjugation of lectins with fluorochromes, an approach to histochemical double labelling of carbohydrate components // *Histochemistry*. – 1978. – **56**. – P. 265–273.
2. Луцик А.Д., Детюк Е.С., Луцик М.Д. Лектины в гистохимии. – Львов: Вища шк., 1989. – 141 с.
3. Шалай О.О., Логінський В.Є. Гліканові структури мембрани лімфоцитів у хворих на хронічну лімфоїдну лейкемію // *Онкологія*. – 2005. – **7**, № 1. – С. 19–22.
4. Brooks S.A., Lymboura M., Schumacher U., Leathem A.J. Histochemistry to detect *Helix pomatia* lectin binding in breast cancer: methodology makes a difference // *J. Histochem. Cytochem.* – 1996. – **44**. – P. 519–524.
5. Dolapchieva S., Eggers R., Kuhnel W. N- and R-cadherins expression in the rat sciatic nerve demonstrated by postembedding immunogold method on semi-thin sections // *Ann. Anat.* – 2001. – **183**. – P. 405–411.
6. Helliot B., Panis B., Busogoro J.P., Sobry S., Poumay Y., Raes M., Swennen R., Lepoivre P. Immunogold silver staining associated with epi-fluorescence for cucumber mosaic virus localization on semi-thin sections of banana tissues // *Eur. J. Histochem.* – 2007. – **51**. – P. 153–158.
7. Holgate C.S., Jackson P., Cowen P.N., Bird C.C. Immunogold silver staining: new method of immunostaining with enhanced sensitivity // *J. Histochem. Cytochem.* – 1983. – **31**. – P. 938–944.
8. Springall D.R., Hacker G.W., Grimelius L., Polak J.M. The potential of the immunogold silver method for paraffin sections // *Histochemistry*. – 1984. – **81**. – P. 603–608.
9. Taatjes D.J., Schaub U., Roth J. Light microscopical detection of antigens and lectin binding sites with gold labelled reagents on semithin Lowicryl K4M sections: usefulness of the photochemical silver reaction for signal amplification // *Histochem. J.* – 1987. – **19**. – P. 235–245.
10. Hacker G.W., Grimelius L., Danscher G., Bernatsky G., Muss W., Adam H., Thurner J. Silver acetate autometallography: an alternative enhancement technique for immunogold silver staining (IGSS) and silver amplification of gold, silver, mercury and zinc in tissues // *J. Histochem. Technol.* – 1988. – **11**. – P. 213–221.

11. *Лахтин В.М.* Лектини в дослідженні білків і вуглеводів. — М.: ВИНТИ, 1987. — С. 25–28. (Итоги науки и техники, сер. Биотехнология; Т. 2).
12. *Goldstein I., Hayes C.* The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals // *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* — 1978. — **35**. — Р. 127–340.
13. *Хомутовский О.А., Луцки М.Д., Передерей О.Ф.* Углеводная специфичность лектинов // *Электронная гистохимия рецепторов клеточных мембран.* — Киев: Наук. думка, 1986. — С. 8–33.
14. *Osawa T., Tsuji T.* Fractionation and structural assessment of oligosaccharides and glycopeptides by use of immobilized lectins // *Ann. Rev. Biochem.* — 1987. — **56**. — Р. 21–42.
15. *Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США /* Под ред. З.П. Софьиной и др. — М.: Медицина, 1980. — 295 с.
16. *Луцки М.Д., Бойко Н.М., Панчук Р.Р., Стойка Р.С.* Кореляція між зростанням розмірів клітин лімфони NK/Ly і зниженням життєздатності клітин та ефективності прищеплення асциту // *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія.* — 2006. — **4** (36). — С. 16–22.
17. *Belew M., Junti N., Larsson A., Porath J.* A one-step purification method for monoclonal antibodies based on salt-promoted adsorption chromatography on a «thiophilic» adsorbent // *J. Immunol. Meth.* — 1987. — **102**. — Р. 173–182.
18. *Oscarsson S., Porath J.* Covalent chromatography and salt-promoted thiophilic adsorption // *Anal. Biochem.* — 1989. — **176**. — Р. 330–337.
19. *Geoghean W., Ackerman A.* Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, WGA and immunoglobulin G on cell surface at the electron microscopic level // *J. Histochem. Cytochem.* — 1977. — **25**. — Р. 1187–1200.
20. *Уикли Б.* *Электронная микроскопия для начинающих.* — М.: Мир, 1975. — С. 298–301.

Поступила 01.12.09