საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის
სახელობის ქართული უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო
მეცნიერებათა სკოლა (ფაკულტეტი)

საგანმანათლებლო პროგრამა - ბიოტექნოლოგია

მალხაზ ვახანია

ალოეს (A.aristata) ორგანოებიდან ლექტინების გამოყოფა, მათი ფიზიკურ-ქიმიური დახასიათება და ფუნქცია.

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად წარმოდგენილი ნაშრომის

სადისერტაციო მაცნე

მიმართულება - 05 საბუნებისმეტყველო მეცნიერებები
დარგი/სპეციალობა - 0504 ბიოლოგია/სიცოცხლის შემსწავლელი მეცნიერებანი

თბილისი
2016

სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის ინფორმატიკის,

მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა სკოლის (ფაკულტეტის) საბუნებისმეტყველო მიმართულებაზე.

სამეცნიერო ხელმძღვანელები: **1. გიორგი ალექსიძე**
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი.
2. ნუგზარ ალექსიძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი.

ოფიციალური ოპონენტები: **1. ნანა კოშორიძე**
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
პროფესორი.
2. მატრონა ჩაჩუა
ბიოლოგიის მეცნიერებათა აკადემიური დოქტორი.

დისერტაციის დაცვა შედგება 2016 წლის 4 ივლისს 15^{00} საათზე.

საქართველოს საპარტიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა სკოლის (ფაკულტეტის) სადისერტაციო კომისიის სხდომაზე.

მისამართი: 0162, თბილისი, ილია ჭავჭავაძის ქ. № $53^{ა}$, აკადემიკოს ილია ვეკუას სახელობის აუდიტორია.

დისერტაციის გაცნობა შეიძლება საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის სამეცნიერო ბიბლიოთეკაში.

სადისერტაციო მაცნე დაიგზავნა 2016 წლის 4 ივნისს.

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი,
ფიზიკა–მათემატიკის აკადემიური დოქტორი, პროფესორი

გიორგი მაქაცარია

სარჩევი

1. ნაშრომის ზოგადი დახასიათება..... 4
1.1. თემის აქტუალობა……... 4
1.2. კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები……... 5
1.3. ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და ძირითადი შედეგები…….....…….. 5
1.4. კვლევის თეორიული და მეთოდოლოგიური საფუძვლები…… 6
1.5. ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა…… 6
1.6. დისერტაციის სტრუქტურა და მოცულობა…..... 7
2. ნაშრომის ძირითადი შინაარსი…..……..…..... 8
2.1. კვლევის ობიექტი.....……...… 8
2.2. კვლევის მეთოდები.....……...… 9
2.3. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა.....…….. 13
2.4. დასკვნები..... 22
3. დისერტაციის თემასთან დაკავშირებული პუბლიკაციების ნუსხა…….…… 26

1.ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

1.1. თემის აქტუალობა

ნახშირწყალ-დამოკიდებული შეცნობა, წარმოადგენს ერთ-ერთ ცენტრალურ მოვლენას ბიოლოგიური სისტემის ფუნქციონირებაში. უჯრედის დონეზე შეცნობა ჩვეულებრივ ხორციელდება სპეციფიკური ცილა-ნახშირწყლოვანი ურთიერთქმედებით და განაპირობებს ისეთ ბიოლოგიურად მნიშვნელოვან პროცესებს როგორიცაა: ნივთიერებათა ტრანსპორტი, ენზიმების მოქმედების მოდულაცია, უჯრედული კომუნიკაციები, უჯრედთა დიფერენცირება, განაყოფიერება, ზრდა-განვითარება, ანთებითი პროცესები, მიკრობთა ადჰეზია, სინაფსური გადაცემა და სხვა.

ლექტინების აღმოჩენის შემდეგ ინტენსიურმა კვლევებმა მიგვიყვანა ფიტოჰემაგლუტინინების სხვადასხვა ასპექტების გაგების დიდ პროგრესთან. მიუხედავად ამისა, ლექტინებთან მიმართებაში მეტად მნიშვნელოვანი კითხვები, რომელიც პასუხს მოითხოვს ჯერ კიდევ დასმული არ არის.

განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს ლექტინების ბიოლოგიური როლის შესწავლა, ფიტოლექტინები ცილების ძალზე ჰეტეროგენული ჯგუფია. მცენარეებში ისინი სხვადასხვა კონცენტრაციით არიან წარმოდგენილნი. ლექტინების ბიოლოგიური როლი მოიცავს უნივერსალურ მოლეკულურ მექანიზმს, რომელიც განაპირობებს ყველა ცოცხალი სისტემის, დაწყებული ვირუსებიდან დამთავრებული ადამიანით, ურთიერთქმედებას და განვითარებას. ამასთან არის კავშირში ლექტინების ბიოლოგიური როლი, რომელიც მოიცავს სპეციფიკური პროცესების ინჰიბირებას ან აქტივაციას, უჯრედებს შორის ურთიერთქმედებას და მათ ადჰეზიას ჰისტოგენეზსა და რეგენერაციის პროცესში. თუმცა ისიც უნდა აღინიშნოს, რომ ამ ურთიერთქმედების მექანიზმები, ზოგჯერ ბოლომდე ნათელი არ არის.

არსებობს მონაცემები, რომლებიც მიუთითებენ მრავალი ფიტოჰემაგლუტინინების ისეთ თვისებაზე, რაც დამახასიათებელია სარეზერვო ცილებისათვის, თუმცა ერთი შეხედვით რთული დასაჯერებელია ნახშირწყლების დამაკავშირებელ ცილებს არ გააჩნდეს უპირატესობა სარეზერვო ცილებთან მიმართებაში.

თანდათან ირკვევა, რომ ლექტინები ხასიათდებიან ორმაგი ფუნქციით, როცა ისინი მცენარეში არსებობენ, როგორც სარეზერვო ცილები, ხოლო როცა მცენარე ახდენს მათ გამოყოფას, ლექტინები აქტიურად იცავენ მას პარაზიტებისაგან. ამასთან რთულია იმის დამტკიცება თუ როგორ ხდება ლექტინებით მცენარის დაცვა, მაგალითად სოკოვანი ინფექციისგან, თუმცა ზოგიერთი ფაქტი ამაზე მიუთითებს, ასეთ შემთხვევებში საჭიროა კვლევის გარკვეული მეთოდების შემუშავებაც.

1.2. კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები

ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე, მცენარეული წარმოშობის უცნობი ლექტინების გამოყოფა, იდენტიფიკაცია და მათი ბიოლოგიური როლის შესწავლა კვლავ ერთ-ერთ აქტუალურ პრობლემად რჩება. ამიტომაც მიზნად დავისახეთ შეგვესწავლა ალოეს ერთ-ერთი სახეობის (A.aristata) ლექტინები. ჩვენი ინტერესი ალოეს მიმართ განპირობებული იყო ლიტერატურული მონაცემების საფუძველზე გაკეთებული დასკვნით, რომელიც მიუთითებს ზოგადად ალოეს გვარის სამკურნალო თვისებებზე. განსაკუთრებით საინტერესო იყო A. aristata-ს დღემდე შეუსწავლელი ლექტინების გამოვლენა, მისი ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების შესწავლა და ბიოქიმიური მაჩვენებლების შესწავლა.

1.3. ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და ძირითადი შედეგები

გამოვლენილია მცენარე ალოეს (A.aristata) ორგანოებიდან გამოყოფილი, აქამდე უცნობი ლექტინების ნახშირწყლებისადმი დამოკიდებულება, ადამიანის სისხლის ABO ჯგუფის და ცხოველების ერითროციტებისადმი ლექტინების ურთიერთქმედება.

შესწავლილია ლექტინების აქტიურობა სხვადასხვა აბიოტური ფაქტორების (მაღალი და დაბალი ტემპერატურა, მზის მაღალი რადიაციის გავლენა, უი. სხივების მოქმედება) მიხედვით. დადგენილია ლექტინების განაწილება ცალკეული ფოთლების და მცენარის იარუსების მიხედვით.

ცდების შედეგად დადგინდა, რომ ალოეს (A.aristata) ორგანოები შეიცავს მანოზა- და N-აცეტილ-D-გლუკოზამინ-სპეციფიკურ

ლექტინებს. ლექტინები მაღალ ტემპერატურაზე დროის გარკვეულ (20 წუთი) ინტერვალში ინარჩუნებენ აქტიურობას. ლექტინების განაწილება არაერთგვაროვანია მცენარეში, მაქსიმალური ლექტინური აქტიურობით გამოირჩევა ალოეს ზედა იარუსის ფოთლები.

ალოეს ფოთლის ლექტინი არ ახდენს ადამიანის ABO სისხლის ჯგუფის ერითროციტების აგლუტინაციას, ბოლქვიდან გამოყოფილი ლექტინი ახდენს მეორე და მესამე სისხლის ჯგუფის ერითროციტების სუსტ აგლუტინაციას, ხოლო ფესვიდან გამოყოფილი ლექტინი ახდენს ABO სისტემის ყველა ჯგუფის ერითროციტების აგლუტინაციას.

1.4. კვლევის თეორიული და მეთოდოლოგიური საფუძვლები

ალოეს ცალკეული ორგანოებიდან ლექტინების გამოყოფის მიზნით, ვიყენებდით ფიზიოლოგიურ ხსნარს (0.9% NaCl + 1M KH_2PO_4 pH 7.4 (PBS 0.4 mM), შეფარდებით გრამი ნედლეული/ 10 მლ).

ცილის კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით ლოურის მეთოდით.

ლექტინების კონცენტრირებას და ნაწილობრივ გასუფთავებას ვახდენდით, 90%-იანი ამონიუმის სულფატით გაჯერებული ხსნარით.

ექსტრაქტში ლექტინურ აქტიურობას ვსაზღვრავდით ჰემაგლუტინაციური ტესტით ბოცვრის ტრიფსინიზირებულ ერითროციტების მიმართ იმუნოლოგიურ ფირფიტაზე.

ლექტინების სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ შევისწავლეთ Liener-ის ჰაპტენ-ინჰიბიტორული მეთოდით.

ცილის მოლეკულური მასის დადგენას ვახდენდით ელექტროფორეზით 12%-იან პოლიაკრილამიდის გელში.

1.5.ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება.

ლექტინების ფუნქციიდან გამომდინარე ისახება მათი გამოყენების დიდი პერსპექტივები მედიცინაში, ბიოლოგიაში, გენურ ინჟინერიაში, სოფლის მეურნეობასა და მეცნიერების სხვა დარგებში. ნახშირწყლებთან სპეციფიკურად დაკავშირების თვისობის საფუძველზე ლექტინებმა ეფექტური გამოყენება ჰპოვეს აგრეთვე ბიოქიმიურ და ჰისტოქიმიურ კვლევებშიც. ლექტინების საშუალებით

შესაძლებელი გახდა გლიკოპროტეინების სუფთა სახით გამოყოფა და ბიომემბრანების ტერმინალური ნახშირწყლების ზონდირება.

1.6. დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა.

დისერტაცია მოიცავს: შესავალს, კვლევის მასალებსა და მეთოდებს, საკუთარი კვლევის შედეგებს, შედეგების განხილვას, დასკვნებს, გამოყენებული ლიტერატურის სიას (72 წყარო). იგი ილუსტრირებულია 64 ცხრილით და 25 სურათით. ნაშრომის მოცულობა 120 გვერდია.

2. ნაშრომის ძირითადი შინაარსი

2.1. კვლევის ობიექტი

კვლევის ობიექტად ვიყენებდით ალოეს ერთ-ერთ სახეობას - Aloe aristata. მისი სისტემატიკური დახასიათება ასეთია:

სამეფო Plantae
რიგი Asparagales
ოჯახი Xanthorrhoeaceae
ქვეოჯახი Asphodeloideae
გვარი Aloe
სახეობა **A. aristata**

მისი სამშობლო სამხრეთ აფრიკაა, გავრცელების საზღვარი მოიცავს, სამხრეთ აფრიკის აღმოსავლეთ და დასავლეთ კაპის პროვინციას, თავისუფალ შტატს, ლესოტოს და კვაზულუ-ნატალის ტერიტორიებს. ჩვენთან დეკორატიული სახით არის გავრცელებული. იზრდება ქვიშიან ველებზე, ციცაბო მთიან-კლდოვან ადგილებში, ზღვის დონიდან 1600 მ-მდე. ადვილად ეჯვარება გასტერიას გვარის წარმომადგენლებს. A. arborescens-თან შედარებით, როგორც დეკორატიული მცენარე, ნაკლებად გავრცელებულია და ნაკლებად შესწავლილი.

ხასიათდება სუკულენტური ფოთლებით, რომელიც შეკრებილია მჭიდროდ, მრგვალ როზეტებად (დიამეტრი 8-10 სმ). ფოთლები 8-10 სმ. სიდიდის ფართო ლანცეტისებრი, ფუძესთან 1-1.5 სმ. სიგანის, ფერით მუქი მწვანეა, ფოთლის გვერდით კიდეებზე განლაგებულია პატარა გამჭვირვალე ეკლები. ფოთლების ზედაპირზე, განსაკუთრებით ქვედა მხარე, დაფარულია მრავალრიცხოვანი რბილი გამჭვირვალე ეკლებით, რომელიც განლაგებულია გარდი-გარდმო ერთი ან ორი მწკრივით. ფოთლის მწვერვალი მთავრდება თეთრი ქიცვით (ამით განსხვავდება ჰავორციასაგან. გარდა ამისა, მცენარე ჰავორციას ფოთლის ქვედა ნაწილში, შეიმჩნევა რკალის მსგავსი წარმონაქმნი, ალოეს ფოთოლს კი ეს ნაწილი სწორი აქვს და თან ოდნავ მომრგვალებული).

2.2. კვლევის მეთოდები

აგლუტინაციას საფუძვლად უდევს ლექტინების უნარი, დაუკავშირდნენ მეზობელი უჯრედების ზედაპირზე განლაგებულ ნახშირწყლებს, წარმოქმნან მათ შორის მრავალრიცხოვანი მოლეკულური ხიდაკები და გამოიწვიონ მათი შეწებება ანუ აგლუტინაცია.

ცილის ჰემაგლუტინაციურ ანუ ლექტინურ აქტიურობას ვსაზღვრავდით Liener-ის მეთოდით [40]. ჰემაგლუტინაციის ხარისხს ვაფასებდით ცილის ექსტრაქტის სპეციფიკური აქტიურობის მიხედვით (1 მგ ცილის ის მაქსიმალური განზავება, რომელიც ჯერ კიდევ იწვევს აგლუტინაციას) SA=T/C (მლ/მგ) სადაც T (ტიტრი) არის ცილის განზავების მნიშვნელობა პლანშეტის იმ ფოსოში, სადაც ჯერ კიდევ შეინიშნება ჰემაგლუტინაცია, ხოლო C - ცილის კონცენტრაცია, გამოსახული მგ/მლ ერთეულებში.

ლექტინების შემცველობას ვსაზღვრავდით, ცილის კონცენტრაციის შეფარდებით ლექტინურ აქტივობასთან (პირობით აგლუტინაციურ ერთეულებში).

ლექტინური მაჩვენებლების გამოთვლა მიმდინარეობდა შემდეგი ფორმულებით:

1. ლექტინის მინიმალური აქტიურობა.
2. ჰემაგლუტინაციური ტიტრი: $T=2^n$ სადაც
   T - ჰემაგლუტინაციის მინიმალური ტიტრი.
   2 - განზავების მაჩვენებელი
   n - იმუნოლოგიური პლანშეტის ფოსოების რაოდენობა, სადაც სრული აგლუტინაცია შეინიშნება.
3. ლექტინის სპეციფიკური აქტიურობა: SHA (Specifc Haemaglutination Activity) SHA=T/C
   სადაც: T - ჰემაგლუტინაციის მინიმალური ტიტრი.
   C - ცილის კონცენტრაცია.
4. ლექტინის ხვედრითი ჰემაგლუტინაციური აქტიურობა განისაზღვრება - $T \cdot m$
   სადაც T - ჰემაგლუტინაციის მინიმალური ტიტრი.
   m - მცენარის ქსოვილის მასა, საიდანაც ლექტინი გამოიყო.
5. ლექტინის კონცენტრაცია: $LC=\frac{1}{T * m}$ სადაც

LC - ლექტინის კონცენტრაცია.
T - ჰემაგლუტინაციის მინიმალური ტიტრი.
m - მცენარის ქსოვილის მასა, საიდანაც ლექტინი გამოიყო.

ექსპერიმენტული მონაცემები მიღებულია ცდების სამჯერადი
განმეორების შედეგად.

ბოცვრიდან სისხლიდან მიღებული ერითროციტების მასა მუშავდებოდა ტრიფსინით. ინკუბაციის შემდეგ ერითროციტებს სამჯერ ვრეცხავდით PBS-ის ათმაგ მოცულობაში, ვაცენტრიფუგირებდით 2000 g-ზე 10 წთ-ის განმავლობაში და კვლავ ვსაზღვრავდით ჰემატოკრიტს. ფიზიოლოგიური ხსნარის საფუძველზე ვამზადებდით ერითროციტების 2% სუსპენზიას, რომელსაც ვიყენებდით ჰემაგლუტინაციური აქტიურობის განსაზღვრისათვის.

ცილის რაოდენობას ვსაზღვრავდით ლოურის მეთოდით. ამ მეთოდს საფუძვლად უდევს არომატული ამინომჟავების (თიროზინი, ტრიფტოფანი) შეღებილი პროდუქტების წარმოქმნა ფოლინ-ჩიოკალტოს რეაქტივთან.

ნახშირწყლების მიმართ ლექტინების სპეციფიკურობას ვსწავლობდით ჰაპტენ-ინჰიბიტორული მეთოდის გამოყენებით. ანალიზისათვის ვიყენებდით მარტივი ნახშირწყლების, PBS ბუფერის საფუძველზე დამზადებულ 0.6 M ხსნარებს. ჩვენს მიერ გამოყენებული იქნა 5 ნახშირწყალი: D-გალაქტოზა, N-აცეტილ-D-გლუკოზამინი, D-მანოზა, L-ფუკოზა, D-გლუკოზა, ნახშირწყლების ხსნარს ვტიტრავდით 100 mM-დან კლებადი კონცენტრაციით, სამიკროტიტრაციო იმუნოლოგიურ ფირფიტაზე. ფირფიტის ყველა ფოსოში თანაბარი კონცენტრაციით შეგვქონდა ლექტინის ხსნარი. ჰაპტენის სპეციფიკურობაზე ვმსჯელობდით ნახშირწყლის იმ მინიმალური კონცენტრაციის მიხედვით, რომელიც იწვევდა ლექტინის ჰემაგლუტინაციური აქტიურობის დათრგუნვას.

ლექტინების თერმოსტაბილურობის შესწავლის მიზნით ნაწილობრივ გასუფთავებული ლექტინური ფრაქციების ინკუბაციას ვახდენდით წყლის აბაზანაში 20, 40, 60, 80, და 100^{0}C ტემპერატურაზე, 20 წუთის განმავლობაში. დამუშავებულ სინჯებს

ვაცივებდით ყინულოვან აბაზანაში (20 წთ), რის შემდეგაც ვაცენტრიფუგირებდით დენატურირებული ცილის ნალექის მოცილების მიზნით (8000g, 10 წთ) და სუპერნატანტებში ვსაზღვრავდით ჰემაგლუტინაციურ აქტიურობას ოთახის ტემპერატურაზე.

ლექტინების ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე H^+ იონების კონცენტრაციის გავლენას ვსწავლობდით pH 5.0-დან – pH 9.0-მდე დიაპაზონის PBS ბუფერში, 1.0 ერთეულის შუალედებით.

გასუფთავებული ცილის ხსნარს (PBS, pH 7.4) ვტიტრავდით კლებადი კონცენტრაციის მიხედვით სამიკროტიტრაციურ იმუნოლოგიურ ფირფიტაზე, შესაბამისი pH-ის მქონე PBS-ში. აგლუტინაციისათვის ვიყენებდით ბოცვრის ტრიფსინიზირებული ერითროციტების 2% სუსპენზიას, რომელიც დამზადებული იყო აგრეთვე შესაბამისი pH-ის მქონე ბუფერის საფუძველზე.

მცენარეულ მასალას ვაჰომოგენიზირებდით ფაიფურის როდინში შემდეგ საექსტრაქციო არეში: 0.9% NaCl, 0,04M K^+-ფოსფატის ბუფერი, pH 7.4 (PBS), 0.1% β-მერკაპტოეთანოლი, შეფარდებით 1/10 (გ/მლ); ექსტრაქციას ვახდენდით მაგნიტურ სარეველაზე 1 საათის განმავლობაში, +20^{0}C-ზე. ექსტრაქტს ვფილტრავდით ორმაგ დოლბანდში და ვაცენტრიფუგირებდით 8000g-ზე 20 წთ; სუპერნატანტს ვფილტრავდით შუშის ფილტრებში. ექსტრაგირებულ ცილებს ვლექავდით ამონიუმის სულფატით 0-90% გაჯერების პირობებში; ფრაქციებს ვაცენტრიფუგირებდით 8000g-ზე 20 წუთის განმავლობაში, 1-4^{0}C-ზე („Beckman“ SW-27 როტორი); ნალექს ვხსნიდით მინიმალური მოცულობის PBS-ში, ვაჰომოგენიზირებდით მინის ჰომოგენიზატორში, კვლავ ვაცენტრიფუგირებდით (8000 ბრ/წთ, 10 წთ) და ვფილტრავდით Whatman CF/C და 0,45μ ფილტრებში.

გელ-ფილტრაციის მეთოდით ცილის ფრაქციონირებისათვის ვიყენებდით HW-55 გელის სვეტს (2სმX44სმ და 0.5X50სმ) სვეტზე დაგვქონდა 0,9% NaCl + 40mM K^+-ფოსფატის ბუფერით (pH 7.4) ექსტრაგირებული და ამონიუმის სულფატით (0-90% გაჯერების პირობებში) გამომარილებული ცილის ფრაქცია (1 მგ/მლ). ქრომატოგრაფიას ვატარებდით შემდეგ პირობებში: ელუციის სიჩქარე 1.5 მლ/წთ. დეტექტირება - 280 ნმ ტალღის სიგრძეზე, ქაღალდის სიჩქარე 1.5 მმ/წთ, მგრძნობელობა 1.28, საელუციო ბუფერი 0.9% NaCl

+ 40mM K^+-ფოსფატის ბუფერი (pH7.4). სვეტიდან გამოსულ ფრაქციებს ვაანალიზებდით ლექტინურ აქტიურობაზე.

ბოცვრის ერითროციტების გლუტარალდეჰიდით ფიქსაციის მიზნით თავდაპირველად ვახდენდით ერითროციტების ტრიფსინიზაციას.

ვამზადებდით ტრიფსინიზირებული ერითროციტების 2%-იან სუსპენზიას გლუტარალდეჰიდის 2.5 ან 5%-იან ხსნარზე. სააგლუტინაციო ბუფერზე (pH 7.4) და ვდგამდით სანჯღრეველაზე 17 სთ-ის განმავლობაში, +4^{0}C-ზე. ნალექს ვრეცხავდით ოთხმაგი მოცულობის სააგლუტინაციო ბუფერში, ცენტრიფუგირებით (700 g. 10 წთ.), ვადგენდით ჰემატოკრიტს და ვამზადებდით ერითროციტების 2%-იან სუსპენზიას სააგლუტინაციო ბუფერზე მომზადებული 1 M გლიცინის ხსნარზე (pH7.4). ვაყოვნებდით სანჯღრეველაზე 17 სთ-ის განმავლობაში, +4^{0}C-ზე. ნალექს კვლავ ვრეცხავდით ოთხმაგი მოცულობის სააგლუტინაციო ბუფერში, ცენტრიფუგირებით (700 g, 10 წთ.); ჰემატოკრიტის განსაზღვრის შემდეგ ნალექს ვურევდით ბიოგელ P-150-ს შეფარდებით 1:10 და ვამზადებდით გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებული ერითროციტების აფინურ სვეტს ზომით 75×20 მმ. სვეტს კარგად ვრეცხავდით ჯერ სააგლუტინაციო ბუფერით, შემდეგ 0.2M გლიცინ/HCl-ის ბუფერით (pH 3.0). გამოყენების წინ სვეტს ვაწონასწორებდით სააგლუტინაციო ბუფერით.

ლექტინური აქტიურობის მქონე ცილოვანი ფრაქციიდან ლექტინის შემდგომ გასუფთავებას ვახდენდით 0.2N HCl-ით დამუშავებული G10 სვეტზე (1.7×2სმ), რომელიც გაწონასწორებული იყო 0.02M K^+-ფოსფატის ბუფერით. სვეტზე დაგვქონდა ლექტინური აქტიურობის მქონე ექსტრაქტის 10-15 მლ. სვეტს ვრეცხავდით იმავე ბუფერული ხსნარით.

ცილების ელექტროფორეზს დისოცირებულ პირობებში (პრეპარატის პოლიპეპტიდური შედგენილობის დასადგენად) ვატარებდით ასევე Laemmli-ის სისტემის გამოყენებით 1.2 მმ სისქის, 12% გრადიენტის პოლიაკრილამიდის გელში 0,2% SDS-ის თანაობისას. გასუფთავებული ლექტინის ცილოვანი პრეპარატის ელექტროფორეზს ვატარებდით Laemmli-ის სისტემის გამოყენებით 1.2მმ სისქის და 12% გრადიენტის პოლიაკრილამიდის გელში. ელექტროფორეზი მიმდინარეობდა VWR-ის ფირმის ხელსაწყოში 3-5 სთ-ის განმავლობაში გელის თითოეულ მილილიტრზე 2 mA დენის

ძალის თანაობისას. მარკერებად გამოყენებულ იქნა შემდეგი სტანდარტული ცილები (Kda): β-გალაქტოზიდაზა (116), ფოსფორილაზა b (97.4), ხარის შრატის ალბუმინი (66.2), ალკოჰოლდეჰიდროგენაზა (37.6), კარბოანჰიდრაზა (28.5), მოიგლობინი (18.4), ლიზოციმი (14).

2.3. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

გამომდინარე ალოეს წარმომადგენელთა სამკურნალო თვისებებიდან და ახალი ბიოლოგიურად აქტიური ლექტინების გამოვლენის აქტუალობამ, განაპირობა ჩვენი ინტერესი პრაქტიკულად შეუსწავლელი ალოეს ერთ-ერთი სახეობის Aloe Aristata-ს ფოთლის, ბოლქვის და ფესვის ლექტინების მიმართ. ჩვენს მიზანს წარმოადგენდა ალოეს ორგანოებიდან მიგვეღო სუფთა სახის ლექტინის ფრაქცია და მოგვეხდინა მისი ბიოქიმიური დახასიათება და შეგვესწავლა მისი თვისებები.

კვლევის პირველ ეტაპზე შესწავლილ იქნა ალოეს (A.aristata) ორგანოებიდან გამოყოფილი ლექტინების დამოკიდებულება წყალბადიონთა კონცენტრაციისადმი. შედეგებმა აჩვენა, რომ ალოეს ფოთლის ლექტინი მაქსიმალურ აქტიურობას ავლენს pH 7.4-ის პირობებში, ხოლო ბოლქვის და ფესვის ლექტინი pH 9-ის პირობებში. ალოეს ფოთლის ექსტრაქტის ლექტინური აქტიურობაზე, გავლენას ახდენს pH-ის მკვეთრი ცვლილება და ტემპერატურისაგან დამოკიდებულება (36.6°C).

ალოეს (A.aristata) ფოთლიდან გამოყოფილი ლექტინი მანოზა-სპეციფიკურია, მანოზასპეციფიკური აღმოჩნდა ალოეს ყვავილის ღეროს და მთლიანად ყვავილიდან გამოყოფილი ლექტინიც. ბოლქვის და ფესვის ლექტინი N-აცეტილ-D-გლუკოზამინსპეციფიკურია. სამივე ორგანოდან გამოყოფილი ლექტინები ურთიერთქმედებენ პოლიმერ ქიტინთან, უფრო ნაკლებად რეაგირებს ალოეს ფოთლიდან გამოყოფილი ლექტინი, ვიდრე ბოლქვის და ფესვის ლექტინი, ეს ბუნებრივია, ვინაიდან ქიტინი შეიცავს N-აცეტილ-D-გლუკოზამინის ნაშთებს.

ალოეს (A.aristata) ორგანოებიდან გამოყოფილი ლექტინები, ახდენენ ბოცვრის, ვირთაგვას როგორც ტრიფსინიზირებულ, ისე ნატიური ერითროციტების აგლუტინაცას. ადამიანის AB0 სისხლის

ჯგუფის ნატიური ერითროციტების მიმართ კი ალოეს ფოთლის ლექტინი არ რეაგირებს, სუსტად რეაგირებს ალოეს ბოლქვის ლექტინი ადამიანის მეორე და მეოთხე სისხლის ჯგუფის ერითროციტებთან, ხოლო ფესვის ლექტინი ადამიანის ოთხივე ჯგუფის მიმართ ავლენს აგლუტინაციურ თვისებას.

ცილების სუფთა სახით მიღების პირველი ეტაპი არის ამონიუმის სულფატით მათი დალექვა. ამ მიზნით მიმდინარეობდა 20-100%-მდე ამონიუმის სულფატით მცენარეული ექსტრაქტების გაჯერება და ფიქსირება თუ რომელ პირობებში იყო ცილების ყველაზე მაღალი აქტიურობა. ალოეს ფოთლის ექსტრაქტის შემთხვევაში ლექტინური აქტიურობა ყველაზე მაღალი იყო ამონიუმის სულფატით 20-40%-ით ექსტარქტის გაჯერების, ხოლო ფესვის და ბოლქვის ექსტრაქტის შემთხვევაში 40-60%-ის პირობებში.

მცენარე გამოირჩევა იარუსების რაოდენობით. მათი რიცხვი ასაკის მიხედვით მერყეობს. ჩვენს შემთხვევაში იარუსების რაოდენობა რვა იყო. აღსანიშნავია, რომ ზოგჯერ იარუსების საზღვრები მკვეთრად გამიჯნული არ არის. ცდები ჩატარდა თითო იარუსზე გვერდიგვერ მყოფი ორი ფოთლის მიხედვით. იარუსების ნუმერაცია მიმდინარეობდა ზემოდან ქვემოთ. ყველაზე მაღალი ლექტინური აქტიურობა გამოავლინა მცენარის პირველი იარუსის ფოთლებმა, ხოლო მერვე იარუსი ფოთლებში ლექტინური აქტიურობა, თითქმის 100%-ით დაბალი იყო, პირველი იარუსი ფოთლების ლექტინურ აქტიურობასთან მიმართებაში.

ლექტინური აქტიურობა განსხვავებული აღმოჩნდა ალოეს ფოთოლშიც კი. ის პირობითად დაიყო ორ: ზედა და ქვედა ნაწილებად. ზედა ნაწილი მკვეთრი მწვანე ფერისაა, ხოლო ქვედა ღია მწვანეა. ზედა ნაწილში ლექტინური აქტიურობა გაცილებით მაღალი აღმოჩნდა ქვედა ნაწილთან შედარებით. ალოეს ფოთლის კუტიკულა ასევე მაღალი ლექტინური აქტიურობით გამოირჩევა, ხოლო ფოთლის რბილობში ლექტინური აქტიურობა საერთოდ არ ფიქსირდება.

ალოეს (A.aristata) ბოლქვიც ლექტინური განაწილების მხრივ ერთგვაროვანი არ არის. ბოლქვის ზედა ნაწილი გამოირჩევა ლექტინის მაღალი აქტიურობით, რაც თანდათან მცირდება მის შუა და ბოლო ნაწილებში. ანალოგიურად ფესვებიც რაც უფრო

დაშორებულია მცენარის ბოლქვს მით უფრო მცირდება ლექტინური აქტიურობა.

ალოეს (A.aristata) ფოთლის ყვავილიც განსხვავებულია ლექტინური აქტიურობის მხრივ. მაქსიმალურ აქტიურობას ავლენს ყვავილის ყუნწი, ყველაზე ნაკლებია ფილამენტებში, ხოლო სამტვრე პარკში ლექტინური აქტიურობა არ ვლინდება.

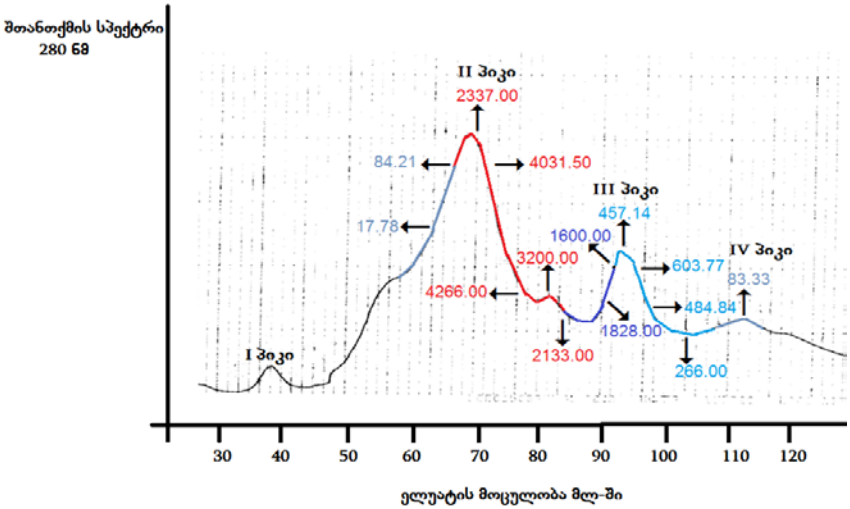
ცდების მომდევნო სერიებში დადგინდა ალოეს (A.aristata) ორგანოებიდან მომზადებულ ექსტრაქტებში ლექტინური აქტიურობის ცვლილება მაღალი ტემპერატურული რეჟიმის ცვლის პირობებში. აღმოჩნდა, რომ ალოეს ფოთლის ექსტრაქტში ლექტინური აქტიურობა შენარჩუნებულია 20 წუთის მანძილზე 60°C-ზე. 80°C-ზე ის მთლიანად იხსნება, ხოლო ბოლქვის და ფესვის ლექტინი 100°C 20 წუთის განმავლობაში კი ინარჩუნებს მცირე ლექტინურ აქტიურობას.

ალოეს (A.aristata) ორგანოებიდან მიღებული ექსტრაქტები -18°C-ზე საკმაოდ მაღალ დონეზე ინარჩუნებენ ლექტინურ აქტიურობას.

ალოეს (A.aristata) ფოთლის ლექტინური აქტიურობა იზრდება უი. სხივების ზემოქმედების შედეგად 30 წუთის შემდეგ. ამასთან 60 წუთის მანძილზე უი. სხივები ზემოქმედება ალოეს ფოთლის ექსტრაქტში ლექტინურ აქტიურობაზე არ მოქმედებს, რაც დიდი ალბათობით ადაპტაციის მექანიზმებში ლექტინის როლზე მიუთითებს.

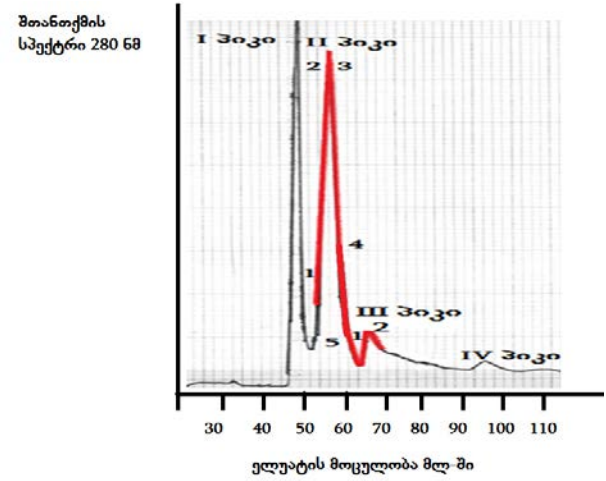
ცდების მომდევნო სერიაში, დავადგინეთ თუ როგორ იცვლებოდა ალოეს ფოთლის ცილების ქრომატოგრამის პიკების ცალკეულ უბნებში ლექტინური აქტიურობა. მაღალი ლექტინური აქტიურობით და ცილის კონცენტრაციით გამოირჩევა მეორე პიკი (სურათი №1). ლექტინური აქტიურობა თანდათან ქვეითდება, თუმცა ის გარკვეულ დონეს ინარჩუნებს მესამე პიკის ბოლომდე.

ალოეს (A.aristata) ფოთლის ექსტრაქტის ცილების ქრომატოგრამა
სურათი №1



ალოეს (A.aristata) ბოლქვის ექსტრაქტის ცილების ქრომატოგრამაშიც ლექტინური აქტიურობით გამორჩეულია მეორე და მესამე პიკები. სურათზე №2 ნაჩვენებია ლექტინური აქტიურობის მქონე უბნები.

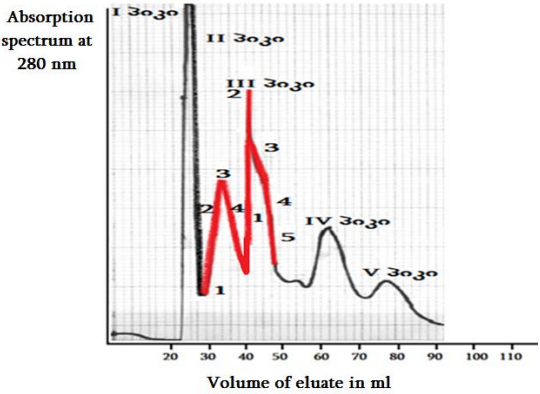
ალოეს (A.aristata) ბოლქვის ექსტრაქტის ცილების ქრომატოგრამა
სურათი №2



ალოეს ფესვის ექსტრაქტის ქრომატოგრამაშიც ლექტინური აქტიურობით მეორე და მესამე პიკებია გამორჩეული. №3 სურათზე აღნიშნულია ლექტინური აქტიურობის მონაკვეთები.

ალოეს (A.aristata) ფესვის ექსტრაქტის ცილების ქრომატოგრამა

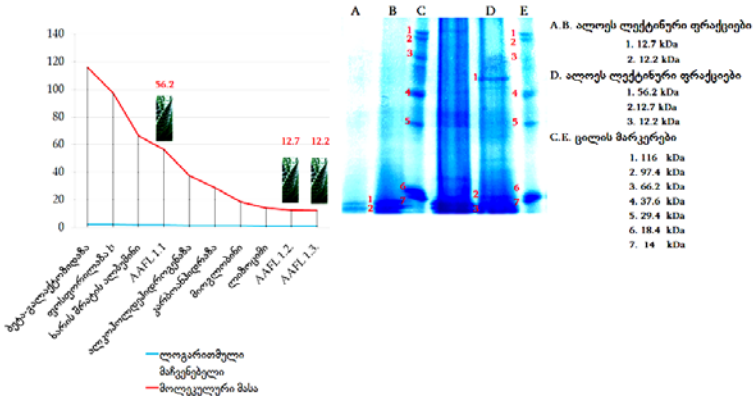
სურათი №3



ალოეს (A.aristata) ორგანოებიდან გამოყოფილი ლექტინების სუფთა სახით მიღება მიმდინარეობდა გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებული ბოცვრის ტრიფსინიზირებული ერითროციტებით. მიღებული ლექტინური ფრაქციის ერითროციტებისგან გამოთავისუფლება მიმდინარეობდა გლიცინ HCl-ის ხსნარით, დამზადებული PBS-ის ბუფერზე pH 2.5. შედეგად მიღებული გასუფთავებული ლექტინური ფრაქციის დატანა ხდებოდა 12%-იან პოლიაკრილამიდის გელში 0.2 %-იან SDS-ის თანხლებით. შედეგად მიღებულ იქნა სამი ლექტინური აქტიურობის მქონე ფრაქცია მოლეკულური მასით: 56.2; 12.7 და 12.2 kDa (სურათი №4).

ალოეს(A.aristata) ფოთლის ცილების ელექტროფორეგრამა

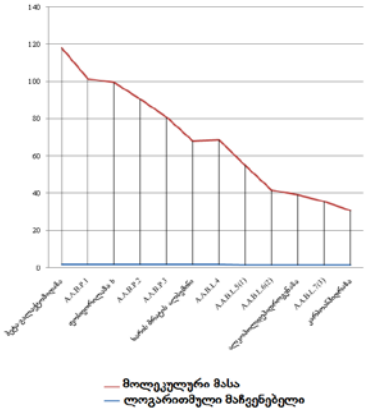
სურათი №4.

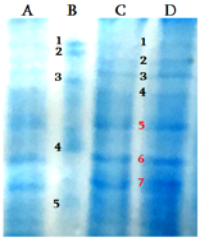


ალოეს (A.aristata) ბოლქვის ცილები, რომელიც ასევე ინკუბირებული იყო გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებული ერითროციტების სვეტზე, ელექტროფორეზულმა ანალიზმა გამოავლინა მკვეთრად გამოხატული სამი ცილოვანი (ლექტინური) ფრაქცია მოლეკულური მასით: 53.19; 39.57 და 33.69 kDa (სურათი №5).

ალოეს (A.aristata) ბოლქვის ცილების და ლექტინების ელექტროფორეგრამა

სურათი №5





B. ცილის მარკერები

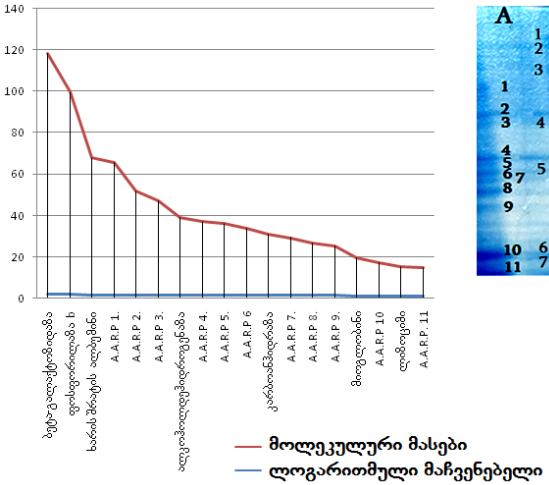
1.	ბეტა გალაქტოზიდაზა	116 kDa
2.	ფოსფორილაზა ბ	97.4 kDa
3.	ხარის შრატის ალბუმინი	66.2 kDa
4.	ალკოჰოლდეჰიდროგენაზა	37.6 kDa
5.	კარბოანჰიდრაზა	29.5 kDa

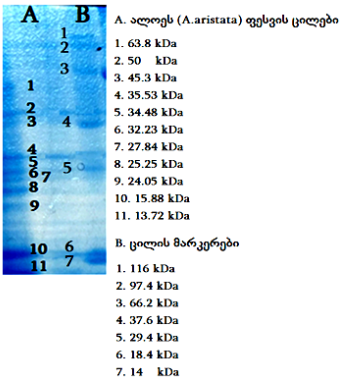
A.C.D. Aloe aristata-ს ბოლქვის ცილების და ლექტინების ფრაქციები

1.	A.A.B.P.1	99.49 kDa
2.	A.A.B.P.2	88.49 kDa
3.	A.A.B.P.3.	78.89 kDa
4.	A.A.B.P.4	67.07 kDa
5.	A.A.B.L.5.(1)	53.19 kDa
6.	A.A.B.L.6.(2)	39.57 kDa
7.	A.A.B.L.7.(3)	33.69 kDa

ალოეს (A.aristata) ფესვის შემთხვევაში მიღებულ იქნა ცილების ზოგადი ელექტროფორეზის სურათი სადაც გამოვლინდა 11 ცილოვანი ფრაქცია (სურათი №6).

ალოეს (A.aristata) ფესვის ცილების ელექტროფორეგრამა
სურათი №6

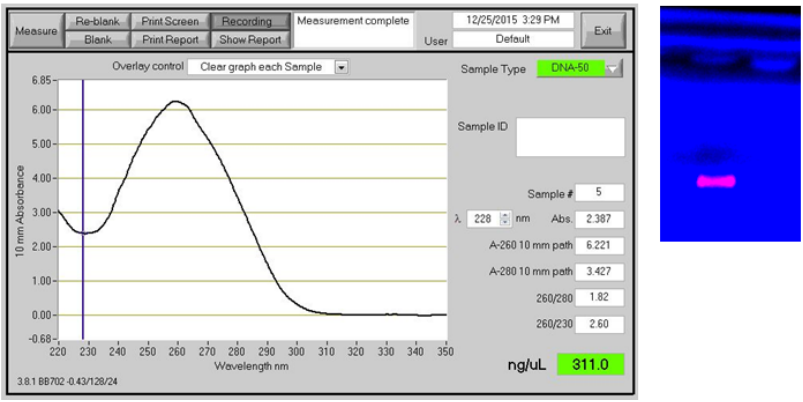




ალოედან (A.aristata) სუფთა სახით მიღებულ იქნა ნუკლეინის მჟავები (დნმ და რნმ), რომელიც დატანილ იქნა 2%-იან აგაროზის ეთიდიუმ ბრომიდიან გელზე. ელექტროფორეზი მიმდინარეობდა ტრის-აცეტატური ბუფერის თანაობისას. კონცენტრაცია და სისუფთავის მაჩვენებლები იზომებოდა NaNo Drop ND-1000 spectrophotometer-ით (სურათი №7 და 8).

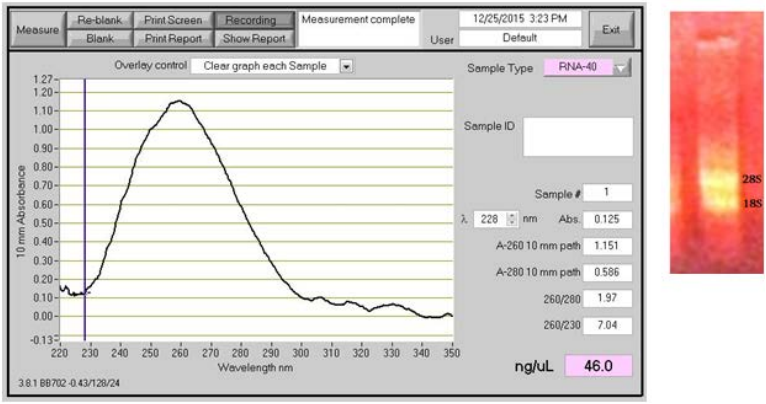
ალოედან (A.aristata) გამოყოფილი დნმ

სურათი №7



ალოედან (A.aristata) გამოყოფილი რნმ (28S და 18S)

სურათი №8

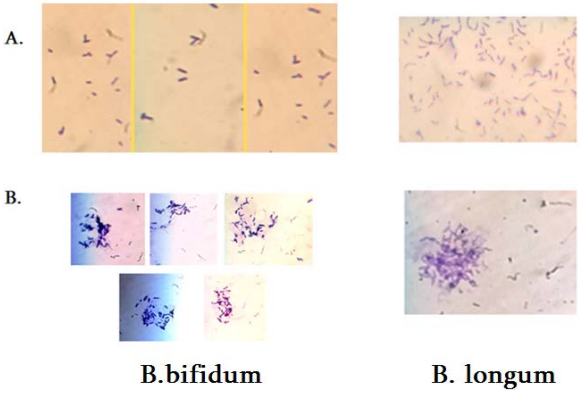


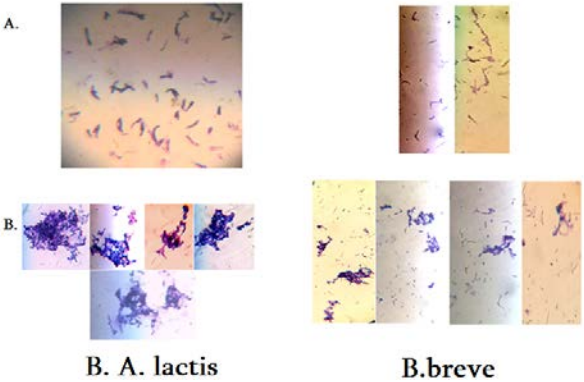
ალოეს ორგანოებიდან მიღებული ლექტინური აქტიურობის ექსტრაქტები, გარკვეული სიძლიერით რეაგირებენ ბიფიდობაქტერიების გვარის წარმომადგენლებზე (B.bifidum, B.longum, B.A.lactis, B. breve). ძლიერი აგლუტინაციური უნარით ხასიათდება ფოთლის ექსტრაქტი, რომელიც ექსპერიმენტში გამოყენებული ბიფიდობაქტერიების ოთხივე წარმომადგენლებზე ახდენს ძლიერ აგლუტინაციურ გავლენას (სურათი №9). ამ ფონზე საშუალო მოქმედებით გამოირჩევა ალოეს ბოლქვის ექსტრაქტი, ხოლო ფესვის ექსტრაქტი, ფოთლის და ბოლქვის ექსტრაქტებთან

შედარებით, ბიფიდობაქტერიების აგლუტინაციას გაცილებით სუსტად ახდენს.

ალოეს (A.aristata) ფოთლის ლექტინური აქტიურობის ექსტრაქტის ურთიერთქმედება ბიფიდობაქტერიებთან.

სურათი №9





A. ბაქტერიების კულტურები ალოეს (A.aristata) ფოთლის ექსტრაქტის გარეშე
B. ბაქტერიების კულტურები ალოეს (A.aristata) ფოთლის ლექტინური აქტიურობის ექსტრაქტთან ერთად

ექსპერიმენტში გამოყენებულ იქნა კომპანია DSMZ-ში (Leibnis-Institute DSMZ-German collection of microorganisms and cell cultures. www.dsmz.de) მიღებული ბიფიდობაქტერიების სუფთა კულტურები.

2.4. დასკვნები

1. დადგენილ იქნა ალოეს A.aristata-ს ფოთლის, ბოლქვის და ფესვის ლექტინური აქტიურობის ცილების დამოკიდებულება წყალბადიონთა კონცენტრაციის მიმართ. ალოეს ფოთლის ლექტინი მაქსიმალურ აქტიურობას ავლენს pH 7.4-ის პირობებში, ბოლქვის და ფესვის ლექტინები pH 9-ის პირობებში. ამასთან ალოეს ფოთლის ლექტინის აქტიურობაზე გავლენას ახდენს ტემპერატურის და pH-ის ცვლილება.
2. დადგენილ იქნა A.aristata-ს ორგანოებიდან გამოყოფილი ლექტინების მაქსიმალური ექსტრაქციის დრო, რაც შეადგენს 60 წუთს.
3. დადგენილ იქნა β-მერკაპტოეთანოლის ზემოქმედება A.aristata-ს ფოთლის და ბოლქვის ლექტინურ აქტიურობაზე. ფესვის ლექტინის მიმართ მისი მოქმედება არ ვლინდება.
4. დადგენილ იქნა A.aristata-ს ფოთლის ლექტინის მანოზასპეციფიკურობა, ხოლო ბოლქვის და ფესვის ლექტინი N-აცეტილ-D-გლუკოზამინსპეციფიკურია.
5. A.aristata-ს ორგაოებიდან გამოყოფილი ლექტინები ახდენენ ბოცვრის, ვირთაგვას, როგორც ტრიფსინიზირებული, ისე ნატიური ერითროციტების აგლუტინაციას. ადამიანის ABO სისხლის ჯგუფების ნატიური ერითროციტებთან A.aristata-ს ფოთლის ლექტინი არ რეაგირებს, ბოლქვის ლექტინი სუსტად რეაგირებს მხოლოდ მეორე და მეოთხე ჯგუფის ერითროციტებზე, ხოლო ფესვის ლექტინი ახდენს ყველა ჯგუფის ერითროციტების აგლუტინაციას.
6. A.aristata-ს ფოთლის ლექტინის მაქსიმალური აქტიურობა ვლინდება ამონიუმის სულფატის 20-40%-ით გაჯერების პირობებში, ხოლო ბოლქვის და ფესვის მაქსიმალური აქტიურობა ვლინდება ამონიუმის სულფატის 40-60%-ით გაჯერების პირობებში.

7. A.aristata-ს ფოთლებში ლექტინური განაწილება იცვლება მცენარის იარუსების მიხედვით. მინიმალურ ლექტინურ აქტიურობას ავლენს ქვედა იარუსის ფოთლები, მაქსიმალურს კი ზედა იარუსის ფოთლები. მაღალი ლექტინური აქტიურობით გამოირჩევა მცენარის ცენტრში არსებული ნორჩი ფოთლები. მიუხედავად ანატომიური ერთიანობისა A.aristata-ს ბოლქვში ლექტინი არაერთგვაროვნად არის განაწილებული: მაქსიმალურია ბოლქვის ზედა ნაწილში ფოთლებთან ახლოს და მინიმალურია ბოლქვის ძირში. ფესვი კი რაც უფრო დაშორებულია ბოლქვს, მისი ლექტინური აქტიურობა მცირდება.
8. დადგინდა, რომ A.aristata-ს ერთეული ფოთლები, ლექტინური აქტიურობის მხრივ ერთგვაროვანი არ არის. ლექტინური აქტიურობა გაცილებით მაღალია ფოთლის წვერში, რომელიც უფრო მწვანედ გამოიყურება, ფოთლის რბილობი ლექტინებს პრაქტიკულად არ შეიცავს. მაღალია ლექტინური აქტიურობა ფოთლის კუტიკულაში.
9. ლექტინურ აქტიურობას ავლენს დეჰიდრატირებული ალოეს ფოთოლი და დაზიანების ადგილზე განვითარებული ქერქი.
10. ლექტინური აქტიურობის ცილებს შეიცავს A.aristata-ს ყვავილის შემადგენელი ნაწილები: ღერო, რომელშიც აღმოჩენილ იქნა ერითროციტების ლიზის ფაქტორი, მისი ინჰიბირება ნაწილობრივ ხდება ნახშირწყალ მანოზით. უშუალოდ ყვავილის ნაწილებიდან ლექტინური აქტიურობით გამოირჩევა ყვავილის ყუნწი, გვირგვინის ფურცლები, ბუტკო, შემდეგ მტვრიანას ფილამენტი, ხოლო სამტვრე პარკის ექსტრაქტში ლექტინური აქტიურობა არ ვლინდება.
11. A.aristata-ს ფოთლის ლექტინური აქტიურობის ექსტრაქტის ქრომატოგრაფიით ვლინდება ოთხი პიკი, აქედან მეორე და მესამე პიკები გამოირჩევიან ლექტინური აქტიურობით. ფოთლის ქვედა ნაწილის ექსტრაქტის ქრომატოგრაფიით ვლინდება ასევე ოთხი პიკი, თუმცა ლექტინური აქტიურობით მხოლოდ მესამე პიკი გამოირჩევა.
12. A.aristata-ს ყვავილის ღეროს ექსტრაქტის ქრომატოგრაფიით ვლინდება სამი პიკი, ლექტინური აქტიურობით მეორე და მესამე პიკები გამოირჩევა. გაერთიანებული ყვავილის

ექსტრაქტი კი ავლენს ოთხ პიკს, საიდანაც ლექტინური აქტიურობით მეორე და მესამე პიკები გამოირჩევა.

13. A.aristata-ს ბოლქვის ლექტინური აქტიურობის ექსტრაქტის ქრომატოგრაფიით მიიღება ოთხი პიკი, აქედან მეორე და მესამე პიკები ავლენს ლექტინურ აქტიურობას.
14. A.aristata-ს ფესვის ლექტინური აქტიურობის ექსტრაქტების ქრომატოგრაფიით ვლინდება ხუთი პიკი, ლექტინური აქტიურობით გამოირჩევა მეორე და მესამე პიკები.
15. A.aristata-ს ფოთლის ცილების ელექტროფორეზით, ვლინდება ლექტინური აქტიურობის სამი ფრაქცია მოლეკულური მასით: 56.2; 12.7 და 12.2 kDa.
16. A.aristata-ს ბოლქვის ცილების ელექტროფორეზმა გამოავლინა მკვეთრად გამოხატული სამი ლექტინური ფრაქცია მოლეკულური მასით: 53.19; 39.57 და 33.69 kDa.
17. A.aristata-ს ფესვის შემთხვევაში, ელექტროფორეზით გამოვლენილ იქნა ცილების 11 ფრაქცია მოლეკური მასით: 63.8; 50; 45.3; 35.53; 34.48; 32.23; 27.84; 25.25; 24.05; 15.88; 13.7 kDa.
18. დადგინდა, რომ A.aristata-ს ფოთლის ლექტინი აქტიურობას ინარჩუნებს 60°C-ზე გაცხელების პირობებში 20 წუთის განმავლობაში, ხოლო ბოლქვის და ფესვის ლექტინი 100°C-ზე 20 წუთის განმავლობაში ინარჩუნებს სუსტ ლექტინურ აქტიურობას.
19. A.aristata-ს ფოთლის და ფესვის ლექტინები შესაბამის ტემპერატურაზე ინაქტივაციის შემდეგ, შენიშნულია 7 დღის შემდეგ ლექტინური აქტიურობის სუსტი რეაქტივაცია.
20. A.aristata-ს ორგანოებიდან გამოყოფილი ლექტინები 10 დღის მანძილზე -18°C-ზე შენახვის პირობებში ინარჩუნებენ ლექტინურ აქტიურობას.
21. A.aristata-ს ფოთლის ლექტინი მზის მაღალი რადიაციის პირობებშიც კი ინარჩუნებს ლექტინურ აქტიურობას.
22. A.aristata-ს ფოთლის ექსტრაქტში უი. სხივების მოქმედებიდან 30 წუთის შემდეგ ლექტინური აქტიურობა იზრდება, ხოლო დაუსხივებელი ფოთლის დასხივებულ ექსტრაქტში უი. სხივების 60 წუთის განმავლობაში ზემოქმედება არ მოქმედებს მის ლექტინურ აქტიურობაზე.
23. ალოეს ფოთოლში სიბნელეში მოთავსების მეორე დღიდან იწყება ლექტინის კონცენტრაციის კლება 50%-ით, რაც შენარჩუნებულია

მეექვსე დღემდე. მეშვიდე დღიდან ლექტინის კონცენტრაცია ნორმის ფარგლებს უბრუნდება.

24. ჩატარებული კვლევების საფუძველზე დგინდება, რომ A.aristata-ს ფოთლის ლექტინი ძირითადად ლოკალიზებულია მცენარის კუტიკულაში, ღეროში, ყვავილის ყუნწში, მტვრიანების ფილამენტებში, ბუტკოში, ხოლო რბილობსა და სამტვრე პარკში ლექტინური აქტიურობა ფაქტიურად არ შეინიშნება. ლექტინური აქტიურობა მაღალია მცენარის ჭრილობის ადგილზე განვითარებულ ქერქში. აქედან გამომდინარე, შეიძლება ითქვას, რომ ალოეს ფოთლის ლექტინი საყრდენი ცილაა, ის უზრუნველყოფს ფოთლის სიმტკიცეს, იცავს მცენარის ყვავილს აბიოტური ფაქტორების ზემოქმედებისაგან. უი. სხივების შედეგად ლექტინური აქტიურობის მატება მიანიშნებს მცენარის მზის მაღალი რადიაციისადმი თავდაცვის მექანიზმების გამომუშავებაზე. რაც შეეხება ფესვის და ბოლქვის ლექტინს, მათი მაღალი ტემპერატურისადმი მდგრადობა უზრუნველყოფს მცენარის არსებობას, მაღალი ტემპერატურის პირობებში. A.aristata-ს გარემოს მაღალი ტემპერატურის მიმართ გამომუშავებული აქვს სხვადასხვა ადაპტაციური მექანიზმები, რომლის ერთ-ერთი რგოლი ლექტინური აქტიურობის ცილებია.

25. ალოეს ორგანოებიდან მიღებული ლექტინური აქტიურობის ექსტრაქტები, გარკვეული სიძლიერით რეაგირებენ ბიფიდობაქტერიების გვარის წარმომადგენლებზე. ძლიერი აგლუტინაციური უნარით ხასიათდება ფოთლის ექსტრაქტი, რომელიც თითქმის ბიფიდობაქტერიების ოთხივე წარმომადგენლებზე (B.bifidum, B.longum, B.A.lactis, B. breve) ახდენს ძლიერ აგლუტინაციურ გავლენას. ამ ფონზე საშუალო მოქმედებით გამოირჩევა ალოეს ბოლქვის ექსტრაქტი (თუმცა საკმაოდ ძლიერი აგლუტინაცია ფიქსირდება B.bifidum-ის და B.longum-ის შემთხვევაში), ხოლო ფესვის ექსტრაქტი, ფოთლის და ბოლქვის ექსტრაქტებთან შედარებით, გაცილებით სუსტ აგლუტინაციურ უნარს ავლენს ბიფიდობაქტერიებთან ურთიერთობისას.

26. A.aristata-დან სუფთა სახით გამოყოფილია ნუკლეინის მჟავები.

3. დისერტაციის თემასთან დაკავშირებული პუბლიკაციების ნუსხა

1. ნ. მღებრიშვილი, მ. ვახანია, გ. ალექსიძე, ნ. ალექსიძე. ალოეს ფოთლებიდან D-მანოზასპეციფიკური ლექტინის გამოყოფა და მისი ფიზიკურ- ქიმიური თვისებების შესწავლა. საქ. მეცნ. აკადემია. ჟურნალი „მეცნიერება და ტექნოლოგია“ N4-6, 2011. pp.78-82.
2. Vakhania M., Alexidze G., Aleksidze N. Isolation, purification and biochemical Characterization of N-Acetyl-D-Glucosamine specific lectin from the root of Aloe aristata. Bulletin of the Georgian National Academy of science, 5. 2011 pp. 112-115.
3. M. Vakhania, N. Aleksidze. Plant lectins, Biochemical characterization and functions. ANNALS OF AGRARIAN SCIENCE, vol. 11, no.3,2013. pp.8-16.
4. M. A. Vakhania, G. I. Alexidze, N. G. Aleksidze. Allocation of lectins in flower organs of Aloe plant (*Aloe aristata Haw.*) and their biochemical characteristics. ANNALS OF AGRARIAN SCIENCE, vol. 12, no. 3, 2014. pp. 22-26.
5. M. A. Vakhania, G. I. Alexidze, N. G. Aleksidze Allocation of mannose- and N-acetyl-D-glucosamine specific lectins in different parts of Aloe plants (*Aloe aristata Haw.*) and their biochemical characteristics. Bulletin of the Georgian National Academy of science,vol.10,2. 2016 (in press).

გაწეული დახმარებისათვის მადლობას ვუხდით, საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის მეცნიერ-თანამშრომლებს:

ირინა ჯაფარიძეს,
თამარ ჯაფარიძეს,
ნანა კუნელაურს,
თინათინ ნიქაბაძეს,
მარგარიტა კარაპეტიანს,
ვლადიმერ ბარამიძეს,
ლეონიდ უშანოვს,
გიორგი ზაალიშვილს.

St. Andrew the First-called Georgian University of the Patriarchate of Georgia

With the rights of manuscript

School (faculty) of informatics, mathematics and natural sciences

Educational program – biotechnology

Malkhaz Vakhania

Extraction of lectins from *A.aristata*, their physical and chemical characterization and functions

AUTHOR'S ABSTRACT

OF THE DISSERTATION FOR THE ACADEMICAL DEGREE OF DOCTOR OF BIOLOGY

Direction – 05 natural sciences
Subject/speciality – 0504 biology/life sciences

Tbilisi
2016

The work has been accomplished at the school (faculty) of informatics, mathematics and natural sciences of St. Andrew the First-called Georgian University of the Patriarchate of Georgia, branch – natural sciences.

scientific supervisors: **1. Giorgi Aleksidze**
Doctor of Biological Sciences, Professor
2. Nugzar Aleksidze
Doctor of Biological Sciences, Professor

official opponents: **1. Nana Koshoridze**
Doctor of Biological Sciences, Professor
2. Matrona Chachua
PhD in Biological sciences

Defence of the thesis is set on the sesssion of the Dissertation Council of Andrew the First-called Georgian University of the Patriarchate of Georgia in 4 July 2016, at 15^{00} o'clock.

Adress: 0162, Tbilisi, Chavchavadze № 53^{a}, lecture hall of Acad. Vekua

The thesis is open for scrutiny in the library of Andrew the First-called Georgian University of the Patriarchate of Georgia

The abstract has been dispatched on 2016 4 June.

Scientific Secretary of the Council,
Academical Doctor of physics and mathematics,

Professor Giorgi Makatsaria

Contents

1. The general characterization of the work..... 30

1.1. Topicality of the subject..... 30

1.2. Goals and tasks of the research..... 31

1.3. Scientific novelty of the research and main results..... 31

1.4. The theoretical and methodological basics of the research..... 31

1.5. The practical value of the work..... 32

1.6. Structure and volume of the dissertation..... 32

2. The main content of the research..... 33

2.1. Research subject..... 33

2.2. Methods..... 33

2.3. Results and discussion..... 36

2.4. Conclusions..... 44

3. List of publications..... 47

1. The general characterization of the work

1.1. Topicality of the subject

Carbohydrate-depended identification is one of the key events in functioning of the biological system. Identification at the cell level usualy is based on the spesifical protein-carbohydrate interactions and is responsible for biologicaly important processes, like translocation of substances, modulation of enzymatic activity, cell communication and differentiation, fertilization, growth and development, inflammation processes, adhesion of microbs, synaptic transmission etc.

Since lectins were discovered, great progress in comprehension of different aspects of phytohemagglutinins has been reached. Though many questions requiring answers remain to be put concerning lectins.

Investigation of the biological role of lectins is of special interest. Phytolectins are very heterogenic group of proteins. They are presented at diverse concentrations in plant. Their biological role comprises a universal molecular mechanism, which is responsible for interaction and development of all living systems from viruses till the human beings. Lectins take part in inhibition or activation of specifical processes, cell-to-cell interactions, and their adhesion during histogenesis and regeneration. Though, it must be mentioned that the mechanisms of these interactions sometimes remain partly unclear.

According to existing data many phytohemaglutinins posess the properties of reserve proteins. Though, it is difficult to believe that the carbohydrate- joining proteins do not possess any priority above the reserve proteins. Little-by-little it clears that lectins have a dual function: when they are inside the plant they act as reserve proteins, but when lectins are released from the plant, they intensively protect it from parasites. It is difficult to explain how lectins protect the plant, for e.g. against a fungal infection. Though some facts prove this, elaboration of special methods for investigations is necessry.

1.2. Goals and tasks of the research

According to above mentioned, isolation, identification and investigation of biological role of some until unknown plant lectins remains very popular. Thus, investigation of lectins of one of the species of *Aloe* genus – *A. arisata* became the purpose of our study. Special interest to aloe was based on literary data about the medicinal properties of *Aloe* genus. Obtaining of lectins from *A. arisata*, investigation of their physical and chemical properties and biochemical indices was of special interest to us.

1.3. Scientific novelty of the research and main results

Relationship of until now unknown lectins, isolated from *A.aristata*, with carbohydrates, their interaction with human blood group AB0 and animal erythrocytes has been studied. Activity of lectins under the affect of different abiotic factors (high and low temperatures, solar irradiation, and effect of ultraviolet irradiation) has been investigated. Distribution of lectins following particular leaves and layers was established.

According to investigations it was determined that organs of *A. aristata* contain mannose- and N-acetyl-D-glucosamine specific lectins. They keep activity at high temperature for a particular (20min) interval of time. Distribution of lectins in plant was unequal – the highest activity of lectins was established in upper layer leaves of the studied plant.

Lectins of *A. aristata* do not cause agglutination of human erythrocytes belonging to the blood group AB0. Lectin isolated from bulbs of the studied plant caused slight agglutination of the II and III group blood erythrocytes, while lectin obtained from the root of the plant caused agglutination of all group erythrocytes of the AB0 system.

1.4. The theoretical and methodological basics of the research

For extraction of lectins from different organs of *A. aristata* the physiological solution (0.9% NaCl + 1M KH_2PO_4 pH 7.4 (PBS 0.4 mM) in ratio g of raw material per 10ml was used.

Proteins were determined after Lowry.

Concentration and partial purification of lectins was performed by means of saturated, 90% solution of ammonium sulfate.

Lectin activity in the extract was determined by means of hemagglutination test of the tripsinized rabbit erythrocytes on an immunological plate.

The carbohydrate-specificity of lectins was studied by hapten-inhibitory method of Liener.

The molecular weight of protein was determined by electrophoresis in 12% polyacrylamide gel.

1.5. The practical value of the work

According to the functions of lectins they have great perspectives of application in medicine, biology, genetic engineering, agriculture and other fields of science. For carbohydrate-binding specificity lectins are effectively used in biochemical and histological researches as well. Application of lectins made possible to obtain the pure fraction of glycoproteins and to probe the terminal carbohydrates of bio membranes.

1.6. Structure and volume of the dissertation

The dissertation consists of: introduction, research materials and methods, experimental results, their discussion, conclusions and list of references (72 sources). It is illustrated with 64 tables and 25 pictures. Total volume of the work is 120 pages.

2. The main content of the research

2.1. Research subject

One of the species of aloe - *Aloe aristata* was used as a test object. Its systematic characterization:

Kingdom – Plantae
Order – Asparagales
Family - Xanthorrhoeaceae
Subfamily – Asphodeloideae
Genus – *Aloe*
Species – *A. aristata*

The plant's mother country is South Africa. *A. aristata* grows in east and west Capi provinces, Free State, Lesotho and territories of Quasulu-Natali. It is spread as a decorative plant in our country. *A. aristata* is less popular and less studied compared to A*. arborescens*.

A. aristata has succulent leaves, collected in a tight, round rosettes (8-10cm diameter). Leaves are wide, lancer form, 8-10cm length, 1-1.5cm width at the basis. They are of dark green colour, with small, transparent burs along the lateral edges. Leaf surface, especially lower side, is covered with great number of mild, transparent burs, which make one or two unequal taws. The top of the leaf is terminated by a white scale (this feature differs it from Haworthia).

2.2. Methods of research

Agglutination is based on the ability of lectins to join carbohydrates situated on the surface of the neighbour cells by forming between them great number of molecular links and cause their gluing or agglutination.

Hemagglutination or lectin activity of proteins was determined using Liener's method. Degree of hemagglutination was evaluated following the specific activity of protein extract (the maximal dilution index of one mg protein, able to cause agglutination) SA=T/C (mg/ml). Here T (titre) is the dilution number of the protein in that cavity of the plate, where agglutination is still noticeable. C is the concentration of protein in mg/ml units.

Content of lectins was determined by ratio of protein concentration to lectin activity (expressed in conditional agglutination units)

Lectin activity was calculated by following formulas:

1. The minimal activity of lectins

2. Hemagglutination titre: $T=2^n$

T is the minimal titre of hemagglutination, n is the number of cavities, where the full agglutination was evident.

3. Specific activity of lectin: SHA (Specific hemagglutination Activity). SHA=T/C.

T – the minimal titre of hemagglutination

C – concentration of the protein

4. The specific hemagglutination activity of lectin was calculated - T·m.

T is the minimal titre of hemagglutination

m – the mass of the plant tissue, the lectin was extracted from.

5. Concentration of lectin: $LC=\frac{1}{T*m}$;

LC is lectin concentration

T - the minimal titre of hemagglutination

m - the mass of the plant tissue, the lectin was extracted from.

Experimental data obtained by repeating the three experiments.

Erythrocytes, obtained from the rabbit's blood were treated with tripsine. After incubation erythrocytes were washed three times in 10-fold volume of PBS, centrifuged at 2000g for 10min and hematocrit was measured. 2% suspension of erythrocytes in physiological solution was prepared to determine the hemagglutination activity.

Content of proteins was measured after Lowry. This method is based on the ability of aromatic amino acids (tyrosine, tryptophan) to form colored products with the Folin-Ciocalteu reagent.

Lectins specificity towards carbohydrates was studied by Hapten's inhibitory method. 0.6M solutions of soluble carbohydrates in PBS buffer were used for analysis. Five different soluble carbohydrates were used: D-glucose, D-galactose, N-acetyl-D-glucosamine, D-mannose, and L-fructose.

Partly purified lectin fractions were incubated in water bath at 20, 40, 60, 80 and 100°C temperatures for 20 min. to study the thermostability of lectins. The treated samples were cooled on ice bath (for 20min) and centrifuged to remove sediments of the denaturized proteins (8000g, for

10min). Hem agglutination activity of the supernatant at room temperature was determined.

Influence of the concentration of H^+ ions on lectins hemagglutination activity was studied in PBS buffer with pH ranging from 5.0 to 9.0, with 1.0 interval.

The solution of the purified protein (PBS, pH7.4) was titrated by the declining concentration order on a micro titration plate.

Plant material was homogenized in a mortar, using following extracting area: 0.9% NaCl, 0,04M K^+ - phosphate buffer, pH 7.4 (PBS), 0.1% β-mercaptoethylene in ratio1:10 (g/ml). Extraction was performed on a magnetic mixer during one h at 20°C. Later the extract was filtered through two-layer gauze filter and centriguged at 8000g during 20min. The obtained supernatante was filtered though the glass filter.

For fractionation of proteins the gel column HW-55 was used (2cmx44cm and 0.5cmx50cm). Protein fraction (1mg/ml) extracted by 0.9%NaCl+40mM K^+-phosphate buffer (pH7.4), and crystallized with ammonium sulfate (0-90% saturation), was applied on the column. Chromatography was performed under following conditions: speed of ellution – 1.5mm/min, detection at 280nm, speed of the paper – 1.5mm/min, sensitivity – 1.28, ellution buffer – 0.9% NaCl+40mM K^+-phosphate buffer (pH7.4). Post-column eluent was analysed for lectin-dependent activity.

Initially trypsinization of erythrocytes was performed for the fixation of rabbit erythrocytes with glutaraldehyde. The 2% suspension of trypsinized erythrocytes (in agglutination buffer, pH7.4) was fixed with 2.5% or 5% glutaraldehyde solution and shaked during 17h at 4°C. Sediment was washed by agglutination buffer, centrifuged at 700g for 10 min. After the hematocrit was built, 2% suspension of erythrocytes was prepared on 1M glycine solution with agglutination buffer (pH7.4). Suspension was shaked for 17h at 4°C. Sediment was again washed with agglutination buffer, centrifuged at 700g for 10min. After determining the hematocrit the sediment was mixed with bio gel P-150 in ratio 1:10 and the affinity column of glutaraldehyde-fixed erythrocytes (size 75mmx20mm) was prepared.

From the protein fraction with lectin activity further purification of lectin was performed on 0.2N HCl- treated G10column (1.7cmx2cm), which was balanced with 0.02M K^+-phosphate buffer. After the unfixed

proteins were washed out, the absorbed lectin was eluted: 1. with glycin-HCl buffer (pH2.5) and 2. distilled water (pH5.0).

Electrophoresis of proteins was performed using Laemmle system as well, in 1.2mm depth and 12% polyacrylamide gel with 0.2% SDS. Electrophoresis was carried out in VWR type device during 3-5h, with current strength 2mA on each ml of gel. Following standard proteins (kDa) were used as markers: β-galactosidase (116), phosphorylase b (97.4), bovine serum albumin (66.2), alcohol dehydrogenase (37.6), carboanhydrase (28.5), myoglobin (18.4), and lysozyme (14). Gel was stained with Coomassie G-250.

2.3. Results and discussion

Medical properties of the representatives of *Aloe* genus on the one hand and popularity of revealing new, biologicaly active lectins on the other, have determined our interest to study lectins in leaves, bulbs and roots of until-now unexplored species *Aloe aristata*. The main aim was to obtain pure fraction of lectins from different organs of the plant and study their biochemical properties.

On the first step of investigation relation of the extracted lectins to hydrogen ion concentration was studied. According to obtained results the maximal activity of the lectins, extracted from leaves, was mentioned at pH7.4, and for lectins, extracted from bulbs and roots of the given species – at pH9.

Lectins obtained from *Aloe aristata* leaves, flowers and its petiole was manose-specific, while lectins extracted from bulbs and roots were N-acetyl-D-glucoseamine-spesific. Lectins extracted from all tree organs reacted with polymer chitin. Less active, from this point of view, were lectins obtained from leaves, compared with bulb and root lectins. This is easy to explain, as chitin contains residues of N-acetyl-D-glucosamine.

Lectins, extracted from *A. aristata* different organs agglutinated both trypsinized and native erythrocytes of rabbits and rats, while lectins extracted from leaves were uneffective towards the native erythrocytes of human blood group AB0, bulb lectins revealed a weak effect on erythrocytes of the second and fourth groups of human blood, and only lectins extracted from roots agglutinated erythrocytes of all four groups of human blood.

The first step of proteins purifying was their sedimentation by ammonium sulfate. For this purpose plant extracts were saturated with ammonium sulfate solutions of different concentration (20-100%) and the maximal activity of proteins was studied. In case of leaf lectins, their maximal activity was mentioned when saturation with sulfate was 20-40%. In case of bulb and root lectins optimal concentration of the sulfate was 40-60%.

A. aristata is distinguished by the quantity of leaf layers. Their number varies with the age. In our experimental plant the number of layers was 8. It must be mentioned that some times the layers are not separated clearly. For testing were picked two neigbour leaves from each layer. Layers were numerated from top to foot direction. The highest activity of lectins was revealed in leaves of the first layer, while in leaves of the 8th layer the lectin activity was almost by 100% lower, compared with leaves of the first layer.
Even different parts of a particular leaf differed by lectin activity.

Coditionally were separated upper and lower parts of leaves. Upper parts were dark green, and lower – light green. Lectin activity of the upper part appeared to be much higher compared with the lower one.The cuticule of Aloe leaves revealed also high lectin activity, while no activity was found in leaf meat.

Lectin distribution was heterogenous in bulbs of *A. aristata* as well. High lectin activity was discovered in the upper part of a bulb and gradually decreased to middle and lower parts direction. The same was with roots: more far the root was from the bulb, less its lectin activity was.
As for flower of the experimental species, maximal lectin activity was revealed in flower petiole, and the least – inanther filaments. In pollen sacs lectin activity was absent.

In further series of experiments variation of lectin activity of extracts, prepared from different organs of *A. aristata*, under different high temperature regimen was investigated. It was established that leaf extract retained lectin activity during 20min at 60°C, and fully lost it at 80°C. In case of bulbs and roots their lectin activity stored even at 100°C for 20min, though it was very low.

At -18°C extracts obtained from different organs of *A. aristata* retained lectin activity on quite a high level.

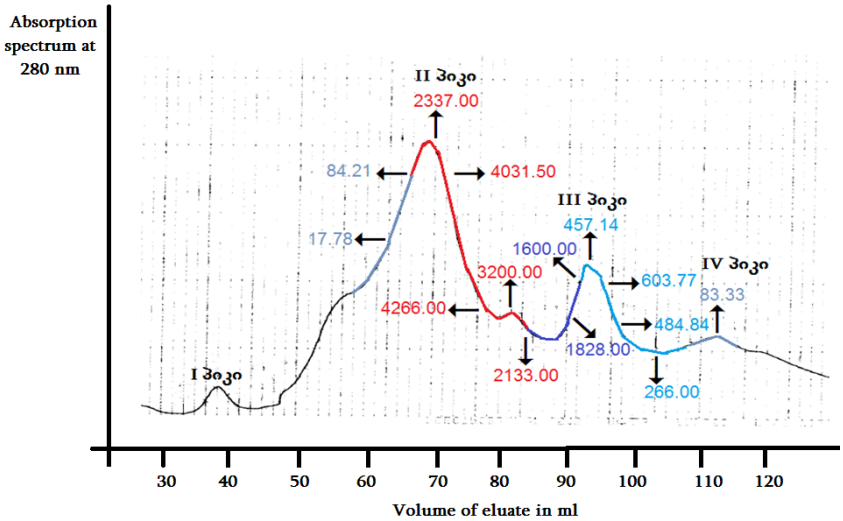
Lectin activity of *A. aristata* leaves increased under the effect of ultraviolet irradiation (UV) 30min later after irradiation. 60min affect of

UV on leaves did not change lectin activity which presumably is indication to participation of lectins in adaptation mechanisms.

In the next series of experiments changes of lectin activity in particular sections of chromatograms of leaf proteins were studied. High lectin activity and protein concentration was established in the second peak of the protein chromatogram. Then lectin activity gradually declined, but its low level was retained till the end of the third peak (Pic. 1).

Chromatogram of proteins extracted from the flower leaves of Aloe aristata Haw. plant

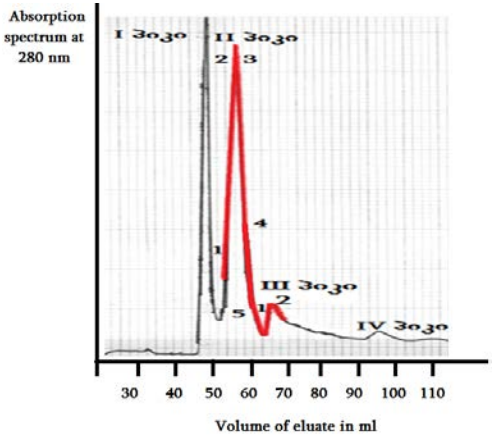
Pic. 1.



In chromatograms of bulb proteins third and second peaks were distinguished with lectin activity (Pic. 2).

Chromatogram of proteins extracted from the bulb of Aloe aristata Haw. plant

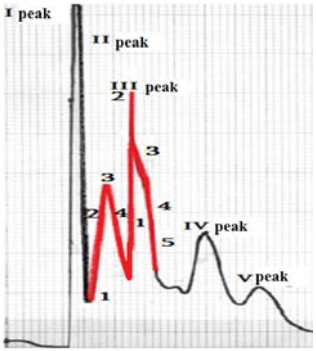
Pic. 2.



In chromatograms of roots proteins third and second peaks were distinguished with lectin activity (Pic 3).

Chromatogram of proteins extracted from the roots of Aloe aristata Haw. Plant

Pic. 3.

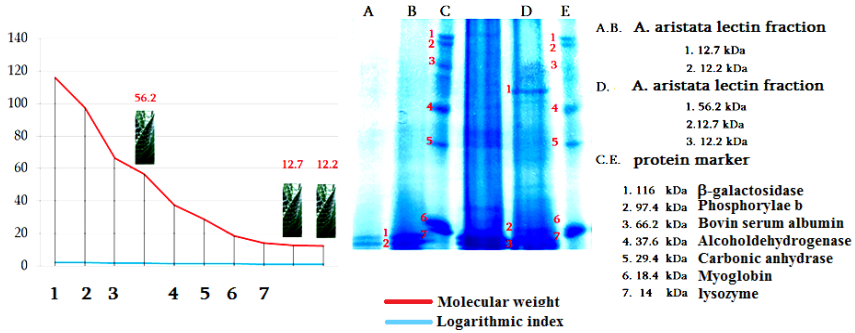


Trypsinized rabbit erythrocytes, fixed in glutaraldehyde were used for purification of lectins obtained from different organs of *A. aristata*. Lectin

fraction was released from erythrocytes with glycine-HCl solution, prepared on PBS buffer, pH2.5. Purified lectin fraction was run on 12% polyacrylamide gel with 0.2% SDS. As a result three fractions with lectin activity were obtained, with molecular weight of 56.2, 12.7 and 12.2kDa (Pic. 4).

Electrophoregram of *A.aristata* leaf proteins

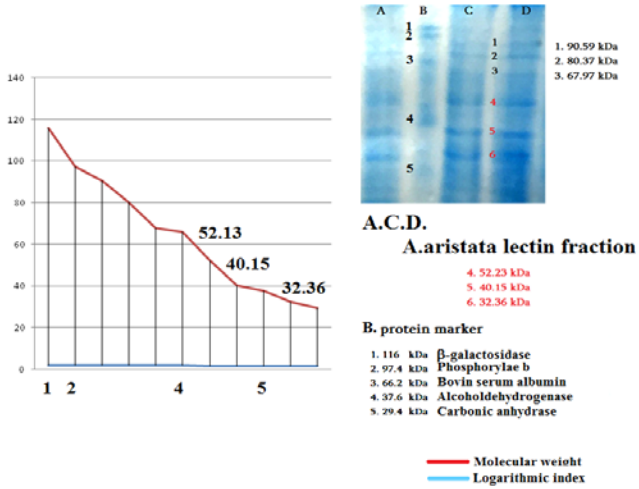
Pic. 4.



Electrophoretic analysis of *A.aristata* bulb proteins, which were incubated on glutaraldehyde-fixed erythrocytes column as well, has revealed three clearly expressed fractions with molecular weight: 53.19, 39.57, and 33.69 kDa (Pic.5).

Electrophoregram of *A.aristata* bulb proteins and lectins

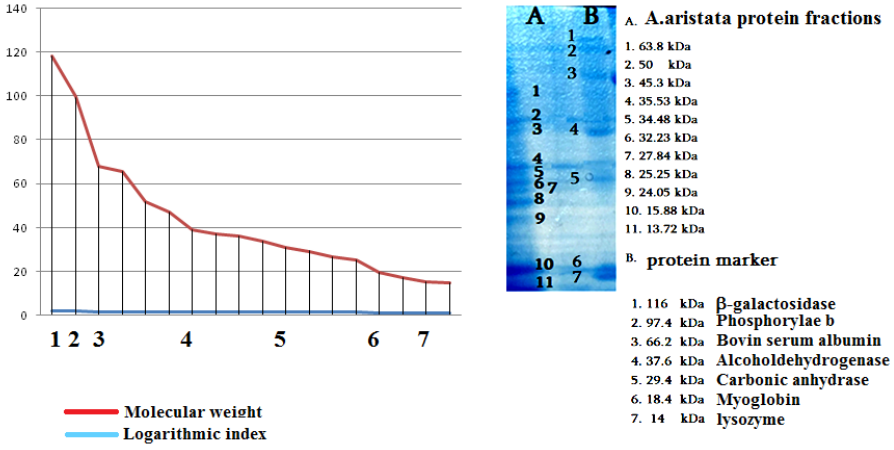
Pic. 5.



In case of *A.aristata* roots the general picture of protein electrophoresis contained 11 protein fractions (Pic.6).

Electrophoregram of *A.aristata* root proteins

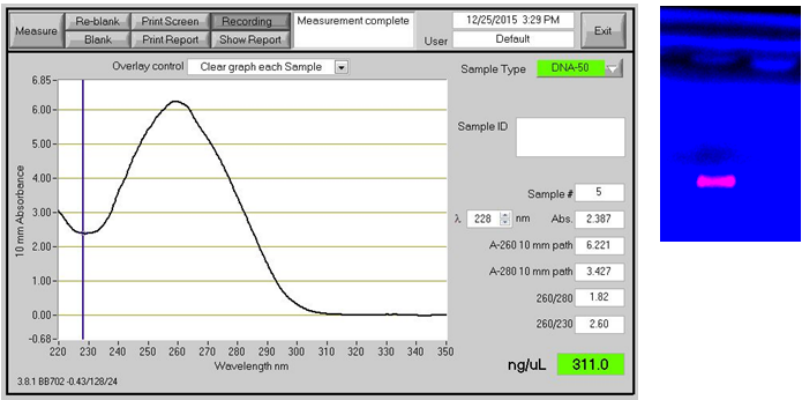
Pic.6



Pure nucleic acids (DNA and RNA) were obtained from *A.aristata*, which were run on 2% agarose gel with ethidium bromide. Electrophoresis ran on Tris-acetate buffer. Concentration and purity were measured on a NaNoDrop ND-1000 spectrophotometer (Pic.7-8).

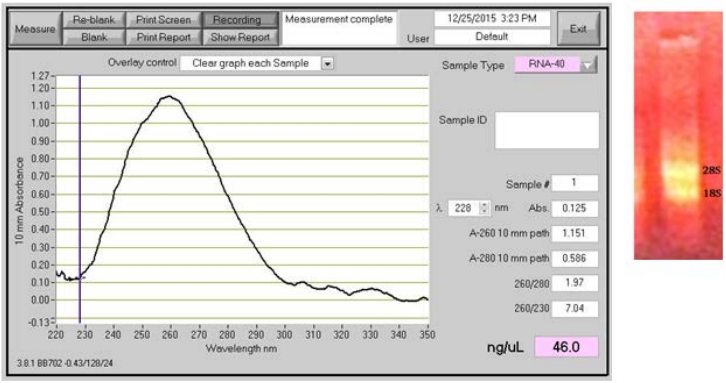
DNA extracted from *A.aristata*

Pic. 7



RNA (28S and 18S) extracted from *A.aristata*

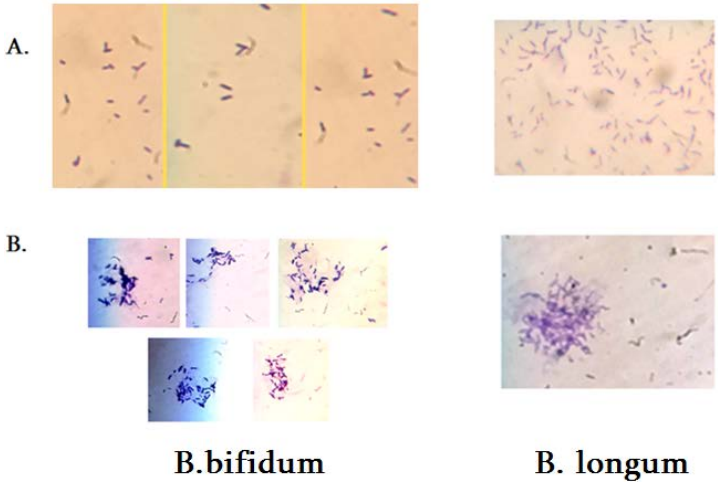
Pic. 8

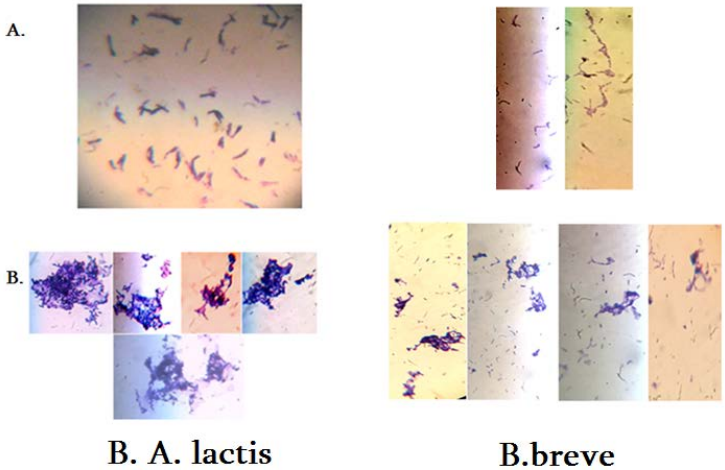


Extracts of aloe organs with lectin activity revealed some effect on the representatives of bifidobacteria genus. Strong agglutination ability has revealed leaf extract. It affected all four representatives of bifidobacteria (Pic. 9). Bulb extract showed relatively moderate effect, while extract obtained from aloe roots relatively weakly agglutinated bifidobacteria.

Interaction of *A.aristata* leaf lectin-active extract with bifidobacteria

Pic.9





A. Bacterial cultures without *A. aristata* leaf extract
B. Bacterial cultures with *A. aristata* leaf lectin-active extract

Pure cultures of bifidobacteria obtained in DSMZ (Leibnis-Institute DSMZ-German collection of microorganisms and cell cultures).

2.4. Conclusions

1. Relationship between lectin-active proteins, extracted from *A. aristata* leaf, bulb, and root, and hydrogen ions concentration has been established. Lectins obtained from leaves revealed maximal activity at pH7.4, while lectins extracted from bulbs and roots – at pH9. Moreover, activity of the leaf lectins was influenced by changes of temperature and pH.
2. The maximal time of extraction of *A. aristata* lectins, which made 60min, has been established.
3. Effect of β-mercaptoethanole on lectin activity of *A. aristata* leaf and bulb was established. The mentioned substance did not reveal any influence on root lectins of the plant.
4. Manose-specificity of *A. aristata* leaf lectins and N-acetyl-D-glucoseamine-specificity of bulb and root lectins has been established.

5. Lectins, extracted from different organs of *A. aristata* agglutinated both trypsinized and native erythrocytes of rabbits and rats, while lectins extracted from leaves were uneffective towards the native erythrocytes of human AB0 blood group. Bulb lectins revealed a weak effect on erythrocytes of the second and fourth groups of human blood, and only lectins extracted from roots agglutinated erythrocytes of all four groups of human blood.

6. Leaf lectins of *A. aristata* revealed their maximal activity when concentration of ammonium sulfate was 20-40%. In case of bulb and root lectins for their maximal activity the optimal concentration of the sulfate was 40-60%.

7. Lectin activity in *A. aristata* leaves depended on layers. The minimal lectin activity was revealed in lower layer leaves, and the highest activity – in leaves of the first layer. With high lectin activity were distinguished young leaves of the plant, situated in the center. In spite of anatomical identity, lectins distribution in a bulb was uneven: it was maximal in the upper part of the bulb, near leaves, and minimal – at its bottom. In roots lectin activity decreased with its distance from the bulb.

8. It was determined that even particular leaf of *A. aristata* is not equal in lectin activity. The index was significantly higher at the top of the leaf, which looks greener. There were no lectins in leaf flesh. High was the lectin activity in leaf cuticule.

9. Dehydrated leaves of *A. aristata* and scrab, formed at the place of damadge revealed lectin activity.

10. Parts of A. aristata's flower contein proteins with lectin activity. In particular petiole, were the lysis factor of erythrocytes was discovered. It was partially inhibited by the cafrbohydrate mannose.

11. Chromatography of *A. aristata* leaf xtract with lectin activity has revealed four picks. Among them second and third picks had lectin activity in case of leaf upper part and in case of lower part – only the third pick had.

12. Chromatograpy of *A. aristata* flower petiole revealed three picks. Among them second and third ones had lectin activity. Total flower extract showed four picks. Lectin activity was discovered only in the second and third picks.

13. Chromatography of *A. aristata* bulbs revealed four picks, among them second and third ones have demonstrated lectin activity.

14. Five picks were obtaind by the chromatography of *A. aristata* roots. Only the second and third picks have demonstrated lectin activity.
15. Electrophoresis of *A. aristata* leaf proteins has revealed four fractions with lectin activity, with molecular weight 56.2, 12.7 and 12.2kDa.
16. Electrophoresis of *A. aristata* bulb proteins revealed three fractions with intensive lectin activity. Their molecular weights are 53.19, 39.57 and 33.69kDa.
17. In case of *A. aristata* roots 11 fractions of protein were revealed with following molecular weights: 63.8; 50; 45.3; 35.53; 34.48; 32.23; 27.84; 25.25; 24.05; 15.88; 13.7 kDa.
18. It was established that leaf lectins of *A. aristata* retain their activity at 60°C for 20min, while bulb and root lectins stay active even at 100°C during the same period of time.
19. After disactivation of leave and root lectins of *A. aristata* at corresponding temperatures, their slight reactivation was observed 7 days later.
20. Lectins extracted from different organs of *A. aristata* retained their activity during 10 days if been stored at -18°C.
21. *A. aristata* leaf lectins retain its activity even under the high solar irradiation.
22. 30 min later after irradiation with UV lectin activity of *A. aristata* leaves extract increased, while irradiated extract of unirradiated leaves did not change its activity being irradiated with UV during 60min.
23. Lectins concentration decreased by 50% in leaves of *A. aristata* on the second day after been placed in darkness.It retained at the same level till the sixth day and after returned to the norm.
24. According to experimental results it was concluded that *A. aristata* lectins are localized mainly in leaf cuticule, stem, flower petiole, anther filaments and pestle, while in leaf meat and pollen sacs lectin activity was absent. High lectin activity was deteted in the cortex, formed at the place of wounding. Accordingly it may be supposed that leaf lectins of *A. aristata* are supporting proteins, responsible for its hardiness and protect flower against unfavorable influence of abiotic factors. As for root and bulb lectins, their resistance to high temperature is responsible for plant survival at high temperature conditions. *A. aristata* possesses different machanisms against high environmental temperature, and lectin-active proteins are one of them.

25. Extracts with lectin activity, obtained from *A. aristata* organs, revealed some effect on the representatives of bifidobacteria genus. Strong agglutination ability has revealed leaf extract. It has affected all four representatives of bifidobacteria (B.*bifidum, B.longum, B.A.lactis, B. breve*). Bulb extract showed relatively moderate effect (though enough strong agglutination was mentioned in case of *B.bifidum* and *B.longum*). While extract, obtained from *A. aristata* roots relatively weakly agglutinated bifidobacteria.
26. Pure nucleic acids – DNA and RNA (28S and 18S) were extracted from *A.aristata.*

3. The list of papers published by the author on the theme of dissertation:

1. N. Mghebrishvili, M. Vakhania, G.Aleksidze, N.Aleksidze. Separation of D-mannose-specific lectin from Aloe (Aloe aritata) leaves and investigation of their physical-chemical properties. „Metsniereba da Techologiebi“ („Science and Technologies“). Monthly scientific-reviewed magazine of Georgian National Academy of Sciences. N4-6, 2011. pp. 78-82 (In Georgian).

2. Vakhania M., Alexidze G., Aleksidze N. Isolation, purification and biochemical Characterization of N-Acetyl-D-Glucosamine specific lectin from the root of Aloe aristata. Bulletin of the Georgian National Academy of science, 5. 2011 pp. 112-115.

3. M. Vakhania, N. Aleksidze. Plant lectins, Biochemical characterization and functions. ANNALS OF AGRARIAN SCIENCE, vol. 11, no.3, 2013. pp.8-16.

4. M. A. Vakhania, G. I. Alexidze, N. G. Aleksidze. Allocation of lectins in flower organs of Aloe plant (*Aloe aristata Haw.*) and their biochemical characteristics. ANNALS OF AGRARIAN SCIENCE, vol. 12, no. 3, 2014. pp. 22-26.

5. M. A. Vakhania, G. I. Alexidze, N. G. Aleksidze Allocation of mannose- and N-acetyl-D-glucosamine specific lectins in different parts of Aloe plants (*Aloe aristata Haw.*) and their biochemical characteristics. Bulletin of the Georgian National Academy of science, vol 10,2. 2016 (in press).

Aknowledgments: we are thankful to scientific workers of Georgian Agricultural University – Irina Japaridze, Tamar Japaridze, Nana Kunelauri, Tinatin Nikabadze, Margarita Karapetian, Vladimer Baramidze, Leonid Ushanoff, and Giorgi Zaalishvili for help and support.