საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის
ქართული უნივერსიტეტი

მაია ხურციძე

მიმართულება - **05** საბუნებისმეტყველო მეცნიერებები

დარგი/სპეციალობა - **0504** ბიოლოგია/სიცოცხლის შემსწავლელი მეცნიერებანი

ქრისტესისხლას (*Chelidonium majus*) ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინის ბიოქიმიური თვისებების, ფიზიოლოგიური როლისა და ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად წარმოდგენილი ნაშრომის

სამეცნიერო ხელმძღვანელი

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, სადოქტორო
მიმართულება „ბიოტექნოლოგიის“ ხელმძღვანელი,
პროფესორი, გიორგი ალექსიძე

თბილისი

2017 წელი

შ ი ნ ა ა რ ს ი

ანოტაცია ---------- 6

Annotation ----------9

შესავალი ----------12

სამუშაოს მიზანი და ამოცანები----------15

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და ძირითადი შედეგები---------- ----15

კვლევის თეორიული და მეთოდოლოგიური საფუძვლები----------17

ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება ---------- ----17

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა----------18

თავი 1.ლიტერატურის მიმოხილვა ----------19

1.1. ლექტინების ზოგადი დახასიათება----------19

1.1.1. ლექტინების განსაზღვრება და კლასიფიკაცია ----------19

1.1.2. ლექტინების კლასიფიკაცია ვალენტობისა და სუბერთეულების რიცხვის მიხედვით---------- 21

1.1.3. ლექტინების კლასიფიკაცია წარმოშობის მიხედვით----------23

1.1.4. ლექტინების ლოკალიზაცია ----------23

1.1.5.ლექტინების ბიოლოგიური აქტივობა და ნახშირწყლების შემცველობა----------24

1.2. ლექტინური სისტემის ბიოქიმიური დახასიათება----------25

1.2.1. ლექტინების სტრუქტურული ორგანიზაცია----------25

1.2.2. ლექტინების სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ.----------29

1.3. ლექტინების ბიოლოგიური აქტივობა---------- 31

1.3.1. ლექტინების ცოტოტოქსიური მოქმედება---------- 33

1.3.2. ლექტინების მიტოგენური აქტივობა----------34

1.4. ლექტინების გავრცელება და განაწილებ მცენარეში----------35

1.5. მცენარეული ლექტინების ენდოგენური ლიგანდები----------38

1.6. ლექტინების ფიზიოლოგიური როლი მცენარეებში----------38

1.6.1. ლექტინების როლი სიმბიოზში----------39

1.6.2. ლექტინების როლი განაყოფიერებაში----------39
1.6.3. ლექტინების სამარაგო ფუნქცია---------- 40
1.6.4. ლექტინების როლი ნახშირწყლების ტრანსპორტში,
დაგროვებასა და იმობილიზაციაში----------41
1.6.5. ლექტინების უჯრედშიდა ფუნქციები ---------- 41
1.6.6. ლექტინების როლი ფიტოიმუნიტეტში----------44
1.6.7. ლექტინების როლი მცენარეთა თავდაცვით მექანიზმებში ----------45
1.6.8. მცენარეული ლექტინების ანტივირუსული აქტივობა----------48
1.6.9. მცენარეული ლექტინების ანტიბაქტერიული აქტივობა---------- 48
1.6.10. მცენარეული ლექტინების ანტისოკოვანი მოქმედება----------49
1.6.11. მცენარეული ლექტინების ინსექტიციდური აქტივობა---------- 51
1.7.ლექტინების გამოყენება----------52

ე ქ ს პ ე რ ი მ ე ნ ტ უ ლ ი ნ ა წ ი ლ ი

თავი 2. კვლევის ობიექტი და გამოყენებული მეთოდები---------- 55

2.1. კვლევის ობიექტი ქრისტესისხლა (*Chelidonium majus L.*)---------- 55

2.2. გამოყენებული მეთოდები---------- 60

2.2.1. მცენარეული მასალიდან ლექტინური აქტივობის მქონე
ხსნადი ცილის ექსტრაქციის მეთოდი---------- 60
2.2.2. ცილის დალექვა და ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით
გამომარილების მეთოდით---------- 61
2.2.3. ულტრაფილტრაცია----------62
2.2.4. ლექტინური აქტივობის განსაზღვრის მეთოდები---------- 62
2.2.5. ლექტინური აქტივობის განსაზღვრა ფოტოკოლორიმეტრული
მეთოდით----------63
2.2.6. ბოცვრის ტრიპსინიზებული ერითროციტების მომზადება----------63
2.2.7. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა----------64
2. 2.8. ლექტინების ნახშირწყლების მიმართ სპეციფიკურობის შესწავლა---------64
2. 2. 9. ლექტინებში ნახშირწყლების შემცველობის განსაზღვრა----------65
2. 2.10. გელ-ფილტრაცია Toyopearl HW-55-ის სვეტზე----------65

2. 2.11. ცილის ფრაქციონირება და მოლეკულური მასის განსაზღვრა
გელ-ფილტრაციით——————————————————————————————— 66
2. 2.12. აფინური ქრომატოგრაფია ქიტინის სვეტზე——————————————————67
2.2.13. ცილის ანალიზური ელექტროფორეზი ნატიურ და დისოცირებულ
პირობებში——————————————————————————————————67
2.2.14. ლექტინის თერმოსტაბილურობის შესწავლა——————————————68
2.2.15. ლექტინის ჰემაგლუტინაციური აქტივობის დამოკიდებულების
შესწავლა H^+იონების კონცენტრაციაზე ——————————————————— 68
2.2.16. ორვალენტიანი კათიონების გავლენა ლექტინების ჰემაგლუტინაციური
აქტივობაზე——————————————————————————————————69
2.2.17.ქრისტესისხლას თესლების გაღივება——————————————————69
2.2.18. ლექტინების მოქმედებით ბაქტერიების აგლუტინაციის შესწავლა——————69
2.2.19. მიკროორგანიზმების ზრდის ინჰიბირების შესწავლა დისკ-დიფუზიის
მეთოდით——————————————————————————————————71
2.2.20. შედეგების სტატისტიკური დამუშავება——————————————————72
თავი 3. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა——————————74
3.1.ქრისტესისხლას თესლებიდან ლექტინების ექსტრაქცია——————————74
3.2.ქრისტესისხლას თესლიდან გამოყოფილი ლექტინის სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ——————————————————79
3.3.ქრისტესისხლას თესლიდან ექსტრაგირებული ლექტინის გასუფთავების ეტაპები——————————————————————————82
3.3.1. ცილების ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით
გამომარილების მეთოდით——————————————————————————— 82
3.3.2. ქრისტესისხლას თესლის ცილების ფრაქციონირება გელ–ფილტრაციის
მეთოდით——————————————————————————————————84
3.3.3. ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის (CBL) გასუფთავება აფინური
ქრომატოგრაფიის მეთოდით——————————————————————— 85
3.4. ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ზოგიერთი ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების შესწავლა——————————————————————88

3.4.1.CBL-ის პოლიპეპტიდური შედგენილობისა და მოლეკულური მასების შესწავლა ქრომატოგრაფიული და პოლიაკრილამიდის გელში ანალიზური ელექტროფორეზის მეთოდებით——————————————————————————————————————88
3.4.2.ტემპერატურის გავლენა ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე——————————————————————————————————— 92
3.4.3. H^+-იონების კონცენტრაციის გავლენა ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე——————————————————————————————94
3.4.4. ორვალენტიანი იონების გავლენა CBL-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე——————95
3.4.5.ქრისტესისხლას თესლის ლექტინში ნახშირწყლების შემცველობა——————————95
3.5. ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის (CBL) ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა——————————————————————————————————————96
3.5.1. ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ჰემაგლუტინაციური თვისებები—————————— 96
3.6.ლექტინების განაწილება ფიზიოლოგიური მდგომარეობით განსხვავებულ სტრუქტურულ-ფუნქციონალურ ორგანოებში——————————101
3.6.1. ლექტინების განაწილება ქრისტესისხლას სხვადასხვა ორგანოებში——————————101
3.6.2. ლექტინების განაწილება ქრისტესისხლას თესლსა და მის გარემომცველ არეში თესლის გაღივების პროცესში——————————————————————————————103
3.7. ქრისტესისხლას ლექტინის ანტიმიკრობული აქტივობა—————————— 110
დ ა ს კ ვ ნ ე ბ ი——————————————————————————————————————119
გამოყენებული ლიტერატურა ——————————————————————————— 121

ანოტაცია

ლექტინოლოგია წარმოადგენს თანამედროვე ბიოლოგიის ერთ-ერთ ახალ და სწრაფად განვითარებად მიმართულებას. იგი შეისწავლის ნახშირწყლებთან და რთული ნახშირწყლების შემცველ გლიკოკონიუგატებთან შერჩევითად და შექცევადად დაკავშირების უნარის მქონე, სტრუქტურულად მრავალფეროვან, თუმცა უნიკალური ცილების ჯგუფს - ლექტინებს. ლექტინების უნიკალურობას განაპირობებს მათი უნარი მოახდინონ გლიკოკონიუგატების (გლიკოპროტეინები, გლიკოლიპიდები, ოლიგოსაქარინები და სხვა) რთული მოლეკულების შემადგენლობაში შემავალ ნახშირწყლებში, პირველადი და მეორეული სტრუქტურის სახით ჩაწერილი ინფორმაციის დეკოდირება და ამ ინფორმაციის გადაყვანა შესაბამის ბიოლოგიურ ენაზე. ლექტინების ეს უნიკალური თვისება, საფუძვლად უდევს მცენარისათვის ისეთ სასიცოცხლო მნიშვნელობის მქონე პროცესებს, როგორიცაა: განაყოფიერება, ზრდა-განვითარება, გენეტიკური აპარატის ფუნქციონირების რეგულაცია, ფოტოსინთეზი, მიტოქონდრიული სუნთქვა, ნივთიერებათა ტრანსპორტი, სიმბიოზი, ფიტოიმუნიტეტი და სხვა.

განსაკუთრებით აქტუალური და პერსპექტიულია ასევე ლექტინოლოგიის განვითარება გამოყენებითი მიმართულებით. კერძოდ, ლექტინები როგორც ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები, წარმატებით გამოიყენება ბიოტექნოლოგიის, ბიომედიცინის, მედიცინის, სოფლის მეურნეობის და სხვა სფეროებში. სამეცნიერო ლიტერატურა გვიჩვენებს, რომ სხვადასხვა ტიპის ლექტინებს, შეუძლიათ გამოავლინონ განსხვავებული ბიოლოგიური აქტივობები. გამოვლენილია, რომ მცენარეული ლექტინები იწვევენ, ცხოველური უჯრედების პროლიფერაციას ან პირიქით პროლიფერაციის დათრგუნვას, გააჩნიათ იმუნოტროპული და ჰორმონების მსგავსი ეფექტები. გარკვეული ტიპის ლექტინები იწვევენ აპლაზიური და ინფიცირებული უჯრედების აპოპტოზს, გამოვლენილია მათი ანტიოქსიდანტური, ანტიბაქტერიული, ანტისოკოვანი, ანტივირუსული მოქმედების უნარი და სხვა აქტივობები.

ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, მცენარეულ ობიექტებში ახალი ლექტინების გამოვლენა, მათი ფიზიოლოგიური როლის და ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა, წარმოადგენს ფუნდამენტური და გამოყენებითი ბიოლოგიის, ბიოტექნოლოგიის,

სოფლის მეურნეობის, მედიცინისა და მეცნიერებათა სხვა დარგების ერთ-ერთ აქტუალურ პრობლემას.

წინამდებარე სადისერტაციო ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა, გამოგვევლინა საქართველოში გავრცელებული სამკურნალო მცენარე ქრისტესისხლას (*Chelidonium majus*) ლექტინები და შეგვესწავლა მათი ფიზიკურ-ქიმიური თვისებები, ფიზიოლოგიური როლი და ბიოლოგიური აქტივობა.

სადისერტაციო ნაშრომში დასაბუთებულია თემის აქტუალობა, წარმოდგენილია კვლევის მიზანი და ამოცანები.

შესრულებული სადისერტაციო სამუშაოს შედეგებით დადგენილია, მცენარე ქრისტესისხლადან, ლექტინური აქტივობის მქონე ხსნადი ცილების ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობები. ექსტრაგენტი: PBS+0,5mMβ-მერკაპტოეთანოლამინი (pH 7,4), რაც მინიმუმ 10-ჯერ აღემატება სხვა გამოყენებული ექსტრაგენტების ეფექტურობას. სამი განსხვავებული მეთოდით (სინათლის მიკროსკოპი, პლანშეტზე მიკროტიტრაცია, ფოტოკოლორიმეტრია) გამოვლენილია ქრისტესისხლას ლექტინის უნარი გამოიწვიოს ბოცვრის და ადამიანის ტრიპსინიზირებული ერითროციტების აგლუტინაცია. დადგენილი, რომ ლექტინი არ იწვევს ბოცვრის ნატიური ერითროციტებისა და ადამიანის სისხლის I(0); II(A); III(B) და IV(AB) ჯგუფის ნატიური ერითროციტების აგლუტინაციას.

შესწავლილია **CBL**-ის შემცველობა მცენარის სხვადასხვა ორგანოებში. ნაჩვენებია, რომ ქრისტესისხლას ყვავილები, ფესვები, ღეროები, ფოთლები, ღეროს ნარინჯისფერი წვენი არ შეიცავენ ჰემაგლუტინაციური აქტივობის მქონე ცილებს-ლექტინებს. ლექტინებს შეიცავენ მხოლოდ ქრისტესისხლას თესლები.

დადგენილია ქრისტესისხლას თესლში **CBL** ლექტინის შემცველობის სეზონურობა, რომელიც ყველაზე მაღალია მაისსა და ივნისში და მკვეთრად მცირდება მარტსა და აპრილში.

დამუშავებულია ქრისტესისხლას თესლიდან ლექტინის **CBL** გამოყოფისა და გასუფთავების ახალი მეთოდი. მოწოდებული მეთოდი საშუალებას იძლევა მიღებული ლექტინი გამოყოფილი იქნას ინდივიდუალური მოლეკულის სახით (გასუფთავების ხარისხი 789) და მაღალი ჰემაგლუტინაციური აქტივობით.

წინამდებარე ნაშრომში შესწავლილია **CBL**-ის ზოგიერთი ბიოქიმიური და ფიზიკურ ქიმიური მახასიათებლები. წარმოდგენილი კვლევის შედეგებით ნაჩვენებია, რომ ანალიზირებული 20 განსხვავებული ტიპის ნახშირწყლიდან, ქრისტესისხლას თესლიდან იზოლირებული ლექტინი, სპეციფიკურობას ავლენს მხოლოდ ქიტინის მიმართ და შესაბამისად მიეკუთვნება ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინების კლასს.

ნაშრომში წარმოდგენილი მონაცემებით დგინდება, რომ მისი ნატიური მოლეკულის მეოთხეული სტუქტურა წარმოდგენილია დიმერის სახით და მის მოლეკულური მასა შეესაბამება 34,000 Da-ს, შედგება 2 თანაბარი 17,000 KDa მოლეკულური მასების მქონე სუბერთეულისაგან, არ შეიცავს ნახშირწყლებს და მიეკუთვნება ჰოლოლექტინების კლასს. ლექტინური აქტივობა ვლინდება pH-ის ფართო დიაპაზონში (pH 5.5-დან pH 9.0-მდე) და მაქსიმალური აქტივობა აღინიშნება pH 7.0-8.0 დიაპაზონში. ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე გავლენას არ ახდენს ორვალენტიანი მეტალის იონები (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2}).

ლექტინის ბიოქიმიური დახასითებისთვის, დადგენილია ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის გამოყოფისა და გასუფთავების მეთოდები: თესლებიდან ცილოვანი ფრაქციის ექსტრაქცია; ქრომატოგრაფია Toyopearl HW-55-ის სვეტზე; სვეტიდან ელუირებული **CBL**-ის შემცველი ცილების ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით; ლექტინური აქტივობის თერმოსტაბილურობა, რომელიც +60^{0}C-ზე 30 წთ-ის განმავლობაში ინარჩუნებს აქტივობას; აცეტონით დამუშავება; აფინური ქრომატოგრაფია ქიტინის სვეტზე. მეთოდები საშუალებას იძლევა ლექტინი გამოყოფილი იქნას ინდივიდუალური მოლეკულის სახით.

სადისერტაციო ნაშრომში წარმოდგენილია, **CBL**-ის ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლის ექსპერიმენტების შედეგები. მიღებული შედეგები გვიჩვენებენ, რომ ქრისტესისხლას თესლები გაღივების მე-20 დღიდან ახდენენ **CBL**-ის სეკრეციას გარემომცველ არეში და გააჩნიათ ფიტოპათოგენური ბაქტერიების *Pectobacterium aroidae, Xanthomonas campestris* და *Agrobacterium tumefaciens*-ის და ფიტოფათოგენური სოკოების *Trichoderma viride*-ს და *Fusarium oxysporum*-ის აგლუტინაციის, მათი ზრდისა და გამრავლების დათრგუნვის უნარი.

Annotation

Lectinology presents one of the new and quick developing directions in modern Biology. It studies lectins, which have the ability of connection electively and reversibly with Glycoconjugates, include carbohydrates and complex carbohydrates, structurally various, however, itbelongs unique group of albumens. The uniqueness of lectins is conditioned by their ability to carry out decoding of recorded information with primary and secondary structure forms in the content of included in the complex molecules of carbohydratesof Glycoconjugates (Glycoproteins, Glycolipid, Olygosacarines and so on) and transformation of this information into the relevant Biological language. This unique property of lectinsis based on such vital processes for the plants, asfecundation, growing-development, regulation for functioning of genetic apparatus, photosynthesis, mitochondrial respiration, material transportation, symbiosis, phytoimmunity, etc.

Development of Lectinology in applied direction is also actual and prospective especially. Namely, Lectins, as an active biologically compounds, are successfully used in biotechnology, biomedicine, medicine, agriculture and other sectors. Scientific literature shows, that various types of lectins can effect various biological activities. It is revealed, that the plant lectins cause proliferation of animal cells or conversely repress of proliferation, and it has effects like immuno tropic and hormone. Certain types of lectins causeaplastic apoptosisand apoptosis of infected cells, there is revealed antioxidant, antibacterial, anti-fungous, antiviral ability of activities and other activities.

In accordance with above-mentioned, revealing of new lectins in the vegetable objects, studying of their physiological role and biological activity, it is presentedone of the actual problem of fundamental applied in Biology, Biotechnology, agriculture, medicine and the other sectors of Science.

The purpose of this thesis presented to reveal lectins of treatment plant Celandine (*Chelidonium majus*) and to study their physical-chemical properties, physiological role and biological activity.

Dissertation work is presented the subject actuality, substantiated principal goals and tasks of the reserch.

According to the received results of done dissertation work, established, that from the grown plant Celandine, optimal conditions of extraction of soluble proteins in the activity of lectin. Extragent: PBS+0,5mMβ-merkptoetanolamin(pH 7,4), what is at least 10 times higher than the efficiency of the other usedextragents. The ability of Celandine's lectin is revealed by three different methods (light microscope, micro-titration onplane table, photocolorimetry), what can cause agglutination of trypsin-treated erythrocytes of rabbit and human. It is established, that lectin doesn't cause agglutination of native erythrocytes of the rabbit or of human's blood, agglutination of native erythrocytes of I(0); II(A); III(B) and IV(AB) group.

Compound of **CBL** has studied in the various organs. It is shown, that flowers of Celandine, roots, stems, leaves, orange juice of stemdo not contain hemugglutination activity of the protein-lectins. Only the seeds of Celandine contains the lectins

Seasonal content of **CBL** lectin is established in the seed of Celandine, which is the highest in May and in June and it is drastically reduced in March and April.

The new method of separation and cleaning **CBL** lectin from Celandine's seed is treated.Given method allows to separate the received lectin as the form of individual molecule (the quality of cleaning 789) and with high pemagglutationactivity

Some biochemical and physical-chemical characteristics of **CBL** are studied in this thesis. According to the given results from the presented research, shown, that isolated lectin from the seed of Celandine is analyzed 20 different types of carbohydrates, it reveals the specificity only towards to Chitin and it belongs to the class of Chitin-specific lectins.

According to the presented data in this thesis, it is determined, that quaternary structure of its natural molecule is presented as the form of Dimer and its molecular weight is 34,000 Da, it contains 2 equal subunits with molecular weight 17,000 KDa, it does not contain carbohydrates and belongs to the Hololectins class.Lectin activity does not reveal in the wide range of pH (from pH 5.5until pH 9.0) and maximum activity is marked in the area of pH 7.0-8.0.Divalent metal ions (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}) do not affect tohemugglutination activity of the lectin.

As the result of studying of biochemical characteristics of lectin, the methods of separation and cleaning lectin of Celandine's seed were established: extraction of protein fraction from the seed; Chromatography on the Toyopearl HW-55column; Protein fractionation

embodying of **CBL** with ammonium sulfate from the columns; Thermal stability of lectin activity, which remains activity at +60^{0}C during 30 minutes; Processing with acetone; Affine chromatography on the column of Chitin. The methods allow being separated received lectin as the form of individual molecule.

The results of experiment of studying of biological activity of **CBL** is presentedin the dissertation work.Received results show, that the seeds of Celandine carry out secretion of **CBL** from the 20th day of germinating in the surrounding area and have phytopathogenous bacteria's *Pectobacterium aroidae, Xanthomonas campestris, Agrobacterium tumefaciens* and *Trichoderma viride* of funguses and *Fusarium oxysporum* agglutination, the ability of their growing and reproduction and repression.

შ ე ს ა ვ ა ლ ი

უძველესი დროიდან მცენარეები წარმოადგენენ ბუნებრივი პროდუქტების ფასდაუდებელ წყაროს და ემსახურებიან ადამიანის ჯანმრთელობას. მცენარეული ნაერთების გამოყენება ფარმაცევტული მიზნებისთვის სწრაფად იზრდება მთელს მსოფლიოში. განვითარებული ქვეყნების მოსახლეობის 80%, უპირატესობას ანიჭებს ხალხურ მედიცინას, რომელიც გამოიყენებს სამკურნალო მცენარეებიდან მიღებულ ნაერთებს.

უკანასკნელი წლების განმავლობაში უსაფრთხო წამლებზე მოთხოვნილებების ზრდის გამო, მცენარეული ექსტრაქტების და ნატურალური პროდუქტების ანტიმიკრობული თვისებების კვლევამ, ინტენსიური ხასიათი მიიღო. ეს გამოწვეული იქნა ანტიბიოტიკების არასწორი გამოყენებისა და იმუნური დეფიციტით.

იმის მიუხედავათ, რომ ფარმაკოლოგიურმა წარმოებამ, აწარმოა მთელი რიგი ახალი ანტიბიოტიკები, მიკროორგანიზმების რეზისტენტულობა ამ წამლების მიმართ განუსაზღვრელად იზრდება და ეს პრობლემა თანამედროვე მედიცინის ერთ-ერთ უმთავრეს ამოსახსნელ პირობად რჩება.

ბოლო წლებში მნიშვნელოვნად გაფართოვდა სამეცნიერო და პრაქტიკული ინტერესის სფერო, ახალი ბუნებრივი საშუალებების აღმოჩენის თვალსაზრისით, ისეთი ნაერთებისა, რომლებთაც აქვთ ანტიმიკრობული, ანტივირუსული და იმუნოსტიმულატორული აქტივობა. ამ მოთხოვნებს მნიშვნელოვნად აკმაყოფილებს ლექტინები, რომლებიც წარმოადგენენ რთულ ცილებს მეტალშემცველი გლიკოპროტეიდებით (Peumans W. J., 1995; Gabius H. J., 1998; Sakeena Q., 2013).

ლექტინები - არის ცილები, რომლებსაც უნარი აქვთ სპეციფიკურად და შექცევადად დაუკავშირდნენ ნახშირწყლებს, ან მის ნარჩენებს ბიოპოლიმერებში. ლექტინები შედიან ქსოვილთა სტრუქტურებში, რომლებიც მონაწილეობას იღებენ ორგანიზმის გარე ფაქტორებისაგან დაცვისა და რეგულაციის პროცესებში. სხვადასხვა ორგანიზმიდან გმოყოფილი ლექტინები ფართოდ გამოიყენება, როგორც რეაქტივები: ბიოქიმიაში, ჰისტოქიმიაში, უჯრედულ ბიოლოგიაში, ბიოტექნოლოგიაში, იმუნოლოგიაში და სხვადასხვა დაავადების დიაგნოსტიკაში. ბოლო წლებში დაიწყეს მისი, როგორც სამკურნალო პრეპარატებად გამოყენება (Rabia Hamid, 2013).

დღეისათვის ლექტინური აქტივობის მქონე რამდენიმე ათასი ნივთიერებაა იდენტიფიცირებული და ბიოქიმიურად დახასიათებული. მცენარეული ლექტინები ავლენენ მიტოგენურ აქტივობას (Ho wong J., 2005), ჰორმონის მსგავს მოქმედებას ცხოველურ უჯრედებზე, ციტოტოქსიკურ აქტივობას კიბოს უჯრედების მიმართ (Tabiasco J., 2002; Tandea A. T., 2016), ანტიბაქტერიულ, ანტისოკოვან, ანტივირუსულ და ინსექტიციდურ თვისებებს. ლექტინების გამოყენებით შესაძლებელია უჯრედული მეტაბოლიზმის განსაზღვრულ სტადიებზე მიზანმიმართული ზემოქმედება (Van Damme E.J.M.,1998; Cai Q., 2005).

ლექტინების ბიოლოგიური როლის შესახებ ბევრი ვარაუდი და ჰიპოთეზა არსებობს. გლიკოკონიუგატებთან სპეციფიკურად დაკავშირების თვისება უნდა განსაზღვრავდეს მათ უშუალო მონაწილეობას სხვადასხვა ენდოგენურ და ეგზოგენურ სპეციფიკურ ამოცნობით პროცესებში, რაც ძალიან მნიშვნელოვანია მცენარეთა და ცხოველთა განვითარების, გამრავლებისა და დაცვითი მექანიზმების რეგულაციაში (Sandeep K., 2013). სამეცნიერო ლიტერატურაში განხილულია ლექტინების მონაწილეობა მცენარისათვის სასიცოცხლო მნიშვნელობის პროცესებში, როგორიცაა განაყოფიერება, გამრავლება, ზრდა-განვითარება, სიმბიოზი, პარაზიტიზმი, ფიტოიმუნიტეტი (Rudiger H., 1984; Peumans W.J., 1995; Repon K. S., 2014).

გამოვლენილი ფაქტიურად ყველა ჰორმონი და მათი სპეციფიკური რეცეპტორები წარმოადგენს გლიკოპროტეინებს, რომელთა დიდი ნაწილი ლექტინური (ნახშირწყალ დამკავშირებელი) ბუნებისაა (Futai M., 2009). ლექტინები იმ რეცეპტორებით, რომლებსაც ის უკავშირდება, უჯრედებზე ახდენენ სხვადასხვა ტიპის გავლენას. არის ისეთი რეცეპტორები, რომლებიც ამცირებენ სისხლმბადი ორგანოების ჩამოყალიბებას სიმსივნურ კერებში (ანტიანგიოგენეზი), მაგრამ ისინი ასევე ახდენენ აპოპტოზის ინჰიბირებას (Tammu Yau, 2015; Ram Sarup Singh, 2016). Con A-ს ლექტინის ნახშირწყალ სპეციფიკურ რეცეპტორთან ურთიერთქმედებისას, ირთვება ავტოფაგია ან აპოპტოზი, რომელიც მიმდინარეობს ერთ-ერთი შესაძლო ვარიანტით: 1) მიტოქონდრიის ელექტრული პოტენციალის ტრანსმემბრანული ცვლილებით 2) ჟანგბადის აქტიური ფორმის ჩამოყალიბებით.

ამასთან დაკავშირებით განსაკუთრებით საინტერესოა ამერიკელი მკვლევარის - ალბერსგეიმის უკანასკნელი მონაცემები, კერძოდ, მის ლაბორატორიაში ნაჩვენები იქნა,

რომ არსებობს ახალი კლასი მარეგულირებელი მოლეკულებისა, რომლებიც წარმოადგენს მცენარეული უჯრედის პირველადი კედლის შემადგენლობაში შემავალი რთული პოლისაქარიდებიდან ამოჭრილ ოლიგოსაქარიდებს, რომელთაც ოლიგოსაქარინები (2-10 ნაშთისაგან შემდგარი მაღალსპეციფიკური ფრაგმენტები) ეწოდათ (Albersheim P., 1985). მათ გააჩნიათ ჰორმონის მსგავსი მოქმედება მცენარეულ უჯრედებზე. როგორც ჩანს, თითოეული სახის ოლიგოსაქარინი გადასცემს სიგნალს, რომელიც არეგულირებს მცენარის განსაზღვრულ ფუნქციას: დაავადებებისაგან დაცვა, ზრდა-განვითარება, უჯრედების დიფერენცირება და სხვ.

ლექტინები უშუალო მონაწილეობას ღებულობენ მცენარეთა და ცხოველთა განაყოფიერების პროცესში, მათ განსაკუთრებული როლი ენიჭებათ ონტოგენეზში, სიმბიოზში, ფიტოიმუნიტეტში (Elaasser M. M., 2011; Petnual P., 2010) და სხვა. აღმოჩნდა, რომ რიგი მცენარეული ლექტინებისა ხასიათდება ინსექტიციდური, ანტიბაქტერიული და ანტივირუსული თვისებებით. ამ თვისებებს დიდი ეკოლოგიური მნიშვნელობა უნდა ენიჭებოდეს მცენარეთა თავდაცვისა და თვითგადარჩენის პროცესში. მედიცინასა და სოფლის მეურნეობაში ისახება ვირუსებითა და ბაქტერიებით გამოწვეული დაავადებების ნახშირწყლებით მკურნალობის დიდი პერსპექტივა, რომელიც სპეციფიკური ჰაპტენებით (ნახშირწყალი) მათ წინასწარ ინაქტივაციას ემყარება. მიკროორგანიზმების ლექტინთა წინასწარი დაკავშირებით შაქრებთან კავდება ვირუსებისა და ბაქტერიების მცენარეულ და ცხოველურ ორგანიზმებში შეღწევა და მათი კოლონიზაცია (Kheereen N., 2011). პერსპექტივაში ისახება სრულიად ახალი მეთოდოლოგია ეკოლოგიურად სუფთა გარემოს შესაქმნელად, რათა თავიდან ავიცილოთ პესტიციდებისა და ანტიბიოტიკების მასშტაბური გამოყენება.

ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ახალი მცენარეული ლექტინების იდენტიფიკაცია და მათი ბიოლოგიური როლის შესწავლა კვლავ აქტუალურ პრობლემად რჩება.

სამუშაოს მიზანი და ამოცანები

წინამდებარე სადისერტაციო ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა საქართველოში გავრცელებული, უნიკალური სამკურნალო მცენარის - ქრისტესისხლას (*Chelidonium majus*) სხვადასხვა ორგანოებიდან ლექტინების იდენტიფიკაცია, ბიოქიმიური დახასიათება და მათი ბიოლოგიური როლის შესწავლა. რაც ერთის მხრივ გააფრთოვებს წარმოდგენებს მცენარეული ლექტინების ბიოლოგიური როლის შესახებ და მეორეს მხრივ შექმნიდა წინაპირობას მისი სოფლის მეურნეობაში, ბიოტექნოლოგიაში, ბიომედიცინაში, მედიცინაში და მეცნიერების სხვა სფეროებში შესაძლო გამოყენების შესახებ.

სამუშაოს მიზნიდან გამომდინარე დასმული იყო შემდეგი კონკრეტული ამოცანები:

1. ქრისტესისხლას თესლებში ხსნადი ლექტინების შემცველობის დადგენა;
2. ქრისტესისხლას თესლიდან ლექტინების გამოყოფისა და გასუფთავების მეთოდის შემუშავება;
3. ქრისტესისხლას თესლიდან გამოყოფილი ლექტინების ბიოქიმიური დახასიათება (ნახშირწყალდამკავშირებელი თვისებების შესწავლა, ტემპერატურის და H^+-იონთა კონცენტრაციის გავლენა, ნატიური მოლეკულებისა და შემადგენელი სუბერთეულების მოლეკულური მასების განსაზღვრა და სხვ.);
4. ლექტინების განაწილების შესწავლა ქრისტესისხლას სტრუქტურულ-ფუნქციონალურად განსხვავებულ ორგანოებსა და ქსოვილებში მცენარის სასიცოცხლო ციკლის სხვადასხვა სტადიაზე;
5. ბიოლოგიური როლის შესწავლა: ქრისტესისხლას გაღივებული და გაუღივებელი თესლებიდან გამოყოფილი ლექტინური აქტივობის მქონე ფრაქციების ანტიბაქტერიული და ანტისოკოვანი თვისებების განსაზღვრა.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და ძირითადი შედეგები

ჩვენს მიერ შემუშავებული ახალი მეთოდით, შემოთავაზებულია საქართველოში ფართოდ გავრცელებული უნიკალური სამკურნალო მცენარე ქრისტესისხლადან

(*Chelidonium majus*), ახალი ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინის გამოყოფისა და გასუფთავების გზები.

შესწავლილია ხსნადი ლექტინის განაწილება ქრისტესისხლას სტრუქტურულ-ფუნქციონალურად განსხვავებულ ორგანოებში და მათი შემცველობის დინამიკა თესლის აღმოცენების პროცესში ამ ნაერთების ფიზიოლოგიური როლის შესწავლის მიზნით.

შესწავლილია ქრისტესისხლას თესლის გაღივებული და გაუღივებელი თესლებიდან, გარემომცველ არეში სეკრეტირებული ლექტინის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა, შაქარსპეციფიკურობა, ანტიბაქტერიული და ანტისოკოვანი მოქმედება.

შესრულებული სადისერტაციო სამუშაოს შედეგებით დადგენილია, ქრისტესისხლას ორგანოებიდან ლექტინების საექტრაქციო ხსნარის ოპტიმალური შემადგენლობა და ექსტრაქციის ოპტიმალური დრო. პირველად სამი განსხვავებული მეთოდით (სინათლის მიკროსკოპით, პლანშეტებზე მიკროტიტრაციის და ფოტოკოლორიმეტრული) ნაჩვენებია, რომ ლექტინების ყველაზე მაღალი შემცველობით გამოირჩევა თესლი. გამოვლენილია ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ანტიბაქტერიული და ანტისოკოვანი თვისებები.

მოწოდებული მეთოდი, საშუალებას იძლევა მიღებული ლექტინი გამოყოფილი იქნას ინდივიდუალური მოლეკულის სახით (გასუფთავების ხარისხი - 1272) და მაღალი ჰემაგლუტინაციური აქტივობით (0. 000022 მგ/მლ). ლექტინი მაღალ სპეციფიკურობას ავლენს ქიტინის მიმართ რაც მიუთითებს, რომ იგი მიეკუთვნება ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინების კლასს.

ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინის ფიზიკო-ქიმიური თვისებების შესწავლამ გამოავლინა, რომ მისი ნატიური მოლეკულის მეოთხეული სტუქტურა წარმოდგენილია დიმერის სახით და მის მოლეკულური მასა შეესაბამება 34 kDa-ს, შედგება 2 თანაბარი – 17 kDa მოლეკულური მასების მქონე სუბერთეულისაგან, არ შეიცავს ნახშირწყლებს და მიეკუთვნება ჰოლოლექტინების კლასს.

ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინის ბიოქიმიური თვისებების შესწავლის შედეგად, დადგენილ იქნა, რომ ლექტინი თერმოსტაბილურია (ინაქტივირდება 60^0C-ზე) და ხასიათდება მაღალი ჰემაგლუტინაციური აქტივობით (0.000022 მგ/მლ). ლექტინური აქტივობა ვლინდება pH-ის ფართო დიაპაზონში (pH 5.5-დან pH 9.0-მდე) და

მაქსიმალური აქტივობა აღინიშნება pH 7.0-8.0. ლექტინის ჰემაგლუტინაციური აქტივობაზე გავლენას არ ახდენს ორვალენტიანი მეტალის იონები (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}).

კვლევითი სამუშაოებში, სადაც ლექტინის ბიოლოგიური აქტივობის სპექტრი იქნა შესწავლილი ნაჩვენებია, რომ ლექტინი **CBL** ავლენს ანტიბაქტერიულ აქტივობას ზოგიერთი გრამ უარყოფითი ფიტოპათოგენური ბაქტერიების მიმართ და იწვევს მათი ზრდის ინჰიბირებას. ასევე შესწავლილი იქნა **CBL**-ის ანტისოკოვანი თვისებებიც, აქაც ის შერჩევითად მოქმედებს სოკოებზე და იწვევს მათი ჰიფების აგლუტინაციას და ზრდის ინჰიბირებას.

კვლევის თეორიული და მეთოდოლოგიური საფუძვლები

სადისერტაციო ნაშრომის კვლევის თეორიულ საფუძველს წარმოადგენდა სამეცნიერო-კვლევითი სამუშაოების წარმართვა, როგორც ფუნდამენტალური ასევე გამოყენებითი მიმართულებით.

სადისერტაციო ნაშრომის მეთოდოლოგიური საფუძვლებს წარმოადგენდა ბიოქიმიის, ბიოფიზიკის, ბიოტექნოლოგიის, იმუნოლოგიის და მიკრობიოლოგიის კვლევის უახლესი თანამედროვე მეთოდები. კვლევებში გამოყენებული იქნა ცენტრიფუგირების, კოლორიმეტრული, სპექტროფოტომეტრული მეთოდები; ლექტინური აქტივობის და უჯრედების აგლუტინაციის განსაზღვრის მიკროტიტრაციის, მიკროსკოპული და ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდები; მაღალი წნევის გელფიტრაციული ქრომატოგრაფიის, აფინურ სორბენტებზე აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდები; პრეპარატული და ანალიტიკური ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელებში; ცილების შემადგენლობაში ნახშირწყლების განსაზღვრა ელექტროფორეზის და შიფის რეაგენტის გამოყენებით;

ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება.

სადისრტაციო ნაშრომში ფუნდამენტური და გამოყენებითი მიმართულებით ჩატარებული კვლევის შედეგების საფუძველზე წარმოდგენილია მოსაზრებები საქართველოში გავრცელებული სამკურნალო მცენარე, ქრისტესისხლას (*Chelidonium majus)* ბიოლოგიური აქტივობების შესახებ. კერძოდ გამოთქმულია მოსაზრება ლექტინი **CBL**- ის ანტიმიკრობული, დამცველობითი როლის შესახებ.

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა

დისერტაცია მოიცავს: შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას, კვლევის ობიექტს და მეთოდებს, კვლევის შედეგებს და განხილვას, დასკვნებს, გამოყენებული ლიტერატურის სიას (188 წყარო). იგი ილუსტრირებულია 10 ცხრილით და 24 სურათით. ნაშრომის მოცულობა 120 გვერდია.

თავი 1.ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1. ლექტინების ზოგადი დახასიათება

1.1.1. ლექტინების განსაზღვრება და კლასიფიკაცია

ლექტინოლოგიას, როგორც ბიოლოგიური კვლევის ახალ მიმართულებას, სათავე დაედო 115 წლის წინ, დერპტის (ამჟამად ტარტუს) უნივერსიტეტის ფარმაკოლოგიური ინსტიტუტის თანამშრომლების მიერ (კობერტი, შტილმარკი), 1888 წლიდან გამოქვეყნებული შრომების სერიით.

ტერმინი ლექტინის სინონიმებია: აგლუტინინი და ჰემაგლუტინინი. 1898 წელს ელფსტრანდმა პირველად შემოიღო ტერმინი ,,ჰემაგლუტინი'', როგორც მცენარეების იმ პროტეინების დასახელება, რომლებიც უჯრედების შეწებებას იწვევდნენ. პირველად ლექტინი აღწერილი იქნა შტილმარკის მიერ 1888 წელს, რომელიც შეისწავლიდა აბუსალათინის (*Ricinus communis L*) თესლებიდან და ზოგიერთი სხვა *Euphorbiaceae*-ს სახეობიდან გამოყოფილ (რიცინ-A) - ტოქსიკურ ცილას. მან აბუსალათინის თესლების ტოქსიკურობა, პროტეინის ჰემაგლუტინაციურ ფაქტორს დაუკავშირა. დიდი ხნის განმავლობაში ჩატარებული ექსპერიმენტებით ნაჩვენები იქნა, რომ შტილმარკის ,,რიცინი'' იყო სუსტი მააგლუტინირებელი ტოქსიკური ცილის (დღესაც ცნობილია როგორც რიცინი) და არატოქსიკური აგლუტინინის (RCA) ნარევი. ამ ექსპერიმენტის პირველი მტკიცებულება წარმოადგინა კაბეტმა და სხვებმა, მეორე მსოფლიო ომის დროს. მათ იმუნოქიმიური მეთოდების მეშვეობით აღმოაჩინეს, რომ ,,რიცინის'' ტოქსიკური და მაჰემაგლუტინირებელი თვისებები სხვადასხვა ნივთიერებებით იყო განპირობებული, რიცინმა სახელი გაითქვა ხალხში, განსაკუთრებით 1978 წლის შემდეგ, როდესაც ის იარაღის სახით გამოყენებული იქნა პოლიტიკურ მკვლელობაში - ,,ჩხვლეტა ქოლგით''. კაფსულის ნახვრეტის დიამეტრი კარგად გვიჩვენებს თუ რამდენად ეფექტურია რიცინი, როგორც მკვლელობის იარაღი. ძალიან ცოტაა ისეთი შხამი, რომელსაც აქვს პოტენციალი წუთების განმავლობაში მოკლას ადამიანი.

იდეა, რომ ტოქსიკურობა ლექტინის აუცილებელი თვისებაა, საუკუნის დასაწყისშივე იქნა უარყოფილი, როდესაც წარმოდგენილი იქნა პარკოსნებში: ლობიოში, ბარდაში, ცერცვში და ოსპში არსებული არატოქსიკური ლექტინები.

თანდათანობით გამოირკვა, რომ ლექტინი ფართოდაა გავრცელებული მცენარეულ სამყაროში და რომ ტოქსიკური უფრო გამონაკლისია, ვიდრე არატოქსიკური (Van Dam, 1995).

შემდეგი ეტაპი მცენარეული ლექტინების ისტორიაში უკავშირდება ტერმინოლოგიას. აღმოჩენილი იქნა, რომ ზოგიერთი ჰემაგლუტინინი, აშკარად ავლენს შეწებების ეფექტს, უპირატესად ადამიანის გარკვეული ტიპის სისხლის ჯგუფებთან მიმართებაში -ABO-სისტემაში (Boyd 1949; Renkonen, 1948). ტერმინი ,,ლექტინი'', თავიდანვე ზოგიერთი ჰემაგლუტინინის შემაწებელი მოქმედების აღსანიშნავად იყო შემოღებული, თუმცა შემდგომ ყველა აგლუტინაციის უნარის მქონე ცილების მიმართებაში იქნა გამოყენებული. სიტყვა ,,ლექტინი'' წარმოიშვა ლათინური სიტყვა Legere-დან, რაც ამორჩევას ნიშნავს. ამით ხაზი გაესვა ამ ჯგუფის ცილების ნახშირწყლებთან, განსაკუთრებით კი სისხლის ჯგუფების ნახშირწყლოვან დეტერმინანტებთან შერჩევითი ურთიერთქმედების უნარს (Boyd W. C., 1954). ამ ლექტინებისთვის ჰემაგლუტინინი ყველაზე შესაფერისი ტერმინია, ვინაიდან ის მათ მიერ ერითროციტების აგლუტინაციის უნარზე მიუთითებს, თუმცა არ ითვალისწინებს იმას, რომ ლექტინების უმეტესობა სხვა უჯრედების აგლუტინაციასაც ახდენენ. ამრიგად ტერმინ აგლუტინინს უპირატესობა ენიჭება, მაგრამ ტერმინი ,,ლექტინი'' ფართოდ გამოიყენება, თუმცა აგლუტინინი და ჰემაგლუტინინი, ჯერაც ლექტინის სინონიმებად არის მიჩნეული.

ჰემაგლუტინინების აღსანიშნავად 70-იანი წლებიდან, ამ სახელწოდების ქვეშ გაერთიანდა როგორც მცენარეული, ასევე ცხოველური წარმოშობის შაქრის დამკავშირებელი ცილების სტრუქტურულად მეტად მრავალფეროვანი ჯგუფი.

სამეცნიერო წრეებში შემოთავაზებულია რიგი ფორმულირებებისა, ასე მაგალითად, ერთ-ერთი განმარტების თანახმად ,,ლექტინები წარმოადგენენ არაიმუნური ბუნების ცილებს, რომლებსაც აქვთ გლიკოკონიუგატების ნახშირწყლოვანი ნაშთების ამოცნობისა და შექცევადი დაკავშირების უნარი მათი კოვალენტური სტრუქტურის დარღვევის გარეშე (Kosourek J., 1983). ლექტინები არაიმუნური წარმოშობის ცილებია, რომელთაც გააჩნიათ ერთი ან მეტი ნახშირწყალ-დამკავშირებელი უბანი (Peumans W. J., 1986).

1936 წელს უკვე ცნობილი იყო, რომ შაქრის ლერწმის ექსტრაქტი თრგუნავდა კონ A-ს აგლუტინაციურ აქტივობას (Summer, 1936). 1952 წელს ნაჩვენები იქნა, რომ ლექტინის მააგლუტინირებელი თვისებები ეფუძნება სპეციფიკურ შაქარ-დამკავშირებელ აქტივობას (Watkins, 1952). როგორც კი ლექტინი აღიარებული იქნა, როგორც ნახშირწყალდამკავშირებელი პროტეინი, შესაძლებელი გახდა ამ ფუნქციურ კრიტერიუმზე დაყრდნობით, მათი სხვა ჯგუფის პროტეინებიდან გამოყოფა. ამ მომენტიდან ლექტინს ნახშირწყალდამკავშირებელ პროტეინად მოიხსენებენ და არა (ჰემ) აგლუტინინად.

ყველაზე სრულყოფილად გვეჩვენება კოროლიოვის მიერ მოწოდებული განმარტება (Королев Н. П., 1984), რომლის თანახმად ,,ლექტინები წარმოადგენენ ცილების ჯგუფს უჯრედების აგლუტინაციის და/ან გლიკოკონიუგატების პრეციპიტაციის უნარით".

ამრიგად, თანამედროვე შეხედულებით, მცენარეული ლექტინები განისაზღვრება როგორც ცილები, რომელთაც გააჩნიათ თუნდაც ერთი არაკატალიზური მონაკვეთი, რომელიც შექცევადად უკავშირდება სპეციფიკურ მონო ან ოლიგოსაქარიდს (Peumans W. J., 1995).

დღეისათვის იდენტიფიცირებულია ლექტინური აქტივობის მქონე რამდენიმე ათასი ნივთიერება. ისინი გამოვლენილია ცოცხალი ფორმების ყველა სისტემატიკური ჯგუფის წარმომადგენლებში. ლექტინების დიდ ჯგუფში გაერთიანებულია განსხვავებული წარმოშობის, აგებულებისა და ფუნქციის მქონე ცილები. ამის გამო სამეცნიერო ლიტერატურაში შემოთავაზებულია მათი კლასიფიკაციის სხვადასხვა ვარიანტები:

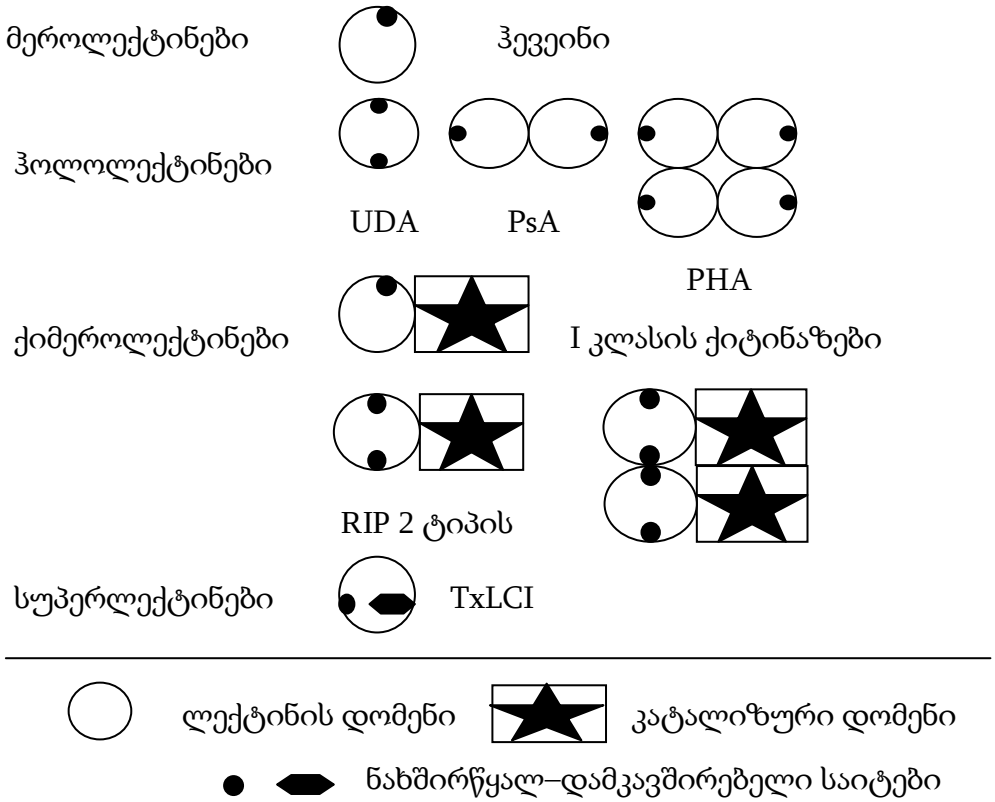
1.1.2. ლექტინების კლასიფიკაცია ვალენტობისა და სუბერთეულების რიცხვის მიხედვით

ვალენტობა განისაზღვრება ნახშირწყალ-დამკავშირებელი უბნების რიცხვით. მონოვალენტურია რიგი მცენარეული და ბაქტერიული ტოქსინებისა: რიცინი, აბრინი, მოდესცინი, ქოლერის ტოქსინი და სხვ. ლექტინთა უმრავლესობა კი პოლივალენტური (Peumans W. J., 1995). სტრუქტურის მიხედვით ლექტინებს ყოფენ ოთხ ჯგუფად:

მეროლექტინები, ჰოლოლექტინები, ქიმეროლექტინები და სუპერლექტინები (სქემა 1)

მეროლექტინები შეიცავენ მხოლოდ ერთ ნახშირწყალ-დამკავშირებელ ცენტრს. ისინი მოკლებული არიან გლიკოკონიუგატების პრეციპიტაციის ან უჯრედების აგლუტინაციის უნარს. ამ ჯგუფის ტიპიური წარმომადგენელია ჰევეინი, ორქიდეას მონომერული მანოზა-დამკავშირებელი ცილა (Peumans W. J., 1995).

სქემა I



ჰოლოლექტინები შეიცავენ ორ ან მეტ ნახშირწყალ-დამკავშირებელ ცენტრს, რომლებიც იდენტურნი ან ძლიერ ჰომოლოგიურნი არიან. ეს ჯგუფი მოიცავს ყველა ლექტინს, რომელთაც აქვთ რამოდენიმე დამკავშირებელი უბანი და აქედან გამომდინარე, გააჩნიათ უჯრედების აგლუტინაციის ან გლიკოკონიუგატების პრეციპიტაციის უნარი. აღსანიშნავია, რომ ამჟამად ცნობილი მცენარეული ლექტინების უმრავლესობა წარმოადგენს ჰოლოლექტინებს, რადგანაც ისინი ავლენენ ჰემაგლუტანაციის უნარს.

ქიმეროლექტინები შერწყმული ცილებია, რომლებსაც ნახშირ-წყალდამკავშირებელი ცენტრების გარდა გააჩნიათ კატალიზური (ან განსხვავებული ბიოლოგიური აქტივობის) ცენტრები. ქიმეროლექტინებს ეკუთვნის RIP 2 ტიპის ტოქსიკური ცილები და I კლასის მცენარეული ქიტინაზები.

სუპერლექტინები ქიმეროლექტინების განსაკუთრებული ტიპს წარმოადგენს და მოიცავს რთული ბუნების მქონე ცილებს, რომლებიც შეიცავენ სტრუქტურულად განსხვავებულ ორ ნახშირწყალ-დამკავშირებელ დომენს და ამოიცნობენ სტრუქტურულად განსხვავებულ შაქრებს. აღწერილია ერთი სუპერლექტინი - ტიტას ბოლქვის ლექტინი (Peumans W. J., 1995).

ლექტინთა უმრავლესობა პოლივალენტურია. გამონაკლისია მცენარეული და ბაქტერიული ტოქსინები. პრაქტიკულად ყველა ლექტინი მიეკუთვნება ოლიგომერულ ცილებს (ყველაზე უფრო ხშირად ტეტრამერებს). გამონაკლისს წარმოადგენს ზოგიერთი დიმერული ტოქსინი.

1.1.3. ლექტინების კლასიფიკაცია წარმოშობის მიხედვით

ლექტინები აღმოჩენილია მცენარეთა და ცხოველთა სხვადასხვა სისტემატიკურ ჯგუფებში. ლექტინების თანამედროვე უნივერსალურ ნომენკლატურულ სისტემაში გამოიყოფა: მცენარეული (ერთლებნიანთა, პარკოსანთა, ძაღლყურძენასებრთა, მარცვლოვანთა და ა.შ. ლექტინების არსებობა დადგენილია ლიქენებშიც), ცხოველური (C-ტიპის, გალექტინები, I-ტიპის, p-ტიპის, S-ტიპის), ვირუსული, ბაქტერიული, Actinomyces-ის, სოკოების, ერთუჯრედიანი ორგანიზმების, უხერხემლოების (კერძოდ, ნაწლავღრუიანების, რგოლოვანი ჭიების, მოლუსკების, ფეხსახსრიანების, კანეკლიანების), უმაღლეს ცხოველთა (თევზების, ამფიბიების, ძუძუმწოვრების) და ა.შ. ლექტინები.

1.1.4. ლექტინების ლოკალიზაცია

დღეისათვის ყველაზე პოპულარულ და გავრეცელებულ კლასიფიკაციას წარმოადგენს ლექტინების დაყოფა სუბუჯრედული ლოკალიზაციის შესაბამისად, ბოულსის მიხედვით (Bowles D. J., 1982). ამ კლასიფიკაციის თანახმად უჯრედში შეიძლება გამოიყოს ორი კლასი:

ა) ლექტინები, რომლებიც წარმოადგენენ მემბრანის ინტეგრალურ კომპონენტებს და მათი ექსტრაქცია ხდება მხოლოდ ლიპიდური შრის დამრღვევი სპეციფიკური დეტერგენტების გამოყენებით. ლექტინების ამგვარი დაყოფა დღეისათვის საკმაოდ

პოპულარულია მისი პრაქტიკულობის გამო და ხშირად გამოიყენება მიმდინარე კვლევით სამუშაოებში და ბ) ლექტინები, რომლებიც თავისუფალი, ხსნადი სახით არსებობენ ციტოპლაზმაში ან სუბუჯრედული მემბრანების სანათურებში და რომელთა ურთიერთქმედება მემბრანულ ზედაპირებთან შექცევადი და დროებითია.

თესლის ლექტინები განეკუთვნება ლექტინთა მეორე კლასს, ვინაიდან მათი ექსტრაქცია შესაძლებელია ბუფერული ხსნარებით დეტერგენტის გამოყენების გარეშე. ასეთი გზით არის მიღებული ხსნადი ლექტინები, რომელთა სუბუჯრედული ლოკალიზაციის შესწავლა ძირითადად შემოიფარგლება ხსნადი ლექტინების განაწილების დადგენით თესლებში. ამრიგად თესლის სამარაგო ქსოვილის უჯრედებში, ხსნადი ლექტინები ლოკალიზებულია ცილოვანი სხეულაკების მატრიქსში, რომლებიც თესლის გაღივების პერიოდში ვლინდებიან ციტოპლაზმაში და უჯრედის ზედაპირზე, ე.ი. ადგილი აქვს მათ სეკრეციას ცილოვანი სხეულაკებიდან უჯრედის ზედაპირზე და გარემომცველ არეში.

პირველადი მემბრანული ლექტინების არსებობაზე მცენარეში მიუთითეს ბოულსმა და კაუსმა (Bowles D.J., 1976; Spilarto S., 1996; Алексидзе Г.Я., 1990). მემბრანული ლექტინების არსებობა გამოვლინდა თითქმის ყველა მემბრანულ ფრაქციაში, რაც ბადებს ვარაუდს იმის შესახებ, რომ ლექტინების ეს ჯგუფი წარმოადგენს მცენარეული უჯრედის მემბრანათა აუცილებელ კომპონენტს და ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში, ისინი უნდა მონაწილეობდნენ სხვადასხვა ბიოლოგიურ პროცესებში, როგორც მემბრანების აქტიურად ფუნქციონირებადი კომპონენტები.

1.1.5. ლექტინების ბიოლოგიური აქტივობა და ნახშირწყლების შემცველობა

1) ბიოლოგიური აქტივობის მიხედვით ამ ჯგუფში გამოიყოფა ჰემაგლუტინინები, ლეიკოაგლუტინინები, მიტოგენები, ბლასტტრანსფორმანტები, ფუზოგენები, ტოქსინები, სასქესო აგლუტინინები, ადჰეზინები და ა.შ. (Луцик М.Д., 1981, De Mejia E.G., 2005).

2) ნახშირწყლების შემცველობის მიხედვით ა) ლექტინები, რომლებიც საერთოდ არ შეიცავენ ნახშირწყლებს (ხორბლის ლექტინი, კონკ. A, არაქისის ლექტინი), ბ)

გლიკოპროტეინები (ლექტინთა უმეტესობა, რომელიც მიღებულია ეუკარიოტული ორგანიზმებიდან), სადაც ნახშირწყლები შეადგენს ლექტინის წონის 15%-ს და გ) პროტეოგლიკანები (კარტოფილის გორგლის ლექტინი), სადაც ნახშირწყლების შემცველობა ლექტინის წონის მიხედვით აღემატება 50-60%-ს. (Люцик М. Д., 1981; Korolev N. P., 1984, Chan J., 2009).

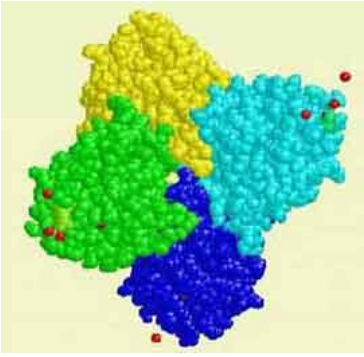
3) ლექტინების დაყოფა იონების შემცველობის მიხედვით: C ტიპის ლექტინები (Ca^{2+}-დამოკიდებული) და გალექტინები (Ca^{2+}-დამოუკიდებელი).

ევოლუციური განვითარების სხვადასხვა საფეხურზე მდგომი ორგანიზმების, ლექტინური სისტემების, ფუნქციებისა და მოქმედებების მექანიზმების სწორი გაგებისათვის, ერთ-ერთ აუცილებელ პირობას წარმოადგენს, მათი ძირითადი კომპონენტების, ლექტინებისა და მათი ლიგანდების ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა.

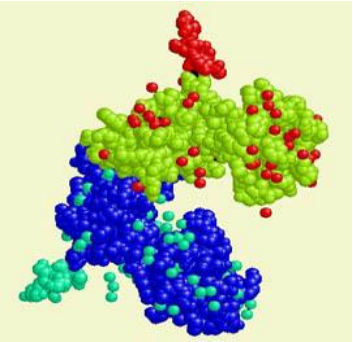
1.2. ლექტინური სისტემის ბიოქიმიური დახასიათება

1.2.1. ლექტინების სტრუქტურული ორგანიზაცია

პირველ ლექტინს, რომლისთვისაც დადგენილ იქნა სრული ამინომჟავური შედგენილობა და მოლეკულის სივრცითი სტრუქტურა, წარმოადგენს კონ. A (Reecke G., 1975) (სურ. 1). მცენარეული ლექტინების უმრავლესობა ოლიგომერულ ცილებს მიეკუთვნება. ისინი სხვა ცილებს შორის შედარებით მცირე ზომისაა (50-120კდა) და შედგება უფრო ხშირად 2 ან 4 სუბერთეულისაგან, რომლებიც ერთმანეთთან დისულფიდური ხიდაკებითაა დაკავშირებული. ლექტინების პირველადი სტრუქტურა ძირითადად შესწავლილია პარკოსანთა ოჯახის წარმომადგენლებში. პარკოსანთა ლექტინების პოლიპეპტიდური ჯაჭვების ამინომჟავური თანმიმდევრობის შედარებამ გამოავლინა, მათ შორის სტრუქტურული ჰომოლოგიურობა. კერძოდ: ოსპის, ბარდის, ცერცვის ლექტინები წარმოადგენენ დიმერულ ცილებს და შეიცავენ α-სუბერთეულს მოლეკულური მასით 6 კდა და β-სუბერთეულს მოლეკულური მასით 18კდა. მათ გააჩიათ აგრეთვე იდენტური ტერმინალური ამინომჟავური თანამიმდევრობა (Lis H., 1986).



ConA



WGA

სურ.1 ლექტინების სტრუქტურული ორგანიზაცია

ლექტინებში ნახშირწყლების შემცველობა. მცენარეული ლექტინების უმრავლესობა გლიკოპროტეინებს წარმოადგენს და, როგორც გამოკვლევებმა აჩვენა, მათი აქტივობა არ იცვლება გლიკანების მოდიფიკაციის ან საერთოდ არ არსებობის შემთხვევაში. გამონაკლისს წარმოადგენს რიცინი (*Ricinus communis*) -აბუსალათინის ორჯაჭვიანი ტოქსიკური ლექტინი, რომელიც დეგლიკოზილირების შემთხვევაში კარგავს ნახშირწყალ-დამკავშირებელ აქტივობას (Lis H., 1993).

ნახშირწყლების რაოდენობრივი შემცველობა ლექტინებში მერყეობს 3%-დან 80%-მდე (Glarke A., 1975) ტიპიურ შემთხვევაში კი 3%-10%-ია. გამონაკლისია კონ.A, ხორბლის ჩანასახის აგლუტინინი, არაქისის ლექტინები, რომლებიც ნახშირწყლებს საერთოდ არ შეიცავენ. თუმცა, ნანახია, რომ ბიოსინთეზის პროცესში კონ.A და WGA გლიკოზილირებული წინამორბედების სახით ვლინდებიან. რაც შეეხება ნახშირწყლების როლს ლექტინის მოლეკულაში, ზოგიერთი ავტორის ვარაუდით ნახშირწყლოვანი კომპონენტი არ თამაშობს დიდ როლს ლექტინის აქტივობაში (Older K., 1982). ამჟამად მხარს უჭერენ იმ აზრს, რომ ნახშირწყლოვანი კომპონენტი არ მოქმედებს ლექტინის ბიოლოგიურ აქტივობაზე და უფრო დასაშვებად მიაჩნიათ ნახშირწყლოვანი კომპონენტის მიერ მემბრანული ან სეკრეტორული გლიკოპროტეინების კონფორმაციული სტაბილიზაციის შენარჩუნება (Lis P., 1993). ასე მაგალითად, უკანასკნელი მონაცემებით ნახშირწყლოვანი ჯაჭვი ხელს უწყობს აბუსალათინის (*Ricinus communis L.)* ლექტინის რიცინის ნატიური კონფორმაციის შენარჩუნებას, რაც აუცილებელია სამიზნე უჯრედის ციტოზოლში რიცინის ჯაჭვის შესაღწევად (Richardson P. T., 1991, Percin I., 2009).

ლექტინების ამინომჟავური შედგენილობა მეტად განსხვავებულია. ანალიზმა აჩვენა, რომ მრავალი ლექტინის პოლიპეპტიდური ჯაჭვი შედარებით მდიდარია ასპარაგინის მჟავით, სერინით და ტრეონინით, რომლებიც შეადგენენ მასში შემავალი ამინომჟავების 30%-ზე მეტს. რიგი ლექტინების შემადგენლობაში მცირედ ან სრულიად არ გვხვდება გოგირდშემცველი ამინომჟავები. ამავე დროს არსებობენ ლექტინები ცისტეინის მაღალი შემცველობით, რომლებიც მონაწილეობას იღებენ დისულფიდური ხიდაკების წარმოქმნაში. ცილის მესამეული სტრუქტურის ფორმირებისას ასეთი დისულფიდური კავშირების მაღალი შემცველობა ფიტოჰემაგლუტინინში აპირობებს მის სტაბილურობას მაღალი ტემპერატურისადმი, აგრეთვე მდგრადობას პროტეოლიზური ფერმენტებისა და დენატურაციის გამომწვევი აგენტებისადმი (დეტერგენტები, ფუძეები, მჟავები, შარდოვანა).

ამინომჟავურ შემადგენლობაზე დამოკიდებულების მიხედვით ლექტინები შეიძლება დავყოთ 2 ტიპად:

I ტიპი - დამოკიდებულია ამინომჟავურ თანმიმდევრობაზე:

ა) ბეტა პრიზმული ლექტინები (B); ბ) კალციუმ დამოკიდებული ლექტინები (C); გ) ფიკოლინ-ფიბროგენ/კოლაგენ დომენის შემცველი ლექტინები (Fტიპი); დ) ნიორის ან ენძელას ლექტინები (G); ე) ჰიალონ-დამკავშირებელი პროტეინები (H); ვ) იმუნოგლობულინების ოჯახის (I); ზ) ჟოჟობას და მსგავსი ლექტინები (J); თ) ლობიოს თესლის ლექტინები (L); ი) ალფა მონოზიდაზას მონათესავე (M); კ) ნუკლეოტიდ-ფოსფოჰიდროლაზები (N); ლ) რიცინის ლექტინები (R); მ) ხორბლის ღივის აგლუტინინი (WGA).

II ტიპი არ არის დამოკიდებული ამინომჟავურ თანმიმდევრობაზე:

ა) ანექსინები; ბ) პენტრაქსინები, პენტავალენტური დომენით; გ) გლიკანები G-დომენით ალფა დექსტრაგლიკანზე; დ) CD 11b/CD 18 (ბეტა ინტეგრინები CR3) – სოკოვანი გლიკანები და გამოვლენილი C/c NAC ნაშთები გლიკოპროტეინებზე.

ლექტინებში არაორგანული იონების შემცველობა. როგორც მცენარეული, ასევე ცხოველური ლექტინები ხასიათდება ორვალენტიანი მეტალების (Ca^{2+} , Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}) შემცველობით, რომლებიც ერთდროულად რამდენიმე ამინომჟავურ ნაშთს უკავშირდება და ხელს უწყობს ცილის სტრუქტურის სტაბილიზაციას. ზოგიერთი ლექტინის, მაგალითად, კონ.A, ლობიოს, ბარდის ლექტინების ბიოლოგიურ

აქტივობაზე გავლენას ახდენს მათში ორვალენტიანი იონების: Ca^{2+} და Mg^{2+} არსებობა. მათი მოცილებისას მჟავე არეში დიალიზით ან EDTA-ს მეშვეობით ხდება ლექტინის დაშლა სუბერთეულებად და მათი ჰემაგლუტინაციური უნარის დაკარგვა, რაც კარგადაა დემონსტრირებული კონ. A-ს მაგალითზე (Basu D.,1983).

რიგი ცხოველური ლექტინების შემთხვევაში მეტალის იონები უშუალოდ მონაწილეობს ლექტინების ნახშირწყლებთან დაკავშირებაში. ლექტინების ნაწილი (WGA, მრავალი ცხოველური ლექტინი) საერთოდ არ შეიცავს მეტალის იონებს (Луцик М. Д., 1981). ამრიგად, ლექტინების შემადგენლობაში შემავალ მეტალთა იონებს სხვადასხვა ფუნქციური დატვირთვა გააჩნია (Mo Y, 2005).

გამოყოფენ რამდენიმე სტრუქტურულ ქვეჯგუფს (Van Damme, 1998) 1. პარკოსანთა ლექტინები; 2. ერთლებნიანთა მანოზა-დამკავშირებელი ლექტინები; 3. ამარანთინის (*Amaranthus)* ქვეჯგუფი, ამ გვარის თესლებიდან გამოყოფილია ჰომოლოგიური GlNAc - სპეციფიკური ლექტინები; 4. ჯაკალინის ქვეჯგუფი: პურის ხის- (*Artocarpus integrifolia*) ლექტინი და მონათესავე ლექტინები; 5. 2 ტიპის RIP ანუ რიბოსომების მაინაქტივირებელი ცილები (ტოქსიკური ლექტინები), შედგება A (ეფექტომერი-შეიცავს კატალიზურ დომენს) და B (ჰაპტომერი ლექტინური საიტით) ჯაჭვებისაგან. 6. ჰევეინის დომენის შემცველი ქიტინ-დამკავშირებელი ლექტინები: ჰევეინი კაუჩუკის ხის (*Hevea brasiliensis*) ლატექსიდან გამოყოფილი მცირე ზომის (43 ამინომჟავა) ლექტინია, რომელიც განიხილება როგორც ქიტინ-დამკავშირებელი დომენი. არსებობს განსხვავებული სტრუქტურის მქონე ფორმებიც, მაგალითად, პარკოსნების GlNAc-დამკავშირებელი და გოგრისებრთა ფლოემის წვენის ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინები, რომლებიც არ შეიცავენ ჰევეინის დომენს, რძიანასებრთა ლექტინები, ორქიდეების მანოზა-დამკავშირებელი ცილები და სხვ. სტრუქტურული თვალსაზრისით უნიკალურია ტიტას ლექტინი. იგი შედგება 4 იდენტური 28 კდა სუბერთეულისაგან, რომელთაგან თითოეული შეიცავს ორი განსხვავებული დომენის (Man და G GlNAc - სპეციფიკური) ტანდემს.

ლექტინებისათვის დამახასიათებელია ორგანიზმში მრავლობითი მოლეკულური ფორმების (იზოლექტინების) არსებობა, რაც ცილის მეოთხეულ სტრუქტურას უკავშირდება. მცენარიდან მიღებული ლექტინის პრეპარატები ხშირ შემთხვევებში იზოლექტინების რთულ ნარევს წარმოადგენს (Van DamE. J. M., 1998).

დასასრულს, ლექტინთა გენების მოლეკულური კლონირებისა და ანალიზის შედეგად გამოვლენილია ე. წ. ლექტინ-მონათესავე ცილები, რომლებიც ლექტინებთან სტრუქტურულ ჰომოლოგიას ავლენენ, მაგრამ ნახშირწყალ-დამკავშირებელი აქტივობა არა აქვთ, დამკავშირებელი საიტების შეცვლილი სტრუქტურის გამო.

1.2.2. ლექტინების სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ

ნახშირწყლების მიმართ სპეციფიკურობა ლექტინების ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი მახასიათებელია. ფერმენტ გლიკოზიდაზებისაგან განსხვავებით, რომლებიც იწვევენ ნახშირწყლების ქიმიურ გარდაქმნას, ლექტინები შექცევადად უკავშირდებიან გლიკოპროტეინების ნახშირწყლებს. ნახშირწყალ-დამკავშირებელი უბნების ზომები ლექტინის მოლეკულის ზომასთან შედარებით უმნიშვნელოა. უმეტეს შემთხვევაში ლექტინის თითო სუბერთეული შეიცავს ერთ ნახშირწყალ-დამკავშირებელ ცენტრს.

ლექტინების სპეციფიკურობა დამოკიდებულია შაქრების დაბოლოებაზე ან მოცემული ოლიგოსაქარიდის რამოდენიმე მონომერულ ჯგუფზე. მაგალითად კონ.A უკავშირდება გლუკოზასა და მანოზას. შაქრები, რომლებსაც უნარი აქვთ დაუკავშირდნენ ლექტინებს, იყოფა 4 კლასად (Makela O., 1957), იმის მიხედვით თუ როგორი კონფიგურაცია, აქვს მონოსაქარიდს C-3 თუ C-4 ან ოლიგოსაქარიდის მოლეკულის არარედუცირებულ ალდოპირანოზულ ნაწილს:

1) მანოზისა და გლუკოზის მიმართ სპეციფიური; 2) N-აცეტილ-D-გლუკოზამინ-სპეციფიური; 3) გალაქტოზისა და N-აცეტილ-D-გალაქტოზამინის მიმართ სპეციფიკური; 4) L-ფუკოზოსპეციფიური. ცალკე გამოყოფენ სიალ-სპეციფიურ ლექტინებს.

აქედან გამომდინარე ლექტინების დაკავშირება სპეციფიურია, მაგრამ ეს სპეციფიურობა შეზღუდულია. სწორედ ეს ხდის ლექტინს ასე საინტერესოს კვლევებისთვის. მაგალითად კონ. A-ს, რომელიც გამოყოფილია ხმალა ლობიო-*Canavalia ensiformis*-დან, შეუძლია არა მარტო შეასრულოს თავისი ფუნქცია ამ მცენარეში, არამედ შეუძლია გამოიწვიოს აგლუტინაცია ისეთი განსხვავებული უჯრედების და ორგანული ნაერთების, როგორიცაა: ერითროციტები, სიმსივნური

უჯრედები ან გლიკოგენი. ამ ობიექტებს აერთიენებს, მხოლოდ გლუკოზისა და მანოზის ნარჩენების არსებობა. ასეთი სპეციფიკურობის გარეშე, შესაძლოა საერთოდ ვერ მომხდარიყო ლექტინების, როგორც განსაკუთრებული ჯგუფის აღმოჩენა.

ცილასა და ნახშირწყალს შორის ბმა არ არის კოვალენტური, შაქრების ჰიდროფილური ბუნებიდან გამომდინარე, აქ გადამწყვეტ როლს უნდა თამაშობდეს პოლარული ურთიერთქმედება, კერძოდ, წყალბადური ბმები და დიპოლური კავშირები (Hardman K.D. 1976; Becker J.W. 1975).

რიგი ლექტინების მოლეკულებში ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრების გარდა გამოვლენილ იქნა დამოუკიდებლად განლაგებული ალტერნატიული დამკავშირებელი უბნები, რომელთა საშუალებით ლექტინებს შეუძლია არანახშირწყლოვანი ლიგანდების დაკავშირებაც. მაგ, დადგენილია, რომ ConA იკავშირებს ინდოლილ-ძმარმჟავას. ბმა ხორციელდება ლექტინის ჰიდროფობული დაკავშირების უბნით და არ არის დამოკიდებული ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრების დაკავებაზე (Edelman J.M., 1978, Percin I., 2009).

მემბრანული ცილების ოლიგოსაქარიდები, თავის მხრივ წარმოადგენენ ლიგანდებს ლექტინებთან დასაკავშირებლად და იწვევენ სხვადასხვა ეფექტებს მემბრანის ფუნქციონირებისათვის. ამ პროცესში დაკავშირება ნახშირწყლოვან ნარჩენებთან ხდება, განსაზღვრული ლექტინებით. **ლექტინები ოლიგოსაქარიდული სპეციფიურობის მიხედვით დაყოფილია ორ ჯგუფად:**

1) ეგზოლექტინები, რომელთა ინჰიბირება ხდება მონოსაქარიდებით;

2) ენდოლექტინები, რომლებიც ინჰიბირდებიან ოლიგოსაქარიდებით.

თავის მხრივ ეგზოლექტინები იყოფა ობლიგატურ (ინჰიბირდებიან მხოლოდ მონოსაქარიდებით) და ფაკულტატურ (ინჰიბირდებიან ასევე ოლიგოსაქარიდებითაც) ლექტინებად. (Goldstein L. J., 1978; Callager J. I., 1984), ენდოლექტინები იყოფა ჰომოტიპურ და ჰეტეროტიპურ ქვეჯგუფებად. ჰომოტიპური ლექტინები ინჰიბირდებიან ერთი ტიპის ოლიგოსაქარიდებით, ხოლო ჰეტეროტიპური ლექტინები განსხვავებული მონოსაქარიდული ჯაჭვებისაგან შემდგარი ოლიგოსაქარიდებით.

ამჟამად მიღებულია ნახშირწყალ-ცილოვანი ურთიერთქმედების მოდელი, რომლის თანახმადაც მოცემული კომპლექსის სტაბილიზაცია ერთდროულად ხორციელდება ჰიდროფილური, ჰიდროფობული კავშირებით და ვან დერ ვალსის

ძალებით. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ საკითხი ლექტინებისა და ნახშირწყლების ურთიერთქმედების ბუნების შესახებ ამოწურული არ არის.

1.3. ლექტინების ბიოლოგიური აქტივობა

ლექტინების ბიოლოგიური როლი მრავალფეროვანია. ისინი შეიძლება მონაწილეობდნენ: შაქრის ტრანსპორტში, ნახშირწყლების შენახვაში, ზოგიერთი ლექტინი შეიძლება ასოცირდებოდეს სიმბიოზურ რიზობიასთან, იმისთვის, რომ წარმოქმნას ფესვის კვანძები. მათი განსაკუთრებული როლის გამო ათჰეზიასა და აგლუტინაციაში, ლექტინებს მიიჩნევენ მნიშვნელოვან სიმბიოტურ და პათოგენურ აგენტებად მიკროორგანიზმთა და მათი მასპინძლების ურთიერთობაში. მიკრობული ლექტინები შეიძლება თამაშობდეს მნიშვნელოვან როლს ათჰეზიაში (Tian O., 2008).

რამდენიმე ექსპერიმენტული მონაცემი ლექტინებს წარმოაჩენს, როგორც აგლუტინინებს, რომელიც სპეციფიურია სხვადასხვა სისხლის ჯგუფების ერითროციტების მიმართ. მათი მრავალფეროვანი ბიოლოგიური თვისების გამო, ისინი უჯრედულ ბიოლოგიაში გამოიყენება, უჯრედის ზედაპირების სტრუქტურებისა და ფუნქციების გამოსაკვლევად (De Mejia E. G., 2005).

ლექტინები გამოყენებული იქნა, როგორც მატარებლები ქემოთერაპიული აგენტების გადასატანად. ლექტინები მნიშვნელოვანი რეაგენტებია ბაქტერიების, პროტოზოების და სხვა უმაღლესი ორგანიზმების უჯრედის ზედაპირების გამოსაკვლევად. მცენარეული ლექტინების ურთიერთობა მიკროორგანიზმებთან გამოიყენება ბაქტერიების, სოკოების და პროტოზოების კლასიფიკაციაში. ლექტინები გამოიყენება ბაქტერიული უჯრედის კომპონენტების დასახასიათებლად და ბაქტერიოფაგის რეცეპტორების აღმოსაჩენად (Horikawa Y., 2007).

ლექტინების აღმოჩენა და ამ ნაერთებით მეცნიერთა დაინტერესება იმთავითვე უკავშირდებოდა ცხოველური უჯრედების ზედაპირთან მათი განსაკუთრებული ურთიერთქმედების უნარს. ლექტინების მიერ უჯრედების აგლუტინაციის უნარი არ შემოიფარგლება ერითროციტებით. იგი გამოვლენილია სხვა ეუკარიოტული და პროკარიოტული უჯრედების მიმართაც, რომელთა მემბრანებიდან გამოყოფილია ლექტინების მრავალი რეცეპტორი. განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება

ლექტინების უნარს მოახდინოს ამორჩევით ავთვისებიანი სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაცია. (Луцик М.Д., 1981; Thomas, 2004; Tandea A. T., 2016). ლექტინებს შეუძლია უჯრედული ორგანელების აგლუტინაციაც (Shapter, 1990).

მცენარეული ლექტინების ურთიერთქმედება ცხოველურ უჯრედებთან და მათ მიერ გამოწვეული რეაქციები განიხილება, როგორც ლექტინებისა და მემბრანული რეცეპტორების შემთხვევითი კომპლემენტარულობის შედეგი. ლექტინები ინფორმაციული მოლეკულების როლს ასრულებენ და მემბრანის სტრუქტურულ-ფუნქციური ცვლილებების შედეგად განაპირობებენ მთელ რიგ ძვრებს უჯრედში მიმდინარე პროცესებში.

ლექტინების ჰორმონის მსგავსი მოქმედება რიგი ლექტინები უკავშირდება ჰორმონების რეცეპტორებს და ჰორმონების მოქმედების იმიტირებას ახდენს (Van Damme E. J. M., 1998). ასე მაგალითად ჰორმონის, კერძოდ, ინსულინის მსგავსი აქტივობით ხასიათდებიან ხორბლის ჩანასახის WGA ლექტინი, Con A და PHA (Yevdokimova, 2001; Mo Y., 2005). ლექტინის დაკავშირების შემდეგ ხდება მემბრანის სტრუქტურულ-ფუნქციონალური რეორგანიზაცია, რასაც თან ახლავს კლასტერიზაცია და "ქუდის" წარმოქმნა, რომელიც შემდგომ განიცდის ენდოციტოზს. ეს ვლინდება უჯრედის ზომების გაზრდით და მემბრანის განვლადობის ზრდით Na^+, K^+, Ca^{2+}-ის იონებისათვის. ლექტინის თანაობისას ძლიერდება მეტაბოლიტების ტრანსპორტი - გლუკოზის, ამინომჟავების, ნუკლეოტიდების და სხვა. უფრო გვიანდელ ეტაპებზე, ლექტინის რეცეპტორთან დაკავშირების შემდეგ სტიმულირდება ცილის (20 წთ-ის შემდეგ) და ნუკლეინის მჟავების სინთეზი.

ლექტინების მიერ ფერმენტული აქტივობის გამოვლენა. დიდ ყურადღებას იპყრობს პარკოსანთა თესლებიდან გამოყოფილი ლექტინები, რომელთაც α-გალაქტოზიდაზური აქტივობა ახასიათებთ (Dazzo F., 1975; Mellor C., 1981; Hankins R. B., 1980). ჰემაგლუტინაციის თვისება გამოვლენილია ფოსფორილაზას, α-ამილაზას, გალაქტოზიდაზას მოლეკულებში. თანამედროვე შეხედულებით, ნახშირწყალ-დამკავშირებელი უბნები ფერმენტს ეხმარება მისი გლიკოპროტეინული სუბერთეულების ასოციაციაში. ქიმეროლექტინების ტიპის I კლასის მცენარეული ქიტინაზები შედგება, როგორც ჰევეინის ქიტინ-დამკავშირებელ, ასევე ქიტინაზური აქტივობის მქონე კატალიზურ მონაკვეთებს. მსგავსი თავისებურებით ხასიათდება

აგრეთვე RIP 2 ტიპის ტოქსიკური ლექტინები. ისინი ლექტინისა და ფერმენტ N-გლიკოზიდაზას ბუნებრივი კონიუგატებია და ამდენად, ორმაგი ბიოლოგიური ფუნქციის მატარებელ მოლეკულებს წარმოადგენს.

I.3.1. ლექტინების ციტოტოქსიკური მოქმედება

ზოგიერთი ტოქსიკური ლექტინები (რიცინი, აბრინი, დიფტერიის ტოქსინი, მოდესცინი, ბრინჯის ლექტინი, ფითრის ლექტინები) სიმსივნურ უჯრედებთან უშუალო კონტაქტისას ამჟღავნებს ანტიკანცეროგენულ აქტივობას. ყველა უჯრედი, მის ზედაპირზე განლაგებული D-გალაქტოზის ნაშთებით, მგრძნობიარე უნდა იყოს გალაქტოზა სპეციფიკური ტოქსიკური ლექტინებისადმი. ლექტინები იწვევენ სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციასა და აგრეგაციას (De Mejia E. G., 2005). ნანახია, რომ რიცინს, დაბალი კონცენტრაციების ($5X10^{-11}$-$5X10^{-13}$ მოლი) დროს, შერჩევითად შეუძლია გამოიწვიოს სიმსივნური უჯრედების დაღუპვა, მაგრამ უფრო მაღალი კონცენტრაციებისას იგი ციტოტოქსიკურია როგორც სიმსივნური, ასევე ჯანმრთელი უჯრედების მიმართ (Zou L. B., 2005). მიუხედავად ამისა ანტისიმსივნური პრეპარატების სახით მათი გამოყენება ჯერჯერობით ვერ მოხერხდა ძლიერი ანტიგენური და ტოქსიკური თვისებებისა და ნორმალურ უჯრედებზე არასასურველი მოქმედების გამო. ცნობილია, რომ გარკვეული რიცინ-რეზისტენტული სიმსივნური უჯრედები მგრძნობიარეა ფითრის ლექტინების მიმართ (Луцик М.Д., 1981). ფითრის ლექტინის ანტიკანცეროგენული თვისებები დიდი ხანია ცნობილია. ფითრის VAA-1 ლექტინი ხასიათდება ციტოტოქსიკური მოქმედებით ფილტვის კიბოს უჯრედებისადმი (Siegle I., 2001; Tabiasco J., 2002; Ram Sarup Singh, 2016).

ნაჩვენებია, რომ სხვადასხვა სტადიაზე პირველადი და მეტასტაზური პროსტატის სიმსივნეების უჯრედულ ხაზებთან ხდება სხვადასხვა ნახშირწყალ-სპეციფიკურობის მქონე ლექტინების დაკავშირება (Breborowicz J., 1998). ასევე ნანახი იქნა, რომ ადენოკარცინომაზე არსებობს PNA, PSA (ბარდის ლექტინი) და JFA-ს რეცეპტორები (Forsgen B., 1989). ანტიკანცეროგენული მოქმედებით ხასიათდება ხორბლის აგლუტინინიც (WGA).

ონკოლოგიაში ლექტინების გამოყენებას, დიდი ხნის ისტორია არა აქვს და პირველ რიგში, სანამ მის ფართო გამოყენებას დაიწყებენ დიაგნოსტიკასა და თერაპიაში, მან გარკვეული დროის შუალედში, უნდა გაიაროს გამოცდები, კლინიკურ კვლევებში, უსაფრთხოებასა და მისი გამოყენების ეფექტურობაში.

უკვე დღეისათვის ნახშირწყალდამკავშირებელი ცილების საფუძველზე, შექმნილია კომერციული ტესტ - სისტემები ზოგიერთი ონკოპათოლოგიებისთვის, მაგ. AFP-L 3-% ტესტი ჰეპატოცელულარულ კარცინომაზე კომპანია Wako Diagnostics - ში. GP Biosciences Ltd. ლექტინები გამოიყენება სისხლის გასაწმენდათ, კერძოდ მასში მოუმწიფებელი ლიმფის უჯრედების მოსაცილებლად, მწვავე ლეიკოზების დროს. სულ უფრო ახალი და ახალი ჰისტოქიმიური, იმუნოფერმენტული და სხვა სახის ანალიზები, რომლებიც ეფუძნება ლექტინებს, გამოიყენება სამედიცინო პრაქტიკაში. დიდი პოტენციალი აქვს ლექტინების გამოყენებას სიმსივნეების დიაგნოსტიკასა და თერაპიაში.

I.3.2. ლექტინების მიტოგენური აქტივობა

უკანასკნელ წლებში განსაკუთრებული ყურადღება მიიპყრო ლექტინების მიერ მიტოგენური აქტივობის გამოვლენის უნარმა (Gonzalez Pereyra M. L., 2005). ზოგიერთი პარკოსანი მცენარის ლექტინი ავლენს მიტოგენურ აქტივობას ცხოველთა უჯრედების, მაგალითად, ლიმფოციტების მიმართ. პირველი ლექტინი, რომელსაც აღმოაჩნდა მიტოგენური აქტივობა ძუძუმწოვრების უჯრედების მიმართ, იყო ლობიოს (*Phaseolus vulgaris L*) ლექტინი (ფიტოჰემაგლუტინინი - PHA) (Луцик М.Д., 1989). ამჟამად უკვე ცნობილია მიტოგენური აქტივობის მქონე 30-ზე მეტი მცენარეული ლექტინი. ცნობილია, რომ ლექტინები დიფერენცირებულად ასტიმულირებენ T და B ლიმფოციტების პროლიფერაციას.

ლექტინები ასევე ფართოდ გამოიყენება კლინიკურ იმუნოლოგიაში, როგორც კვლევის ინსტრუმენტები. კერძოდ ისინი გამოიყენება ანტიგენ-ანტისხეულის დაკავშირების, ანტიგენის ბუნების და მისი მოქმედების მექანიზმების შესწავლის პროცესებში (Kovatchev D., 1998).

მცენარეულ უჯრედებზე ლექტინების ეფექტები არასრულადაა შესწავლილი. ნაჩვენებია, რომ ბევრი ლექტინი იწვევს კალუსის დაყოფას in vitro. მაგალითად, სოიას ლექტინი ავლენს მიტოგენურ აქტივობას სოიას კალუსის უჯრედების მიმართ, რაც ინჰიბირდება ლექტინის სპეციფიკური მონოსაქარიდით (Howard G., 1977). PHA მიტოგენურია თამბაქოს კალუსის, ქერისა და ბარდის ფესვის ბუსუსების მიმართ (Borrebaeck C., 1989). სამუშაოები ამ მიმართულებით გაძნელებულია მცენარეული უჯრედის კედლის არსებობის გამო.

1.4. ლექტინების გავრცელება და განაწილება მცენარეებში

ლიტერატურული მონაცემებიდან გამომდინარე, დღეისათვის მიღებულია, რომ ლექტინები მოიპოვება პრაქტიკულად ყველა ოჯახის წარმომადგენელში. ფარულთესლოვან მცენარეებში ლექტინების ყველაზე მაღალი შემცველობით გამოირჩევა პარკოსნების ოჯახი. ლექტინებით მდიდარია ასევე ძაღლყურძენასებრთა, რძიანასებრთა, ვარდისებრთა, მიმოზასებრთა, მარცვლოვანთა და სხვ. ოჯახები. მრავალრიცხოვანი ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, ზოგადად ლექტინები გამოვლენილია მცენარის ყველა ორგანოს (თესლები, ფესვები, ღერო, ფოთლები, ნაყოფი, ყვავილი და ძირხვენები) შემადგენლობაში, სასიცოცხლო ციკლის სრულიად განსხვავებულ სტადიებზე. სხვადასხვა მცენარის ორგანოებში ლექტინების შემცველობა, ლოკალიზაცია და კონცენტრაცია ძლიერ განსხვავებულია. მცენარეთა ნაწილში ლექტინების გამოვლენა ზოგჯერ საერთოდ ვერ ხერხდება. ამის მიზეზი შეიძლება იყოს მოცემულ მცენარეში ლექტინების სიმცირე ან მათ გამოსავლენად არაადექვატური მეთოდების გამოყენება ან ორგანიზმის სასიცოცხლო ციკლის განვითარების ხვადასხვა სტადია. რის გამოც გარკვეულ პერიოდებში მათი დაფიქსირება შეუძლებელია. გათვალისწინებულ უნდა იქნას ლექტინის სიცოცხლის ნახევარპერიოდი, ოლიგო და პოლისაქარიდული ინჰიბიტორების არსებობა მცენარეულ ექსტრაქტებში და სხვ. (Rűdiger H., 1984).

როგორც ცნობილია, ლექტინების უმეტესი ნაწილი ლოკალიზებულია მცენარეთა თესლებში. ისინი, ჩვეულებრივ, თესლის საერთო ცილის 0,1-5%-ს შეადგენს, თუმცა, ზოგიერთ თესლში ლექტინები 50%-ზე მეტია (მაგ, ლობიოს სახეობებში), ზოგში კი

რაოდენობრივად უმნიშვნელო მინორულ ცილას წარმოადგენს. თესლის ლექტინები ლოკალიზებულია ლებნებში (პარკოსან მცენარეებში), ენდოსპერმში (აბუსალათინში), ან მხოლოდ ჩანასახით შემოიფარგლება (ერთლებნიან მარცვლოვან მცენარეებში). თესლის გაღივების პერიოდში ციტოპლაზმაში და უჯრედის ზედაპირზე, ადგილი აქვს მათ სეკრეციას გარემომცველ არეში. გაღივებისა და ჩანასახოვანი ზრდის პერიოდში ისინი ვლინდება აქტიურად მზარდ ქსოვილებში (უპირატესად, მიწისქვეშა ნაწილებში) (Clarke A., 1975) თესლის ლექტინების გაქრობა ლებნების შეწოვის პროცესში დასაშვებს ხდის ლექტინების, როგორც სამარაგო ცილების ფუნქციებს (Lamb J., 1983).

გარდა თესლებისა, ლექტინები აღმოჩენილია ფოთოლში, ღეროში, ქერქში, ფესვში, ბოლქვში, ტუბერებსა და ფესურებში, ფესვ-გორგლებში, ყვავილში, ნაყოფში, ფლოემის წვენსა და ნექტარშიც კი. ზოგიერთ პარკოსან მცენარეებში ლექტინები ლოკალიზებულია ფესვის შემწოვი ბუსუსების ზონაში (Dazzo F.B., 1975. Gade W., 1981). როგორც ლიტერატურის მონაცემები გვიჩვენებს, ერთი მცენარის სხვადასხვა ორგანოდან გამოყოფილი ლექტინები სტრუქტურულად მონათესავეა და კოდირდება განსხვავებული, თუმცა, მაღალ-ჰომოლოგიური გენებით (Van Dame 1998).

საინტერესოა ლექტინების განაწილება ორლებნიანთა კლასის სხვა ოჯახების წარმომადგენლებში: ძაღლყურძენასებრთა ოჯახის ლექტინები (კარტოფილის, პომიდორის, ლემას) ხასიათდებიან ნახშირწყლების მაღალი შემცველობით. ლექტინები მცირე რაოდენობით იქნა ნანახი მცენარის ყვავილის სხვადასხვა ნაწილებში, კერძოდ, გვირგვინის ფურცლებში, მტვრიანებში, ბუტკოს ნასკვში, დინგსა და სვეტში. რაც შეეხება ერთლებნიან მცენარეებს, მასში ლექტინების განაწილება ყველაზე კარგადაა შესწავლილი მარცვლოვანთა ოჯახის წარმომადგენლებში, კერძოდ, ხორბალში, ჭვავში, ქერში, ბრინჯში და სხვა. იმუნოციტოქიმიური მეთოდების გამოყენებით დადგენილ იქნა, რომ ლექტინების უმეტესობა ლოკალიზებულია ჩანასახოვან ფესვებში და მათ შემომფენ შალითაში (Becker J.W., 1975). ჩანასახის გარე ზედაპირზე ლექტინების კონცენტრირება შეიძლება მნიშვნელოვან როლს თამაშობდეს სოკოვანი პათოგენებისაგან მცენარეთა თავდაცვით პროცესებში. შესწავლილ იქნა ხორბლის აგლუტინინის შემდგომი განაწილება ახალგაზრდა მცენარეებში და ნაჩვენები იქნა, რომ მათში ზრდის პირველი 34 დღის განმავლობაში ლექტინების შემცველობა კლებულობდა 50%-ით, ამასთანავე ლექტინების 2/3 მოდიოდა

ყლორტების ბაზალურ ნაწილზე, რომელიც როგორც ცნობილია, წარმოადგენს ზრდის ყველაზე აქტიურ უბანს. ნორჩ მოზარდ გვერდით ფესვებისაგან განსხვავებით, ფოთლებში ლექტინები არ იქნა გამოვლენილი.

ლექტინები ნანახია ასევე შიშველთესლოვნებშიც. მაგ: ევროპული სოჭის ქერქიდან გამოყოფილია ორი A1 და A2 ლექტინები (Rudiger, 1984).

ლექტინების რაოდენობრივი შემცველობის დინამიკა სხვადასხვა მცენარეების ონტოგენეზში განსხვავებულია და ერთიან კანონზომიერებას არ ავლენს. აღმონაცენის განვითარებისას მის ყველა ნაწილში ლექტინების შემცველობის მკვეთრი შემცირება ხდება. ყვავილობის მომენტში მცენარის მიწისზედა ნაწილებში ლექტინები მთლიანად ქრება. ყვავილობის დამთავრების შემდეგ ლექტინები გროვდება ახალ ბოლქვებში (Van Dame, 1990). ლიტერატურული მონაცემების მიხედვით, რიგ მცენარეებში ლექტინების შემცველობა მაქსიმალურია ინტენსიური ზრდის პერიოდში და სიბერის სტადიაზე ქრება. სხვა შემთხვევაში, ლექტინები, პირიქით, მათი სინთეზი იწყება ზრდის შენელებისას და მაქსიმუმს აღწევს ზრდის დამთავრების შემდეგ. ამრიგად, მცენარეთა ორგანოებსა და ქსოვილებში ლექტინების განაწილების შესწავლა გვაძლევს საფუძველს დავასკვნათ, რომ: 1) ლექტინებს შეიცავს ყველა ორგანიზმი. ისინი ნანახია მცენარის ყველა ორგანოში. კლასიკური ჰემაგლუტინაციური ლექტინები განსაკუთრებით მაღალ კონცენტრაციებში ვლინდება სამარაგო ორგანოებში (თესლები, ბოლქვები, ტუბერები და სხვ.), ასევე აქტიურად მზარდ და ფუნქციონირებად ქსოვილებში. 2) ლექტინების ექსპრესია ხდება მცენარის სხვადასხვა ნაწილში განვითარების სხვადასხვა სტადიაზე და ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში ასრულებენ განსაზღვრულ ფუნქციებს. 3) გამოვლენილია მსგავსება განსხვავებული სახეობების (ძირითადად ერთი ოჯახის, მაგ: პარკოსნების ფარგლებში) სხვადასხვა ორგანოებში ნანახ ლექტინებს შორის, მიუხედავად ამისა, აღსანიშნავია თითოეული სახეობის, ორგანიზმისა თუ ქსოვილის ლექტინური სპექტრის ჰეტეროგენულობა და უნიკალურობა.

ამრიგად, ლექტინების განაწილების შესწავლამ მცენარეთა ორგანოებსა და ქსოვილებში კიდევ ერთხელ დაადასტურა, რომ ლექტინები ცილების მეტად მობილური ჯგუფია, თუმცა, უნდა აღინიშნოს, რომ არსებული მონაცემები არ იძლევა სრულ წარმოდგენას მცენარეში ამ ცილების შესაძლო ფიზიოლოგიური როლის შესახებ. ლექტინების გამოყოფისა და შესწავლის მეთოდების შემდგომი დახვეწა ხელს შეუწყობს

მრავალი ახალი ლექტინის აღმოჩენასა და მათი განაწილებისა და ბიოლოგიური როლის სრულყოფილ შესწავლას.

1.5. მცენარეული ლექტინების ენდოგენური ლიგანდები

ლექტინების ბიოლოგიური როლისა და ფუნქციონირების მექანიზმების გაგებისათვის მნიშვნელოვანი ინფორმაციის მოწოდება შეუძლია მათი ენდოგენური ლიგანდების გამოვლენასა და შესწავლას. მცენარეული ლექტინების ენდოგენური ლიგანდების შესახებ ცოტა რამ არის ცნობილი.

ლექტინებთან დამკავშირებელი ცილები მკვეთრად განსხვავდებიან ლექტინებისაგან მოლ. მასებით, ამინომჟავური შედგენილობითა და ცხოველთა თუ ადამიანის უჯრედებზე ზემოქმედებით, მათ არ გააჩნიათ ერითროციტების აგლუტინაციის თვისება. თუმცა, ლექტინების მსგავსად შეიძლება მოქმედებდნენ ლიმფოციტებზე და იწვევდნენ მიტოზების სტიმულირებას (Gensera, 1979; Gebauer, 1982) არსებული მონაცემების მიხედვით, გარდა გლიკოპროტეინებისა, ლექტინთა ენდოგენური ლიგანდების როლს შეიძლება ასრულებდეს გლიკოლიპიდები და პოლისაქარიდები (Sanagran G. G., 1984).

1.6. ლექტინების ფიზიოლოგიური როლი მცენარეებში

თანამედროვე ბიოლოგიის ერთ-ერთ აქტუალურ საკითხს წარმოადგენს ლექტინების ფიზიოლოგიური როლის დადგენა. ლექტინების მიერ გამოვლენილი ბიოლოგიური აქტივობის საფუძველზე მათი ფუნქციების შესახებ ბევრი ვარაუდი არსებობს, რომლებიც ჯერ კიდევ სრულად ახსნასა და დასაბუთებას საჭიროებს. ნახშირწყლებთან სპეციფიკურად დაკავშირების თვისება უნდა განსაზღვრავდეს ლექტინების უშუალო მონაწილეობას ბიოლოგიური ამოცნობის ფუნდამენტურ პროცესებში ცოცხალი ორგანიზმების რთული სტრუქტურულ-ფუნქციური ორგანიზაციის სხვადასხვა დონეზე.

1.6.1 ლექტინების როლი სიმბიოზში

ცნობილია, რომ სიმბიოზი წარმოადგენს მრავალსაფეხუროვან პროცესს, რომელიც მოიცავს მცენარის ფესვებზე ბაქტერიის მიმაგრებას, ინტერნალიზაციას და შემდგომ კოჟრების წარმოქმნას. ვარაუდს ლექტინების სიმბიოზში მონაწილეობის შესახებ, საფუძველი ჩაეყარა იმ ფაქტზე დაყრდნობით, რომ *Phaseolus vulgaris* თესლიდან მიღებული ლექტინი უკავშირდებოდა *Rhizobium phaseoli*-ის შტამს (Hamblin J.,1973; Brewin N. J.,1991). გამოითქვა ვარაუდი, რომ ფესვის ლექტინის მიერ რიზობიუმის ამოცნობა წარმოადგენს საწყისს ეტაპს აზოტფიქსაციურ სიმბიოზში. დადგენილ იქნა კორელაცია რიზობიუმის შტამებთან მასპინძელი მცენარის ლექტინების დაკავშირებასა და ამ შტამების მიერ მცენარის ინფიცირებას შორის (Diaz C., 1986). ლიტერატურაში განხილულია სიმბიონტებს შორის ლექტინ-რეცეპტორული ურთიერთქმედების რამდენიმე მოდელი: ორიგონალური მოდელის თანახმად ლექტინი ასოცირებულია ფესვის გარე ზედაპირზე და ამოიცნობს ბაქტერიული უჯრედის ზედაპირის ნახშირწყლოვან კომპონენტებს ან *Rhizobium*-ის ზედაპირიდან გამოთავისუფლებულ ცალკეულ მოლეკულებს. ალტერნატიული მოსაზრების თანახმად, პარკოსანთა ლექტინები წარმოქმნიან ხიდაკებს მცენარეული და ბაქტერიული უჯრედის ზედაპირულ რეცეპტორებს შორის და ამრიგად ქმნიან ჯვარედინ კავშირებს პატრონ მცენარესა და დამასნებოვნებელ ბაქტერიებს შორის (Rudiger H., 1984).

1.6.2. ლექტინების როლი განაყოფიერებაში

უჯრედების ამოცნობის შესანიშნავ მაგალითს წარმოადგენს განაყოფიერების მოვლენა. ძუძუმწოვრებში განაყოფიერებისათვის აუცილებელ პირობას წარმოადგენს სპეციფიკური ამოცნობის პროცესები გამეტებს შორის, რასაც საფუძვლად უდევს ძუძუმწოვრების კვერცხუჯრედის ექსტრაუჯრედული გარსის ოლიგოსაქარიდებსა და სპერმის ნახშირწყალ-დამკავშირებელ ცილებს შორის ურთიერთქმედება (Lis. H., 1993). უმაღლეს მცენარეებში ანალოგიურ მოვლენას წარმოადგენს დამტვერვა, რომელიც ემყარება ყვავილის მტვერსა და ბუტკოს შორის სპეციფიკურ ურთიერთქმედებებს. აღმოჩნდა, რომ ლექტინები მონაწილეობას ღებულობენ მტვრის მარცვლის ზედაპირზე

არსებული გლიკოპროტეინების ან ცილების ურთიერთქმედებაში დინგის ან სვეტის უჯრედების ზედაპირზე არსებულ კომპლემენტარულ მაკრომოლეკულებთან (Голинская Е. Л., 1979). ამგვარად განაპირობებენ დინგსა და მტვრიანას შორის ურთიერთშეთავსებადობის შეცნობას (რეკოგნიციას). კერძოდ, შეთავსებადობისას მტვრიანა უკავშირდება დინგს, ძლიერდება მტვრიანების განვლადობა სამტვერე მილში და ჩქარდება განაყოფიერება. შეუთავსებადობისას მილში მტვრიანების განვლადობა კავდება ლექტინებით, აღინიშნება სპეციფიკური კოჟრების ინტენსიური წარმოქმნა და მტვრიანებთან ერთად მცენარიდან დაკოჟრებული ქსოვილის მოცილება (Голинская Е.Л., 1976).

1.6.3. ლექტინების სამარაგო ფუნქცია

ლექტინების აკუმულირება ძირითადად სამარაგო ორგანოებში ბადებს აზრს, რომ მცენარეები თავისი აზოტოვანი მარაგის ნაწილს აგროვებენ ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცილების სახით, რომლებიც შეიძლება შემდგომში გამოიყენონ როგორც პასიური დამცველობითი ცილები (Peumans W., 1995). ლექტინებისათვის სამარაგო ფუნქციის მიკუთვნება დაკავშირებული იყო იმ გარემოებასთან, რომ მრავალი პარკოსანი და არაპარკოსანი მცენარის თესლში სხვა სამარაგო ცილებთან ერთად გამოავლინეს ლექტინების არსებობაც. მაგ., *Vicia faba*-ს, *Pisum sativum*-ის, *Phaseolus vulgari*-ის თესლების ფრაქციონირებისას ლექტინების ლოკალიზაცია გამოვლინდა ლებნების ცილოვან სხეულაკებში.

ლექტინების სამარაგო ფუნქციის სასარგებლოდ მეტყველებს ის ფაქტიც, რომ ლექტინების ყველაზე დიდი რაოდენობა გამოვლენილი იყო მომწიფებულ თესლებში, ხოლო გაღივების შემდეგ ლექტინის რაოდენობა თესლში სწრაფად მცირდებოდა. სავარაუდოთ თესლის ლექტინები შეიძლება მონაწილეობდეს თესლის მომწიფებისას სამარაგო ცილების შეფუთვაში (Van Damme J. M., 1990). სამწუხაროდ, არაფერია ცნობილი ამ ცილოვანი მოლეკულების შემდგომი ბედის შესახებ. არსებობს ვარაუდი, რომ მათი დაშლა ხდება ამინომჟავებამდე, ან შემდგომში ისინი გარდაიქმნებიან მონათესავე მოლეკულებად, რომელთაც შეუძლიათ სხვა ფუნქციის შესრულება.

სავარაუდოა, რომ ლექტინების აკუმულირება სამარაგო ორგანოებში დაკავშირებულია ნივთიერებათა ფონდის წარმოქმნასა და მის შენახვასთან (დაცვასთან). ცილოვან სხეულაკებს შესაძლოა ჰქონდეთ ასევე ლექტინების შიდაუჯრედული ტრანსპორტის ფუნქცია და ასევე დიდი ალბათობით მიკროორგანიზმებისაგან თავდაცვის ფუნქციაც.

1.6.4. ლექტინების როლი ნახშირწყლების ტრანსპორტში, დაგროვებასა და იმობილიზაციაში

ლექტინების ნახშირწყლების ტრანსპორტში მონაწილეობაზე, მცენარის ფლოემის საშუალებით, მოწმობს ლექტინების რაოდენობის მკვეთრი გადიდება მრავალწლოვანი მცენარეების ქერქში, გაზაფხულზე მცენარეული წვენების მოძრაობისას (Hamblin J., 1993).

ლექტინები შესაძლოა მოქმედებდნენ, როგორც კოლენჰიდრატ-ფიქსატორები ან ნახშირწყალ-დამჭერები და ამდენად, ხელს უწყობდნენ ნახშირწყლების ტრანსპორტსა და მათ იმობილიზაციას თესლებში (Reber S., 1974; Sabnis D., 1978). ამ მოსაზრებას აძლიერებს ზოგიერთი მცენარის ფლოემაში ლექტინების გამოვლენა, თუმცა ჯერ არ არის ნანახი კავშირი ფლოემის ლექტინთა სპეციფიკურობასა და ფლოემაში ტრანსპორტირებულ შაქრებს შორის. ფლოემის ლექტინი შეიძლება ამაგრებდეს P-ცილის ფილამენტებს საცრისებრი მილების პლაზმური მემბრანის გლიკოპროტეინებზე ან გლიკოლიპიდებზე (Rajindar S., 1981).

1.6.5. ლექტინების უჯრედშიდა ფუნქციები

მცენარეულ უჯრედებში ლექტინური სისტემების ფუნქციონირების მექანიზმების შესახებ მონაცემები მცირერიცხოვანია. სხვადასხვა ბიოლოგიურ პროცესებში მონაწილე შიდაუჯრედული ლექტინური სისტემების არსებობაზე მიუთითებს ლექტინების გამოვლენა სუბუჯრედული სტრუქტურების მემბრანებში (ენდოპლაზმურ რეტიკულუმში, გოლჯის კომპლექსში, მიტოქონდრიებში (Bowels D., 1976), პლაზმალემაში, ბირთვის გარსში, პლასტიდებში (Jeffree C. E., 1981), ვაკუოლში

(Spilarto S. P., 1996). მაგ. ლექტინები გამოვლენილია ბირთვის მემბრანაში, კერძოდ კი ფორების კომპლექსში. ისინი შესაძლოა მონაწილეობდნენ ბირთვულ-ციტოპლაზმურ ტრანსპორტში. თვით ბირთვში გამოვლენილი ლექტინები მონაწილეობენ გლიკოპროტეინების ტრანსპორტში და გლიკოზირებული ფერმენტების. მცენარეულ უჯრედებში, არაენდოგენური ლექტინებისა და მათი ლიგანდების ურთიერთქმედების შესწავლის საფუძველზე ნავარაუდევია მცენარეული ლექტინების ფუნქციონალური როლი უჯრედის შიგნით. მაგ., შაქრის ჭარხლის ძირხვენის უჯრედებში მიტოქონდრიების მემბრანულ ლექტინებზე ენდოგენური ციტოპლაზმური გლიკოპეპტიდის მოქმედების შესწავლისას დადგინდა, რომ ლიგანდ-რეცეპტორული ურთიერთქმედება იწვევს ჟანგვისა და ფოსფორილირების პროცესების გამიჯვნას. ამის საფუძველზე მკველარებმა გამოთქვეს ვარაუდი, რომ ციტოზოლ-მიტოქონდრიული ურთიერთქმედების რეგულაციაში და შესაბამისად, მიტოქონდრიების ფუნქციურ აქტივობაში მონაწილეობს ლიგანდ-რეცეპტორული სისტემა, რომლის ერთ-ერთი კომპონენტი (ლექტინი) ლოკალიზებულია მიტოქონდრიის გარეთა მემბრანაზე და ასრულებს რეცეპტორის ფუნქციას, ხოლო მეორე (გლიკოპეპტიდი) ლოკალიზებულია ჰიალოპლაზმაში და წარმოადგენს მის ლიგანდს. შაქრის ჭარხლის მზარდი ძირხვენას პარენქიმული უჯრედების პლაზმალემაში გამოვლენილი საქაროზა-სპეციფიკური ლექტინის შემცველობა, კორელირებდა ძირხვენის უჯრედებში შაქრის დაგროვების სიჩქარესთან. ნავარაუდევი იქნა ამ ლექტინის მონაწილეობა შაქრის დაგროვების მექანიზმებში, კერძოდ, საქაროზის ტრანსპორტში უჯრედშიგნით, ვაკუოლებში შემდგომი აკუმულაციის მიზნით [Алексидзе Г.Я., 1983).

ფერმენტული (გალაქტოზიდაზური) აქტივობის მქონე ხსნადი ლექტინები (ძაძას, ლობიოს, სოიას, ცერცვის და სხვ), სავარაუდოდ, მონაწილეობენ უჯრედშიდა ნახშირწყლოვანი ცვლის პროცესებში (Jackson S. P., 1988).

ტრიტიკალეს ფოთლის ქლოროპლასტების თილაკოიდებში ლექტინური აქტივობა ასოცირებული აღმოჩნდა ფოტოსისტემა I-ის რეაქციულ ცენტრთან (P_{700}). პიგმენტ-ლექტინური კომპლექსი-1 (პლკ-1), როგორც მემბრანული რეცეპტორი, სპეციფიკურად იკავშირებს კალვინის ციკლის წამყვან გლიკოფერმენტს რიბულოზობისფოსფატ-კარბოქსილაზას და იწვევს მისი აქტივობის სტიმულირებას (Алексидзе Г.Я., 1991). რაც შეეხება ქლოროპლასტის გარე მემბრანის ლექტინებს, მათი

ფუნქციები შეიძლება იყოს ციტოპლაზმური გლიკოპროტეინების შერჩევითი ტრანსპორტი ქლოროპლასტის შიგნით და/ან ციტოპლაზმური სიგნალების გატარება, რითაც რეგულირდება ქლოროპლასტების ფუნქციონალური აქტივობა (Алексидзе Г. Я., 1991).

ლექტინების მიერ უჯრედთა მიტოგენური სტიმულირების განსაკუთრებული უნარი მცენარეულ სისტემებშიც იქნა გამოვლენილი. ნაჩვენებია, რომ ბევრი ლექტინი მონაწილეობს in vivo უჯრედულ დაყოფასა და ზრდის პროცესების რეგულაციაში. ბევრი ლექტინია აღმოჩენილი მუხლთშორისებში და აქტიურად მზარდ ნაწილებში. გამოყოფილია და ნაწილობრივ დახასიათებულია ლექტინი, რომელიც ასტიმულირებს მტვრის მარცვლების ზრდას. ნაჩვენებია ზოგიერთი ლექტინის გენების ექსპრესია მერისტემულ უჯრედებში. ხორბლის, ჭვავისა და ბრინჯის ლექტინების შესწავლის საფუძველზე ნავარაუდევი იქნა, რომ თესლის ლექტინები აუცილებელია ამ მცენარეთა ჩანასახოვანი ღერძის ფორმირებისათვის. ნაჩვენებია, რომ სიმინდის მზარდ აღმონაცენში ლექტინური აქტივობის გაძლიერება ემთხვეოდა უჯრედთა აქტიური მიტოზური დაყოფის დაწყებას, რაც მიუთითებს ამ პროცესების მჭიდრო ურთიერთკავშირზე (Лепёхина Е. А., 1986).

კრისტალოგრაფიული ანალიზით დადგენილია, რომ გარკვეული ტიპის ლექტინებს ცილის ზედაპირზე გააჩნიათ ჰიდროფობული უბანი, რომლის საფუძველზე ნავარაუდევი იქნა ლექტინების შესაძლო მონაწილეობის შესახებ უჯრედის კედლის გაჭიმვით ზრდის რეგულაციაში, მცენარის ზრდის მარეგულირებელ ჰორმონებთან ურთიერთქმედების გზით (Kauss H., 1974). განსაკუთრებული ინტერესი გამოიწვია მაშა-ლობიოს აღმონაცენების უჯრედის კედლებთან არაკოვალენტურად ასოცირებული ლექტინების აღმოჩენამ. წამოყენებულ იქნა ჰიპოთეზა, რომ ლექტინები ქმნიან არაკოვალენტურ ჯვარედინ კავშირებს უჯრედის კედლის შემადგენელ კომპონენტებს შორის და მონაწილეობენ აუქსინის მოქმედებით უჯრედის კედლის გაჭიმვით ზრდაში

ამრიგად, ზემოთ მოყვანილი მონაცემები გარკვეულწილად მიუთითებენ ლექტინების მონაწილეობაზე მცენარეული უჯრედის დაყოფასა და ელონგაციაში.

1.6.6.ლექტინების როლი ფიტოიმუნიტეტში

ცოცხალ ორგანიზმთა გამძლეობა სხვადასხვა დაავადებების მიმართ, რომელიც ვლინდება მოცემული დავადების გამომწვევთან უშუალო კონტაქტის დროს, იმუნიტეტის სახელითაა ცნობილი. ადამიანის და ცხოველთა იმუნიტეტის წარმატებულმა კვლევებმა, საფუძველი ჩაუყარა ფიტოიმუნიტეტსაც, რომელიც პარაზიტისა და მცენარის ურთიერთდამოკიდებულებას ეფუძნება.

მიუხედავათ იმისა, რომ დღეს მსოფლიოში უდიდესი ძალისხმევაა და თანხებია მიმართული სასოფლო-სამეურნეო მნიშვნელობის მქონე კულტურების დაცვისათვის, მაინც დიდ პრობლემას წარმოადგენს მოსავლიანობის გაზრდა და მათი დაცვა სხვადასხვა დაავადებების და მავნებლებისაგან, ამიტომ ფიტოიმუნიტეტის შესწავლის ბიოქიმიური მექანიზმები ერთ-ერთი პრობლემატური და ჯერ კიდევ შეუსწავლელია.

არსებობს მცენარეთა თავდაცვითი რეაქციის მრავალნაირი მექანიზმი მტკიცებულებისა და ვარაუდების დონეზე. მაგალითად ფენოლური ნაერთების ჟანგვითი პოლიმერიზაცია ლიგნინის წარმოქმნით, რომელიც ილექება მცენარეული უჯრედის კედელში და ხელს უშლის მიკროორგანიზმების უჯრედში შეღწევას. მექანიკური ბარიერი ეპიდერმისის ზედაპირზე კუტინის არსებობით განისაზღვრება და ხელს უშლის პათოგენის შეღწევას უჯრედის შიგნით. სუნთქვის ინტენსივობის მომატება და ენერგეტიკული ცვლის გაძლიერება, რომელთა მიზანს წარმოადგენს მცენარის თავდაცვითი რეაქციების უზრუნველყოფა, ენერგიითა და პლასტიკური მასალებით. მრავალი ფენოლური ნაერთის ჟანგვითი წინამორბედის უნარი მოახდინონ ფერმენტული სისტემის არასპეციფიკური ინჰიბირება. ნავარაუდევია, რომ მცენარეულ პეროქსიდაზებს შეუძლიათ პათოგენური ტოქსინების უგულველყოფა, მცენარის არამდგრად ფორმებს მემბრანებზე აქვთ რეცეპტორული უბნები, რომლებსაც უკავშირდება ტოქსინი, მაშინ როდესაც მდგრადი მცენარეები, დაკავშირების ასეთ უბნებს მოკლებული არიან, მცენარეში არსებობს ცილოვანი ბუნების მაღალსპეციფიკური ინჰიბიტორები, რომლებსაც აქვთ უნარი პათოგენების პროტეოლიტური ფერმენტების ინჰიბირებისა და ბოლოს მონაცემები ცხადყოფენ, ლექტინების მონაწილეობას ფიტოიმუნიტეტის პროცესებში. ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია, რომ ლექტინების ბიოლოგიური როლი ეხება, მათ

უჯრედშორის ურთიერთქმედებებს მოლეკულებისა და უჯრედების გამოცნობის პროცესებში, დამცველობით ფუნქციას და მათ მონაწილეობას უჯრედშიდა ტრანსპორტში (Sakeena Q., 2013).

1.6.7. ლექტინების როლი მცენარეთა თავდაცვით მექანიზმებში

სამეცნიერო ლიტერატურაში არსებობს მრავალრიცხოვანი გამოკვლევები, სადაც დადასტურებულია ლექტინების მონაწილეობა პათოგენებისაგან მცენარეთა დაცვით რეაქციებში როგორიცაა: 1. მცენარეული უჯრედის კედლის მექანიკური თვისებების გაძლიერება-განმტკიცება; 2. ფიტოალექსინების სინთეზი; 3. პათოგენეზთან დაკავშირებული ცილების სინთეზი; 4. პროტეაზ-ინჰიბიტორების წარმოქმნა; 5. ლიგნიფიკაცია; 6. ზოგიერთ მცენარეულ სახეობაში მაჰიდროლიზებელი ფერმენტების სინთეზი; 7. ნეკროზული რეაქციები (Koo G. C., 2002; Petnual P., 2010).

მცენარეული ლექტინების დამცველობითი როლის არაპირდაპირ მაჩვენებელს წარმოადგენს მათი საოცარი მდგრადობა გარემოს არაოპტიმალურ პირობებში: ლექტინების უმრავლესობა სტაბილურია pH-ის ფართო საზღვრებში, მდგრადია მაღალი ტემპერატურისადმი და რეზისტენტულია ცხოველური და მწერების პროტეაზების მიმართ. ამასთანავე მცენარეული ლექტინების სპეციფიკურობის მნიშვნელოვანი თავისებურებაა მაღალი აფინურობა უცხო გლიკანებისადმი. კერძოდ, მათი დიდი ნაწილი გაცილებით მაღალ აფინურობას ავლენს ცხოველური ან მიკროორგანიზმული გლიკოკონიუგატების რთული ოლიგოსაქარიდული ჯაჭვების მიმართ, ვიდრე ტიპიური მცენარეული ნახშირწყლებისადმი. მაგ., მცენარეული ქიტინ-დამკავშირებელი ლექტინები ამოიცნობენ სოკოს უჯრედის კედლის და უხერხემლოთა გარეგანი ჩონჩხის ტიპიურ პოლისაქარიდს. სიალ-დამკავშირებელი მცენარეული ლექტინების *(Maakia amurensis, Sambucus ebulus, viscum album)* სპეციფიკური ჰაპტენი - სიალის მჟავა ცხოველური გლიკოპროტეინების ძირითად ნახშირწყლოვან კომპონენტს წარმოადგენს და მცენარეებში არ გვხვდება (Van Damme E. J. M., 1998). ნაჩვენებია ზოგიერთი პარკოსნის თესლის ლექტინის ურთიერთქმედება მურამინის მჟავასთან რომელიც შედის ბაქტერიების უჯრედის კედლის შემადგენლობაში (Ayouba A., 1994). ზემოაღნიშნულის საფუძველზე გამოითქვა ვარაუდი, რომ უცხო ორგანიზმების

ზედაპირულ გლიკოკონიუგატებთან ურთიერთქმედების გზით მცენარეული ლექტინების დიდი ნაწილი, შესაძლოა, მონაწილეობს პოტენციური პათოგენებისა და მავნებლებისაგან მცენარეთა დაცვაში. ლექტინების დამცველობითი როლის შესახებ ვარაუდს ადასტურებს იმ ექსპერიმენტების შედეგებიც, სადაც ნაჩვენებია თესლის ლექტინების სეკრეცია გარემომცველ არეში. თესლის გაღივების პროცესში ლექტინები შიდა უბნებიდან ტრანსპორტირდება გარემოში და ახორციელებს პოტენციური პათოგენებისაგან დაცვას (Repon K. S., 2014).

მცენარეული ლექტინები შეიძლება მონაწილეობდნენ პათოგენური მიკროორგანიზმებით მცენარის ინფიცირების დროს მცენარის სპეციფიკური დაცვითი რეაქციების ფორმირებაში. უჯრედშორისი კონტაქტი (ლექტინ-ნახშირწყლის ურთიერთქმედების დონეზე) მდგრადობის არასპეციფიკური შიდაუჯრედული მექანიზმის ჩართვის ინიცირებას ახდენს. მაგალითად, დადგენილია, რომ ინფიცირების საპასუხოდ კარტოფილში იზრდება ჰიდროქსიპროლინით მდიდარი ლექტინის შემცველობა. იგი ახდენს *Pseudomonas solanacearum* ავირულენტური შტამების იმობილიზაციას უჯრედის კედელზე (Sequera L., 1977; Gilca M., 2010). გამორიცხული არ არის ჰიდროლაზური აქტივობის მქონე ლექტინების უშუალო მონაწილეობა ოლიგოსაქარინების გამოთავისუფლებაში. ასეთი პოლიფუნქციურობა ლექტინებისათვის დამახასიათებელია (Семенов И. Л., 1985; Любимова Н. В.,1985).

ექსპერიმენტებში შესწავლილია ლექტინების დაკავშირება სხვადასხვა სოკოებთან და მათ მიერ სოკოების ზრდის ან გაღივების ინჰიბირების უნარი. ნაჩვენებია, რომ ხორბლის ჩანასახის აგლუტინინი (WGA) აკავებს სოკო *Trichoderma viride*-ს და *Fusarium solani*-ს ზრდას. როგორც გაირკვა, ხორბლის ჩანასახის ლექტინი გროვდება სოკოს მიცელიუმებში, უკავშირდება ქიტინს და თრგუნავს მიცელიუმების ზრდას და იცავს მცენარეს ინფექციისაგან (Mirelman D., 1975; Rajindar S., 1981). ასევე მც. *Parbitis nil*-ის თესლებიდან გამოყოფილ ლექტინს ახასიათებს ანტიმიკრობული აქტივობა ფიტოპათოგენური სოკოების მიმართ (Koo G. C., 2002).

დადასტურებულია, რომ ლექტინები იწვევენ პათოგენური ბაქტერიებისა და სპორების აგლუტინაციას, თრგუნავენ სასიცოცხლო პროცესებს და მათ გაღივებისა და გავრცელების უნარს უკარგავენ (Rudiger H., 1984; Horikawa Y., 2007). ლექტინების დაცვითი ფუნქცია დადგენილ იქნა აგრეთვე გოგრის მაგალითზე. გოგრის ექსუდატში

ლექტინის ინტენსიური მატება აღინიშნა გოგრის კანის ბაქტერიული დაზიანებისას. პარკოსანთა თესლის ლექტინები იცავენ თესლებს და კერძოდ, თესლის კანს ბაქტერიული დაზიანებისაგან.

თეთრი თუთის (*Morus Alba L.*) ფოთლებიდან გამოყოფილია N-გლუკონეირამინის მჟავა სპეციფიკური MLL-1 და MLL-2 ლექტინები. ნანახია მათი ანტიბაქტერიული მოქმედება P. Syringae pv. Mori- ის მიმართ, რომელიც წარმოადგენს თუთის ხის ფოთლების სპეციფიკურ პათოგენს. MLL-1 იწვევს ამ პათოგენის აგლუტინაციას ბაქტერიის ზრდის ექსპონენციალურ ფაზაში (Ratanapo S., 2001).

მცენარეთა თესლებსა და ფესვებში აკუმულირებული ლექტინები, შეიძლება მოქმედებენ როგორც `ანტისხეულები ნიადაგის ბაქტერიებისა და სოკოების წინააღმდეგ და ახდენენ პათოგენის იმობილიზაციას მცენარე-პათოგენის ურთიერთობის საწყის ურთიერთ ამოცნობის ეტაპზე. ასეთი ლექტინები გამოვლენილია მაინფიცირებელი აგენტების შეჭრის პოტენციურ უბნებში: ჩანასახის ზედაპირზე, თესლის კანში, ფესვებში (Pistole G., 1981; Lehmann H. S., 2004).

მსგავსი ტიპის სამუშაოებით დადასტურდა ლექტინების დამცველობითი ფუნქცია ვირუსული დაავადებების მიმართ. კერძოდ, 2 RIP ტიპის ლექტინები, ავლენენ ინჰიბიტორულ აქტივობას მცენარეული ვირუსების მიმართ. ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, მანოზოსპეციფიური ლექტინი მნიშვნელოვან ფიზიოლოგიურ როლს უნდა თამაშობდეს, ვირულენტური შტამებისაგან ძუძუმწოვრების ორგანიზმის, დაცვის მექანიზმებში. კერძოდ კი - ადამიანის სისხლის შრატის მანოზოსპეციფიური ლექტინი კომპლემენტის თანაობისას ერთვება E. coli K12 და E. coli K13–ის ბაქტერიულ მოქმედებაში (Balzarini J., 2004).

ჯერ კიდევ 1976 წელს გამოითქვა მოსაზრება მწერებისაგან თავდაცვის მექანიზმებში მცენარეული ლექტინების შესაძლო ეკოლოგიური როლის შესახებ. ეს მოსაზრება ემყარებოდა იმ ფაქტს, რომ ლობიოსა და სხვა პარკოსნებიდან გამოყოფილი ლექტინები - ფიტოჰემაგლუტინინები, ამჟღავნებდნენ ინსექტიციდურ თვისებას. უკანასკნელი მონაცემებით, ანალოგიური მოქმედება გააჩნია ხორბლის აღმონაცენის, კარტოფილის ტუბერის, ბარდის, ლემას, თუთავაშლას, ბრინჯის, ჭინჭრის ქიტინ-დამკავშირებელ ლექტინებს. ნანახია, რომ *Phaseolus acutifolius*-ის თესლის ლექტინი ტოქსიკურია ხოჭოს მიმართ.

ამრიგად, მრავალრიცხოვანი გამოკვლევების შედეგები პირდაპირ ან არაპირდაპირ მიუთითებს ლექტინების მონაწილეობაზე პათოგენური ბაქტერიების, ვირუსების, სოკოებისა და მწერებისაგან მცენარეთა დამცველობით რეაქციებში. ლექტინების როლი მცენარეთა დამცველობით მექანიზმებში ინტენსიურად შეისწავლება.

1.6.8. მცენარეული ლექტინების ანტივირუსული აქტივობა

ზემოთ აღწერილი 2 RIP-ტიპის გამოკლებით არც ერთი სხვა მცენარეული ლექტინის შესახებ არ ყოფილა ცნობები, რომ ისინი აინჰიბირებენ ვირუსულ ინფექციას, რეპლიკაციას ან ორგანიზმში მის სისტემურ გავრცელებას. მიუხედავათ იმისა, რომ ასეთი მტკიცებულების ნაკლებობა არ გამორიცხავს მცენარეული ლექტინების შესაძლო ანტივირუსულ ეფექტურობას, ეს ლოგიკურია მცენარეულ ვირუსებზე გლიკანების არ არსებობის პირობებში. საჭიროა აღინიშნოს, რომ რამდენიმე მცენარეული ლექტინი არის პოტენციური ინჰიბიტორი *in vitro* პირობებში ცხოველებისა და ადამიანების ვირუსებისა, რომელსაც გააჩნიათ გლიკოპროტეინები თავიანთ ვირიონებში (Balzarini, 1992). ზოგიერთ მცენარეულ ლექტინს შეიძლება ეკისრებოდეს არაპირდაპირი ანტივირუსული როლი მაგ. ინსექტიციდური ლექტინების არსებობამ, შეიძლება შეაკავოს ან/და შეამციროს მწერების მიერ გადატანილი ვირუსული დაავადებების არსებობა (Rabia Hamid, 2013).

1.6.9. მცენარეული ლექტინების ანტიბაქტერიული აქტივობა

ბაქტერიის უჯრედული კედელი, არა მხოლოდ ხელს უშლის თავიანთ მემბრანაზე გლიკოკონიუგატებისა და ნახშირწყალდამკავშირებელი პროტეინების ურთიერთქმედებას, არამედ ახდენს ამ პროტეინების ციტოპლაზმაში შეღწევის პრევენციასაც. შესაბამისად მცენარეულ ლექტინებს არ შეუძლიათ მემბრანის სტრუქტურაზე ან/და შეღწევადობაზე ზემოქმედება, ან მაინფიცირებელი მიკრობების ნორმალური შიდა უჯრედული პროცესების არევა. ამგვარად თუ ლექტინებს რაიმე როლი აკისრიათ მცენარის ბაქტერიებისაგან დაცვაში, ეს უნდა ხდებოდეს

არაპირდაპირი მექანიზმების მეშვეობით, რომელიც ეფუძნება უჯრედის კედლის ნახშირწყლებთან ან უჯრედგარე გლიკანებთან ზემოქმედებას (Petnual P., 2010).

არაპირდაპირი დაცვის მექანიზმია, ნორმალურად მოძრავი ბაქტერიების იმობილიზაცია ეშმაკის ვაშლას (*Datura stramonium*) თესლის ლექტინის მიერ წყლისა და ჰაერის საზღვარზე (Broekaert and Peumans, 1986). ვინაიდან ამ ექსპერიმენტებში გამოყენებული იყო, ზედმიწევით კარგად გასუფთავებული (აფინური ქრომატოგრაფიით) ლექტინი და ყველა ეფექტი სრულად რევერსირებული იქნა ფეტუინის მიერ (ფეტუინს ლექტინი მჭიდროდ იკავშირებს), სავარაუდოთ ბაქტერიების ინჰიბირება ლექტინის მიერ თითქმის არ იწვევს ეჭვს. ლექტინის მიერ *in vitro* პირობებში ბაქტერიის ინჰიბირება, კორელაციაშია თესლის კანისა და ეპიდერმისიდან ლექტინის ხშირ და სპეციფიკურ გამოყოფასთან. როგორც ჩანს, ნიადაგის ბაქტერიების ქემოსტატიკური მოძრაობის იმობილიზაციის გზით, ლექტინი აჩერებს მცენარის ფესვის ინვაზირებას, პოტენციურად მავნე ბაქტერიებისაგან.

ახალი მონაცემებით, მცენარის ლექტინების მიერ, ბაქტერიული უჯრედის კედლის პეპტიდოგლიკანებთან დაკავშირება მიანიშნებს იმაზე, რომ პარკოსნების ზოგიერთი სახეობის თესლის ლექტინები, ძლიერად ურთიერთქმედებენ მურამის მჟავასთან N-აცეტილ მურამის მჟავასთან და მურამის დიპეპტიდთან. მცენარის ბაქტერიებისაგან დაცვაში, ლექტინების ჩართულობის მნიშვნელობა საკმარისად არ არის შესწავლილი (Ayouba, 1994; Sakeena Q., 2013).

1.6.10. მცენარეული ლექტინების ანტისოკოვანი მოქმედება

მცენარეულ ლექტინებს არ შეუძლიათ, სოკოს მემბრანებზე არსებულ გლიკოკონიუგატებთან დაკავშირება, ან უჯრედის ციტოპლაზმაში შეღწევა, ვინაიდან მათ აქვს ძალიან სქელი და მყარი უჯრედის კედელი და მის ზრდა-განვითარებაზე პირდაპირი ზემოქმედება (მემბრანის სტრუქტურის ან/და შეღწევადობის მოშლა, ან ნორმალური შიდაუჯრედული პროცესებისთვის ხელის შეშლა) ძნელია. თუმცა არაპირდაპირი ეფექტები, რომლებიც ეფუძნება ლექტინების დაკავშირებას უჯრედული კედლის ზედაპირის კარბოჰიდრატებთან, შესაძლებელია. სპეციფიკურობიდან გამომდინარე, ქიტინ-დამკავშირებელ ლექტინებს, როგორც ჩანს აქვთ გარკვეული

როლი, მცენარის სოკოებისაგან და მწერებისაგან დაცვაში. *in vitro* ექსპერიმენტები გვიჩვენებენ, რომ WGA ლექტინით ინჰიბირებული სპორების გაღივება, აკავებს სოკო *Trichoderma viride*-ის ჰიფების ზრდას, ეს კი ამყარებს ჰიპოთეზას ქიტინდამკავშირებელი მცენარეული ლექტინების, ანტისოკოვანი როლის შესახებ. ნაჩვენები იყო, რომ ჭინჭრიდან (*Urtica dioica*) გამოყოფილი ქიტინაზებისაგან თავისუფალი ლექტინი, აინჰიბირებდა *Botrytis cinerea, Trichoderma hamatum* და *Phycomyces blakesleeanus* ჰიფების ზრდას (Broekaert, 1989). ჭინჭრის ლექტინის მოქმედების ზუსტი მექანიზმი, დღემდე არ არის განსაზღვრული, როგორც ჩანს, უჯრედის კედლის სინთეზზე ხორციელდება მხოლოდ ზემოქმედება, რაც ქიტინის სინთეზზე ან დაგროვების ხელის შეშლაზეა დამყარებული (Van Parijs, 1992). ლექტინის *in vitro* ანტისოკოვანი აქტივობის მიუხედავად, ჯერ კიდევ უცნობია ახასიათებს თუ არა მას გარკვეული დამცავი აქტივობა *in vivo* პირობებში, ვინაიდან ლექტინს არა აქვს უნარი მოკლას, გაღივებული სპორები ან მიცელიუმი. ჭინჭრის ლექტინის გარკვეული ეფექტებიდან გამომდინარე, რითაც ის ცვლის უჯრედის კედელსა და ჰიფების სტრუქტურულ მორფოლოგიას, როგორც ჩანს ის ჩართულია ენდომიკორიზას მიერ რიზომების კოლონიზაციის პროცესში. ლექტინის ამ როლზე მეცნიერებს შორის არსებობს გარკვეული სახის შეთანხმება, რომელიც უკავშირდება რიზომებსა და თესლებში ლექტინის ლოკაციას.

ზოგიერთი სხვა ქიტინ-დამკავშირებელი მცენარეული პროტეინები, რომელიც ზოგი დეფინიციის მიხედვით ლექტინებად უნდა ჩაითვალოს, ავლენენ ანტისოკოვან თვისებებს. პირველი ჯგუფი ეს არის ქიტინ–დამკავშირებელი მეროლექტინები, რომლებიც არიან ცილები ერთი ქიტინ-დამკავშირებელი დომენით. ჰევეინის ჯგუფის სხვა პროტეინები, კერძოდ სიყვარულის სისხლას (*Amaranthus caudatus)* თესლების 30 ამინომჟავის შემცველი ქიტინ-დამკავშირებელი პოლიპეპტიდი კიდევ უფრო მეტ პოტენციურ ანტისოკოვან თვისებებს ავლენენ, მაგრამ მაინც ვერ კლავს სოკოს (Broekaert, 1992). მცენარეული ლექტინების ერთადერთი ჯგუფი, რომელიც შეიძლება ფუნგიციდურ პროტეინებად მივიჩნიოთ არიან ქიმეროლექტინები, რომლებიც I კლასის ქიტინაზებს განეკუთვნებიან. გასუფთავებულ ენზიმებზე და ტრანსგენურ მცენარეებზე ჩატარებული *in vitro* ტესტირების შედეგად გამოვლინდა, რომ I კლასის ქიტინაზები, ნამდვილად რეზისტენტული არიან მცენარეების პათოგენური სოკოების მიმართ,

ვინაიდან ამ პროტეინების ანტისოკოვანი თვისებები განპირობებულია მათი კატალიზური უნარით და ნაკლებად არის კავშირში ნახშირწყლის დამკავშირებელ დომენთან, მათი დამცავი როლის გამოკვლევა რთული საკითხია (Collinge, 1993; Tian O., 2008; Repon K. S.,2014).

1.6.11. მცენარეული ლექტინების ინსექტიციდური აქტივობა

ფიტოფაგი მწერების, საჭმლის მომნელებელი ტრაქტის ეპითელური უჯრედები, პირდაპირ კავშირშია საკვებთან და ამგვარად მცენარის დამცავი პროტეინების მიზნობრივ სტრუქტურებს წარმოადგენს. ვინაიდან გლიკოპროტეინები არიან ამ უჯრედების მემბრანების ძირითადი ნაწილი, ნაწლავის გამტარი მხარე დაფარულია საკვებ ლექტინებთან პოტენციურად დამაკავშირებელი მოლეკულებით. იოლად შეგვიძლია წარმოვიდგინოთ, რომ როდესაც ლექტინის გლიკოპროტეინთან დაკავშირება ახდენს ადგილობრივი ან სისტემური დამშლელის ეფექტის პროვოცირებას, მწერი განიდევნება, მისი ზრდა ითრგუნება და შესაძლოა განადგურდეს კიდეც.

ქიტინ დამკავშირებელი ლექტინები, რომლებიც ბრინჯიდან (*Oryza sativa*) და ჭინჭრიდან იყო გამოყოფილი, ასევე ახდენდნენ ხოჭოს ლარვის ზრდის ინჰიბირებას. (Huesing, 1991), მაგრამ როგორც ჩანს, ეს თესლების ტიპიური დამაზიანებელი ხოჭო (მბურღავი) არ არის მგრძნობიარე მცენარეთა უმეტესი ლექტინების მიმართ და მხოლოდ საშუალო დონეზე რეაგირებს ტოქსიკურ ლექტინებზე როგორიცაა WGA, ბრინჯის და ლექტინი ჭინჭრის ლექტინები.

WGA და პეპლის ხის (*Bauhinia purpurea)* თესლის ლექტინები, სასიკვდილოთ მოქმედებდა ევროპული მბურღავის (*Ostrinia nubilalis*) ნეონატალურ ლარვაზე, შედარებით მცირე კონცენტრაციებითაც კი. დამაიმედებელი შედეგები იქნა ასევე მიღებული ერთლებნიანი მცენარეებიდან გამოყოფილი, მანოზა-დამკავშირებელი ლექტინის შემთხვევაში. ენძელიდან (*Galanthus nivalis*) და ნივრიდან (*Allium sativum*). გასუფთავებული ლექტინებით კვებამ გვიჩვენა, რომ ისინი საშუალოდ აქტიურები არიან მღეჭავი მწერების მიმართ, როგორიცაა: მბურღავი ხოჭო და თამბაქოს რქოსანი ჭია. რაც უფრო მნიშვნელოვანია ენძელას ლექტინმა აჩვენა მაღალი ტოქსიკურობა

მწოველი მწერების მიმართ, არა მხოლოდ ხელოვნური გამოკვების შემთხვევაში, არამედ ტრანსგენური მცენარეების გამოყენების დროსაც (Hilder, 1995).

როგორც ჩანს, ამ ლექტინების ტოქსიკურობა ეფუძნება გლიკოკონიუგატების სპეციფიური დაკავშირების უნარს, მწერის საჭმლის მომნელებელ ტრაქტში, თუმცა ამ მცენარის ლექტინების მოქმედების ზუსტი მექანიზმი უცნობია. შესაძლოა სამი ტიპის ზემოქმედება, სახელდობრ:

ა) ლექტინები უკავშირდება ქიტინს პერიფერიულ მემბრანაზე (მხოლოდ ქიტინ-დამკავშირებელი ლექტინების შემთხვევაში);

ბ) ლექტინების დაკავშირება გლიკოკონიუგატებთან, რომლებიც ღიადაა წარმოდგენილი საჭმლის მომნელებელ ტრაქტის ეპითელური უჯრედების ზედაპირზე;

გ) ლექტინების დაკავშირება გლიკოზირებულ საჭმლის მომნელებელ ლექტინებთან.

1.7. ლექტინების გამოყენება

მცენარეული და ცხოველური ლექტინები ბიოლოგიური აქტივობის უაღრესად დიდი მრავალფეროვნების წყალობით ფართოდ გამოიყენება ბიოლოგიის და მედიცინის ისეთ დარგებში როგორებიცაა: ბიოქიმია, ბიოტექნოლოგია, ბიოფიზიკა, ციტოლოგია, გენეტიკა, მემბრანოლოგია, იმუნოლოგია, მიკრობიოლოგია, ონკოლოგია და სხვა. კერძოდ, სპეციფიკური მოლეკულური ზონდების სახით ნიშანდებული ლექტინები, გამოიყენება უჯრედის ზედაპირული მარკერების იდენტიფიკაციისა და მემბრანების ნახშირწყლოვანი ტოპოგრაფიის შესწავლისათვის (Королёв Н. П., 1997). ლექტინების მეშვეობით გაფართოვდა ჩვენი ცოდნა ტრანსფორმირებული უჯრედების ტოპოგრაფიის შესახებ. ლექტინებს სულ უფრო ხშირად იყენებენ მიკროორგანიზმების ზედაპირული რეცეპტორული ნახშირწყლების გამოსაკვლევად (Лахтин В. М., 1987). ლექტინები გამოიყენება როგორც კვლევის ინსტრუმენტები, აფინური ადსორბენტები სხვადასხვა უჯრედების, ორგანელების და ძნელად მისაღები ისეთი გლიკოკონიუგატების იმობილიზაციის, გამოყოფისა და გასუფთავებისათვის, როგორიცაა მემბრანული გლიკოპროტეინული რეცეპტორები; ლექტინები შეიძლება გამოყენებულ იქნას უჯრედების იდენტიფიკაციისათვის. მაგალითად, ისინი გამოიყენება მაკროფაგ/ჰისტიოციტების და რეტიკულური უჯრედების

იდენტიფიკაციისათვის. სიალსპეციფიკური ლექტინები მეგაკარიოციტების საუკეთესო მარკერებია. ლექტინები ფართოდ გამოიყენება ჰისტოქიმიურ კვლევაში (Лахтин В. М., 1986). მცენარეულ ლექტინებს ასევე იყენებენ, როგორც ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთებს, ვინაიდან მათ აღმოაჩნდათ მიტოგენური აქტივობა ლიმფოციტების მიმართ (აძლიერებს ლიმფოციტების პროლიფერაციას, მათ ბლასტ-ტრანსფორმაციას), ჰორმონების მსგავსი მოქმედება ცხოველურ უჯრედებზე, სიმსივნის საწინააღმდეგო მოქმედება კიბოს უჯრედებზე (Kim, 2003) და სხვ. ლექტინები გამოიყენება უჯრედთა პათოლოგიაში, სხვადასხვა დაავადებების გამოსავლენად (Dwek, 2001). მაგ, UEA-I წარმოადგენს დიაგნოსტიკურ ლექტინს, რომელიც საიმედო მარკერია ვასკულარული წარმოშობის ენდოთელური და სიმსივნური უჯრედებისათვის (Damjanov L., 1987). იმუნომოდულატორული თვისებების გამო ლექტინებს იყენებენ როგორც ბიოეფექტორებს იმუნოლოგიური დარღვევების მკურნალობის სფეროში (Huber, 2005). ლექტინების მიერ T და B ლიმფოციტების მიტოგენური სტიმულაცია წარმოადგენს მეთოდს ავადმყოფების იმუნოკომპეტენციის შესაფასებლად (Луцик М. Д., 1981). განსაკუთრებულ ინტერესს იწვევს ლიპოსომებში (ლიპიდებიდან მომზადებული ხელოვნური ვეზიკულები) ჩართული ორგანოებისა და ქსოვილებისაკენ სამკურნალო წამლებისა და პრეპარატების მიზანმიმართული ტრანსპორტი სპეციფიკური ლექტინების "მეგზურობით" (Zhang, 2005). ლექტინები უშუალო მონაწილეობას ღებულობენ მცენარეთა და ცხოველთა განაყოფიერების პროცესში, მათ განსაკუთრებული როლი ენიჭებათ ონტოგენეზში, სიმბიოზში, ფიტოიმუნიტეტში და სხვა. აღმოჩნდა, რომ რიგი მცენარეული ლექტინებისა ხასიათდება ინსექტიციდური, ანტიბაქტერიული და ანტივირუსული თვისებებით. ამ თვისებებს დიდი ეკოლოგიური მნიშვნელობა უნდა ენიჭებოდეს მცენარეთა თავდაცვისა და თვითგადარჩენის პროცესში. მედიცინასა და სოფლის მეურნეობაში ისახება ვირუსებითა და ბაქტერიებით გამოწვეული დაავადებების ნახშირწყლებით მკურნალობის დიდი პერსპექტივა, რომელიც სპეციფიკური ჰაპტენებით (ნახშირწყალი) მათ წინასწარ ინაქტივაციას ემყარება. მიკროორგანიზმების ლექტინთა წინასწარი დაკავშირებით შაქრებთან კავდება ვირუსებისა და ბაქტერიების მცენარეულ და ცხოველურ ორგანიზმებში შეღწევა და მათი კოლონიზაცია. პერსპექტივაში ისახება სრულიად ახალი მეთოდოლოგია

ეკოლოგიურად სუფთა გარემოს შესაქმნელად, რათა თავიდან ავიცილოთ პესტიციდებისა და ანტიბიოტიკების მასშტაბური გამოყენება.

მიუხედავად იმისა, რომ მცენარეული ლექტინის ანტიმიკრობული აქტივობის ხარისხი შეიძლება დაბალი იყოს, მას მაინც დიდი მნიშვნელობა აქვს მომავალი კვლევების ჩასატარებლად, რადგანაც დღევანდელი მეთოდი – ბიოაქტიური ნაერთის გამოყოფა მხოლოდ და მხოლოდ ბუნებრივი წყაროდან – არ არის კვლევის ერთადერთი გზა. ბიოაქტიური ნაერთის სტრუქტურა, რომ იყოს სრულად შესწავლილი, რეკომბინანტული დნმ–ის მეთოდის საშუალებით, შესაძლებელი იქნებოდა სინთეზური ნაერთის გამომუშავება. ამასთანავე, რადგანაც ანტიმიკრობული რეზისტენტობის მქონე ორგანიზმები ჯერ კიდევ დიდ პრობლემას წარმოადგენს, სამედიცინო მკურნალობის თვალსაზრისით, ახალი ანტიმიკრობული ნაერთის აღმოჩენისთვის კვლევების ჩატარება დიდ ინტერესს იწვევს.

ექსპერიმენტული ნაწილი

თავი 2. კვლევის ობიექტი და გამოყენებული მეთოდები

2.1. კვლევის ობიექტი

ზოგადი აღწერა: ქრისტესისხლა - *Chelidonium majus - Great celandine – Chelidonia – Common celandine – Carden celandine – Kelta ruoho – Kirlangi cotu – Kusanowo – Otompui kina – Schelkraut – Svalert* (სახელწოდება წამოვიდა ბერძნული სიტყვიდან ,,მერცხალი'', რადგან მცენარე აყვავებას იწყებს მერცხლების მოფრენისას და ასრულებს ყვავილობას მათი გაფრენის დროს). რუსულად ,,чистотел'' ჰქვია, რაც სუფთა სხეულს ნიშნავს, იმის გამო, რომ ის კურნავდა კანზე არსებულ მეჭეჭებს, ფურუნკულებს, გამონაყარს და უამრავ სხვა დაავადებას და ასუფთავებდა მას.

კლასიკური მრავალწლოვანი, ბალახოვანი მცენარეა, ყაყაჩოსებრთა (*Papaveraceae)*-ს ოჯახიდან. ფესვი მთავარღერძიანია, ღერო დატოტიანებული და სიმაღლეში 60-100სმ-დე იზრდება, ღეროზე ფოთლები მორიგეობითაა განლაგებული. მათი შეფერილობა ზემოდან ღია მწვანეა, ქვემოდან კი მოცისფრო. ფოთლების ფორმა მოგვაგონებს ფართო ელიფსს კენტფრთართულდანაკვთულია, მრგვალად დაკბილული კიდეებით (სურ.2).

სურ. 2 ქრისტესისხლა - *Chelidonium majus*.

ყვავილები ყვითელია, განლაგებულია მარტივი ქოლგების სახით და 3-8 ყვავილითაა წარმოდგენილი. თითოეული ყვავილი 2 ჯამისა და 4 გვირგვინის ფურცლისგან შედგება, რომელშიც მრავალი მტვრიანა და 1 ბუტკოა მოთავსებული. ნაყოფები ოვალური ფორმისაა, ყავისფერიდან შავ შეფერილობამდე, მოყვითალო-

თეთრი თითქმის გამჭვირვალე დანამატით, თესლების ზომაა 2მმ სიგრძით და 1მმ დიამეტრით, ერთბუდიან, წაგრძელებულ-მილისებრ კოლოფებშია მოთავსებული, რომლის სიგრძე 5სმ-ია. მცენარის ყველა ნაწილი შეიცავს ნარინჯისფერ, უსიამოვნო სუნისა და მწარე გემოს მქონე წვენს, რომელიც უხვად გამოდის ღეროს გადატეხვისას. ყვავილობს აპრილ-ივნისში, ნაყოფი მწიფდება მაისს აგვისტოში (Климахин А. 1987).

გავრცელება და არეალი: ამ უნიკალური მცენარის სამშობლოდ ითვლება ხმელთაშუაზღვის ქვეყნები, ველური სახით გაცრცელებულია კავკასიაში, უკრაინაში, ყირიმში, ციმბირში, ყაზახეთში, შორეულ აღმოსავლეთში, ჩრდ. ამერიკაში. იგი საქართველოს ყველა რაიონში გვხვდება, თუმცა ხარობს ,,ამოჩემებულ'' ეკოსისტემებში. არის ტენის მოყვარული მცენარე, იზრდება საცხოვრებელ სახლებთან, გზების გასწვრივ, დანაგვიანებულ, ქვიან ადგილებში, ტყეების განაპირას, ბუჩქნარებში, მდინარეებისა და ნაკადულების პირას. ლამაზი ყვავილების მიუხედავად, ის არ ითვლება დეკორატიულ მცენარედ, ის ცნობილია როგორც სამკურნალო მცენარე, საინტერესოა ერთი ფაქტი, მისი უმოწყალოდ მოპოვების შემთხვევაში ის სწრაფად ქრება!

ქიმიური შემადგენლობა: მცენარის ყველა ორგანო მდიდარია და შეიცავს ალკალოიდებს: ხელიდონინს, ხელერიტრინს, სპარტეინს, ჰომოგელიდონინი, სანგვინარინი, პროტოპინი და სხვა., დაახლოებით 2%-მდე; (Tome F., 1995) რაც თავის მხრივ განაპირობებს კიდეც მცენარის ძლიერ ტოქსიკურობას. მათ შორის დაფიქსირებულია ბერბერინი, რომელიც განსაზღვრავს ნარინჯისფერ შეფერვას; მცენარე მდიდარია ეთერზეთებით - 0,4%, რომლის შემადგენლობაშიც შედის ციტრალი - 60%, ვიტამინი C - 170მგ%; ვიტამინი A - 20-მგ%, შეიცავს ასევე კაროტინებს, ფლავონოიდებს, საპონინებს, მთრიმლავ ნივთიერებებს, ფენოლკარბოლმჟავებს. თესლი შეიცავს 40%-მდე ცხიმოვან მჟავებს, ორგანულ მჟავებს: ვაშლის, ლიმონის, ქარვის. ყლორტები შეიცავს გლიკოზიდებს, ლორწოს. მცენარეში აღმოჩენილია ასევე: მეთილამინი, თირამინი, ხელიდონის მჟავა (კაჭარავა თ. 2010).

ხალხურ მედიცინაში უძველესი დროიდან, მცენარის მიწისზედა ნაწილები და წვენი, გამოიყენება მეჭეჭების, კოჟრების, მაზოლების, ეკზემების, პოდაგრის, რევმატიზმების, პიგმენტური ლაქების მოსაცილებლად; ასევე კანის ტუბერკულიოზის, ძნელად შეხორცებადი ჭრილობების ეპითელიზაციის დასაჩქარებლად, კანის სიმსივნეების, სიფილისის, ფსორიაზის, მალარიის, მწვავე და ქრონიკული ჰეპატიტების,

წითელი მგლურას დროს. მისი ნახარში ბელგიელი მედიკების მიერ მოწოდებულია, როგორც დიურეზული საშუალება ასციტის დროს, რომელიც დამახასიათებელი ღვიძლის ციროზისათვის, ხოლო მცენარის ნაყენებს სპირტზე და წყალზე, ასევე მის ნარინჯისფერ წვენს აქვს ტკივილგამაყუჩებელი და სპაზმოლიტური მოქმედება ისეთი დაავადებების დროს როგორიცაა: თირკმელში და ნაღვლის ბუშტში კენჭების გავლა, გასტრიტი, კოლიტი. ავსტრიაში ახალგაზრდა მცენარის ღეროები და ფოთლები გამოიყენება დამამშვიდებელ და კუნთოვანი მასის სპაზმის მოსახსნელად, ნაღვლის წვენისა და ნაღველმდენი გზების გასააქტიურებლად. საფრანგეთში მას იყენებენ, როგორც აღმაგზნებელი, შარდმდენი, კუჭის ასაშლელი საშუალება. ციმბირში მისი წვენი გამოიყენება იოდის შემცვლელ საშუალებად.

საქართველოში ქრისტესისხლას გამოყენება, როგორც უნიკალური სამკურნალო მცენარისა, ასწლეულების განმავლობაში მიმდინარეობს. ხევსურეთში მას ,,სისხლა ბალახას“ ეძახიან ყვითელი, სამკურნალო წვენის გამო. სახალხო ექიმები და მოყვარულები მთელი ამ პერიოდის მანძილზე, ახდენდნენ ამ მცენარის კულტივირებას საკუთარი მოხმარებისთვის. ამ პროცესში ისინი თაობიდან თაობაში, ნებსით თუ უნებლიედ სელექციურ სამუშაოებს აწარმოებდნენ, რამაც საფუძველი დაუდო ერთ-ერთი ხალხური ვარიაციის შექმნას. სელექცია მიმდინარეობდა სხვადასხვა კუთხით. საინტერესოა რა ვარიაციით ხდებოდა სელექცია, რადგან მცენარის მახასიათებლები მჭიდრო კავშირში არიან ერთმანეთთან. მაგალითად, როცა მოსავლიანობა იზრდება, მკვეთრად მცირდება ფარმაკოლოგიური მახასიათებლები და პირიქით.

ქრისტესისხლა, როგორც სამკურნალო მცენარე, გამოიყენება უამრავი დაავადებების სამკურნალოდ, თითქმის არ მოიძებნება არც ერთი ისეთი დაავადება, რომ არ შეიძლებოდეს ამ მცენარით მკურნალობა. თუმცა მისი გამოყენება ექიმის და კვალიფიცირებული სპეციალისტების გარეშე არ შეიძლება, რადგან დიდი დოზებით მისმა მიღებამ შეიძლება გამოიწვიოს მოწამვლა: ძლიერი წყურვილი, სიმძიმის შეგრძნება თავისა და მუცლის არეში, თავბრუსხვევა, გულყრა, გალუცინაცია. განსაკუთრებით ცუდად მოქმედებს ის ცხოველებზე, შეიძლება გამოიწვიოს სიყრუე, აქტივობის დაქვეითება, სიბრმავე და სხვა. ერთადერთი ცხოველი, რომელზეც ეს ბალახი არ მოქმედებს ლაქიანი ირემია.

ქრისტესისხლას ახასიათებს ნაღველმდენი, სპაზმოლიზური და ტკივილგამაყუჩებელი მოქმედება. შედის მრავალი პრეპარატის შემადგენლობაში. მისი სპაზმოლიზური აქტივობა გამოწვეულია მასში შემავალი ალკალოიდ **ხელიდონინით**, რომელსაც ამას გარდა გააჩნია ცენტრალურ ნერვულ სისტემაზე დამამშვიდებელი მოქმედება, ზოგიერთ ქვეყანაში მას იყენებენ, როგორც კუჭ-ნაწლავის ტრაქტის სპაზმური ხასიათის ტკივილგამაყუჩებელ საშუალებას პაპავერინის ნაცვლად. დოზის გადიდებისას ეს ეფექტი გადადის ნარკოზში. ალკალოიდი **ჰომოგელიდონინი** ხასიათდება საანესთეზიო მოქმედებით, თუმცა ამ მიზნით არ იყენებენ, ვინაიდან მისი მაღალი დოზებით გამოყენება იწვევს კრუნჩხვებს. ალკალოიდ **სანგვინარინს** ახასიათებს ანტიქოლინესტერაზული მოქმედება, რის გამოც მისი ზემოქმედებით ძლიერდება საჭმლის მომნელებელი ტრაქტის მოტორული ფუნქცია და ნერწყვის გამოყოფა. ალკალოიდი **პროტოპინი** კი ზრდის საშვილოსნოს კუნთების ტონუსს და ამცირებს ვეგეტატიური ნერვული სისტემის რეაქციას (Nawrot P. 2010).

მცენარე გამოიყენება ღვიძლისა და ნაღვლის ბუშტის სამკურნალოდ. აფერხებს: ავთვისებიანი სიმსივნეების ზრდას, მეტასტაზების განვითარებას, კარგი შედეგები აქვს გარეგანი სიმსივნეების, კერძოდ, ტუჩის, კანის, შარდგამომყოფი ხვრელის, საშვილოსნოს ყელის კიბოს მკურნალობაში. ქრისტესისხლას პრეპარატებს გააჩნიათ ფუნგისტატიკური და ბაქტერიოციდული მოქმედება თვით ტუბერკულიოზის ჩხირის მიმართაც. შინაგანი გამოყენების დროს ეს მცენარე ამცირებს აჩქარებულ პულსს და დაბლა წევს არტერიულ წნევას, აქვს ნაღველმდენი ფუნქცია, გამოიყენება სტენოკარდიის, ჰიპერტონული დაავადებების, სხვადასხვა დაავადებებით გამოწვეული კუნთების სპაზმის დროს, გამოიყენება თირკმლების, მსხვილი ნაწლავის პოლიპოზების, მენსტრუალური დაავადებების, ჰემოროების, თავბრუსხვევების, ძლიერი ხველების, თავის ტკიველების, ართრიტების დროს (Nawrot P. 2010).

ქრისტესისხლას ნაყენი გამოიყენება, როგორც მცენარეთა დაცვის ბუნებრივი საშუალება ბუგრების, ღილღველას, თალგამის თეთრულას და სხვა მავნებლების წინააღმდეგ. გამხმარი მცენარის ფხვნილი, ასევე გამოიყენება მწერების და ბაღ-ვენახების პარაზიტების გასანადგურებლად.

კვლევის ობიექტად ვიყენებდით ქრისტესისხლას ვეგეტაციურ და გენერაციულ ორგანოებს, რომლებსაც ვაგროვებდით აპრილ - ივნისში, თიანეთის რეგიონში ცხვარიჭამიის მიდამოებში.

ქრისტესისხლას ვეგეტაციურ ორგანოებს ვაგროვებდით მცენარის სასიცოცხლო ციკლის-ონტოგენეზის პირველ (აღმოცენების, ფესვთა სისტემის და საასიმილაციო აპარატის-ღეროების და ფოთლების ფორმირების ფაზაში) და მეორე (გენერაციული ორგანოების ფორმირების - ყვავილედის, ნაყოფების, თესლის წარმოქმნისა და მომწიფების ფაზაში), ხოლო გენერაციულ ორგანოებს ონტოგენეზის მეორე პერიოდში. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ როგორც ლიტერატურული მონაცემებიდანაა ცნობილი (Paul Chal P. 2009), ქრისტესისხლას ბუნებრივი თავისებურებებიდან გამომდინარე მცენარის სიცოცხლის ხანგრძლივობაზე, მეტაბოლური აქტივობის დინამიკაზე, უჯრედების ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე გავლენას ახდენს ონტოგენეზის პერიოდში ეკოლოგიური ფაქტორები (ტემპერატურა, ფარდობითი ტენიანობა, ნიადაგის შემადგენლობა და სხვა). ე. ი. მცენარის სასიცოცხლო ციკლის გავლა დამოკიდებულია ვეგეტაციური პერიოდის ხანგრძლივობასა და ბიოტურ ფაქტორებზე. ამასთანავე გასათვალისწინებელია ის გარემოებაც, რომ მცენარის მახასიათებლები მჭიდრო ურთიერთკავშირშია ერთმანეთთან, ერთი მახასიათებლის გაუმჯობესება პრაქტიკულად სხვა მახასიათებლის გაუარესების ხარჯზე მიიღება, ასე მაგალითად მოსავლის რაოდენობის მკვეთრმა ზრდამ მაღალი ალბათობით შეიძლება გამოიწვიოს მცენარის ფარმაკო-ქიმიური მახასიათებლების შემცირება (დათეშიძე ლ. 2010).

თესლის მასალის მისაღებად მომწიფებული პარკი ნაყოფებიდან ვაგროვებდით თესლებს და ვაშრობდით ჩრდილში. თესლებს ვინახავდით 15–25^{0}C

ტემპერატურაზე, კარგი აერაციის და ჰაერის არაუმეტეს 60–65% ტენიანობის პირობებში.

2. 2. გამოყენებული მეთოდები

2.2.1. მცენარეული მასალიდან ლექტინური აქტივობის მქონე ხსნადი ცილის ექსტრაქციის მეთოდი

მცენარეულ მასალას ვაჰომოგენიზირებდით ფაიფურის როდინში, საექსტრაქციო არედ ვიყენებდით PBS-ს: 0.9% NaCl, 0,04 M K^+ფოსფატის ბუფერი pH 7,4, 0,1% β-მერკაპტოეთანოლი, შეფარდებით 1/40 (გ/მლ). ხსნადი ცილების ფრაქციების მისაღებად გამოყენებული იყო აგრეთვე შემდეგი საექსტრაქციო ხსნარები: ა) 0.9% NaCl 40mM K^+ - ფოსფატის ბუფერი pH 5,0; ბ) 0.9% NaCl 40mM K^+ - ფოსფატის ბუფერი, 0,5mM PMSF pH 7,4; გ) 0.9% NaCl + 40mM K^+ - ფოსფატის ბუფერი, 0,5mM PMSF pH 7,4; β-მერკაპტოეთანოლი, pH 7,4.

ხსნადი ცილის ექსტრაქციის მიზნით ჰომოგენატს ვდგამდით მექანიკურ ან მაგნიტურ სარეველაზე 1 სთ-ის განმავლობაში; შემდეგ ვფილტრავდით ორმაგ დოლბანდში და ფილტრატს ვაცენტრიფუგირებდით 16 000 ბრ/წთ (10000g) 15 წთ-ის განმავლობაში. ცილის ნაწილობრივ გასუფთავებისა და ფრაქციონირების მიზნით შემდეგ ეტაპზე ვახდენდით სუპერნატანტის ცილების გამომარილებას (დალექვას) ამონიუმის სულფატით $(NH_4)_2SO_4$ 0-90% გაჯერების პირობებში (Скоупс Р.,1985). გამომარილებულ სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 20000g- ზე 20 წთ (Bekman SW-27 როტორი) +4^{0}C ტემპერატურის პირობებში, ვინაიდან დაბალ ტემპერატურაზე ცილის ხსნადობა დაქვეითებულია. ნალექს ვხსნიდით მინიმალური მოცულობის 0,9% NaCl 40mMKK$^+$ - ფოსფატის ბუფერი, pH 7,4, ვაჰომოგენიზირებდით შუშის ბურთულიან ჰომოგენიზატორში და კვლავ ვაცენტრიფუგირებდით 5000g-ზე (8000ბრ/წთ ცენტრიფუგა TY5. 375-4172-78, ТУ5.375-4172-78, როტორი PY 180) 15 წთ. სუპერნატანტს ვფილტრავდით Whatman CF/C და synpor-0,45-0,22 μm ფილტრში, ხოლო ჭარბი არაორგანული იონების მოცილებას ვახდენდით დიალიზით G-10 სეფადექსის გელით დატენილ სვეტზე (50 x, 2,7სმ) ან amicon (mod. 52 Milipore 10000 NMWL მემბრანა) ტიპის კონცენტრატორში ულტრაფილტრაციის მეთოდით. ექსტრაქტებს ვინახავდით +4^{0}C ტემპერატურის პირობებში.

2.2.2. ცილის დალექვა და ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით გამომარილების მეთოდით

ექსტრაგირებული ლექტინების ნაწილობრივ გასუფთავებისა და დაკონცენტრირების მიზნით ვიყენებდით ამონიუმის სულფატით გამომარილების მეთოდს. ეს მეთოდი მოიცავს ცილის ხსნარის დალექვას ნეიტრალური მარილის მაღალი კონცენტრაციის პირობებში, (0-90%) და ნალექის შემდგომ გახსნას ნაკლები მოცულობის ბუფერში. ამისათვის ვსაზღვრავდით ექსტრაქტის მოცულობას და ვითვლიდით მარილის იმ რაოდენობას, რომელიც საჭირო იყო მოცემულ ექსტრაქტში საერთო ცილის დალექვისათვის (60გ/100მლ) (Ckoyps P., 1985) განსაზღვრული რაოდენობის $(NH_4)_2SO_4$ ვუმატებდით ექსტრაქტს და ვურევდით 30 წთ განმავლობაში. უნდა ავღნიშნოთ ასევე, რომ 2-3M $(NH_4)_2SO_4$-ის ხსნარში გამოლექილი ცილის სუსპენზია სტაბილურია განუსაზღვრელად დიდი დროის განმავლობაში. აქედან გამომდინარე, ექსტრაგირებულ ცილებს ცდებს შორის ინტერვალებში, ჩვეულებრივ, ამ სახით ვინახავდით - 10^0C-ის პირობებში.

ცილების საფეხურებრივი ფრაქციონირების მიზნით, დალექვის თითოეულ ეტაპზე ცილის ხსნარს ვუმატებდით მარილის საჭირო რაოდენობას ნელა, თანდათანობით, მუდმივი მორევის პირობებში. მარილის გახსნის შემდეგ მორევას ვაგრძელებდი 20 წთ განმავლობაში. ცილის სუსპენზიას 1 საათით ვაჩერებდით მაცივარში -10^0C -ზე, შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით 20000g-ზე 20წთ +4^0C-ზე, ვიღებდით სუპერნატანტს, ვზომავდით მის მოცულობას და ვითვლიდით მარილის რაოდენობას, რომელიც საჭირო იყო ფრაქციონირების შემდგომი ეტაპისათვის. ნალექს კი ვხსნიდით მინიმალური მოცულობის იმავე ბუფერში და ვაანალიზებდით ლექტინური აქტივობის მხრივ. ჭარბი არაორგანული იონების მოცილებას ვახდენდით დიალიზით G-10 სეფადექსის გელ-ფილტრაციულ სვეტზე (50x2.7სმ) ან ულტრაფილტრაციით.

2.2.3.ულტრაფილტრაცია

ცილის ხსნარების დიალიზისა და დაკონცენტრირების მიზნით ვიყენებდით ულტრაფილტრაციის მეთოდს, რომელიც სპეციალური შერჩევით-განვლადი მემბრანის საშუალებით ნივთიერებათა დაყოფის შესაძლებლობას იძლევა. ულტრაფილტრაციას ვახდენდით amicon-ის ტიპის საფილტრაციო აპარატში (Millipore 10000 NMWL მემბრანა), რომელიც აღჭურვილი იყო მაგნიტური მომრევით, შეკუმშული აირადი აზოტის 4-5 ატმ. წნევის ქვეშ.

2.2.4. ლექტინური აქტივობის განსაზღვრის მეთოდები

ლექტინურ აქტივობას ვსაზღვრავდით იმუნოლოგიურ პლანშეტებზე ვიზუალურად ჰემაგლუტინაციური ტესტით ბოცვრის არატრიფსინიზირებულ და ტრიფსინიზირებულ ერითროციტებზე ტაკაჩის მიკროტიტრაციის მეთოდით (Liener 1976; Takatsy 1967). **ლექტინურ აქტივობას** ვაფასებდით ცილის იმ მინიმალური კონცენტრაციის (მგ/მლ) მიხედვით, რომელიც იწვევდა ბოცვრის ტრიპსინიზირებული ერითროციტების აგლუტინაციას. ლექტინის აქტივობის შესაფასებლად ვიყენებდით აგრეთვე **სპეციფიკურ აქტივობას** (მლ/მგ), რომელიც ლექტინური აქტივობის შებრუნებულ სიდიდეს წარმოადგენს. იგი გამოხატავს 1 მგ ცილის იმ მაქსიმალურ განზავებას, რომელიც ჯერ კიდევ იწვევს აგლუტინაციას: $SA=T^{-1}C^{-1}$ სადაც T^{-1} (ტიტრი) არის ცილის განზავების ხარისხი სატიტრაციო პლანშეტის ბოლო ფოსოში, სადაც ჯერ კიდევ შეინიშნება ჰემაგლუტინაცია ($T=2^n$, n – აგლუტინაციური ფოსოების რაოდენობა, c - ცილის კონცენტრაცია გამოსახული მგ/მლ ერთეულებში). **ჰემაგლუტანციის ტიტრს** ვსაზღვრავდით აგლუტინინის ყველაზე მაღალ განზავების რეციპროკული სიდიდის მიხედვით, რომელიც ჯერ კიდევ იწვევდა ერიტროციტების ვიზუალურ აგლუტინაციას. $T = 2^n$. n-ფოსოების რაოდენობა სადაც შეინიშნება ჰემაგლუტინაცია. **ლექტინების შემცველობაზე** ვმსჯელობდით საერთო ცილის შემცველობის შეფარდებით ლექტინურ აქტივობასთან (პირობით აგლუტინაციური ერთეული- HU (*Hemagglutination Units*)).

2.2.5. ლექტინური აქტივობის განსაზღვრა ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით

ლექტინურ აქტივობას ვსაზღვრავთ სინათლის გაბნევის მეთოდით, ფოტოკოლორიმეტრ КФК-3-ის გამოყენებით. ამისათვის საკონტროლო და საანალიზო კიუვეტებში შეგვქონდა 400 მკლ 1%-იანი ტრიპსინიზირებული ერითროციტების სუსპენზია. საანალიზო კიუვეტაში ვუმატებდით ლექტინურ ფრაქციას განსაზღვრული კონცენტრაციით 600 მკლ, ხოლო საკონტროლოში - იმავე მოცულობის ბუფერს. საკონტროლო კიუვეტაში 670 ნმ ტალღის სიგრძის სინათლის გატარების მაჩვენებელს მივიჩნევდით 100%-ად, ხოლო საანალიზო კიუვეტაში ამ მაჩვენებლის ცვლილებას ვაფიქსირებდით ფოტოკოლორიმეტრზე (ФК-3) მიერთებული თვითმწერის საშუალებით (Alexidze G, Ya 2014).

2.2.6. ბოცვრის ტრიპსინიზებული ერითროციტების მომზადება

ბოცვრის ყურის ვენიდან აღებული სისხლი, სწრაფად გადაგვქონდა Na-ციტრატის შემცველ ფიზიოლოგიურ ხსნარში (3.8% Na-ციტრატი, 0.9% NaCl). ამის შემდეგ სისხლს ვაცენტრიფუგირებდით 100 g-ზე 10 წთ-ის განმავლობაში (სამედიცინო ცენტრიფუგა ტიპი TY5. 375-7261-76). ნალექს სამჯერ ვრეცხავდით ფიზიოლოგიურ სხნარით, ვსაზღვრავდით ჰემატოკრიტს და ვამზადებდით ერითროციტების ხსნარს აგლუტინაციის ბუფერით, რომელშიც ვხსნიდით 1.8 მგ ტრიპსინს. რაოდენობით სხნარის ყოველ 1 მლ-ზე. ამის შემდეგ ერითროციტების სუსპენზიას ვათავსებდით საინკუბაციოდ თერმოსტატში 1 საათის განმავლობაში +37^{0}C ტემპერატურის პირობებში. ინკუბაციის შემდეგ ერითროციტებს სამჯერ ვრეცხავდით ცენტრიფუგირების გზით (სამედიცინო ცენტრიფუგაზე ტიპი TY5. 375-4261-76). 100 g-ზე 10 წთ-ის განმავლობაში. ისევ ვსაზღვრავდით ჰემატოკრიტს და ფიზიოლოგიურ ხსნარზე ვამზადებდით ერითროციტების 2% სუსპენზიას, რომელსაც ვიყენებდით ჰემაგლუტინაციური აქტივობის განსაზღვრის მიზნით.

2.2.7. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა

ცილის რაოდენობას ვსაზღვრავდით ლოურის მეთოდით (Lowry O.H., 1951) მეთოდს საფუძვლად უდევს არომატული ამინომჟავების (თიროზინი, ტრიფტოფანი) შეღებილი პროდუქტების წარმოქმნა ფოლინ-ჩიოკალტოს რეაქტივთან. ეს პროცესი მოიცავს ბიურეტის რეაქციას (პეპტიდურ ბმებზე) და ფოლინის რეაქციას (თიროზინზე და ტრიფტოფანზე), მეთოდი შესაძლებლობას იძლევა განისაზღვროს 10-100 მკგ ცილა სინჯში. რეაქტივები: (A): Na_2CO_3-ის 2%-იანი ხსნარი დამზადებული 0,1M NaOH-ზე; (B): 0,5% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, დამზადებული ნატრიუმის ციტრატის 1%-იან ხსნარზე; (C): A რეაქტივს ემატება B რეაქტივი (50:1), მზადდება ცდის წინ; (D): ფოლინ-ჩიოკალტოს რეაქტივი (Sigma). საკვლევი ხსნარის 1 მლ-ს ვუმატებდით 2 მლ C რეაქტივს, ვურევდით და ვტოვებდით ოთახის ტემპერატურაზე 10 წთ, შემდეგ ვუმატებდით 0,05 მლ (D) რეაქტივს. სინჯარას ვანჯღრევთ და 30 წთ-ის შემდეგ ვზომავდით შთანთქმას 750 ნმ ტალღის სიგრძეზე. ცილის კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით ხარის შრატის ალბუმინის (BSA, Sigma) საფუძველზე კალიბრირებული გრაფიკის საშუალებით.

2.2.8. ლექტინების ნახშირწყლების მიმართ სპეციფიკურობის შესწავლა

ნახშირწყლების მიმართ ლექტინის სპეციფიკურობას ვსწავლობდით ჰაპტენით ინჰიბირების ტექნიკის გამოყენებით (Lis 1986). ანალიზისათვის ვიყენებდით PBS ბუფერის საფუძველზე დამზადებულ მარტივი შაქრების ხსნარებს. ლექტინების სპეციფიკურობა განისაზღვრებოდა შემდეგი მარტივი შაქრების მიმართ: D-გალაქტოზა, მეთილ-D-გალაქტოზა, N-აცეტილ-D-გლაქტოზამინი, D-მანოზა, მეთილ-D-მანოზა, D-გლუკოზა, მეთილ-D-გლუკოზა, N-აცეტილ-D-გლუკოზამინი, L-რამნოზა, L-ფუკოზა, D-გალაქტურონის მჟავა, ფრუქტოზა, ქიტინი, D-არაბინოზა, L -რიბოზა, D-მელიბიოზა, D-ლაქტოზა, D-მალტოზა, D-ტრეგალოზა, საქაროზა, აღნიშნული შაქრების ხსნარებს ვტიტრავდით 200 mM-დან კლებადი კონცენტრაციის მიხედვით სატიტრაციო იმუნოლოგიურ ფირგიტაზე. ფირფიტის ყველა ფოსოში შეგვქონდა ლექტინის ხსნარი თანაბარი კონცენტრაციით. ლექტინის ხსნარი დამზადებული იყო PBS-ის საფუძველზე

და მისი კონცებტრაცია შეესაბამებოდა ცილის იმ მინიმალურ რაოდენობას, რომელიც ჯერ კიდევ იწვევდა ბოცვრის ტრიპსინიზებული ერითროციტების აგლუტინაციას.

ჰაპტენის სპეციფიკურობაზე ვმსჯელობდით შაქრის იმ მინიმალური კონცენტრაციის მიხედვით, რომელიც იწვევდა ლექტინის ჰემაგლუტინაციური აქტივობის დათრგუნვას.

ცილის რაოდენობა ყველა შემთხვევაში ისაზღვრებოდა Lowry-ის მეთოდის მიხედვით (Lowry 1951).

2.2.9. ლექტინებში ნახშირწყლების შემცველობის განსაზღვრა

ლექტინის მოლეკულაში ნახშირწყლების შემცველობას ვადგენდით შიფის რეაგენტის გამოყენებით ამისათვის ელექტროფორეზის დამთავრების შემდეგ გელს ვაფიქსირებდით 7.5%-იანი ძმარმჟავას ხსნარით 1 საათის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ გელს ვათავსებდით 0.2%-იანი იოდის მჟავას ხსნარში 1 საათის განმავლობაში, +4^{0}C-ზე. ჭარბ იოდის მჟავას ვაცილებდით გელს 15%-იანი ძმარმჟავას ხსნარით. გარეცხილ გელს ვათავსებდით შიფის რეაგენტის ხსნარში და ინკუბაციას ვახდენდით ნახშირწყლების შემცველი ცილოვანი ფრაქციების წითელ ზონებად შეღებვამდე. ჭარბ საღებავს ვაცილებდით 7.5%-იანი ძმარმჟავას ხსნარით მრავალჯერადი გარეცხვით.

2.2.10. გელ-ფილტრაცია Toyopearl HW-55-ის სვეტზე

ლექტინური აქტივობის მქონე ცილოვანი ფრაქციის გასუფთავებას ვახდენდით Toyopearl HW-55-ის სვეტზე (3.5 x 70 სმ), რომელიც გაწონასწორებული იყო ფიზიოლოგიური ხსნარით. ქრომატოგრაფიას ვახდენდით HPLC სისტემის გამოყენებით (Knauer). ელუციისათვის ვიყენებდით PBS-ის ხსნარს. ელუციის სიჩქარე შეადგენდა 2 მლ/წთ-ში. დეტექტირებას ვახდენით 280nm ტალღაზე. სვეტიდან ელუირებულ ცილოვან ფრაქციებს ვამოწმებდით ლექტინურ აქტივობაზე.

2.2.11. ცილის ფრაქციონირება და მოლეკულური მასის განსაზღვრა გელ-ფილტრაციით

გელ-ფილტრაციის მეთოდით ცილების ფრაქციონირებისა და მოლეკულური მასის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით მაღალი წნევის თხევადი ქრომატოგრაფიის სისტემას (გელ-ფილტრაციული სვეტი PROTEIN PAK-300-SW, "Waters", აშშ). ქრომატოგრაფიას ვატარებდით შემდეგ პირობებში: ელუციის სიჩქარე -1.0 მლ/წთ, დეტექტირება -214 ნმ ტალღის სიგრძეზე, საელუციო ბუფერები: 1) 0.1 M K^+-ის ფოსფატის ბუფერი (pH 7.4), 2) 0.01% ტრიტონ X-100, 0.1 M K^+-ის ფოსფატის ბუფერი (pH 7.4), 3) 0.02 M ამონიუმის აცეტატი, 0.02 M NaN_3, 0.5% მეთანოლი (pH 6-6.5).

სტანდარტული და საკვლევი ცილოვანი ფრაქციებისთვის ვსაზღვრავდით განაწილების კოეფიციენტს შემდეგი ფორმულით:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_n - V_0}$$

სადაც, V_n - არის სვეტის საერთო მოცულობა,

V_0 - თავისუფალი ანუ გრანულებს შორის მოცულობა,

V_e - საკვლევი ნივთიერების ელუცირებული ხსნარის მოცულობა,

K_{av} – განსაზღვრავს ფორების იმ წილს, რომელიც შეიძლება დაიკავოს ამ მოლეკულამ.

K_{av}–ს მნიშვნელობების და სტანდარტული ცილების მოლეკულური მასის ლოგარითმს შორის დამოკიდებულების მიხედვით ვაგებდით კალიბრირების მრუდს, რომლის მიხედვით ვსაზღვრავდით საკვლევი ცილების ფრაქციების მოლეკულურ მასებს (Скоупс 1985).

კალიბრირების მიზნით გამოვიყენეთ შემდეგი სტანდარტული ცილები (kDa): თირეოგლობულინი (660), ფერიტინი (440), კატალაზა (232), ალბუმინი (67), ქიმოტრიპსინოგენი (25), ლაქტატი (36.5), ინსულინი (6), ალუბუმინი (45).

2.2.12. აფინური ქრომატოგრაფია ქიტინის სვეტზე

აფინური ქრომატოგრაფიისთვის ვიყენებდით, ნაწილობრივ გასუფთავებული ქიტინის ჰიდროლიზატით დატენილ სვეტს. თავდაპირველად ქიტინის სვეტს ვათავსებდით 2-2 სთ-ით HCl-ისა და NaOH-ის ხსნარებში, შემდეგ ვრეცხავდით წყლით და ერთი დღე-ღამის განმავლობაში ვათავსებდით თერმოსტატში 37 ^{0}C-ზე. მეორე დღეს იგივე ხსნარების გამოყენებით, ვიმეორებდით პროცედურას 1-1 სთ-ის ხანგრძლივობით და კვლავ ვრეცხავდით წყლით. სვეტს ვაწონასწორებდით სააგლუტინაციო ბუფერით და დაგვქონდა საკვლევი ცილის ხსნარი, სვეტის საკუთარი სიჩქარით. ლექტინის მაქსიმალურად იმობილიზაციისთვის, ხსნარს რამდენჯერმე ვატარებდით სვეტზე, მანამ სანამ სვეტიდან ჩამოსული ქვედა ხსნარის ლექტინური აქტივობა არ შემცირდებოდა მინიმუმამდე. სპეციფიკურად დაკავშირებული ლექტინის ელუცია ხდებოდა 0.1 N გლიცინ გლიცინ-HCl-ის ბუფერით (pH 2.5). ქრომატოგრაფის დროს ელუციის სიჩქარე იყო 0.5 მლ/წთ, დეტექტირებას ვახდენდით 280 ნმ ტალღის სიგრძეზე (“LKB”, შვეცია)

ქრომატოგრაფიის დამთავრების შემდეგ სვეტს ვრეცხავდით სააგლუტინაციო ბუფერით, რომელიც შეიცავდა 0.03% ნატრიუმის აზიდს და ვინახავდით +4^{0}C-ზე.

2.2.13. ცილის ანალიზური ელექტროფორეზი ნატიურ და დისოცირებულ პირობებში

გასუფთავებული ლექტინის ნატიური პრეპარატის ელექტროფორეზს ვატარებდით 1.2 მმ სისქის 5-25% გრადიენტიან პოლიაკრილამიდის გელში დევისის სისტემის გამოყენებით (Davis B.J., 1964). ელექტროფორეზი მიმდინარეობდა Hoefer scientific instruments SE-200 ტიპის ხელსაწყოში 4-5 სთ-ის განმავლობაში(40-60mA) გელის თითოეულ მლ-ზე 2 mA დენის ძალის თანაობისას. მარკერად ვიყენებდით შემდეგი სტანდარტული ცილების ნაკრებს (Kda): ურეაზა (272.545), ხარის შრატის ალბუმინი (67.132), კვერცხის ალბუმუნი (45), კარბოანჰიდრაზა (29), α-ლაქტალბუმინი (14.2) [Sigma]. გელებს ვღებავდით 0,2% Cumassie Blue G-250 საღებავით.(Blakesley 1977).

პრეპარატის პოლიპეპტიდური შედგენილობისა და მოლეკულური მასების დასადგენად ცილის ელექტროფორეზს ვატარებდით Laemmli-ის სისტემის გამოყენებით (Laemli U.K., 1970) 1,2მმ სისქის 10-25% გრადიენტიან პოლიაკრილამიდის გელში, დისოცირებულ პირობებში 0,1% SDS-ის თანაობისას. ელექტროფორეზი მიმდინარეობდა Hoefer scientific instruments SE-200 ტიპის აპარატში 5სთ-ის განმავლობაში, 1მლ გელზე 2mA დენის ძალის პირობებში. ელექტროფორეზის მარკერებად გამოყენებულ იქნა დაბალმოლეკულური სტანდარტული ცილები (Kda): ხარის შრატის ალბუმინი (66 000), ოვალბუმინი (45000), პეპსინი (34 700), ტრიფსინოგენი (24000), β-ლაქტოგლობულინი (20100), ლიზოციმი (14200) [Sigma]. (The Pharmacia LMW Electrophoresis Calibration Kit) გელებს ვღებავდით 0,2% Cumassie G-250-ის გამოყენებით.

2.2.14. ლექტინების თერმოსტაბილურობის შესწავლა

ამ მიზნით ლექტინის სუფთა პრეპარატის ხსნარის (0.9 % NaCl + 10 mM K^+-ის ფოსფატის ბუფერი, pH 7.4) ინკუბირებას ვახდენდით თერმოსტატში ტემპერატურის +30^{0}C-დან +80^{0}C-მდე გაცხელების პირობებში. ტემპერატურის გაზრდას ვახდენდით 10^{0}C-ით და ლექტინის ხსნარს ვაყოვნებდით 15 წუთის განმავლობაში. დამუშავებულ სინჯარებს სწრაფად ვაცენრტიფუგირებდით 1500 g-ზე 15 წუთი. სუპერნატანტებში ვსაზღვრავდით ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას.

2.2.15. ლექტინების ჰემაგლუტინაციური აქტივობის დამოკიდებულების შესწავლა წყალბად-იონების კონცენტრაციაზე

გასუფთავებული ლექტინის ხსნარს თანაბრად ვანაწილებდით 10 სინჯარაში და ვაცენტრიფუგებდით 3000 g-ზე 10 წთ-ის განმავლობაში (სამედიცინო ცენტრიფუგა. ტიპი TY5. 375-4261-76). მიღებულ ნალექს ცალ-ცალკე ვხსნიდით pH 5.0-pH9.5 დიაპაზონის PBS ბუფერში 0.5 ერთეულით ზრდის მიხედვით. აგლუტინაციისათვის ვიყენებთ შესაბამისი pH-ის მქონე PBS ბუფერულ ხსნარებს.

2.2.16. ორვალენტიანი კათიონების გავლენა ლექტინების ჰემაგლუტინაციური აქტივობაზე

ამ მიზნით ლექტინების სუფთა პრეპარატების ხსნარებს ვადიალიზებდით 24 საათის განმავლობაში 0.9% NaCl და 10 mM EDTA-ს შემცველ ხსნარში ორვალენტიანი იონების სრულად მოსაცილებლად. დიალიზატს ვამოწმებდით ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე. პარალელურად ვიკვლევდით Ca^{2+}, Mn^{2+} და Mg^{2+}-ის გავლენას ლექტინების ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე. ამისათვის სარეაქციო არეში შეგვქონდა აღნიშნული იონები 1-დან 5mM-მდე კონცენტრაციით.

2.2.17. ქრისტესისხლას თესლების გაღივება

ვიღებდით ქრისტესისხლას თესლების ოთხ ასეულს (4 პარალელი), ვწონიდით (100 ცალი თესლის მასა დაახლოებით 220-230 მგ-ია) და გაჯირჯვების მიზნით ერთი დღე-ღამის განმავლობაში ვტოვებდით გამდინარე წყალში (მისნიკი, 1947). თესლების სტერილიზაციას ვახდენდით $KMnO_4$-ის ხსნარში (5 წთ) და 80%-იან მეთანოლში (10 წმ-ის განმავლობაში). სტიმულაციის მიზნით თესლებს ვათავსებდით მურაშიგა-სკუგას ხსნარში 1 დღე-ღამის განმავლობაში (კაკულია მ., 1969). თესლის აღმოცენებას ვატარებდით პეტრის ჯამებზე (საფენად იხმარება ბამბა და ფილტრის ქაღალდი), თერმოსტატში +37^{0}C ტემპერატურის პირობებში, 25 დღის განმავლობაში. ერთ ჯამზე ვთესავდით 100 ცალ თესლს.

2.2.18. ლექტინების მოქმედებით ბაქტერიების აგლუტინაციის შესწავლა

ტესტ-კულტურებად გამოყენებულ იქნა ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის ბოტანიკის ინსტიტუტის მიკრობიოლოგიის განყოფილების კულტურათა მუზეუმში დაცული ზოგიერთი ფიტოპათოგენური ბაქტერიისა და სოკოს შტამები, კერძოდ:

ბაქტერიები:

1. 2. *Agrobacterium tumefaciens* – ვაზის კიბოს გამომწვევი;
2. *Pectobacterium aroidae* – იწვევს სიდამპლეებს;
3. *Xanthomonas campestris* – კომბოსტოს დაავადების აღმძვრელი;
4. *Bacillus subtilis* - არ წარმოადგენს ფიტოპათოგენურ ბაქტერიას, ხასიათდება ფუნგიციდური მოქმედებით;
5. *Staphylococcus aureus* - ადამიანის დაავადებათა 30 % გამომწვევი;

სოკოები:

1. *Trichoderma viride* – საპროფიტი, პარალელურად სოკოების პარაზიტი,
2. *Fusarium oxysporum* – ფუზარიოზული დაავადების გამომწვევი.

ფიტოპათოგენური ბაქტერიების კულტივირებას ვახდენდით ეშბის თხევად საკვებ არეზე (გ-ში) გლუკოზა – 20,0; K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4$ – 0,2; NaCL – 0,2; K_2SO_4 – 0,1; $CaCO_3$ – 5,0; წყალი – 1 ლ. სოკოების კულტივირებას ვახდენდით ჩაპეკის მყარ საკვებ არეზე (გ-ში) – გლუკოზა – 14,0; $CaCO_3$ – 0,7; KNO_3 – 0,7; $MgSO_4$ – 0,35; NaCl – 0,35; K_2HPO_4 – 0,35; $FeSO_4$–კვალი; აგარი – 20,0; დისტილირებული წყალი -1000 მლ.

თხევად საკვებ არეში კულტივირებულ 18-24 საათიან ბაქტერიულ კულტურას ვაცენტრიფუგირებდით 8000 ბრ/წთ 10 წთ-ის განმავლობაში (სამედიცინო ცენტრიფუგა TY5. 375-4261-76). პრეციპიტატს (ბაქტერიების ნალექი) სამჯერ ვრეცხავდით TBS (0.50 mM Tris-HCI pH7.4 + 0.15M NaCI + 0.03M $CaCI_2$) (Lectins. 1994).

ბაქტერიულ სუსპენზიას ვამუშავებდით მთელი ღამე 4^0C 1.5% V/V გლუტარალდეჰიდით TBS-ში, შემდეგ ვრეცხავდით 1M გლიცინით - ვბლოკავდით ალდეჰიდურ ჯგუფებს. შემდეგ ისევ ვრეცხავდით TBS-ით. ცდისათვის ვიყენებდით ბაქტერიების სუსპენზიას 0.1 ოპტიკური სიმკვრივით, რომელსაც ვაყენებდით ფოტოელექტროკოლორიმეტრის საშუალებით 585 ნმ-ზე. სინჯარაში გადაგვქონდა 300 მკლ ლექტინური ფრაქცია (ცილის კონცენტრაცია 60მკგ/50მკლ, ლექტინური აქტივობის ტიტრი 2048) და ვამატებდით 200 მკლ ბაქტერიების სუსპენზიას, პარალელურად ვატარებდით საკონტროლო ცდას რომელშიც ვიყენებდით ბუფერში სუსპენზირებულ

ბაქტერიულ კულტურას. 24 სთ ინკუბაციის შემდეგ ნარევს 50 მკლ-ის ოდენობით ვათავსებდით სასაგნე მინაზე. ვამზადებდით ფიქსირებულ პრეპარატს, რომელსაც ვღებავდით ფუქსინით, რის შემდეგაც მიკროსკოპში (1000 ჯერადი გადიდებით) დაკვირვებით ვახდენდით ბაქტერიების აგლუტინაციის დადასტურებას. აგლუტინაციას ვადარებდით ბაქტერიების საკონტროლო სინჯს ბუფერში. სოკოებთან მიმართებაში, ვიყენებდით იგივე პროცედურას, მაგრამ პეტრის ჯამებიდან კოლონიების ჩამონარეცხებთან მიმართებაში. სუსპენზია შეიცავდა როგორც სოკოს სპორებს, ისე მიცელიუმის ფრაგმენტებსაც.

2.2.19. მიკროორგანიზმების ზრდის ინჰიბირების შესწავლის დისკ-დიფუზიის მეთოდი

ცდის ჩასატარებლად ვიყენებდით 18-24 სთ ბაქტერიულ კულტურას კონცენტრაციით 105-106 კწე/მლ (კწე - კოლონიის წარმომქმნელი ერთეული გაანგარიშებული ხსნარის ერთ მილილიტრზე), რომლის 100 მკლ შპადელით ჰომოგენურად ნაწილდება 2%-იანი აგარის შემცველ ეშბის არის ზედაპირზე. სოკოებისათვის ვიყენებდით მონოსპორული სუსპენზიების ტექნიკას, რისთვისაც მიცელიუმის წყლიან სუსპენზიას ვფილტრავდით სტერილური ბამბა-მარლის ფილტრში ასეპტიკურ პირობებში. საკვებ არეს წარმოადგენდა აგარიზებული ჩაპეკის არე. მიკროორგანიზმების კონცენტრაცია შეადგენდა 10^5–10^6 უჯრედი/მლ (აღებულს მიკროორგანიზმების ზრდის ექპონენციალურ ფაზაში). აგარის ზედაპირზე სუსპენზიის შეშრობის შემდეგ, მიკროორგანიზმების გაზონზე ვათავსებდით წინასწარ გამზადებული სტერილური ფილტრის ქაღალდის დისკებს (Watman 3,6მმ დიამეტრის). ამ უკანასკნელზე კი ვაწვეთებდით გასუფთავებული ცილოვანი ფრაქციის (ცილის კონცენტრაცია 20მკგ/50მკლ, ლექტინური აქტივობის ტიტრი 2048) 20 მკლ-ს. დადებით კონტროლად გამოყენებული იქნა ამოქსაცილინი (2.5 მგ/მლ) და ციპროფლოქსაცილინი (0.005 მგ/მლ). პარალელურად ვდგამდით საკონტროლო პეტრის ჯამებს, რომელზედაც დისკებზე ცილოვანი ფრაქციის ნაცვლად ვაწვეთებდით იგივე რაოდენობის სტერილურ წყალს. ჯამებს ვათავსებდით თერმოსტატში 37^0C ტემპერატურაზე 18-24 სთ-ის განმავლობაში ბაქტერიებისათვის, ხოლო სოკოებისათვის 72-96 სთ. ექსპერიმენტულ და

საკონტროლო ჯამებზე მიღებული შედეგების შედარებით ვახდენდით ბაქტერიების ზრდის დათრგუნვის ხარისხის შეფასებას.

ლექტინის მინიმალური მაინჰიბირებელი კონცენტრაციის განსაზღვრა (MIC – მკგ/მლ). **MIC** წარმოადგენს ლექტინის იმ მინიმალურ კონცენტრაციას (მაქსიმალური განზავების პირობებში), რომელიც ჯერ კიდევ იწვევს მიკროორგანიზმების ზრდის ინჰიბირებას (Courvalin, 1985).

მიკროორგანიზმების ზრდის დათრგუნვის ზონის გაზომვა. თითოეული ნიმუშისთვის დათრგუნვის ზონა იზომება მმ–ში. აქტივობის ინდექსი (A.I.) და ინჰიბირების პროცენტი – P.I. გამოითვლება შემდეგი ფორმულებით (Lis, 1998):

$$\text{A.I.} = \frac{\text{თითოეული სინჯისთვის დათრგუნვის ზონის საშუალო მაჩვენებელი}}{\text{სტანდარტის ინჰიბირების ზონასთან}}$$

P.I.= აქტივობის ინდექსი (A.I.) x 100.

2.2.20. შედეგების სტატისტიკური დამუშავება

ექსპერიმენტის შედეგების სტატისტიკური დამუშავება ხდებოდა სტიუდენტის t განაწილებით (t-ტესტი).

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1 - 1} + \frac{S_2^2}{N_2 - 1}}}, \qquad M = \frac{\sum_{i=1}^{N} \mathrm{Xi}}{\mathrm{N}}$$

სადაც:

1. N_1 – საკონტროლო ცდების განმეორებითობების რიცხვი,
2. N_2 – საკვლევი ცდების განმეორებითობების რიცხვი,
3. M_1 -საკონტროლო ცდების მნიშვნელობების საშუალო არითმეტიკული,
4. M_2 – საკვლევი ცდების მნიშვნელობების საშუალო არითმეტიკული,
5. S_1 - საკონტროლო ცდების საშუალო სტანდარტული გადახრა,
6. S_2 - საკვლევი ცდების საშუალო სტანდარტული გადახრა.

t განაწილების კოეფიციენტით, შესაბამის ცხრილებში, ვადგენდით p–ს (თავისუფლების ხარისხი) მნიშვნელობას. $p<0.05$ ნიშნავს, რომ საკონტროლო და საკვლევი ცდის მონაცემებს შორის მიღებული განსხვავება, მნიშვნელოვნად უნდა მივიჩნიოთ, ხოლო როცა $p>0.05$ - საკონტროლო და საკვლევი ცდის მონაცემებს შორის განსხვავება არ არის მნიშვნელოვანი.

თავი 3. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

3.1. ქრისტესისხლას თესლებიდან ლექტინების ექსტრაქცია

ბიოლოგიურად აქტიური ახალი ლექტინების იდენტიფიკაცია, მათი ბიოლოგიური როლის და გამოყენების სფეროების შესწავლა ლექტინოლოგიის ყველაზე აქტუალურ საკითხად რჩება. აღნიშნულმა გარემოებამ განაპირობა ჩვენი ინტერესი ლექტინების მიმართ. კვლევის ობიექტად შერჩეული იქნა საქართველოში საველე პირობებში მოყვანილი ყაყაჩოსებრთა (*Papaveraceae*) ოჯახის საინტერესო წარმომადგენელი - სამკურნალო მცენარე ქრისტესისხლა *(Chelidonium majus).*

ლიტერატურული მონაცემების მიხედვით ქრისტესისხლადან ჯერ კიდევ 1995 წელს იქნა გამოყოფილი სამი სტრუქტურულად და ბიოლოგიური თვისებებით განსხვავებული ქიტინ-სპეციფიკური და ჰეპარინ-სპეციფიკური ლექტინები (Fik E., Gozdzicka-Jozefiak A., 1995). თუმცა აღნიშნულ სამუშაოებში შეუსწავლელი დარჩა გამოკვლეული ლექტინების ბიოლოგიური ფუნქციები. ავტორების მიერ გამოთქმული იქნა მოსაზრება ქრისტესისხლას ლექტინების შესაძლო მონაწილეობაზე მცენარის ზრდა-განვითარებისა და მიკრობებისაგან დაცვის პროცესებში (Nawrot R.,2008; Amal K., Maji, 2015). შესაბამისად დღემდე უცნობი რჩებოდა თუ რა როლი ეკისრებოდათ ლექტინებს ქრისტესისხლას ორგანიზმში. მეორეს მხრივ, გამოყენებითი მიმართულებით ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა გამოავლინეს, რომ აღნიშნულ ლექტინებს გააჩნიათ ეფექტური ანტიკანცეროგენული მოქმედება გარკვეული ტიპის აპლაზიურ უჯრედებზე და ანტიმიკრობული აქტივობა მულტირეზისტენტული სტაფილოკოკების მიმართ (Fik E., Gozdzicka-Jozefiak A., 1997; Gilca M., 2010). შესაბამისად დაისახა პერსპექტივა ქრისტესისხლას ლექტინების, კლინიკაში სამკურნალო საშუალებებად გამოყენის შესახებ. მიუხედავად მათი ასეთი მნიშვნელოვანი ბიოლოგიური აქტივობისა, რომლებიც გამოვლენილ იქნა in vitro ექსპერიმენტებში, სამუშაოები ამ მიმართულებით შეჩერებულ იქნა მას შემდეგ, რაც გამოვლინდა მათი ტოქსიკური მოქმედება ორგანიზმებზე და ეჭვის ქვეშ დადგა ქრისტესისხლას ლექტინების პრაქტიკულ მედიცინაში სამკურნალო საშუალებების სახით გამოყენების პერსპექტივაც.

ზემოთქმულიდან გამომდინარე მიზნად დავისახეთ ჩვენს მიერ შემუშავებული განსხვავებული მიდგომების გამოყენებით გამოგვევლინა ახალი ტიპის ლექტინი/ლექტინები, რომლებიც ზემოთ აღწერილი ქრისტესისხლას ტოქსიკური ლექტინებისაგან განსხვავებული იქნებოდნენ თავისი უსაფრხთო და მაღალეფექტური ბიოლოგიური აქტივობით.

ექსპერიმენტებში პირველ რიგში შერჩეული იქნა ქრისტესისხლას მომწიფებული თესლები, ვინაიდან, როგორც ცნობილია ლექტინები ხშირ შემთხვევაში ჭარბადაა ლოკალიზებული მცენარეთა თესლებში.

სამუშაოს საწყის ეტაპზე შემუშავებულიი იქნა ქრისტესისხლას თესლიდან ლექტინური აქტივობის მქონე ხსნადი ცილის გამოყოფის მეთოდი.

სამეცნიერო ლიტერატურაში აღწერილია მცენარეული მასალიდან ლექტინების ექსტრაქციის სხვადასხვა სტანდარტული მეთოდები. როგორც ცნობილია, მცენარეული უჯრედების დაშლისას ჰომოგენიზაციის პირობებში, ადგილი აქვს ციტოპლაზმის pH-ის მკვეთრ ცვლილებას. ცნობილია ასევე, რომ მჟავე არე ხშირ შემთხვევაში იწვევს უჯრედული ცილების ინაქტივაციას და დენატურაციას. ამის გამო, მცენარეული ლექტინების საექსტრაქციოდ, როგორც წესი, ყველაზე ხშირად გამოიყენება ნეიტრალური pH-ისა და 0,015-0,04 M იონური ძალის მქონე ხსნარები, როგორიცაა ფოსფატის ბუფერული ხსნარი (PBS).

ხსნადი ცილოვანი ფრაქციის გამოყოფის მიზნით ვიყენებდით სხვადასხვა შემადგენლობის საექსტრაქციო ხსნარებს:

1. PBS (0,9%NaCl, 0,04M KH_2PO_4, pH7.4),

2. PBS (pH 5.0),

3. PBS + 0.5 mM PMSF (pH 7.4),

4 PBS + 0.5 mM β-მერკაპტოეთანოლი 0.5 mM PMSF (pH 7.4).

ყველა შემთხვევაში ნედლეულის წონისა და ექსტრაგენტის თანაფარდობა შეადგენდა 1 : 40 (გ/მლ). წონისა და საექსტრაქციო ხსნარის მოცულობის ოპტიმალური თანაფარდობა დადგენილი იქნა ცდების სერიით, სადაც ვსწავლობდით ნედლეული (გ) : საექსტრაქციო ხსანარი (მლ) სხვადასხვა თანაფარდობების (1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50) გავლენას ლექტინურ აქტივობაზე. მიღებული შედეგებიდან ნაჩვენები იქნა, რომ ქრისტესისხლას ნედლეულის წონისა და საექსტრაქციო ხსნარის მოცულობის ყველაზე

ოპტიმალური თანაფარდობა შეადგენდა 1 : 40 (გ/მლ). აღნიშნული შეფარდების მქონე საექსტრაქციო ხსნარის გამოყენებისას ფიქსირდებოდა ტიტრის (2^8), ლექტინური აქტივობის (0.028 მგ/მლ) და სპეციფიკური აქტივობის (9142.86 მგ/მლ) ყველაზე მაღალი მაჩვენებლები.

სხვადასხვა შემადგენლობის საექსტარქციო ხსნარის გავლენა ქრისტესისხლას ექსტრაქტების ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე მოცემულია ცხრილი №1–ში.

ცხრილი №1-ში წარმოდგენილი მონაცემები მიუთითებენ, რომ PBS-ის მარტივი ბუფერული ხსნარის გამოყენება იწვევს ჰემაგლუტინაციური აქტივობის მქონე ხსნადი ცილების ექსტრაქციას ქრისტესისხლას თესლის ქსოვილებიდან.

ცხრილი №1

ქრისტესისხლას თესლის ექსტრაქტების ჰემაგლუტინაციური აქტივობა ტრიპსინიზირებული ბოცვრის ერითროციტების მიმართ სხვადასხვა შემადგენლობის საექსტრაქციო ხსნარის გამოყენების პირობებში.

საექსტრაქციო ხსნარი 1 : 40 (გ/მლ)	**ცილა მგ/მლ**	**ტიტრი**	**ლექტინური აქტივობა მგ/მლ**	**სპეციფიკური აქტივობა მლ/მგ**
PBS (0,9%NaCl + 0,04M KH_2PO_4, pH 7,4)	8.32	32	**0.26**	3.85
PBS (pH 5,0)	7.04	32	**0.22**	4.55
PBS + 0,5mM PMSF (pH 7,4)	8.96	32	**0.28**	3.57
PBS+0,5mM β-მერკაპტოეთანოლი (pH 7,4)	7.17	256	**0.028**	35.70

$p<0.01$

როგორც ცხრილი №1-იდან ჩანს, ყველაზე მაღალი ტიტრი (256), ჰემაგლუტინაციური აქტივობა (0.028 მგ/მლ) და სპეციფიკური აქტივობა (35.7მლ/მგ) ფიქსირდება შემდეგი შემადგენლობის ექსტრაგენტში - PBS+0,5mM β-მერკაპტოეთანოლი (pH 7.4), რაც მინიმუმ 10-ჯერ აღემატება სხვა გამოყენებული ექსტრაგენტების ეფექტურობას.

იმის გათვალისწინებით, რომ ქსოვილებში ლექტინები შესაძლებელია წარმოდგენილი იყოს უჯრედის სტრუქტურებთან ასოცირებული ფორმით, მათი მაქსიმალური გამოთავისუფლების მიზნით, გამოყენებულ იქნა დაბალი pH-ის მქონე საექსტრაქციო არე (PBS, pH 5.0). ვინაიდან ცნობილია, რომ მჟავე არეში ხშირ შემთხვევაში ქვეითდება ლექტინების ნახშირწყალ-დამკავშირებელი აქტივობა და წყდება არაკოვალენტური კავშირები ლექტინებსა და მათ დამკავშირებელ ლიგანდებს შორის. როგორც ცხრილი №1-იდან ჩანს მჟავე pH-ის პირობებში ექსტრაქტის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა მნიშვნელოვნად არ იცვლებოდა.

ამრიგად მიღებული შედეგები გვიჩვენებენ, რომ დაბალი pH-ის მქონე საექსტრაქციო არის (PBS, pH 5.0) გამოყენება არ ახდენს გავლენას ლექტინების გამოსავალზე.

სამეცნიერო ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ ჰომოგენიზაციის დროს ლიზოსომებისა და სხვა სტრუქტურების რღვევის შედეგად, ჰომოგენატში გამოთავისუფლდება პროტეაზული ფერმენტები, რომლებიც იწვევენ უჯრედული რიგი ცილების დაშლას და ინაქტივაციას. შესაბამისად ლექტინების ინაქტივაციის თავიდან აცილების მიზნით საექსტრაქციო ხსნარში ჩვენს მიერ გამოყენებული იქნა პროტეაზების ინჰიბიტორი - ფენილ-მეთილ-სულფონილ-ფტორიდი (PMSF).

როგორც №1 ცხრილიდან ჩანს, PMSF შეტანა საექსტრაქციო ხსნარში არ ცვლიდა ექსტრაქტის ჰემაგლუტინაციური აქტივობის მაჩვენებელს, რაც მიუთითებს ქრისტესისხლას თესლის ლექტინების მდგრადობაზე პროტეოლიზური ფერმენტების მოქმედების მიმართ.

სამეცნიერო ლიტერატურიდან ასევე ცნობილია, რომ ქსოვილებიდან ცილის ექსტრაქციის დროს გამოთავისუფლებული დამჟანგველი ფერმენტები – ფენოლოქსიდაზები შეუქცევადად ჟანგავენ ფენოლებს მუქი პიგმენტების წარმოქმნით. ეს უკანასკნელნი კი კოვალენტურად ურთიერთქმედებენ უჯრედულ ცილებთან და იწვევენ მათი აქტივობის ძლიერ დაქვეითებას ან სრულ ინაქტივაციას. აღნიშნულის თავიდან აცილების მიზნით ხშირ შემთხვევაში რეკომენდებულია საექსტრაქციო არეში აღმდგენელი რეაგენტების გამოყენება.

ჩვენს შემთხვევაში ლექტინების აქტივობის დამცავ საშუალებად გამოყენებულ იქნა β-მერკაპტოეთანოლი, რომელიც დამჟანგავი ფერმენტების ინჰიბიტორს წარმოადგენს და იცავს ცილის სულფჰიდრილურ ჯგუფებს.

როგორც №1 ცხრილიდან ჩანს, β-მერკაპტოეთანოლის შემცველი საექსტრაქციო ხსნარის გამოყენებისას ვლინდება მაქსიმალური ჰემაგლუტინაციური აქტივობა.

ამრიგად მიღებული შედეგების საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ, რომ ფენოლური ნაერთები გარკვეულწილად გავლენას უნდა ახდენდნენ თესლის ლექტინების (CBL) მდგრადობაზე, ვინაიდან β-მერკაპტოეთანოლის გამოყენების პირობებში ვლინდებოდა მაქსიმალური ლექტინური აქტივობა. კერძოდ, ექსტრაქტის აქტივობა იზრდებოდა დაახლოებით 10-ჯერ.

საექსტრაქციო ხსნარში ლექტინების მაქსიმალური გადასვლისათვის ახდენენ ჰომოგენატის ექსტრაქციას მაგნიტურ სარეველაზე გარკვეული დროის განმავლობაში. ლიტერატურული მონაცემების მიხედვით, ლექტინთა უმრავლესობისათვის ექსტრაქციის ოპტიმალური ხანგრძლივობა 1-2 სთ-ს შეადგენს. თუმცა, ასევე ცნობილია, რომ პარკოსანთა ლექტინების ექსტრაქციას ახდენენ 24 საათის განმავლობაში. მეორეს მხრივ, გასუფთავების პროცედურები, მაგალითად, ცილა-ფერმენტების შემთხვევაში, ტარდება უმოკლეს დროში, +4^{0}C-ის პირობებში, რადგან უფრო მაღალ ტემპერატურაზე ხშირად ადგილი აქვს მათ ინაქტივაციას.

ყოველივე ზემოთ თქმულის გათვალისწინებით, თესლის ლექტინების გამოყოფის პირობების შერჩევის მიზნით ცდების სერიაში ვცვლიდით ექსტრაქციის ხანგრძლივობისა და ტემპერატურის რეჟიმს. ცხრილში №2 ნაჩვენებია ექსტრაქციის ხანგრძლივობისა და ტემპერატურის გავლენა CBL-ის ჰემაგლუტანაციურ აქტივობაზე (ცხრილი №2). ცხრილში წარმოდგენილია CBL-ის ჰემაგლუტინაციის ტიტრი, ჰემაგლუტინაციური და სპეციფიკური აქტივობების დამოკიდებულება ექსტრაქციის დროის ხანგრძლივობასა და ტემპერატურულ რეჟიმზე.

როგორც ცხრილი №2-დან ჩანს, ჰომოგენატის ექსტრაქციას ვახდენდით 15 წთ, 30 წთ, 1 სთ, 2 სთ, 24 სთ-ის განმავლობაში, ოთახის ტემპერატურის პირობებში (18-20^{0}C) და 24სთ განმავლობაში +4^{0}C-ის ტემპერატურაზე. მიღებული შედეგების მიხედვით, ქრისტესისხლას თესლის ლექტინები სრულად ექსტრაგირდებოდა ბუფერში, ჩვენს

მიერ გამოცდილ მინიმალურ დროში (15 წთ), ხოლო ტემპერატურული რეჟიმის შეცვლა კი გავლენას არ ახდენდა ლექტინების ექსტრაქციის ეფექტურობაზე.

ცხრილი №2.

ექსტრაქციის ხანგრძლივობისა და ტემპერატურის გავლენა CBL-ის ჰემაგლუტინაციის ტიტრზე, ჰემაგლუტინაციურ და სპეციფიკურ აქტივობაზე

ექსტრაქციის დრო, ტემპერატურა	ცილა მგ/მლ	ჰემაგლუტი–ნაციის ტიტრი	ჰემაგლუტი–ნაციური აქტივობა მგ/მლ	სპეციფიკური ჰემაგლუტინაციური აქტივობა მლ/მგ
15 წთ; (+18^{0}C)	7.61	256	**0.0297**	33.64
30 წთ; (+18^{0}C)	7.52	256	**0.0293**	34.04
1 სთ; (+18^{0}C)	7.65	256	**0.0299**	33.46
2 სთ; (+18^{0}C)	7.21	256	**0.0282**	35.51
24 სთ; (+18^{0}C)	7.14	256	**0.0279**	35.85
24 სთ; (+4^{0}C)	7.43	256	**0.0290**	34.45

$p<0.001$

როგორც ცხრილი №2-დან ჩანს, ჰემაგლუტინაციური და სპეციფიკური აქტივობა უკვე მაქსიმუმს აღწევს 15 წთ–ის შემდეგ, ტემპერატურული რეჟიმის შეცვლამ (+4^{0}C) **CBL**-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე გავლენა არ იქონია.

3.2. ქრისტესისხლას თესლიდან გამოყოფილი ლექტინის სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ

ლექტინების უნიკალურობას განაპირობებს მათი უნარი მოახდინონ გლიკოკონიუგატების (გლიკოპროტეინები, გლიკოლიპიდები, ოლიგოსაქარიდები და სხვა) რთული მოლეკულების შემადგენლობაში შემავალ ნახშირწყლებში, პირველადი და მეორეული სტრუქტურის სახით ჩაწერილი ინფორმაციის დეკოდირება და ამ ინფორმაციის გადაყვანა შესაბამის ბიოლოგიურ ენაზე.

ლექტინების სპეციფიკურობას, როგორც წესი, განსაზღვრავენ და გამოსახავენ იმ მონო- ან ოლიგოსაქარიდების მიხედვით, რომლებიც იწვევენ ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრების ეკრანირებას და ამის შედეგად თრგუნავენ ლექტინებით გაპირობებულ აგლუტინაციურ რეაქციებს. დადგენილია, რომ ლექტინ-ნახშირწყლის ურთიერთქმედებაში განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება შაქრის პირანოზული ციკლის მე-3 და მე-4 ნახშირბადთან OH-ჯგუფების კონფიგურაციას, რის საფუძველზეც ლექტინები რამდენიმე ძირითად კლასად იყოფა.

ნახშირწყლების მიმართ ლექტინების სპეციფიკურობას ვსწავლობდით ჰაპტენ-ინჰიბიტორული მეთოდის გამოყენებით. ანალიზისათვის ვიყენებდით PBS-ზე დამზადებული მარტივი შაქრების 0,6M ხსნარებს. ცდებში გამოყენებული იყო 20 განსხვავებული ნახშირწყალი: D-გალაქტოზა, მეთილ-D-გალაქტოზა, N-აცეტილ-D-გალაქტოზამინი, D-მანოზა, მეთილ-D-მანოზა, D-გლუკოზა, მეთილ-D-გლუკოზა, L-რამნოზა, N-აცეტილ-D-გლუკოზამინი, L-ფუკოზა, D-გალაქტურონის მჟავა, ფრუქტოზა, N-აცეტილგლუკოზამინის ოლიგომერები (ნაწილობრივ გასუთავებული ქიტინის ჰიდროლიზატი), D-არაბინოზა, L-რიბოზა, D-მელიბიოზა D-ლაქტოზა. D-მალტოზა, D-ტრეგალოზა, საქაროზა.

შაქრის ხსნარს ვტიტრავდით 200 mM-დან კლებადი კონცენტრაციით, სატიტრაციო იმუნოლოგიურ პლანშეტზე. პლანშეტის ყველა ფოსოში თანაბარი კონცენტრაციით (0.000132მგ/მლ) შეგვქონდა ლექტინის ხსნარი ტიტრით 1:4. ჰაპტენის სპეციფიკურობაზე ვმსჯელობდით შაქრის იმ მინიმალური კონცენტრაციის (mM) მიხედვით, რომელიც იწვევდა ლექტინის ჰემაგლუტინაციური აქტივობის დათრგუნვას.

ცხრილი №3–ში წარმოდგენილი მონაცემები გვიჩვენებენ, რომ გამოყენებული შაქრებიდან ქრისტესისხლას ლექტინის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა კავდება მხოლოდ N-აცეტილგლუკოზამინის ოლიგომერების თანაობისას (ნაწილობრივ გასუთავებული ქიტინის ჰიდროლიზატი). მიღებული შედეგები მიუთითებენ, რომ ჩვენს მიერ ქრისტესისხლას თესლიდან გამოყოფილი ლექტინი მიეკუთვნება ქიტინ სპეციფიკური, ჰომოტიპური (ინჰიბირდება ერთი ტიპის ოლიგოსაქარიდით) და ჰოლოლექტინების ანუ ორი ან მეტ ნახშირწყალ-დამკავშირებელ ცენტრის შემცველ ლექტინების კლასს.

ცხრილი №3

CBL ლექტინის სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ

ნახშირწყლები (საწყისი კონცენტრაცია 200 mM)	ჰემაგლუტინაციური აქტივობის ინჰიბირება	ნახშირწყლის მინიმალური მაინჰიბირებელი კონცენტრაცია (mM)
D-გალაქტოზა	_	
მეთილ-D-გალაქტოზა	_	
N-აცეტილ-D-გალაქტოზამინი	_	
D-მანოზა	_	
მეთილ-D-მანოზა	_	
D-გლუკოზა	_	
მეთილ-D-გლუკოზა	_	
L-რამნოზა	_	
N-აცეტილ-D-გლუკოზამინი	_	
L-ფუკოზა	_	
D-გალაქტურონის მჟავა	_	
ფრუქტოზა	_	
N-აცეტილგლუკოზამინის ოლიგომერები (ნაწილობრივ გასუთა–ვებული ქიტინის ჰიდროლიზატი)	+	**1.562**
D-არაბინოზა	_	
L-რიბოზა	_	
D-მელიბიოზა	_	
D-ლაქტოზა	_	
D-მალტოზა	_	
D-ტრეგალოზა	_	
საქაროზა	_	

+ თრგუნავს ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას.

- არ თრგუნავს ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას.

ამრიგად მიღებული შედეგების საფუძველზე შეიძლება გამოვთქვათ მოსაზრება, რომ **CBL**, როგორც ჰოლოლექტინი უკავშირდება რა ერითროციტების ზედაპირზე განლაგებულ N-აცეტილ-გლუკოზამინის ოლიგომერების შემცველ მემბრანულ რეცეპტორებს, წარმოქმნის მეზობელ ერითროციტების უჯრედებს შორის ხიდაკებს და იწვევს მათ შეწებებას ანუ აგლუტინაციას.

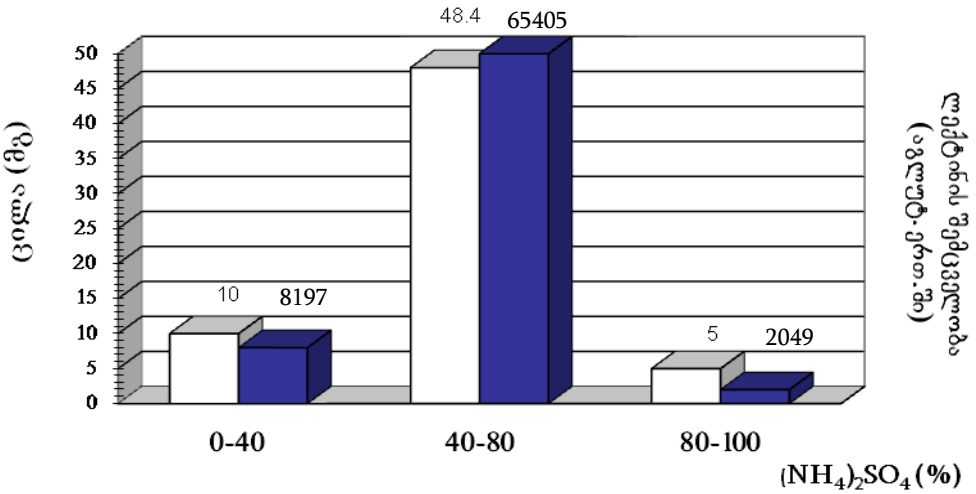
3. 3. ქრისტესისხლას თესლიდან ექსტრაგირებული ლექტინის გასუფთავების ეტაპები

3.3.1. ცილების ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით გამომარილების მეთოდით

ლექტინების გამოყოფა ინდივიდუალური მოლეკულების სახით, აუცილებელი პირობაა მისი შემდგომი ფიზიკურ-ქიმიური დახასიათებისათვის და ფიზიოლოგიური და ბიოლოგიური ფუნქციებისა და მოქმედების მოლეკულური მექანიზმების შესწავლის მიზნით. ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ჩვენ მიზნად დავისახეთ მოგვეხდინა ქრისტესისხლას თესლის ექსტრაქტიდან CBL-ის გასუფთავება და შეგვესწავლა მისი ზოგიერთი ბიოქიმიური მახასიათებლები.

დასახული მიზნის მისაღწევად, ცდების პირველ ეტაპზე ვახდენდით, CBL-ის ნაწილობრივ გასუფთავებას ამონიუმის სულფატით საფეხურებრივი, (როგორც სამეცნიერო ლიტერატურიდანაა ცნობილია), ფრაქციონირების მეთოდით, 0-დან 90%-მდე გაჯერების პირობებში (სურ. 3). გამომარილება წარმოადგენს ფრაქციონირების მაღალეფექტურ მეთოდს, რომელსაც საფუძვლად უდევს მარილის სხვადასხვა კონცენტრაციაზე ცილების შერჩევითი დალექვა. გამომარილების მეთოდი საერთო ცილის დაკონცენტრირებისა და იმავდროულად ნაწილობრივი გასუფთავების საშუალებას იძლევა.

ქრისტესისხლას თესლის ხსნადი ცილების ექსტრაქტს, დალექვის თითოეულ ეტაპზე, თანდათანობით ვუმატებდით მარილის საჭირო რაოდენობას, მუდმივი მორევის პირობებში. ცილის სუსპენზიას ვაყოვნებდით –10^{0}C-ზე 24სთ განმავლობაში, შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით 20 000g-ზე 20წთ +4^{0}C ტემპერატურის პირობებში. ნალექს ვხსნიდით მინიმალური მოცულობის PBS-ში და ვაანალიზებდით ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე. ჭარბი არაორგანული იონების მოცილებას ვახდენდით დიალიზით G-10 სეფადექსის გელ-ფილტრაციულ სვეტზე (50X2.7სმ) ან ულტრაფილტრაციით. სურ.3-ზე ნაჩვენებია ფრაქციონირების თითოეულ ეტაპზე მიღებული ცილის რაოდენობა და ლექტინების შემცველობა.



სურ.3. ქრისტესისხლას თესლის ხსნადი ცილების ექსტრაქტის ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით

□ ცილა (მგ) ■ ლექტინის შემცველობა (აგლუტ. ერთ.-ში)

p<0.001

როგორც სურათი 3-დან ჩანს, ლექტინების მაქსიმალური სპეციფიკური ჰემაგლუტინაციური აქტივობა ვლინდება ფრაქციაში, რომელიც მიიღება ამონიუმის სულფატით 40-80%-ით გაჯერებისას. დალექილი ცილის რაოდენობა და ასევე ლექტინების ხვედრითი წილი ყველაზე მაღალი იყო ფრაქციებში, რომლებიც მიიღებოდა ამონიუმის სულფატით 40-დან 80%-მდე გაჯერების პირობებში. აქედან გამომდინარე, შემდგომ ცდებში ვიყენებდით სწორედ ამ გზით ნაწილობრივ გასუფთავებულ ფრაქციას, რომელშიც **CBL**-ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა შეადგენდა 0.0094 მგ/მლ, ხოლო გასუფთავების ხარისხი დაახლოებით 2.98-ჯერ იზრდებოდა წინა ეტაპთან შედარებით.

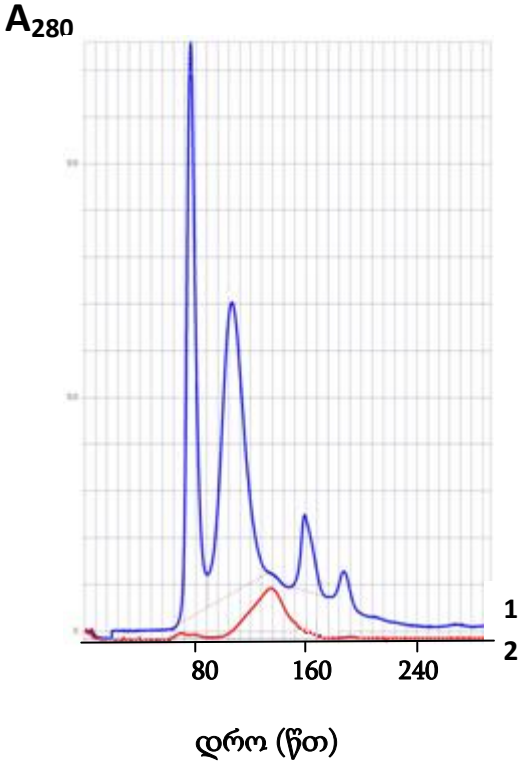
ამრიგად, მიღებული შედეგები მიუთითებენ, რომ ქრისტესისხლას თესლების ექსტრაქტიდან ლექტინების მაქსიმალური გამოლექვა ხდება ამონიუმის სულფატის 40-დან 80%-მდე გაჯერების პირობებში.

CBL-ის შემდგომი გასუფთავების მიზნით, ცდების სერიაში ვახდენდით ამონიუმის სულფატით (40–80%) ნაწილობრივ გასუფთავებული ცილოვანი ფრაქციის თერმულ დამუშავებას (სურ. 10) +60^{0}C ტემპერატურაზე 15 წთ და შემდეგ აცეტონით დამუშავებას –10^{0}C ტემპერატურაზე 3 სთ–ის განმავლობაში. როგორც ცხრილი №4-იდან ჩანს, ცილოვანი ფრაქციის თერმული დამუშავების შემდეგ **CBL**-ის ლექტინური აქტივობა შეადგენდა 0.0028 მგ/მლ, აცეტონით დამუშავების შემდეგ – 0.0011 მგ/მლ, ხოლო

გასუფთავების ხარისხი საწყის ეტაპთან შედარებით იზრდებოდა 10–ჯერ და 25–ჯერ შესაბამისად.

3.3.2. ქრისტესისხლას თესლის ცილების ფრაქციონირება გელ–ფილტრაციის მეთოდით

სამუშაოს მომდევნო ეტაპზე, CBL-ის შემდგომი გასუფთავების მიზნით, ქრისტესისხლას თესლის ცილების ფრაქციონირებას ვახდენდით გელ-ფილტრაციის მეთოდით Toyopearl HW55 სორბენტით დატენილ ქრომატოგრაფიულ სვეტზე (90X3სმ). Toyopearl HW55 სორბენტის დაყოფის დიაპაზონი ცილებისათვის შეადგენს 1-700 kDa.



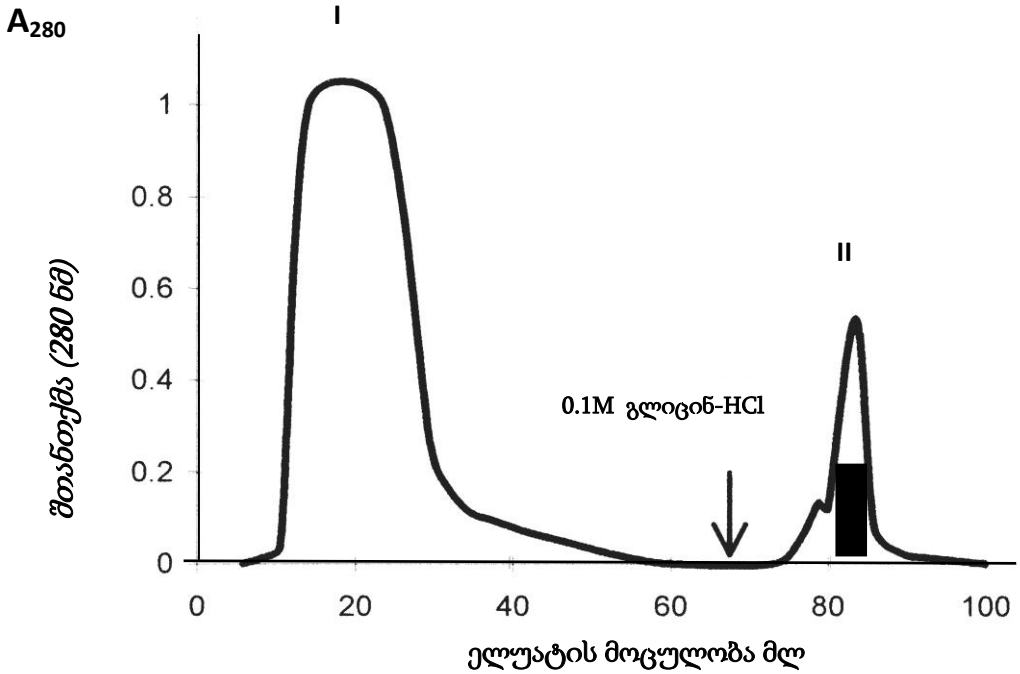
სურ. 4. 1 - ქრისტესისხლას თესლის ექსტრაქტის Toyopearl HW-55 - ის სვეტზე ფრაქციონირების ელუციის პროფილი; 2- ჰემაგლუტინაციური აქტივობა.

სურ.4-ზე წარმოდგენილია Toyopearl HW55 სვეტზე ცილის ფრაქციონირების პროფილი. როგორც სურათიდან და ცხრილი №4–დან ჩანს სვეტიდან ელუირებული 5 განსხვავებული მოლეკულური მასის მქონე ცილოვანი ფრაქციიდან მე–3 ფრაქცია ხასიათდებოდა ჰემაგლუტინაციური აქტივობით და ლექტინური აქტივობა შეადგენდა 0.00027 მგ/მლ.

3.3.3. ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის (CBL) გასუფთავება აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდით

CBL-ის გასუფთავების შემდგომ ეტაპზე, გელ-ფიტრაციის შედეგად მიღებულ ლექტინების შემცველ ფრაქციას ვუშვებდით აფინური ქრომატოგრაფიის სვეტზე ქიტინის სორბენტის გამოყენებით.

აფინური ქრომატოგრაფია დღეისათვის წარმოადგენს ბიომოლეკულების გასუფთავების ყველაზე ფართოდ გამოყენებულ მეთოდს, რომელიც საშუალებას იძლევა გამოვყოთ ნაერთები მათი სპეციფიკური დამკავშირებელი თვისებების საფუძველზე და მივიღოთ მაღალი ხარისხის სისუფთავის პრეპარატები.



სურ. 5. ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ქიტინის სვეტზე აფინური ქრომატოგრაფიის პროფილი

I – PBS ბუფერით ელუირებული ცილების ფრაქცია;
II – 0.1M გლიცინ-HCl-ით ელუირებული ლექტინური ფრაქცია;
■ _ ლექტინური აქტივობა

ქიტინის აფინურ სორბენტზე იმობილიზებული ცილის ელუციას ვახდენდით 0.1M გლიცინ-HCl ხსნარით (სურ.5). ელუირებულ ხსნარს ვადიალიზებდით ულტრაფილტრაციის მეთოდით, წნევის ქვეშ, amicon-ის საფილტრაციო აპარატში

(Millipore 10000NMWL მემბრანა). ამ მეთოდის საშუალებით ვაღწევდით ცილის ხსნარების სწრაფ დაკონცენტრირებასა და დიალიზს.

როგორც ცხრილი №4-იდან ჩანს მიღებული **CBL** ჰემაგლუტინაციური აქტივობა შეადგენდა 0.000022 მგ/მლ-ს, რაც დაახლოებით 1200-ჯერ და მეტად აღემატებოდა საწყისი ხსნადი ფრაქციის ანალოგიურ მაჩვენებელს (0.028 მგ/მლ), და მიუთითებდა მოცემული ლექტინის გამორჩეულად მაღალ აქტივობაზე და მისი გასუფთავების მაღალ ხარისხზე.

სვეტიდან ჩამოხსნილ ფრაქციებს ვაკონცენტრირებდით, ვადიალიზებდით (წყლის მიმართ) და ლიოფილურად ვაშრობდით. **CBL**-ის გამოსავალი 1გ მშრალ თესლზე გადაანგარიშებით, შეადგენდა 42–55 მგ. ფრაქციონირების სხვადასხვა ეტაპზე ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის გასუფთავების ხარისხი მოცემულია ცხრილ №4-ში.

ცხრილი №4

გასუფთავების სხვადასხვა ეტაპზე ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის გასუფთავების ხარისხი

CBL-ის გასუფთავების ძირითადი ეტაპები	CBL -ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა (მგ/მლ)	გასუფთავების ხარისხი ყოველ მომდევნო ეტაპზე წინა ეტაპთან შედარებით	გასუფთავების ხარისხი საწყის ეტაპთან შედარებით
ექსტრაქტი	**0.028**	0	**0**
ამონიუმის სულფატით ფრაქციონირება	**0.0094**	3	**2.98**
თერმო დამუშავება	**0.0028**	3.4	**10**
აცეტონით დამუშავება	**0.0011**	2.55	**25**
ქრომატოგრაფია Toyopearl HW-55 -ის სვეტზე	**0.00027**	4	**103**
აფინური ქრომატოგრაფია ქიტინის სვეტზე	**0.000022**	12.3	**1 272**

$p<0.01$

როგორც ცხრილი №4-დან ჩანს, ქრისტესისხლას ლექტინის გასუფთავების ძირითადი ეტაპები მოიცავს 6 სტადიას:

1. თესლიდან ცილოვანი ექსტრაქტის მიღება;

2. ცილების ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით;

3. თერმული დამუშავება +60^{0}C-ზე 15 წთ-ის განმავლობაში;

4. აცეტონით დამუშავება;

5. ქრომატოგრაფია Toyopearl HW-55-ის სვეტზე;

6. აფინური ქრომატოგრაფია ქიტინის სვეტზე.

სურ. 6. ლექტინ CBL-ის გასუფთავების სრული სქემა

ქრისტესისხლას თესლები

↓

ჰომოგენიზაცია

ბლენდორში 3 წთ.

ნედლეული + საექტსტრაქციო ხსნარი (1გ/40მლ)

↓

ექსტრაქცია

მაგნიტურ სარეველაზე 15 წთ.

↓

ამონიუმის სულფატით დალექვა

40–80% გაჯერება

↓

თერმოდამუშავება

60^{0}C ტემპერატურაზე 15 წთ.

↓

აცეტონით დამუშავება

ფილტრატი + ცივი აცეტონი V/V=1/5

შენახვა -10^0 ტემპერატურაზე 3 სთ.

↓

ქრომატოგრაფია

Toyopearl HW-55 -ის სვეტზე

↓

აფინური ქრომატოგრაფია

ქიტინის სვეტზე

↓

სტერილიზაციური ფილტრაცია

მილიპორის მემბრანული ფილტრი (0.22 μm)

↓

ლიოფილიზაცია

48 სთ.

↓

ლექტინ CBL ინდივიდუალური მოლეკულების ლიოფილიზირები ფხვნილი

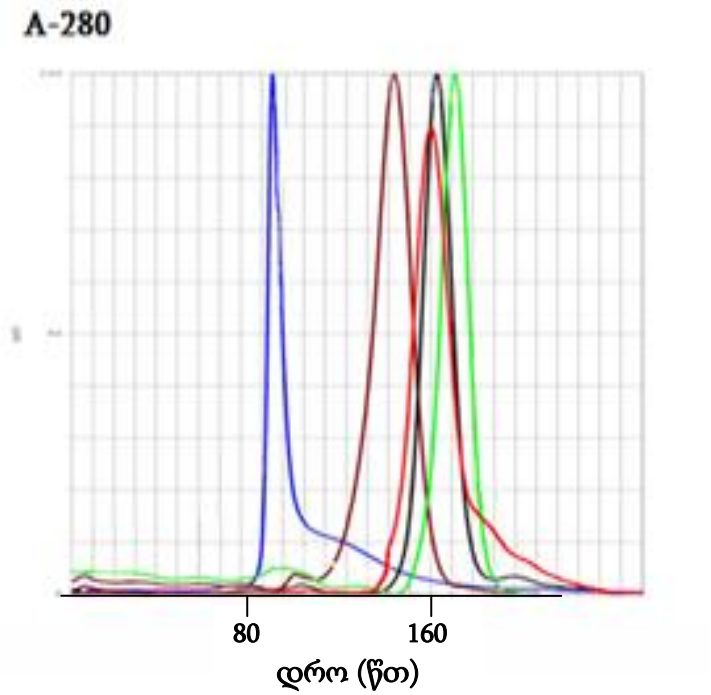
გასუფთავების ყოველ მომდევნო ეტაპზე **CBL**-ის შემცველი ცილოვანი

ფრაქციების ჰემაგლუტინაციური აქტივობა იზრდება. შესაბამისად იზრდება CBL-ის გასუფთავების ხარისხიც. ბოლო ეტაპის შემდეგ CBL-ის ლექტინური აქტივობა შეადგენს 0.000022 მგ/მლ. ხოლო გასუფთავების ხარისხი 1 272 -ჯერ გაიზარდა. წარმოდგენილი მონაცემები მიუთითებენ, რომ ჩვენს მიერ შემუშავებული მეთოდით, ქრისტესისხლას თესლებიდან ინდივიდუალური მოლეკულების სახით, მიღებული ლექტინი CBL გასუფთავებული იქნა 1272-ჯერ.

3.4. ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ზოგიერთი ფიზიკურ-ქიმიური თვისების შესწავლა

3.4.1. CBL-ის პოლიპეპტიდური შედგენილობისა და მოლეკულური მასების შესწავლა ქრომატოგრაფიული და პოლიაკრილამიდის გელში ანალიზური ელექტროფორეზის მეთოდებით

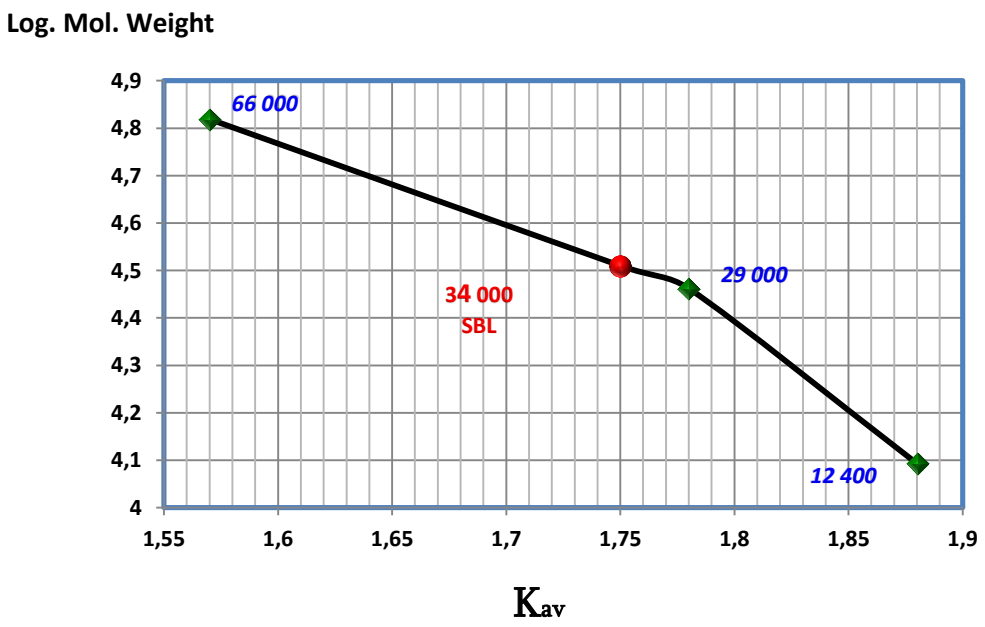
კვლევის შემდგომ ეტაპზე, გელ-ფილტრაციის მეთოდის და საკალიბრო სტანდარტული ცილების (მარკერების) გამოყენებით, დადგენილ იქნა აფინურად გასუფთავებული CBL-ის ნატიური მოლეკულური მასა (სურ. 7).



ლურჯი დექსტრანი 2. 000. 000 Da
ხარის შრატის ალბუმინი 66.000Da
კარბოანჰიდრაზა 29.000 Da
ციტოქრომი C 12.400 Da
CBL

სურ. 7. Toyopearl HW-55 სვეტზე საკალიბრო მარკერული ცილებისა და აფინური ქრომატოგრაფიით გასუფთავებული ლექტინ CBL-ის ელუციის პროფილი.

როგორც სურათი 7-ზე წარმოდგენილი ქრომატოგრაფიის პროფილი გვიჩვენებს აფინურად გასუფთავებული **CBL**-ის ფრაქცია (წითელი მრუდი) სვეტიდან ელუირდება მარკერული ცილების კარბოანჰიდრაზას (29.000 Da) და ალბუმინს (66.000 Da) შორის.სურ. 8-ზე წარმოდგენილია საკალიბრო მარკერული ცილების ქრომატოგრაფიის ელუციის პროფილის მიხედვით აგებული საკალიბრო მრუდი, რომელიც გამოყენებულ იქნა **CBL**-ის ნატიური მოლეკულის, მოლეკულური მასის განსაზღვრისათვის. საკალიბრო მრუდის გათვლების მიხედით დადგენილია, რომ ნატიური **CBL**-ის მოლეკულური მასა შეადგენს **34. 000 Da.**



სურ. 8. საკალიბრო მრუდი მარკერული ცილებისა (ხარის შრატის ალბუმინი 66.000 Da, კარბოანჰიდრაზა 29.000 Da, ციტოქრომი C 12.400 Da) და აფინური ქრომატოგრაფიით გასუფთავებული CBL-ისათვის, აგებული ანალიტიკურ Toyopearl HW-55 სვეტზე ქრომატოგრაფიის ელუციის პროფილების მიხედვით.

Kav -ცილის განაწილების კოეფიციენტი

სამუშაოს შემდგომ ეტაპზე შესწავლილ იქნა ქრისტესისხლას თესლიდან გამოყოფილი ლექტინის პრეპარატის სისუფთავე, პოლიპეპტიდური შედგენილობა და

მოლეკულური მასები პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელში ელექტროფორეზის მეთოდით.

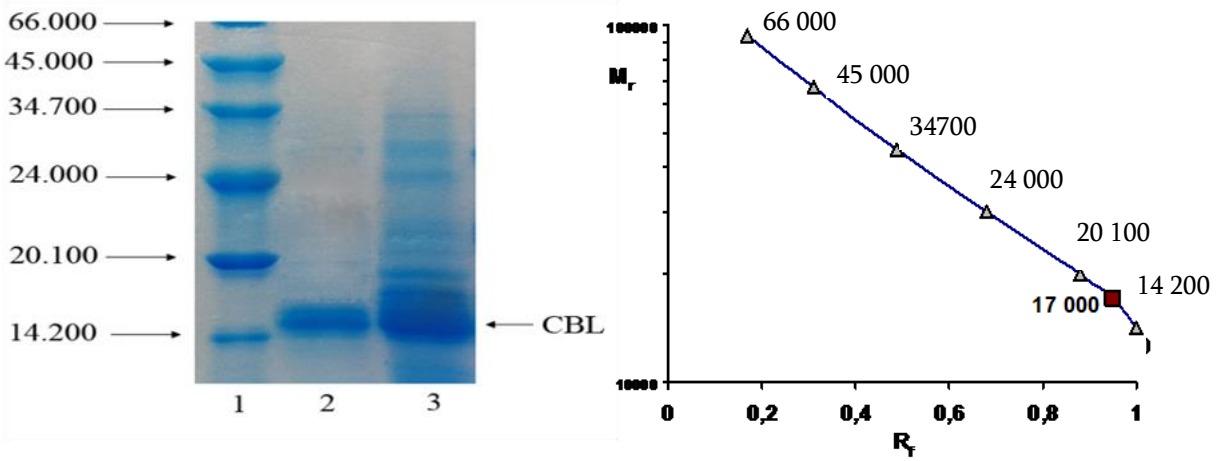
გელ–ფილტრაციური ქრომატოგრაფიით დადგენილ იქნა, რომ აფინურად გასუფთავებული **CBL** ლექტინის მოლეკულური მასა შეადგენდა 34 000 Da-ს. ასევე დადგენილ იქნა (პოლიაკრილამიდის 5-25% გელში გრადიენტული ელექტროფორეზის მეთოდით, ნატიურ პირობებში), რომ ქიტინის სვეტზე გასუფთავებული ლექტინის (**CBL**) პრეპარატი, გელში მიგრირებდა 34 000 Da მოლ. მასის შესაბამისი ერთი, მსხვილი ზოლის სახით. პრეპარატულ ელექტროფორეზში ვახდენდით ზოლების ამოჭრას და შესაბამისი ცილის ლექტინური აქტივობის შემოწმებას. ნაჩვენები იქნა, რომ ფრაქციები ავლენდა ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას.

CBL-ის მეოთხეული სტრუქტურის დასადგენად, ცდების შემდგომ ეტაპზე ვახდენდით ნატიური **CBL**-ის მოლეკულების დენატურაციას ნატრიუმის დოდეცილსულფატის თანაობისას (SDS) და ვსაზღვრვდით მისი შემადგენელი სუბერთეულების მოლეკულურ მასებს და რაოდენობას ელექტროფორეზის მეთოდით პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელში (10-25%), საკალიბრო სტანდარტული ცილების (მარკერების) გამოყენებით (სურ. 9).

სურ. 9-ზე წარმოდგენილ ელექტროფორეგრამის პირველ ტრეკზე ნაჩვენებია ცნობილი მოლეკულური წონის მარკერების მიგრირების პროფილი. მე-3 ტრეკზე წარმოდგენილია გასუფთავების მესამე ეტაპის გამოყენებით მიღებული ცილების ფრაქციის მიგრირების პროფილი, სადაც თვალნათლივ ჩანს, რომ აღნიშნული ფრაქცია წარმოადგენს ნაწილობრივ გასუფთავებულ **CBL**-ს, რომლის წილი საკმაოდ მნიშვნელოვანია აღნიშნული ცილების ფრაქციაში. ტრეკი 2 გვიჩვენებს, რომ აფინური ქრომატოგრაფიის შედეგად გასუფთავებული **CBL** დისოცირებულ პირობებში მიგრირებს ერთი კომპაქტური ზოლით, რაც ადასტურებს, რომ იგი წარმოადგენს გასუფთავების შედეგად მოღებულ **CBL**-ის თანაბარი მოლეკულური წონის პოლიპეპტიდებს. საკალიბრო მრუდის მიხედვით დადგენილ იქნა, რომ **CBL**-ის შემადგენელი სუბერთეულების მოლეკულური მასა თანაბარია და შეადგენს 17.000 **Da.**

ამრიგად, შემუშავებულია ქრისტესისხლას თესლებიდან ქიტინ სპეციფიკური **CBL** ლექტინის გამოყოფისა და გასუფთავების მეთოდი. აღნიშნული მეთოდით ინდივიდულაური მოლეკულების სახით მიღებული **CBL**-ის ჰემაგლუტიონაციური

აქტივობა შეადგენს 0.000022 მგ/მლ-ს, ხოლო მისი გასუფთავების ხარისხი 1272. გელფილტრაციის და ელექტროფორეზის მეთოდების გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ მისი ნატიური მოლეკულის მასა შეესაბამება 34 000 Da, შედგება ორი თანაბარი 17 000 Da მოლეკულური მასის მქონე პოლიპეპტიდური სუბერთეულისაგან.



სურ. 9. სტანდარტული მარკერული ცილებისა და ლექტინ CBL-ის პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელში (10-25%), SDS-ის თანაობისას, ელექტროფორეზის ელექტროფორეგრამა.

1. მარკერები, მოლეკულური წონების დიაპაზონი 14 000–70 000 Da, გელში ჩატვირთული სინჯების მოცულობაა 1-10 მკლ. (ხარის შრატის ალბუმინი - 66 000; ოვალბუმინი - 45 000; პეპსინი - 34,700; ტრიფსინოგენი - 24 000; β-ლაქტოგლობულინი - 20 100; ლიზოციმი - 14 200.
2. ლექტინი **CBL** აფინური ქრომატოგრაფიით გასუფთავებული.
3. ლექტინი **CBL**-ის შემცველი ცილების ფრაქცია მიღებული Toyopearl HW-55 სვეტზე გელფილტრაციული ქრომატოგრაფიის შედეგად.
4. სტანდარტული მარკერული ცილების საკალიბრო მრუდი, ■ – **CBL** პოლიპეპტიდი.

აღსანიშნავია, რომ ჩვენს მიერ იზოლირებული **CBL**-ი განსხვავდება რიგი ავტორების მიერ (Amal K. Maji, 2015) ქრისტესისხლას თესლიდან, განსხვავებული მეთოდებით იზოლირებული ლექტინებისაგან, ფიზიკურ-ქიმიური და სტრუქტურული ორგანიზაციის მახასიათებლებით.

კერძოდ რიგი ავტორების მიერ (რომლებიც ქრისტესისხლას თესლებიდან ლექტინების გამოსაყოფად განსხვავებულ მეთოდს იყენებდნენ (Peumans W. J., 1984) ნაჩვენებია, რომ მათ მიერ შემუშავებული მეთოდით გამოყოფილი ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ნატიური მოლეკულის მასა შეადგენს 21 000 Da-ს და შედგება 2 განსხვავებული - 11 500 Da და 9 500 Da მოლეკულური მასის მქონე სუბერთეულებისაგან.

ამრიგად, მიღებული შედეგების და სამეცნიერო ლიტერატურაში არსებული მონაცემების საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ქრისტესისხლას (*Chelidonium majus*) თესლებიდან, ჩვენს მიერ შემუშავებული მეთოდით მიღებულია ახალი, ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინი **CBL**. მისი ნატიური მოლეკულის მეოთხეული სტრუქტურა წარმოდგენილია დიმერის სახით, შედგება 2 თანაბარი მოლეკულური მასის მქონე პეპტიდური სუბერთეულისაგან და მიეკუთვნება ჰოლოლექტინების კლასს.

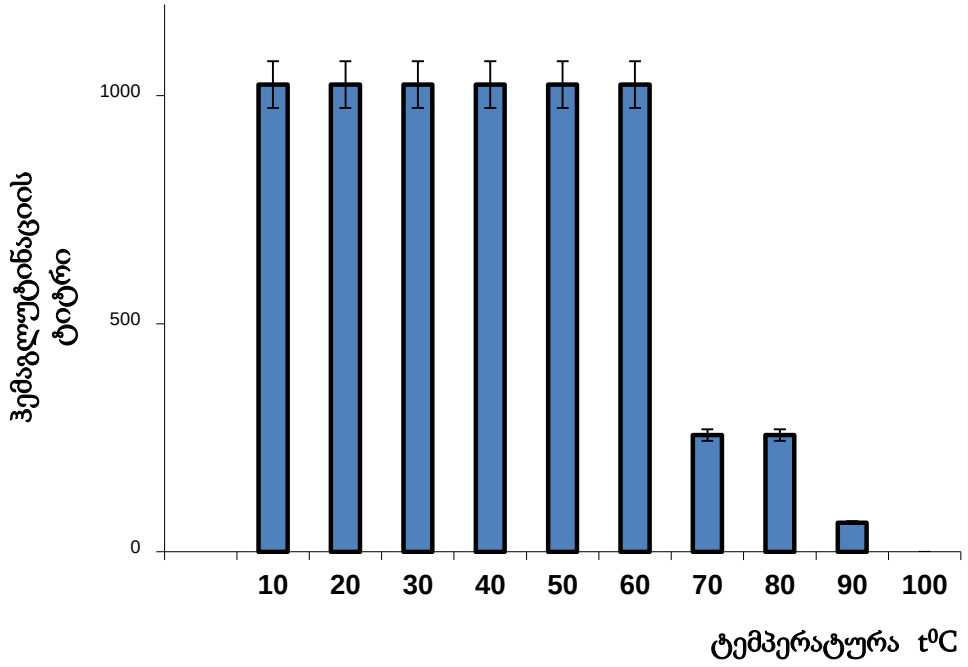
3.4.2. ტემპერატურის გავლენა ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე

კვლევის შემდგომ ეტაპზე შესწავლილ იქნა ლექტინის CBL-ის ინდივიდუალური მოლკულების ბიოქიმიური მახასიათებლები.

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ ლექტინების უმრავლესობა თერმოსტაბილურობით ხასიათდება. ამ თვისებას ხშირ შემთხვევაში იყენებენ მათი გასუფთავების მიზნით, რადგან ლექტინების მდგრადობა აადვილებს მათ დაცილებას შედარებით თერმოლაბილური ბალასტი ცილებისაგან.

ცდების შემდგომ სერიაში შევისწავლეთ **CBL** ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე ტემპერატურის გავლენა, როგორც სურ. 10-იდან ჩანს **CBL** გამოირჩევა თერმოსტაბილურობით და აქტივობას სრულად ინარჩუნებს 60^{0}C-ზე 30 წთ-ის განმავლობაში. ტემპერატურის შემდგომი გაზრდისას აღინიშნება ლექტინის ინაქტივაცია, 100^{0}C-ზე კი ჰემაგლუტინაციური აქტივობა სრულად კავდება (სურ.9).

ამრიგად, მიღებული შედეგები მიუთითებენ, რომ ლექტინი **CBL** მიეკუთვნება თერმოსტაბილური ცილების კლასს.



სურ.10. ტემპერატურის გავლენა ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის (CBL) ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე

სამეცნიერო ლიტერატურიდან ასევე ცნობილია, რომ რიგი ლექტინები არამდგრადია და დაბალ ტემპერატურაზე კარგავს აქტივობას. კრიოზემოქმედების შედეგად ხშირ შემთხვევაში ადგილი აქვს ცილის მოლეკულების შეუქცევად დაზიანებას მექანიკური და სხვადასხვა ფიზიკურ-ქიმიური ფაქტორების გავლენით.

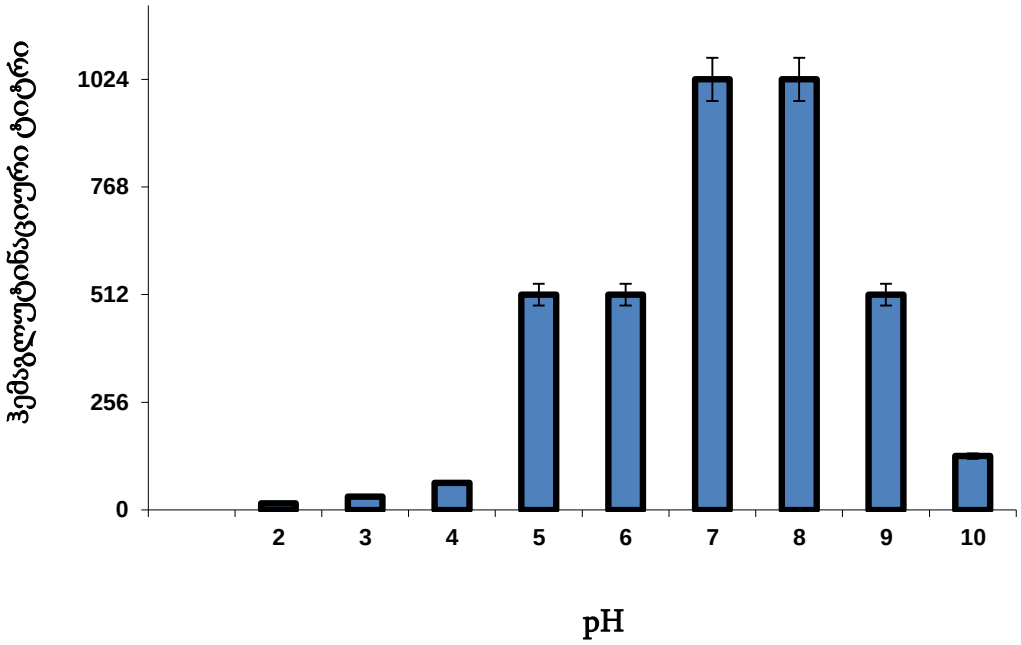
ზემოთქმულიდან გამომდინარე სპეციალურ ცდებში ვსწავლობდით დაბალი ტემპერატურის გავლენას CBL-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე. ექსპერიმენტების შედეგად გამოვლენილ იქნა, რომ ქრისტესისხლას ექსტრაქტების გაყინვისას (-10°C-ზე) და შემდგომი გალღობის შედეგად, ხსნარის ექსტრაქტის ჰემაგლუტინაციური აქტივობის მაჩვენებლი არ იცვლებოდა, რაც მიუთითებდა დაბალი ტემპერატურების მიმართ ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის მდგრადობაზე.

3.4.3. H^+- იონების კონცენტრაციის გავლენა ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე

სამეცნიერო ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია, რომ H^+-იონების კონცენტრაცია გავლენას ახდენს არა მხოლოდ პოლიპეპტიდური ჯაჭვის სხვადასხვა ჯგუფების იონიზაციის ხარისხზე, არამედ მთლიანად ცილის მოლეკულის სტრუქტურულ-ფუნქციონალურ მდგომარეობაზე.

ჩვეულებრივ, მცენარეული ლექტინები აქტივობას ავლენს pH-ის ფართო დიაპაზონში, აქტივობის მაქსიმუმით - ნეიტრალურ არეში. თუმცა, არსებობს ლექტინები, რომლებიც მაქსიმალურ აქტივობას ავლენს H^+-იონთა კონცენტრაციის მაღალ მნიშვნელობაზე (pH–3), რაც უშუალო კავშირშია მათ ფიზიოლოგიურ როლთან.

ზემოთქმულიდან გამომდინარე ცდების შედგომ სერიაში შევისწავლეთ წყალბადიონთა კონცენტრაციის გავლენა **CBL**-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე pH 2,0 – 10,0-ის ფარგლებში. მიღებული შედეგები ნაჩვენებია სურ. 11-ზე. როგორც სურათიდან ჩანს **CBL** მაქსიმალურ ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას ავლენს **pH 7.0–8.0**–ის ფარგლებში.



სურ.11. pH-ის გავლენა ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის CBL-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე.

3.4.4. ორვალენტიანი იონების გავლენა CBL-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე

ლექტინების აგლუტინაციური აქტივობის გამოსავლენად ხშირ შემთხვევაში მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ ორვალენტიანი იონები, რომლებიც ზოგიერთი მონაცემის თანახმად, იწვევს ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრის და მთლიანი მოლეკულის სტაბილიზაციას.

შესაბამისად სპეციალურ ცდებში შევისწავლეთ ჩვენს მიერ გამოყოფილი ლექტინ **CBL**-ის აგლუტინაციურ აქტივობაზე Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}-ის აგრეთვე EDTA-ას გავლენას. ქრისტესისხლას თესლის ლექტინების შემცველი ხსნადი ცილების ექსტრაქტს, ამონიუმის სულფატით დალექვისა და გამომარილების შემდეგ, ორვალენტიანი იონების მოცილების მიზნით ვადიალიზებდით 0.9% NaCl და 20 mM EDTA-ს შემცველი ხსნარის მიმართ. დიალიზატს ვამოწმებდით ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე და ვიკვლევდით Ca^{2+}, Mn^{2+} და Mg^{2+}-ის იონების გავლენას (საბოლოო კონცენტრაცია 5 mM) **CBL**-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე. აღმოჩნდა, რომ 20 mM EDTA-ს ხსნარში დიალიზი, რომელიც იწვევდა ორვალენტიანი კათიონების შებოჭვას, ასევე ზემოხსენებული იონების დამატება საბოლოო კონცენტრაციით 5 mM არ ახდენდა გავლენას ლექტინი **CBL**-ის ლექტინურ აქტივობაზე.

ამრიგად მიღებული შედეგების საფუძველზე გაკეთებული იქნა დასკვნა, რომ ჩვენს მიერ გამოყოფილი ლექტინის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა არ მოითხოვს ორვალენტიანი კათიონების თანაობას, თუმცა ეს საბოლოოდ არ გამორიცხავს ლექტინის მოლეკულაში მტკიცედ ბმული კათიონის არსებობას.

3.4.5. ქრისტესისხლას თესლის ლექტინში (CBL) ნახშირწყლების შემცველობა

ცნობილია, რომ მცენარეული ლექტინების უმრავლესობა გლიკოპროტეინული ბუნებისაა ანუ შეიცავენ კოვალენტურად დაკავშირებულ ნახშირწყლოვან კომპონენტს. აღნიშნულიდან გამომდინარე, შევისწავლეთ ლექტინ **CBL**-ის მოლეკულაში შაქრის შემცველობა შიფის რეაგენტის გამოყენებით. ექსპერიმენტების შედეგებმა

დაადასტურეს, რომ ლექტინი CBL არ შეიცავს ნახშირწყლებს და შესაბამისად არ მიეკუთვნება რთული ცილების - გლიკოპროტეინების კლასს.

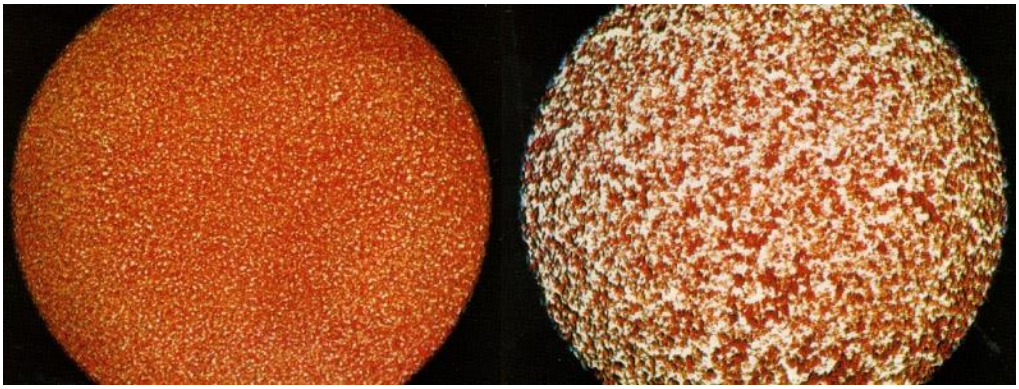
3.5. ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის (CBL) ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა

ჩვენი სამუშაო პროგრამა ითვალისწინებს კვლევის ობიექტად არჩეული მცენარის შესწავლას ორი ძირითადი მიმართულებით, რომელიც მოიცავდა კვლევებს: პირველი – ფუნდამენტური მიმართულებით, კერძოდ ფიზიოლოგიური როლის შესწავლას მცენარე ქრისტესისხლაში; და მეორე – გამოყენებითი მიმართულებით, ახალი მცენარეული ლექტინის ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლას. აღნიშნული კვლევების მიზანს წარმოადგენდა, ახალი მცენარეული პოლიპეპტიდების კლინიკურ მედიცინაში (როგორც სამკურანალო და სადიაგნოსტიკო საშუალებებად), სოფლის მეურნეობაში (როგორც ფიზიოლოგიური პროცესების რეგულატორების და პათოგენური მიკრობების და გარემოს მავნე ფაქტორებისაგან დამცავ საშუალებებად), ბიოლოგიასა და ბიოტექნოლოგიის და სხვა სფეროებში (როგორც კვლევის ინსტრუმენტებად) დანერგვის პერსპექტივის გამოვლენას.

3.5.1. ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ჰემაგლუტინაციური თვისებები

ცდების შემდგომ სერიაში შესწავლილ იქნა CBL-ის ჰემაგლუტინაციური თვისებები. ჰემაგლუტინაციის ტესტში ძირითადად იყენებდნენ ბოცვრის ნატიურ და ტრიფსინით დამუშავებულ ერითროციტებს, ვინაიდან ისინი განსაკუთრებული მგრძნობელობით გამოირჩევა სხვა ორგანიზმების ერითროციტებთან შედარებით. თუმცა, არსებობს ლექტინები, რომლებიც არ ავლენს აქტივობას ბოცვრის ერითროციტების მიმართ და იწვევს, მაგალითად ცხვრის, ვირთაგვის, ადამიანისა და სხვ. ერითროციტების აგლუტინაციას. ძუძუმწოვრების უჯრედების გამოყენებით ლექტინის დამკავშირებელი თვისებების შესწავლას, როგორც წესი მიმართავენ მისი ბიოლოგიური აქტივობის და იმუნოლოგიური კვლევის ინსტრუმენტის სახით გამოყენების პოტენციალის შესაფასებლად. გარდა ამისა, პრაქტიკული მნიშვნელობა

აქვს ლექტინების სპეციფიკურ ურთიერთქმედებას ადამიანის სისხლის სხვადასხვა ჯგუფის ერითროციტების მიმართ. ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია, რომ რიგი ლექტინები ხასიათდება სეროლოგიური სპეციფიკურობით და გააჩნია პრაქტიკული გამოყენება. აქედან გამომდინარე, ჩვენთვის საინტერესო იყო ქრისტესისხლას თესლიდან იდენტიფიცირებული ლექტინის აგლუტინაციური თვისებების შესწავლა, რომელსაც ვაკვირდებოდით 96 ფოსოიან იმუნოლოგიურ პლანშეტებზე და მიკროსკოპის ქვეშ (40 ჯერადი გადიდებით). სურ. 12–ზე და სურ. 13–ზე ნაჩვენებია ლექტინის (CBL) მიერ ბოცვრის ტრიფსინიზირებული ერითროციტების აგლუტინაცია. როგორც უკვე ავღნიშნეთ, ქრისტესისხლას ლექტინის მინიმალური კონცენტრაცია, რომელიც ახდენდა ბოცვრის ტრიფსინიზირებული ერითროციტების აგლუტინაციას ტესტში შეადგენდა 0.000022მგ/მლ–ს.

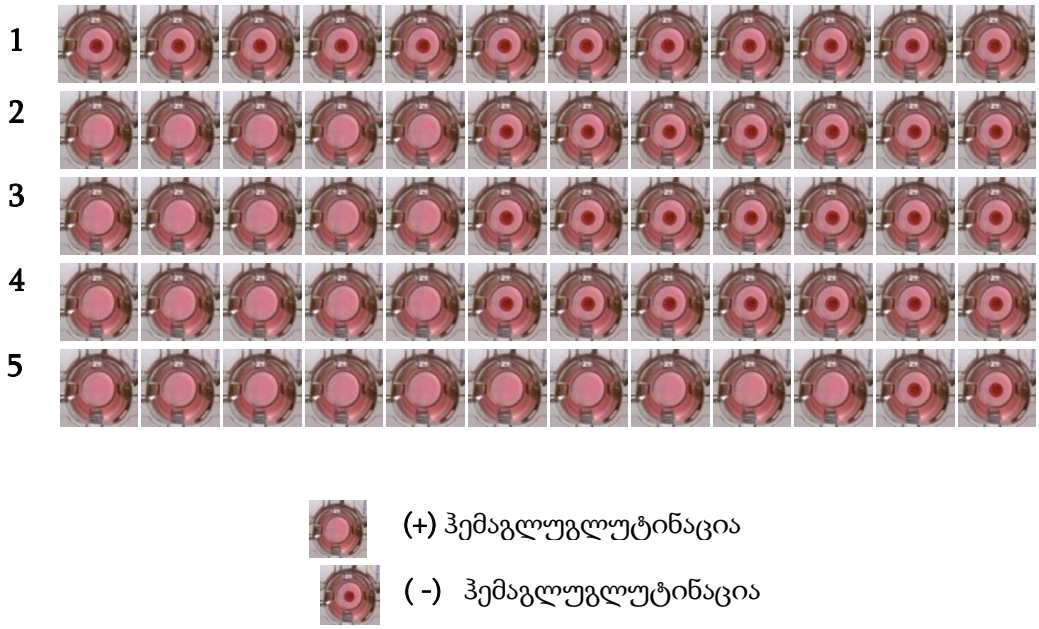


კონტროლი	საცდელი
ლექტინების გარეშე ერიტროციტების დიფუზიური განლაგება.	ლექტინებით განპირობებული ერიტროციტების შეწებება ანუ აგლუტინაცია.

სურ. 12. ქრისტესისხლას ექსტრაქტების ჰემაგლუტინაციური აქტივობის ვიზუალური ფიქსაცია მიკროსკოპით (გადიდება 40-ჯერ).

ამრიგად, ყველაზე მაღალი ჰემაგლუტინაციური აქტივობა და ლექტინების შემცველობა ფიქსირდება ქრისტესისხლადან მიღებულ ხნადი ცილების ექსტრაქტში, რომელიც მიიღება მე-4 ექსტრაგენტის: PBS+0,5mM β-მერკაპტოეთანოლი (pH 7,4) გამოყენების შემთხვევაში, რაც უდავოდ განპირობებულია მის შემადგენლობაში შემავალი β-მერკაპტოეთანოლის მოქმედებით. როგორც ცნობილია აღნიშნული ნაერთი

წარმოადგენს ფენოლების დამჟანგავი ფერმენტების ინჰიბიტორს, ასევე ცილების სულფჰიდრილური (-SH) ჯგუფების აღმდგენელს და შესაბამისად იცავს ცილებს დაჟანგვისა და ინაქტივაციის პროცესებისაგან.

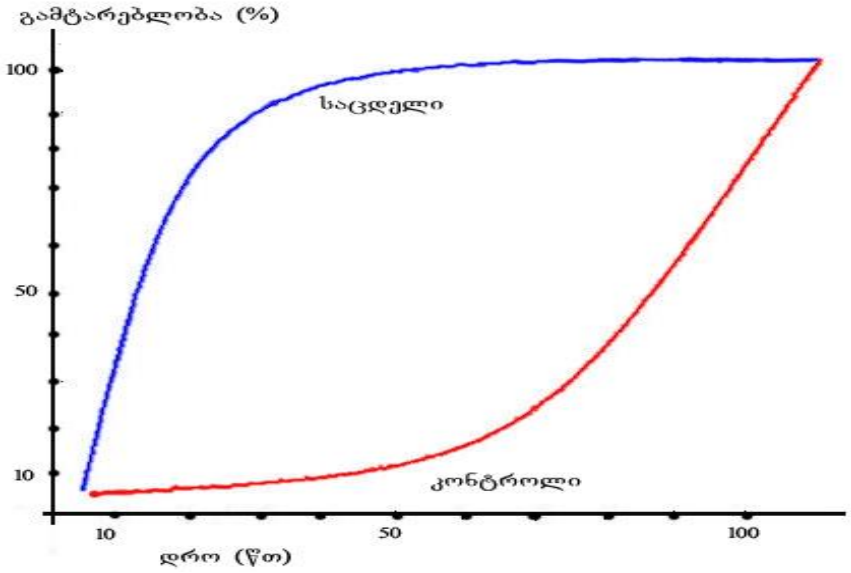


სურ.13. ქრისტესისხლას ექსტრაქტების ჰემაგლუტინაციური აქტივობის ვიზუალური ფიქსაცია იმუნოლოგიურ პლანშეტზე ტაკაჩის მეთოდის გამოყენებით.

1. კონტროლი - ლექტინის გარეშე
2. ლექტინების თანაობისას, ექსტრაგენტი: PBS (0,9%NaCl + 0,04M KH_2PO_4, pH 7,4)
3. ლექტინების თანაობისას, ექსტრაგენტი: PBS (pH 5,0)
4. ლექტინების თანაობისას, ექსტრაგენტი: PBS + 0,5mM PMSF (pH 7,4)
5. ლექტინების თანაობისას, ექსტრაგენტი: PBS+0,5mM β-მერკაპტოეთანოლამინი (pH 7,4)

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ ტაკაჩის მიკროტიტრაციის მეთოდით ლექტინური აქტივობის ვიზუალურად განსაზღვრისას ხშირ შემთხვევაში ფიქსირდება მოჩვენებითი ჰემაგლუტინაცია. კერძოდ ცნობილია, რომ ასეთი სახის არტეფაქტები შეიძლება გამოიწვიოს პოლისაქარიდებმა, ფენოლურმა ნაერთებმა და თვით შეუმჩნევლად დაზიანებულმა იმუნოლოგიურმა პლანშეტებმაც. აქედან გამოდინარე არსებობს საშიშროება, რომ გაკეთებული იქნას მცდარი დასკვნა საკვლევ ობიექტში ლექტინების არსებობის შესახებ. აღნიშნულის თავიდან ასაცილებლად ჰემაგლუტინაციას, ტაკაჩის მიკროტიტრაციის მეთოდის გარდა, ვსაზღვრავდით ჩვენს

მიერ შემუშავებული **ჰემაგლუტინაციური აქტივობის განსაზღვრის ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით,** რომელიც გვიჩვენებდა ჰემაგლუტინაციური პროცესის კინეტიკას (სურ. 14).



სურ. 14. ქრისტესისხლას ლექტინით (CBL) ერითროციტების ჰემაგლუტინაციური აქტივობის კინეტიკა.

- საკონტროლო – ტრიპსინიზებული ერითროციტები ლექტინების გარეშე;
- საცდელი - ტრიპსინიზებული ერითროციტები ლექტინების თანაობისას.

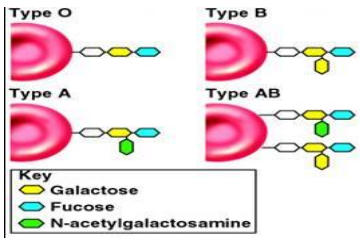
სურ. 14–იდან ჩანს, რომ საკონტროლოში (ერითროციტები ლექტინების გარეშე) და საცდელში (ერითროციტები ლექტინების თანაობისას) ერითროციტების დალექვის კინეტიკა რეციპროკული ხასიათისაა. კერძოდ, საცდელში სხივის გამტარებლობა სწრფად იზრდება და აღწევს მაქსიმუმს (100%) უკვე 30 წუთის, ხოლო საკონტროლოში იგივე მაჩვენებელი კი ფიქსირდება მხოლოდ 1 სთ და 40 წთ–ის შემდეგ. ეს შედეგი იმაზე მიგვანიშნებს, რომ **CBL**-ით ბოცვრის ტრიპსინიზებული ერითროციტების აგლუტინაციის პროცესში სწრაფად მატულობს სინათლის გატარების სპექტროფოტომეტრული მაჩვენებელი. აღნიშნული გამოწვეულია საცდელ ხსნარში ქრისტესიხლას ლექტინით (**CBL**) ერითროციტების აგლუტინაციით და აქედან გამოწვეული შეწებებული ერითროციტების დიდი ჯგუფის სწრაფი დალექვით, რაც თავის მხრივ სწრაფად ზრდის ერითროციტების სუსპენზიის გამტარებლობას და

დამოკიდებულია ლექტინის აქტივობაზე. მიღებული შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ **CBL** ხასიათდება მაღალი ჰემაგლუტინაციური აქტივობით.

სპეციალურ ცდებში შესწავლილ იქნა **CBL**-ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა ადამიანის სისხლის A, B, AB და O ჯგუფების ნატიური და ტრიფსინიზირებული ერითროციტების მიმართ, რასაც პრინციპული მნიშვნელობა ენიჭება, სამედიცინო პრაქტიკაში გამოყენების მიზნით (ცხრილი №5).

ცხრილი №5

CBL–ის გავლენა ადამიანის სისხლის ჯგუფების ნატიურ და ტრიფსინიზირებულ ერითროციტების აგლუტინაციაზე.

ადამიანის სისხლის ჯგუფები		ერითროციტები	CBL- ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა მგ/მლ
	**I (0)**	ნატიური	–
		ტრიპსინიზირებული	–
	II (A)	ნატიური	–
		ტრიპსინიზირებული	–
	III (B)	ნატიური	–
		ტრიპსინიზირებული	–
	IV (AB)	ნატიური	–
		ტრიპსინიზირებული	–

როგორც ცხრილი №5-იდან ჩანს **CBL** არ იწვევს ადამიანის სისხლის არც ერთი ჯგუფის ნატიური თუ ტრიპსინიზირებული ერითროციტების აგლუტინაციას, რის გამო ისახება სამედიცინო პრაქტიკაში მისი გამოყენების დიდი პერსპექტივა.

მიღებული შედეგები მოწმობენ რომ **CBL** თვისობრივად განსხვავდება ქრისტესისხლადან სხვა ავტორების მიერ (Peumans W. J., 1984) გამოყოფილი ლექტინებისაგან. კერძოდ, ცნობილია, რომ მათ მიერ გამოყოფილი ლექტინები **CBL**-საგან განსხვავებით იწვევენ ადამიანის სისხლის ყველა ჯგუფის, როგორც ნატიური ასევე ტრიპსინიზირებული ერითროციტების აგლუტანციას.

ამგვარად მიღებული შედეგები დიდ ინტერესს იწვევს ჩვენს მიერ გამოვლენილი ქრისტესისხლას თესლის ახალი ტიპის ლექტინის შემდგომი კვლევისადმი: პირველი ის, რომ მისი ლოკალიზია ქრისტესისხლას მხოლოდ ერთ ორგანოში - თესლებში საინტერესოა მათი ფიზიოლოგიური როლის შესწავლის მიზნით და მეორე, ვინაიდან CBL არ იწვევს ადამიანის სისხლის არც ერთი ჯგუფის ერითროციტების აგლუტინაციას, მეტად საიტერესო ხდება მისი ბიოლოგიური აქტივობების შესწავლა პრაქტიკულ მედიცინაში გამოყენების მიზნით.

3.6. ლექტინების განაწილება ფიზიოლოგიური მდგომარეობით განსხვავებულ სტრუქტურულ-ფუნქციონალურ ორგანოებში

თანამედროვე შეხედულებით, ლექტინები უნდა მონაწილეობდნენ მცენარისათვის სასიცოცხლო მნიშვნელობის მქონე ისეთ ფიზიოლოგიურ პროცესებში, როგორიცაა: ზრდა-განვითარება, დიფერენცირება, გამრავლება, ფიტოიმუნიტეტი და სხვ. ლიტერატურის მონაცემებიდან ცნობილია, რომ ლექტინები მეტად მობილური ცილებია და მათი შემცველობა კორელაციურ დამოკიდებულებაშია იმ ქსოვილების ფიზიოლოგიურ მდგომარეობასთან, სადაც ისინი არიან ლოკალიზებული.

ამიტომ მცენარეული ლექტინების ფიზიოლოგიური როლის შესწავლისათვის მნიშვნელოვან წინაპირობას წარმოადგენს მცენარის სტრუქტურულ-ფუნქციონალურად განსხვავებულ ორგანოებში ლექტინების განაწილების შესწავლა სასიცოცხლო ციკლის სხვადასხვა სტადიაზე. ლექტინების ლოკალიზაციისა და აქტივობის სხვადასხვა ფიზიოლოგიურ პროცესებთან დამოკიდებულების შესწავლა ხშირად იძლევა მეტად საინტერესო და აუცილებელ ინფორმაციას მათი ბიოლოგიური როლის დადგენის და შემდგომი ექსპერიმენტების სწორად წარმართვის თვალსაზრისით.

3.6.1. ლექტინების განაწილება ქრისტესისხლას სხვადასხვა ორგანოებში

სპეციალურ ცდებში შეწავლილ იქნა ლექტინების განაწილება ქრისტესისხლას ორგანოებში. ექსპერიმენტში გამოყენებული იქნა ქრისტესისხლას ზრდასრული

მცენარის ყვავილები, ფოთლები, ღეროები, ფესვები, მოუმწიფებელი და მომწიფებული თესლები და ნარინჯისფერი წვენი (ცხრილი №6, სურ. 15).

ცხრილი №6

ლექტინების განაწილება ქრისტესისხლას ორგანოებში

ქრისტესისხლას ორგანოები		ცილა მგ/მლ	ჰემაგლუტინა-ციური ტიტრი	ჰემაგლუტინაცი-ური აქტივობა მგ/მლ	სპეციფიკური აქტივობა მლ/მგ
ყვავილი		-	-	-	-
ღერო		-	-	-	-
ფოთოლი		-	-	-	-
ფესვი		-	-	-	-
თესლი	მოუმწიფებ.	3.25	128	0.0254	39.38
	მომწიფებ.	7.21	16 384	0.000022	2272.4
ნარინჯისფერი წვენი		-	-	-	-

$p<0.01$

ა

ბ

გ

სურ. 15. ქრისტესისხლა - *Chelidonium majus* : ა –ყვავილი, ბ – მომწიფებული ნაყოფი და თესლი, გ – ნარინჯისფერი წვენი.

ცხრილი №6-ში წარმოდგენილი ექსპერიმენტების შედეგები მიუთითებენ, რომ ქრისტესისხლას ყვავილები, ფესვები, ღეროები, ფოთლები, ნარინჯისფერი წვენი არ შეიცავენ ჰემაგლუტინაციური აქტივობის მქონე ცილებს-ლექტინებს. ლექტინური აქტივობა ვლინდება მოუმწიფებელ თესლებში (25.4 მკგ/მლ) და მაქსიმუმს აღწევს (22 ნგ/მლ) თესლის მომწიფების პერიოდისთვის, რაც მიუთითებს განსაკუთრებით მაღალ ჰემაგლუტინაციურ აქტივობასა და ლექტინების მაღალ შემცველობაზე მომწიფებულ თესლებში.

განსაკუთრებით აღსანიშნავია, რომ ქრისტესისხლას თესლიდან ჩვენი მეთოდით ექსტრაგირებული ლექტინის ჰემაგლუტინაციური ტიტრი, რომელიც შეადგენს 16 384, 584-1168-ჯერ აღემატება W.J. Peumane-ისა და მისი თანაავტორების მიერ გამოყენებული მეთოდით გამოყოფილი ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ ტიტრს, რომელიც მერყეობს 20-40-ის ფარგლებში. მიღებული მონაცემები ადასტურებს, რომ ჩვენს მიერ ქრისტესისხლას თესლიდან გამოყოფილი ლექტინი (CBL) განსხვავდება ზემოთ აღნიშნული ავტორების მიერ გამოყოფილი ლექტინისაგან.

3.6.2. ლექტინების განაწილება ქრისტესისხლას თესლსა და მის გარემომცველ არეში თესლის გაღივების პროცესში

მცენარეებს გააჩნიათ პირველხარისხოვანი მნიშვნელობა გლობალურ ეკოსისტემაში. ისინი, ბაქტერიების მცირე ჯგუფთან ერთად, წარმოადგენენ ერთადერთ ცოცხალ ორგანიზმებს, რომლებსაც გააჩნიათ უნარი, მზის ენერგიის ხარჯზე წარმოქმნან ორგანული მოლეკულები. პრაქტიკულად ყველა დანარჩენი ცოცხალი ორგანიზმების სიცოცხლე მთლიანად დამოკიდებულია მათ მიერ სინთეზირებულ ორგანულ მოლეკულებზე. სწორედ ამის გამო, მცენარეები არიან სასურველი სამიზნეები მთელი რიგი მტაცებლებისა და მიკრობებისათვის. მეცნიერები ამტკიცებენ, რომ მცენარეებს არასასურველი მტრებისაგან თავის დასაცავად გააჩნიათ საკუთარი დამცველობითი სისტემა-ფიტოიმუნიტეტი.

თანამედროვე ბიოლოგიის, სოფლის მეურნეობის, ეკოლოგიისა და მედიცინის ერთ-ერთ ინტენსიურად განვითარებად მიმართულებას წარმოადგენს, მცენარეთა ანტიმიკრობული ნაერთების გამოვლენა და მათი მოქმედების მოლეკულური

მექანიზმების შესწავალა, მცენარის დამცველობითი ფუნქციების შესწავლის და მათი სოფლის მეურნეობასა და მედიცინაში გამოყენების მიზნით.

უკანასკნელი წლების განმავლობაში, უსაფრთხო წამლებზე მოთხოვნილებების ზრდის გამო, მცენარეული ექსტრაქტების და ნატურალური პროდუქტების ანტიმიკრობული თვისებების კვლევამ, ინტენსიური ხასიათი მიიღო. ეს გამოწვეული იქნა ანტიბიოტიკების არასწორი გამოყენებისა და იმუნური დეფიციტით.

იმის მიუხედავათ, რომ ფარმაკოლოგიურმა წარმოებამ უკანასკნელი სამი ათწლეულის განმავლობაში აწარმოა მთელი რიგი ახალი ანტიბიოტიკები, მიკროორგანიზმების რეზისტენტულობა ამ წამლების მიმართ განუსაზღვრელად იზრდება. ზოგადად ბაქტერიას აქვს გენეტიკური უნარი გამოიმუშავოს მდგრადობა იმ პრეპარატების მიმართ, რომლებიც გამოიყენება როგორც თერაპიული აგენტები. ეს აიხსნება ერთი მხრივ ავადმყოფთა დაქვეითებული იმუნიტეტით და მეორეს მხრივ ახალი ბაქტერიული შტამების გამოვლენით, რომლებიც ამჟღავნებენ მულტირეზისტენტულ თვისებებს. მიკრობული რეზისტენტულობის პრობლემა, თანამედროვე მედიცინის ერთ-ერთი მწვავე პრობლემაა და მის გადასაჭრელად, კვლევების წარმართვა ბაქტერიული რეზისტენტულობის გენეტიკური მექანიზმების ამოსახსნელად და ახალი სინთეზური და ბუნებრივი წარმოშობის ეფექტური პრეპარატების საძიებლად ერთ-ერთი პრიორიტეტული საკითხია თანამედროვე მედიცინაში.

უკანასკნელი 10 წლის განმავლობაში მიმდინარეობს ინტენსიური კვლევები ამ მიმართულებით. გამოვლენილია რიგი ანტიმიკრობული ცილები (AMP), რომლებიც უშუალოდ უკავშირდებიან პათოგენურ მიკრობულ ორგანიზმებს და იწვევენ მათი ზრდის, გამრავლებისა და გავრცელების ინჰიბირებას (Karnchanatat A., 2012). რიგ მცენარეთა სხვადასხვა ორგანოებიდან (თესლები, ბოლქვები, ძირხვენები და სხვა ქსოვილები) გამოყოფილია ანტიმიკრობული აქტივობის, გასხვავებული კლასის წარმომადგენელი ცილები. აქ წარმდგენილი არიან თიონინები, სატრანსპორტო ცილები, დეფენსინები, ქიტინაზები, გლუკანაზები, ალბუმინები და ლექტინები (Menichetti F., 2005).

როგორც ცნობილია, ლექტინები წარმოადგენენ ცილების ან გლიკოპროტეინების ჯგუფს, რომლებსაც გააჩნიათ, შაქრებთან ან მის წარმოებულებთან, რთული შაქრების

შემცველ ხსნად და მემბრანულ რეცეპტორულ ცილებთან და უჯრედებთან სპეციფიკურად და შექცევადად დაკავშირების რამოდენიმე ან სულ მცირე ერთი, არა კატალიზური ცენტრი.

ლექტინების შესაძლო როლს მცენარეთა დაცვის მექანიზმებში საფუძველი ჩაეყარა მას შემდეგ, რაც აღმოჩენილი იქნა, რომ რიგ ლექტინებს გააჩნიათ მიკროორგანიზმების ზედაპირზე არსებულ შაქრებთან სპეციფიკურად დაკავშირებისა და მათი აგლუტინაციის (შეწებების) უნარი.

ამ მიზნით დავიწყეთ ქრისტესისხლას თესლის ქიტინ სპეციფიკური ლექტინის (**CBL**) ანტიმიკრობული აქტივობისა და მისი მოქმედების შესაძლო მოლეკულური მექანიზმების შესწავლა, მისი ენდოგენური ბიოლოგიური როლის დადგენის მიზნით.

სპეციალურ ცდებში შესწავლილ იქნა:

ა) ქრისტესისხლას თესლში ლექტინების შემცველობის სეზონური დინამიკა;

ბ) ქრისტესისხლას თესლის მიერ ლექტინების გარემომცველ არეში სეკრეციის უნარი;

გ)ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის მიერ მიკროორგანიზმების აგლუტინაციის უნარი;

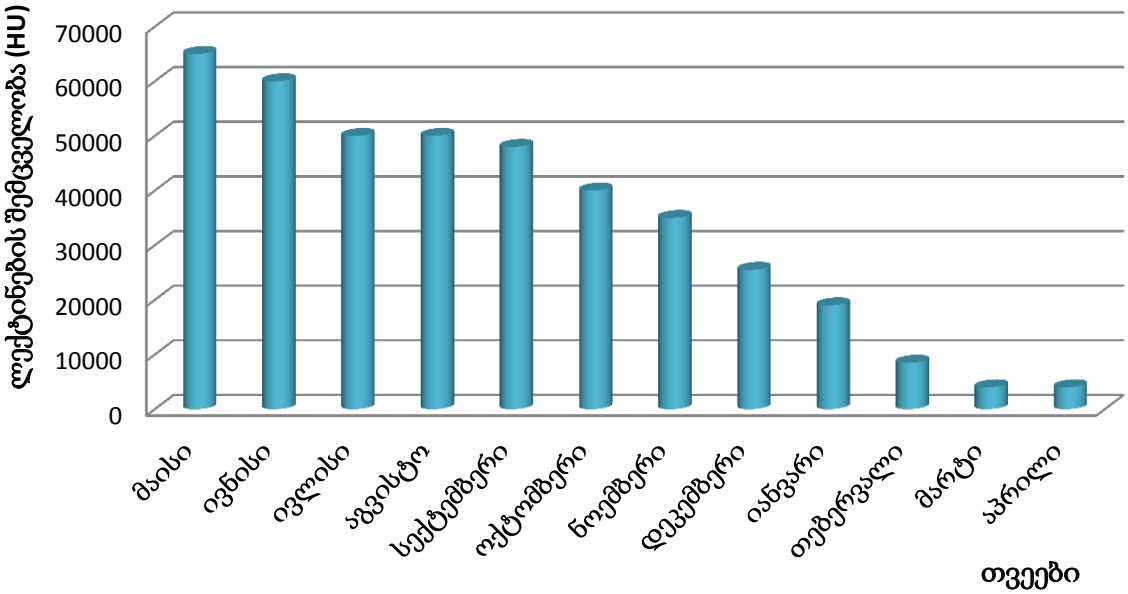
დ) ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ანტიმიკრობული აქტივობა.

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, ლექტინების შემცველობა მცენარის ორგანოებში ცვალებადია და ხშირად კორელირებს ამა თუ იმ ბიოლოგიურ პროცესებთან. ექსპერიმენტების პირველ სერიებში, შესწავლილი იქნა ქრისტესისხლას თესლებში (სურ. 16) **CBL**-ის შემცველობის (HU) სეზონური დინამიკა.

ლექტინების შემცველობას თესლებში ვსაზღვრავდით ერთი წლის განმავლობაში, ყოველთვიურად. როგორც სურ. 17-დან ჩანს, **CBL**-ის შემცველობა ქრისტესისხლას თესლებში ივნისადან დაწყებული მაისის ჩათვლით მცირდება.

ცნობილია, რომ ლექტინები წარმოადგენენ მობილურ ცილებს და მათი შემცველობა მცენარის სხვადასხვა ორგანოებში, კორელირებს მათში მიმდინარე ფიზიოლოგიურ პროცესებთან. ასეთი კორელაციის დადგენა გარკვეულად წინ გადადგმული ნაბიჯია მცენარეული ლექტინების ბიოლოგიური როლის დადგენის მიზნით მიმართულ კვლევებში.

სურ. 16. ქრისტესისხლას (*Chelidonium majus*) თესლები.



სურ 17. ქრისტესისხლას თესლებში ლექტინების შემცველობის სეზონური დინამიკა.

როგორც სურათი 17-იდან ჩანს, ლექტინების შემცველობა ქრისტესისხლას თესლებში მაქსიმალურია მაისის თვეში, ანუ ახლად მომწიფებულ თესლებში.

ჩვენს მიერ მიღებული შედეგებით, კერძოდ **CBL**-ის შემცველობის კორელაცია თესლის მოსვენების სტადიასთან, უდაოდ მიუთითებს, რომ ქრისტესისხლას ლექტინები გარკვეულ ბიოლოგიურ როლს უნდა ასრულებდნენ მოსვენების მდგომარეობაში მყოფ თესლებში. რიგი მეცნიერების მიერ გამოთქმულია ვარაუდი, რომ

ლექტინები, რომელთა აკუმულაცია ხდება თესლებში ასრულებენ სამარაგო ფუნქციას და გამოიყენებიან როგორც ამინომჟავების მარაგი, თესლის გაღივების სტადიაზე. არსებობს ასევე მოსაზრება, რომლის მიხედვითაც თესლის ლექტინები ასრულებენ დამცველობით ფუნქციას და გააჩნიათ ხშირ შემთხვევაში, ანტიმიკრობული აქტივობა ფიტოპათოგენური მიკრობების მიმართ (Karnchanatat A., 2012).

თესლი როგორც სამარაგო ორგანო, პოტენციურად უფრო მეტი აქტიური ნაერთების წყაროს წარმოადგენს, ფოთლის ან ნაყოფის რბილობთან შედარებით შესაბამისად ანტიმიკრობული საწყისი სავარაუდოთ ამ ორგანოშია ლოკალიზებული. იმის გათვალისწინებით, რომ ბუფერული წყალხსნარებით ქსოვილებიდან უმეტესად ექსტრაგირდება ხსნადი ცილები; ამინომჟავები; პოლისაქარიდები; ვისკოტოქსინები და არაორგანული ნაერთები და თესლი ძირითადათ სამარაგო ცილებით და პეპტიდებით გაჯერებულ სტრუქტურას წარმოადგენს, სავარაუდოა, რომ ქრისტესისხლას თესლში აქტიური ანტიმიკრობული საწყისი ცილოვანი ბუნებისაა.

ზემოთქმულიდან გამომდინარე ჩვენთვის განსაკუთრებულ ინტერესს წარმოადგენდა **CBL**-ის შემცველობის დინამიკა თესლის გაღივების სტადიაზე. მცენარის განვითარების საწყისს ეტაპზე მიკროორგანიზმების დამაზიანებელი მოქმედებისაგან დამცავ მექანიზმებში წამყვანი როლი სწორედ უნდა ენიჭებოდეს იმ ლექტინებს, რომლებიც გარემომცველ არეში ექსპონირდება თესლის გაღივების პერიოდში.

ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე სპეციალურ ცდებში შესწავლილ იქნა ქრისტესისხლას თესლში და მის გარემომცველ არეში **CBL**-ის შემცველობის დინამიკა გაღივებიდან 25 დღის განმავლობაში (ცხრილი №7).

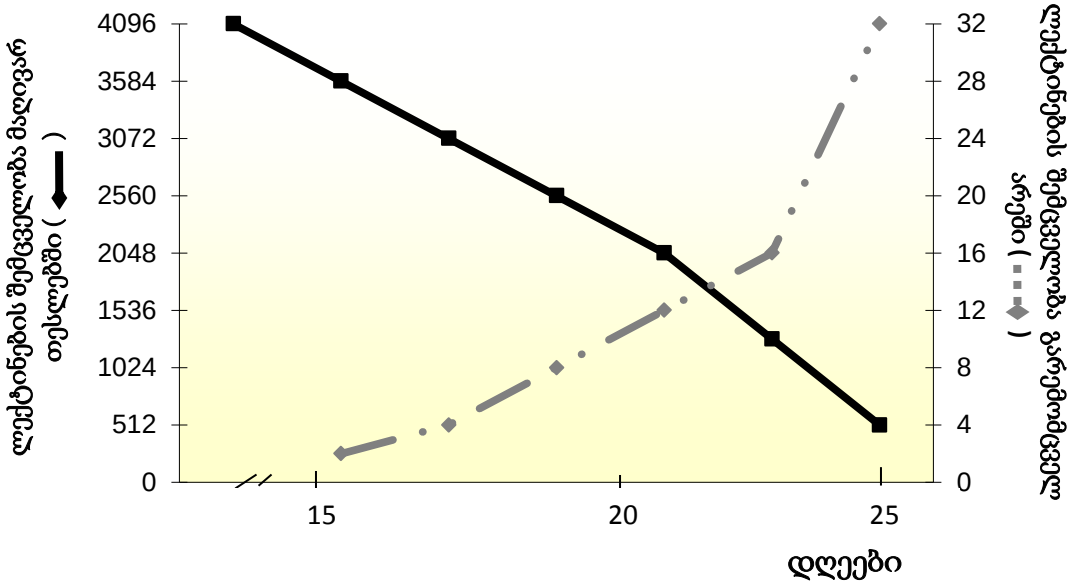
როგორც ცხრილი №7-იდან ჩანს, რომ **CBL**--ის შემცველობა თესლებში მათი გაღივების 5,10 და 15 დღეს ფაქტიურად უცვლელია და შეადგენს **LC=6045**, გაღივების მე-20 დღიდან ფიქსირდება **CBL**--ის შემცველობის მკვეთრი შემცირება – **LC=768** და აღწევს მინიმუმს 25-ე დღეს – **LC=302**. გაღვივების სტადიაზე მყოფ თესლების გარემომცველ არეში, გაღივების 5, 10 და 15 დღეს **CBL**--ის შემცველობა არ ფიქსირდება. **CBL**--ის შემცველობა გარემომცველ არეში დაფიქსირებული იქნა მე-20 დღეს – **LC=102**, ხოლო მისმა მაქსიმალურმა მაჩვენებელმა 25-ე დღეს – **LC=2 142** შეადგინა.

ცხრილი №7

ქრისტესისხლას თესლში და მის გარემომცველ არეში CBL-ის შემცველობის დინამიკა გაღივებიდან 25 დღის გამნმავლობაში

ქრისტესისხლას თესლები და მათი გარმომცველი არე	ცილის კონცენტრაცია C (მგ/მლ)	ჰემაგლუტინაციური აქტივობა HA (მგ/მლ)	ლექტინის შეცველობა LC
გაუღივებელი თესლი	1.33	0.00022	6 045
გაღივებული თესლი (1-15 დღე)	-	-	-
გაღივებული თესლი (20-ე დღე)	0.93	0.00121	768
გაღივებული თესლი (25-ე დღე)	1.21	0.004	302
გაღივებული თესლის გარემომცველი არე (20-ე დღე)	0.25	0.0013	102
გაღივებული თესლის გარემომც ველი არე (25-ე დღე)	0,75	0.00025	2142

$p<0.01$



სურ.18. ლექტინების შემცველობის დინამიკა ქრისტესისხლას მაღივარ თესლებსა და გარემოცველ არეში გაღივების პერიოდში

მაღივარ თესლებსა და მათ გარემომცველ არეში CBL-ის შემცველობის დინამიკის რეციპროკული ხასიათი თესლების გაღივების 25 დღის განმავლობაში მიუთითებს, რომ გაღივების დაწყებიდან მე-15 დღეს ადგილი აქვს თესლში აკუმულირებული CBL-ის სეკრეციას გარემომცველ არეში (სურ. 18).

ცდების შემდგომ სერიებში ვსწავლობდით ქრისტესისხლას თესლების და მათი გაღივების მე-20 დღიდან გარემომცველ არეში ფიქსირებული ლექტინის შაქრების მიმართ სპეციფიკურობას (ცხრილი №8).

ცხრილი №8

ქრისტესისხლას თესლების და მათი გაღივების მე-20 დღიდან გარემომცველ არეში ფიქსირებული ლექტინების სპეციფიკურობა შაქრების მიმართ

naxSirwylebi (საწყისი კონცენტრაცია 200 mM)	**hemaglutinaciuri aqtivobis inhibireba**	**naxSirwylis minimaluri mainhibirebeli koncentracia (mM)**
D-გალაქტოზა	_	
მეთილ-D-გალაქტოზა	_	
N-აცეტილ-D-გალაქტოზამინი	_	
D-მანოზა	_	
მეთილ-D-მანოზა	_	
D-გლუკოზა	_	
მეთილ-D-გლუკოზა	_	
L-რამნოზა	_	
N-აცეტილ-D-გლუკოზამინი	_	
L-ფუკოზა	_	
D-გალაქტურონის მჟავა	_	
ფრუქტოზა	_	
N-აცეტილგლუკოზამინის ოლიგომერები (ნაწილობრივ გასუთა–ვებული ქიტინის ჰიდროლიზატი)	+	3.125
D-არაბინოზა	_	
L-რიბოზა	_	
D-მელიბიოზა	_	
D-ლაქტოზა	_	
D-მალტოზა	_	
D-ტრეგალოზა	_	
საქაროზა	_	

+ თრგუნავს ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას.

- არ თრგუნავს ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას.

როგორც ცხრილი 8-დან ჩანს, თესლის და გარემომცველ არეში ფიქსირებული ლექტინები ამჟღავნებენ იდენტურ სპეციფიკურობას შაქრების მიმართ, კერძოდ მხოლოდ ქიტინის მიმართ. მიღებული შედეგები ადასტურებს ქრისტესისხლას თესლების და მათი გაღივების მე-20 დღიდან გარემომცველ არეში ფიქსირებული ლექტინების იდენტურობას.

დღეისათვის ინტენსიურად შეისწავლება ლექტინების როლი ფიტოიმუნიტეტში. როგორც ვარაუდობენ, ამ პროცესებში ადგილი აქვს ჰაპტენ-რეცეპტორულ ურთიერთქმედებას ლექტინებსა და მიკროორგანიზმებს შორის. ამ უკანასკნელთა ზედაპირულ ნახშირწყლებთან დაკავშირების გზით ლექტინები თრგუნავენ მათი ცხოველქმედების პროცესებს და ხელს უშლიან გამრავლებასა და გავრცელებაში. აქედან გამომდინარე, მცენარის განვითარების დასაწყის ეტაპზე მიკროორგანიზმების დამაზიანებელი მოქმედებისაგან დამცავ მექანიზმებში წამყვანი როლი უნდა ენიჭებოდეს იმ ლექტინებს, რომლებიც გარემომცველ არეში ექსპონირდება თესლის გაღივების პერიოდში.

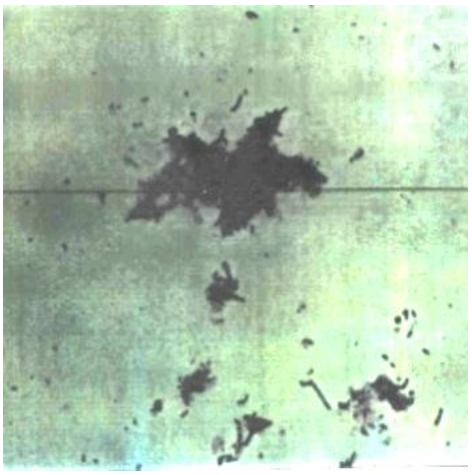
3.7. ქრისტესისხლას ლექტინის ანტიმიკრობული აქტივობა

როგორც ცნობილია, სამეცნიერო ლიტერატურაში არსებობს მრავალრიცხოვანი გამოკვლევები, სადაც დადასტურებულია ლექტინების მონაწილეობა პათოგენებისაგან მცენარეთა დაცვით რეაქციებში (Koo G. C., 2002). ნაჩვენებია, რომ ხორბლის ჩანასახის აგლუტინინი (WGA) აკავებს სოკო *Trichoderma viride*-ს და *Fusarium solani*-ის ზრდას. როგორც გაირკვა, ხორბლის ჩანასახის ლექტინი WGA გროვდება სოკოს მიცელიუმებში, უკავშირდება ქიტინს და თრგუნავს მიცელიუმების ზრდას და იცავს მცენარეს ინფექციისაგან (Mirelman D., 1975; Rajindar S.,1981).

ასევე ცნობილია, რომ თეთრი თუთის (*Morus Alba L.*) ფოთლებიდან გამოყოფილია N-გლუკონეირამინის მჟავა-სპეციფიკური MLL-1 და MLL-2 ლექტინები. ნანახია მათი ანტიბაქტერიული მოქმედება *P. Syringae pv mori* –ს მიმართ, რომელიც წარმოადგენს თუთის ხის ფოთლების სპეციფიკურ პათოგენს. MLL-1 იწვევს ამ პათოგენის აგლუტინაციას ბაქტერიის ზრდის ექსპონენციალურ ფაზაში (Ratanapo S., 2001).

ყოველივე ზემოთქმულის გათვალისწინებით და ჩვენი ვარაუდის შემოწმების მიზნით, ექსპერიმენტებში ვსწავლობდით ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის გავლენას, ჩვენს ხელთ არსებული ზოგიერთი სახის მიკროორგანიზმის ზრდაზე. კერძოდ ცდებში გამოყენებული იქნა გრამ–უარყოფითი: *Pectobacterium aroidae, Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium tumefaciens* და გრამ–დადებითი: *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* ბაქტერიები და სოკოები: *Trichoderma viride, Fusarium oxysporum.*

ცდების საწყის ეტაპზე ვსწავლობდით გაღივების სტადიაზე თესლის გარემომცველ არეში ფიქსირებული ლექტინის მიერ პათოგენური ბაქტერიის *Pectobacterium aroidae, Xanthomonas campestris*, *Agrobacterium tumefaciens, Bacillus subtilis* და *Staphylococcus aureus* აგლუტინაციის უნარს. ბაქტერიების აგლუტინაციის ფიქსაციას ვახდენდით ვიზუალურად მიკროსკოპის გამოყენებით (გადიდება 1200-ჯერ) (სურ.19, 20).



კონტროლი
ბაქტერიები **CBL**-ის გარეშე

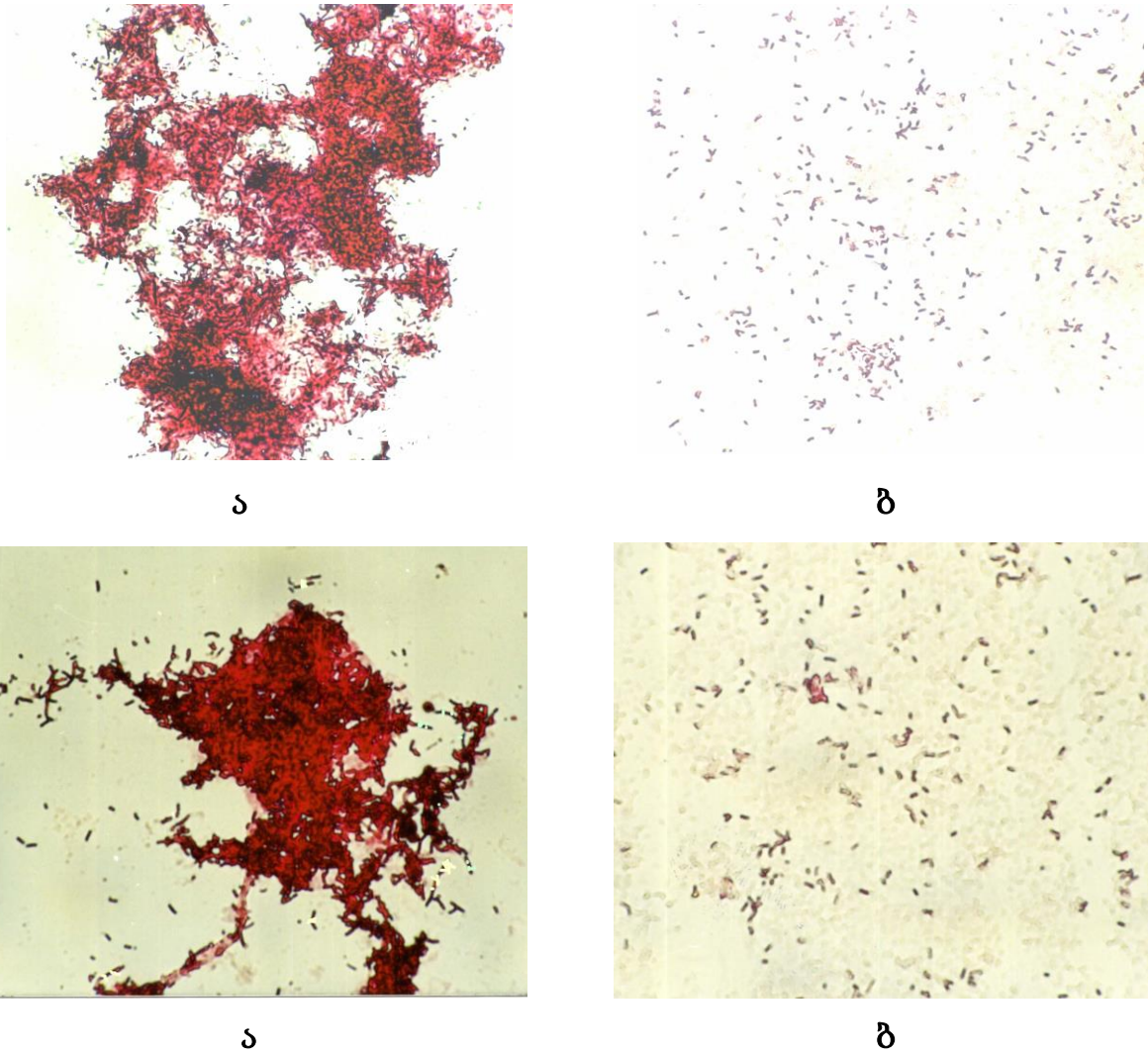
საცდელი
აგლუტინირებული ბაქტერიები **CBL**-ის თანაობისას

სურ. 19. CBL-ის მიერ ფიტოპათოგენური ბაქტერიის *Agrobacterium tumefaciens* აგლუტინაციის ვიზუალური ფიქსაცია მიკროსკოპით.

როგორც სურ. 19–დან ჩანს საკონტროლო ცდაში, სადაც **CBL** არ იყო გამოყენებული, შეინიშნება ფიტოპათოგენური ბაქტერიის (*Agrobacterium tumefaciens*)

უჯრედების დიფუზიური განლაგება, ხოლო საცდელში - სადაც **CBL** - იქნა გამოყენებული, თვალნათლივ ჩანს ფიტოპათოგენური ბაქტერიების აგლუტინაცია.

იგივე შედეგები იქნა მიღებული *Pectobacterium aroidae* და *Xanthomonas campestris* მიმართაც (სურ 20).



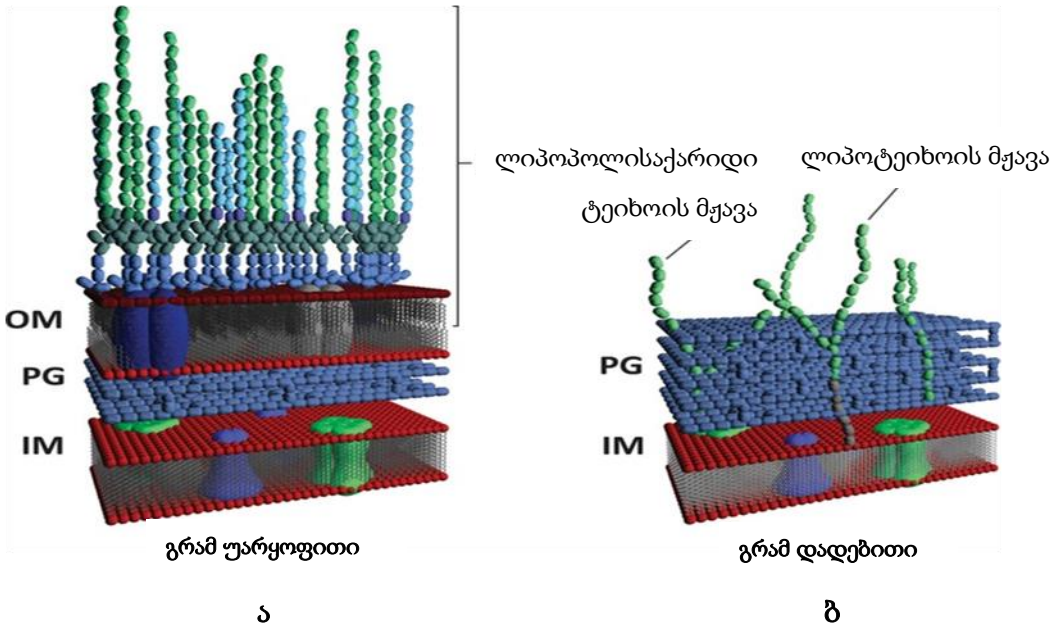
სურ. 20. CBL-ის მიერ ფიტოპათოგენური ბაქტერიების: 1. *Pectobacterium aroidae,* 2. *Xanthomonas campestris* აგლუტინაციის ვიზუალური ფიქსაცია მიკროსკოპით.

ა – აგლუტინაცია, ბ – ბაქტერიების კონტროლი

ამრიგად, ექსპერიმენტებმა აჩვენეს, რომ **CBL** იწვევდა გრამ–უარყოფითი ფიტოპათოგენური ბაქტერიების – *Pectobacterium aroidae, Xanthomonas campestris* და *Agrobacterium tumefaciens* შტამების უჯრედების აგლუტინაციას, ხოლო გრამ–

დადებითი ბაქტერიების – *Bacillus subtilis* და *Staphylococcus aureus* მიმართ **CBL** ამ თვისებას არ ამჟღავნებდა.

როგორც ლიტერატურიდანაა ცნობილი, უჯრედის კედლის აგებულება წარმოადგენს გრამდადებითი და გრამუარყოფითი ბაქტერიების ძირითად განმასხვავებელ ნიშანს (სურ. 20).



სურ. 21. გრამუარყოფითი (ა) და გრამდადებითი (ბ) ბაქტერიების უჯრედის კედლის აგებულება.

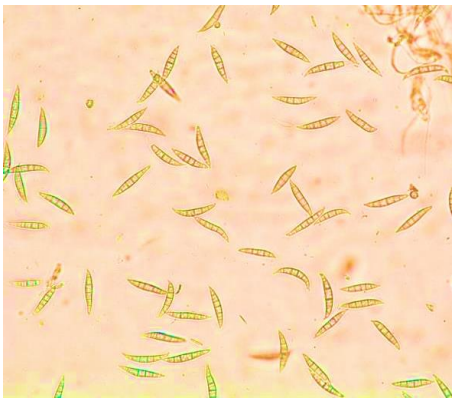
OM – გარეთა მემბრანა, **PG** – პეპტიდოგლიკანი, **IM** – შიდა მემბრანა.

როგორც სურათიდან ჩანს, გრამ(+) ბაქტერიების უჯრედის კედელს გააჩნია პეპტიდოგლიკანის (მურეინის) გაცილებით სქელი შრე, გრამ(–) ბაქტერიის კედელთან შედარებით. პეპტიდოგლიკანი შედგება ორი შაქრის თანაბარი რაოდენობის მონომერისაგან: N-აცეტილმურამის მჟავა და N-აცეტილგლუკოზამინისაგან, რომლებიც ერთმანეთთან მონაცვლეობით არიან დაკავშირებული ჯაჭვის სახით. ერთმანეთის გასწვრივ განლაგებული რამდენიმე ასეთი ჯაჭვი პეპტიდების ხიდაკებით ჯვარედინად არიან გადაბმული მურამის მჟავას ნაშთებს შორის, რაც ქმნის შრეს, ხოლო ანტიგენური დეტერმინანტის როლს ასრულებს მურეინის შრეში გამჭოლად განლაგებული ტეიხოის (იგი შედგება რიბიტოლ–ფოსფატის ან გლიცეროლ–ფოსფატისაგან) და ლიპოტეიხოის მჟავები (სურ. 21, ბ). რაც შეეხება გრამ(–) ბაქტერიის უჯრედის კედელს იგი შედგება

შიდა და გარე მემბრანისაგან, რომელთა შორის მოთავსებულია პეპტიდოგლიკანის უფრო თხელი შრე. ამასთანავე უნდა აღინიშნოს, რომ გარეთა შრე შედგება მაღალი სიმკვრივის ლიპოპოლისაქარიდებისაგან. ლიპოპოლისაქარიდი ძლიერ მნიშვნელოვანია ბაქტერიების ადგეზიის, ამოცნობისა და შეჭრის პროცესებში. ლიპოპოლისაქარიდი შედგება ლიპიდი A-ს და O-ანტიგენისაგან. ლიპიდი A ძლიერ აქტიური მოლეკულაა, იწვევს ენდოტოქსიკურ შოკს, ხოლო O-ანტიგენი წარმოადგენს ანტიგენურ დეტერმინანტს (სურ. 21, ა). იგი შეიცავს მანოზას, გალაქტოზას და N-აცეტილგლუკოზამინის მონომერებს, რომლებიც ლექტინის დამკავშირებელ საიტებს წარმოადგენენ.

ყოველივე ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ **CBL**-ის მიერ გრამ(–) ბაქტერიების აგლუტინაცია განპირობებულია O-ანტიგენის ნახშირწყლოვან დეტერმინანტებთან ლექტინის ურთიერთქმედებით, განსხვავებით გრამ(+) ბაქტერიების გარეთა შრის ანტიგენებისაგან, რომლებიც ტეიხოის და ლიპოტეიხოის მჟავას წარმოადგენენ და რომლის მიმართაც **CBL** არ ავლენს სპეციფიკურობას.

პარარელურად, ცალკეულ ცდებში ვსწავლობდით გაღივების სტადიაზე, თესლის გარემომცველ არეში ფიქსირებული ლექტინების გავლენას ფიტოპათოგენური სოკოებზე, ვიზუალურად მიკროსკოპის გამოყენებით (სურ. 22).



კონტროლი
ბაქტერიები **CBL**-ის გარეშე

საცდელი
აგლუტინირებული სპორები **CBL**-ის თანაობისას

სურ. 22. CBL-ის მიერ ფიტოპათოგენური სოკოს *Fusarium oxysporum* - ის სპორების აგლუტინაციის ვიზუალური ფიქსაცია მიკროსკოპით (გადიდება 400-ჯერ).

როგორც სურათიდან ჩანს, ქრისტესისხლას თესლის ლექტინი - **CBL** *in vitro* ექპერიმენტებში იწვევს ფიტოპათოგენური სოკოს – *Fusarium oxysporum*–ის სპორების ძლიერ აგლუტანაციას. მსგავსი შედეგები დაფიქსირდა *Trichoderma virides* სპორებთან მიმართებაშიც, რაც შესაძლებელია განპირობებული იყოს სოკოს უჯრედის კედლის შემადგენლობაში შემავალ სტრუქტურულ პოლისაქარიდებთან, ქიტინის პოლიმერებთან **CBL** ლექტინის ურთიერთქმედებით.

სპეციალურ ცდებში შესწავლილი იქნა **CBL**-ის ანტიმიკრობული აქტივობა დისკ-დიფუზიური მეთოდით (Cole MD, 1994) ფიტოპათოგენური ბაქტერიების და სოკოების ტესტ-კულტურებზე. ექსპერიმენტებში გამოყენებული იქნა გაუღივებელი და გაღივებული თესლებიდან, ასევე გაღივების მე-20 დღეს გარემომცველი არიდან გამოყოფილი **CBL**–ის სერიული განზავებები.

ცხრილი №9

ქრისტესისხლას თესლების გაუღივებელი და გაღივებული თესლებიდან, და გაღივების მე-20 დღიდან გარემომცველი არიდან გამოყოფილი CBL-ის ანტიმიკრობული აქტივობა.

მიკროორგანიზმები ბაქტერია / სოკო	CBL-ის ანტიმიკრობული აქტივობა (+ მიკროორგანიზმების ზრდის ინჰიბირება)		
	გაუღივებელი თესლებიდან იდენტიფიცირებული CBL	გაღივებული (25დღე) თესლებიდან იდენტიფიცირებული CBL	თესლების გაღივების (25 დღე) გარემომცველ არიდან იდენტიფიცირებული CBL
Pectobacterium aroidae	+	+	+
Xanthomonas campestris	+	+	+
Agrobacterium tumefaciens	+	+	+
Bacillus subtilis	–	–	–
Staphylococcus aureus	–	–	–
Trichoderma viride	+	+	+
Fusarium oxysporum	+	+	+

ლექტინის საწყისი კონცენტრაცია შეადგენდა (1 მგ/მლ, 0.5 მგ/მლ, 0.25 მგ/მლ), მიკროორგანიზმების კონცენტრაცია კი – 10^5–10^6 უჯრედი/მლ. 6მმ დიამეტრის დისკებს ვასხამდით 20 მკლ ლექტინის სტერილურ ხსნარს. დადებით კონტროლად გამოყენებული იქნა ამოქსიცილინი (2.5 მგ/მლ) და ციპროფლოქსაცილინი (0.005 მგ/მლ) (ცხრილი №9, №10).

ცხრილი №9-ში წარმოდგენილი მონაცემები გვიჩვენებენ, რომ გაუღივებელი და გაღივებული თესლებიდან, ასევე გაღივებისას გარემომცველ არეში სეკრეტირებული **CBL**-ის გასუფთავებულ პრეპარატს, გაჩნია ანტიმიკრობული აქტივობა ექსპერიმენტებში გამოყენებული ფიტოპათოგენური გრამუარყოფითი ბაქტერიების და სოკოების მიმართ. მონაცემები მიუთითებენ ასევე, რომ სამივე წყაროდან იდენტიფიცრებულ **CBL**-ს გააჩნიათ პრაქტიკულად იდენტური ანტიმიკრობული აქტივობა.

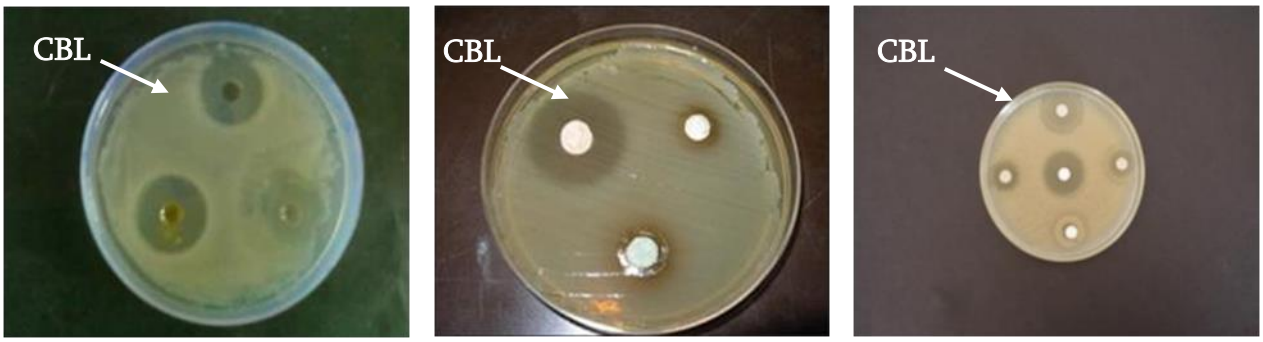
ცხრილი №10

CBL–ის მიერ მიკროორგანიზმების ზრდის ინჰიბირება

მიკროორგანიზმები ბაქტერია / სოკო	ინჰიბირების ზონების დიამეტრი (მმ)	CBL-ის მინიმალური მაინჰიბირებელი აქტივობა (MIC – მკგ/მლ)	ანტიბიოტიკები
Pectobacterium aroidae	16.5	10	ამოქსაცილინი
Xanthomonas campestris	18.6	5	ამოქსაცილინი
Agrobacterium tumefaciens	20.0	2	ამოქსაცილინი
Trichoderma viride	12.7	20	ციპროფლოქსაცილინი
Fusarium oxysporum	13.0	10	ციპროფლოქსაცილინი

როგორც ცხრილი №10–დან ჩანს **CBL** წარმოადგენს ბაქტერიული და სოკოვანი ზრდის კარგ ინჰიბიტორს და ახასიათებს მაღალი ანტიბაქტერიული აქტივობა (სურ. 23, 24). მიღებული შედეგები გვიჩვენებენ, რომ ქრისტესისხლას თესლები გაღივების მე-20 დღიდან ახდენენ **CBL**-ის სეკრეციას გარემომცველ არეში, რომელსაც ახასიათებს ფიტოპათოგენური ბაქტერიების *Pectobacterium aroidae, Xanthomonas campestris* და

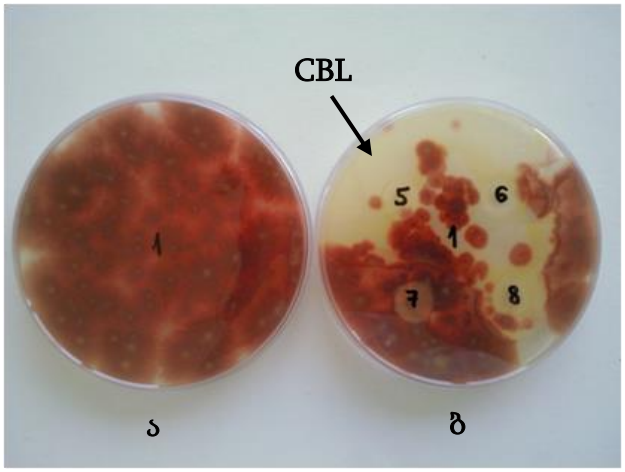
Agrobacterium tumefaciens და ფიტოპათოგენური სოკოების *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporum* აგლუტინაციისა და მათი ზრდისა და გამრავლების დათრგუნვის უნარი.



ა ბ გ

სურ. 23. CBL–ის მიერ გრამ(–) ბაქტერიების ზრდის ინჰიბირება.

ა–*Agrobacterium tumefaciens,* ბ– *Xanthomonas campestris,* გ– *Pectobacterium aroidae*



ა – K – საკონტროლო ცდა (110 კწე/მლ)
ბ – 5 – CBL (20 მკგ/20 მკლ)
6 – CBL (10 მკგ/20 მკლ)
8 – CBL (5 მკგ/20 მკლ)

სურ. 24. CBL–ის მიერ ფიტოპათოგენური სოკო – *Fusarium oxysporum* –ის ზრდის ინჰიბირება.

წარმოდგენილი კვლევის შედეგები გვაძლევენ წარმოდგენას ქრისტესისხლას თესლის **CBL**-ის ანტიმიკრობული მოქმედების მოლეკულური მექანიზმების და მისი მცენარეში ენდოგენური ბიოლოგიური ფუნქციის - კერძოდ ქრისტესისხლას თესლის

(გაღივების სტადიაზე) ფიტოპათოგენური მიკროორგანიზმებისაგან დაცვის ფუნქციების შესახებ.

ამრიგად ქრისტესისხლას თესლის ლექტინი მიეკუთვნება მცენარეული ანტიმიკრობული ცილების (AMP) კლასს და სავარაუდოთ ასრულებს მცენარის ფიტოპათოგენური მიკროორგანიზმებისაგან დამცავ ფუნქციებს. მიღებული შედეგები გვაძლევენ საფუძველს, რომ ბუნებრივ პირობებში ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის დამცველობითი როლი უნდა გამოიხატებოდეს გაღივებადი თესლების დაცვაში ნიადაგში არსებული ფიტოპათოგენური მიკროორგანიზმების მავნე მოქმედებისაგან. ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემებიდან გამომდინარე, შესაძლებელია შემუშავებულ იქნას სოფლის მეურნეობაში ქრისტესისხლას ლექტინის ბუნებრივ ანტიმიკრობულ პრეპარატად გამოყენების პერსპექტივა. მონაცემებიდან გამომდინარე, ისახება სრულიად ახალი მეთოდოლოგია ეკოლოგიურად სუფთა გარემოს შესაქმნელად, რათა თავიდან ავიცილოთ პესტიციდებისა და ფუნგიციდების მასშტაბური გამოყენება.

დასკვნები

1. დადგენილია ზრდასრული მცენარე ქრისტესისხლადან, ლექტინური აქტივობის მქონე ხსნადი ცილების ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობები. საექსტრაქციო ხსნარში - PBS+0,5mM β-მერკაპტოეთანოლამინი (pH 7,4), მაქსიმალურად ხდება **CBL**-ის ექსტრაქცია, რაც სხვა გამოყენებულ ხსნარებს 10-ჯერ აღემატება.
2. ნაჩვენებია, რომ ქრისტესისხლას ყვავილები, ფესვები, ღეროები, ფოთლები და ღეროს ნარინჯისფერი წვენი არ შეიცავს ჰემაგლუტინაციური აქტივობის მქონე ცილა-ლექტინებს. ლექტინები აღმოჩენილი იქნა მხოლოდ ქრისტესისხლას თესლებში.
3. დადგენილია ქრისტესისხლას თესლში **CBL** ლექტინის შემცველობის სეზონური ხასიათი. ყველაზე მაღალი შემცველობა აღინიშნება მაისსა და ივნისში, ხოლო მარტსა და აპრილში მკვეთრად მცირდება.
4. დადგენილია ქრისტესისხლას თესლის შაქარსპეციფიკურობა. გამოცდილი 20 შაქრიდან ის სპეციფიკურობას ავლენს, მხოლოდ ქიტინის (N-აცეტილ-D-გლუკოზამინის ოლიგომერების) მიმართ. ე. ი. **CBL** ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინების ჯგუფს განეკუთვნება.
5. დადგენილია ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის გამოყოფისა და გასუფთავების მეთოდები: თესლიდან ცილოვანი ფრაქციის ექსტრაქცია; ქრომატოგრაფია Toyopearl HW-55-ის სვეტზე; სვეტიდან ელუირებული **CBL**–ის შემცველი ცილების ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით; ლექტინური აქტივობის თერმოსტაბილურობა, რომელიც +60^{0}C-ზე 30 წთ-ის განმავლობაში ინარჩუნებს აქტივობას; აცეტონით დამუშავება; აფინური ქრომატოგრაფია ქიტინის სვეტზე. მეთოდები საშუალებას იძლევა მიღებული ლექტინი გამოყოფილი იქნას ინდივიდუალური მოლეკულის სახით.
6. დადგენილია, რომ მისი ნატიური მოლეკულის მეოთხეული სტუქტურა წარმოდგენილია დიმერის სახით. მისი მოლეკულური მასა 34,000 Da-ია, შედგება 2 თანაბარი 17,000 Da მოლეკულური მასის მქონე სუბერთეულისაგან, არ შეიცავს ნახშირწყლებს და მიეკუთვნება ჰოლოლექტინების კლასს. ლექტინური აქტივობა ვლინდება pH-ის ფართო დიაპაზონში (pH 5.5-დან pH 9.0-მდე) და მაქსიმალური

აქტივობა აღინიშნება pH 7.0-8.0 ფარგლებში, ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე გავლენას არ ახდენს ორვალენტიანი მეტალის იონები (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}).

7. მიღებული შედეგებით დასტურდება, რომ ქრისტესისხლას თესლები გაღივების მე-20 დღიდან ახდენენ **CBL**-ის სეკრეციას გარემომცველ არეში და იწვევენ ფიტოპათოგენური ბაქტერიების *Pectobacterium aroidae, Xanthomonas campestris, Agrobacterium tumefaciens* და სოკოების *Trichoderma viride*-ს და *Fusarium oxysporum*-ის აგლუტინაციას, შედეგად კავდება მათი ზრდა და გამრავლება.
8. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ქრისტესისხლას - **CBL** ლექტინი მონაწილეობს ფიტოპათოგენური მიკროორგანიზმებისაგან მცენარის დაცვის მექანიზმებში. მიღებულ შედეგებზე დაყრდნობით შესაძლებელია შემუშავებულ იქნას სოფლის მეურნეობაში ქრისტესისხლას ლექტინის ანტიმიკრობულ პრეპარატად გამოყენების პერსპექტივა.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. დათეშიძე ლ., შენგელია ვ. ქრისტესისხლას წარმოება, გამოყენება, მარკეტინგი. საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახ. ქართული უნივერსიტეტი. 14. 06. 2010 გ.1-9.
2. კაჭარავა თ., კაპანაძენ ნ. ქრისტესისხლას (*Chelidonium Majus L.*) კულტივირების შედეგები და გამოყენება. ელექტრონული სამეცნიერო ჟურნალი ,,Plants Science" ISSN E 1987-80 UDK 581, N23, მარტი 2010 წ.
3. კაკულია ე., კრავჩენკო პ., ზვიადაძე გ. ,,მეთუთეობა" თბილისი 1969, გვ. 165.
4. Алексидзе, Г.Я. Королев Н.П., Семенов И.Л., Выскребенцева Э.И Выделение лектинов и их возможных рецепторов из корнеплода сахарной свеклы. Физиология растений. 1983. Т. 30, вып. 6. С. 1069-1076. 2. Алексидзе Г.Я., Гаидамашвили М.В., Литвинов А.И., Санадзе Г.А. Рибулозобис-фосфаткарбоксилаза как гликофермент и как лиганд пигмент-лектинового комплекса 1. 1991. 144. №2. 305-308.
5. Алексидзе Г.Я., Литвинов А.И., Санадзе Г.А. Влияние лектина тилакоидов на активность рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы. 1992.145. №2. 393-396.
6. Алексидзе Г.Я., Санадзе Г.А. Эндогенные лиганды лектинподобных белков хлоропластов листьев тритикале: выделение и некоторые свойства. 1990.13 http://www.medgeo.net/2014/04/06/კვლევები-2/8. №1, 121-124.
7. http://www.medgeo.net/2014/04/06/კვლევები-2/
8. Бояркин А. Н. Методы определения регуляторов роста. М., 1966.
9. Голинская Е.Л. ФГА генеративных органов растений и их возможное участие в реакции распознавания при взаимодействии пыльцы и пестика. Мол. биол. (Киев) 1979. №23.34-45.
10. Голинская Е.Л., Башкирова Н.В. Томчук Н.Н. ФГА пестика примулы как возможные белки генеративной несовместимости. Физиол.раст., 1976, т.23, вып.1, с.88.

11. Ильченко К.В. Некоторые свойства лектина пыльцы двух видов табака Nicotiana alafa, N. tabacum и секреция лектина в процессе роста пыльцевых трубок. Физ. раст. 1988, 35, №1. 534-541.
12. Кефели В. И., и др. Методы определения фитогормонов. М., 1973.
13. Королёв Н.П. Лектины – инструменты для исследования биологических мембран. Успехи современной биологии 1987. №3. 463-476.
14. Королёв Н.П. Функции лектинов в клетках. Итоги науки и техники.т.1.М.: Винити. 1984. -216 с.
15. Лахтин В.М. Лектины в исследовании белков и углеводов. Итоги науки и техники. 1987. т.2. -254с.
16. Лахтин В.М.. Лектины - регуляторы мета,олизма. Биотехнология. 1986, с.66-77.
17. Лепёхина Е.А., Палладина Т.А., Педченко В.К., Рыбак В.И. Распределение и активность лектинов в субклеточных фракциях корней проростков кукурузы. Физ. раст. 1987, 34, №1. 160-164.
18. Лепёхина Е.А., Яловой А.И., Рыбак В.И. Активность и углеводная специфичность лектинов в прорастающих семенах кукурузы. Физ. раст. 1986, т.33, №2. 390-393.
19. Луцик А.Д., Детюк Е.С, Луцик М.Д. Лектины в гистохимии. -Львов: Выща Школа, 1989.
20. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. -Львов: Выща Школа, 1981.с.66-77.
21. Любимова Н.В. Салькова Е.Г. Фитолектины во взаимоотношениях растений и патогенных микроорганизмов.
22. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.:Наука, 1985.-с.535.
23. Семенов И.Л., Выскребенцева Э. И., Алексидзе Г.Я. Структура и функции биологических мембран растений. Новосибирск: Наука, 1985. с.47-54.
24. Скоупс Р. Методы очистки белков. М. 1985. с.365.
25. Франц Х., Пфюллер К. Применение токсических растительных лектинов в изготовлении иммунотоксинов (аффинотоксинов). Ж.Микробиол. Эпидемиол. и Иммунобиол. 1983, №5, с.
26. Любимова Н.В. Салькова Е.Г. Фитолектины во взаимоотношениях растений и патогенных микроорганизмов. 1985.

27. Albersheim, Peter; Darvill, Alan G. Oligosaccharins. Scientific American. 1985, 11, ст. 16-23.
28. Andallu B., Suryakantham V., Lakshmi Srikanthi B., Reddy GK. ‘’Effect of mulberry (Morus indica L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with tipe 2 diabetes.’’ Clin Chim Acta. 2001; v-314(1-2) p.47-53.
29. Andallu B., Suryakantham V., Lakshmi Srikanthi B., Reddy GK.”Effect of mulberry (Morus indica L.) therapy on plasma and erythrocyte membrane lipids in patients with type 2 diabetes”.Clin Chim. Acta.2001, 314(1-2), pp. 47-53.
30. Amal K. Maji, Pratim Banerji A Reviewon its Phytochemical and Therapeutic Perspectives International Journal of Herbal Medicine 3. 2015, (1): 10-27.
31. Aouba A., Gausse H., Van Damme E.J.M., Peumans W.J., Cambillau C., Rouge P. Interactions of plant lectins with the components of the bacterial cell wall peptidoglycan. Biochem. Syst. Ecol., 1994, v.22, p. 153-159.
32. Ashraf MT., Khan RH.”Mitogenic lectins”. Med. Sci. Monit. 2003 Nov, 9(11), pp. 265-269.
33. Avalbaev A. M., Bezrukova M. V., Kildibekova A. R., Fatkhutdinova R. A.F. Shakirova M. J.”Wheat Germ Agglutinin restores cell division and growth of wheat seedlings under salinity”.Plant Physiol. Special Issue.2003, pp.257-263.
34. Ayouba A., Martin D., Rouge P.”Recognition of muramic acid and N-acetylmuramic acid by Leguminosae lectins: possible role in plant-bacteria interaction”. In FEMS Microbiol. Lett. 1994, 92, pp. 41-46.
35. Balzarini J., Laethem K., Hatse S., Vermeire K., De Clercq F., Peumans W., Van Damme E., Van Damme AM., Boilmstedt A., Schols D. ‘’Profile of resistance of human immunodeficiency virus to mannose-specific plant lectins.’’ J. Virol. 2004, v 78, N 19, pp.10617-27.
36. Bartik MM., Walker D., Kay NE.”Impairments in immune cell function in B cell chronic lymphocytic leukemia”. Semin. Oncol.1998, 25, pp. 27-33.
37. Basu D., Appukuttan P.S. Plant lectins specific for N-acetil-α-D galactosamine. J. Bioscien., 1983, v.5, p.131-135.

38. Becker J.W., Reeke G.N., Wang J.L., Cunningham B.A., Edelman G.M. Covalent and three-dimentional structure of ConA. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. J.Biol.Chem.,1975, v.250, p.1513-1524.
39. Borrebaeck C., Carlson R. A. Lectins as mitogens. B. Van Diressche E. Structure and function of Leguminosae lectins. In: Franz H.(ed) Advances in lectin research, 1989, v.1,2, p. 10-22, 73-119.
40. Bowles D.J. Lectins of plant cells: Properties and possible functions. Elsevier biomedical press. 1982, p.171-176.
41. Bowels D.J., Kauss H. Characterisation, enzymatic and lectin properties of isolated membranes from Phaseolus aureus. Biochem. Biophys. Acta,1976, v.243, p.360-374.
42. Boyd W., Requera R. Hemagglutinating substances in various plants. J. Immunol. 1949, v.62, p.333-339.
43. Boyd W.C., Everhart D.L., Mc Master M.H. J. Immunol., 81, 1958, 414-418.
44. Branden C., Tooze J.Intraduction to Protein Structure, Second edition, Garland Sci. Pub., 1999.
45. Breborowicz A., Wieczorowska-Tobis K., Korybalska K., Polubinska A., Radkowski M and DG Oreopoulos. The effect of a nitric oxide inhibitor (L-NAME) on peritoneal transport during dialysis in rats Perit Dial Int 1998 Mar-Apr 18:188-192.
46. Breborowicz J., Filas V.“Application of lectins for immunohistochemical studies of prostate”. Book of abstracts Interlec 11. 1989, pp.11.
47. Brewin N.J., Development of the legume root nodule. Ann. Rev. Cell Biol., 1991, v.7, p.191-226.
48. Broekaert WF, VAN Parijs J, Leyns F, Joos H, Peumans WJ. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. Science. 1989 Sep. 8; 245 (4922):1100–1102.
49. Broekaert F. Rupert W. Osborn Willem . Antifungal Proteins Chapter seeds proteins pp. 727-751.
50. Cai Q., Zhang ZR. ‘’Lectin-mediated cytotoxicity and specificity of 5-fluorouracil conjugated with peanut agglutinin (5-Fu-PNA) in vitro.’’ J. Drug Target. 2005, v.13, N 4, pp.251-7.

51. Collinge, D.B., K.M. Kragh, J.D. Mikkelsen, K.K. Nielsen, U. Rasmussen and K. Vad,. Plant chitinases. Plant J., 3: 1993, 31-40.
52. Coli MD Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays – a critical review. Biochem Syst Ecol 22, 1994, 837-856.
53. Chen A.P., Phillips D.A. Les hemagglutinines des champignons. Physiol. Plant, 1976, v.38, p.83-88.
54. Chen, J., Liu, B., Ji, N., Zhou, J., Bian, H., and Li, C. A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent ntineoplastic and antifungal activities.Phytomedicine, 16, 2009, 352-360.
55. Chen JG., Shimomura S., Sitbon F., Sandberg G., Jones AM." The role of auxin-binding protein 1 in the expansion of tobacco leaf cells".Plant J.2001, 28(6), pp. 607-17.
56. Clarence A. Ryan and Gregory Pearce."Polypeptide Hormones".Plant Physiol. 2001, v. 125, pp. 65-68.
57. Clarke A. Knox R., Jermyn M. Localization of lectins in legume cotyledons. J. Cell Sci., 1975, v.19, p.157-167.
58. Courvalin P, Interpretive reading of in vitro antibiotic susceptibility tests (the antibiogramme. View issue TOC v. 2, issue s1 December 1996, P. S26–S34.
59. Chen, J., Liu, B., Ji, N., Zhou, J., Bian, H., and Li, C. A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent ntineoplastic and antifungal activities.Phytomedicine, 16, 352-360. 2009.
60. Damjanov I. Lectin cytochemistry and Histochemistry Biology of Disease, Laboratory Investigation 1987, v. 57, N1, p.5.
61. Davis B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, pp. 404-427.
62. Dazzo F.B., Hubbel D.H. Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the Rhizobium-clover assosiation. Appl. Microbiol., 1975, v.30, p. 1017-1033.
63. De Mejia E.G, Prisecaru VI. ''Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment.'' Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2005, v-45, N-6, pp.425-45.

64. De Mejia E. G., Prisecaru VI. '' Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment.'' Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 2005, v. 45, N 6, pp.425-45.
65. Diaz C. L,Van Spronsen P.C.,Bakhuizen R.,Logman G.J.J.,Lugtenberg E.J.J.,Kijne J.W. Correlation between infection by Rh. leguminosarum and lectin on the surface of Pisum sativum roots. Planta, 1986, 168, №350-359.
66. Diaz CL., Spaink HP., Wijffelman CA. "Genomicrequirement of Rhizobium for nodulation of white clover hairy roots transformed with the pea lectin gene". In Mol. Plant-Microbe Interact. 1995, 8, pp. 348-356.
67. Digiero G., Travade P., Chervet S., Fenaux P., Chastang C."B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions". Blood. 1991, 78, pp. 1901-1914.
68. Dwek MV., Ross HA., Streets AJ., Brooks SA., Adam E., Titcomb A., Woodside JV., Schumacher U., Leathem AJ. ''Helix pomatia agglutinin lectin-binding oligosaccharides of aggressive breast cancer.'' Int J Cancer. 2001; v-95(2)p.79-85.
69. Dwek MV., Ross HA., Streets AJ., Brooks SA., Adam E., Titcomb A., Woodside JV., Schumacher U., Leathem AJ. Helix pomatia agglutinin lectin-binding oligosaccharides of aggressive breast cancer.'' Int J Cancer. 2001; v-95(2)p.79-85.
70. Edelman G.M., Wang J.L. Binding and functional properties of Con A and its derivatives. Interactions with indolacetic acid and other hydrofobic ligands. J. Biol.Chem., 1978, v.253, p. 3016-3022.
71. Favero J., Corbeau P., Nicolas M., Benkirane M., Trav G., Dixon J.F.P., Aucouturier P., Rasheed S., Parker J.W., Liautard J.P., Devaux C., Dornand J. ''Inhibition of human immunodeficiency virus infection by the lectin jacalin and by a derived peptide showing a sequence similarity with gp 120.; Europ. J. Immun. 1993, v-23 p.179-185.
72. Foa R., Guarini A."Biology of chronic lymphocytic leukemia". Educational Book. American Society of Clinical Oncology. 1999, pp.178-183.
73. Foriers A., de Neve R., Kanarek L. A common ancestor of Con A and lens lectins. Proc. Natl. Acad. Sci., 1978, v.75, p. 1136-1139.
74. Fik, E., Gozdzicka-Jozefiak, A. & Kedzia, H. Isolation and characterization of glycoproteins from milky juice leaves and roots of Chelidonium majus. Herba Polon. 1995, 41, 84-95.

75. Fik, E., Gozdzicka-Jozefiak, A., Mirska, I. & Kedzia, W. New plant glycoprotein against methicillin resistant Staphylococci and Enterococci. Acta Microb. Pol. 1997, 46, 325-327.
76. Forsgren B., Billstrom A., Pripp S., Zather E. and Ersson B."Lectin binding by prostate cancer cell lines". Book of abstracts Interlec 11. 1989, pp.18.
77. Franz H., Ziska P., Kindt A. Biochem. J., 195, 481-484, 1981.
78. Gabius H. J. Gabius S. Joshi S.S. et al.,. Planta Med., Feb., 1994, 60(1): 2-7.
79. Gabius H.-J.,Walzel H.,Joshi S.S.,Kruip J., KKojima S.,Gerke V., Kratzin H. & Gabius S. "The immunomodulatory β-galactoside-spesific lectin from mistletoe: partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact on intracellular biosignallingof monocytic leukemia cells".Anticancer Research 12, 1992, pp. 669-676.
80. Gade W., Jack MA., Dahl JB., Schmidt EL., Woldt F. '' The isolation and characterization of a root lectin from soybean.'' J. Biol. Chem. 1981, v. 256, pp.12905-10.
81. Gallager J.I. Carbohydrate-binding properties of lectins: a possible approach to lectin nomenclature and classification.Bioscience Reports 4, 1984, p. 621-632.
82. Gansera R., Schurz H., Rudiger H. Studies of phytohemagglutinins. Physiol. Chem., 1979, v. 360, p. 1579-1585.
83. Gebauer G., Schimpl A., Rudiger H. Plant seed lectins. Eur. J. Immunol., 1982, v.12, p.491-495.
84. Gilboa-.Garber N., Avichezer D., Gbarah A., Mor N. and Barr-Nea L."Erythrina corallodendron lectin biological effects and applications". Book of abstracts Interlec 11. 1989, pp. 21.
85. Goldstein I.J., Hayes C.E. The lectins: carbohydrate binding proteins of plant and animals. Avd. Carbohydr. Chem. Biochem., 1978, v.35, p. 127-340.
86. Goldstein I.J., Hughes R.C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N. What should be called a lectin?, Nature, 1980, 285, 66.
87. Goldstein I.J., Poretz R.D. Isolation, physico-chemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins.Mol.Biol.:The lectins,1986, 621-326.
88. Golynskaya E.L., Baskirova N.V., Tomchuk N.N. Phytohemagglutinins from the pistil of the Primula as the possible proteins of generative incompatibility. Fisiol.Rast (Moscow), 1976, v. 23, p.88-97.

89. Gonzalez Pereyra ML., Cariddi LN., Ybarra F., Isola MC., Demo MS., Sabini L., Maldonado AM. "Immunomodulating properties of Minthostachys verticillata on human lymphocytes and basophils". Rev Alerg Mex. 2005, 52(3), pp. 105-112.
90. Hamblin J., Kent SP. ''Possible role of phytohaemagglutinin in Phaseolus vulgaris.'' L. Nat. New. Biol. 1973, v. 245, pp. 28-30.
91. Hankins C.N., Kindinger J.I., Shanon L.M. Legume-galactosidases which have hemagglutinin properties. Plant Physiol., 1980, v. 65, p. 618-622.
92. Hardman K.D., Ainsworth C.F. Structure of the ConA-methyl-α-D-mannopyranoside complex at 6-A0 resolution. Biochem., 1976, v.15, p. 1120-1128.
93. Ho wong J., Ng TB. '' A homotetrameric agglutinin with antiproliferative and mitogenic activites from haricot beans.'' J. Cromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005, v. 828, N 1-2, pp. 130-8.
94. Hoson T., Masuda Y. Effect of lectins on auxin-induced elongation and wall loosening in oat coleoptile and azuki bean epicotyl segments. Plant. Physiol., 1987, v.71, p.1-8.
95. Howard J., Shanon L., Oki L., Murashiga Soybean agglutinin. A mitogen for soybean callus cells. Exp.Cell. Res., 1977, v.107, p. 448-450.
96. Horikawa, Y., Wang, X.C., Miyoshi, E., Gu, J.G., and Taniguchi, N. Carbohydrate binding specificity of a fucose-specific lectin from *aspergillus oryzae* -A novel probe for core fucose. Journal of Biological Chemistry, 282, 2007, 15700-15708.
97. Hu R., Zhao Q., Liu W., Liu X. ''An insight into the mechanism of cytotoxicity of ricin to hepatoma cell: roles of Bcl-2 family proteins, caspases, Ca^{2+} dependent proteases and protein kinase C.'' J Cell Biochem. 2001, v.81, N4, pp. 583-93.
98. Hu RG., Zhai QW., He WJ., Mei L., Liu WY. ''Bioactivities of ricin retained and its immunoreactivity to anti-ricin polyclonal antibodies alleviated through pegylation.'' Int. J. Biochem. Cell Biol. 2002, v. 34, N4, pp. 396-402.
99. Huber R., Rostock M., Goedl R., Ludtke R., Urech K., Buck S., Klein R. ''Mistletoe treatment induces GM-CSF- and IL-5 production by PBMC and increases blood granulocyte- and eosinophil counts: a placebo controlled randomised study in healthy subjects.'' Eur J Med Res. 2005; v.10(10), p.411-8.

100. Jackson S.P.,Tjian R. O-Glycosilation of eukariotic transpiration factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. Cell, 1988, v. 55, p. 125-133.
101. Jeffree C.E., Yeoman M. A study of the intracellular and intercellular distribution of the Datura Stramonium lectin using an immunofluorescent technique. New Phytol., 1981, v. 87, p. 463-471.
102. Kauss H., Glasser C. Carbohydrate-binding proteins from plant cell wall and their possible involvment in extension growth. FEBS Lett., 1974, v. 45, p. 304-307.
103. Kim MS., Lee J., Lee KM., Yang SH., Choi S., Chung SY.,Kim TY., Jeong WH., Park R. ''Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-indused apoptosis of cells.'' Life Sci. 2003; v. 73(10) p. 1231-43.
104. Kim MS., Lee J., Lee KM., Yang SH., Choi S., Chung SY.,Kim TY., Jeong WH., Park R. 'Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-indused apoptosis of cells.'' Life Sci. 2003; v. 73(10) p. 1231-43.
105. Koo JC., Chun HJ., Park HC., Kim MC., Koo YD., Koo SC., Ok HM., Park SJ., Lee SH., Yun DJ., Lim CO., Bahk JD., Lee SY., Cho MJ. ''Over-expression of a seed specific hevein-like antimicrobial peptide from Pharbitis nil enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants.'' Plant Mol Biol. 2002, v. 50, N3, pp. 441-52.
106. Karnchanatat,A Chitinase-Like Protein with α-Amylase Inhibitory Activity from Kluai Hom Thong Banana Fruit: Musa (AAA group) Polkit Sangvanich
107. Food biotechnology 2012 v. 26 no.3 pp. 218-238.
108. Kosourek j., Horejši V. A note on the resent discussion on definition of the term Lectin. Lectins Biol. Biochem. Clinical Biochem., 1983, v. 3.
109. Kovatchev D. "Lectins as a tool in clinical immunological assays". Book of abstracts Interlec 11. 1989, pp. 40.
110. Kheeree, N., Sangvanich, P., and Karnchanatat, A. Antifungal and Antiproliferative ctivities of Lectin from the Rhizomes of *Curcuma amarissima* Roscoe. Applied.Biochemistry and Biotechnology, 2011, 162, 912-925.
111. Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227, 680-685.

112. Lamb J., Shibata S., Goldstein IJ. ''Purification and characterization of Griffonia simplicifolia leaf lectins.'' Plant Physiol. 1983, v. 71, p. 879-887.

113. Lehmann H. S., Heaton T., Mallon D., Holt PG. ''Staphylococcal enterotoxin-B-mediated stimulation of interleukin-13 production as a potential aetiologic factor in eczema in infants.'' Int. Arch. Allergy Immunol. 2004, v.135, N4, pp. 306-12.

114. Steffan, A.M., Lafon, M.E., Gendrault, J.L., Koehren, F., De Monte, M., Royer, C., Kim, A. and Gut, J.P. Feline immunodeficiency virus can productively. Lectins and Pathology 1994, pp. 49.

115. Liener I. Phytohemagglutinins (phytolectins). Ann. Rev. Plant Physiol., 1976, v.27, p.291-319.

116. Lis H., Sharon N. Lectins as molecules and tools. Ann. Rev. Biochem., 1986, v. 55, p. 35-67.

117. Lis H., Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. Eur.J. Biochem., 1993, v.218, p. 1-27.

118. Lockhart C.M., Rowell P., Stewart W.D.P. Phytohaemagglutinin from TM nitrogen-fixing lichenes Peltigera canina and P. polydactila. FEMS Microbiol. Lett., 1978, v.3, p.127-130.

119. Lowry O.H., Rosebrought N.J., Far A. L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193, 1, 265-271.

120. Maciel EV., Araujo-Filho VS., Nakazawa M., Gomes YM., Coelho LC., Correia MT. ''Mitogenic activity of Cratylia mollis lectin on human lymphocytes.'' Biologicals. 2004, v. 32, N 1, pp.57-60.

121. Mahmoud Mohamed Elaasser, Marwa Mostafa Abdel-Aziz and Rasha Ahmad El-KassasAntioxidant, antimicrobial, antiviral and antitumor activities of pyranone derivative obtained from *Aspergillus candidus Chelidonium majus* L. (Greater celandine). J. Microbiol. Biotech. Res., 2011, 1 (4):5-17.

122. Marilena Gilcaa,b Laura Gamana,b Elena Panaita Irina Stoiana,b Valeriu Atanasiua.*Chelidonium majus* – an Integrative Review: Traditional Knowledge versus Modern Findings. 17:241–248 Published online: October 8, 2010.

123. Mäkelä O. Studies in hemagglutinins of leguminose seeds. Ann. Med. Exp. Biol.Fenn. v.35. Suppl.11, 1957, p.11-35.

124. Mellor R. B., Gadd G. M., Rowell P., Stewart W. D. A phytohemagglutinin from the Azolla-Anabaena symbiosis. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1981, v.99, p.1348-1353.

125. Mirelman D., Galun F., Sharon N., Lotan R. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. Nature, 1975, v. 256, p. 414-416.

126. Miyagi T., Takehara T., Tatsumi T., Suzuki T., Jinushi M., Kanazawa Y., Hiramatsu N., Kanto ., Tsuji S., Hori M., Hayashi N. Concanavalin A injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an antitumor effect in murine liver.'' Hepatology. 2004, v. 40, N5, pp. 1190-6.

127. Mo Y., Lim LY. ''Preparation and in vitro anticancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl myristate.'' J. Control. Release. 2005, v.107, N 1, pp. 30-42.

128. Nawrot R. Maria Wo³uñ-Cholewa2, Anna GoŸdzicka-Józefiak Nucleases isolated from *Chelidonium majus* L. milky sap can induce apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells but not in Chinese Hamster Ovary CHO cells. University of Medical Sciences, Poznañ, Poland v. 46, No. 1, 2008, pp. 79-83.

129. Ohba H., Bakalova R. ''Relationships between degree of binding, cytotoxicity and cytoagglutinating activity of plant-derived agglutinins in normal lymphocytes and cultured leukemic cell lines.'' Cancer Chemother. Pharmacol. 2003, v.51, N6, pp.451-8.

130. Olden K., Parent B., White S.L. ''Carbohydrate moieties of glycoproteins. A re evaluation of their function.'' . Biochim. Biophys. Acta., 1982, v. 650, p. 209-232.

131. Ostanin AA., {ernqx EP., Hubinskij GZ., Lozoboj VP., Kurmanova LV., Ermolin GA. "Funkcional`nqe svojstva B-limfocitov u bol`nqx B-kleto[nqm variantom xroni[eskogo limfoleikoza (B-XLL)". Immunol. 1989, 2, pp. 63-66.

132. Overlgone JH, Koninkx JF, Pusztai A, Bardocz S, Kok W, Ewen SW, Hendriks HG, van Dijk JE Decreased levels of heat shock proteins in gut epitelial cells after exposure to plant lectins'' Gut, 2000, v. 46 N 5, pp. 679-87.

133. Paul Chal P.– Medicinal Plants of Sarawak, – Sarawak, Malaysia. 2009.

134. Peumans W.J., Van Damme E.J.M. Lectins as plant defence proteins. Plant Physiol., 1995, v. 109, pp. 347-352.
135. Peumans W.J., Nsiba-lubeki M., Carlier A.R., Driessche V.E.. Planta, 1984, 160, 220-228.
136. Peumans W.J., Verhaert P. et al., FEBS Letters 396, 1996, 261-265.
137. Peumans WJ, De Ley M, Stinissen HM, Broekaert WF. Isolation and Partial Characterization of a New Lectin from Seeds of the Greater Celandine (Chelidonium majus). Plant Physiol. 1985 Jun;78(2):379–383.
138. Peumans W.J., Hao Q., Van Damme E.J.M. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? The FASEB Journal. 2001,15:1493-1506.
139. Petnual, P., Sangvanich, P., and Karnchanatat, A. A lectin from the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* L.) and its antifungal, antibacterial and alpha-glucosidase inhibitory activities. Food Science and Biotechnology, 2010,19, 907-916.
140. Percin, I., Yavuz, H., Aksoz, E., and Denizli, A. *N*-Acetyl-D-galactosamine-Specific Lectin Isolation from Soyflour with Poly (HPMA-GMA) Beads. Journal of Applied Polymer Science, 111, 2009, 148-154.
141. Pistole Th. G. Interaction of Bacteria and Fungi with lectins and lectin-like substances. Ann. Rev. Microbiol. 1981, 35: 85-112.
142. Presant C.A., Kornfeld S.J. J. Biol. Chem., 1972, 247, 6937-6945.
143. Rajindar S. Sandhu, Ranbir S. Reen. Distribution, specificity and in vivo function of phytolectins. Lectins – Biology, Biochem., Clin. Biochem. v. 2: Proc.of the Fourth lectin meeting. Copenhagen, June 1981.
144. Ratanapo S., Ngamjunyaporn W., Chulavatnatol M. ''Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, P. syrinagae pv mori.''2001.
145. Ratanapo S., Ngamjunyaporn W., Chulavatnatol M. "Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, P. syringae pv mori",Plant Sci., 2001; v-160(4): pp. 739-744.
146. RENKONEN, K. O.-(1948) Ann. Med. exp. Fenn., 26, 66.-(1950) Ibid., 28, 45.
147. Ram Sarup Singh, Hemant Preet Kaur, Jagat Rakesh Kanwar. Mushroom Lectins as Promising Anticancer Substances. Current protein and Peptide Science. 2016 v.17, pp. 797-807.

148. Rabia Hamid, Akbar Masood, Ishfak H. Wani, and Shaista Rafiq, Lectins: Proteins with Diverse Applications. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2013, 3 : pp. 93-103.

149. Reecke G., Becker J., Edelman G. ‘’The covalent and threedimentional structure of concanavalin A. Atomic coordinates, hydrogen bounding and quaternary structure’’. J. Biol. Chem., 1975, v. 250, p. 1525-1547.

150. Repon Kumer Saha*, Srijan Acharya, Maha Jamiruddin, Priyanka Roy, Md. Sohidul Islam, Syed Sahidul Haque Shovon. Antimicrobial effects of a crude plant lectin isolated from the stem of *Tinospora tomentosa.* The Journal of Phytopharmacology 2014, 3(1): 44-51.

151. Robert Nawrot1, Maria Wo³uñ-Cholewa2, Anna GoŸdzicka-Józefiak1 Nucleases isolated from *Chelidonium majus* L. milky sap can induce apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells but not in Chinese Hamster Ovary CHO cells. University of Medical Sciences, Poznañ, Poland Vol. 46, No. 1, 2008, pp. 79-83.

152. Richard M. N., Michael A. V.”From auxin-binding protein to plant hormone receptor”. TIBS 16. 1991, pp. 72-75.

153. Richardson P.T., Hussan R., Woodland H.R., Lord J.M., Roberts L.M. The effects of N glycosylation on the lectin activity of recombinant ricin B chain. Carbohydr. Res., 1991, v. 213, p.19.

154. Roberts D.D., Goldstein I.J. Effect of carbohydrate and metal ion binding on the reactivity of the essential thiol groups of lima bean lectin. J. Biol. Chem., 1984, v. 259, pp. 903-908.

155. Rocío Esteban, Berta Dopico, Francisco J. Muñoz, Silvia Romo and Emilia Labrador.” A seedling specific vegetative lectin gene is related to development in *Cicer arietinum*”. Physiologia Plantarum. 2002, v. 114, pp. 619.

156. Rűdiger H. On the physiological role of plant lectins.Bioscience.1984, 34. 2. 95- 99.

157. Rule A.H., Boyd W.C. Transfussion, 1964, 4, 449-452.

158. Sabnis D.D., Hart J.W. Planta, 1978, 142, pp.97-101.

159. Sakeena Qadir, Ishfak Hussain Wani, Shaista Rafiq, Showkat Ahmad Ganie, Akbar Masood Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from

Indigofera heterantha FOLIA HISTOCHEMICAET CYTOBIOLOGICA Advances in Bioscience and Biotechnology, 2013, 4, 999-1006.

160. Sandeep K. Singh, Seema Singh, Sanjeev K Verma, Piyush Jain, Vinod K. Dixit, Sanjeev Solanki. A REVIEW ON PLANTS OF GENUS POLYGONATUM. International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences. 2013, Vol. 2, No.3, pp. 387-397.
161. Sequera L., Graham T.L. Agglutination of avirulent strains of Phaseolus solanacearum by potato lectin. Physiol. Plant Pathol., 1977, v. 11, p. 43-54.
162. Siegle I, Fritz P, McClellan M, Gutzeit S, Murdter TE. Combined cytotoxic action of Viscum Album agglutinin-1 and anticancer agents against human A549 lung cancer cells.'' Anticancer Res. 2001, v-21, N-4A, pp. 2687-91.
163. Siegle I, Fritz P., McClellan M., Gutzeit S., Murdter TE. ''Combined cytotoxic action of Viscum album agglutinin-1 and anticancer agents against human A549 lung cancer cells.'' Anticancer Res. 2001, v. 21, N 4A, pp. 2687-91.
164. Singh Bains J., Singh J., Kamboj SS, Nijjar KK., Agrewala JN., Kumar V., Kumar A., Saxena AK. ''Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (Sauromatum venosum).'' Biochim Biophis Acta. 2005, v. 1723, N1-3, pp. 163-74.
165. Singh J., Singh J., Kamboj SS. ''A novel mitogenic and antiproliferative lectin from a wild cobra lily, Arisaema flavum.'' Biochem Biophys Res Commun. 2004, v. 318, N 4, pp. 1057-65.
166. Spilarto S.P. Cochram G.R., Walker R.E., Cablish K.L., Bittner C.C. Characterization of a new lectin of soybean vegetative tissues. Plant Physiol.,1996, v. 110, p. 825-834.
167. Stillmark H. Ricin, ein giftiges ferment aus den samen von Ricinus communis und einigen anderen Euforbiaceaen. Inaug. Dissertation, dorpat., 1888.
168. Tabiasco J, Pont F, Fourine JJ, Vercellone A. ''Mistletoe viscotoxins increase natural killer cell-mediated cytotoxicity.'' Eur. J. Biochem. 2002, v 269, N 10, pp.2591-2600.
169. Takatsy G., Symp. Series Immunobiol. Standar. 4, 1967, 275-280.
170. Tammy Yau, Xiuli Dan, Charlene Cheuk Wing Ng and Tzi Bun Ng. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. Molecules 2015, 20, 3791-3810;

171. Tande A. T., Lade M. S., Patil A. R., Patil A. B. and J. I. souza. Screening of Soy Lectin: As new Era Cancer Healing Agent. International Journal of Biological & Pharmaceutical Research. 2016, Sr No: 40, P No: 2147.

172. Talbot C., Etsler M. development and distribution of dolichos biflorus lectin as measured by radioimmunoassey.'' Plant Physiol., 1978, v. 61, p. 847-850.

173. Tian, Q., Wang, W., Miao, C., Peng, H., Liu, B., Leng, F. Purification, characterization and molecular cloning of a novel mannose-binding lectin from rhizomes of *Ophiopogon japonicus* with antiviral and antifungal activities. Plant Science, 175, 2008, 877-884.

174. Tollefsen S., Kornfeld R. The B4 lectin from Vicia Villosa seeds interacts with N-acetyl-galactosamine residues – linked to serine or threonine residues in cell surface glycoproteins. J.Biol. Chem., 1983, v. 258, pp. 5172-5176.

175. Tomasu, 2004, Tomasu M., Mujin T., Shibamoto N., Tashiro F., Ikuta A. ''Production of aralin, a selective cytotoxic lectin against human transformed cells, in callus culture of *Aralia elata.*'' Planta Med. 2004, v. 70(5), pp.469-71.

176. Umekawa H., Takao K., Fujihara M. et al."Interaction of *Phaseolus vulgaris* lectin with indole derivatives". In Agric. Biol. Chem.1990, 54, pp. 3295-9.

177. Van Damme E.J.M., Balsarini J., Smeets K., Van Leuven F., Peumans W.J. The monomeric and dimeric mannose-binding proteins from the Orchidaceae species Listera ovata and Epipactis helleborine, sequence homologies and differences in biological activities. Glycoconjugate J.,1994, v. 11, p. 321-332.

178. Van Damme E.J.M., Peumans W.J., The Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomed.Applications, 1998, pp. 417-421.

179. Van Damme E. J and Peumans W. J. Lectins as plant defense proteins. Plant Physiol. Oct; v.109(2): 1995, 347–352.

180. Van Damme J.M., Peumans W.J. Changes in lectin concentration during depelopment of *G. nivalis* and *N. pseudonarcissus* plants. Arch. Int. phys. biochem. 1990, 98. №6.

181. Wallays G.&Ceuppens J. L."Humman T-lymphocyteactivation by pokeweed mitogen inducesproduction of TNF-alpha and GM-CSF and helper cell signalling by IL-1. European Cytokine Network; 1993, 4, pp. 269-277.

182. Weber C., Franke W.W., Kartenbeck J. Exp. Cell Res. 1974, 87, 79-106.

183. Wittenbach V.A., Lin W., Hebert R.R. Vacuolar localization of proteases and degradation of chloroplasts in mesophyll protoplasts from senescing primary wheat leaves. Plant Physiol., 1982, v. 69, pp. 98-103.

184. Wong JH., Ng TB ,,Isolation and characterization of a glucose/mannose/rhamnose-specific lectin from the knife bean Canavalia gladiata.'' Arch Biochem Biophys. 2005, v.439, N 1, pp. 91-8.

185. Wong JH., Ng TB. ''Gymnin, a potent defensin-like antifungal peptide from the Yunnan bean (Gymnocladus chinensis Baill).'' Peptides. 2003, v.24, N 7, pp.963-8.

186. Yevdokimova NY., Yefimov AS. ''Effects of wheat germ agglutinin and concanavalin A on the accumulation of glycosaminoglycans in pericellular matrix of human dermal fibroblasts. A comparison with ansulin.''Acta Biochim Pol. 2001, v. 48(2), pp. 563-72.

187. Zhang N., Ping QN., Huan GH., Xu WF. ''Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration.'' Int J Pharm. 2005, v. 294(1-2), pp.247-59.

188. Zou LB, Zhan JB. ''Purification and anti-cancer activity of ricin.'' Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. 2005, v-34, N-3, pp.217-9.