საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის
ქართული უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო
მეცნიერებათა სკოლა (ფაკულტეტი)

ბიოტექნოლოგია

მაია ხურციძე

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

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის
მოსაპოვებლად წარმოდგენილი ნაშრომის

სადისერტაციო მაცნე

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

თბილისი

2017 წელი

სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტის ბიოტექნოლოგიის მიმართულებაზე.

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: **გიორგი ალექსიძე**
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი.

ოფიციალური ოპონენტები: **1. ზურაბ ლომთათიძე**
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი.

2. ელენე დავითაშვილი
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი.

დისერტაციის დაცვა შედგება 2017 წლის „10“ თებერვალს 14^{00} საათზე, საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის ქართული უნივერსიტეტის ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა სკოლის (ფაკულტეტის) სადისერტაციო კომისიის სხდომაზე.

მისამართი: 0162, თბილისი, ილია ჭავჭავაძის №53ა, მე-2 კორპუსი, ილია ვეკუას სახ. აუდიტორია №104.

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

სადისერტაციო მაცნე დაიგზავნა 2017 წლის ,,10'' იანვარს.

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი

ტექნიკურ მეცნიერებათა აკადემიური დოქტორი

თეიმურაზ კივილაძე

სარჩევი

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა ----------4
კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები ----------5
ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და ძირითადი შედეგები ---------6
კვლევის თეორიული და მეთოდოლოგიური საფუძვლები -------7
ნაშრომის თეორიული ღირებულება ----------8
ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა ----------8
ნაშრომის სტრუქტურა და მოცულობა----------8

ნაშრომის ძირითადი შინაარსი

თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა ----------9
თავი II. კვლევის ობიექტი და მეთოდები ----------9
თავი III. კვლევის შედეგები და მათი განხილვა ----------10
დასკვნები ----------19
დისერტაციის თემასთან დაკავშირებული
პუბლიკაციების ნუსხა ----------21

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა

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. (W. peumans, Van Damme 2000).

განსაკუთრებით აქტუალური და პერსპექტიულია ასევე ლექტინოლოგიის განვითარება გამოყენებითი მიმართულებით 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 (Charungchitrak et.al 2011).

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 მიმართულებას.

კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები

მიზანი: სადისერტაციო ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა, საქართველოში გავრცელებული, უნიკალური სამკურნალო მცენარის ქრისტესისხლას (*Chelidonium majus*) ახალი ლექტინები, მოგვეხდინა სხვადასხვა ორგანოებიდან მათი გამოყოფა, იდენტიფიკაცია, ბიოქიმიური დახასიათება, ბიოლოგიური როლისა და ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა. აღნიშნული, ერთის მხრივ, გააფართოვებდა წარმოდგენებს მცენარეული ლექტინების ბიოლოგიური როლის შესახებ და მეორე მხრივ შექმნიდა წინაპირობას მისი სოფლის მეურნეობაში, ბიოტექნოლოგიაში, ბიომედიცინასა და მეცნიერების სხვა სფეროებში მათი გამოყენების პერსპექტივას.

ამოცანები: სადისერტაციო ნაშრომის ძირითადი მიზნის განსახორციელებლად დასმული იქნა შემდეგი კონკრეტული ამოცანები.

- გამოგვევლინა მცენარე ქრისტესისხლას ლექტინური აქტივობის მქონე ცილები;
- შეგვესწავლა მათი შემცველობა მცენარის სხადასხვა ორგანოთა ქსოვილებში;
- დაგვედგინა მათი რაოდენობრივი შემცველობა, მცენარის ფიზიოლოგიურად მკვეთრად განსხვავებულ ორგანოთა ქსოვილებში;
- დაგვემუშავებინა მცენარე ქრისტესისხლადან ლექტინის ინდივიდუალური მოლეკულების სახით გამოყოფისა და გასუფთავების მეთოდები;
- შეგვესწავლა გასუფთავებული ლექტინის ფიზიკურ-ქიმიური მახასიათებლები;
- მოგვეხდინა ინდივიდუალური მოლეკულის სახით გასუფთავებული ლექტინის ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა;

• შეგვესწავლა ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ანტიბაქტერიული აქტივობა, ფიტოპათოგენურ ბაქტერიულ კულტურებზე;

• შეგვესწავლა ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ანტისოკოვანი აქტივობა პათოგენურ ტესტ-კულტურებზე.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და ძირითადი შედეგები

ჩვენს მიერ დამუშავებული მეთოდით, საქართველოში ფართოდ გავრცელებული უნიკალური სამკურნალო მცენარე ქრისტესისხლადან (*Chelidonium majus*), გამოყოფილი და იდენტიფიცირებულია ახალი ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინი (CBL).

შესწავლილია ხსნადი CBL-ის განაწილება ქრისტესისხლას ფუნქციურად განსხვავებულ ორგანოებში და მათი შემცველობის დინამიკა, თესლის აღმოცენების პროცესში, მათი ფიზიოლოგიური მდგომარეობის გათვალისწინებით.

შესწავლილია ქრისტესისხლას თესლის გაღივებული და გაუღივებელი თესლებიდან, გარემომცველ არეში სეკრეტირებული CBL-ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა, შაქრების მიმართ სპეციფიკურობა, ანტიბაქტერიული და ანტისოკოვანი მოქმედება. ნაჩვენებია, რომ CBL-ის ყველაზე მაღალი შემცველობით გამოირჩევა თესლი.

დადგენილია ქრისტესისხლას ორგანოებიდან, CBL-ის საექსტრაციო ხსნარის ოპტიმალური შემადგენლობა და ექსტრაქციის ოპტიმალური დრო. პირველად სამი განსხვავებული მეთოდით (სინათლის მიკროსკოპით, პლანშეტებზე მიკროტიტრაციის და ფოტოკოლორიმეტრული), გამოვლენილია ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ანტიბაქტერიული და ანტისოკოვანი თვისებები.

ნაჩვენებია, რომ 20 განსხვავებული ტიპის ნახშირწყლიდან, ქრისტესისხლას თესლებიდან იზოლირებული ლექტინი, სპეციფიკურობას ავლენს ქიტინის მიმართ, ე. ი. ის მიეკუთვნება ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინების ჯგუფს.

ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინის, ფიზიკო-ქიმიური თვისებების შესწავლამ გამოავლინა, რომ მისი ნატიური მოლეკულის მეოთხეული სტუქტურა წარმოდგენილია დიმერის სახით, მისი მოლეკულური მასა 34 kDa-ია, შედგება 2 თანაბარი 17 kDa მოლეკულური მასის 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. ლექტინური აქტივობა ვლინდება pH 5.5-დან pH 9.0-ის ფარგლებში. მაქსიმალური აქტივობა აღინიშნება pH 7.0-8.0 დიაპაზონში. ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე გავლენას არ ახდენს ორვალენტიანი მეტალის იონები (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}).

ნაჩვენებია, რომ ლექტინი CBL ხასიათდება ანტიბაქტერიული აქტივობით სხვადასხვა ფიტოპათოგენური ბაქტერიების მიმართ და იწვევს მათი ზრდის შეკავებას, ინჰიბირებას. ასევე შესწავლილი იქნა CBL-ის ანტისოკოვანი თვისებებიც, თუმცა ის შერჩევითად მოქმედებს სოკოებზე მათი ჰიფების აგლუტინაციის გზით.

კვლევის თეორიული და მეთოდოლოგიური საფუძვლები

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

სადისერტაციო ნაშრომის მეთოდოლოგიურ 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 გელფილტრაციული ქრომატოგრაფიის, აფინურ სორბენტებზე აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდები; პრეპარატული და

ანალიზური ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელებში; ცილების შემადგენლობაში ნახშირწყლების განსაზღვრა ელექტროფორეზის და შიფის რეაგენტის გამოყენებით.

ნაშრომის თეორიული ღირებულება

სადისერტაციო ნაშრომში წარმოდგენილი შედეგები აღრმავებენ თეორიულ ცოდნას, მცენარეული ლექტინების ფიზიოლოგიური როლის შესახებ. მიღებული შედეგების საფუძველზე გამოთქმულია მოსაზრება მცენარეული ლექტინების დამცველობითი ფუნქციების შესახებ და ქმნის ფუნდამენტს მათი ამ კუთხით შესწავლისათვის. წარმოდგენილი კვლევის შედეგები აღრმავებს მეცნიერულ ცოდნას, ლექტინების ანტიბაქტერიული და ანტისოკოვანი მოქმედების მოლეკულური მექანიზმების შესახებ.

ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა

სადისერტაციო ნაშრომში, ფუნდამენტური და გამოყენებითი მიმართულებით ჩატარებული კვლევის შედეგების საფუძველზე, წარმოდგენილია მოსაზრებები საქართველოში გავრცელებული სამკურნალო მცენარე ქრისტესისხლას (*Chelidonium majus)* ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინის, ფიზიოლოგიური როლისა და ბიოლოგიური აქტივობის შესახებ. კერძოდ, გამოთქმულია მოსაზრება ლექტინ CBL-ის ანტიმიკრობული და დამცველობითი როლის შესახებ და განიხილავს სოფლის მეურნეობაში მცენარეების ანტიმიკრობულ ბუნებრივ აგენტებად და კლინიკურ მედიცინაში ანტიბაქტერიულ და ანტისოკოვან სამკურნალო პრეპარატებად ლექტინების გამოყენების პერსპექტივას.

ნაშრომის სტრუქტურა და მოცულობა

დისერტაცია მოიცავს: შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას, კვლევის ობიექტს და მეთოდებს, კვლევის შედეგებს და მათ განხილვას, დასკვნებს, გამოყენებული ლიტერატურის სიას (155 წყარო). იგი ილუსტრირებულია 10 ცხრილით და 24 სურათით. ნაშრომის მოცულობა 120 გვ.-ია.

ნაშრომის ძირითადი შინაარსი

თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა

ლიტერატურის მიმოხილვაში წარმოდგენილია, მცენარეული ლექტინების ისტორიული მიმოხილვა და განმარტება, ლექტინების კლასიფიკაცია. განხილულია ლექტინების ბიოქიმიური თვისებები, ლექტინების სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ, ლექტინების გავრცელება მცენარეებში, მათი განაწილება მცენარეთა ორგანოებსა და ქსოვილებში და მათი შემცველობის დინამიკა. წარმოდგენილია ლიტერატურული მონაცემები და სხვადასხვა კონცეფციები ლექტინების ფიზიოლოგიური როლის შესახებ მცენარეებში. წარმოდგენილია კვლევის შედეგები, ლექტინების ანტიბაქტერიული და ანტისოკოვანი აქტივობის შესახებ.

თავი II. კვლევის ობიექტი და მეთოდები

კვლევის ობიექტი. ახალი ლექტინების იდენტიფიკაცია, მათი ბიოლოგიური როლის და გამოყენების სფეროების შესწავლა ლექტინოლოგიის ერთ-ერთ აქტუალურ პრობლემად რჩება. ამ მიზნით, კვლევის ობიექტად შერჩეული იქნა, საქართველოში საველე პირობებში გავრცელებული ყაყაჩოსებრთა (*Papaveraceae*) ოჯახის მეტად საინტერესო წარმომადგენელი სამკურნალო მცენარე ქრისტესისხლა (*Chelidonium majus*).

მედიცინაში ქრისტესისხლა ფართოდ გამოიყენება: კანის ტუბერკულიოზის, პოდაგრების, რევმატიზმების, ბებერების, ეგზემების, მეჭეჭების, კანის სიმსივნეების, სიფილისის, ფსორიაზის, მალარიის, მწვავე და ქრონიკული ჰეპატიტების, წითელი მგლურას სამკურნალოდ. გამოიყენება აგრეთვე თირკმლებისა და ნაღვლის ბუშტის დაავადებების, მსხვილი ნაწლავის პოლიპოზების, მენსტრუალური დაავადებების, ჰემოროების, თავბრუსხვევის, ძლიერი ხველების, თავის ტკივილების, და ართრიტების დროს. 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 და სხვა. ზემოთქმულიდან გამომდინარე, კვლევის ობიექტად შერჩეული იქნა ქრისტესისხლა.

კვლევის მეთოდები. ლექტინის ფიზიკურ-ქიმიური დახასიათების მიზნით გამოყენებულია: მაღალი წნევის გელ-ფილტრაციული ქრომატოგრაფიის, ნატიური და დისოცირებულ პირობებში ცილების გრადიენტული ელექტროფორეზის, შაქრების მიმართ სპეციფიკურობის დადგენის ჰაპტენ-ინჰიბიტორული (I. Liener 1976) მეთოდები.

ლექტინის შემცველობას და სპეციფიკურ აქტივობას ვსაზღვრავდით სამი განსხვავებული მეთოდით: ვიზუალურად იმუნოლოგიურ პლანშეტებზე ტაკაჩის (G.Takatsy 1967) მეთოდით, ჩვენს მიერ შემუშავებული ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით და სინათლის მიკროსკოპის გამოყენებით.

ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის ანტიბაქტერიულ და ანტისოკოვან მოქმედებას, ვსწავლობდით დისკ-დიფუზიური (A. Bauer M. Kirby 1966) და ასევე ბაქტერიებით ლექტინების აგლუტინაციის მეთოდებით.

ექსპერიმენტებს ვატარებდით მინიმუმ 5 ჯერადი განმეორებით და კვლევის შედეგებს ვამუშავებდით სტატისტიკურად სტიუდენტის მეთოდის გამოყენებით.

თავი III. კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

სამუშაოს საწყის ეტაპზე შესწავლილი იქნა ლექტინების შემცველობა ზრდასრული ქრისტესისხლას სხვადასხვა ორგანოებში (ყვავილი, ფოთოლი, ღერო, ფესვი და ღეროს წვენი).

ცხრილი 1. ლექტინების შემცველობა ქრისტესისხლას ორგანოებში

ქრისტესისხლას ორგანოები	საერთო ცილა მგ/მლ	ჰემაგლუტინაციის ტიტრი	ჰემაგლუტი-ნაციური აქტივობა მგ/მლ	სპეციფიკური აქტივობა მგ/მლ	ლექტინების შემცველობა (აგლუტ. ერთ.)
ყვავილი	-	-	-	-	-
ღერო	-	-	-	-	-
ფოთოლი	-	-	-	-	-
ფესვი	-	-	-	-	-
თესლი	**7.21**	**16 384**	**0.000022**	**2272.4**	**327 727**
ღეროს წვენი	-	-	-	-	

ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად დადგენილ იქნა, რომ ქრისტესისხლას ყვავილები, ფესვები, ღეროები, ფოთლები, ღეროს ნარინჯისფერი წვენი არ შეიცავს ჰემაგლუტინაციური აქტივობის მქონე ცილებს-ლექტინებს (ცხრილი 1). როგორც ცხრილში წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, ლექტინები წარმოდგენილია ქრისტესისხლას მხოლოდ ახლად მომწიფებულ თესლებში.

სპეციალურ ცდებში შევისწავლეთ ქრისტესისხლას ლექტინის (CBL) სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ. საანალიზოდ გამოყენებული იყო 20 განსხვავებული ნახშირწყალი (D-გალაქტოზა, მეთილ-D-გალაქტოზა, N-აცეტილ-D-გალაქტოზამინი, 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), საწყისი კონცენტრაციით 200 mM. დადგენილ იქნა, რომ შერჩეული შაქრებიდან ქრისტესისხლას ლექტინის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა, კავდება მხოლოდ N-აცეტილგლუკოზამინის ოლიგომერების თანაობისას (ნაწილობრივ გასუფთავებული ქიტინის ჰიდროლიზატი).

კვლევის შემდეგ ეტაპზე შემუშავებული იქნა ქრისტესისხლას ლექტინის CBL-ის გამოყოფისა და გასუფთავების მეთოდი.

ცხრილი 2. ქრისტესისხლას თესლებიდან CBL -ის გამოყოფისა და გასუფთავების ძირითადი ეტაპები

CBL -ის გასუფთავების ძირითადი ეტაპები	CBL -ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა (მგ/მლ)	CBL -ის გასუფთავების ხარისხი
ექსტრაქტი	0.028	0
ამონიუმის სულფატით ფრაქციონირება	0.0094	2.98
თერმოდამუშავება	0.0028	25
აცეტონით დამუშავება	0.0011	176
ქრომატოგრაფია Toyopearl HW-55 -ის სვეტზე	0.00027	103
აფინური ქრომატოგრაფია ქიტინის სვეტზე	0.000022	1 272

$p<0.01$

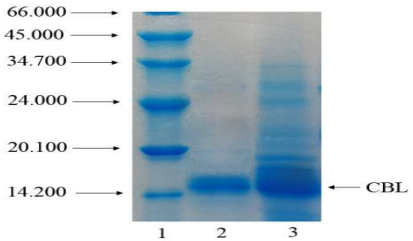
როგორც ცხრილი 2-დან ჩანს, ქრისტესისხლას ლექტინის გასუფთავების ძირითადი ეტაპები მოიცავს 6 სტადიას: 1. თესლიდან ცილოვანი ექსტრაქტის მიღება; 2.ცილების ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით; 3.თერმული დამუშავება +60^{0}C-ზე 30 წთ-ის განმავლობაში. 4.აცეტონით დამუშავება, 5. ქრომატოგრაფია Toyopearl HW-55-ის სვეტზე; 6.აფინური ქრომატოგრაფია ქიტინის სვეტზე.

ცხრილი 2-იდან ჩანს, რომ გასუფთავების ყოველ მომდევნო ეტაპზე CBL-ის შემცველი ცილოვანი ფრაქციების ჰემაგლუტინაციური აქტივობა იზრდება. შესაბამისად იზრდება CBL-ის გასუფთავების ხარისხი. გასუფთავების ყოველ შემდგომ ეტაპზე ჰემაგლუტინაციური აქტივობა შესაბამისად იზრდება 2.98, 25, 176, 1 272- ჯერ და გასუფთავების ბოლო ეტაპის შემდეგ CBL-ის აქტივობა შეადგენა 0.000022 მგ/მლ, ხოლო გასუფთავების ხარისხი 1 272 -ჯერ გაიზარდა.

კვლევის შემდგომ ეტაპზე, გელ-ფილტრაციის მეთოდის და საკალიბრო სტანდარტული ცილების (მარკერების) გამოყენებით,

დადგენილ იქნა აფინურად გასუფთავებული CBL-ის ნატიური მოლეკულური მასა. საკალიბრო მრუდის გათვლების მიხედვით დადგენილია, რომ ნატიური CBL-ის მოლეკულური მასა 34,000 Da.-ია.

CBL-ის მეოთხეული სტრუქტურის დასადგენად, ცდების შემდგომ ეტაპზე, ვახდენდით ნატიური CBL-ის მოლეკულების დენატურაციას ნატრიუმის დოდეცილსულფატის თანაობისას (CBL) და ვსაზღვრავდით მისი შემადგენელი სუბერთეულების მოლეკულურ მასებს და რაოდენობას.



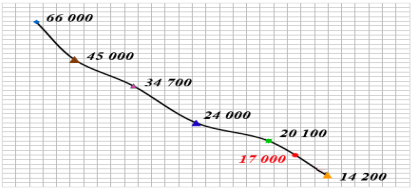
სურ. 1. ლექტინი CBL-ის და სტანდარტული მარკერული ცილების პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელში (10-25%) დისოციაციის პირობებში (SDS-ის თანაობისას) ელექტროფორეზის ელექტროფორეგრამა.

1. SDS მოლეკულური მასის მარკერები, მოლეკულური მასების დიაპაზონი 14,000–70,000 Da, გელში ჩატვირთული სინჯების მოცულობა 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. აფინური ქრომატოგრაფიით გასუფთავებული ლექტინი- CBL.
3. Toyopearl HW-55 სვეტზე, გელფილტრაციული ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებული ლექტინ CBL-ის შემცველი ცილების ფრაქცია.

როგორც სურ. 1-ზე წარმოდგენილი ელექტროფორეგრამა გვიჩვენებს, აფინური ქრომატოგრაფიის შედეგად გასუფთავებული CBL დისოცირებულ პირობებში მიგრირებს ერთი კომპაქტური ფრაქციის სახით, რაც ადასტურებს, რომ იგი წარმოადგენს

გასუფთავების შედეგად მოღებულ CBL-ის თანაბარი მოლეკულური მასის პოლიპეპტიდს (ტრეკი 2).

Log. Mol. Weight



Rf

სურ. 2. საკალიბრო მრუდი ლექტინი CBL და სტანდარტული მარკერული ცილებისათვის, აგებული პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელში (10-25%) დისოცოაციის პირობებში (SDS-თანაობისას) ელექტროფორეზის შედეგად მიღებული ელექტროფორეგრამის მიხედვით.

სურ.2-ზე წარმოდგენილია ელექტროფორეგრამის მიხედვით აგებული საკალიბრო მრუდი, დადგენილ იქნა, რომ CBL-ის შემადგენელი სუბერთეულების მოლეკულური მასა თანაბარია და შეადგენს 17.000 Da.

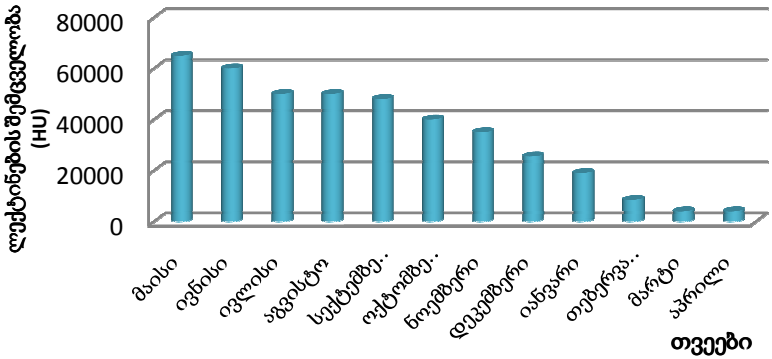
ამრიგად დადგენილია, რომ CBL-ის ნატიური მოლეკულის მეოთხეული სტრუქტურა წარმოდგენილია დიმერის სახით და მისი მოლეკულური მასა შეესაბამება 34, 000 დალტონს, შედგება 2 თანაბარი მოლეკულური მასის მქონე სუბერთეულისაგან, მოლეკულური მასებით 17,000 დალტონი და მიეკუთვნება ჰოლოლექტინების კლასს.

კვლევის შემდგომ ეტაპზე შესწავლილ იქნა, ლექტინ CBL-ის ბიოქიმიური მახასიათებლები. ჩატარებული ექსპერიმენტების შედეგად დადგენილ იქნა, რომ ლექტინი CBL თერმოსტაბილურია (ინაქტივირდება 60^0C-ზე). 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 იონები (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}).

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.

ექსპერიმენტების შემდგომ ეტაპზე, შესწავლილ იქნა ქრისტესისხლას თესლებში CBL-ის შემცველობის დინამიკა (HU) სეზონურობის მიხედვით. ლექტინების შემცველობას თესლებში ვსაზღვრავდით ერთი წლის განმავლობაში, ყოველ მე-3 თვეს. როგორც სურათ 3-დან ჩანს, CBL-ის შემცველობა ქრისტესისხლას თესლებში ივნისადან დაწყებული მაისის ჩათვლით, მნიშვნელოვნად მცირდება.



სურ 3. ქრისტესისხლას თესლებში ლექტინების შემცველობის სეზონური დინამიკა.

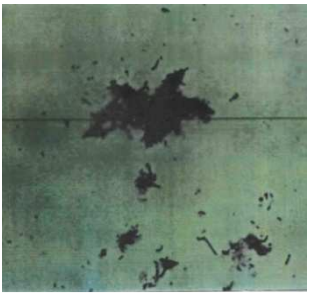
სპეციალურ ცდებში შესწავლილ იქნა, ქრისტესისხლას თესლში და მის გარემომცველ არეში, CBL-ის შემცველობის დინამიკა გაღივებიდან 25 დღის გამნმავლობაში. ჩატარებული კვლევის შედეგებით გამოვლენილი იქნა, რომ CBL-ის შემცველობა თესლებში მათი გაღივების მე-5, მე-10 და მე-15 დღეს ფაქტიურად უცვლელია და შეადგენს (LC=6045), გაღივების მე-20 დღიდან ფიქსირდება CBL-ის შემცველობის მკვეთრი შემცირება (LC=768) და აღწევს მინიმუმს 25-ე დღეს (LC=302). გაღივების სტადიაზე მყოფ თესლების გარემომცველ არეში კი, გაღივების მე-5, მე-10 და მე-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=2142 შეადგინა.

CBL-ის შემცველობის რეციპროკული დამოკიდებულება, ქრისტესისხლას თესლებში და მათ გარემომცველ არეში გაღივების 25 დღის განმავლობაში მიუთითებს, რომ გაღივების მე-20 დღიდან ადგილია აქვს CBL-ის სეკრეციას თესლებიდან გარემომცველ არეში.

ცელკეულ ექსპერიმენტებში შევისწავლეთ გაღივების სტადიაზე, თესლის გარემომცველ არეში გამოყოფილი ლექტინების გავლენა ფიტოპათოგენური ბაქტერიების: *Pectobacterium aroidae, Xanthomonas campestris* და *Agrobacterium tumefaciens* აგლუტინაციის უნარზე.

კონტროლი
ბაქტერია CBL-ის გარეშე

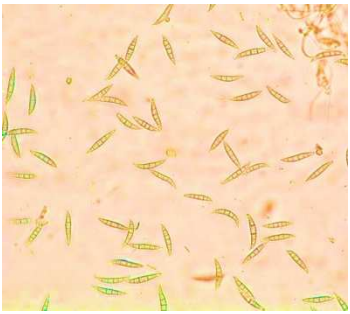


საცდელი
აგლუტინირებული ბაქტერია CBL-ის თანაობისას

სურ. 4. CBL-ის გავლენით ფიტოპათოგენური ბაქტერია-*Agrobacterium tumefaciens*-ის აგლუტინაციის ფიქსაცია ვიზუალური მიკროსკოპით (გადიდება 1200-ჯერ).

როგორც სურ. 4-დან ჩანს საკონტროლოში, სადაც CBL არ იყო გამოყენებული, შეინიშნება ბაქტერიის დიფუზური განლაგება, ხოლო საცდელში, CBL-ის თანაობისას აღინიშნება *Agrobacterium tumefaciens*-ის აგლუტინაცია. იგივე შედეგები იქნა მიღებული, ჩვენს მიერ გამოყენებული სხვა ფიტოპათოგენური ბაქტერიების მიმართაც.

პარარელურად, შევისწავლეთ გაღივების სტადიაზე თესლის გარემომცველ არეში ფიქსირებული ლექტინების გავლენა, ფიტოპათოგენური სოკოების: *Trichoderma viride* და *Fusarium oxsisporium*-ის აგლუტინაციის უნარზე, ვიზუალურად მიკროსკოპის გამოყენებით.



კონტროლი
სოკო CBL-ის გარეშე

საცდელი
აგლუტინირებული სპორები CBL-ის თანაობისას

სურ. 5. CBL-ის გავლენით გამოწვეული ფიტოპათოგენური სოკო-*Fusarium oxsisporium*-ის სპორების აგლუტინაცია. ვიზუალური ფიქსაცია მიკროსკოპით (გადიდება 400-ჯერ)

როგორც სურათიდან ჩანს, ქრისტესისხლას თესლის ლექტინი -CBL in vitro ექპერიმენტებში იწვევს ზოგიერთი ფიტოპათოგენური სოკოს სპორების ძლიერ აგლუტანაციას. მსგავსი შედეგები დაფიქსირდა *Trichoderma viride*-ს სპორების მიმართაც.

სპეციალურ ცდებში შესწავლილ იქნა CBL-ის ანტიმიკრობული აქტივობა დისკ-დიფუზიური მეთოდით ფიტოპათოგენურ ბაქტერიებსა და სოკოების ტესტ კულტურებზე. ექსპერიმენტებში ანტიმიკრობული აქტივობის დასადგენად, გამოყენებული იქნა გაუღივებელი და გაღივებული თესლებიდან და გაღივების მე-20 დღიდან გარემომცველი არიდან გამოყოფილი CBL.

ცხრილი 3. 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** (დათრგუნვის ზონები მმ-ში)		
	გაუღივებელი თესლებიდან იდენტიფიცირებული **CBL**	გაღივებული (25დღე) თესლებიდან იდენტიფიცირებული **CBL**	თესლების გაღივების (25 დღე) გარემომცველ არიდან იდენტიფიცირებული **CBL**
Pectobacterium aroidae	+	+	+
Xanthomonas campestris	+	+	+
Agrobacterium tumefaciens	+	+	+
Trichoderma viride	+	+	+
Fusarium oxsisporium	+	+	+

ცხრილი 3-ში წარმოდგენილი მონაცემები გვიჩვენებენ, რომ გაუღივებელი და გაღივებული თესლებიდან, და გაღივების მე-20 დღიდან გარემომცველი არიდან იდენტიფიცირებულ CBL-ს გაჩნია ანტიმიკრობული აქტივობა, ყველა ექსპერიმენტში გამოყენებული ბაქტერიული ტესტ კულტურების და სოკოს შტამების მიმართ, მონაცემები მიუთითებენ, რომ სამივე წყაროდან იდენტიფიცრებულ CBL-ს გააჩნია პრაქტიკულად იდენტური ანტიმიკრობული აქტივობა.

მიღებული შედეგები გვიჩვენებენ, რომ ქრისტესისხლას თესლები გაღივების მე-20 დღიდან ახდენენ CBL-ის სეკრეციას გარემომცველ არეში და გააჩნიათ ფიტოპათოგენური ბაქტერიების *Pectobacterium aroidae, Xanthomonas campestris, Agrobacterium tumefaciens* და სოკოების *Trichoderma viride*-ს და *Fusarium oxsisporium*-ის აგლუტინაციის, მათი ზრდისა და გამრავლების და დათრგუნვის უნარი. წარმოდგენილი კვლევის შედეგებიდან გამომდინარე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ქრისტესისხლას თესლის CBL-ის ანტიმიკრობული მოქმედების მოლეკულური მექანიზმებისა 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 ფიტოფათოგენური მიკროორგანიზმებისაგან დამცავ ფუნქციას. მიღებული შედეგები გვაძლევენ საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ ბუნებრივ პირობებში ქრისტესისხლას თესლის ლექტინის დამცველობითი როლი უნდა გამოიხატებოდეს, გაღივებადი თესლების დაცვაში ნიადაგში არსებული ფიტოპათოგენური მიკროორგანიზმების მავნე მოქმედებისაგან.

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. 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 oxsisporium*-ის აგლუტინაციას, შედეგად კავდება მათი ზრდა და გამრავლება.
5. დადგენილია ქრისტესისხლას თესლის შაქარსპეციფიკურობა. გამოცდილი 20 შაქრიდან ის სპეციფიკურობას ავლენს, მხოლოდ

ქიტინის (პოლი-N-აცეტილ-D-გლუკოზამინი) მიმართ. ე. ი. CBL ქიტინ-სპეციფიკური ლექტინების ჯგუფს განეკუთვნება.

6. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ქრისტესისხლას - CBL ლექტინი, შესაძლებელია გამოყენებული იყოს, ფიტოპათოგენური ბაქტერიებისაგან დაცვის მიზნით.
7. 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.
8. 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+}).

დისერტაციის თემასთან დაკავშირებული პუბლიკაციების ნუსხა

1. Maia Khurtsidze, Nugzar Aleksidze, George Alexidze ,,Isolation of new lectins from the greater celandine plant (*Chelidonium majus* L.), study of their properties and disstribution within the plant.''Georgian national academy of sciences. vol. 7, no.3, 2013.

2. Maia Khurtsidze, Nugzar Aleksidze, George Alexidze ,,Partial Purification and Biochemical Characteristics of Lectin CBL-1 Isolated from the Greater Celandine (*Chelidonium majus* L.) Plant'' Georgian national academy of sciences. vol. 8, no.3, 2014.

3. Maia Khurtsidze, Nugzar Aleksidze, George Alexidze .,Antimicrobial Activity of Greater Celandine (*Chelidonium majus* L.) Plant Seed Lectin'' Georgian national academy of sciences. vol. 9, no.3, 2015.

4. G. Alexidze, M. Khurtsidze, N. Aleksidze. Purification and Characterization of Novel Lectin from the *Chelidonium majus* with Antimicrobial Activity. Horizons in Cancer Research. (ბეჭდვაშია).

5. მაია ხურციძე, გიორგი ალექსიძე., სამკურნალო მცენარე ქრისტესისხლას (*Chelidonium majus*) ლექტინის გამოყოფა, გასუფთავება და მისი ზოგიერთი ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა **სამეცნიერო კონფერენცია** „ბიოლოგიისა და ბიომედიცინის აქტუალური პრობლემები“, 31 მაისი, 2012, გვ. 30.

საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის
ქართული უნივერსიტეტი

On the Manuscript Rights

School(Departament) of Informatics, Mathematics and Natural Sciences

Biotechnology

Maia Khurtsidze

Biochemical Characterisation, Physiological role and Biological Activity of the *Chelidonium majus* Chitin-specific Lectin

Of thesis on academic degree of Doctor of Biology Sciences

Abstract

0,5 Natural Sciences Branch 0504 Biology/Life Sciences

Tbilisi

2017

This scientific paper has been performed in the School (Departament) of Informatics, Mathematics and Natural Sciences of the St. Andrew the First-called Scientific University at the Georgian Patriarchate. Biotechnology

Scientific Supervisor: **1. Giorgi Alexsidze**

Doctor of Biological Sciences, professor

Official Opponents: **1. Zurab Lomtatidze**

Doctor of Biological Sciences, professor

2. Elene Davitashvili

Doctor of Biological Sciences, professor

Defense of the thesis will be held on 2017,,10“ february at 14^{00} o’ clock, at the St. Andrew the First-called Scientific University at the Georgian Patriarchate School (Department) of Informatics, Mathematics and Natural Sciences at the School’s (Department’s) Dissertation committee meeting.

Address: 0162, Tbilisi # 53^{a} Ilia Chavchavadze Ave., II Housing, I. Vekua auditorium №104.

Dissertation text is available at the St. Andrew the First-called Scientific University’s Library at the Georgian Patriarchate.

The abstract of the thesis is sent on 2017 ,,10” January.

Secretary of Dissertation Council, Doctor of Sciences

Doctor of Technical Sciences

Teimuraz kiviladze

References

Short Description of the Work

General Features of the Research----------25
Main Objective and Tasks of Study----------26
Scientific Novelty and Main Results of the Research----------27

Theoretical and Methodological Basis of the Research.----------28
Theoretical Value of the Research----------28
Practical Value of the Research----------29

General Contents of the Research

Chapter 1. Literature review----------29
Chapter II. Subject and Methods of the Research

Subject of the Research----------29

Chapter III. The Results and Their Discussions ----------31
Conclusions----------39
References----------40

General Features of the Research

Actuality of the topic

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. (W. peumans, Van Damme 2000).

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. (Charungchitrak et.al 2011).

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.

Main Objective and Tasks of Study

The objective of the thesis research was a study of lectins of the unique medicinal herb spread in Georgia celandine (*Chelidonium majus*), the identification of lectins extracted from various organs, their biochemical characterization and study of their biological role. On the one hand this would expand conceptions about the biological role of plant lectins and on the other hand would create a prerequisite for its possible utilization in agriculture, biotechnology, biomedicine and other spheres of science.

Tasks: in order to implement the main objective of the thesis research the following particular tasks have been set.

- To reveal proteins with lectin activity of the plant celandine.
- To study their content in tissues of various organs of the plant.
- Establish their quantitative composition, physiologically distinct conditions in tissues of various organs of the plant.
- To develop the method of extraction and purification of lectin from the plant celandine in a form of individual molecules.
- To study the physical and chemical properties of individual molecules of lectin.
- To study the biochemical properties of individual molecules of lectin.
- To study the antibacterial activity of the lectin of celandine seed on phytopathogen bacterial culture.
- To study the antifungal activity of the lectin of celandine seed on pathogen bacterial culture.

Scientific Novelty of the Work and Main

By the new method developed by us it is proposed to extract the chitin-specific lectin (CBL) from the unique medicinal herb celandine (*Chelidonium majus*), widely spread in Georgia.

Distribution of soluble lectin CBL in structurally and functionally different organs of celandine and dynamics of their content in the germination process of seed with the purpose of study of physiological role of these compoundshave been studied.

It is studied from germinated and un-germinated seeds of Celandine, Hemaglutinational activity of secreted CBL in the surrounding area, the specificity of the sugar,antibacterial and anti-fungous activity. It is shown, that the seed is distinguished by the highest content of CBL.

The results of the fulfilled thesis research have established the optimal composition of extraction solvent of lectins from organs of celandine and optimal time of extraction. For the first time the antibacterial and antifungal properties of lectin of celandine seed have been detected by three different methods (light microscope, microtitration on plate and photocolorimetry).

It is shown that out of 20 different types of carbohydrates the lectin isolated from celandine seeds demonstrates specificityfor chitin, i.e. it is graded to the class of chitin-specific lectins.

The study of physical and chemical properties of chitin-specific lectin has established that the quaternary structure of its native molecule is presented in a form of dimer and its molecular mass is equal to 34 kDa, it consists of 2 subunits of equal molecular masses, does not contain carbohydrates and is graded to the class of merolectins.

Study of biochemical properties of chitin-specific lectin resulted in establishment of thermostability of lectin (it is inactivated at 60°C) and it is characterized by high hemagglutination activity. The lectin activity is exhibited in wide range of pH (from pH 5.5 to pH 9.0) and the activity

attains maximum in the range of pH 7.0-8.0; bivalent metal ions (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}) do not affect the hemagglutination activity of lectin.

The research works, where the spectrum of biological activity of lectin was studied have shown that the lectin CBL exhibits the antibacterial activity for various phytopathogen bacteria and causes inhibition of their growth. The antifungal properties of CBL were also studied; here it also selectively affects fungi and causes agglutination of their hypha

Theoretical and Methodological Basis of the Research

The theoretical basis of the thesis research was a fulfillment of scientific researches in fundamental and applied directions.

The methodological basis of the thesis research was the emergent up-to-date methods of biochemistry, biophysics, biotechnology, immunology and microbiology. The centrifugation, colorimetric, spectrophotometric methods were used in the research; and also microtitration, microscopic and photocolorimetric methods of determination of lectin activity and cell agglutination were used. The methods of high pressure gel permeation chromatography, affine chromatography on affine sorbents; preparative and analytic electrophoresis in gradient gels of polyacrylamide; determination of carbohydrates in composition of proteins using the electrophoresis.

Theoretical Value of the Research

The results presented in the thesis research deepen the theoretical knowledge about physiological role of plant lectin. Based on the obtained results an idea is expressed about protective functions of plant lectin. The results of the research lay a cornerstone for study of protective functions of lectins in field conditions and open a perspective of their use in agriculture as natural antimicrobial agents for plants. The results of the presented research deepen the scientific knowledge about molecular mechanisms of antitumor and immunotropic actions of lectins.

Practical Value of the Research

Based on the results of researches fulfilled in fundamental and applied directions, the conceptions about physiological role and multi biological actions of chitin-specific lectin of the medicinal herb celandine (*Chelidonium majus*) spread in Georgia are presented in the thesis. In particular, the idea is expressed about the antimicrobial and protective role of the lectin CBL and a possibility of its use in perspective as an antibacterial preparation is outlined.

Volume and Structure of the Thesis.

The thesis comprises of introduction, literature review, object and methods of research, results and consideration of the research, conclusions, references (155 items). It is illustrated by 10 Tables and 24 Figures pg. 120

General Contents of the Research

Chapter 1. Literature review

In the literature review, the historical summary, the definition of plant lectins and the general classification of lectins are presented. The biochemical properties of lectins, specificity of lectins for carbohydrates, occurrence of lectins in plants, their distribution in plant organs and tissues and dynamics of their contents are considered. The literature data and various conceptions about physiological role of lectins in plants are presented. The results of the research about the antibacterial and antifungal activity of lectins are presented.

Chapter II. Subject and Methods of the Research

Subject of the Research

Identification of new lectins, study of their biological role and spheres of use is still the most topical issue of the lectinology.

With the purpose of study of the issues a very interesting representative of the poppy family (*Papaveraceae*) growing in Georgia in field conditions the medicinal herb celandine (*Chelidonium majus*) has been selected as the object of the research Celandine is actively used in medicine: for skin tuberculosis, podagra, rheumatism, callous, tetter, warts, skin tumors, syphilis, psoriasis, malaria, acute and chronic hepatitis, lupus erythematosus.

It is used in treatment of diseases of nephros and gall bladder, polyposis of colon, menstrual diseases, hemorrhoid, dizziness, severe cough, headache, arthritis. It is characterized by cholagogic, spasmolytic and analgesic actions.

The plant is used for treatment of liver and gall bladder. It hinders growth of malignant tumors, development of metastases; it has good results in treatment of external tumors, in particular, of lip, skin, urinoexcretory tract, cervical cancer. The celandine preparations have the fungistatic and bactericide action even for Koch's bacillus.

Research Methods. In this research, we have been using modern methods and up-to-date tools and devices of biochemistry, plant physiology, microbiology.

For the physical and chemical characterization of lectin, we have used the methods of high-performance gel permeation chromatography, gradient electrophoresis of proteins, method by hapten-inhibitore of identification of specificity towards sugars, and some other methods (I. Liener 1976).

As regards for the contents, activity as well as the specific activity of lectins, we have used three different methods: method of Takachi (G. Takatsy 1967), the photocolorimetric method (the one that we have elaborated) and the method of optical or light microscopy.

Additionally, we have studied the antibacterial and antifungal activities of lectins (in the environment of various phytopathogen bacteria and fungi), using also the disk-diffusion and lectin-agglutination methods (A. Bauer M. Kirby 1966).

As far as the experimental part is concerned, we used to repeat each experiment at least for five times, in order to obtain a statistically correct and attested result.

Chapter III. Results and Discussion

At the first stage Medicinal plant–greater celandine –*Chelidonium majus L.* (family *Papaveraceae*)– growing in the wild in Georgia was chosen a object of investigation and allocation of lectins in its different parts (flowers, leaves, stems, roots, mature seeds and milky sap of orange color) was investigated.Table 1 shows that flowers, roots, stems, leaves and sap of orange color do not contain protein-lectin possessing hemagglutination activity.Only freshly ripened seeds of *Chelidonium majus* contain lectin.

Table 1 Distribution of lectins in organs of *Chelidonium majus*

Organ of *Chelidonium majus*	Protein mg/ml	Hemagglutination titre (T)	Hemagglutination activity, mg/ml (HA)	Specific activity ml/mg (SHA) ml/mg	Lectins contain agglutination activity
Flower	-	-	-	-	-
Stem	-	-	-	-	-
Leaf	-	-	-	-	-
Root	-	-	-	-	-
Seed	**7.21**	**16 384**	**0.000022**	**2272.4**	**327 727**
Milky sap	-	-	-	-	

In special experiments we have investigated the specificity of lectin CBL to carbohydrates.Establishing of the specificity of lectins to carbohydrates is necessary for full characterization of lectins. Lectins are known to specifically and reversibly bind the carbohydrates, to cause blocking of active sugar binding centres of lectins and inhibition of agglutination caused by lectins.

20 different carbohydrates at the initial concentration 200 mM have been used for the analyzes: (D-galactose, methyl-D-galactose, N-acetyl-D-galactosamine, D-mannose, methyl-D-mannose, D-glucose, methyl-

D-glucose, L-ramnose, N-acetyl-D-glucosamine, L-fucose, D-galacturonic acid, fructose, chitin, D-arabinose, L-ribose, D-melibiose, D-lactose, D-maltose, D-trehalose, saccharose).

Data presented indicate that of the saccharides used only oligomers of N-acetylglucoseamine (hydrolysate of partly purified chitin) inhibited the hemagglutination activity of lectins.

The main stages of purification of lectin CBL, obtained at each stage of purification and quality of purification of CBL lectin are presented in the Table 1. The data given in Table 1 evidence, that the process of purification of lectin, isolated from Chelidoni consists of 6 stages: 1. Isolation of protein extract from the Chelidoni seeds; 2. Chromatography on the Toyopearl HW-55 column; 3. Fractionation of CBL containing proteins with ammonium sulphate; 4. Thermal treatment at +60°C for 30 min; 5. Treatment with acetone; 6. Affinity chromatography on the column, with chitin.

Table 2 . Main stages of purification of CBL

Main stages of purification of CBL	Hemagglutination activity (mg/ml)	Purification degree
Extract	0.028	0
Fractioning with ammonium sulphate	0.0094	2.98
Thermal treatment	0.0028	25
Treatment with acetone	0.0011	176
Chromatography HW-55	0.00027	103
Affine chromatography	0.000022	1 272

$p<0.01$

Table 2 shows that at each next step of purification hemagglutination activity of protein fraction, containing CBL increases. Correspondingly increases purification quality of CBL In particular, in the protein fraction. 2.98, 25, 176, 1 272 after the final step activity of CBLcorresponding 0.000022 mg/ml, and purification degree attained 1 272

presents the calibration curve, built according to the elution profile of chromatography of Calibration kit proteins, which was used for the determination of the molecular mass of the native molecule of CBL. According to calculations, done with the use of the calibration curve, it was established, that molecular weight of CBL 34,000 Da.

With the aim of establishing of quaternary structure of CBL, on the next steps of experiment native CBL molecules were denaturated in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS) and molecular masses and quantity of its constituent.

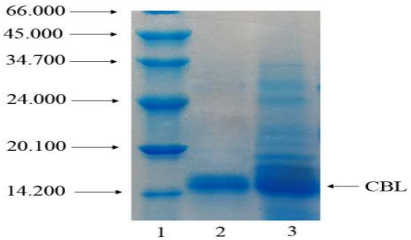
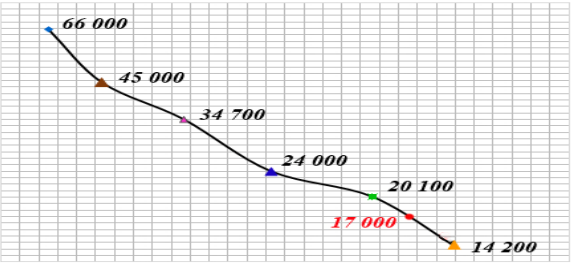


Figure 1 CBL electrophoresis in polyacrylamide gradient (10-25%) gel in the presence of the anionic detergent, sodium dodecyl sulfate (SDS).

1. SDS Molecular Weight Markers, Molecular Weight Range 14,000–70,000 Da, gel loading volumes are 1-10 µl. (Albumin (Bovine)-66, 000; Ovalbumin-45,000; Pepsin-34,700; Trypsinogen-24,000; β-Lactoglobulin -20,100; Lysozyme -14,200);
2. CBL purified by affinity chromatography;
3. CBL containing protein fraction obtained after the gel-filtration on Toyopearl HW-55 column.

seen from the electrophoregram, presented on Fig. 1 CBL purified as a result of affinity chromatography, in the dissociated state migrates as one compact strip, which proves that it corresponds to the individual polypeptides of CBL, obtained as a result of purification. (track 2)

Log. Mol. Weight



Rf

Fig. 2. Calibration curve obtained for lectin-CBL and proteins from SIGMA, run on polyacrylamide gradient (10-25%) gel in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS). Built according to the electrophoregram.

Fig. 2. shows the calibration curve, built according to the electrophoregram for the determination of molecular weights of the CBL constituent subunits. Using the calibration curve it was determined that molecular weight of subunts of CBL is equal and it comprises 17.000 Da Using the methods of gel-filtration and electrophoresis it has been shown that mass of its native molecule is 34,000 Da and it consists of two equal polypeptide subunits of 17,000 Da molecular mass and belongs to the class of hololectins.

At the main stage we research CBL-lectins biochemical characteristics The obtained results, lectin-CBL is thermally stabile (inactivity 60 ^{0}C). Lectin activity does not reveal in the wide range of pH (from pH 5.5 till 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.

In special exams were studied: a) seasonal dynamic of lectins content in the seed of Celandine. B) Secretion ability in the surrounding area of lectins by the seed of Celandine. C) Agglutination ability of microorganisms by the lectin of the seed of Celandine. D) Antimicrobial activity of lectin of the seed of Celandine.

After experimentation stage, content dynamic (HU) of CBL in the seeds of Celandine was studied according to the seasons.We have been

measured the content of lectins in the seeds for one yaer, in every three month. As it is shown in the picture, the content of CBL, in the seeds of Celandine from June till May, is significantly reduced

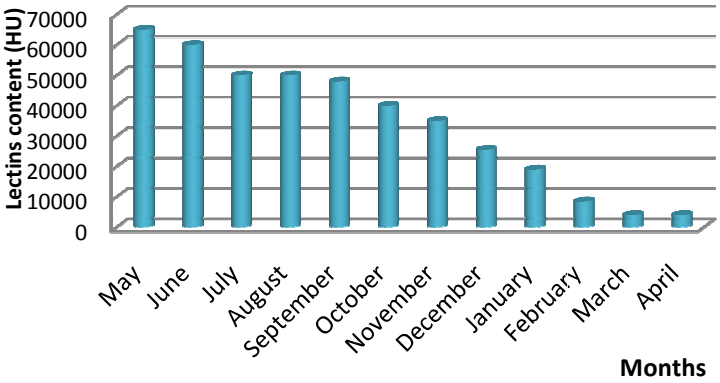


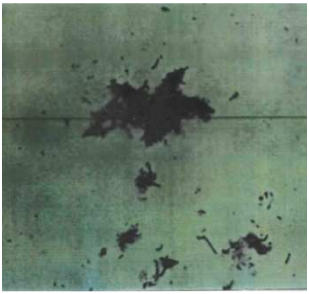
Fig. 3. Content dynamic (HU) of CBL in the seeds of Celandine was studied according to the seasons.

In special exams were studied content dynamics of CBL in the seeds of Celandine and in its surrounding area from germinating for 25 days. In accordance with the results of conducted research, was revealed germination in the content of the seeds of CBL at the 5th, 10th and 15th day, and it is almost unchanged and amounts (LC=6045), abruptly reducing (LC=768) of the content of CBL is fixed from the 20th day of germinating and it reaches the minimum on the 25th day (LC=302).At the stage of germinating of the seeds in the surrounding area, the content of CBL is not fixed on the 5th, 10th and 15th days of the germinating. The content of CBL in the surrounding area was fixed on the 20th day (LC=102), and its maximum rate was reached to LC=2142 on the 25th day.

Reciprocating attitude of CBL content, in the seeds of Celandine and in their surrounding area for 25 days, indicates, that there is CBL secretion from the 20th day in the surrounding area of the seeds.

In some experiments, at the germinating stage, we have already studied phytopathogenous bacteria of the impact of separated lectins in the surrounding area of the seed: *Pectobacterium aroidae, Xanthomonas campestris* and *Agrobacterium tumefaciens* at the agglutinative activity.

Control
Bacteria without CBL

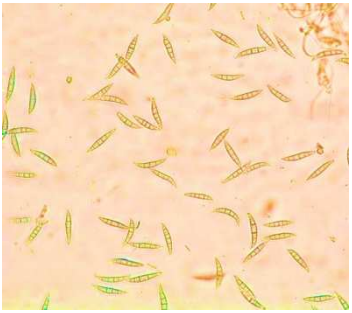


Expeimenta
Agglutinated bacteria in the presence of CBL

Picture 4. Phytopathogenous bacteria by the influence of CBL, Agglutinative fixation of *Agrobacterium tumefaciens* with visual microscope (increasing 1200 times).

As it seems from the picture 4, where CBL was not used, there is designated diffusion layout of bacteria in the checking, and in the experimental version, with the presence of CBL is designated the agglutination of *Agrobacterium tumefaciens*. The same results were obtained by the use of other bacteria as well phytopathogenous.

In paralle to, we have studied effect of fixed lectin in the surrounding area of the seed at the germinating stage, of phytopathogenous fungus: *Trichoderma viride* and about the ability of agglutination of *Fusarium oxsisporium*, by using of microscope visually.



Control
Fungal without CBL

Experimental
Agglutinated fungal spores in the presence of CBL

Picture 5. Phytopathogenous fungus caused by the effect of CBL–the agglutination spores of *Fusarium oxsisporium* with visual microscope (increasing 400 times)

As it seems from the picture 5, in experiments in vitro CBL lectin of Chelidonii seed causes severe agglutination of soil phytopathogenic fungus spores. Similar results were reported to the fungus-*Trichoderma viride.*

In special experiments we studied antimicrobial activity of CBL by disk-diffusion methods against the test cultures of phytopathogenic bacteria and fungu. In experiments used CBL isolated from nongerminated and germinated seeds and from the surrounding environment, at 20 th day of germination.

Table 3. Show that from the germinated and un-germinated seeds, and an identified CBL, from the 20th day of germinating from the separated area, has an antimicrobial activity.

Microorganisms bacteria/fungi	Antimicrobial activity of CBL (inhibition zones in mm)		
	CBL, isolated from nongerminated seeds	CBL, isolated from nongerminated seeds 25 day	germinated seeds 25 day
Pectobacterium aroidae	+	+	+
Xanthomonas campestris	+	+	+
Agrobacterium tumefaciens	+	+	+
Trichoderma viride	+	+	+
Fusarium oxsisporium	+	+	+

Presented data in picture 3 show that from the germinated and un-germinated seeds, and an identified CBL, from the 20th day of germinating from the surrounding area, has an antimicrobial activity, subjected to use bacterial testcultures and fungus's strains in all experiments, except *Candida albiccins*. The data indicate that identified CBL from three sources has almost the practical identical antimicrobial activity.

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 oxsisporium agglutination,* the ability of their growing and reproduction and repression. According to the results of the research, we can conclude, that in accordance with molecular mechanisms of antimicrobial activities of CBL of Celandine's seed and its endogenous biological function in the plant, In particula, *Chelidonium majus* seed (germination stage) phytopathogenous microorganisms protection functions.

The Greater Celandine seeds lectin CBL belongs to the class of plant antimicrobial proteins (AMP). The obtained results allow tosupposethat in natural conditions in the wild protective endogenous role of the Greater

Celandine seed lectin is protection shall be expressed in, germinating seeds from the harmful action of phytopathogenic microorganisms, occurring in the surrounding soil.

Conclusions

1. It is established from the grown plant Celandine, optimal conditions of extraction ofsoluble proteinshaving of lectin activity.In extraction solution, PBS+0,5mM β- merkptoetanolamin (pH 7,4), ischanged as the extraction of CBL, what is 10 times more than the other used solutions.

2. It is shown, that the flowers of Celandine, roots, stems, leaves, stem and orange juice don't contain hemugglutination activity of the protein-lectins. The lectins were found out in only the seeds of Celandine.

3. Seasonal nature of the content of CBL lectin is established in the seed of Celandine. The highest concentration is marked in May and June, and it isdrastically reduced in March and April.

4. Ordered by received results, 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 *oxsisporium agglutination,* the ability of their growing and reproduction and repression

5. The specificity of sugar of the Celandine's seed is established. It reveals the specificity from examined 20 sugars, only for Chitin(Poly-N- acetyl-D- glucosamine). Therefore, CBL Chitin is belonged to the specific group of lectins.

6. It is suggested, that CBL lectin of Celandine, may be used forprotection purpose from phytopathogenous bacteria.

7. The methods of separation and cleaning lectin of Celandine's seed are 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 asthe form of individual molecule.

8. It is established, that quaternary structure of its natural molecule is presented as the form of Dimer. Its molecular weight is34,000 Da, it contains 2 equal subunits with molecular weight 17,000 Da, it does not containcarbohydrates and belongs to the Hololectins class. Lectin activity does not reveal in the wide range of pH (from pH 5.5 till 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.

REFERENCES:

1. Maia Khurtsidze, Nugzar Aleksidze, George Alexidze .,Isolation of new lectins from the greater celandine plant (*Chelidonium majus* L.), study of their properties and disstribution within the plant''. Georgian national academy of sciences. vol. 7, no.3, 2013.

2. Maia Khurtsidze, Nugzar Aleksidze, George Alexidze .,Partial Purification and Biochemical Characteristics of Lectin CBL-1 Isolated from the Greater Celandine (*Chelidonium majus* L.) Plant''
Georgian national academy of sciences. vol. 8, no.3, 2014.

3. Maia Khurtsidze, Nugzar Aleksidze, George Alexidze .,Antimicrobial Activity of Greater Celandine (*Chelidonium majus* L.) Plant Seed Lectin.''
Georgian national academy of sciences. vol. 9, no.3, 2015.

4. G. Alexidze, M. Khurtsidze, N. Aleksidze. Purification and Characterization of Novel Lectin from the *Chelidonium majus* with Antimicrobial Activity. Horizons in Cancer Research. (ბეჭდვაშია).

5. მაია ხურციძე, გიორგი ალექსიძე. ,,სამკურნალო მცენარე ქრისტესისხლას (*Chelidonium majus*) ლექტინის გამოყოფა, გასუფთავება და მისი ზოგიერთი ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა'' **სამეცნიერო კონფერენცია** „ბიოლოგიისა და ბიომედიცინის აქტუალური პრობლემები“, 31 მაისი, 2012, გვ. 30.