

УДК: 547.963.1:543.9

*Володимир АНТОНЮК^{1,2}, Лідія ПАНЧАК², Марина СТАРИКОВИЧ¹,
Ростислав СТОЙКА¹*

НОВІ МАНОЗОСПЕЦИФІЧНІ ЛЕКТИНИ ОДНОДОЛЬНИХ РОСЛИН. ОЧИСТКА ТА ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА

¹*Інститут біології клітини НАН України,
вул. Драгоманова 14/16, 79005 Львів, Україна*

²*Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, 79010 Львів, Україна
e-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua*

*Здійснено пошук нових манозоспецифічних лектинів серед однодольних рослин, які відносяться до різних родин, в результаті якого знайдено ряд нових лектинів. Для очищених лектинів досліджена взаємодія з ключовими вуглеводами та глікопротеїнами. Відібрано декілька нових лектинів для подальшого більш детального дослідження. Для лектинів з кореневищ *Heterocallis fulva* та цибулин *Huacynthella acutiloba* визначено основні фізико-хімічні характеристики, досліджено взаємодію з еритроцитами людини і тварин та встановлено вуглеводну специфічність.*

Ключові слова: D-манозоспецифічні лектини, пошук, властивості, однодольні.

ВСТУП

Лектини – це білки або глікопротеїни неіммунної природи, які мають щонайменше один некаталітичний домен, який селективно і зворотно зв'язує моно- або олігосахариди, не викликаючи при цьому їхнього хімічного перетворення. Лектини знайдені у рослин, грибів, тварин, мікроорганізмів і вірусів, де виконують різноманітні біологічні функції, що пов'язані з розпізнаванням вуглеводних детермінант на поверхні клітин. Результатом такого розпізнавання може бути розвиток інфекційного процесу, наприклад, проникнення часточок вірусу у клітини макроорганізму [1], симбіоз у мікоризних грибів [2], або стимуляція захисних реакцій організму під час захисту проти інфекції [3].

На сьогоднішній день лектини є важливими біотехнологічними інструментами і мають широке застосування в біології, медицині і сільському господарстві.

Важливою групою є манозоспецифічні лектини однодольних рослин. Ці лектини, на відміну від манозоспецифічних лектинів дводольних рослин (зокрема, родини бобових), як правило, не зв'язують D-глюкозу і її похідні. Маючи високу селективність до манозильних ланцюгів у складі макромолекул вони знайшли практичне застосування, оскільки такі структури відіграють важливу роль в багатьох біо-

логічних процесах. Перший лектин подібного типу був описаний з цибулин підсніжника у 1985 році [4]. Його очистку здійснювали афінною хроматографією на манозо-сефарозі. У 90-их роках минулого сторіччя лектини, специфічні до вуглеводів групи D-манози були знайдені в родинях амарилісових (*Amaryllidaceae*), орхідних (*Orchidaceae*), лілійних (*Liliaceae*), цибулевих (*Alliaceae*), а також в півникових (*Iridaceae*) та ароїдних (*Araceae*) [5]. Інтерес до манозоспецифічних лектинів однодольних значно підвищився після виявлення у них сильної інгібіторної дії до людських і тваринних ретровірусів (включаючи вірус імунодефіциту людини) [6, 7] та інсектицидної активності цих лектинів по відношенню до ряду сисних комах і нематод [8].

Базуючись на інсектицидній активності манозоспецифічних лектинів були виведені трансгенні сільськогосподарські культури, які стійкі до їх шкідників, що вже вирощуються на значних площах. Трансгенні рослини рису з включеним геном лектину підсніжника мають значно вищу опірність до зеленої (*Nephotettix virescens*) та коричневої (*Nilaparvata lugens*) цикадки – найбільш злісних шкідників рису [9], а картопля з цим же геном має підвищену стійкість до рослинної тлі *Myzus persicae* /Sulz./ [10]. Лектини також застосовують для розділення різних типів клітин та клітинних субпопуляцій, мітогенної стимуляції лімфоцитів, гістохімічного виявлення патологічних клітин, ідентифікації груп крові та штамів мікроорганізмів, розділення глікопротеїнів та дослідження їх біосинтезу [5, 11, 12]. Цікавими є роботи працівників Aethlon Medical Inc. (San Diego, Calif., USA) щодо очищення крові людини від вірусу гепатиту С шляхом плазмафорезу через спеціальну колонку, наповнену іmobілізованим лектином підсніжника. Після 3-разових сеансів на тиждень через 2 тижні такого лікування у пацієнтів рівень вірусу в їх крові знижувався в середньому на 57 % [13, 14].

Лектини нарцису і підсніжника не реагують з α 1-6; α 1-3; α 1-4 глюканами (лінійними, розгалуженими, природними і синтетичними). У той же час вони преципітують розгалужені α -манани дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* із множинними бічними залишками D-манози, приєднаної до α 1-6-манопіранозиду. Преципітація спостерігається також із лінійним α -мананом дріжджів *Hansenula carposulata*. Галактоманани з бічними залишками α -галактоманозилу або α -манобіозилу, приєднані до α -1-6-манопіранозиду основного ланцюга полісахариду з дріжджів *Candida lipolytica*, *Torulopsis lactiscondens*, *Torulopsis gropengiesseri* також виявляють високу спорідненість до цих лектинів [15]. Цю групу лектинів можна розділити на три підгрупи на основі їхньої реактивності до складних гліканних ланцюгів фетуїну, асіалофетуїну та фітогемаглютинину-E з *Phaseolus vulgaris* [16]. Завдяки цьому вони можуть бути використані як ліганди афінних сорбентів для розділення глікопротеїнів та їх аналізу. Кожен лектин, навіть в межах однієї родини має притаманну лише йому вуглеводну специфічність, тому пошук нових лектинів та дослідження їхніх властивостей і сьогодні має сенс і далі продовжується.

Метою дослідження був пошук нових D-манозоспецифічних лектинів серед однодольних рослин та дослідження їх вуглеводної специфічності, як основної функціональної характеристики лектинів, що визначає перспективу їх подальшого практичного застосування.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Загальна стратегія пошуку. Об'єктом пошуку нових манозоспецифічних лектинів було вибрано рослини класу однодольних. Ми виходили з того міркування, що імовірність знаходження лектинів подібного типу серед них є найвищою. Це припущення базується на численних роботах, здійснених в 1990–2010 роках, результатом яких було знаходження цілої низки нових манозоспецифічних лектинів в цих рослинах [16, 17, 18]. Цей клас рослин представлений багатьма порядками, родинами і родами рослин. Наприклад, лише в родини лілійних (порядок лілієцвіті) нараховується більше 250 родів з 3700 видами рослин, поширених по всій Земній кулі [19], однак лектини є виявлені лише в деяких з них. Другим важливим моментом у загальній стратегії пошуку було одержання простого у виготовленні але дуже ефективного при очищенні манозоспецифічних лектинів афінного сорбенту, який дозволяє виділяти подібні лектини за присутності цілої низки низькомолекулярних інгібіторів [20].

Виходячи з можливої фізіологічної функції лектинів можна припустити їх наявність в тих чи інших органах або в тих чи інших фазах вегетації рослин, що може бути червоною ниткою в їх цілеспрямованому пошуку. Так, було виявлено, що в запасуючих органах ароїдних лектини є основним білком [21]. Очевидно, що бульби, цибулини, а також насіння можуть служити об'єктом пошуку нових лектинів, а їх кількість буде максимальною в період відносного спокою. В той же час в період вегетації рослин лектини можуть відігравати транспортну функцію; активність лектинів різко зростає в молодих, швидкоростучих органах, а коли ці органи не ростуть, активність лектинів зменшується [5]. Тому пошук лектинів у вегетуючих органах доцільно проводити в період їх інтенсивного росту, а в запасуючих в фенофазу їх відносного спокою.

Характеристика рослинної сировини, використаної при очищенні та пошуку лектинів

Багато видів рослин родин лілійних, півникових та амарилісових є видами з коротким періодом вегетації, тому вегетативні частини їх заготовляли весною (березень-травень). Запасуючі органи рослин (бульби та цибулини) цих та інших родин заготовляли у період відносного спокою. Надземну частину трав'янистих рослин (листя або листя з стеблами) використовували свіжими, без висушування. Рослину сировину для очистки та пошуку нових сировинних джерел лектинів заготовляли на приватних ділянках у Львівській області (*Allium sativum*, *Hemerocallis fulva*, *Hyacinthella pallasiana*, *Hyacinthus orientalis*, *Narcissus pseudonarcissus*, *Kniphofia uvaria*, *Canna indica*), або у місцях природнього зростання у Львівській області (*Leucojus vernus*, *Typha latifolia*) та Південному березі Криму (*Ornithogalum ponticum*). У ряді випадків використовували кімнатні рослини (*Hippeastrum hordorum*, *Sansevieria trifasciata*) та плоди і підземні органи субтропічних рослин, які є в продажі в наших магазинах (*Musa banana*, *Zingiber officinale*).

Виявлення лектинів та дослідження їх вуглеводної специфічності

При пошуку та виявленні манозоспецифічних лектинів за допомогою реакції гемаглютинації еритроцитів ми використовували еритроцити кролика, з якими, як показали наші попередні дослідження, а також згідно літературних даних [22], реагують найкраще, а також брали еритроцити людини і ряду тварин, які брали з віва-

рію Львівського Національного медичного університету. Еритроцити людини брали на Львівській обласній станції переливання крові.

Суспензію еритроцитів готували шляхом відмивання їх від плазми або сироватки крові забуференим фізіологічним розчином (ЗФР). 5–10 крапель крові з проколу пальця або вени вуха кролика збирають у пробірку з 10 мл ЗФР, перемішують і через 10 хв центрифугували при 1000–1500 г протягом 5-ти хв. ЗФР має такий склад: в 1 л дистильованої води 8,0 г NaCl, 0,2 г KCl, 1,15 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; рН після розчинення солей доводили до 7,4 за допомогою 1 н. HCl або NaOH. Еритроцити 2 рази відмивали ЗФР, після чого визначали їхній вміст у суспензії за допомогою гематокрита і розбавляли сольовим розчином до 2% концентрації. Цю суспензію можна зберігати в холодильнику протягом тижня.

До серії послідовних двократних розведень у мікропробірках лектину або екстракту, додавали 2%-ну суспензію еритроцитів у ЗФР і після 10-ти хвилинної інкубації пробірки центрифугували 30 секунд при 500 г і результат аглютинації спостерігали візуально (неозбросним оком). Аглютинація (позитивний результат) характеризується утворенням згустка еритроцитів, який не розпадається при обережному збовтуванні пробірки; при відсутності ж аглютинації еритроцити при збовтуванні підіймаються з дна пробірки кожен окремо, без утворення згустка (негативний результат).

Визначення вуглеводної специфічності лектинів здійснювали за наступною методикою, описаною нами раніше в методичних рекомендаціях [23].

Для цього необхідні такі реактиви:

а). Розчини вуглеводів з якими досліджується взаємодія у ЗФР високої концентрації (нами використовувались 0,3М розчини). У випадку використання полісахаридів або глікопротеїнів, молекулярна маса яких є великою або невідомою, використовували 3% розчини останніх.

б). Розчин досліджуваного лектину. У випадку чистого лектину готували 0,1% розчин на ЗФР, а потім із нього готували робочий розчин шляхом розведення до титру 1:4. У випадку дослідження неочищеного лектину або екстракту, розчин розбавляли ЗФР до титру 1:4.

в). 2% суспензія еритроцитів на ЗФР.

Спочатку визначали вуглевод, із яким взаємодіє лектин. З цієї метою в пробірку вносили по 0,05 мл розчину вуглеводу, 0,05 мл робочого розчину лектину та залишали на 15 хв. за кімнатної температури. Потім у пробірку вносили 0,05 мл 2% суспензії еритроцитів, залишали на 15 хв., після чого центрифугували 30 секунд при 500 г і спостерігали за реакцією аглютинації еритроцитів. обов'язковою є постановка контрольної проби, в яку замість вуглеводу додавали ЗФР.

У контрольній пробірці і в пробірках з вуглеводами, що не взаємодіяли із лектином, спостерігалась аглютинація еритроцитів. Відсутність аглютинації у пробірках засвідчує про блокування активного центру лектину вуглеводом, тобто про взаємодію цього лектину з вуглеводом. Коли концентрація вуглеводу реакційної суміші в першій пробірці становить 0,1М, то можна вважати це достатнім для виявлення навіть слабо взаємодіючих вуглеводів із лектином.

Після виявлення вуглеводів, які взаємодіють із лектином, визначали їхню мінімальну концентрацію, що пригнічує реакцію гемаглютинації. З цієї метою готували серію послідовних розведень активного вуглеводу. У пробірки вносили по 0,05 мл ЗФР: у першу вносили 0,05 мл 0,6М розчину вуглеводу і після цього переносили у наступні пробірки по 0,05 мл розчину. У кожену пробірку додавали

по 0,05 мл робочого розчину лектину і залишали на 15 хв. Центрифугували 30 секунд при 500 g і фіксували результати реакції гемаглютинації. На початку ряду пробірок гемаглютинація є відсутньою внаслідок блокування лектину вуглеводом, а потім у міру зниження концентрації вуглеводу з'являється аглютинація.

Відмічали останню пробірку, в якій ще відсутня аглютинація і розраховували концентрацію вуглеводу у цій пробірці, виходячи з того, що концентрація вуглеводу в першій пробірці є 0,1M, а коефіцієнт розведення в ряді дорівнює 2. Таким способом визначали мінімальну інгібуючу концентрацію для всіх вуглеводів, що взаємодіють з лектином [23].

Очищення лектинів

Орган рослини, що містив лектини, подрібнювали і гомогенізували у міксері до гомогенної маси у співвідношенні 1:3 з 0,9% розчином NaCl. Одержаний гомогенат центрифугували при 6000 g 10 хв. Надосадову рідину освітлювали доведенням рН до 4,5. Після повернення рН до 6,5–7,0 білки надосадової рідини осаджували сульфатом амонію при 90%-ному насиченні останнього. Утворений осад збирали центрифугуванням, розчиняли у воді і після короткочасного діалізу проти води наносили на афінний сорбент. Як афінний сорбент використовували співполімер дріжджового манану і крохмалю, спосіб одержання якого описано раніше [20]. Елюцію лектину з колонки афінного сорбента здійснювали за допомогою 2% розчину D-манози, розчиненої в 0,05M калій-боратному буферному розчині, рН 8,2. Вихід протеїну з колонки контролювали за абсорбцією елюату при 280 нм. Фракції, що містили протеїн, об'єднували, висолювали сульфатом амонію при 90%-ному насиченні і діалізували проти 0,02M фосфатного буферного розчину. Після діалізу розчин наносили на колонку DEAE-Toyorearl, попередньо зрівноважену тим же буферним розчином. Поступово збільшуючи йонну силу елююючого розчину шляхом додавання NaCl, елюювали лектин з колонки іонообмінника під контролем аглютинації еритроцитів кролика. Фракції, що володіли гемаглютинуючою активністю, об'єднували, концентрували шляхом висолювання сульфатом амонію і після діалізу проти дистильованої води використовували в подальших дослідженнях.

Визначення чистоти одержаних препаратів, молекулярної маси та вмісту вуглеводів

Чистоту одержаних лектинів оцінювали за допомогою диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) в лужній (рН 8,6) буферній системі. Молекулярну масу субодиниць визначали за допомогою електрофорезу в 20%-ному ПААГ в присутності 0,1% розчину додецилсульфату натрію. В якості стандарту використовували суміш білків з відомою молекулярною масою фірми "Fermentas" (Литва).

Повну молекулярну масу лектину визначали на колонці Toyorearl HW-55, використовуючи в якості білків-маркерів яечний лізоцим ($M_r = 14,3$), соєвий інгібітор трипсину ($M_r = 21$ кДа), пероксидазу хрому ($M_r = 43$ кДа), лектин насіння гороху ($M_r = 48$ кДа), лектин підсніжника ($M_r = 50$ кДа), альбумін сироватки крові бика ($M_r = 69$ кДа) та лектин виноградного слимака ($M_r = 79$ кДа).

Вміст вуглеводів в препараті лектину визначали за методом Dubois et al. [24]. Згідно цього методу речовини, що містять у своєму складі вуглеводи, перш за все, гексози (глікопротеїни, полісахариди, протеоглікани, тощо) у присутності фенолу і сульфатної кислоти дають коричневе забарвлення, яке прямо пропорційне кількості вуглеводу. З цією метою до 0,5 мл 5%-ного розчину фенолу додавали 0,5 мл дос-

ліджуваної проби, перемішували і додавали 2,5 мл 96 % сульфатної кислоти протягом 10-ти секунд. Перемішували і через 10 хв ставили на водяну баню на 30 хв при +25°C. Після цього колориметрували при 465 нм. Калібрувальний графік будували по глюкозі. Лінійна залежність спостерігалась в діапазоні 0,1–1 мг/мл вуглеводу.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні свіжовиготовлених екстрактів з органів рослин за допомогою реакції гемаглютинації з еритроцитами людини та кролика нових лектинів виявлено не було. Це, очевидно, пов'язано з тим, що використані в дослідженні рослини є легкодоступні і неодноразово піддавались подібним дослідженням. Тому для виявлення нових манозоспецифічних лектинів протеїни з екстрактів потенційних сировинних джерел концентрували і одержаний протеїновий концентрат пропускали через нами раніше синтезований афінний сорбент [20]. Після специфічної елюції сорбованого на афінному сорбенті протеїнового матеріалу його концентрували висоловлюванням сульфатом амонію і в одержаному концентраті виявляли лектин за допомогою реакції гемаглютинації. Одержані результати наведені в табл. 1.

Таким чином у більшості рослин, які були досліджені на предмет наявності манозоспецифічних лектинів шляхом афінної очистки відповідних екстрактів були виявлені лектини. Зокрема, нами вперше виявлені і очищені лектини з кореневищ *Hemerocallis fulva* цибулин *Hyacinthella acutiloba*, *Hyacinthus orientalis*, *Gladiolus sp.*, плодів *Arum orientale*, надземної частини *Ornithogalum ponticum*, *Kniphofia uvaria*, листків *Sansevieria trifasciata*. Всі ці рослини відносяться до класу однодольних, але до різних родин. Вміст лектинів у виявлених рослин, однак, невисокий і є у 10–100 разів нижчий, ніж у відомих і широко використовуваних лектинів з амарилісу, підсніжника, нарцису. Тому до них може бути виявлений інтерес, якщо вони будуть відрізнятися за властивостями від відомих лектинів або мати якісь унікальні властивості.

Дослідження вуглеводної специфічності одержаних лектинів

Зважаючи на те, що найбільш важливою функціональною характеристикою будь-якого лектину є його вуглеводна специфічність, яка в значному ступені визначає перспективи його подальшого застосування, ми насамперед визначили інгібуючу дію ключових вуглеводів та глікопротеїнів на нововиявлені лектини. Результати цих досліджень представлені в табл. 2.

Фізико-хімічна характеристика нових манозоспецифічних лектинів

Нами було вибрано два, на наш погляд, перспективних лектини для більш детального вивчення. Це лектин з кореневища лілійника рудуватого (*Hemerocallis fulva* L.), що належить до родини ксантореевих (*Xanthorrhoeaceae*) та лектин з цибулин гіацинтника гостролопатевого (*Hyacinthella acutiloba* K. Perss.), родини гіацинтових (*Hyacinthaceae*). Лілійник рудуватий – це багаторічна трав'яниста рослина висотою до 120 см з красивими великими квітами оранжевого кольору, що по формі і величині нагадують квіти лілії. Він походить з Китаю, вирощується як декоративна рослина по всій території України, цвіте в травні – липні, іноді дичавіє [31]. Застосовується в Китайській народній медицині як діуретичний та протизапальний засіб [32]. Гіацинтник гостролопатевиї – також декоративна рослина, яка цвіте ранньою весною і має короткий вегетаційний період [31].

Таблиця 1

Зведена таблиця результатів пошуку та одержання манозоспецифічних лектинів

| № п/п | Назва рослини і сировини | Родина | Приблизна к-ть у сировині | Література |
|-------|---|------------------|---------------------------|------------|
| 1 | <i>Allium sativum</i> , цибулини | Alliaceae | 65 мг/кг* | [26] |
| 2 | <i>Hemerocallis fulva</i> , кореневища | Xanthorrhoeaceae | 10,0 мг/кг* | Відсутня |
| 3 | <i>Hyacinthella acutiloba</i> , цибулини | Amaryllidaceae | 6,5 мг/кг* | Відсутня |
| 4 | <i>Hyacinthus orientalis</i> цибулини | Amaryllidaceae | 7,8 мг/кг** | Відсутня |
| 5 | <i>Zingiber officinale</i> , кореневища | Zingiberaceae | 3,3 мг/кг** | [27] |
| 6 | <i>Sansevieria trifasciata</i> , листя | Agavaceae | 0,8 мг/кг** | Відсутня |
| 7 | <i>Musa banana</i> , плоди | Musaceae | 2,2 мг/кг* | [28] |
| 8 | <i>Gladiolus sp.</i> , цибулини | Iridaceae | 3,0 мг/кг** | Відсутня |
| 9 | <i>Hippeastrum hordorum</i> , цибулини | Amaryllidaceae | 553 мг/кг* | [29] |
| 10 | <i>Leucojus vernus</i> , листя | Amaryllidaceae | 180 мг/кг* | [30] |
| 11 | <i>Narcissus pseudonarcissus</i> , цибулини | Amaryllidaceae | 110 мг/кг* | [15] |
| 12 | <i>Arum orientale</i> , незрілі плоди | Araceae | 15 мг/кг** | Відсутня |
| 13 | <i>Typha latifolia</i> , листя | Typhaceae | Не знайдено | Відсутня |
| 14 | <i>Orchis maculata</i> , надземна частина | Orchidaceae | Не знайдено | Відсутня |
| 15 | <i>Canna indica</i> , кореневища | Cannaceae | Не знайдено | Відсутня |
| 16 | <i>Ornithogalum ponticum</i> , надземна частина | Liliaceae | 16 мг/кг** | Відсутня |
| 17 | <i>Kniphofia uvaria</i> , надземна частина | Xanthorrhoeaceae | 0,32 мг/кг** | Відсутня |

* – маса лектину, одержана нами в результаті очистки із сировини;

** – маса лектину в сировині, обчислена із припущення, що їх аглютинуюча активність дорівнює аглютинуючій активності лектину нарцису (титр гемаглютинації розчину 1 мг/мл з еритроцитами кролика 1:256).

Лектини були очищені з сировини за методикою, описаною нижче. Для порівняння властивостей та подальшої роботи було також очищено ряд раніше відомих лектинів (лектини м'якоти плодів банану, цибулин підсніжника та нарцису, зубців часнику, кореневищ купини багатоквіткової), які одержували за нижчеописаною методикою із незначними модифікаціями.

Із 1 кг свіжозібраних кореневищ лілійника рудуватого було одержано 9,6 мг, а з 1 кг цибулин гіацинтника гостролопатевого було одержано 6,5 мг лектину. Вони мали вигляд білого аморфного порошку, які добре розчинялись у водно-солових розчинах при рН 3–9. Лектини витримували прогрівання при +60°C протягом 1 год., але за 15 хв при +72°C втрачали 75% своєї активності. При діалізі проти 1% розчину ЕДТА впродовж 8 год. обидва лектини не втрачали гемаглютинуючої активності, що може свідчити про те, що іони Ca^{2+} і Mg^{2+} не є необхідними для прояву їх активності. Лектини скоріш за все є чистими білками, так як за результатами аналізу в складі одержаних препаратів вуглеводів було виявлено менше за 0,5%.

Таблиця 2

Взаємодія досліджуваних лектинів з вуглеводами

| № п/п | Назва рослини і сировини | Найменша концентрація моносахариду (в мМ) або глікокон'югату (в %), яка повністю пригнічує активність 4 гемаглютинуючих одиниць лектину | | | | |
|-------|---|---|---------|-----------|------------------|-------------------|
| | | αMe-D-Manp | NAcDGal | Овомукоїд | Дріжджовий манан | Пероксидаза хрому |
| 1 | <i>Allium sativum</i> , цибулини | 50 | – | 1% | 0,008% | 0,5% |
| 2 | <i>Heimerocallis fulva</i> , кореневища | 50 | 6,25 | 1% | 0,004% | 0,125% |
| 3 | <i>Hyacinthella acutiloba</i> , цибулини | 50 | 50 | 0,25% | 0,0005% | – |
| 4 | <i>Hyacinthus orientalis</i> цибулини | | Н.д. | 0,003% | 0,003% | Н.д. |
| 5 | <i>Zingiber officinale</i> , кореневища | 50 | Н.д. | Н.д. | 0,001% | Н.д. |
| 6 | <i>Sansevieria trifasciata</i> , листя | – | Н.д. | – | 0,06% | Н.д. |
| 7 | <i>Musa banana</i> , плоди | 25 | 100 | 0,125% | 0,004% | 0,062% |
| 8 | <i>Gladiolus sp.</i> , цибулини | – | – | 0,5% | 0,001% | – |
| 9 | <i>Hippeastrum hordorum</i> , цибулини | – | Н.д. | – | 0,0012% | – |
| 10 | <i>Leucojus vermus</i> , листя | 50 | Н.д. | 1% | 0,03% | – |
| 11 | <i>Narcissus pseudonarcissus</i> цибулини | 100 | 12,5 | 0,5% | 0,002% | – |
| 12 | <i>Arum orientale</i> , незрілі плоди | – | – | – | 0,5% | 1% |
| 13 | <i>Ornithogalum ponticum</i> , надземна частина | – | – | – | 0,5% | – |
| 14 | <i>Kniphofia uvaria</i> , надземна частина | 100 | 25 | – | 0,001% | – |

Примітка: прочерк означає відсутність взаємодії лектину з вуглеводом у концентрації 100 мМ або 1% для глікопротеїнів та дріжджового манану; всі наведені у таблиці лектини при застосуванні концентрації 100 мМ D-ксилози, D-глюкози, D-галактози та N-ацетил-D-глюкозаміну не пригнічували аглютинацію еритроцитів кролика, тому вони в таблицю не внесені.

Ці лектини можливо, трішки відрізняються зарядом молекули, так як при очистці іонообмінною хроматографією елюються з колонки іонообмінника речовинами різної іонної сили (рис. 1 і 2).

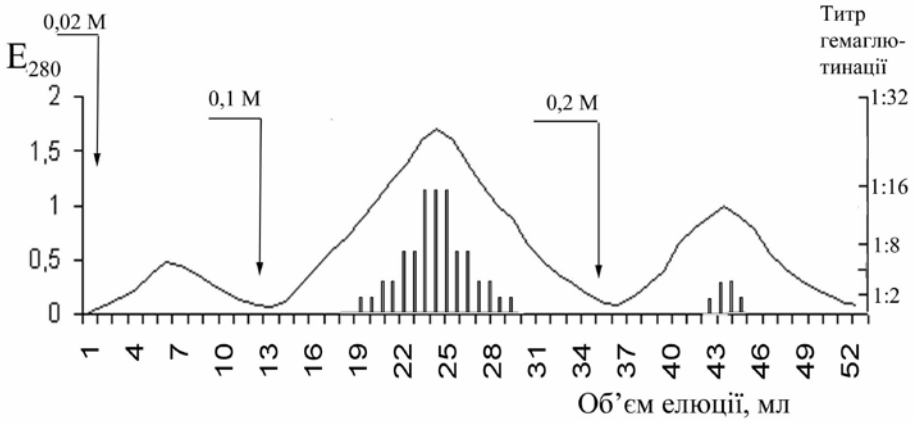


Рис. 1. Очищення лектину *Hemerocallis fulva* за допомогою іонообмінної хроматографії на колонці з DEAE-Тоуорpearl. Стрілками вказано місце нанесення і молярність фосфатного буферу; а стовпчиками показано місце елюції лектину за його гемаглютинуючою активністю щодо еритроцитів кролика (шкала справа).

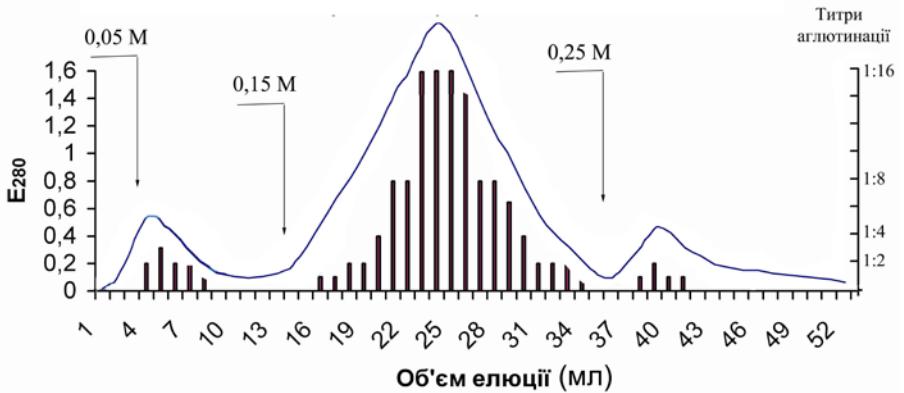


Рис. 2. Очищення лектину *Hiacinthella acutiloba* іонообмінною хроматографією на колонці з DEAE-Тоуорpearl. Пояснення теж, що для рис. 1.

При електрофорезі в 20%-ному ПААГ в присутності 0,1% ДДС-натрію у всіх тестованих манозоспецифічних лектинів виявлено одну зону, яка відповідає мол. масі ≈ 12 кДа (рис. 3).

Лектини *Hemerocallis fulva* та *Hiacinthella acutiloba* при рН 7,2 скоріш за все є гомотетрамерами, так як молекулярна маса, визначена гель-хроматографією становила ≈ 48 кДа. Молекулярна маса цих лектинів була близькою до молекулярної маси відомих манозоспецифічних лектинів однодольних рослин (підсніжника, нарцису, білоцвіту).

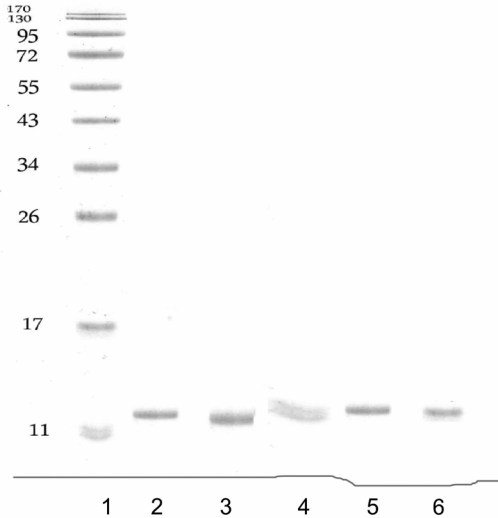


Рис. 3. Електрофорез лектинів *Hiacinhella acutiloba*, *Hemerocallis fulva* та інших манозспецифічних лектинів однодольних у 20 %-ному ПААГ за присутності 0,1 % ДДС-Na. Цифрами на рисунку позначено: 1 – білки-маркери із вказаною відомою мол. масою; 2 – лектин нарцису, 3 - лілійника рудуватого; 4 – лектин часнику, 5 – лектин підсніжника білосніжного, 6 – лектин гіацинтника гостролопатевого.

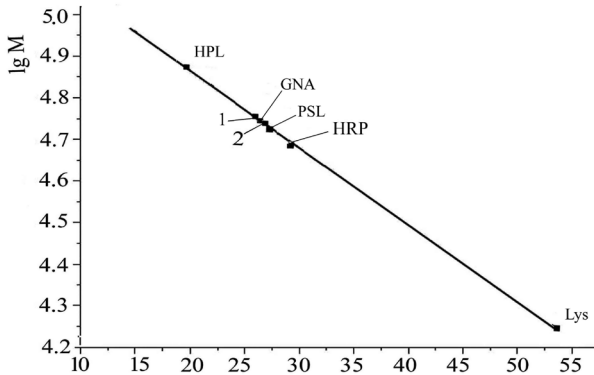


Рис. 4. Визначення молекулярної маси лектинів *Hemerocallis fulva* та *Hiacinhella acutiloba* в 0,1 М фосфатному буферному р-ні, рН 7,2 гель-хроматографією на Тоуорег HW-55. Розміри колонки (h = 39 см, d = 1,5 см), об'єм нанесеного зразку – 1,0 мл). 1 – лектин *Hemerocallis fulva*; 2 – лектин *Hiacinhella acutiloba*; HPL – лектин виноградного равлика ($M_r = 79$ кДа), PSL – лектин насіння гороху ($M_r = 48$ кДа), HRP – пероксидазу хропу ($M_r = 43$ кДа), Lys – яечний лізоцим ($M_r = 14,3$).

Порівняльна характеристика взаємодії манозоспецифічних лектинів однодольних з еритроцитами та глікокон'югатами.

Не зважаючи на те, що всі очищені лектини з високою афінністю взаємодіяли з дріжджовим мананом, вони відрізнялись по взаємодії як еритроцитами тварин, так і з олігосахаридами та глікопротеїнами. На жаль, великий набір олігосахаридів є доступним лише для небагатьох спеціалізованих лабораторій світу, тому лише у них можлива достатньо глибока характеристика вуглеводної специфічності лектинів.

По взаємодії з еритроцитами спільним для усіх досліджуваних лектинів є високий титр аглютинації для еритроцитів кролика і відсутність такої для еритроцитів людини і кози. Титри аглютинації для еритроцитів морської свинки і щура у досліджуваних лектинів були досить різними і власне за їх співвідношенням можна судити про ступінь спорідненості лектинів.

Мінімальна гемаглютинуюча концентрація лектинів представлена в табл. 3.

Таблиця 3

Взаємодія деяких манозоспецифічних лектинів з еритроцитами людини і тварин

| Лектин | Мінімальна концентрація лектину (в мкг/мл), що викликає аглютинацію еритроцитів | | | | |
|-------------|---|----------------|------|------------------------|------|
| | Кролик | Морська свинка | Щур | Людина (групи О, А, В) | Коза |
| НАВА | 19 | 625 | 2500 | – | – |
| HFRA | 19 | 156 | 39 | – | – |
| MBA | 9,75 | 2,44 | 2500 | – | – |
| NPA | 9,75 | 19 | 312 | – | – |
| GNA | 9,75 | 312 | – | – | – |
| LVA | 4,88 | 9,75 | 625 | – | – |
| PMRA | 4,88 | 78 | 9,75 | – | – |
| ASA | 19 | 312 | 1250 | – | – |

Примітки: прочерк означає відсутність аглютинації у концентрації 10000 мкг/мл; скорочення **НАВА** – *Niacintella acutiloba bulb agglutinin*, лектин гіацинтка гостролопатевого; **HFRA** – *Hemerocallis fulva rhizomae agglutinin*, лектин лілійника рудоватого; **MBA** – *Musa banana agglutinin*, лектин м'якоті плодів банану; **NPA** – *Narcissus pseudonarcissus agglutinin*, лектин цибулин нарцису; **GNA** – *Galanthus nivalis agglutinin*, лектин цибулин підсніжника; **LVA** – *Leucocjum vernum agglutinin*, лектин цибулин білоцвіту весняного; **PMRA** – *Polygonatum multiflorum rhizomae agglutinin*, лектин кореневищ купини багатоквіткової; **ASA** – *Allium sativum agglutinin*, лектин зубців часнику.

Як бачимо з результатів, представлених в таблиці, всі досліджувані лектини достатньо сильно відрізняються за взаємодією з еритроцитами. Більшість лектинів найкраще аглютинуються еритроцитами кролика, але для лектину мякоті банана еритроцити морської свинки були в 4 рази чутливішими. В переважній більшості еритроцити морської свинки краще аглютинували досліджувані лектини, як еритроцити щура, але при цьому спостерігалась велика варіабельність. У тварин, так як і в людей, можлива наявність груп крові, але для кролів, морських свинок і щурів в літературі про це даних немає. Для виключення такої можливості експерименти були здійснені з використанням еритроцитів від одних і тих же особин. В той же час не виключено, що при наявності груп крові у тварин цифри у таблиці 3 можуть відрізнятись.

Результати дослідження вуглеводної специфічності двох нових лектинів (HFRA і НАВА) та найбільш відомих манозоспецифічних лектинів представлені в табл. 4.

Таблиця 4

Взаємодія лектинів з вуглеводами та глікопротеїнами

| Інгібітор | Найменша концентрація (мМ або %), що пригнічує активність 4 гемаглютинуючих одиниць лектину | | | | | |
|----------------------------------|---|---------|--------|--------|--------|--------|
| | HFRA | НАВА | АSА | МВА | PMRA | NPA |
| α -метил-D-манопіраноза | 50 | 50 | 50 | 50 | – | – |
| D-фруктоза | 50 | 100 | – | 100 | – | – |
| Тураноза | 50 | 6,25 | 50 | 25 | 25 | 100 |
| 2-ацетамідо-D-галактопіраноза | 6,25 | 50 | – | 100 | 12,5 | 12,5 |
| Яєчний альбумін | 1% | 0,25% | – | 0,125% | 0,5% | – |
| Овомукоїд | 1% | 0,25% | 1% | 0,125% | – | 0,5% |
| Пероксидаза коренів хрону | 1% | – | 0,5% | 0,062% | – | – |
| Крохмаль | 0,5% | 0,5% | – | 0,5% | 1% | – |
| Глікоген печінки свині | – | 0,125% | – | – | – | – |
| Дріжджовий манан | 0,004% | 0,0005% | 0,008% | 0,004% | 0,002% | 0,002% |
| Тиреоглобулін бика | – | 0,125% | 0,125% | 0,5% | 0,016% | 0,25% |
| Лужна фосфатаза кишечника теляти | – | – | – | 0,5% | 1% | 0,25% |

Примітка: в таблицю не внесені D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза, L-рамноза, L-арабіноза, L-фукоза, лактоза, рафіноза, мелібіоза, 2-ацетамідо-D-глюкопіраноза, D-глюкуронова кислота, гуміарабік, гепарин, ламінарин, інулін, імуноглобулін G людини, з якими лектини не взаємодіяли у концентрації 100 мМ (моно- і дисахариди) або 1% (полісахариди і глікопротеїни). Скорочення назв лектинів – як в табл. 3.

Аналіз одержаних даних показує, що всі досліджувані лектини мають ряд спільних і відмінних ознак. Всі вони мають високу спорідненість до дріжджового манану (з *Saccharomyces cerevisiae*), який у своєму складі має олігосахаридні ланки манози, зв'язані $\alpha 1 \rightarrow 2$, $\alpha 1 \rightarrow 3$ і $\alpha 1 \rightarrow 6$ зв'язками [33]. В той же час всі ці лектини при концентрації 100 мМ D-манози не пригнічують реакції гемаглютинації, а α -метил-D-манопіраноза дуже слабо її пригнічує, що вказує на те, що комплементарним вуглеводом для активного центру всіх цих лектинів є олігосахаридна структура. Також відмічено значну різницю у зв'язуванні лектинів пероксидазою хрону та тиреоглобуліну бика.

ЛІТЕРАТУРА

1. Eisen S., Dzwonek A., Klein N.J. Mannose-binding lectin in HIV infection // *Future Virol.* – 2008. – V. 3, N 3. – P. 225–233.
2. Giollant M., Guillot J., Damez M., Dusser M., Didier P., Didier E. Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*. Research on the possible involvement of the fungal lectin in

- recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhize formation // *Plant. Physiol.* – 1993. – V. 101. – P. 513–522.
3. *Willment J.A., Brown G.D.* C-type lectin receptors in antifungal immunity // *Trends Microbiol.* – 2008. – V. 16, N 1. – P. 27–32.
 4. *De Meirsmen C.E., Nsimba-Lubaki M., Peumans W.I.* Melibiose/mannose-specific lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs // *Lectins: Biol., Biochem., Clin. Biochem. Vol. 5: Proc. IUB Symp. № 144 7 Int. Lectin Meet. Bruxelles. Aug. 18-23 1985.* – Berlin-New York. – 1986. – P. 117–123.
 5. *Антонюк В.О.* Лектини та їх сировинні джерела. – Львів: Кварт. 2005 – 554 с.
 6. *Balzarini J., Schols D., Neyts J., Van Damme E., Peumans W., De Clercq E.* α -(1-3)- and α -(1-6)-D-mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections in vitro // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1991. – V. 35, No 3. – P. 410–416.
 7. *Hester G., Kaku H., Goldstein I.J., Wright C.S.* Structure of mannose-specific snowdrop (*Galanthus nivalis*) lectin is representative of new plant lectin family // *Nature Structural Biology* – 1995. – V. 2, No 6. – P. 472–479.
 8. *Hilder V.A., Powell K.S., Gatehouse A. M.R. et al.* Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids // *Transgenic Research.* – 1995. – V. 4. – P. 18–25.
 9. Foissac X, Thi Loc N, Christou P, Gatehouse A. M, Gatehouse J. A. Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). // *J. Insect Physiol.* 2000. – V. 46, N 4. – 573–583.
 10. *Down R.E., Ford L., Woodhouse S.D., Davison G.M. et al.* Tritrophic interactions between transgenic potato expressing snowdrop lectin (GNA), an aphid pest (peach-potato aphid; *Myzus persicae* (Sulz.) and a beneficial predator (2-spot ladybird; *Adalia bipunctata* L.) // *Transgenic Res.* – 2003. – V. 12, N 2. – P. 229–241.
 11. *Sharon N., Lis H.* History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules // *Glycobiology* 2004. – V. 14, P. 53R–62R.
 12. *Nascimento K. S., Cunha A. I., Nascimento K. S. et al.* An overview of lectins purification strategies // *J. Mol. Recognit.* – 2012. – V. 25. – P. 527–541.
 13. *Tullis R. H., Duffin R. P., Handley H.H. et al.* Reduction of hepatitis C virus using lectin affinity plasmapheresis in dialysis patients // *Blood Purif.* – 2009. – V. 27, N 1. – P. 64–69.
 14. *Tullis R. H., Duffin R. P., Ichim T. E., Joyce J. A., Levin N. W.* Modeling Hepatitis C Virus Therapies Combining Drugs and Lectin Affinity Plasmapheresis // *Blood Purif.* – 2010. – V. 29. – P. 210–215.
 15. *Kaku H., Van Damme E.I. M., Peumans W.I., Goldstein I.J.* Carbohydrate-binding specificity of the daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) and amaryllis (*Hippeastrum hybr.*) bulb lectins // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1990. – V. 279, N 2. – P. 298–304.
 16. *Barre A., Van Damme E. J. M., Peumans W. J., Rouge P.* Structure-Function Relationship of Monocot Mannose-Binding Lectins // *Plant Physiol.* – 1996. – V. 112. – P. 1531–1540.
 17. *Smeets K, Van Damme E.J.M, Peumans W.J.* Comparative study of the post-translational processing of the mannose-binding lectins in the bulbs of garlic (*Allium sativum*) and ramsons (*Allium ursinum*) // *Glycoconjugate Journal* – 1994. – V. 11. – P. 309–320.
 18. *Van Damme E.J., Peumans W.J., Barre A., Rouge P.* Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 1998. – V. 17. – P. 575–692.
 19. *Определитель высших растений Украины / Добровичева Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др.* – Киев.: Наукова думка, 1987. – 548 с.

20. *Антонюк В.О.* Спосіб очищення манозоспецифічних лектинів / Деклараційний патент на корисну модель, № 13770, Опубл. 17.04.2006, Заявка u200510008.
21. *Van Damme E.J., Goossens K., Smeets K. et. al.* The major tuber storage protein of araceae species is a lectin. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Arum maculatum* L // *Plant Physiology*. 1995. – V.107, N 4. – P.1147–1158.
22. *Van Damme E.J., Goldstein I.J., Peumans W.J.* A comparative study of mannose-binding lectins from the Amaryllidaceae and Alliaceae // *Phytochemistry*. – 1991. – V. 30, N 2. – P.509 – 514.
23. *Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Антонюк В. А., Луцик А.Д., Ладная Л.Я.* Методи исследования углеводной специфичности лектинов: Методические рекомендации. – Львов, 1983. – 20 С.
24. *Dubois M., Gilles K., Hamilton I., Rebers P., Smith F.* Colorimetric method for demonstration of sugars and related substances // *Anal. Chem.* – 1956. – V. 28. № 3. – P. 350–356.
25. *Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К., Вухоть Н.Е.* Иммунология: практикум, Киев: Вища школа – 1989 – 304 с.
26. *Dam T.K., Bachhawat K. Rani P.G. Surolia A.* Garlic (*Allium sativum*) lectins bind to high mannose oligosaccharide chains // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V.273, N 10. –P.5528–5535.
27. *Chen Z., Kai G., Liu X., Lin J., Sun X., Tang K.* cDNA cloning and characterization of a mannose-binding lectin from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes // *J. Biosci.* – 2005. – V. 30, N 2 – P. 213–220.
28. *Cheung A.H., Wong J.H., Ng T.B.* *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity // *Phytomedicine*. – 2009. – V. 16, N 6–7. – P. 594 – 600.
29. *Kaku H., Van Damme E.I.M., Peumans W.I., Goldstein I.J.* Carbohydrate-binding specificity of the daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) and amaryllis (*Hippeastrum hybr.*) bulb lectins // *Arch. Biochem. Biophys.* –1990. – V.279, N 2. – P.298–304.
30. *Антонюк Л.Я.* Очистка и некоторые свойства лектинов из подснежника белоснежного (*Galanthus nivalis* L.) и белоцветника весеннего (*Leucojum vernum* L.) // *Биохимия* – 1993 – Т.58, N 3. – С.367–375.
31. *Определитель высших растений Украины / Доброчаева Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др.* – Киев: Наукова думка, 1987. – 548 с.
32. *Konishi T., Fujiwara Y., Konoshima T., et al.* Steroidal Saponins from *Hemerocallis fulva* var. *Kwanso* // *Chem. Pharm. Bull.* – 2001. – V. 49. – P. 318–320.
33. *Jones G.H., Ballou C.E.* Studies on the Structure of Yeast Mannan // *J. Biol. Chem.* – 1969. – V. 244, N 4. – P. 1043–1051.

SUMMARY

Volodymyr ANTONYUK^{1,2}, Lydyia PANCHAK², Maryna STARYKOVYCH¹, Rostislav STOIKA¹

A NEW MANNOSE-SPECIFIC LECTINS MONOCOTYLIDONE PLANTS. PURIFICATION AND COMPARATIVE DESCRIPTION

¹*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine,
Drahomanov Street 14/16, 79005 Lviv, Ukraine*

²*Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ukraine.
Pekarska str., 69, 79010 Lviv, Ukraine
e-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua*

We realized screening of new mannose-specific lectins among the Monocotyledones plants that belong to different families. As results was found several new lectins. For purified lectins was investigated interaction with key carbohydrates and glycoproteins. Was choose a few new lectins for subsequent more detailed research. For lectins from rhizomes of *Hemerocallis fulva* and bulbs of *Hyacinthella acutiloba* determined main physical and chemical characteristics, investigational interaction with human and animals erythrocytes and determined carbohydrate specificity.

Keywords: D-mannose-specific lectins, screening, properties, Monocotyledones.

РЕЗЮМЕ

Владимир АНТОНЮК^{1,2}, Лидия ПАНЧАК², Марина СТАРИКОВИЧ¹, Ростислав СТОЙКА¹

НОВЫЕ МАННОЗОСПЕЦИФИЧНЫЕ ЛЕКТИНЫ ОДНОДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ. ОЧИСТКА И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

¹*Институт биологии клетки НАН Украины,
ул. Драгоманова 14/16, 79005 Львов, Украина*

²*Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого
ул. Пекарская, 69, 79010 Львов, Украина
e-mail: antonyuk@meduniv.lviv.ua*

Осуществлен поиск новых маннозоспецифичных лектинов среди однодольных растений, которые относятся к разным семействам, в результате которого найдено ряд новых лектинов. Для очищенных лектинов исследовано взаимодействие с ключевыми углеводами и гликопротеинами. Отобрано несколько новых лектинов для последующего более детального исследования. Для лектинов из корневищ *Hemerocallis fulva* и луковиц *Hyacinthella acutiloba* определены основные физико-химические характеристики, исследовано взаимодействие с эритроцитами человека и животных и установлена углеводная специфичность.

Ключевые слова: D-маннозоспецифичные лектины, поиск, свойства, однодольные.

Надійшла: 30.01.2013.
Після доопрацювання: 14.02.2013.
Прийнята до друку: 20.02.2013.