

Grażyna KOŃSKA¹
 Urszula WÓJTOWICZ¹
 Anna PITUCH-NOWOROLSKA²

Możliwości zastosowania lektyn w diagnostyce i terapii. Cz.I. Zastosowanie diagnostyczne

¹Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
 P/o Kierownika Katedry: Dr hab. *Halina Ekiert*

²Zakład Immunologii Klinicznej Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
 Kierownik Zakładu:
 Prof. dr hab. *Marek Zembala*

Dodatkowe słowa kluczowe:

lektyny
 glikopolażenia
 terapia nowotworów
 terapia celowana
 badania histochemiczne

Additional key words:

lectins
 glycoconjugates
 cancer therapy
 drug targeting
 histochemistry methods

Lektyny są proteinami lub glikoproteinami, które w sposób swoisty i bez udziału enzymów wiążą określone ligandy węglowodanowe. Lektyny występują w organizmach znajdujących się na różnych szczeblach rozwoju ewolucyjnego (mikroorganizmy, rośliny, grzyby, zwierzęta) i pełnią w procesach życiowych tych organizmów ważne funkcje, a ich mechanizm działania oparty jest na reakcji glikozylacji. W organizmach kręgowców rola lektyn dotyczy zjawisk rozpoznawania komórkowego, kontroli proliferacji, adhezji, różnicowania komórkowego, mechanizmów tworzenia narządów jak również procesów obronnych. Zdolność lektyn do wiązania się z precyzyjnie określonymi strukturami cukrowymi oraz odwracalny charakter tych wiązań spowodował, że obecnie związki te wykorzystywane są powszechnie jako doskonałe narzędzia molekularne w różnych dziedzinach biologii i medycyny. Przy wykorzystaniu nowoczesnych metod chromatografii powinowactwa lektynowego - lectin affinity chromatography (LAC) oraz różnorodnych metod histochemicznych, lektyny mają praktyczne zastosowanie w śledzeniu zmian zachodzących na powierzchni błony komórek znajdujących się w różnych stadiach rozwoju fizjologicznego lub patologicznego ludzkich i zwierzęcych organizmów. Szczególnie ważne jest wykorzystanie lektyn w badaniach nad izolacją i strukturą glikopolażeń istotnych w procesach patologicznych (w tym również w procesie transformacji nowotworowej). Pierwszą dziedziną medycyny w której wykorzystano określone zdolności lektyn do wiązania cukrów była serologia. Podwalinami były odkrycia w 1948 r przez Rekonen'a i w 1963 r przez Boyd'a wybiórczej zdolności pewnych lektyn do wiązania się z ludzkimi i zwierzęcymi antygenami grupowymi krwi. Kolejne odkrycie przez Nowell'a (1960 rok) mitogennych właściwości fitohemaglutyniny (PHA) w stosunku do limfocytów ludzkich pozwoliło na wykorzystanie lektyn do badań genetycznych oraz oceny funkcji limfocytów T in vitro poprzez pomiar proliferacji po stymulacji PHA.

Lectins are proteins or glycoproteins binding selectively and without the involvement of enzymes specific for carbohydrate ligands. Lectins are present in organisms on different levels of evolutionary development and play very important roles in life processes of these organisms. Lectins' functioning mechanism is based on the reaction of glycolysation. In vertebrates, functions of lectins are connected with cell recognition, proliferation control, adhesion, cell differentiation, mechanisms of organ creation, and defense mechanisms. Due to their ability to bind reversibly with specific carbohydrate structures, Lectins have commonly been used as a perfect molecular tool in various disciplines of biology and medicine. With the use of modern methods of lectin affinity chromatography (LAC) and various histochemistry methods, lectins provide practical application during observation of changes occurring in the cell membrane in different stages of physiological and pathological development of human or animal organisms. What is particularly important is lectins' contribution to studies on the isolation and structure of glycoconjugates in clinical pathology (including processes of tumor transformation). Serology was the first discipline of medicine relying on the specific activity of lectins. It had been based on the discoveries (by Rekonen in 1948 and Nowell in 1960) that proved that some lectins are able to bind with human and animal blood group antigens. Another discovery (by Nowell in 1960s) of mitogenic effect of PHA on human lymphocytes made lectins helpful and commonly used in the diagnosis of genetic conditions in several diseases. Proving that lectins bind differently with glycoconjugates of normal and tumor cells and are able to detect subtle neoplastic changes was a clue that lectins can be precious and useful in cancer treatment and diagnostics. For many years lectins inducing apoptosis, with immuno-modulatory or antiproliferative activity and

Adres do korespondencji:
 Grażyna KOńska
 Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej CM UJ
 30-688 Kraków, ul. Medyczna 9
 Tel./Fax: 012 657 00 22

Wykazanie zróżnicowanego sposobu wiązania się lektyn z glikokoniugatami komórek prawidłowych i transformowanych było wskazówką, że poprzez ujawnianie subtelných zmian w strukturze glikokoniugatów komórek nowotworowych, lektyny mogą stanowić cenne narzędzie przydatne w diagnostyce i terapii nowotworów. Od wielu lat trwają badania nad wykorzystaniem licznych lektyn o aktywności immunomodulującej, antyproliferacyjnej, indukującej apoptozę, oraz lektyn toksycznych należących do klasy białek II-RIP (rycyny, wiskuminy) w terapii różnorodnych chorób, w tym szczególnie chorób nowotworowych. Współcześnie podejmowane są również próby wykorzystania lektyn w terapii celowanej (lektyny jako nośniki leków), udział lektyn w przygotowaniu preparatów bioadhezyjnych tzw. drugiej generacji. Przedstawiona praca jest próbą zebrania najnowszych wiadomości na temat diagnostycznych i terapeutycznych możliwości wykorzystania lektyn.

Zastosowanie lektyn w hematologii i serologii

Dzięki zdolności do wybiórczego wiązania się z fragmentami łańcuchów cukrowych obecnych na powierzchni komórek krwi, lektyny mają praktyczne zastosowanie w diagnostyce serologicznej do oznaczania antygenów grupowych układu ABO, oraz (co obecnie jest szczególnie cenne), także innych układów (MNSs, Lewis, P, Ii). Przy udziale lektyn istnieje możliwość nie tylko identyfikacji antygenów grupowych na erytrocytach, ale również ich izolacji z różnych tkanek i płynów ustrojowych [21,24,27]. Wykazano zróżnicowanie strukturalne antygenów zlokalizowanych w poszczególnych tkankach tzw. „wydzielaczy” (Ss) i „niewydzielaczy” (ss). Dla przykładu lektyna DBA (*Dolichos biflorus*), GSA-I (*Griffonia simplicifolia*), aglutynina SJA (*Sophora japonica*) i VVA (*Vicia villosa*) łączą się z antygenami A na komórkach gruczolów ślinowych wyłącznie u wydzielaczy, natomiast PNA (*Arachis hypogaeae*) daje pozytywną reakcję wiązania z komórkami błony śluzowej żołądka jedynie u niewydzielaczy. Zaobserwowano także różnice w wiązaniu się lektyn anti-H z komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych u osób o różnym fenotypie układu grupowego krwi ABO [21].

Zastosowanie lektyn pozwoliło na uzyskanie wielu informacji na temat prawidłowej i nieprawidłowej struktury determinant cukrowych, uzyskanie np. dokładnej topografii receptorów powierzchniowych erytrocytów podczas ich cyrkulacji w krwioobiegu [24, 66], jak również badanie glikoforyny A obecnej na ludzkich erytrocytach [35,54]. Lektyny pomogły również w zdefiniowaniu różnych patologicznych anomalii strukturalnych głównie antygenów grupy MN, Ii oraz Lewis, oraz pojawiających się nowych struktur (antygen TF, Tn) związanych z chorobami nowotworowymi (tabela I).

Lektyny w diagnostyce mikrobiologicznej

W mikrobiologii klinicznej lektyny używane są do różnicowania i identyfikacji blisko spokrewnionych patogenów jak również do badania mechanizmów interakcji (przyleganie, internalizacja oraz efekty cytotoksyczne i reakcje obronne) pomiędzy komórkami pasożyta i gospodarza [23].

Takie lektyny jak HPA (ze ślimaka *Helix pomatia*), DBA (z *Dolichos biflorus*), lektyna z *Wisteria floribunda* posłużyły do identyfikacji gatunków paciorkowców (np. *Streptococcus equisimilis*, *S. zooepidemicus*, *S. dysgalactiae*) [45]. W charakterystyce epi-

demiologicznej *Neisseria gonorrhoea* pomocna jest lektyna GSA (z *Griffonia simplicifolia*) [57].

Liczne roślinne lektyny wiążące się z lipopolisacharydem (LPS) mogą być używane do typowania szczepów bakterii Gram (-), głównie *Campylobacter*, a także spokrewnionego *Helicobacter pylori*. Prostymi i niedrogimi metodami przy zastosowaniu lektyn udało się efektywnie wyizolować 45 różnych szczepów bakterii z rodzaju *Campylobacter* [1]. Przy użyciu lektyn możliwa jest także identyfikacja niebakteryjnych np. drożdżakowych patogenów ludzkich jak np. blisko spokrewnione gatunki rodzaju *Candida* [14]. Okazało się, że lektyna z grzyba *Russula nigricans* posiada wyjątkową wybiórczość wiązania się z receptorami powierzchniowymi *Candida albicans*, (co może być wykorzystane w testach diagnostycznych) [51]. Również liczne gatunki pierwotniaków z rodzaju *Crithidia*, *Blastocystidia*, *Leishmania* lub *Trypanosoma* mogą być identyfikowane przy pomocy lektyn. W niektórych przypadkach możliwe jest określenie ich stadium rozwojowego [13,50].

Odmienna siła i wybiórczość reakcji lektyn z powierzchniowymi strukturami cukrowymi jaj pasożytów pozwala na wykorzystanie lektyn znakowanych FITC w udoskonalaniu metod identyfikacji jaj pasożytniczych w kale ludzi i zwierząt [7].

Badania nad wyjaśnianiem mechanizmu interakcji pasożyt-gospodarz oraz zjawiskach oporności lekowej pasożytów przy udziale lektyn prowadzone były od dawna [10,23]. Intensywnie prowadzone badania nad mechanizmem przylegania do komórek gospodarza *Chlamydia pneumoniae* oraz *Ch. trachomatis* (odpowiedzialnego m.in. za zapalenie stawów, zakażenia układu moczowo-płciowego oraz zakażenia okołoporodowe) wykazały istnienie receptorów glikozaminoglikanowych (*heparan-like sulphate receptor*) w komórkach śródbłonna ludzkiego z którymi prawdopodobnie wiążą się komórki pierwotniaków. Przy pomocy roślinnej lektyny z *Galanthus nivalis* udowodniono, że w procesie wychwytu chlamydii do komórek gospodarza duże znaczenie odgrywa endogenna ludzka lektyna MBP (*mannose binding protein*). Gen kodujący białko MBP determinuje podatność na zakażenia *Ch. pneumoniae*. Przy wykorzystaniu techniki LAC (chromatografia powinowactwa lektynowego) zidentyfikowano białko MOMP (*Major Outer Membrane Protein*) szczególnie zaangażowane w interakcje z MBP [59]. Jednocześnie wykazano *in vitro* z wykorzystaniem linii fibroblastów L-929, że roślinna

toxic lectins belonging to II-RIP class (Ribosome Inactivating Proteins like viscumin, ricin) have been intensively examined in therapy of various diseases, esp. in cancer. Currently the use of lectins in drug targeting is being examined (lectins as drug-carriers, the preparation of bioadhesive "Second Generation" drug-delivery systems). Paper presents below is an attempt at collecting the latest information on diagnostic and therapeutic application possibilities of lectins.

lektyna z *Arum maculatum* posiada właściwości ochronne przed wiązaniem się *Ch. pneumoniae* z powierzchnią komórek [43]. Obserwacje interakcji pasożyt-gospodarz wskazywały również na udział struktur cukrowych w mechanizmach oporności lekowej pasożytów. Badania prowadzone na przykładzie *Trichomonas vaginalis* wykazały, że formy lekooporne posiadają glikopłączenia mannozowe, (wiązane specyficznie przez lektynę Con), podczas gdy formy lekowrażliwe – struktury zawierające N-acetyloglukozaminę (wiążące się z WGA – lektyną z kielków pszenicy) [23].

Lektyny w badaniach histologicznych

Przy pomocy metod immunohistochemicznych oraz lektynowej chromatografii powinowactwa udało się ustalić strukturę glikokoniugatów różnych tkanek jak również ich zróżnicowanie w obrębie tej samej tkanki w zależności od stanu fizjologicznego lub patologicznego. Przy pomocy DBA (lektyny z *Dolichos biflorus*) można wykazać różnice strukturalne powierzchni komórek naskórka płodowego (reakcja negatywna) i komórek naskórka dorosłych (reakcja pozytywna) [68], a przy pomocy lektyn z *Ricinus communis* i *Maclura pomifera* różnice w strukturze glikokoniugatów komórek powierzchniowych pęcherzyków płucnych i komórek produkujących surfaktant [4]. Dobrym markerem komórek mikrogleju człowieka jest lektyna z *Ricinus communis* [68]. Glikoproteiny występujące w tkance mózgowej bogate w reszty fukozytowe badane były przy pomocy lektyn fukozylo-specyficznych, m.in. AAL (grzybowej lektyny z *Aleuria aurantia*), którą zastosowano do monitorowania dróg przewodzenia neuronowego, procesu odnerwiania organów oraz izolacji związków podlegających transportowi w aksonach komórek nerwowych [16, 48]. Lektyna HPA (ze ślimaka *Helix pomatia*) wykazuje wiązanie z obszarami zajmowanymi przez limfocyty T w węzłach chłonnych, migdałkach, grasicy i śledzionie [54]. WGA może być stosowana do frakcjonowania komórek szpiku kostnego, ze względu na selektywną aglutynację limfocytów B i ich prekursorów [52]. Wyznacznikiem lokalizacji mastocytów umiejscowionych w tkance łącznej może być lektyna z *Maackia amurensis* [41].

Szczególnie istotne znaczenie mają badania histochemiczne z udziałem lektyn, pozwalające na izolację z tkanek lub płynów ustrojowych N/O-glikanów (hormony, antygeny zgodności tkankowej, interferony, enzymy, markery limfocytarne, proteiny oso-

cza) występujących w śladowych ilościach i nie pozwalających na detekcję metodami klasycznymi. Badania te dały możliwość dogłębnego studiowania zmiany struktury glikokoniugatów w różnych stanach patologicznych [29]. Przy udziale lektyny z *Aleuria aurantia* analizowano różnicę w strukturze fukozylowanych oligosacharydów glikoprotein ludzkich w tym również w paraproteinemii np. białka *Bence-Jonesa* [66]. Ta sama lektyna z *Aleuria aurantia* wraz z inną lektyną grzybową PVL z (*Psathyrella velutina*) umożliwiły określenie zmian zachodzących w strukturze łańcuchów cukrowych IgG między innymi w reumatoidalnym zapaleniu stawów [18, 37]. Konkanawalina A (Con A) była stosowana do rozróżniania form gonadotropin LH i FSH wydzielanych przez przysadkę w normalnym cyklu miesięcznym i w okresie postmenopauzalnym [54].

Zastosowanie mitogennych i immunomodulujących właściwości lektyn

Określenie lektyn mianem „mitogenne”, oznacza przede wszystkim ich zdolność do indukowania transformacji blastycznej komórek, czyli uruchomienia mechanizmów przejścia komórek z fazy spoczynku G0 do fazy G1/S, a następnie stymulacji do podziałów mitotycznych. Aktywność immunomodulująca lektyn nie zawsze doprowadza do wejścia komórki w fazę M (podziałów mitotycznych). W komórce stymulowanej lektynami mitogennymi indukowana jest synteza wielu czynników, w tym specyficznych cytokin, limfokin które nie są syntetyzowane przez komórki w fazie spoczynkowej. Obok interleukin, limfocyty produkują także czynnik hamujący migrację makrofagów (MIF), limfotoksynę oraz interferony [2].

Większość lektyn działa stymulująco na populację limfocytów T [2,38,52]. Pierwszymi poznanymi aktywatorami komórek T były: PHA (fitohemaglutynina), ConA (konkanawalina A) i PWM (mitogen szkarłatki – lektyna z *Phytolacca americana*) [2]. Swoista aktywność lektyn ograniczoną tylko do populacji limfocytów B obserwuje się rzadziej (np. roślinna lektyna z *Dictyostelium purpureum* oraz lektyna z kraba *Homarus americanus*) [2].

Zdolność do indukowania tworzenia form blastycznych oraz indukowania proliferacji limfocytów, uczyniła lektyny ważnym narzędziem diagnostycznym i badawczym. Stymulację PHA, ConA i PWM wykorzystuje się w badaniach diagnostycznych i monitorowaniu niedoborów odporności związanych z zaburzeniami funkcji limfocytów T [2]. Zastosowanie mitogennych lektyn jak PHA czy ConA pozwoliło na uzyskanie mitoz badanych komórek, co jest wykorzystywane rutynowo w ustalaniu kariotypu ludzkiego i ułatwiło diagnozowanie licznych chorób uwarunkowanych genetycznie [68].

W przypadku pobudzającego działania lektyn immunomodulujących na układ odporności, wydzielanie limfokin jest przedmiotem badań, a częściowo jest także wykorzystywane praktycznie [2]. Dość dobrze udało się wyjaśnić pobudzający wpływ lektyn roślinnych, głównie WGA (lektyna z kielków pszenicy), a także UDA (lektyna pokrzywy), na produkcję interleukiny-2 (IL-2) oraz

Tabela I

Lektyny wykazujące powinowactwo do antygenów TACA - tumor associated carbohydrate antigens.

Antygeny nowotworowe	Specyficzne lektyny
Antygeny Lewis, (Lex) Galβ 1-4GlcNAc(α 1-3Fuc) β 1-3Gal	EEA (Euonymus europaeus), LTA (Lotus tetragonolobus) [15, 52]
(Ley) Gal(α 1-2Fuc) β 1-4GlcNAc (α 1-3Fuc) β 1-3Gal	UEA (Ulex europaeus) - specyficzna również wobec antygeny H [52]
Antygen Ii (Galβ 1-4 GlcNAc)	ECA (Erythrina cristagalli), PSL (Laetiporus sulphureus), [15, 30]
antygen Tn: GalNAcA-Ser/Thr	DBA (Dolichos biflorus), LBL (Phaseolus lunatus Lima bean), HPA (Helix pomatia), RCA-1 (Ricinus communis), SBA (Glycine max), SSL (z Salvia sclarea), lektyna Molucella laevis VVA-B4 (Vicia vilosa), GSI-A4 (Griffonia simplicifolia), WFA (Wistaria floribunda) [15, 52, 64, 65]
antygen TF: Galβ 1-3GalNAcA-Ser/Thr	ABL (Agaricus bisporus), ACA (Amarantus caudatus), BPA (Bauhinia purpurea), BBL (Beauveria bassiana), JAC (Artocarpus integrifolia), LDL (Lactarius deliciosus), MPA (Maclura pomifera), PNA (Arachis hypogaea), SJA (Sophora japonica), VGA (Vicia graminea), [11, 15, 33, 52].

Tabela II

Lektyny w diagnostyce/prognostowaniu nowotworów:	- badania cytochemiczne, histochemiczne; - serodiagnostyka; - radioobrazowanie (scyntygrafia);
Lektyny w terapii przeciwnowotworowej:	- terapia celowana, nośniki leków (użycie lektyn np. PNA, WGA w konstrukcji systemów terapeutycznych); - oplaszczanie mikrocząstek lektynami np. WGA, UEA; lektyny jako nośniki radioizotopów; lektyny połączone z DNA w terapii genowej); - terapia bezpo- średnia, cytotoksyny (łańcuch A rybcy, abryny, ML-I); - modyfikacja odpowiedzi immunologicznej - działanie immunomodulacyjne i immunotoksyczne (PHA-L4, PWM, rybcyna, ML-I)

ekspresję receptora dla tej interleukiny (IL-2R) [2,44]. Właściwości immunostymulujące stwierdzono również dla lektyny z *Aralia cordata*, która stymuluje produkcję interleukiny-8 (IL-8) oraz dla aglutyniny z *Abrus precatorius*, zwiększającej produkcję cytokin IL-2, IFN-γ (interferonu γ), TNF (czynnika martwiczego nowotworów) [34,61]. Właściwości immunomodulacyjne posiadają także lektyny pochodzenia grzybowego jak np. VVL (z jadalnego grzyba *Volvariella volvacea*) [56] czy FIP-fve (z grzyba *Flammulina velutipes*). Limfocyty T aktywowane przez FIP-fve zwiększały produkcję i sekrecję cytokin w tym również IFN-γ, ponadto lektyna ta wykazywała aktywność mitogenną [62]. Po podaniu dootrzewnowym ConA stwierdzono u gryzoni wzrost produkcji IFN-γ przez komórki NK wątroby [42]. W przypadku inkubacji komórek z dzakaliną (lektyna z *Artocarpus integrifolia*) obserwuje się wzmożoną sekrecję IL-6, IFN-γ i prawdopodobnie IL-2 [25].

Zastosowanie lektyn w diagnostyce schorzeń nienowotworowych

Choroby spichrzeniowe związane z zaburzeniami glikozylacji: Nieprawidłowości w glikozylacji i budowie chemicznej glikoprotein mogą pojawić się m.in. w przebiegu wrodzonych zaburzeń glikozylacji (CDG – *Congenital Disorders of Glycosylation*), czyli grupie dziedzicznych zaburzeń metabolicznych dotyczących różnych narządów. W wykrywaniu tych chorób pomocne mogą być lektyny. Reagują one ze specyficznymi sekwencjami węglowodanowymi i pozwalają na detekcję nieprawidłowych komórek i

związków [8]. W diagnozowaniu chorób spichrzeniowych grupy glikolipidów używana jest np. PNA (lektyna z orzeszków ziemnych *Arachis hypogaea*), która jest również stosowana jako marker dla komórek histiocytozy X (H-X) [68].

Choroby reumatyczne: Niektóre choroby reumatyczne są związane ze znacznymi defektami ekspresji galaktozylotransferazy. W strukturach cukrowych cząsteczki IgG brak terminalnej galaktozy powoduje odsłonięcie nie redukujących łańcuchów N-acetylogalaktozamin. Do wykrycia eksponowanych struktur galaktozy i N-acetylogalaktozamin posłużyły znakowane lektyny o odpowiedniej specyficzności na przykład grzybowa lektyna PVL (z *Psathyrella velutina*) [37]. W określaniu zmian w strukturze łańcuchów cukrowych IgG w reumatoidalnym zapaleniu stawów (RA) pomocne są lektyny: AAL (z *Aleuria aurantia*) [18] oraz ConA. Rola tej drugiej lektyny polega na oznaczeniu poziomu α1-antychymotrypsyny – glikofory nie reagującej z ConA [6, 54].

Nefropatia IgA to forma zapalenia kłębków nerkowych, charakteryzująca się odkładaniem IgA w mezenchymie kłębka nerki. Wysokie stężenia IgA1 w surowicy chorych można wykryć za pomocą dzakaliny (lektyny z *Artocarpus integrifolia*) znakowanej FITC. Zastosowanie dzakaliny w chromatografii powinowactwa lektynowego pozwala na wyizolowanie IgA1 z surowicy krwi w 90% już w czasie 2 godzin; wcześniej wykrycie immunoglobulin IgA1 klasycznymi metodami było trudne i pracochłonne [25]. Wiązanie ludzkich przeciwciał IgA1 zostało udowodnione również dla lektyn *Agaricus bisporus*

Tabela III

Przykłady lektyn znajdujących zastosowanie w diagnostyce nowotworów.

Examples of lectins use in the process of neoplastic diagnostics.

Lektyna:	Zastosowanie w wykrywaniu nowotworów:
PNA	- specyficzna wobec antygeny T-F, używana w metodach histochemicznych ludzkich nowotworów pęcherza moczowego, jelita grubego, trzustki, bardzo aktywna <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> w stosunku do komórek nowotworu jajnika i sutka [3,11,30,31]
ConA	- używana w różnicowaniu chłoniaków od rozrostów nienowotworowych, wiąże się z histiocytami grudek chłoniaka foliukulego, umożliwiając wyróżnienie jego podtypów [67]; - pomocna przy wykrywaniu, izolacji z surowicy krwi α -fetoproteiny i diagnozowania nowotworów wątroby [54]; - pozwala na rozróżnianie oligosacharydów prawidłowych komórek ludzkiego nabłonka przełyku i nabłonka płaskokomórkowego raka przełyku [67]; - umożliwia identyfikację antygeny prostatowego (PSA), matryce z ConA i WGA stosuje się w rozróżnianiu raka prostaty od łagodnego przerostu [54]
RCA	- odróżnia histiocyty prawidłowe (RCA+) od nowotworowych (RCA) [67]; - marker α -fetoproteiny w surowicy chorych na nowotwory wątroby i woreczka żółciowego [20]
UEA	- wiąże się z komórkami gruczołakoraka i gruczołaka jelita grubego, natomiast nie daje reakcji z prawidłowymi komórkami błony śluzowej jelita [67]
DSA	- może być stosowana w rozróżnianiu typów hCG, ponieważ reaguje z łańcuchami cukrowymi ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej w nowotworach rozrostowych, np. inwazyjnym nabłonku kosmówkowym [54]; - stosowana w wykrywaniu płaskokomórkowego raka przełyku [67]
MAA	- pomocna w różnicowaniu prawidłowych limfocytów i komórek białaczki Stosowana w badaniach nad przewlekłymi i ostrymi białaczkami [3]; Wykazuje powinowactwo do węglowodanów antygeny prostatowego PSA [49]
PHA	- podobnie jak ConA używana do detekcji α -fetoproteiny z surowicy krwi [52]; - wiążąc β 1 \rightarrow 6 rozgałęzione łańcuchy cukrowe (występujące np. w strukturze GlcNAc β 1 \rightarrow 6Man α 1 \rightarrow 6Man β) - jest przydatna w wykrywaniu subtelných różnic pomiędzy glikokonjugatami komórek nowotworów złośliwych a komórek prawidłowych, których nie można wykryć za pomocą przeciwciał monoklonalnych [15,17,44]; - PHA-E4 używana jest do wykrywania protein produkowanych przez komórki złośliwego nowotworu pęcherzyka żółciowego [52]; - wiąże się z łańcuchami cukrowymi γ -glutamylotransferazy w nowotworach nerek [52]
VVA B4	- specyficzna w stosunku do antygeny Tn, wiąże się z komórkami nowotworów jamy ustnej, jelita grubego jajników i sutka [15,30,31]
AIA	- używana w reakcjach histochemicznych do wykrywania łagodnych i złośliwych zmian nowotworowych sutka i tarczycy, wykazuje wysoką kumulację w komórkach neoplastycznych [25]
BPL	- używana jako marker dla komórek Reed-Stemberga w ziarnicy złośliwej [52]
LCA	- przydatna we wczesnym diagnozowaniu raka wątroby, szczególnie w połączeniu z metodami obrazowania, stosowana w wykrywaniu α -fetoproteiny, a szczególnie jej frakcji reaktywnej AFP-L3 (marker nowotworów wątroby) [36]

oraz *Helix pomatia* [25]. Wykrycie wolnego IgA1 ma znaczenie ze względu na zdolność wiązania składowych dopełniacza przez tę podklasę IgA.

Infekcje wirusowe: Produkcja IgM odgrywa znaczącą rolę we wczesnej odpowiedzi immunologicznej na zakażenia bakteryjne i wirusowe i związana jest głównie z wczesną fazą infekcji. Wysoki poziom IgM obserwowano np. u pacjentów zakażonych wirusem cytomegalii (CMV), opryszczki i różyczki. Wczesna identyfikacja wzrostu poziomu IgM w płynach fizjologicznych może być przydatne w diagnostyce chorób zakaźnych. Jako specyficznego odczynnika w wykrywaniu tej immunoglobuliny wykorzystuje się endogenną lektynę ludzką – MBP (*mannose binding protein*) [32].

Zastosowanie lektyn w okulistyce: Lektyna ABL (z pieczarki *Agaricus bisporus*) znalazła zastosowanie w badaniach nad rozrostowymi chorobami siatkówki takimi jak rozrostowa witreoretinopatia (PVR). Oceniano zdolność znakowanej ABL do wiązania z komórkami prawidłowej siatkówki i siatkówki ze zmianami rozrostowymi, a ponadto komórkami uzyskanymi z ognisk epite-

liopatii barwnikowej hodowanymi *in vitro*. Otrzymane wyniki wskazują, że testowana lektyna nie wykazuje aktywności z prawidłowymi komórkami, wiąże się natomiast w znacznym stopniu z komórkami RPL – (ludzkiej epiteliopatii barwnikowej) uczestniczącymi w procesie formowania się bliznowatych błon na powierzchni siatkówki oraz z regionami komórek fotoreceptorowych dotkniętych schorzeniem PVR. Określenie ekspresji glikokonjugatów na komórkach dotkniętych PVR przy pomocy lektyn daje możliwości lepszego zrozumienia mechanizmu powstania choroby [26].

Możliwości zastosowania lektyn w innych schorzeniach. ConA może być pomocna przy wykrywaniu formowania i obecności płytek starczych w korze mózgowej, regionu hipokampu i jądrze migdałowatym, co może mieć znaczenie w diagnostyce choroby *Alzheimer*a [39]. Lektyna MOA (z grzyba *Marasmius oreades*) indukuje *in vitro* niszczenie komórek śródbłonka małych naczyń krwionośnych, powodując zmiany w śródbłonku przypominające obraz w zespole hemolityczno-mocznicy (hemolytic-uremic syndrome), w chorobie *Moscowitza*

(*thrombotic thrombocytopenic purpura*) Między innymi dzięki doświadczeniom z MOA, wiadomo obecnie, że w procesach tych główną rolę odgrywają cytokiny, cząsteczki adhezyjne i neutrofile [63]. Przypuszcza się, że progeria (zespół *Hitchinsona-Gilforda*) ma związek z zaburzeniami glikozylacji białek. Nieprawidłowości w budowie niektórych glikopoleń fibroblastów skóry pobranych od chorych dzieci wykryty dzięki lektynie DSA (z *Datura stramonium*). Wyróżniono dwa typy fibroblastów (D+ silnie wiążące lektynę, i D- bez zdolności do wiązania lektyny) oraz określono zwiększony poziom glikoproteiny gp200 [5].

System do nieinwazyjnego pomiaru stężeń glukozy we krwi. Poszukiwania urządzeń i metod, które pozwalałyby na nieinwazyjne pomiary stężeń glukozy we krwi obejmują nowe technologie, w których z powodzeniem wykorzystywane są glukozospecyficzne lektyny. Przykładem tego może być implant do wszczepiania podskórnego bazujący na przejściu energii rezonansu fluorescencyjnego (FRET – *fluorescence resonance energy transfer*). System ten opiera się na przenoszeniu energii wzbudzenia z jednej fluorescencyjnej cząsteczki – donora (ConA) na drugą cząsteczkę – akceptora (dekstran). W przypadku wysokiego stężenia glukozy w ustroju, zwiększa się intensywność i czas trwania fluorescencji. Odpowiedni czujnik podczerwieni dokonuje pomiaru i zapisu na zewnątrz ciała [53].

Zastosowanie lektyn w chorobach nowotworowych

Istnieją dwie możliwości wykorzystania lektyn w walce z chorobami nowotworowymi, jedna to użycie lektyn jako narzędzi do wykrywania i monitorowania rozwoju guza druga - to zastosowanie ich w leczeniu nowotworów (szczegółowo omówione w części II. Przykłady metod stosowanych w walce z rakiem z wykorzystaniem lektyn przedstawia tabela II.

Występujące w chorobach nowotworowych zmiany w procesach glikozylacji w komórkach (np. wzrost fukozytacji, sialowania, desialowania) lub powstawanie nowych nieobecnych w prawidłowych tkankach struktur (antygeny nowotworowe) oraz związków chemicznych (α -fetoproteina lub specyficzne osoczowe mucyny) są wykorzystywane i rozpoznawane jako markery nowotworowe [54]. Obecnie wiadomo, że zmiany cyto- i histopatologiczne, powstające podczas transformacji nowotworowej, są poprzedzone modyfikacją glikozylacji na poziomie błonowych struktur komórkowych [15,22]. Za pomocą lektyn można zbadać zmiany w strukturze glikokonjugatów błonowych, co stanowi ważny czynnik diagnostyczny, pomocny również w postępowaniu terapeutycznym [11,12]. Szczególne znaczenie w diagnozowaniu i monitorowaniu rozwoju nowotworów ma wykrywanie przy pomocy specyficznych lektyn antygenów nowotworowych należących do grupy antygenów TACA (*tumor associated carbohydrate antigens*). Lektyny służące do wykrywania tych antygenów zestawiono w tabeli I Obecność antygenów T (TF – *Thomsen-Friedenreicha*) oraz Tn na komórkach złośliwego nowotworu (szczególnie sutka

okrężnicy), może być sygnałem, że w niedługim czasie nowotwór może przejść w formę inwazyjną, złośliwą [22,30,31,67]. Gwałtowny wzrost ilościowy antygenu Tn oznaczany przy pomocy specyficznych lektyn (VVA-B4, HPA) notowany jest szczególnie w zaawansowanych stadiach rozwojowych raka [11, 12, 15, 30]. Dzieje się tak na skutek dezaktywacji enzymatycznej t.j. blokowania aktywności kolejno β -3-galtransferazy oraz α , γ 6-sialyltransferazy [12,22]. Reakcja z HPA (*Helix pomatia*) może być stosowana dla celów prognostycznych raka sutka, gdyż lektyna ta wykazuje wybiórczą specyficzność wiązania jedynie z komórkami nowotworu pierwotnego zdolnymi do tworzenia przerzutów oraz z zdominowanymi przez złośliwe komórki [55]. Liczba komórek silnie wiążących się z lektyną AIA („dzakalina” z *Artocarpus integrifolia*) jest proporcjonalna do stadium rozwojowego nowotworu śródnowotworowego szczyki macicy, można więc użyć tej lektyny do monitorowania rozwoju guza [25].

Inne antygeny pojawiające się w trakcie rozwoju nowotworów to wolne łańcuchy N-acetylolaktosaminowe (antygen Ii) oraz nietypowe antygeny H i antygeny *Lewis* typu II (Lex, Ley) [11,15]. Przy pomocy specyficznych lektyn stwierdzono obecność wieloantennowych struktur N-acetylolaktosaminy w komórkach raka tarczycy [58], raka płuc [9] oraz nowotworów sutka [30]. Pojawianie się antygenów typu *Lewis* jest złym znakiem prognostycznym i wiąże się z inwazją i przerzutami w licznych typach nowotworów, między innymi: trzustki [46], odbytnicy [28,47], sutka [19,40]. Rozprzestrzenianie się komórek rakowych drogą naczyń krwionośnych jest wspomagane przez sialowane struktury Lex, Lea, Ley które stają się ligandami dla E-selektyn komórek śródnowotworowych [19, 40,60].

Zdolność specyficznego wiązania się poszczególnych lektyn ze strukturami cukrowymi charakterystycznymi dla określonych typów nowotworów powoduje, że lektyny znalazły wspomagającą rolę w diagnostyce nowotworów, diagnostyce różnicowej nienowotworowych zmian przerzutowych lub różnicowaniu np. prawidłowych limfocytów i komórek białaczki [44] Tabela III przedstawia wybrane przykłady lektyn najczęściej stosowanych w diagnostyce chorób nowotworowych.

Piśmiennictwo

- Aabenhus R., Hynes S.O., Permin H. et al.: Lectin Typing of *Campylobacter concisus* J. Clin. Microbiol. 2002, 40, 715.
- Ashraf M.T., Khan R.H.: Mitogenic Lectins. Med. Science Monit 2003, 9, 265.
- Benallal M., Zotter H., Anner R.M. et al.: Maackia amurensis agglutinin discriminates between normal and chronic leukemic human lymphocytes. Biochemical and biophysical research communications 1995, 209, 921.
- Bies Ch., Lehra C. M., Woodley J. F.: Lectin-mediated drug targeting: history and applications. Advanced Drug Delivery Rev. 2004, 56, 425.
- Clark M.A., Weiss A.S.: Hutchinson-gilford progeria types defined by differential binding of lectin DSA. Biochim.Biophys. Acta 1995, 1270, 142.
- Cohen Alan S.: Laboratory diagnostic procedures in the rheumatic diseases 3rd edition. 1985, Grune-Stafford, Orlando 1985, 179.
- Colditz I.G., Le Jambre L.F., Hosse R.: Use of lectin binding characteristics to identify gastrointestinal parasite eggs in faeces Veter. Parasitol. 2002, 105, 219.

- Congenital Disorders of Glycosylation, materiały dostępne on-line: <http://www.cafamily.org.uk/Direct/c64.html>
- Debray H., Duš D., Huesco P. et al.: Lectin-resistant variants of mouse Lewis lung carcinoma cells. II. Altered glycosylation of membrane glycoproteins. Clin. Exp. Metas. 1990, 8, 287.
- Derouin F., Beauvais B., Lariviere M. et al.: Etudes de la fixation de lectines marquées a la fluoresceine sur les trophozoites et les kystes de trois souches de *Toxoplasma gondii* C. R. Soc. Biol. 1981, 175, 761.
- Duš D., Ugorski M., Gorczyca W. et al.: Peanut Agglutinin (PNA) Binding Glycoproteins on Human Urothelial Cell Lines of Different Grades of Transformation. Archiv. Immunol. Therap. Exp. 1995, 43, 273.
- Gabius H.J., Schroter C., Gabius S. et al.: Binding of T-antigen-bearing neoglycoprotein and peanut agglutinin to cultured tumor cells and breast carcinomas. J. Histochem. Cytochem. 1990, 38, 1625.
- Guegnot J., Guillot J., Domez M. et al.: Identification and taxonomy of human and animal leishmaniasis by lectin-mediated agglutination. Acta Tropica 1984, 41, 135.
- Guillot J., Scandariato M., Coulet M.: Essai d'application du pouvoir agglutinant des lectines a l'etude du genre *Candida*. Sann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 1974, 125, 89.
- Guillot J., Guerry M., Końska G. et al.: Modification des glycoconjugués au cours du processus de cancérisation: cas des carcinomes mammaires. Bull. Cancer 2004, 91, 141.
- Gustavsson S., Ohlson C., Karlsson J.O.: Glycoproteins of Axonal Transport: Affinity Chromatography on Fucose-Specific Lectins. J. Neurochem. 1982, 38, 852.
- Hammarstrom S., Hammarstrom M.L., Sundblad G. et al.: Mitogenic leucoagglutinin from *Phaseolus vulgaris* binds to a pentasaccharide unit in N-acetyllactosamine-type glycoprotein glycans. Proc. Natl. Acad. Sci USA 1982, 79, 611.
- Harada H., Kamei M., Tokumuro Y. et al.: Systematic fractionation of oligosaccharides of human Immunoglobulin G by serial affinity chromatography on immobilized lectin columns. Anal. Biochem. 1987, 164, 374.
- Inufusa H., Nakatani Y., Adachi T. et al.: Correlation of prognosis of breast cancer patients and expression of Ley which acts as a cofactor of tumor procoagulant. Int. J. Oncol. 1998, 13, 481.
- Ishiguro T., Takahashi Y.: Serum alpha-fetoprotein subfractions identified by Ricinus communis agglutinin I in hepatic malignancies, yolk sac tumor, benign hepatic diseases, and fetal stage. Disease Markers. 1989, 7, 239.
- Ito N., Nishi K., Kawahara S. et al.: Difference in the ability of blood group-specific lectins and monoclonal antibodies to recognize the ABH antigens in human tissues: J. Molec. Histology 1990, 22, 1573.
- Itzkovitz: Expression of Tn, sialosyl-Tn and T antigens in human colon cancer. Cancer Res. 1989, 49,197.
- Jacobson R.J., Doyle R.J.: Lectin-parasite interaction. Parasitology Today 1996, 12, 55.
- Judd W.J.: The role of lectins in blood group serology. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 1980, 12, 171.
- Kabir S.: Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research J. Immunol. Methods 1998, 212, 193.
- Kent D., Sheridan C., Tomkinson H.A. et al.: Edible mushroom (*Agaricus bisporus*) lectin modulates human retinal pigment epithelial cell behaviour in vitro Exp. Eye Res. 2003, 76, 213.
- Khan F., Khan R.H., Sherwani A. et al.: Lectins as markers for blood grouping Med. Science Monitor 2002, 8, 293.
- Kłopotcki G., Laskowska A., Antoniewicz-Papis J. et al.: Role of sialosyl Lewis a in adhesion of colon cancer cells. The antisense RNA approach. Eur. J. Biochem. 1998, 253, 309.
- Kobata A., Endo T.: Immobilized lectins columns: useful tools for the fractionation and structural analysis of oligosaccharides. J. Chromat. 1992, 597, 111.
- Końska G., Guillot J., De Latour M. et al.: Expression of Tn antigen and N-acetyllactosamine residues in malignant and benign human breast tumors detected by lectins and monoclonal antibody 83D4. Int. J. Oncol. 1998,12, 361.
- Końska G., Vissac C., Jagla K. et al.: Ultrastructural localization of binding sites for PNA and VVA-B4 lectins in human breast cancer cell lines detected by confocal fluorescence microscopy. Int. J. Oncol.: 2002, 21, 1009.
- Koppel R., Solomon B.: IgM detection via selective recognition by mannose-binding protein J. Biochem. Biophys. Methods 2001, 49, 641.
- Kossowska B., Lamer-Zarawska, Olczak M., Kątnik-Prastowska I.: Lectin from *Beauveria bassiana* mycelium recognizes Thomsen-Friedenreich antigen and related structures. Comp. Biochem. Physiol. 1999, 123, 23.
- Koyama Yu., Suzuki T., Kayita A. et al.: Stimulation of IL-8 by *Aralia cordata* Lectin in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells Biosc. Biotechnol. Biochem. 2005, 69, 202.
- Krotkiewska B., Pasek M., Krotkiewski H.: Interaction of glycophorin A with lectins as measured by surface plasmon resonance (SPR). Acta Biochim. Polon. 2002, 49, 481.
- Kumada T.: Clinical utility of Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinoma: special reference to imaging diagnosis J. Hepatology 1999, 30, 125.
- Liljeblad M., Lundblad A., Pahlsson P.: Analysis of agalacto-IgG in rheumatoid arthritis using surface plasmon resonance. Glycoconjugate J. 2000,17, 323.
- Maciel E.V., Araujo-Filho V.S., Nakazawa M.: Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. Biologicals. 2004, 32, 57.
- Mann D.M., Brown A.M., Prinja D. et al.: A morphological analysis of senile plaques in the brains of non-demented persons of different ages using silver, immunocytochemical and lectin histochemical staining techniques. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 1990, 16, 17.
- Matsuura N., Narita T., Hiraiwa M. et al.: Gene expression of fucosyl- and sialyl-transferases which synthesize sialyl Lewis X, the carbohydrate ligands for E-selectin, in human breast cancer. Int. J. Oncol. 1998, 12, 1157.
- Meagher C.K., Liu H., Moore C.P. et al.: Conjunctival M cells selectively bind and translocate *Maackia amurensis* leucoagglutinin Experimental Eye Research 2005, 80, 545.
- Miyagi T.: Concanavalin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an antitumor effect in murine liver. Hepatology 2004, 40, 1190.
- Mladenov I.V., Haralambieva I.H., Iankov I.D. et al.: Characterisation of 20kDa lectin-spermagglutinin from *Arum maculatum* that prevents *Chlamydia pneumoniae* infection of L-929 fibroblast cells. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2002, 32, 249.
- Mody R., Joshi S., Chaney W.: Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. J. Pharmacol. Toxicol. Meth. 1995, 33, 1.
- Nagai T., Yanagisawa Y., Kohler W. et al.: Identification of group C *Streptococcus* with *Helix pomatia* lectin in use for blood grouping. Jap. J. Bacteriol. (Tokyo). 1994, 49, 779.
- Nakamori S., Nishihara S., Ikehara Y. et al.: Molecular mechanism involved in increased expression of sialyl Lewis antigens in ductal carcinoma of the pancreas. J. Exp. Clin. Cancer Res. 1999, 18, 425.
- Nishihara S., Hiraga T., Ikehara Y. et al.: Molecular mechanisms of expression of Lewis b antigen and other type I Lewis antigens in human colorectal cancer. Glycobiology 1999, 9, 607.
- Ohlson C., Karlsson J.O.: Glycoproteins of Axonal Transport: Polypeptides Interacting with lectin from *Aleuria aurantia*. Brain Research 1983, 264, 99.
- Ohyama C.: Carbohydrate structure and differential binding of prostate specific antigen to *Maackia amurensis* lectin between prostate cancer and benign prostate hypertrophy. Glycobiology 2004, 14, 671.
- Petavy A.F., Guegnot J., Guillot J. et al.: Fixation des lectines sur *Leishmania tropica* et *Crithidia luciliae*. Protistologica 1978, 14, 2, 103.
- Petavy A.F., Guillot J., Coulet M.: Interet des lectines dans l'identification des *Candida*. Application a *Candida albicans*, diagnostic positif et exclusion des especes affines. Bull. Soc. Mycol. Med. 1975, 2, 119.
- Peumans W.J., Van Damme E.J.: Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and

- characterization of O-linked glycans. *Critial Review in Biochem. Molec. Biol.* 1998, 33, 209.
53. **Pickup J., McCartney L., Rolinski O. et al.:** In vivo glucose sensing for diabetes management: progress towards non-invasive monitoring. *British Med. J.* 1999, 319, 13.
 54. **Satish P.R., Surolia A.:** Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2001, 49, 625.
 55. **Schumacher U., Kretzschmar H., Brooks S. et al.:** Helix pomatia lectin binding pattern of brain metastases originating from breast cancers. *Path. Res. Pract.* 1992, 188, 284.
 56. **She Q.B., Ng T.B., Liu W.:** A Novel Lectin with Potent Immunomodulatory Activity Isolated from Both Fruiting Bodies and Cultured Mycelia of the Edible Mushroom *Volvariella volvacea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 247, 106.
 57. **Slifkin M., Doyle R.J.:** Lectins and their application to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990, 3, 197.
 58. **Sobrinho-Simoes M., Sambade C., Nesland J.M. et al.:** Lectin histochemistry and ultrastructure of medullary carcinoma of the thyroid gland. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1990, 114, 369.
 59. **Swanson A.F., Ezekowitz R.A., Lee A. et al.:** Human Mannose-binding protein inhibits infection of HeLa cells by *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 1998, 6, 1607.
 60. **Takada A.:** Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Research* 1993, 53, 354.
 61. **Tripathi S., Maiti T.K.:** Immunomodulatory role of native and heat denatured agglutinin from *Abrus precatorius*. *Intern. J. Biochem. & Cell Biology* 2005, 37, 451.
 62. **Wang P.H., Hsu C., Tang S.C. et al.:** Fungal immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes* induces interferon-gamma production through p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 2721.
 63. **Warner R.L., Winter H.C., Speyer C.L et al.:** *Marasmius oreades* lectin induces renal thrombotic microangiopathic lesions, *Experim. Molec. Pathol.* 2004, 77, 77.
 64. **Wu A.M.:** Polyvalency of Tn (GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr) glycotope as a critical factor for *Vicia villosa* B4 and glycoprotein interactions. *FEBS Lett.* 2004, 562, 51.
 65. **Wu A.M.:** Lectinochemical studies on the glyco-recognition factors of a Tn (GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr) specific lectin isolated from the seeds of *Salvia sclarea*. *J. Biomed Sci.* 2005, 12, 167.
 66. **Yamashita K., Kochibe N., Ohkura T. et al.:** Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized *Aleuria aurantia* lectin. *J. Biol. Chem.* 1985, 260, 8, 4688.
 67. **Yu L.G., Milton J.D., Fernig D.G. et al.:** Opposite effects on human colon cancer cell proliferation of two dietary Thomsen-Friedenreich antigen-binding lectins. *J. Cell Physiol.* 2001, 186, 282.
 68. **Zabel M. (red).:** *Immunocytochemia PWN, Warszawa* 1999.