საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის
სახელობის ქართული უნივერსიტეტი

ნინო დუმბაძე

მიმართულება - **05** საბუნებისმეტყველო მეცნიერებები

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

საქართველოს ენდემური მცენარე მთის სვინტრის (*Polygonatum obtusifolium Miscz.*) მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის ბიოქიმიური თვისებების, ფიზიოლოგიური როლისა და ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის

მოსაპოვებლად წარმოდგენილი ნაშრომი

სამეცნიერო ხელმძღვანელები

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

ბიოლოგიის მეცნირებათა დოქტორი,
საქართველოს ეროვნული აკადემიის წევრ კორესპონდენტი,
პროფესორი, ნუგზარ ალექსიძე

თბილისი

2017

შინაარსი

ანოტაცია…….....…….6

Annotation…….....……...9

შესავალი…….....……..…12

თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა…….....…...19

1.1. ლექტინების ისტორიული მიმოხილვა და განმარტება……19

1.2. ლექტინების კლასიფიკაცია…….……20

1.2.1. ლექტინების კლასიფიკაცია აქტიური ცენტრების მახასიათებლების მიხედვით…….. 20

1.2.2. ლექტინების კლასიფიკაცია ნახშირწყლებისადმი სპეციფიურობის მიხედვით……...22

1.2.3. ლექტინების კლასიფიკაცია წარმოშობისა და ლოკალიზაციის მიხედვით…….…..23

1.2.4. ლექტინების კლასიფიკაცია ბიოლოგიური აქტივობისა და ნახშირწყლების შემცველობის მიხედვით……...24

1.3. ლექტინების ბიოქიმიური თვისებები…….…..24

1.3.1. ლექტინების ამინომჟავური შედგენილობა……24

1.3.2. ლექტინებში არაორგანული იონების შემცველობა…….…..24

1.3.3. ლექტინებში ნახშირწყლების შემცველობა…….…25

1.3.4. ლექტინების სტრუქტურული ორგანიზაცია…….…26

1.4. ლექტინების სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ……29

1.5. ლექტინების გავრცელება მცენარეებში, მათი განაწილება მცენარეთა ორგანოებსა და ქსოვილებში და მათი შემცველობის დინამიკა…….…31

1.6. მცენარეებში ლექტინების ფიზიოლოგიური როლის შესახებ……38

1.6.1. ლექტინების როლი მცენარეთა ზრდა-განვითარების პროცესებში……..39

1.6.2. ლექტინების როლი მცენარეთა განაყოფიერების პროცესებში……41

1.6.3. ლექტინების როლი მცენარეთა დაცვის პროცესებში……42

1.6.4. ლექტინების როლი სიმბიოზის პროცესებში……..46

1.6.5. ლექტინების როლი ნახშირწყლების ტრანსპორტისა და დაგროვების პროცესებში……46

1.6.6. ლექტინების, როგორც სამარაგო ცილების, ფუნქციები……47
1.7. ლექტინების გამოყენების სფეროები……48
1.7.1. ლექტინების ანტისიმსივნური აქტივობა……49
1.7.2. ლექტინების იმუნოტროპული აქტივობა……52
თავი 2. ექსპერიმენტული ნაწილი…….....……..57
2.1. კვლევის ობიექტი……..57
2.2. ლექტინების გამოყოფის მეთოდი……..58
2.3. სვინტრის სხვადასხვა ნაწილებში ლექტინების რაოდენობრივი განაწილება ფიზიოლოგიური მდგომარეობის მიხედვით……..59
2.4. ლექტინის ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით……..60
2.5. ლექტინური აქტივობის განსაზღვრის მეთოდები……60
2.6. ლექტინური აქტივობის განსაზღვრა ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით…….61
2.7. ბოცვრის ტრიფსინიზებული ერითროციტების მომზადება……61
2.8. სვინტრის ლექტინის გამოყოფა და გასუფთავება……62
2.9. გელ-ფილტრაცია Toyopearl HW-55 -ის სვეტზე…….……63
2.10. ლექტინის გასუფთავება პრეპარატული ელექტროფორეზით ნატიურ პირობებში……..……64
2.11. ცილების ანალიზური ელექტროფორეზი ნატიურ პირობებში……..……64
2.12. ცილების ანალიზური ელექტროფორეზი დისოცირებულ პირობებში……..…..65
2.13. ლექტინების ნახშირწყლების მიმართ სპეციფიკურობის შესწავლა……..……65
2.14. ლექტინებში ნახშირწყლების შემცველობის განსაზღვრა…….…..66
2.15. ლექტინების ჰემაგლუტინაციური აქტივობის დამოკიდებულების შესწავლა წყალბად-იონების კინცენტრაციაზე……66
2.16. ორვალენტიანი კათიონების გავლენა ლექტინების ჰემაგლუტინაციური აქტივობაზე……66
2.17. ლექტინიების თერმოსტაბილურობის შესწავლა……..67
2.18. გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებული ერითროციტების ქრომატოგრაფიული სვეტის მომზადება……..……67
2.19.აფინური ქრომატოგრაფია გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებული ერითროციტების სვეტზე……..68

2.20. ცილის ფრაქციონირება და მოლეკულური მასის განსაზღვრა გელ-ფილტრაციით……68
2.21. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა……69
2.22. პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების პროლიფერაციის შესწავლა ტეტრაზოლიუმზე დაფუძნებული კოლორიმეტრული (MTT) ტესტით……..70
2.23. ციტოტოქსიკურობის შესწავლა in vitro ექსპერიმენტებში ადამიანის ავთვისებიანი სიმსივნეების პირველად მოკლევადიან სუსპენზიურ კულტურებზე…….71
2.24. სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციის განსაზღვრა ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით……74
თავი 3. კვლევის შედეგები და მათი განხილვა…….....……75
3.1. სვინტრის ფესურიდან ლექტინების ექსტრაქციის პირობები……..75
3.2. ლექტინ SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობის განსაზღვრა ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით……78
3.3. წყალბად-იონების კონცენტრაციის გავლენა სვინტრის ლექტინ SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე……80
3.4. ტემპერატურის გავლენა ლექტინ SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე……81
3.5. ლექტინ SABA-1-ის ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით…….….82
3.6. ორვალენტიანი მეტალის იონების გავლენა ლექტინ SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე……83
3.7. ლექტინ SABA-1-ში ნახშირწყლების შემცველობა……...83
3.8. ლექტინ SABA-1-ის ნახშირწლების მიმართ სპეციფიკურობის შესწავლა……83
3.9. ლექტინ SABA-1-ის შემცველობა და განაწილება სვინტრის მზარდ და ზრდა დასრულებულ მიწისზედა და მიწისქვედა ორგანოებში.....85
3.10. ლექტინ SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა ბოცვრის ნატიური და ტრიფსინიზირებული ერითროციტების მიმართ……...89
3.11. ლექტინ SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა ადამიანის პერიფერიულის სისხლის I(0); II(A); III(B) და IV(AB) ჯგუფების ნატიური ერითროციტების მიმართ…….……91

3.12. ლექტინ SABA–1-ის გამოყოფა, გასუფთავება და ბიოქიმიური დახასიათება…….92
3.13. ლექტინ SABA-1-ის გავლენა ადამიანის ავთვისებიანი სიმსივნის უჯრედებზე……104
3.13.1. ლექტინ SABA-1-ით სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაცია……..105
3.13.2. ლექტინ SABA-1-ის ციტოტოქსიკური აქტივობა ადამიანის სიმსივნური უჯრედების მიმართ…….108
3.13.3. ლექტინ SABA-1-ის მიტოგენური აქტივობა ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების მიმართ…….112
დასკვნები…….....……..116
გამოყენებული წყაროებისა და ლიტერატურის სია…….....….118

ანოტაცია

ცნობილია, რომ ფიზიოლოგიურად აქტიური ნაერთები ფართოდ გამოიყენება ბიოლოგიაში, მედიცინაში, სოფლის მეურნეობასა და მეცნიერების სხვა დარგებში. ბოლო ხანებში სულ უფრო მკვიდრდება აზრი იმის შესახებ, რომ ამ ფუნქციის მატარებელია გარკვეული ტიპის ნახშირწყლების შემცველი გლიკოკონიუგატები და მათთან სპეციფიკური დაკავშირების უნარის მქონე ცილები – ლექტინები.

ზემოთ ქმულიდან გამომდინარე, მცენარეული წარმოშობის ახალი ლექტინების გამოყოფა, იდენტიფიკაცია, მათი ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების, ბიოლოგიური როლისა და ბიოლოგიური აქტივობის დადგენა კვლავ რჩება ფუნდამენტური და გამოყენებითი მეცნიერების ერთ-ერთ აქტუალურ პრობლემად.

აღნიშნულიდან გამომდინარე მიზნად დავისახეთ, შეგვესწავლა ხალხურ მედიცინაში ფართოდ გამოყენებული საქართველოს ენდემური სამკურნალო მცენარე - მთის სვინტრის (*Polygonatum obtusifolium Miscz*) ლექტინები.

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

შესრულებული სადისერტაციო ნაშრომით დადგენილია სვინტრის ლექტინების საექტრაქციო ხსნარის ოპტიმალური შემადგენლობა და ექსტრაქციის ოპტიმალური დრო. ნაჩვენებია, რომ საექსტრაქციო ხსნარის PBS-ის (0,9% NaCl, 40mM K^+-ფოსფატის ბუფერი, pH 7.4, 0,1% β-მერკაპტოეთანოლი) გამოყენებისას, 30 წთ-იანი ექსტრაქციის პირობებში, მაქსიმალურად ხდება სვინტრის სხვადასხვა ორგანოებიდან ლექტინური აქტივობის მქონე ცილების ექსტრაქცია.

სამი განსხვავებული მეთოდით (სინათლის მიკროსკოპი, პლანშეტზე მიკროტიტრაცია, ფოტოკოლორიმეტრია) გამოვლენილია სვინტრის ლექტინის უნარი გამოიწვიოს ბოცვრის ტრიფსინიზირებული ერითროციტებისა და ადამიანის სხვადასხვა ტიპის კიბოს უჯრედების აგლუტინაცია. დადგენილია, რომ ლექტინი არ იწვევეს ადამიანის სისხლის (I(0); II(A); III(B) და IV(AB) ჯგუფის) ნატიური ერითროციტების აგლუტინაციას.

წარმოდგენილია ექსპერიმენტების შედეგები, სადაც შესწავლილია ლექტინის შემცველობა სვინტრის მიწისზედა (ღერო, ფოთოლი, ყვავილი, თესლი) და მიწისქვედა (ფესვი, ფესურა, დამატებითი კვირტი) ორგანოებში. ნაჩვენებია, რომ ლექტინური

აქტივობის ცილებს შეიცავს მცენარის მხოლოდ მიწისქვედა ორგანოები (ფესვი, ფესურა და დამატებითი კვირტი). გამოვლენილია, რომ ლექტინის შემცველობა სვინტრის მიწიქვედა ნაწილის ორგანოებში განსხვავებულია და იცვლება მცენარის ფიზიოლოგიური მდგომარეობის მიხედვით. კერძოდ, ნაჩვენებია, რომ ლექტინის ყველაზე მაღალი შემცველობით გამოირჩევა ფესურა, ხოლო ყველაზე დაბალი შემცველობით დამატებითი კვირტის ქსოვილები. გამოვლენილია, რომ ლექტინის მაღალი შემცველობა ფიქსირდება მცენარის ზრდადასრულებულ, მოსვენების სტადიაზე მყოფ მიწისქვედა ორგანოების ქსოვილებში, კერძოდ, შემოდგომის ფესურაში ყველაზე მაღალია ლექტინის შემცველობა და იგი 10-ჯერ აღემატება გაზაფხულის აქტიური ზრდა-განვითარების სტადიაზე მყოფ ფესურაში ლექტინის შემცველობას.

დამუშავებულია სვინტრის ფესურადან ლექტინის (შემდგომში SABA-1) გამოყოფისა და გასუფთავების ახალი მეთოდი. მოწოდებული მეთოდი საშუალებას იძლევა მიღებული ლექტინი გამოყოფილ იქნას ინდივიდუალური მოლეკულის სახით (გასუფთავების ხარისხი - 789) და მაღალი ჰემაგლუტინაციური აქტივობით (0.000095 მგ/მლ).

წინამდებარე ნაშრომში წარმოდგენილი კვლევის შედეგები გვიჩვენებენ, რომ სვინტრის ფესურიდან იზოლირებული ლექტინი, ანალიზირებული 18 სხვადასხვა ტიპის ნახშირწყლიდან, სპეციფიკურობას ავლენს მხოლოდ D-მანოზის მიმართ. რაც მიუთითებს, რომ იგი მიეკუთვნება მანოზა-სპეციფიკური ლექტინების კლასს.

მანოზა-სპეციფიკური ლექტინ SABA-1-ის ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების შესწავლამ გამოავლინა, რომ მისი ნატიური მოლეკულის მეოთხეული სტუქტურა წარმოდგენილია დიმერის სახით, მოლეკულური მასა შეესაბამება 30 kDa-ს (შედგება 2 თანაბარი მოლეკულური მასების მქონე სუბერთეულისაგან), არ შეიცავს ნახშირწყლებს და მიეკუთვნება ჰოლოლექტინების კლასს.

ლექტინ SABA-1-ის ბიოქიმიური თვისებების შესწავლის შედეგად, დადგენილ იქნა, რომ იგი თერმოსტაბილურია (ინაქტივირდება 60^0C-ზე). ლექტინური აქტივობა ვლინდება pH-ის ფართო დიაპაზონში (pH 5.5-დან pH 9.0-მდე), მაქსიმალური აქტივობა აღინიშნება pH 7.0-8.0-ის ფარგლებში, ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე გავლენას არ ახდენს მეტალის ორვალენტიანი იონები ($Ca2^+$, $Mg2^+$, $Mn2^+$).

კვლევით სამუშაოებში, სადაც ლექტინის ბიოლოგიური აქტივობის სპექტრი იქნა შესწავლილი, ნაჩვენებია, რომ:

ა) ლექტინი SABA-1 სპეციფიკურად უკავშირდება ადამიანის სიმსივნის უჯრედებს და იწვევს მათ აგლუტინაციას. D-მანოზა სრულად აინჰიბირებს აღნიშნული ლექტინით სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციას.

ბ) დაგენილია ლექტინ SABA-1-ის კონცენტრაციაზე დამოკიდებული ციტოტოკსიკური აქტივობა სიმსივნური უჯრედების პირველად კულტურებზე (ადამიანის კანის, ფილტვის, საკვერცხისა და სარძევე ჯირკვლის). D-მანოზა იწვევს აღნიშნული ლექტინის ციტოტოკსიკური აქტივობის ინჰიბირებას.

გ) ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია კონცენტრაციაზე დამოკიდებული მიტოგენური აქტივობა ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების მიმართ. D-მანოზა იწვევს აღნიშნული ლექტინის მუტაგენური აქტივობის ინჰიბირებას.

სადისერტაციო ნაშრომში განხილულია მოსაზრებები საქართველოს ენდემური სამკურნალო მცენარე - მთის სვინტრის (*Polygonatum obtusifolium Miscz*) მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის ბიოლოგიური როლისა და მეცნიერების სხვადასხვა სფეროებში მისი გამოყენების პერსპექტივის შესახებ. კერძოდ, ფიზიოლოგიური კვლევის შედეგების საფუძველზე გამოთქმულია მოსაზრება მცენარეში ლექტინ SABA-1-ის დამცველობითი როლის შესახებ. ლექტინისათვის დამახასიათებელი მულტი-ბიოლოგიური აქტივობის სპექტრი გვაფიქრებინებს, რომ იგი შეიძლება გამოყენებულ იქნას ბიოტექნოლოგიაში, ონკოლოგიასა და იმუნოლოგიაში, როგორც სადიაგნოსტიკო და კვლევის საშუალება. მიღებული შედეგებიდან ჩანს კლინიკურ მედიცინაში ლექტინ SABA-1-ის ანტიკანცეროგენულ და იმუნოტროპულ სამკურნალო პრეპარატად დანერგვის პერსპექტივა.

Annotation

It is well known that physiologically active compounds are widely used in biology, medicine , agriculture and other fields of science.

Recently the idea that this function can be carried out by glycoconjugates, containing certain type of carbohydrates and carbohydrate binding proteins – lectines. Based on the above mentioned, isolation, identification of new lectines of plant origin, establishment of their physical-chemical properties, biological role and biological activity still remains as one of the actual problem of fundamental and applied science.

In this respect, it was studied the Mountain Polygonatum (*Polygonatum obtusifolium Miscz)*, the Georgian endemic medicinal plant widely used in folk medicine.

The relevance of the topic is documented in the dissertation work, the study goals and tasks are provided as well.

Based on the results of the performed dissertation work, the optimal composition of the Polygonatum lectines extraction solution and optimal time for extraction have been established. It is shown that using the extraction solution PBS- (0,9% NaCl, 40mM K + - phosphate buffer, pH 7.4, 0,1% β- mercaptoethanol) in 30 minutes of extraction conditions the extraction of protein having lectin activity from different organs of Polygonatum takes place.

Three different methods (light microscope, micro titration on plane table, photocolorymetry) have been used to reveal Polygonatum lectin ability to cause the agglutination of rabbit triphsinized erythrocytes, different types of human cancer cells. It is estimated that the lectin does not cause the agglutination of human blood I (0); II (A); III (B) and IV (AB) group native erythrocytes.

Results of experiments, which have studied lectin content in Polygonatum overground (stem, leaf, flower, seed) and underground (root, roots, underground buds) bodies. It is shown that the lectine contents in underground organs of the plant (roots, rhizomes and underground buds) is different and changes according to the physiological position of the plant. In particular, it was was shown that there was the most distinguished high content of lectins in roots, while the lowest content was in underground bud tissues. It was determined that the high levels of lectins are observed in underground organ tissues of adult plant in the dormant stage, in

particular the content of lectins was highest in the autumn roots and it is 10 times more than the content of lectins in spring roots in the active development stage.

A new method of extraction and purification of lectin from Polygonatum roots has been developed (hereinafter SABA-1). The method allows the lectin to be provided in the form of an individual molecule (degree of purification - 789) and with high haemaglutinative activity (0.000095 mg / ml).

The results of the study provided in this work show that from 18 different types of analyzed carbohydrates lectin isolated from Polygonatum roots reveals the specificity only towards D- mannose. Which indicates that it belongs to the mannose-specific lectins' class.

Study of mannose-specific lectin SABA-1-'s physical and chemical properties revealed that the quaternary structure of the its native molecule was presented in form of dimer and its molecular weight corresponds to a 30 kDa- (consists of 2 sub-units of equal 15 kDa molecular masses), it does not contain carbohydrates and belongs to hololectins' class.

As a result of the study of biochemical properties of Lectin SABA-1 it was concluded that it was thermal stable (inactivated at 60^0C) and was characterized by high hemaglutinative activity (0.000095 mg / ml). Lectin activity is revealed in a wide range of pH (from pH 5.5 to pH 9.0) and the maximum activity was observed in the range of pH 7.0-8.0, the divalent metal ions (Ca2 +, Mg2 +, Mn2 +) do not affect lectin hemaglutinative activity.

In research studies, where lectin's biological activity was studied it was shown that:

A) lectin SABA-1 binds specifically to human tumor cells and causes their agglutination. D- mannose completely inhibits the tumor cells agglutination.

B) Lectin SABA-1 shows concentration-dependent cytotoxical activity on primiry cultures of tumor cells (in human skin, lung, ovary and breast). D- mannose leads to the inhibition of the lectin cytotoxical activity.

C) Lectin SABA-1- has a concentration-dependent mitogenic activity in human peripheral blood mononuclear cells. D- mannose leads to the inhibition of the mentioned lectin mutagenic activity.

The dissertation discusses the views about the biological role of mannose-specific lectin of the Georgian endemic medicinal plant Mountain Polygonatum (*Polygonatum obtusifolium Miscz*) and its application in various fields of science. In particular, on the basis of the results of

the physiological study a protective role of the lectin SABA-1 has been suggested. Lectin typical multi- biological activity spectrum suggests that it can be used in Biotechnology, Oncology and Immunology as a diagnostics and research tool. The results show the perspective of lectin SABA-1 to be introduced in clinical medicine, as an anti-cancerogenic and immunotropic drug.

შესავალი

აქტუალობა. თანამედროვე ბიოლოგიის ერთ-ერთ ცენტრალურ საკითხს წარმოადგენს ბიოლოგიური ამოცნობის ფენომენი. დღეისათვის კარგადაა ცნობილი, რომ ცოცხალი ორგანიზმების მეტად რთული სტრუქტურულ-ფუნქციონალური ორგანიზაციის ფორმირება და მისი შემდგომი შენარჩუნება ცოცხალ ორგანიზმებში ბიოლოგიური ამოცნობის, ინფორმაციის შენახვის, მისი დეკოდირებისა და გადაცემის პროცესებთანაა დაკავშირებული. ლიტერატურაში არსებული მონაცემების თანახმად, ბიოლოგიური ამოცნობის აუცილებელ პირობას მაღალი სელექტიურობა წარმოადგენს, რაც ბიომოლეკულებს შორის სპეციფიკური, სტერეოქიმიური შეთავსებულობითაა განპირობებული. ასეთ პირობებში კომპლემენტარული ბიომოლეკულებიდან ერთი ბიოლოგიური ინფორმაციის მატარებელია, ხოლო მეორე ინფორმაციის დეკოდირებას განაპირობებს (Gabius 1998).

ბოლო ხანებში სულ უფრო მკვიდრდება აზრი იმის შესახებ, რომ ამ ფუნქციის მატარებელია გარკვეული ტიპის ნახშირწყლები და მათთან სპეციფიკური დაკავშირების უნარის მქონე ცილები – ლექტინები (Королев 1984). ლექტინებს მიეკუთვნებიან მრავალფეროვანი სტრუქტურის მქონე ცილები, რომლებიც გაერთიანებულნი არიან საერთო თვისებით – შერჩევით, სპეციფიკურად დაიკავშირონ ნახშირწყლები, გლიკოკონიუგატები და მოახდინონ უჯრედების აგლუტინაცია. ისინი შერჩევითად უკავშირდებიან მარტივ შაქრებს, გარკვეული შემადგენლობისა და თანმიმდევრობის რთულ ნახშირწყლოვან სტრუქტურებს და სპეციფიკურად შეიცნობენ ნახშირწყლებში არსებულ ნატიფ სტრუქტურებს. უკანასკნელიდან გამომდინარე, არსებითად შეიცვალა ჩვენი წარმოდგენები ნახშირწყლების ბიოლოგიური ფუნქციის შესახებ. დღეს ნახშირწყლებს განიხილავენ არა მხოლოდ, როგორც ენერგიის სამარაგო და სტრუქტურული ფუნქციების მატარებელ ნაერთებს, არამედ როგორც დიდი ინფორმაციის შენახვის ევოლუციური პოტენციალის მქონე საინფორმაციო სტრუქტურებს. ამრიგად, ბიოლოგიური ამოცნობის სისტემა, რომელსაც ნახშირწყლებსა და ცილებს შორის სპეციფიკური, შექცევადი ურთიერთქმედება უდევს საფუძვლად, ორი ძირითადი კომპონენტითაა წარმოდგენილი: ინფორმაციის მატარებელი

ლიგანდებით, კერძოდ, ნახშირწყლებით და ინფორმაციის დეკოდირების უნარის მქონე ცილებით – რეცეპტორებით, კერძოდ ლექტინებით.

ლექტინები პირველად აღმოჩენილი იქნა მცენარეებში 1888 წელს. დღეისათვის ასობით მცენარეული ლექტინია გამოყოფილი და ბიოქიმიურად დახასიათებული. ლექტინების უნიკალური თვისების გამო ისინი წარმატებით გამოიყენება მეცნიერების მეტად მრავალფეროვან სფეროებში: ბიოლოგიაში, ბიომედიცინაში, ბიოტექნოლოგიაში, სოფლის მეურნეობაში, მედიცინასა და სხვა მომიჯნავე სამეცნიერო დარგებში. ლექტინები ფართოდ გამოიყენება აგრეთვე, როგორც კვლევის ინსტრუმენტები, აფინური ადსორბენტები სხვადასხვა გლიკოკონიუგატების, უჯრედებისა და ორგანელების გამოსაყოფად; როგორც სპეციფიკურმა ბიოლოგიურმა ზონდებმა დიდი როლი ითამაშეს მემბრანების ნახშირწყლოვანი ტოპოგრაფიის დადგენაში; აღმოჩნდა, რომ მათ ხშირად ჰორმონული მოქმედების უნარიც გააჩნიათ, იწვევენ უჯრედების პროლიფერაციას, გააჩნიათ იმუნოტროპული, ანტიმიკრობული, ანტივირუსული, ანტისიმსივნური მოქმედების უნარი და სხვა (Lis and Sharon 1986).

მიუხედავად ლექტინების ასეთი ფართო გამოყენებისა, სამწუხაროდ, მათი ფიზიოლოგიური როლი მცენარეებში, საიდანაც ხდება მათი გამოყოფა, ჯერ კიდევ ბუნდოვანი რჩება. თუმცა დღეს არსებული ლიტერატურული მონაცემები მიუთითებენ, რომ ლექტინები უშუალოდ უნდა მონაწილეობდნენ მცენარისათვის ისეთ სასიცოცხლო მნიშვნელობის პროცესებში, როგორიცაა: განაყოფიერება, ზრდა და განვითარება, ნივთიერებათა ტრანსპორტი, ჰორმონების მსგავსი მოქმედება, ფიტოიმუნიტეტი, სიმბიოზი და სხვა.

თუ დღეისათვის კარგად არის შესწავლილი ლექტინების როლი ბიოლოგიური ამოცნობის რეაქციებში, რომლებიც დამახასიათებელია უჯრედის ზედაპირისათვის, მცირე რამაა ცნობილი უჯრედის შიგნით მიმდინარე მეტაბოლურ რეაქციებში მათი მონაწილეობის შესახებ. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ ბოლო ხანებში ამ მიმართულებითაც საკმაოდ საინტერესო მონაცემებია მიღებული. ასე მაგალითად, ლექტინების სუბუჯრედული ლოკალიზაციის შესწავლამ გამოავლინა მათი არსებობა მცენარეული უჯრედის ორგანელების მემბრანებში, რამაც პრაქტიკულად განსაზღვრა ლექტინების ფუნქციების შესწავლა უჯრედების ისეთ შედარებით ავტონომიურ

ორგანელებში, როგორიცაა მიტოქომდრიები, ბირთვები, ქლოროპლასტები და სხვ. (Jefree 1981).

ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, მცენარეულ ობიექტებში ლექტინების გამოვლენა და მათი ფიზიოლოგიური და ბიოლოგიური ფუნქციების შესწავლა წარმოადგენს თანამედროვე ბიოლოგიის, ბიოტექნოლოგიის, სოფლის მეურნეობის, მედიცინისა და მეცნიერებათა სხვა დარგების ერთ-ერთ აქტუალურ პრობლემას.

კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები

ძირითადი მიზანი: სადისერტაციო ნაშრომის ძირითად მიზანს წარმოადგენს ხალხურ მედიცინაში ფართოდ გამოყენებული საქართველოს ენდემური სამკურნალო მცენარის, მთის სვინტრის (*Polygonatum obtusifolium Miscz*) (Gagnidze 2005) ქსოვილთა უჯრედებში ლექტინების ფიზიოლოგიური როლის შესწავლა, მისი იდენტიფიკაცია და ბიოლოგიური აქტივობის დადგენა, რაც ერთის მხრივ გააფრთოვებს წარმოდგენებს მცენარეული ლექტინების ბიოლოგიური როლის შესახებ და მეორე მხრივ, შექმნის წინაპირობას მისი სოფლის მეურნეობაში, ბიოტექნოლოგიაში, ბიომედიცინაში, მედიცინასა და მეცნიერების სხვა სფეროებში შესაძლო გამოყენების შესახებ.

ამოცანები: სადისერტაციო ნაშრომის ძირითადი მიზნის განსახორციელბლად დასმული იქნა შემდეგი კონკრეტული ამოცანები:

- ✓ გამოგვევლინა მცენარე სვინტრში ლექტინური აქტივობის მქონე ცილები.
- ✓ შეგვესწავლა მათი შემცველობა მცენარე სვინტრის სხადასხვა ორგანოებსა და ქსოვილებში.
- ✓ დაგვედგინა მათი შემცველობის რაოდენობრივი განაწილება, მცენარის ფიზიოლოგიური მდგომარეობის გათვალისწინებით, სხადასხვა ორგანოებსა და ქსოვილებში.
- ✓ დაგვემუშავებინა მცენარე სვინტრიდან ლექტინის გამოყოფისა და გასუფთავების მეთოდი.
- ✓ შეგვესწავლა ლექტინის ფიზიკურ-ქიმიური და ბიოქიმიური თვისებები.
- ✓ შეგვესწავლა სვინტრის ლექტინის ანტიკანცეროგენული აქტივობა ადამიანის სიმსივნურ უჯრედებზე.
- ✓ შეგვესწავლა სვინტრის ლექტინის იმუნომოდულატორული აქტივობა ადამიანის პერიფეროიული სისხლის მონონუკლეარულ უჯრედებზე.

<u>ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და ძირითადი შედეგები:</u> ნაშრომის მეცნიერულ სიახლეს წარმოადგენს ჩვენს მიერ დამუშავებული მეთოდით საქართველოს ენდემური სამკურნალო მცენარე მთის სვინტრდან (*Polygonatum obtusifolium Miscz*) მანოზა-სპეციფიკური ახალი ლექტინის იდენტიფიკაცია. სიახლეს წარმოადგენს ასევე მიღებული მონაცემები მისი ფიზიკურ-ქიმიური და ბიოქიმიური თვისებების შესახებ, დადგენილია მცენარე სვიტრში მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის ფიზიოლოგიური როლი და მულტი-ბიოლოგიური აქტივობა. დამუშავებულია სვინტრის ორგანოებიდან ლექტინების საექტრაქციო ხსნარის ოპტიმალური შემადგენლობა და ექსტრაქციის ოპტიმალური დრო. სამი განსხვავებული მეთოდით (სინათლის მიკროსკოპით, პლანშეტზე მიკროტიტრაციისა და ფოტოკოლორიმეტრული) დადგენილია სვინტრის ლექტინის უნარი გამოიწვიოს ბოცვრის ტრიფსინიზირებული ერითროციტების, ადამიანის სხადასხვა ტიპის კიბოს უჯრედებისა და პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების აგლუტინაცია. დადგენილია, რომ ლექტინი არ იწვევს ბოცვრისა და ადამიანის სისხლის (I(0); II(A); III(B) და IV(AB) ჯგუფის) ნატიური ერითროციტების აგლუტინაციას. ნაჩვენებია, რომ ლექტინური აქტივობის ცილებს შეიცავს მცენარის მხოლოდ მიწისქვედა ორგანოები (ფესვი, ფესურა და დამატებითი კვირტი). ნაჩვენებია, რომ ლექტინების ყველაზე მაღალი შემცველობით გამოირჩევა ფესურა, ხოლო ყველაზე დაბალი შემცველობით დამატებითი კვირტის ქსოვილები. გამოვლენილია, რომ ლექტინების მაღალი შემცველობა ფიქსირდება მცენარის ზრდადამთავრებულ, მოსვენების სტადიაზე მყოფ მიწისქვედა ორგანოთა ქსოვილებში, კერძოდ, შემოდგომის ფესურაში ყველაზე მაღალია ლექტინების შემცველობა და იგი 10-ჯერ აღემატება გაზაფხულის აქტიური ზრდა განვითარების სტადიაზე მყოფ ფესურაში ლექტინების შემცველობას.

დამუშავებულია სვინტრის ფესურადან ლექტინის გამოყოფისა და გასუფთავების ახალი მეთოდი. მოწოდებული მეთოდი საშუალებას იძლევა მიღებული ლექტინი გამოყოფილ იქნას ინდივიდუალური მოლეკულის სახით (გასუფთავების ხარისხი - 789) და მაღალი პემაგლუტინაციური აქტივობით (0.000095 მგ/მლ).

ნაჩვენებია, რომ 18 განსხვავებული ტიპის ნახშირწყლებიდან სვინტრის ფესურიდან იზოლირებული ლექტინი სპეციფიკურობას ავლენდა მხოლოდ D-მანოზის

მიმართ. რაც მიუთითებს, რომ იგი მიეკუთვნება მანოზა-სპეციფიკური ლექტინების კლასს.

მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების შესწავლამ გამოავლინა, რომ მისი ნატიური მოლეკულის მეოთხეული სტუქტურა წარმოდგენილია დიმერის სახით, მოლეკულური მასა 30 kDa-ია, შედგება 2 თანაბარი მოლეკულური მასების მქონე სუბერთეულისაგან, არ შეიცავს ნახშირწყლებს და მიეკუთვნება ჰოლოლექტინების კლასს.

მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის ბიოქიმიური თვისებების შესწავლის შედეგად, დადგენილ იქნა, რომ ლექტინი 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-ის ფარგლებში, ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე გავლენას არ ახდენს მეტალის ორვალენტიანი იონები ($Ca2^+$, $Mg2^+$, $Mn2^+$).

კვლევით სამუშაოებში, სადაც ლექტინის ბიოლოგიური აქტივობის სპექტრი იქნა შესწავლილი დადგენილ იქნა, რომ ლექტინი SABA-1 სპეციფიკურად უკავშირდება ადამიანის სიმსივნის უჯრედებს და იწვევს მათ აგლუტინაციას. D-მანოზა სრულად აინჰიბირებს აღნიშნული ლექტინით სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციას. ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია კონცენტრაციაზე დამოკიდებული ციტოტოკსიკური აქტივობა სიმსივნური უჯრედების პირველად კულტურებზე (ადამიანის კანის, ფილტვის, საკვერცხის და სარძევე ჯირკვლის). D-მანოზა იწვევს აღნიშნული ლექტინის ციტოტოკსიკური აქტივობის ინჰიბირებას. დაგენილია, რომ ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია კონცენტრაციაზე დამოკიდებული მიტოგენური აქტივობა ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების მიმართ. ნაჩვენებია, რომ D-მანოზა იწვევს აღნიშნული ლექტინის მიტოგენური აქტივობის ინჰიბირებას.

<u>კვლევის თეორიული და მეთოდოლოგიური საფუძვლები:</u> სადისერტაციო ნაშრომის კვლევის თეორიულ საფუძველს წარმოადგენდა სამეცნიერო-კვლევითი სამუშაოების წარმართვა, როგორც ფუნდამენტური, ისე გამოყენებითი მიმართულებით.

სადისერტაციო ნაშრომის მეთოდოლოგიურ საფუძვლებს წარმოადგენდა ბიოქიმიის, ბიოფიზიკის, ბიოტექნოლოგიის, იმუნოლოგიისა და კანცეროგენეზის კვლევის უახლესი თანამედროვე მეთოდები. კვლევებში გამოყენებული იქნა

ცენტრიფუგირების, კოლორიმეტრული, სპექტროფოტომეტრული მეთოდები; ლექტინური აქტივობისა და უჯრედების აგლუტინაციის განსაზღვრის მიკროტიტრაციის, მიკროსკოპული და ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდები; მაღალი წნევის გელფიტრაციული ქრომატოგრაფიის, აფინურ სორბენტებზე აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდები; პრეპარატული და ანალიზური ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელებში; ცილების შემადგენლობაში ნახშირწყლების განსაზღვრა ელექტროფორეზის და შიფის რეაგენტის გამოყენებით; ციტოტოქსიკური აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი ადამიანის კიბოს პირველად მოკლევადიან სუსპენზიურ უჯრედთა კულტურებზე, მიტოგენური აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების მოკლევადიან სუსპეზიურ კულტურებზე MTT-ის (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) და მულტისკანის გამოყენებით.

<u>ნაშრომის თეორიული ღირებულება:</u> სადისერტაციო ნაშრომში წარმოდგენილი შედეგები აღრმავებენ თეორიულ ცოდნას მცენარეული ლექტინების ფიზიოლოგიური როლის შესახებ. მიღებული შედეგების საფუძველზე გამოთქმულია მოსაზრება მცენარეული ლექტინების დამცველობითი ფუნქციის შესახებ. კვლევის შედეგები ქმნის ფუნდამენტს ლექტინების დამცველობითი ფუნქციის საველე პირობებში შესწავლისათვის და სახავს მათი გამოყენების პერსპექტივას სოფლის მეურნეობაში, როგორც მცენარეების ანტიმიკრობული ბუნებრივი აგენტები. წარმოდგენილი კვლევის შედეგები აღრმავებს მეცნიერულ ცოდნას ლექტინების ანტისიმსივნური და იმუნოტროპული მოქმედების მოლეკულური მექანიზმების შესახებ.

<u>ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება:</u> სადისრტაციო ნაშრომში ფუნდამენტური და გამოყენებითი მიმართულებით ჩატარებული კვლევის შედეგების საფუძველზე წარმოდგენილია მოსაზრებები საქართველოს ენდემური სამკურნალო მცენარე მთის სვინტრის (*Polygonatum obtusifolium Miscz*) მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის ბიოლოგიური როლისა და მულტი-ბიოლოგიური აქტივობების შესახებ. კერძოდ, გამოთქმულია მოსაზრება მცენარე სვინტრში ლექტინ SABA-1-ის დამცველობითი როლის, აგრეთვე მისი ონკოლოგიასა და იმუნოლოგიაში სადიაგნოსტიკო და კვლევის საშუალებად გამოყენებისა და კლინიკურ მედიცინაში ანტიკანცეროგეული და იმუნოტროპული სამკურნალო პრეპარატად დანერგვის პერსპექტივის შესახებ.

<u>დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა:</u> დისერტაცია მოიცავს: შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას, კვლევის ობიექტს და მეთოდებს, კვლევის შედეგებს და განხილვას, დასკვნებს, გამოყენებული ლიტერატურის სიას (151 წყარო). იგი ილუსტრირებულია 10 ცხრილითა და 22 სურათით. ნაშრომის მოცულობა 117 გვერდია.

თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1. ლექტინების ისტორიული მიმოხილვა და განმარტება

საუკუნეზე მეტია, რაც დერპტის უნივრსიტეტის სტუდენტ შტილმარკის მიერ აღმოჩენილ იქნა პირველი ლექტინი. მისი გამოკვლევების შედეგად დადგენილ იქნა, რომ აბუსალათინის თესლის ექსტრაქტი იწვევს ერითროციტების აგლუტინაციას და ამიტომაც ამ ტიპის ცილებს ეწოდათ ფიტოჰემაგლუტინინები (ლათ. agglutinare - შეწებება).

მოგვიანებით ბოიდის მიერ დადგენილ იქნა, რომ ფიტოჰემაგლუტინინები სისხლის მიმართ იჩენენ ჯგუფ-სპეციფიკურობას (Boyd 1949). აქედან გამომდინარე, ამავე ავტორის მიერ შემოთავაზებულ იქნა ტერმინი "ლექტინი" (ლათ. legere _ ამორჩევა), რითაც ხაზი გაესვა ამ ჯგუფის ცილების ნახშირწყლებთან, განსაკუთრებით სისხლის ჯგუფების ტერმინალურ ნახშირწყლოვან-დეტერმინანტებთან, შერჩევითად დაკავშირების უნარს (Boyd 1963). თავდაპირველად ეს ტერმინი იხმარებოდა სისხლის ჯგუფების მიმართ სპეციფიკური ჰემაგლუტინინების აღსანიშნავად. 70-იანი წლებიდან კი ამ სახელწოდების ქვეშ გაერთიანდა როგორც მცენარეული, ასევე ცხოველური წარმოშობის შაქრის დამკავშირებელი ცილების სტრუქტურულად მეტად მრავალფეროვანი ჯგუფი (Луцик 1981). არსებობს ლექტინების რამდენიმე განმარტება, რომელიც პრაქტიკულად აერთიანებს ყველა იმ კრიტერიუმს, რომელთა მიხედვითაც ლექტინური აქტივობის მქონე ცილები ერთიანდება ერთ ჯგუფში. ასე მაგალითად, ერთ-ერთი ადრეული განმარტების თანახმად "ლექტინები წარმოადგენენ არაიმუნური ბუნების ცილებს, რომლებსაც აქვს გლიკოკონიუგატების ნახშირწყლოვანი ნაშთების ამოცნობისა და შექცევადი დაკავშირების უნარი, უკანასკნელის კოვალენტური სტრუქტურის დარღვევის გარეშე" (Kocourek 1983). ამ განმარტების თანახმად, ლექტინებს მიეკუთვნება რიგი მცენარეული, ცხოველური და ბაქტერიული ტოქსინები, ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცილოვანი ჰორმონები, რიგი გლიკოლიპიდ-გადამტანი ცილები და ქემოტაქსისის რეცეპტორები, რომლებიც ნახშირწყლების ტრანსპორტში იღებენ მონაწილეობას.

მოგვიანებით მოწოდებული განმარტების თანახმად, ლექტინები "არაიმუნური ბუნების ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცილებია, რომლებიც იწვევენ უჯრედების

აგლუტინაციას ან პოლისაქარიდებისა და გლიკოკონიუგატების პრეციფიტაციას" (Луцик 1981). ეს განმარტება აღიარებულია ბიოქიმიკოსთა საერთაშორისო გაერთიანების ნომენკლატურული კომიტეტის მიერ 1981 წელს და თავისთავად გულისხმობს ლექტინების პოლივალენტურობას, ლექტინების არაიმუნური ბუნება კი მიუთითებს მათ განსხვავებაზე ანტისხეულებისაგან, რომლებსაც ასევე შეუძლიათ უჯრედების აგლუტინაციის გამოწვევა. მოცემული განმარტება ლექტინების ჯგუფიდან გამორიცხავს სხვა ნახშირწყალ-დამკავშირებელ ცილებს, მათ შორის შაქარ-სპეციფიკურ ფერმენტებს (გლიკოზიდაზები, გლიკოზილ-ტრანსფერაზები, გლიკოზილ-კინაზები), შაქრების ტრანსპორტში მონაწილე ცილებს, ჰორმონებს, ქემოტაქსისის რეცეპტორებს, ბაქტერიულ ტოქსინებს, ინტერფერონსა და სხვ. გამონაკლისია ე.წ. ბიფუნქციური ფერმენტ-ლექტინები, რომელთაც კატალიზური და ლექტინური ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრები გამიჯნული აქვთ. ყველაზე სრულყოფილად გვეჩვენება კოროლიოვის მიერ მოწოდებული განმარტება (Королев 1984), რომლის თანახმად "ლექტინები წარმოადგენენ ცილების ჯგუფს უჯრედების აგლუტინაციის და/ან გლიკოკონიუგატების პრეციფიტაციის უნარით". ასეთი განსაზღვრება აფართოებს ლექტინების ცნებას და ძირითად აქცენტს აკეთებს ამ ჯგუფის ცილების უნარზე სპეციფიკურად დაუკავშირდეს უჯრედის ზედაპირზე არსებულ ნახშირწყლოვან დეტერმინანტებს და მათ შემცველ ბიოორგანულ მოლეკულებს.

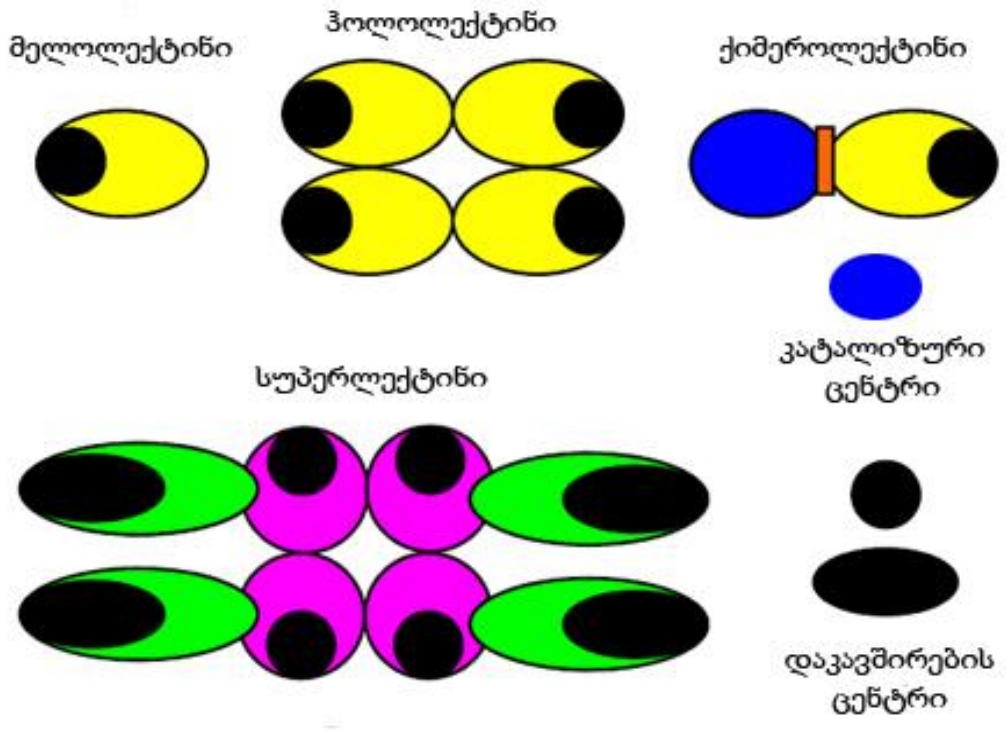
1.2. ლექტინების კლასიფიკაცია

ლექტინოლოგიაში ახალი აღმოჩენების საფუძველზე შემოთავაზებულია ლექტინების კლასიფიკაციის სხვადასხვა ვარიანტები, რომლებმაც, შეიძლება ითქვას დიდი როლი ითამაშეს ლექტინებზე სიღრმისეული შეხედულობის ჩამოყალიბების პროცესებში.

1.2.1. ლექტინების კლასიფიკაცია აქტიური ცენტრების მახასიათებლების მიხედვით

თანაამედროვე ლექტინოლოგიაში ყველაზე ფართოდ მიღებული კლასიფიკაციის მოდელად ითვლება ლექტინების დაყოფა სტრუქტურული ორგანიზაციის მიხედვით ოთხ ჯგუფად: **მელოლექტინები, ჰოლოლექტინები, ქიმეროლექტინები და**

სუპერლექტინები (Peumans 1995). **მელოლექტინები** შეიცავენ მხოლოდ ერთ ნახირწყალ-დამკავშირებელ ცენტრს. ცილა შედგება ერთი პოლიპეპტიდისაგან და მონოვალენტური ბუნების გამო მოკლებულია გლიკოკონიუგატების პრეციფიტაციის ან უჯრედების აგლუტინაციის უნარს. ამ ჯგუფის ტიპიური წარმომადგენელია ჰევეინი, ორქიდეას მონომერული მანოზა-დამკავშირებელი ცილა.



სურ. 1. ლექტინების კლასიფიკაცია აქტიური ცენტრების მახასიათებლების მიხედვით.

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

ქიმეროლექტინები შერწყმული ცილებია, რომლებსაც ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრების გარდა გააჩნია კატალიზური (ან განსხვავებული ბიოლოგიური აქტივობის) ცენტრები. ქიმეროლექტინები მოქმედებემ როგორც

მელოლექტინები ან ჰოლოლექტინები, რაც დამოკიდებულია შაქრის დამკავშირებელი უბნების რიცხვზე. მაგალითად, ცილების 2RIP ტიპი, რომლის B ჯაჭვზე ორი ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრია (მაგ. რიცინი), იწვევს უჯრედების აგლუტინაციას. მცენარეული ქიტინაზების I კლასი კი ასეთ უნარს მოკლებულია ერთი ქიტინ-დამკავშირებელი ცენტრის შემცველობის გამო (Peumans 1995). მეოთხე ჯგუფის წარმომადგენლები- **სუპერლექტინები-** ბუნებაში იშვითად გვხვდება და გააჩნით მეორე და მესამე ჯგუფის ლექტინებისათვის დამახასიათებელი აქტიური ცენტრები, გამოირჩევენიან ასევე განსხვავებული სპეციფიკურობის მქონე შაქრის დამკავშირებელი ცენტრებით **(სურ.1.)**

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

1.2.2. ლექტინების კლასიფიკაცია ნახშირწყლებისადმი სპეციფიურობის მიხედვით

ლექტინების დაყოფა მონოსაქარიდული სპეციფიკურობის მიხედვით მოწოდებულ იქნა გოლდშტეინის მიერ (Goldstein 1986; Королев 1978). ამასთან, ის ლექტინები, რომლებიც არ ინჰიბირდებიან მონოსაქარიდებით, გაერთიანებულია ცალკე ჯგუფში. ამ კლასიფიკაციაში მოცემულია რამდენიმე ჯგუფი, რომლებიც სპეციფიკურია შემდეგი მონოსაქარიდების მიმართ: N-აცეტილ-გლუკოზამინი, N-აცეტილ-გალაქტოზამინი, გალაქტოზა, გლუკოზა, ფუკოზა, მანოზა. მოცემული კლასიფიკაცია პირობითია, რადგან ის არ ითვალისწინებს ლექტინების მიერ, მონოსაქარიდების გარდა, ზოგიერთ ოლიგოსაქარიდულ სტრუქტურებთან რეაგირების უნარს.

არსებობს აგრეთვე ლექტინების კლასიფიკაცია ოლიგოსაქარიდული სპეციფიკურობის მიხედვით, რომლის თანახმად ლექტინები დაყოფილია ორ ჯგუფად: 1) ეგზოლექტინები, რომელთა ინჰიბირება ხდება მონოსაქარიდებით და 2) ენდოლექტინები, რომლებიც ინჰიბირდებიან ოლიგოსაქარიდებით.

თავის მხრივ ეგზოლექტინები იყოფა ობლიგატურ (ინჰიბირდებიან მხოლოდ მონისაქარიდებით) და ფაკულტატურ (ინჰიბირდებიან ასევე ოლიგოსაქარიდებითაც)

ლექტინებად. ენდოლექტინები იყოფა ჰომოტიპურ და ჰეტეროტიპურ ქვეჯგუფებად. ჰომოტიპური ლექტინები ინჰიბირდებიან ოლიგოსაქარიდებით, რომლებიც ერთი ტიპის მონოსაქარიდებისაგან შედგება, ხოლო ჰეტეროტიპური ლექტინები ინჰიბირდებიან ოლიგოსაქარიდებით, რომლებიც აგებულია სხვადასხვა მონოსაქარიდებისაგან.

1.2.3. ლექტინების კლასიფიკაცია წარმოშობისა და ლოკალიზაციის მიხედვით

ლექტინები წარმოშობისა და ლოკალიზაციის მიხედვით იყოფა:

ა) მცენარეული (პარკოსანთა, მარცვლოვანთა და ა.შ.), ცხოველური (C-ტიპის, S-ტიპის), ბაქტერიული და სხვ. ლექტინები;

ბ) ორგანოების, ქსოვილების, უჯრედების ლექტინები;

გ) უჯრედშიდა და უჯრედგარე ლექტინები;

დ) მემბრანული და არამემბრანული ლექტინები.

დღეისათვის ყველაზე პოპულარულ და გავრცელებულ კლასიფიკაციას წარმოადგენს ლექტინების დაყოფა სუბუჯრედული ლოკალიზაციის მიხედვით (Bowles 1982; Bowles 1976). ამ კლასიფიკაციის თანახმად უჯრედში შეიძლება გამოიყოს ორი კლასი: ა) ლექტინები, რომლებიც წარმოადგენენ მემბრანის ინტეგრალურ კომპონენტებს და ბ) ლექტინები, რომლებიც თავისუფალი, ხსნადი სახით არიან ციტოპლაზმაში ან სუბუჯრედული მემბრანების სანათურებში და რომელთა ურთიერთქმედება მემბრანულ ზედაპირებთან შექცევადი ხასიათისაა. აღნიშნული კლასიფიკაცია დღესდღეობით, მიმდინარე კვლევით სამუშაოებში, ხშირად გამოიყენება.

არსებობს ლექტინების სხვა, ნაკლებად გავრცელებული კლასიფიკაციებიც, რომელთა შორისაა ლექტინების დაყოფა: ბიოლოგიური აქტივობისა და ნახშირწყლების შემცველობის მიხედვით.

1.2.4. ლექტინების კლასიფიკაცია ბიოლოგიური აქტივობისა და ნახშირწყლების შემცველობის მიხედვით

ამ ჯგუფში გაერთიანებულია ჰემაგლუტინინები, ლეიკოაგლუტინინები, მიტოგენები, ფუზოგენები, ტოქსინები, სასქესო აგლუტინინები, ადჰეზინები და ა.შ.

აგრეთვე ლექტინები, რომლებიც საერთოდ არ შეიცავენ ნახშირწყლებს (ხორბლის ლექტინი, კონA, არაქისის ლექტინი), გლიკოპროტეინები (ლექტინთა უმეტესობა, რომლებიც მიღებულია ეუკარიოტული ორგანიზმებიდან), სადაც ნახშირწყლების შემცველობა ლექტინის წონის 15%-ს აღწევს და პროტეოგლიკანები (კარტოფილის გორგლის ლექტინი), სადაც ნახშირწყლების შემცველობა ლექტინის წონის მიხედვით 50-60%-ს აღემატება.

1.3. ლექტინების ბიოქიმიური თვისებები

1.3.1. ლექტინების ამინომჟავური შედგენილობა

ლექტინების ამინომჟავური შედგენილობა მეტად განსხვავებულია. ეს უფრო მეტად ვლინდება ევოლუციურად დაშორებული ორგანიზმებიდან მიღებული პრეპარატების შედარებისას. ამიტომ, ლექტინებისათვის ამინომჟავური შემადგენლობის რაიმე დამახასიათებელი ტიპის შესახებ საუბარი არ იქნებოდა გამართლებული. ანალიზმა აჩვენა, რომ მრავალი ლექტინის პოლიპეპტიდური ჯაჭვი შედარებით მდიდარია ასპარაგინის მჟავას, სერინისა და ტრეონინის შემცველობით, რომლებიც შეადგენენ მასში შემავალი ამინომჟავების 30%-ზე მეტს. ზოგიერთ ლექტინებში ძალზე მცირეა ან არაა წარმოდგენილი გოგირდშემცველი ამინომჟავები. თუმცა არსებობენ ლექტინები ცისტეინის მაღალი შემცველობით, რომლებიც მონაწილეობენ დისულფიდური ბმების 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, მჟავეები, შარდოვანა).

1.3.2. ლექტინებში არაორგანული იონების შემცველობა

ლექტინების უმეტესობა შეიცავს ორვალენტიან იონებს (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}), რომლებიც წარმოქმნიან მარილის ტიპის კავშირებს ლექტინის ამინომჟავურ ნაშთთან და ამით განაპირობებენ ცილის სტრუქტურის სტაბილიზაციას. ზოგიერთი ლექტინის, მაგალითად, კონ-A-ს, ლობიოს, ბარდის ლექტინების ბიოლოგიურ აქტივობაზე

გავლენას ახდენს მათში ორვალენტიანი იონების Ca^{2+}-ისა და Mg^{2+}-ის არსებობა (Basu 1983). მათი მოცილებისას ხდება ლექტინის ბიოლოგიური აქტივობის დაქვეითება (Pandolfino 1980). ზოგიერთი ლექტინი, მაგალითად, ხორბლის აგლუტინინი არ საჭიროებს მეტალთა იონების არსებობას მოლეკულაში (Wright 1977). ზოგადად ნანახია, რომ პარკოსნებში Ca^{2+}-ისა და Mg^{2+}-ის ლოკალიზებულია ნახშირწყალ-დამკავშირებელ ცენტრებთან ახლოს და იდენტურ მდგომარეობაში არის წარმოდგენილი ყველა გამოკვლეული პარკოსნის ლექტინებში. მეტალთა იონები დაკავშირებულია ასპარაგინთან და ასპარაგინის მჟავასთან, რომლებიც წარმოქმნიან წყალბადურ ბმებს მონოსაქარიდებთან.

1.3.3. ლექტინებში ნახშირწყლების შემცველობა

მცენარეული ლექტინების უმრავლესობა გლიკოპროტეინებია და, როგორც გამოკვლევებმა აჩვენა, მათი აქტივობა არ იცვლება გლიკანების მოდიფიკაციის ან საერთოდ არარსებობის შემთხვევაში. გამონაკლისს წარმოადგენს რიცინი - აბუსალათინის (*Ricinus communis L*) ორჯაჭვიანი ტოქსიკური ლექტინი, რომელიც დეგლიკოლიზირების შემთხვევაში კარგავს ნახშირწყალ-დამკავშირებელ აქტივობას (Lis 1993). ნახშირწყლების რაოდენობრივი შემცველობა ლექტინებში მერყეობს 3%-დან 80%-მდე, 80%-მდე ნახშირწყალ-შემცველობით ხასიათდება ე.წ. β-ლექტინები, რომლებიც იკავშირებენ ჰიდროფობულ β-გლიკოზიდებს (Clarke 1975), ტიპიურ შემთხვევაში კი 3%-10%-ია. გამონაკლისია კონ-A, ხორბლის ჩანასახის აგლუტინინი (WGA), არაქისის ლექტინები, რომლებიც ნახშირწყლებს საერთოდ არ შეიცავენ, თუმცა ბიოსინთეზის პროცესში კონ-A და WGA გლიკოლიზირებული წინამორბედების სახით არის გამოვლენილი.

რაც შეეხება ნახშირწყლების როლს ლექტინის მოლეკულაში, ზოგიერთი ავტორი ვარაუდობს, რომ ნახშირწყლოვანი კომპონენტი არ თამაშობს დიდ როლს ლექტინის აქტივობაში (Olden 1982). ამჟამად მხარს უჭერენ იმ აზრს, რომ ნახშირწყლოვანი კომპონენტი არ მოქმედებს ლექტინის ბიოლოგიურ აქტივობაზე, სწორედ ნახშირწყლოვანი კომპონენტი განაპირობებს მემბრანული ან სეკრეტორული გლიკოპროტეინების კონფორმაციულ სტაბილიზაციას (Lis 1993). ბოლო მონაცემებით ნახშირწყლოვანი ჯაჭვი ხელს უწყობს, მაგალითად, აბუსალათინის (*Ricinus communis*

L.) ლექტინის - რიცინის ნატიური კონფორმაციის შენარჩუნებას, რაც აუცილებელია სამიზნე უჯრედის ციტოზოლში რიცინის ჯაჭვის შესაღწევად (Richardson 1991).

1.3.4. ლექტინების სტრუქტურული ორგანიზაცია

პირველადი სტრუქტურა გაშიფრული იქნა კონკანავალინი A-ს მაგალითზე (Reeck 1975). ლექტინების პირველადი სტრუქტურა ძირითადად შესწავლილია პარკოსანთა ოჯახის წარმომადგენლებში. კერძოდ, დადგენილია ოსპის, ბარდის, არაქისის, ლობიოს, სოიას, ცერცვის, არჯაკელის, ესპარცეტის ლექტინების პირველად სტრუქტურაში ამინომჟავური თანამიმდევრობა. პარკოსანთა ლექტინების პოლიპეპდიდური ჯაჭვების სტრუქტურის აგებულებისა და ამინომჟავური შედგენილობის შესწავლამ გამოავლინა მჭიდრო სტრუქტურული ჰომოლოგიურობა. კერძოდ: ოსპის, ბარდის, ცერცვის, არჯაკელის ლექტინები წარმოადგენენ დიმერულ ცილებს და შეიცავენ α-სუბერთეულებს, მოლეკულური მასით 6 kDa და β–სუბერთეულებს - მოლეკულური მასით 18 kDa. მათ გააჩნიათ აგრეთვე იდენტური ტერმინალური ამინომჟავური თანმიმდევრობა (Королев 1984; Lis 1986). გამოვლენილია ჰომოლოგიურობა ერთჯაჭვიან კონ-A-ს, სოიას აგლუტინინსა და ორჯაჭვიან ცერცვის ლექტინს – ფავინს შორის: კერძოდ, კონ-A-ს 1-70 ამინომჟავური ნაშთების შემცველი უბანი ჰომოლოგიურია ფავინის β–ჯაჭვის ტერმინალური უბნის, ხოლო 70-იდან 120-მდე ამინომჟავური უბანი ჰომოლოგიურია ფავინის ჯაჭვისა და სოიას ტერმინალური 60 ამინომჟავური ნაშთის მიმართ. სოიას აგლუტინინის 1-120 უბანი ჰომოლოგიურია კონ-A-ს 237 უბნისა და ფავინის β–ჯაჭვის (Королев 1984; Lis 1986). ოსპის ლექტინის პირველადი სტრუქტურის განსაზღვრის შემდეგ დადგინდა, რომ მისი β–ჯაჭვის ტერმინალური უბანი ჰომოლოგიურია კონ-A–ს 1-45 უბნის, ხოლო α-ჰაჭვი 70-121 უბნის. არაქისის ლექტინის ტერმინალური თანამიმდევრობა კონ-A –ს 123-162 სეგმენტის ჰომოლოგიურია (Королев 1984).

ლექტინების პირველად სტრუქტურაში ჰომოლოგიურობა ვლინდება არა მარტო ერთი მცენარეული ოჯახის შიგნით, არამედ სხვადასხვა მცენარეული ოჯახის წარმომადგენლებს შორისაც. კერძოდ, პარკოსნებიდან სისტემატიკურად დაშორებული მცენარის, ესპარცეტის ლექტინი ამჟღავნებს მნიშვნელოვან ჰომოლოგიას ოსპის, კონ-A-სა და არაქისის ლექტინებთან (Королев 1984).

გამოკვლეული ლექტინების უმრავლესობაში ნანახი სტრუქტურული ჰომოლოგიურობის საფუძველზე გამოთქმულია მოსაზრება საერთო წინაპარი გენის არსებობის შესახებ, რომელმაც ევოლუციის პროცესში განიცადა დივერგენცია. ლექტინების პირველად სტრუქტურაში არსებული კონსერვატიულობის მიუხედავად მცენარეული ლექტინები ხასიათდებიან საკმაოდ მაღალი ჰეტეროგენულობით. ეს გამოიხატება მათ განსხვავებულ მოლეკულურ მასებში, სუბერთეულების რაოდენობაში, გლიკოზილირების ხარისხში, ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრების რიცხვში და ნახშირწყლების მიმართ სპეციფიურობაში.

დღემდე ცნობილი ყველა ლექტინის მოლეკულა, მცირე გამონაკლისის გარდა, რამდენიმე პოლიპეპტიდური ჯაჭვისაგან შედგება. მათგან უმრავლესობა დიმერი ან ტეტრამერია. არსებობენ აგრეთვე მოლეკულები, რომლებსაც გააჩნიათ 1-3-8-20 სუბერთეული. ლექტინების უმეტესობა შედგება მოლეკულური მასით იდენტური სუბერთეულებისაგან (მაგალითად სოიას, არაქისის, ხორბლის ჩანასახის ლექტინი, კონ-A). თუმცა ცნობილია არაჰომოლოგიური სუბერთეულების მქონე ლექტინებიც (მაგალითად ბარდის, ცერცვის და სხვა), რომელთა მოლეკულები ორი ტიპის სუბერთეულისაგან შედგება: α (მსუბუქი ჯაჭვი) და β (მძიმე ჯაჭვი) (Lis 1973; Cunningham 1979; Foriers 1978). ამასთან, მაგალითად, ბარდის ტეტრამერული ლექტინის მოლეკულას გააჩნია სამი იზოფორმა, რაც განპირობებულია ერთ-ერთ ჯაჭვში ლიზინის ნაშთის მაღალი შემცველობით. ჰეტეროგენული ტეტრამერული სტრუქტურა და ხუთი იზოფორმა გააჩნია ლობიოს ლექტინსაც (Basu 1983; Lis 1986).

ჰეტეროგენულობა გამოვლენილია აგრეთვე ზოგიერთი ლექტინის მოლეკულაშიც. მაგალითად, აბუსალათინის ლექტინი ტეტრამერია. მისი ორი სუბერთეული იდენტურია და მათი მოლეკულური მასები 27.5 kDa-ია, ხოლო შემდეგი ორი განსხვავებულია და მათი მასები შესაბამისად 30 kDA და 33 kDa-ია (Gurtler 1973). ფითრის აგლუტინინი ორი ტიპის პოლიპეპტიდური ჯაჭვისაგან შედგება, რომელთა მასებია 34.5 kDa და 29 kDa (Luther 1980). ლიმური ლობიოს ლექტინი ერთი ტიპის, 31 kDa მასის მქონე პოლიპეპტიდური ჯაჭვებისდაგან შედგება და დიმერს წარმოადგენს (Gould 1970; Basu 1983). მაღალი რიგის პოლიმერები უფრო ხშირია ცხოველური წარმოშობის ლექტინებში. მათ შორის გვხვდება მოლეკულები 6-იდან 20-მდე სუბერთეულების აგრეგაციით (Kocourek 1983; Jeffree 1981).

მცენარეული ლექტინების მასები მნიშვნელოვნად მერყეობს სახეობათა შორის. მაგალითად, ხორბლის ლექტინის მოლეკულური მასა 36 kDa-ია, ოსპის ლექტინის მასა 8 kDa-ია (Peumans 1984), ჰიმალაის მკვიდრი მცენარის *Arisaema cons. L*-ის ლექტინის მასა 48 kDa-ია და ტეტრამერს წარმოადგენს, რომელშიც თითოეული სუბერთეულის მასა 13 kDa-ია. ამავე დროს მოლეკულურ მასებს შორის განსხვავება აღინიშნება ერთი სახეობის შიგნითაც. მაგალითად, ორყვავილიანი დოლიხოსას ფესვის ლექტინი (Quinn 1987) განსხვავდება ფოთლისა და ღეროს (Roberts 1983) ლექტინისაგან. Griffonia *simplicifolia L.*-ს თესლიდან გამოყოფილია მოლეკულური მასებით განსხვავებული სამი ლექტინი (Peumans 1991).

უმეტეს შემთხვევაში ლექტინის მოლეკულის თითოეული სუბერთეული შეიცავს ერთ ნახშირწყალ-დამკავშირებელ ცენტრს. თუმცა სოიას, არაქისის, ლიმური ლობიოს ოთხ სუბერთეულზე მოდის მხოლოდ ორი ასეთი ცენტრი (Lis 1986; De boeck 1984). ანალოგიური სურათია *Datura stramonium L*-ისა და *Arthocarpus integrifolia L*-ის ტეტრამერებში (Lis 1986). მეორეს მხრივ, ხორბლის ჩანასახის აგლუტინინის თითოეულ სუბერთეულს გააჩნია ორი ნახშირწყალ-დამკავშირებელი უბანი (Goldstein 1978). იგივე ითქმის რიცინის ერთ-ერთ სუბერთეულზე, რომელსაც ორი ასეთი ცენტრი გააჩნია (Houston 1982).

ლექტინების ჰეტეროგენობა ვლინდება, აგრეთვე, მათ სპეციფიკურობაში ნახშირწყლების მიმართ. ლექტინის მოლეკულის ცალკეული სუბერთეულები ხშირად ხასიათდებიან ერთნაირი ნახშირწყალ სპეციფიურობით, თუმცა აღმოჩენილია განსხვავებული სპეციფიკურობის მქონე სუბერთეულებიც. მაგალითად, *Bandeiraea simplicifolia L*-დან გამოყოფილი ლექტინი წარმოადგენს ტეტრამერს და შედგება ორი ტიპის სუბერთეულისაგან, რომელთაგან ერთი იკავშირებს N-აცეტილ-გალაქტოზამინს, მეორე კი α-D-გალაქტოზას (Lis 1986).

ლექტინების სუბერთეულები ბიოლოგიური აქტივობითაც განსხვავდებიან. მაგალითად, ლობიოს ლექტინის E სუბერთეული ჰემაგლუტინინს წარმოადგენს, ხოლო L-ს გააჩნია მიტოგენური თვისებები (Basu 1983). გამოვლენილია იზოლექტინების შუალედური ფორმებიც, რომელთაც ორივე ეს თვისება გააჩნია. სუბერთეულების ორი ტიპი E და L, რომელთაგან შედგება ლობიოს იზოლექტინის მოლეკულა, ამინომჟავური შემცველობით მსგავსია. განსხვავება მდგომარეობს მხოლოდ იმაში, რომ E

სუბერთეულში N-ტერმინალურ ამინომჟავურ ნაშთს წარმოადგენს ალანინი, ხოლო L სუბერთეულში - სერინი (Lis 1986).

დადგენილია, რომ ნახშირწყლოვანი კომპონენტები მნიშვნელოვნად ცვლის ცილის მეოთხეულ სტრუქტურას. გამოვლენილია, რომ *E. corallodendron*-ის ლექტინის ჰეპტასაქარიდი, რომელიც დაკავშირებულია ლექტინის ორივე სუბერთეულის Asn17-თან, ხელს უშლის დიმერების წარმოქმნას, რომელიც დამახასიათებელია სხვა პარკოსანთა ჰომოლოგიური ლექტინებისათვის (მაგ. კონ-A, ბარდის ლექტინი), რის შედეგად სუბერთეულები იძენენ სრულიად განსხვავებულ სამგანზომილებიან სტრუქტურას (Shaanan 1991).

ამრიგად, როგორც წარმოდგენილი ლიტერატურული მონაცემებიდან ჩანს, ჰეტეროგენულობა მჟღავნდება არა მარტო სხვადასხვა მცენარის ლექტინებს შორის, არამედ ერთი ლექტინის მოლეკულაში შემავალ სუბერთეულებს შორისაც. ეს კიდევ ერთხელ მიუთითებს ლექტინების მოლეკულების მრავალფეროვნებაზე, მისი მოლეკულური ფორმების სიმრავლეზე და აქედან გამომდინარე, მათ პოლიფუნქციურობაზე in vivo სისტემებში.

1.4.ლექტინების სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ

ლექტინების ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი მახასიათებელია ნახშირწყლების მიმართ სპეციფიკურობა. ფერმენტ გლიკოზიდაზებისაგან განსხვავებით, რომლებიც იწვევენ ნახშირწყლების ქიმიურ გარდაქმნას, ლექტინები შექცევადად უკავშირდებიან გლიკოპროტეინების ტერმინალურ ნახშირწყლებს და არ იწვევენ მათ სტრუქტურებში რაიმე სახის ცვლილებას. ლექტინის ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრები, სავარაუდოდ, წარმოადგენს მოლეკულის განსაკუთრებულ ღარებს ან ხვრელებს, რომლებშიც თავსდება კომპლემენტარული ფორმის მონო- ან ოლიგოსაქარიდების მოლეკულები. დაკავშირების ხარისხს განსაზღვრავს ლექტინის აქტიური ცენტრის შიდა მოლეკულური სივრცითი სტრუქტურისა და ნახშირწყლოვანი დეტერმინანტის კონფიგურაციის სტერეოქიმიური შესაბამისობა. ნახშირწყალ-დამკავშირებელი უბნების ზომები ლექტინის მოლეკულის ზომასთან შედარებით საკმაოდ მცირეა. უმეტეს შემთხვევაში ლექტინის თითო სუბერთეული შეიცავს ერთ ნახშირწყალ-დამკავშირებელ ცენტრს; WGA-ს, რიცინის თითო სუბერთეულზე 2 ნახშირწყალ-

დამკავშირებელი უბანია, ხოლო სოიას, არაქისის, ლიმური ლობიოს, ლემას, პურის ხის ლექტინების ტეტრამერებში 4 სუბერთეულზე მხოლოდ 2 ასეთი ცენტრი მოდის.

დღეისათვის 500-ზე მეტი სხვადასხვა გვარის მცენარიდან გამოყოფილ ლექტინებს შორის განსაკუთრებით ბევრია D-გალაქტოზა სპეციფიკური ლექტინები. ლექტინები, როგორც წესი, ტოლერანტულია მისი სპეციფიკური შაქრების C-2 ნახშირბად ატომთან არსებული ჯგუფის ცვლილების მიმართ. მაგ., მანოზა-სპეციფიკური ლექტინები იკავშირებს გლუკოზას, თუმცა სუსტად N-აცეტილ-D-გლუკოზამინს (Lis 1986).

როგორც ჩანს, ლექტინების ბუნებრივი ჰაპტენები წარმოადგენს რთულ ნახშირწყლოვან კომპლექსებს (უჯრედის კედლის პოლისაქარიდებს, ოლიგოსაქარინებს, სხვადასხვა გლიკოლიპიდებსა და გლიკოპროტეინებს). აღსანიშნავია, რომ მრავალ მცენარეულ ლექტინს, მცენარეულ ნახშირწყლებთან შედარებით, უფრო მაღალი აფინურობა ახასიათებს ცხოველური ან მიკროორგანიზმული გლიკო-კონიუგატების რთული გლიკანური ჯაჭვების მიმართ. მაგ, ლობიოს D-გალაქტოზა-სპეციფიკური ლექტინის აფინურობა, მარტივ შაქართან შედარებით, ერითროციტების მემბრანის გლიკოლიპიდის მიმართ 60 000-ჯერ უფრო მაღალია.

ცილასა და ნახშირწყალს შორის ბმა არ არის კოვალენტური, შაქრების ჰიდროფილური ბუნებიდან გამომდინარე, აქ გადამწყვეტ როლს ასრულებს პოლარული ურთიერთქმედება, კერძოდ, წყალბადური ბმები და დიპოლური კავშირები (Hardman 1976; Becker 1975). ნაჩვენებია, რომ წყალბადური ბმები ყალიბდება C3 და C4 OH-ჯგუფებსა და Asp და Asn ნაშთების კარბოქსილის ჯგუფებს შორის.

რიგი ლექტინების მოლეკულებში, ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრების გარდა, გამოვლენილ იქნა დამოუკიდებლად განლაგებული ალტერნატიული დამკავშირებელი უბნები, რომელთა საშუალებით ლექტინებს შეუძლიათ არანახშირწყლოვანი ლიგანდების დაკავშირებაც. მაგ., დადგენილია, რომ კონ-A იკავშირებს ინდოლილ-ძმარმჟავას. დაკავშირება ხორციელდება ლექტინის ჰიდროფობული უბნით და არ არის დამოკიდებული ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრზე (Edelman 1978). ჰიდროფობული ურთიერთქმედების შედეგად ლექტინები

უფრო მტკიცედ იკავშირებენ ჰიდროფობულ გლიკოზიდებს, ვიდრე ანალოგიურ ჰიდროფილურ სტრუქტურებს (Roberts 1984).

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 ჯერ კიდევ არაა სათანადოდო შესწავლილი.

1.5. ლექტინების გავრცელება მცენარეებში, მათი განაწილება მცენარეთა ორგანოებსა და ქსოვილებში და მათი შემცველობის დინამიკა

ლექტინოლოგების მიერ გამოთქმულია ვარაუდი, რომ პრაქტიკულად ყველა მცენარე უნდა შეიცავდეს ლექტინს. ამის საფუძველს იძლევა ის ფაქტი, რომ დღეისათვის ლექტინები ნანახია პრაქტიკულად ყველა მცენარეული ოჯახის წარმომადგენლებში. ისინი გამოვლენილია არა მარტო თესლებსა და ფესვებში, არამედ ღეროში, ფოთლებში, ყვავილებში, ნაყოფებსა და ძირხვენებში. ზოგიერთ მცენარეში მათი არგამოვლენის მიზეზი შეიძლება იყოს მოცემულ მცენარეში ლექტინების სიმცირე ან მათ გამოსავლენად არაადექვატური მეთოდების გამოყენება. არ არის გამორიცხული ასევე მცენარეულ ექსტრაქტებში ლექტინების ისეთი ინჰიბიტორების არსებობა, როგორიცაა გალაქტომანანების ტიპის პოლისაქარიდები, ოლიგოსაქარიდები და სხვა ნივთიერებები. ასე მაგალითად, ადრეული გამოკვლევებით ვერ დაადგინეს ლექტინების არსებობა სოიას ფესვის ბუსუსებში, რამაც ეჭვის ქვეშ დააყენა ლექტინების მონაწილეობა სიმბიოზის პროცესში. უფრო ზუსტი მეთოდების გამოყენებით სოიას ფესვებში გამოვლენილია ლექტინი, რომელსაც ფესვი შეიცავს ძლიერ მცირე კონცენტრაციით (Gade at al 1981).

რიგ შემთხვევაში ლექტინების არგამოვლენა განპირობებულია მათი ექსპრესიის დამოკიდებულებით მცენარის სასიცოცხლო ციკლზე. ამის გამო მათი დაფიქსირება გარკვეულ პერიოდებში შეუძლებელია. მაგალითად, დადგენილია, რომ ლექტინები ახალგაზრდა სოიას ყველა ორგანოშია ლოკალიზებული, სიმწიფის სტადიაში კი მათი გამოვლენა საერთოდ ვერ ხერხდება (Gade 1981). იმუნოსორბენტული ანალიზით განსაზღვრული იქნა ლექტინის რაოდენობა და განაწილება სასიცოცხლო ციკლის

განმავლობაში *Galanthus nivalis* და *Narcissus*-ის სხვადასხვა ქსოვილებში (Van Damme 1990). ლექტინები გამოვლინდა ორივე მცენარის თითქმის ყველა ქსოვილში. აღმოჩნდა, რომ მოსვენების პერიოდში ლექტინი მაღალი კონცენრატაციით გროვდებოდა ბოლქვებში, სადაც იგი ცილის საერთო რაოდენობის 15%-ს შეადგენდა. აღმოცენებასა და ყვავილობასთან ერთად მისი რაოდენობა მკვეთრად მცირდებოდა (Peumans 1997). *Allium porrum*-ის ნექტარის ანალიზის შედეგად გამოავლინეს 13 kDa მოლეკულური მასის მქონე მანოზა-სპეციფიური ლექტინი, რომელიც ვლინდებოდა მაშინ, როცა მისი რაოდენობა ნექტარის ცილის საერთო რაოდენობის 75%-ს აღწევდა (Peumans 1997).

ლექტინების განაწილება მცენარის ორგანოებში ყველაზე უკეთაა შესწავლილი პარკოსანთა ოჯახის წარმომადგენლებში. უმეტეს სამუშაოებში კვლევის ობიექტად გამოიყენებოდა მცენარის თესლი, სადაც გამოვლენილია ლექტინების ყველაზე დიდი რაოდენობა, მცენარის სხვა ორგანოებთან შედარებით. მაგალითად, ორყვავილიანი დოლიხოსას თესლებში ნანახია N-აცეტილ-D-გალაქტოზამინის მიმართ სპეციფიური ლექტინი (Talbot 1978), რომელიც ვლინდებოდა თესლის მომწიფების სტადიაში (Talbot 1978) და ლოკალიზებულია ცილოვან სხეულაკებში (Etzler 1984). თესლის ლექტინი ჩნდება ყვავილობისას და მისი რაოდენობა მაქსიმუმს აღწევს თესლის მომწიფებისას (Talbot 1978), ლექტინის რაოდენობა ფაქტიურად ქრება თესლის შეწოვის სტადიაზე და მისი აღმოჩენა ვერ ხერხდება მცენარის სხვა ნაწილებში. თუმცა ღეროსა და ფოთლებში აღმოჩენილი იქნა თესლის ლექტინის სტრუქტურულად მონათესავე ლექტინი, რომელიც განსხვავდებოდა მხოლოდ ერთი სუბერთეულის მოლეკულური მასით. ამასთანავე იგი არ იქნა აღმოჩენილი განვითარებად თესლებში, ძლიერ მცირედ ვლინდებოდა გაჯირჯვებულ თესლებში, სამაგიეროდ ინტენსიურად აკუმულირდებოდა მცენარის აპექსში, ფოთლებში და ძირითადად ასოცირებულია უჯრედის კედელთან (Roberts 1982; Etzler 1983; Etzler 1984). ლექტინი გამოყოფილია ამავე მცენარის ფესვიდანაც (Quinn 1987). იგი თესლის ლექტინისაგან განსხვავდება მოლეკულური მასით, სუბერთეულების სტექიომეტრიით, ამინომჟავური შედგენილობით, თუმცა ნახშირწყალ-სპეციფიურობა ორივე ლექტინისათვის აღმოაჩნდა N-აცეტილ-D-გალაქტოზამინის მიმართ. ლექტინის ყველაზე მაღალი შემცველობა შეინიშნებოდა ერთდღიან ფესვებში. შვიდდღიან ფესვებში კი ლექტინების ყველაზე მაღალი შემცველობა გამოვლინდა ფესვის კენწრულ სეგმენტში. სოიას ფესვში

ლექტინის მაღალი შემცველობა გამოვლინდა ფესვის ბუსუსების განვითარების უბნებში (Gade 1981). იმუნოფლუორესცენტული ანალიზით დადგენილი იქნა, რომ თეთრი სამყურას (Dazzo 1978) და *L. Bainesii L.* (Law 1984) ფესვის ლექტინები ლოკალიზებულია ასევე ფესვის ბუსუსებში. ფესვის ლექტინის იზოფორმები გამოვლენილია პარკოსნებშიც: მაგალითად, სოიას (Gade 1981), ბარდას (Gatehouse 1981; Kijne 1980), თეთრი სამყურას (Dazzo 1978) და ჩვეულებრივი ესპარცეტის (Hapner 1979) ფესვის ლექტინები ძალიან ჰგავს შესაბამისი თესლების ლექტინებს. *Griffonia simplicifolia L.*-ს ფოთლები შეიცავენ ამავე მცენარის თესლის 4 ცნობილი იზოლექტინიდან სამს : GSI, GSII, GSIV (Lamb 1983). როდესაც დაახასიათეს ფოთლიდან გამოყოფილი ლექტინები, აღმოჩნდა, რომ ფოთლის GSI და GSIV-ს გააჩნდა თესლის შესაბამისი ლექტინების მსგავსი თვისებები, ხოლო ფოთლისა და ფესვის GSII ლექტინი ერთმანეთისაგან განსხვავდებოდა სუბერთეულების რიცხვით და მოლეკულური მასით. თუმცა ნახშირწყალ-სპეციფიურობა ორივესათვის მსგავსი აღმოჩნდა.

ლექტინების რაოდენობრივი განაწილება ზოგიერთი პარკოსანი მცენარის ქსოვილებში ვარირებს ვეგეტაციური პერიოდის მიხედვით. მაგალითად, ჩვეულებრივ ლობიოში ლექტინების რაოდენობრივი განაწილების შესწავლისას ლექტინების ყველაზე მაღალი შემცველობა აღმოჩნდა ღეროს ეპიკოტილეში, ჰიპოკოტილეში და ფესვში (Borrebeack 1983). ამასთან მესამედან მეათე კვირის ჩათვლით ჰიპოკოტილეში ლექტინის რაოდენობა აღმოჩნდა სტაბილურად მაღალი, ხოლო ეპიკოტილეში და ფესვში თანდათან მცირდებოდა. ამის საწინააღმდეგოდ მუხლთაშორისებში მეექვსე კვირიდან მკვეთრად მატულობდა ლექტინის რაოდენობა. ამ პერიოდში ლექტინების ძალზე მცირე რაოდენობა აღმოჩნდა ფოთლებში. ეს მონაცემები ეთანხმება სხვა მკვლევარების მიერ მიღებულ შედეგებს, რომელთა მიხედვით ორყვავილიანი დოლიხოსას სიცოცხლის მთელი ციკლის განმავლობაში ღეროსა და ფოთლებში ვლინდებოდა ლექტინების დაბალი შემცველობა (Talbot 1978). ლექტინების დაბალი შემცველობა ნანახია ასევე ოსპის, ბარდას და წითელი ლობიოს 5-6 დღიან აღმონაცენებში, მაშინ, როცა მოზრდილი მცენარეების ნაწილებიდან მიღებულ ბუფერულ ექსტრაქტებში ლექტინი საერთოდ არ აღმოჩნდა (Howard 1972; Mailonier 1973; Rouge 1974).

როგორც წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, მცენარეთა თესლებში, ლექტინები ძირითადად ლოკალიზებულია ლებნებში და რაოდენობის მაქსიმუმს აღწევს მწიფე თესლებში. გაღივების შემდეგ ლებნებში ლექტინების რაოდენობა მკვეთრად მცირდება. ახლადგანვითარებული მცენარის ფოთლები, ღერო ან ფესვი ლექტინებს შეიცავს მცირე რაოდენობით. ლებნების შეწოვის პროცესში, თესლის ლექტინის გაქრობა დასაშვებს ხდის მის, როგორც სამარაგო ცილის ფუნქციას (Rudiger 1984). სამწუხაროდ, ჯერ-ჯერობით გაურკვეველია ამ ცილების შემდგომი ბედი, სავარაუდოა, რომ ხდება მათი ჰიდროლიზი ამინომჟავებად და მოდიფიცირდება მონათესავე მოლეკულებად, რომლებიც ასრულებენ სხვა ფუნქციებს.

რიგ პარკოსნებში ფესვისა და თესლის, აგრეთვე თესლისა და ვეგეტატიური ნაწილების ლექტინების სტრუქტურული მონათესაობა არ გამორიცხავს ამ ვარაუდს, თუმცა სტრუქტურული განსხვავებანი მცენარის სხვადასხვა ნაწილების ლექტინებს შორის ალბათ მიუთითებს ამ ლექტინების განსხვავებულ ფუნქციებზე მცენარის სხვადასხვა ქსოვილში. ლექტინები ნანახია არა მარტო პარკოსანთა, არამედ სხვა გვარის მცენარეულ ორგანოებში და ქსოვილებში. მაგალითად, ევროპული სოჭის ქერქიდან გამოყოფილია ორი ლექტინი: AAA1 და AAA2 (Duk 1982), თამბაქოს ფოთლის მეზოფილური ქსოვილიდან (Hardman 1976), ყვავილებიდან და ფოთლებიდან (Roberts 1984), ბრინჯის აღმონაცენებიდან (Becker 1975), შაქრის ჭარხლის ძირხვენებიდან (Howard 1977), ლექტინები ნანახია ძაღლყურძენასებრთა, რძიანასებრთა (*Euforbeaceae*), გოგრისებრთა (*Cucurbitaceae*), მარცვლოვანთა ოჯახების მრავალ წარმომადგენელში და სხვა ერთ- და ორლებნიან მცენარეებში (Lis 1986).

აღნიშნული ლიტერატურული მონაცემების საფუძველზე შეიძლება დავასკვნათ:

1) ლექტინები ნანახია მცენარის ყველა ორგანოში. ამასთან, სხვადასხვა ორგანოში გამოვლენილი ლექტინები ერთმანეთის მსგავსი ან სრულიად განსვავებულია.

2) ლექტინების ექსპრესია ხდება მცენარის სხვადასხვა ნაწილში განვითარების სხვადასხვა სტადიაზე და შესაბამისად სხვადასხვა დროს. ამასთანავე, ლექტინების აქტიურობა ძირითადად ვლინდება აქტიურად მზარდ და ფუნქციონირებად ქსოვილებში.

3) გამოვლენილია მსგავსება მცენარეთა განსხვავებული სახეობების (ძირითადად ერთი ოჯახის, მაგალითად, პარკოსნების ფარგლებში) სხვადასხვა ორგანოებში ნანახ ლექტინებს შორის.

ამრიგად, მცენარეთა ორგანოებსა და ქსოვილებში ლექტინების განაწილების შესწავლამ კიდევ ერთხელ დაადასტურა, რომ ლექტინები არის ცილების მეტად მობილური ჯგუფი. თუმცა უნდა აღინიშნოს, რომ მონაცემები არ იძლევა სრულ წარმოდგენას მცენარეებში ამ ცილების შესაძლებელი ფიზიოლოგიური როლის შესახებ.

ლექტინების სუბუჯრედული განაწილება: სუბუჯრედული ლოკალიზაციის მიხედვით გამოყოფენ ლექტინების ორ კლასს:

1) ლექტინები, რომლებიც წარმოადგენენ მემბრანის ინტეგრალურ კომპონენტებს,

2) ლექტინები, რომლებიც ხსნადი სახით არსებობენ ციტოპლაზმაში ან სუბუჯრედული მემბრანების სანათურებში და რომელთა ურთიერთქმედება მემბრანულ ზედაპირებთან შექცევადია (Bowles 1982. Gade 1981).

მემბრანული ლექტინების ექსტრაქცია ქსოვილიდან ხდება მხოლოდ დეტერგენტის გამოყენებით, ხოლო ხსნადი ლექტინები ადვილად ექსტრადირდებიან მარტივი ბუფერული ხსნარებით. მაგალითად, თესლის ლექტინები განეკუთვნება ლექტინთა მეორე კლასს, ვინაიდან ისინი ადვილად ექსტრგირდებიან წყალხსნარებით, დეტერგენტის გარეშე. ასეთი გზით არის გამოყოფილი ხსნადი ლექტინები მრავალი პარკოსანი და არაპარკოსანი მცენარეების თესლებიდან.

ხსნადი ლექტინების სუბუჯრედული ლოკალიზაციის დადგენის მიზნით ჩატარებული სპეციალური გამოკვლევები ძალზე მცირერიცხოვანია და ძირითადად მოიცავს ხსნადი ლექტინების განაწილების შესწავლას თესლებში. მაგალითად, ჩვეულებრივი ლობიოს თესლის ლექტინის მიმართ მონიშნული ანტისხეულების გამოყენებით დაადგინეს ხსნადი ლექტინის ლოკალიზაცია მომწიფებული თესლის ლებნების უჯრედების ციტოპლაზმაში (Mailonier 1973). მსგავსი შედეგები იქნა მიღებული ექსპერიმენტებში, სადაც ფლუორესცენტულად მონიშნული იმუნოგლობულინის საშუალებით დაადგინეს კანავალიას ლექტინის ლოკალიზაცია თესლის უჯრედების ციტოზოლში (Clarke 1975). ამავე ავტორებმა გამოავლინეს, რომ ციტოპლაზმაში ლოკალიზებული ლექტინი ასოცირებულია ცილოვან სხეულაკებთან და სახამებლის მარცვლების ზედაპირთან. კონ-A და ლობიოს ლექტინი გამოვლენილი

იქნა თესლის ლებნის პარენქიმული უჯრედების ცილოვანი სხეულების მატრიქსში, ხოლო ჭურჭლის ქსოვილების უჯრედებში კი ცილოვანი სხეულების გარეთ ციტოპლაზმაში (Manen 1982). იგივე კონ-A-ს ლოკალიზაციის შესწავლის შედეგად დადგენილ იქნა, რომ პარენქიმულ უჯრედებში ლექტინი ლოკალიზებული იყო ცილოვან სხეულაკებში, ხოლო თესლის განვითარებისას მისი არსებობა ვლინდებოდა ენდოპლაზმურ რეტიკულუმსა და გოლჯის კომპლექსში (Herman 1984). თესლის ლექტინის გამოვლენა ამ ორ სუბუჯრედულ სტრუქტურაში მიუთითებს ცილის სინთეზისა და ტრანსპორტის იმ გზაზე, რომელსაც გადის კონ-A სინთეზის ადგილიდან ცილოვან სხეულაკებამდე, სადაც ხდება მათი აკუმულირება სხვა სამარაგო ცილებთან ერთად. ხორბლის ჩანასახის ლექტინის სუბუჯრედული ლოკალიზაციის შესწავლის შედეგად ლექტინი გამოვლენილ იქნა არა მარტო ციტოზოლში, არამედ უჯრედის ზედაპირზე. კერძოდ, უჯრედის კედლისა და მემბრანას შორის ინტერფაზაში (Mirelman 1975). დადგენილია ბრინჯისა და ქერის ლექტინების ლოკალიზაცია თესლის უჯრედების ცილოვან სხეულებში, ციტოზოლში და უჯრედის ზედაპირზე (Mishkind 1983).

ამრიგად, ლიტერატურული მონაცემებიდან გამომდინარეობს, რომ თესლის სამარაგო ქსოვილის უჯრედებში ხსნადი ლექტინები ლოკალიზებულია ცილოვანი სხეულების მატრიქსში, რომლებიც თესლის გაღივების პერიოდში ვლინდებიან ციტოზოლში და უჯრედის ზედაპირზე, ე. ი. ადგილი აქვს ცილოვანი სხეულებიდან მათ სეკრეციას უჯრედის ზედაპირზე და გარემომცველ არეში. ჩანასახის გამტარი ქსოვილის უჯრედებში კი ლექტინები ლოკალიზებულია ციტოზოლში და უჯრედის ზედაპირზე.

ლიტარატურაში მოიპოვება აგრეთვე მონაცემები ხსნადი ლექტინების სუბუჯრედული ლოკალიზაციის შესახებ მცენარეთა ვეგეტატიური ნაწილების ქსოვილთა უჯრედებში (Алексидзе 1986). იმუნოფლუორესცენტული ანალიზის გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ ორყვავილიანი დოლიხოსას ღეროსა და ფოთლის ლექტინების 20-40% ასოცირებულია უჯრედის კედლებზე, ხოლო დანარჩენი კი ლოკალიზებულია ციტოზოლში (Etzler 1983). გამოვლენილია ლექტინების შემცველობა მაშა ლობიოს ჩანასახის უჯრედების კედელში (Kauss 1974), ლემას ღეროს უჯრედების ზედაპირზე და ციტოზოლში (Lis 1986), შაქრის ჭარხლის ძირხვენების უჯრედების

კედელში (Howard 1977), არაქისის უჯრედების ციტოზოლში (Bowles 1979). სოიას *(Glicine max. L)* ვეგეტატიური ქსოვილებიდან გამოყოფილი იქნა ახალი ლექტინი, რომელიც გამოვლენილია მცენარის ყველა ორგანოში, გარდა თესლისა, კერძოდ, ღეროში, ფოთლებში, აღმონაცენებში. ლექტინი ლოკალიზებული აღმოჩნდა შალითისა და მეზოფილის ვაკუოლებში და ინჰიბირდებოდა არა მარტო შაქრებით, არამედ მუცინითა და ჰეპარინთ (Spilarto 1996).

პირველად მემბრანული ლექტინების არსებობაზე მცენარეებში მიუთითეს ბოულსმა და კაუსმა (Knox 1976). ამ ავტორთა მიერ მაშა ლობიოს ქსოვილებიდან გამოყვეს როგორც ხსნადი, ისე მემბრანული ლექტინები. მემბრანული ლექტინების ექსტრაქცია ქსოვილიდან ხდებოდა მხოლოდ არაიონური დეტერგენტის გამოყენებით (0.06% ტრიტონ X-100), რომლის მეშვეობითაც ირღვეოდა ბიოლოგიური მემბრანების ორმაგი ლიპიდური შრე. მიღებული შედეგების საფუძველზე გაკეთდა დასკვნა, რომ მცენარეებში, ისე, როგორც ცხოველურ ორგანიზმებში, უნდა არსებობდეს ლექტინების ორი ძირითადი კლასი: ხსნადი და მემბრანული ლექტინები (Morell 1968; Hudgin 1974; Monsigny 1983). მოგვიანებით მემბრანული ლექტინების არსებობა დადგინდა აგრეთვე სოიასა და არაქისის ფესვებში, ყლორტში და ფოთლებში განვითარების ყველა სტადიაზე (Calvert 1978). მაშა ლობიოს ჰიპოკოტილეს უჯრედებიდან ოსმოსური შოკის, ულტრაბგერის და იონური ძალის გამოყენებით ლექტინები აღმოჩენილი იქნა ენდოპლაზმურ რეტიკულუმში და გოლჯის კომპლექსში, სადაც ისინი ასოცირებულია მემბრანასთან, სეკრეტორული ცილების სახით. დეტერგენტის გამოყენებით კი ლექტინი გამოვლენილია მემბრანულ ფრაქციებში (Bowles 1976).

მემბრანული ლექტინების არსებობა გამოვლენილი იქნა მიტოქონდრიებშიც. კერძოდ, დადგენილ იქნა, რომ ლექტინები წარმოადგენენ აბუსალათინის თესლის ენდოსპერმის უჯრედებიდან გამოყოფილი მიტოქონდრიების შიდა მემბრანების კომპონენტებს (Bowles 1976).

მეტად საინტერესო სამუშაო იქნა ჩატარებული ჯეფრისა და თანაავტორების მიერ (Jeffree 1981). ლექტინების განაწილება შეისწავლებოდა ლემას თესლებში, ღეროსა და კალუსში. არაპირდაპირი იმუნოფლუორესცენტული ტექნიკისა და თესლის ლექტინის მიმართ მიღებული მონიშნული ანტისხეულების გამოყენებით ლექტინები გამოვლენილია ყველა ქსოვილის უჯრედებიდან მიღებულ პროტოპლასტებში. კერძოდ,

ისინი ასოცირებული იყო პლაზმალემასთან და უჯრედის ორგანელების მემბრანებთან. ლექტინების არსებობაზე მსჯელობდნენ ფლუორესცენტული ნათების მიხედვით, რომელიც ვლინდებოდა პლაზმალემაში, ბირთვის მემბრანაში, პლასტიდებში, ბირთვის გარშემო და უჯრედის პერიფერიებში. ამავე გამოკვლევებით დადგენილ იქნა ლექტინების განსხვავებული ლოკალიზაცია სხვადასხვა ქსოვილთა უჯრედებში. კერძოდ, ლექტინები დიდი რაოდენობით აღმოჩნდა ეპიდერმისში, ენდოდერმაში, ფლოემაში, ლებნებში, ჩანასახსა და კალუსში, მაშინ, როცა გულგულისა და ქერქის უჯრედებში მათი არსებობა მცირე რაოდენობით ფიქსირდება. ამასთანავე გამოვლენილია, რომ უჯრედის კედელი თავისუფალი იყო ლექტინებისაგან. უჯრედის კედელში ლექტინების არარსებობა ცოტა უფრო ადრე დადგენილი იქნა სხვა ავტორების მიერაც (Bhuvaneswari 1979).

ამრიგად, ლექტინის შემცველობა და ლოკალიზაცია დამოკიდებულია უჯრედის ტიპზე, კერძოდ, როგორც ჩანს, ის უჯრედები, რომლებიც გამოირჩევიან ორგანელების მაღალი შემცველობით, ლექტინების დიდი რაოდენობით შეიცავს. მათ რიცხვს მიეკუთვნება ჩანასახისა და ლებნების უჯრედები, აგრეთვე კამბიუმი და ფლოემის ტრანსლოკაციური ელემენტები.

ამრიგად, ლიტერატურული მონაცემებიდან ჩანს, რომ მემბრანული ლექტინები, ხსნადი ლექტინებისაგან განსხვავებით, წარმოდგენილი არიან მცენარის თითქმის ყველა სახის ქსოვილებში და მათი შემცველობა მემბრანებში მაქსიმალურია ფუნქციურად აქტიურ ქსოვილთა უჯრედებში. ისინი გამოვლენილი არიან როგორც უჯრედის გარეთა მემბრანაში, ასევე ორგანელათა მემბრანებშიც, რაც ბადებს ვარაუდს იმის შესახებ, რომ ლექტინების ეს ჯგუფი წარმოადგენს მცენარეული უჯრედის მემბრანების აუცილებელ კომპონენტს.

1.6. მცენარეებში ლექტინების ფიზიოლოგიური როლის შესახებ

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. ლექტინების ნახშირწყლებთან სპეციფიკური დაკავშირება იმაზე მიგვანიშნებს, რომ

ლექტინები უშუალოდ მონაწილეობენ ბიოლოგიური ამოცნობის ფუნდამენტურ პროცესებში ცოცხალი ორგანიზმების რთული სტრუქტურულ-ფუნქციური ორგანიზაციის სხვადასხვა დონეზე.

ქვემოთ წარმოდგენილი ლიტერატურული მონაცემები გვიჩვენებს, რომ მცენარეული ლექტინების ბიოლოგიური ფუნქციები ვლინდება იმ რეაქციებში, რომელთა რეალიზაციისათვის გადამწყვეტია უჯრდებს შორის ამოცნობის პროცესები. ლექტინების ეს ფუნქცია როგორც ჩანს, განისაზღვრება მოვლენათა მთელი კომპლექსით, რომელთა შორის უმთავრესია ლექტინების ნახშირწყალ-დამკავშირებელი სპეციფიკურობა, ლექტინების აქტივობა გლიკოკონიუგატებთან მიმართებაში, ლექტინებისა და მათი პოტენციური რეცეპტორ-გლიკოკონიუგატების უჯრედული და სუბუჯრედული ლოკალიზაცია, კონკურენტული გლიკოკონიუგატების არსებობა, ლექტინ-რეცეპტორის კომპლექსის წარმოქმნა გარემო პირობებისაგან დამოკიდებულებით.

წარმოდგენილი ლიტერატურული მონაცემებიდან ნათლად ჩანს, რომ ლექტინების ფიზიოლოგიური ფუნქციები მცენარებში სრულად ჯერ კიდევ არ არის შესწავლილი. შედარებით უფრო ნათელია მათი როლი ისეთ ბიოლოგიურ პროცესებში, რომელიც დაკავშირებულია უჯრედის ზედაპირზე მიმდინარე პროცესებთან, კერძოდ სიმბიოზის, განაყოფიერების, მიტოგენური აქტივობისა და სხვა მოვლენებთან დაკავშირებით.

ზემოხსენებულიდან გამომდინარე, მცენარეულ ობიექტებში ლექტინების გამოვლენისა და მათი ფუნქციების შესწავლა კვლავ ერთ-ერთ აქტუალურ პრობლემად რჩება თანამედროვე ბიოლოგიაში.

1.6.1. ლექტინების როლი მცენარეთა ზრდა-განვითარების პროცესებში

ლექტინების მიერ უჯრედთა მიტოგენური სტიმულირების განსაკუთრებული უნარი მცენარეულ სისტემებშიც იქნა გამოვლენილი. ნაჩვენებია, რომ რიგი ლექტინი in vitro იწვევს კალუსის დაყოფას. მაგალითად, PHA მიტოგენურია თამბაქოს კალუსის უჯრედების, ქერისა და ბარდის ფესვის ბუსუსების მიმართ (Borrebaeck 1989). WGA და კონ-A ავლენს მიტოგენურ აქტივობას ხორბლის ფესვის მერისტემული უჯრედების მიმართ (Avalbaev 2003). სოიას ლექტინი ავლენს მიტოგენურ აქტივობას სოიას კალუსის უჯრედების მიმართ, რაც ინჰიბირდება ლექტინის სპეციფიკური მონოსაქარიდით

(Howard 1977). აქედან გამომდინარე, წარმოიშვა საფუძვლიანი ვარაუდი მცენარეული ლექტინების მონაწილეობის შესახებ in vivo უჯრედების დაყოფისა და ზრდის პროცესების რეგულაციაში. მრავალი ლექტინია აღმოჩენილი მცენარეების მუხლთშორისებში და აქტიურად მზარდ ნაწილებში. არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ კონცენტრაციისაგან დამოკიდებულებით ლექტინები ასტიმულირებენ ხახვის ფესვის ზრდას. ფურისულას ბუტკოდან გამოყოფილი ლექტინი ასტიმულირებს მტვრის მარცვლების ზრდას. პარკოსნებისა და მარცვლოვანი მცენარეების თესლების გაღივებისას ლექტინების შემცველობის სწრაფი შემცირება შეიძლება აიხსნას მათი მონაწილეობით უჯრედთა დაყოფის რეგულაციაში, როგორც ჩანასახოვანი უჯრედების მიტოგენური სტიმულატორებისა. ხორბლის, ჭვავისა და ბრინჯის ლექტინების შესწავლის საფუძველზე ნავარაუდევი იყო, რომ თესლის ლექტინები აუცილებელია მცენარეთა ჩანასახოვანი ღერძის ფორმირებისათვის. ნაჩვენებია, რომ სიმინდის მზარდ აღმონაცენში ლექტინური აქტივობის გაძლიერება ემთხვევა უჯრედთა მიტოზურ დაყოფას (Лепёхина 1986).

კრისტალოგრაფიული ანალიზით დადგენილია, რომ გარკვეული ტიპის ლექტინებს, ნახშირწყალ-დამკავშირებელი უბნის პარალელურად, ცილის ზედაპირზე გააჩნიათ ჰიდროფობული უბანი. ჰიდროფობული დაკავშირების უბნების (რომელსაც შეუძლია ადენინის, ციტოკინინის, ინდოლილ-3-ძმარმჟავას დაკავშირება) აღმოჩენის საფუძველზე ნავარაუდევი იქნა ლექტინების შესაძლო მონაწილეობა უჯრედის კედლის გაჭიმვით ზრდის რეგულაციაში, მცენარის ზრდის მარეგულირებელ ჰორმონებთან ურთიერთქმედების გზით (Kauss 1974). ეს აზრი განმტკიცებული იქნა სამუშაოებით, სადაც ნაჩვენები იქნა კონ-A-ს და რიცინის დაკავშირება მცენარეულ აუქსინთან, კერძოდ, ინდოლილ-3-ძმარმჟავასთან და ამ ბმის განხორციელება ლექტინის არანახშირწყალ-დამკავშირებელი უბნით (Edelman1978; Umekawa 1990). 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 (Kauss 1974). ნანახია, რომ კონ-A, WGA, SBA და დოლიხოსის აგლუტინინებით ითრგუნებოდა შვრიის კოლეოპტილეს

სეგმენტების აუქსინ-განპირობებული ელონგაცია (Hoson 1987). ივარაუდეს, რომ ეს ლექტინები უკავშირდება უჯრედის კედლის ნახშირწყლოვან ნაშთებს და ნეიტრალური pH-ის პირობებში თრგუნავს უჯრედის კედლის აუქსინ-გაპირობებულ გაფაშარებას. მუხუდოს (*Cicer arietinum*) თესლებიდან გამოყოფილი ლექტინი იწვევს ეპიკოტილების ელონგაციას (Rocio 2002). ნაჩვენები იქნა, რომ WGA ახდენს ხორბლის ფესვის ელონგაციის ზონაში არსებული უჯრედების გაჭიმვით ზრდის სტიმულირებას (Avalbaev 2003).

ამგვარად, ზემოთ წარმოდგენილი მონაცემები გარკვეულწილად მიუთითებენ ლექტინების მონაწილეობაზე მცენარეული უჯრედის დაყოფისა და ელონგაციის პროცესებში. ის ფაქტი, რომ ლექტინებს გააჩნიათ ინდოლილ 3 ძმარმჟავას (აუქსინის), ადენინისა და 6-ბენზილამინოპურინის, რომლებიც ფიტოჰორმონების ოჯახის წარმომადგენლები არიან, დაკავშირების საიტები, გვაფიქრებინებს, რომ ისინი შესაძლებელია მონაწილეობას ღებულობენ მცენარეთა ჰორმონალურ რეგულაციაში.

1.6.2. ლექტინების როლი მცენარეთა განაყოფიერების პროცესებში

უჯრედების ამოცნობის შესანიშნავ მაგალითს წარმოადგენს განაყოფიერების მოვლენა. ძუძუმწოვრებში განაყოფიერებისათვის აუცილებელ პირობას წარმოადგენს გამეტებს შორის სპეციფიკური ამოცნობის უნარი, რასაც საფუძვლად უდევს ძუძუმწოვრების კვერცხუჯრედის ექსტრაუჯრედული გარსის ოლიგოსაქარიდებსა და სპერმის ნახშირწყალ-დამკავშირებელ ცილებს შორის ურთიერთქმედება (Lis 1993). უმაღლეს მცენარეებში ანალოგიურ მოვლენას წარმოადგენს დამტვერვა, რომელიც ემყარება ყვავილის მტვერსა და ბუტკოს შორის სპეციფიკურ ურთიერთქმედებას. აღმოჩნდა, რომ ლექტინები მონაწილეობენ მტვრის მარცვლის ზედაპირზე არსებული გლიკოპროტეინების ან ცილების ურთიერთქმედებაში დინგის ან სვეტის უჯრედების ზედაპირზე არსებულ კომპლემენტარულ მაკრომოლეკულებთან (Голинская 1979), რაც განპირობებულია დინგსა და მტვრიანას შორის ურთიერთშეთავსებადობის შეცნობით. 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. ნაჩვენებია, რომ ფურისულას (*Primula alconica*) ყვავილების ბუტკოს ჰემაგლუტინინი ხელს უწყობს შესაბამისი მტვრის მარცვლის ზრდას, ის წარმოადგენს გენერაციული შეუთავსებლობის ცილას (Голинская 1976).

თესლოვანთა 30-მდე რიგის ყველა გაანალიზებული მცენარის მტვრის ექსტრაქტებში ასევე გამოვლენილ იქნა ცილოვანი ბუნების მსგავსი ჰემაგლუტინინები. ისინი თავისი ბუნებით განსხვავდებიან ვეგეტატიური ქსოვილების ლექტინებისაგან (Ильченко 1988). ხმალას (*Gladeolus*) ბუტკოს დინგისა და მტვრის მარცვლების ზედაპირზე აღმოჩენილ იქნა ე.წ. β-ლექტინები, რომლებიც სავარაუდოდ ფუნქციონირებენ როგორც არასპეციფიკური ადჰეზინები და სამტვრე მილების განვითარების ხელშემწყობი ფაქტორები (Golynskaya 1976). ნაჩვენებია, რომ კონ-A სპეციფიკურად უკავშირდებოდა ხმალას ყვავილების ბუტკოს ზედაპირულ რეცეპტორებს და ხელს უშლიდა მტვრის შეღწევას ნასკვში. ეს მიუთითებს, რომ მტვრის ზედაპირი შეიცავს ლექტინებს, რომელიც უზრუნველყოფს დამტვერვის წარმატებით განხორციელებას (Rudiger 1984).

1.6.3. ლექტინების როლი მცენარეთა დაცვის პროცესებში

სამეცნიერო ლიტერატურაში არსებობს მრავალრიცხოვანი გამოკვლევები, სადაც დადასტურებულია ლექტინების მონაწილეობა პათოგენებისაგან მცენარეთა დაცვით რეაქციებში (Koo 2002).

მცენარეული ლექტინების დამცველობითი როლის არაპირდაპირ მაჩვენებელს წარმოადგენს მათი 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 1998). ნაჩვენებია ზოგიერთი პარკოსნის თესლის ლექტინის ურთიერთქმედება მურამინის მჟავასთან (Mur, MurNAc), რომელიც შედის ბაქტერიების უჯრედის კედლის შემადგენლობაში (Ayouba 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 ექსპერიმენტების შედეგები, სადაც ნაჩვენებია თესლის ლექტინების სეკრეცია გარემომცველ არეში. თესლის გაღივების პროცესში ლექტინები შიდა უბნებიდან ტრანსპორტირდება გარემოში და ახორციელებს პოტენციური პათოგენებისაგან დაცვას.

მცენარეული ლექტინები შეიძლება მონაწილეობდნენ, პათოგენური მიკროორგანიზმებით მცენარის ინფიცირების შემთხვევაში, 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 1977). გამორიცხული არ არის ჰიდროლაზური აქტივობის მქონე ლექტინების უშუალო მონაწილეობა ოლიგოსაქარინების გამოთავისუფლებაში. ასეთი პოლიფუნქციურობა ლექტინებისათვის დამახასიათებელია (Семенов 1985; Любимова 1985).

ექსპერიმენტებში შესწავლილია ლექტინების დაკავშირება სხვადასხვა სოკოებთან და მათ მიერ სოკოების ზრდის ან გაღივების ინჰიბირების უნარი. ნაჩვენებია, რომ ხორბლის ჩანასახის აგლუტინინი (WGA) აკავებს სოკო *Trichodermaviride*-სa და *Fusarium solani*-ს ზრდას. როგორც გაირკვა, ხორბლის ჩანასახის ლექტინი WGA გროვდება სოკოს მიცელიუმებში, უკავშირდება ქიტინს თრგუნავს მიცელიუმების ზრდას და იცავს მცენარეს ინფექციისაგან (Mirelman 1975; Rajindar 1981).

ასევე მცენარე *Parbitis nil*-ის თესლებიდან გამოყოფილ ლექტინს ახასიათებს ანტიმიკრობული აქტივობა ფიტოპათოგენური სოკოების მიმართ (Koo 2002).

დადასტურებულია, რომ ლექტინები იწვევენ პათოგენური ბაქტერიებისა და სპორების აგლუტინაციას, თრგუნავენ სასიცოცხლო პროცესებს და მათ გაღივებისა და გავრცელების უნარს უკარგავენ (Rudiger 1984). 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 ანტი-ბაქტერიული 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 2001).

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

მსგავსი ტიპის სამუშაოებით დადასტურდა ლექტინების დამცველობითი ფუნქცია ვირუსული დაავადებების მიმართ. კერძოდ, 2 RIP ტიპის ლექტინები, ავლენენ ინჰიბიტორულ აქტივობას მცენარეული ვირუსების მიმართ. ლისისა და შარონის მიერ ნაჩვენებია, რომ ანტივირუსული ცილა, რომელიც გამოყოფილია *Phitolacca americana* და *Dianthus barbatus*-დან იცავდა აღნიშნულ მცენარეებს ალფა მოზაიკური ვირუსით ინფიცირებისაგან. არსებობს აგრეთვე შეხედულება, რომ ზოგიერთი მცენარეული ლექტინები წარმოადგენენ იმ ცხოველური და ადამიანის ვირუსების პოტენციურ in vitro ინჰიბიტორებს, რომლებიც ვირიონებში შეიცავენ გლიკოპროტეინებს. ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, მანოზოსპეციფიური ლექტინი მნიშვნელოვან ფიზიოლოგიურ როლს უნდა თამაშობდეს, ვირულენტური შტამებისაგან

ძუძუმწოვრების ორგანიზმის დაცვის მექანიზმებში. კერძოდ კი - ადამიანის სისხლის შრატის მანოზა-სპეციფიური ლექტინი კომპლემენტის თანაობისას ერთვება E. Coli K12-ისა და E. Coli K13–ის ბაქტერიულ მოქმედებაში. ასევე *Amarilidaceae*–ის ოჯახიდან გამოყოფილია მანოზა-სპეციფიკური ლექტინი, რომელიც მაღალი კონცენტრაციებისას აინჰიბირებს ადამიანის იმუნოდეფიციტის ვირუსის (HIV) შეჭრას ადამიანის ლიმფოციტებში (Balzarini 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. მაგალითად, აღწერილ იქნა გამანადგურებელი მოქმედება ხოჭოს (*Callosobruchus maculatus*) ლარვების მიმართ. 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.

ცნობილია მცენარეული ლექტინების ტოქსიკური ეფექტები უხერხემლოებსა და უმაღლეს ცხოველებზე. ეს გამოწვეულია იმით, რომ მომნელებელი ტრაქტის სანათურების უჯრედები დაფარულია მემბრანული გლიკოპროტეინებით და ძლიერ გლიკოზილირებული მუცინებით, არსებობს უამრავი შესაძლებლობა მცენარეულ ლექტინებთან ურთიერთქმედებისათვის (Peumans 1995). გამოთქმულია ვარაუდი, რომ ლექტინების ტოქსიკურობა ემყარება ლექტინების სპეციფიკურ დაკავშირებას მწერების ნაწლავების გლიკოკონიუგატებთან.

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.

1.6.4. ლექტინების როლი სიმბიოზის პროცესებში

ცნობილია, რომ სიმბიოზი წარმოადგენს მრავალსაფეხუროვან პროცესს, რომელიც მოიცავს მცენარის ფესვებზე ბაქტერიის მიმაგრებას, ინტერნალიზაციასა 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 1973; Brewin 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 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 რიზობიუმის ზედაპირიდან გამოთავისუფლებულ ცალკეულ მოლეკულებს. ნაჩვენები იქნა, რომ ტრანსგენულ Trifolium-ის ფესვებში ლობიოს ლექტინის გენის გადატანის შემდეგ მან დაიკავშირა სწორედ Pisum-სპეციფიკური რიზობიუმის ბაქტერია (Diaz 1995). 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 1984).

1.6.5. ლექტინების როლი ნახშირწყლების ტრანსპორტისა და დაგროვების პროცესებში

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

ლექტინები შესაძლოა მოქმედებდნენ, როგორც "კოლენჰიდრატ-ფიქსატორები" ან "ნახშირწყალ-დამჭერები" და ხელს უწყობდნენ ნახშირწყლების ტრანსპორტსა და მათ იმობილიზაციას თესლებში (Weber 1974; Sabnis 1978). ამ მოსაზრებას ამაგრებს

ზოგიერთი მცენარის ფლოემაში ლექტინების გამოვლენა, თუმცა ჯერ არაა 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 1981).

1.6.6. ლექტინების, როგორც სამარაგო ცილების, ფუნქციები

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 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 vulgaris*-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. 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.

შესწავლილია, რომ თეთრყვავილას, ნარგიზის, ნივრის ბოლქვებში სვენების პერიოდში ლექტინების მაღალი კონცენტრაციაა (საერთო ცილის 10-15%). ფესვების ზრდის დაწყებასთან ერთად იგი იკლებს და მთლიანად ქრება ბოლქვებიდან მცენარის ყვავილობის პერიოდში. ვეგეტაციური პერიოდის ბოლოს ლექტინები კვლავ გროვდება ბოლქვებში (Smeets 1997). ამგვარი მონაცემების საფუძველზე გამოითქვა ვარაუდი, რომ ლექტინები ფუნქციონირებს როგორც სამარაგო ცილები (Van Damme 1990). თესლის ლექტინები შეიძლება მონაწილეობდეს თესლის მომწიფებისას სამარაგო ცილების

“შეფუთვაში”. ეს მოსაზრება შესაბამისობაშია ლექტინების ჭარბ შემცველობასთან განსაკუთრებით სწორედ პარკოსანთა ცილით მდიდარ თესლებში (Rudiger 1984). პარკოსნებისაგან განსხვავებით, მარცვლოვან მცენარეთა თესლებში (ხორბალი, ჭვავი, ქერი) ლექტინები ლოკალიზებულია მხოლოდ ჩანასახში და არ არის ენდოსპერმში. თუმცა, სიმინდის, სორგოს თესლებში ჩანასახის ლექტინთან ერთად გამოვლენილ იქნა ენდოსპერმის ლექტინიც (Lis 1986).

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

1.7. ლექტინების გამოყენების სფეროები

ლექტინების გამოყენების სფეროები მეტად მრავალფეროვანია. მცენარეული და ცხოველური ლექტინები, მათი უნიკალური და მრავალფეროვანი თვისებებიდან გამომდინარე, ფართოდ გამოიყენება ბიოლოგიისა და მედიცინის ისეთ დარგებში როგორებიცაა: ბიოლოგია, ბიოტექნოლოგია, სოფლის მეურნეობა, მედიცინა და სხვა (Rabia 2013., Sze Kwan Lam 2011). კერძოდ, სპეციფიკური მოლეკულური ზონდების სახით ნიშანდებული ლექტინები გამოიყენება უჯრედის ზედაპირული მარკერების იდენტიფიკაციისა და მემბრანების ნახშირწყლოვანი ტოპოგრაფიის შესწავლისათვის (Королёв 1978). ლექტინების მეშვეობით გაფართოვდა ჩვენი ცოდნა ტრანსფორმირებული უჯრედების ტოპოგრაფიის შესახებ. ლექტინებს სულ უფრო ხშირად იყენებენ მიკროორგანიზმების ზედაპირული რეცეპტორული ნახშირწყლების გამოსაკვლევად (Лахтин 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 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 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 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. 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.

1.7.1 ლექტინების ანტისიმსივნური აქტივობა

გამოკვლევები მიუთითებენ, რომ ზოგიერთი მცენარეული საკვები ამცირებს სხვადასხვა ტიპის სიმსიმვნის განვითარების რისკს (Rabia Hamid 2013., Fang .2010., Block

1992). მცენარეები შეიცავენ რიგ ფიტონაერთებს, რომლებიც არსებითად ცვლიან სიმსივნესთან ასოცირებულ ბიოქიმიურ გზებს და ონკოლოგიაში ფართოდ გამოიყენებიან კიბოს სამკურნალო ქიმიოთერაპიულ პრეპარატებად. ანტისიმსივნურ ახალ ბუნებრივ ნაერთთა ჯგუფს განეკუთვნება მცენარეული ლექტინები, რომლებიც ამ მიმართულებით ბოლო პერიოდში ინტენსიურ გამოცდას გადიან. მათზე დიდ იმედებს ამყარებენ, როგორც ბუნერივ უსაფრთხო და მაღალეფექტურ სიმსივნის სამკურნალო პრეპარატებზე (Abdullaev 1997).

ცნობილია, რომ გარკვეული მცენარეული წარმოშობის ლექტინები, უკავშირდებიან კიბოს უჯრედის მემბრანაზე არსებულ შაქრების შემცველ რეცეპტორებს და იწვევენ კიბოს უჯრედების აგლუტინაციას, მათზე ციტოტოქსიკურ მოქმედებას, სიმსივნის ზრდის ინჰიბირებას და/ან კიბოს უჯრედების განადგურებას აპოპტოზის (უჯრედის პროგრამირებული სიკვდილი) გზით. არსებობს განსხვავებული მოქმედების მექანიზმის მქონე ანტისიმსივნური ლექტინებიც. მაგალითად ზოგიერთი ლექტინი (რიცინი) კიბოს უჯრედებთან დაკავშირების შემდგომ აღწევს უჯრედის შიგნით (კლასტერიზაციისა და ინტერნალიზაციის გზით) და ბლოკავს ცილის სინთეზს, რის შედეგადაც კიბოს უჯრედები ნადგურდება.

მცენარეებში გამოვლენილია I და II ტიპის RIP (Ribosome Inactivating Proteins) ცილები, რომელთაგან I ტიპის RIP ცილები ტოქსიკურია მხოლოდ არაუჯრედულ სისტემაში, ვინაიდან ისინი მხოლოდ A ჯაჭვისაგან შედგება (მაგალითად, ჰელონინი - *Gelonium multiflorum*-დან). ტოქსიკურ ლექტინებს კი მიეკუთვნება ე.წ. RIP2 ტიპის ცილების სტრუქტურული ჯგუფი. ისინი 2 სხვადასხვა კლასის ნაერთის ბუნებრივი კონიუგატებია (ლექტინი + ფერმენტი N-გლიკოზიდაზა) და ამდენად, ორმაგი ბიოლოგიური ფუნქციის მატარებელ მოლეკულებს წარმოადგენს. ამ ცილების ტოქსიკურობა ხორციელდება მაღალსპეციფიკური ფერმენტული აქტივობის ხარჯზე: მოლეკულის ერთ-ერთი ჯაჭვი (ე.წ. A ჯაჭვი, ანუ ეფექტომერი, ტოქსიკური ნაწილი) ახდენს ეუკარიოტული (ზოგ შემთხვევაში პროკარიოტულისაც) რიბოსომების ინაქტივაციას რიბოსომული 28S სუბერთეულის რ-რნმ-ის ადენინის ნაშთის დეპურინიზაციით. მოლეკულის მეორე ჯაჭვზე (ე.წ. B ჯაჭვი, ანუ ჰაპტომერი), განლაგებულია ლექტინური საიტი, რომლის საშუალებითაც ხორციელდება სპეციფიკური კავშირი უჯრედის ზედაპირთან და ენდოციტოზის მექანიზმით A

ჯაჭვის ციტოზოლში გადასვლა. ამრიგად, ციტოტოქსიკურობა ლექტინის მთლიანი მოლეკულის თვისებაა. ტოქსიკური ლექტინები ჰომოლოგიურია ამინომჟავების მიხედვით, ცილის მეოთხეული სტრუქტურისა და მოლეკულური მასების თვალსაზრისით. მათი უმრავლესობა ხასიათდება Gal/GalNAc-სპეციფიკურობით, თუმცა, განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან ნატიფი სპეციფიკურობით და სხვადასხვა უჯრედების ზედაპირთან დაკავშირების უნარით (Franz 1983).

ტოქსიკური ლექტინები (რიცინი, აბრინი, დიფტერიის ტოქსინი, მოდესცინი, *Momordica charantia, Croton tiglium*, ბრინჯის ლექტინი, ფითრის ლექტინები) სიმსივნურ უჯრედებთან უშუალო კონტაქტისას ამჟღავნებს ანტიკანცეროგენულ აქტივობას. ყველა უჯრედი, მის ზედაპირზე არსებული D-გალაქტოზის ნაშთებით, მგრძნობიარენი არიან გალაქტოზა-სპეციფიკური ტოქსიკური ლექტინების მიმართ. ნანახია, რომ სიმსივნური უჯრედების გარკვეული ხაზები უფრო მგრძნობიარენი არიან ტოქსიკური ლექტინების მიმართ, ვიდრე ნორმალური უჯრედები. ლექტინები იწვევენ სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციასა და აგრეგეციას (De Mejia 2005). მაგ. არალიადან (*Aralia elata*) გამოყოფილ ლექტინს, ე.წ. არალინს აღმოაჩნდა უნარი, სელექტიურად გამოიწვიოს ადამიანის სიმსივნური უჯრედების აპოპტოზი და სიმსივნური ზრდის შეჩერება, ხოლო ჯანმრთელ უჯრედებთან ის არ რეაგირებს (Tomasu 2004). დადგენილია, რომ სიმსივნურ უჯრედებთან უშუალო კონტაქტისას ანტისიმსივნურ აქტივობას ავლენს რიცინისა და აბრინის ჯგუფის ლექტინებიც, რაც ონკოლოგიაში მათი გამოყენების შესაძლებლობას იძლევა. ნანახია, რომ რიცინს, დაბალი კონცენტრაციების ($5X10^{-11}$ - $5X10^{-13}$ მოლი) დროს, შერჩევითად შეუძლია გამოიწვიოს სიმსივნური უჯრედების განადგურება, მაგრამ შედარებით მაღალი კონცენტრაციებისას იგი ციტოტოქსიკურია როგორც სიმსივნური, ისე ჯანმრთელი უჯრედების მიმართ (Zou 2005). მიუხედავად ამისა ანტისიმსივნური პრეპარატების სახით მათი გამოყენება ჯერჯერობით ვერ ხერხდება ძლიერი ანტიგენური და ტოქსიკური თვისებებისა და ნორმალურ უჯრედებზე არასასურველი ზემოქმედების გამო. ცნობილია, რომ გარკვეული, რიცინ-რეზისტენტული, სიმსივნური უჯრედები მგრძნობიარეა ფითრის ლექტინების მიმართ (Луцик 1981). ეს მიუთითებს ლიგანდ-რეცეპტორულ ურთიერთქმედებაში ისეთი ფაქტორების გათვალისწინების აუცილებლობაზე, როგორიცაა გალაქტოზის ნაშთების სივრცითი განლაგება, უჯრედის მემბრანის თავისებურებები, ჰიდროფობული ურთიერთქმედებანი და სხვა. ფითრის

ლექტინის ანტიკანცეროგენული თვისებები დიდი ხანია ცნობილია. ფითრის VAA-1 ლექტინი ხასიათდება ციტოტოქსიკური მოქმედებით ფილტვის კიბოს უჯრედებისადმი (Siegle 2001). ნანახია, რომ ფითრის ლექტინით მკურნალობა იწვევს GM-CSF-ის, IL-5-ისა და IFN γ-ს წარმოქმნას პერიფერიული სისხლის უჯრედების მიერ როგორც in vitro, ისე in vivo პირობებში (Tabiasco 2002). ამას თან ერთვის ეოზინოფილებისა და გრანულოციტების რაოდენობის გაზრდაც (Huber 2005). VAA-1 იწვევს პროოქსიდანტის, კერძოდ, წყალბადის ზეჟანგის გენერირებას სიმსივნურ უჯრედებში, რაც განაპირობებს მათ აპოპტოზურ დაღუპვას (Kim 2003).

ნაჩვენებია, რომ სხვადასხვა სტადიაზე პირველადი და მეტასტაზური პროსტატის სიმსივნეების უჯრედულ ხაზებთან ხდება სხვადასხვა ნახშირწყალ-სპეციფიკურობის მქონე ლექტინების დაკავშირება (Breborowicz 1998). მაგ. 1013L უჯრედული ხაზები (პირველადი სიმსივნიდან) და DU 145 (CNS მეტასტაზური ხაზებიდან) უკავშირდება კონ-A, ოსპის ლექტინს (LCH), ხორბლის აგლუტინინს (WGA), ჯაკალინს (JFA) და არაქისის ლექტინს (PNA). ასევე ნანახი იქნა, რომ ადენოკარცინომაზე არსებობს PNA, PSA (ბარდის ლექტინი) და JFA-ს რეცეპტორები (Forsgen 1989). ნაჩვენებია, რომ ლობიოს ფიტოჰემაგლუტინინს (PHA) გააჩნია კარცინომა Caco-2-ის დიფეტენცირების უნარი (Overlgone 2000). ანტიკანცეროგენული მოქმედებით ხასიათდება ხორბლის აგლუტინინიც (WGA). აღმოჩენილია რამდენიმე ტიპის სიმსივნის უჯრედული ხაზები (T-24 შარდის ბუშტის კარცინომა, A-375 მელანომა, ACHN თირკმლის კარცინომა, U373MG გლიობლასტომა), რომელთა მიმართაც WGA-ს გააჩნია ანტისიმსივნური მოქმედების უნარი.

1.7.2. ლექტინების იმუნოტროპული აქტივობა

უკანასკნელ წლებში განსაკუთრებული ყურადღება მიიპყრო ლექტინების იმუნოტროპული მოქმედების უნარმა (Ajit 2016). მას საფუძვლად დაედო ლექტინების მიტოგენური აქტივობის გამოვლენა ლიმფოციტების მიმართ. პეტერ ნოუელმა 1960 წელს აღმოაჩინა, რომ წითელი ლობიოდან (*Phaseolus vulgaris*) გამოყოფილი ლექტინი ავლენდა მიტოგენურ თვისებებს, ის ასტიმულირებდა ლიმფოციტებს და იწვევდა მათ მიტოზს (Duk 1982). ამ აღმოჩენამ მოახდინა რევოლიციური გავლენა იმუნოლოგიაზე, ვინაიდან იმ დროის წარმოდგენებით ლიმფოციტები

დიფერენციაციის შემდგომ არ ექვემდებარებოდნენ დაყოფას ანუ პროლიფერაციას. მეორე მიტოგენი ლექტინი გამოყოფილი იქნა *Phytolacca americana*-დან, რასაც მოჰყვა ამ მიმართულებით კვლევების გაძლიერება და მთელი რიგი მიტოგენური აქტივობის მქონე ლექტინების აღმოჩენა (Edelman 1978; Etzler 1983). მოგვიანებით გამოვლენილი იქნა, რომ ლექტინებს ახასიათებთ შერჩევითი მიტოგენური მოქმედება ლიმფოციტების სხვადასხვა ტიპების მიმართ. მაგალითად ნაჩვენები იქნა, რომ jack beans, phytohemagglutinin (PHA) ლექტინი იწვევს, მხოლოდ T-ლიმფოციტების აქტივაციას (Etzler 1984), მაშინ როცა slime mold *Dictyostelium pupureum* ლექტინი იწვევს მხოლოდ B-ლიმფოციტების სტიმულაციას. აღმოჩენილი იქნა ლექტინები, რომლებიც ერთდროულად იწვევდა როგორც T-ლიმფოციტების, ასევე B-ლიმფოციტების სტიმულაციას. მაგალითად ამ ტიპის ლექტინებს მიეკუთვნება ხორბლის ჩანასახის ლექტინი (WGA) (Fett 1980). შემდგომი კვლევების შედეგად დადგენილ იქნა ლექტინების მიტოგენური აქტივობის მოლეკულური მექანიზმებიც. ნაჩვენებია, რომ ლექტინები მაღალი სფეციფიკურობით ამოიცნობენ და უკავშირდებიან ლიმფოციტების ზედაპირზე არსებულ ტერმინალურ შაქრებს. აღნიშული კავშირი და მის შედეგად მემბრანაში ინიცირებული სტრუქტურულ-ფუნქციონალური ძვრები განაპირობებს უჯრედში პროლიფერაციის მაინდუცირებელი სიგნალის გადაცემას, მეორეული მესენჯერების საშუალებით და უჯრედის დაყოფას (Fett 1980;Gonzalez 2005). ამჟამად უკვე ცნობილია მიტოგენური აქტივობის მქონე 30-ზე მეტი მცენარეული ლექტინი, მათ შორისა ლიმური ლობიოს, სოიას (SBA), იაპონური სოფორას, ბარდას (PSA), კანავალიას (ConA), ცერცვის, ოსპის, ცერცველას, ხორბლის (WGA), ჯოჯოს, არჯაკელის, ცრუაკაციის, არაქისის (PNA), აბუსალათინის (RCA-I, RCA-II), პურის ხის (ართოკარპინი-D-მანოზა სპეციფიკური) და სხვა აგლუტინინები (Borrebaeck 1989; Wong 2005). პურის ხიდან (*Artocarpus integrifolia*) გამოყოფილი ორი სხვადასხვა სპეციფიკურობის ლექტინიდან ერთს - ართოკარპინს (Man-სპეციფიკური) აღმოაჩნდა მიტოგენური აქტივობა ადამიანის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტების მიმართ და თაგვის სპლენოციტების მიმართ, მაშინ როდესაც მეორე - ჯაკალინი (JFA-Gal-სპეციფიკური) აინჰიბირებს ართოკარპინით და კონ-A გამოწვეულ ლიმფოციტების პროლიფერაციას. JFA ახდენს ინტერლეიკინ-3-ის სეკრეციის გაძლიერებას, რომლის გავლენითაც ხდება გრანულოციტები-მაკროფაგების

კოლონიების წარმოქმნას, თუმცა გავლენას არ ახდენს ინტერლეიკინ-2-ისა და ინტერლეიკინ-4-ის სეკრეციაზე. იგი უკავშირდება აგრეთვე იმუნოგლობულინ A-ს. მიუხედავად იმისა, რომ ჯაკალინი იკავშირებს ადამიანის პერიფერიული სისხლის ყველა უჯრედს, ის შერჩევითად მხოლოდ CD4-დადებითი T-უჯრედების მიტოგენია. აღმოჩნდა, რომ CD4-ის დაკავშირებით მთლიანად ბლოკავს HIV-1-ის შეჭრას ლიმფოიდურ უჯრედში in vitro (Favero 1993). იმუნომოდულატორული აქტივობით ხასიათდება ფითრის ML-1 ლექტინი, ნაჩვენებია, რომ ის, in vivo და in vitro პირობებში, იწვევს ციტოკინების სეკრეციას (Gabius 1992). ნაჩვენებია, რომ *Cratylia molli*-ს თესლის ლექტინი ამჟღავნებს კონ-A მსგავს მიტოგენურ აქტივობას ადამიანის ლიმფოციტების მიმართ (Maciel 2004). ასევე *Arisaema flavum*-ის და *Sauromatum venosum*-ის ტუბერებიდან გამოყოფილ NAcD-ლაქტოზამინ სპეციფიკურ ლექტინებს ახასიათებთ მიტოგენური აქტივობა ადამიანის ლიმფოციტებიას და BALB/c სპლენოციტების მიმართ (Singh 2004).

ლექტინის მიტოგენური აქტივობის წინასწარმეტყველება მისი სტრუქტურის ან თვისებების მიხედვით შეუძლებელია. ერთადერთი საშუალებაა მისი გავლენის გამოცდა ლიმფოციტების ბლასტტრანსფორმაციაზე.

როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, ლექტინებს ახასიათებთ შერჩევითი მოქმედება ლიმფოციტების მიმართ. კერძოდ, ცნობილია, რომ ლექტინები დიფერენციულად ასტიმულირებენ T და B ლიმფოციტების პროლიფერაციას. ასე მაგ. კონკანავალინი-A (კონ-A) და ფიტოჰემაგლუტინინი (PHA) T-ლიმფოციტების პოლიკლონური აქტივატორებია. ამ მიტოგენების საპასუხოდ პროლიფერაციას განიცდის ჯანმრთელი T-ლიმფოციტების მთელი ერთობლიობა და B უჯრედების მცირე რიცხვი (Branden 1999), ხოლო ჭიაფერადან (*Phytolacca americana*) გამოყოფილი ლექტინებიდან PA-1 წარმოადგენს ორივე T- და B-ლიმფოციტების მიტოგენურ აქტივატორს, მაშინ როდესაც PA-2 და PPL-B მიტოგენურია მხოლოდ T-უჯრედების მიმართ (Wallays 1993).

ლექტინებით სტიმულაციის შემდეგ უჯრედში მიმდინარეობს მთელი რიგი მეტაბოლური ცვლილებები: მემბრანის დეპოლარიზაცია, მემბრანის განვლადობის გაზრდა კალიუმისა და კალციუმის მიმართ, სიგნალის გადაცემის პროცესები, მეტაბოლიტების ტრანსპორტის გაძლიერება უჯრედში (ნახშირწყლები, ამინომჟავები, ნუკლეოტიდები). შიდა უჯრედული პროცესებიდან აღსანიშნავია ც-გმფ-ის

კონცენტრაციის გაზრდა, ფოსფოლიპიდების სინთეზის სტიმულაცია, ჰისტონების აცეტილირება, ბირთვული ფორების ფოსფორილება. მოგვიანებით განხორციელებულ რეაქციებს მიეკუთვნება ცილების სინთეზის გაძლიერება, ასევე რნმ-ის, დნმ-ის სინთეზი და ლიმფოციტების გაყოფა. ც-გმფ-ის კონცენტრაცია საწყის უჯრედში არსებულთან შედარებით 10-50 ჯერ იზრდება, ეს არის მიტოგენური რეაქციების დაწყების სიგნალი, რათა ჩაირთოს ლიმფოციტების აქტივაციის მექანიზმი, შედეგად, 10-15 საათის შემდეგ იწყება რნმ-ისა და ცილების სინთეზი, რომელიც მიტოგენის მოქმედებისას მაქსიმუმს აღწევს 72-96 საათში და უჯრედი შედის მიტოზის ფაზაში.

დაგენილია მიტოგენური ლექტინების ინდუქციური როლი ლიმფოციტების სუბპოპულაციის მიერ ზრდის განმაპირობებელი ფაქტორების გამომუშავებაში. არამიტოგენური ლექტინები ურთიერთქმედებენ ლიმფოციტების სუბპოპულაციასთან და ინდუცირებენ ლიმფოციტების მიერ ციტოტოქსიკური ან ზრდის მაინჰიბირებელი ნივთიერებების - კეილონების გამომუშავებას, რომლებიც ამუხრუჭებენ ლიმფოციტების აქტივაციას. კარტოფილისა და პომიდვრის ლექტინები მოქმედებენ, როგორც ანტი-მიტოგენური აგენტები, უკავშირდებიან რა ლეიკოსიალინს ხდება ლიმფოციტების ადჰეზიის რეგულაცია.

მიტოგენური ლექტინებით გააქტიურებული ლიმფოციტები გამოყოფენ ლიმფოკინებს. ეს ნივთიერებები ხასიათდება მრავალმხრივი ბიოლოგიური მოქმედებით - არეგულირებენ იმუნოლოგიურ რეაქციებს, ასტიმულირებენ ან აკავებენ უჯრედის ზრდას და მაკროფაგების მიგრაციას, ავლენენ ციტოტოქსიკურ მოქმედებას (Ohba 2003). შესაბამისად, სხვადასხვა ლექტინები მოქმედებენ ლიმფოციტების სხვადასხვა სუბპოპულაციაზე და იწვევენ ისეთი ლიმფოკინების წარმოქმნას, რომლებიც განსხვავდებიან ბიოლოგიური მოქმედებით. გამომუშავებული ნივთიერებებიდან მნიშვნელოვანია ინტერლეიკინი-2 და γ-ინტერფერონი. 72-96 საათის შემდეგ ვლინდება გააქტიურებული ლიმფოციტების ისეთი თვისება, როგორიცაა B ლიმფოციტების მიერ იმუნოგლობულინების გამომუშავება და T უჯრედების ციტოტოქსიკურობა. მცენარეული ლექტინები In vitro იწვევენ იმუნოგლობულინების აგრეგაციას და ბაზოფილებისა და სხვა უჯრედების მიერ ჰისტამინის ინდუქციას. რიგ პროლიფერირებად უჯრედში აღმოჩენილ იქნა ჰისტიდინდეკარბოქსილაზა - ერთადერთი ენზიმი, რომელსაც აქვს ჰისტამინის სინთეზის უნარი, რაც მიუთითებს

ჰისტამინის როლზე უჯრედის პროლიფერაციაში. მიტოგენურ ლექტინებს შეუძლიათ იმოქმედონ, როგორც იმუნოსუპრესორულმა აგენტებმა in vitro. ნაჩვენებია, რომ PHA და კონ-A-ს შეუძლიათ შეასუსტონ ჰისტოშეთავსებულობის ბარიერი.

ლექტინები, როგორც კვლევის ინსტრუმენტები, ფართოდ გამოიყენება კლინიკურ იმუნოლოგიაში. კერძოდ, ისინი გამოიყენება ანტიგენ-ანტისხეულის დაკავშირების, ანტიგენის ბუნების და მისი მოქმედების მექანიზმების შესწავლის დროს. იმუნოანალიზისათვის შემუშავებულია სპეციალური ლექტინის იმუნური ტესტი, რომელიც ეფუძნება ლექტინ-ანტისხეულების კონიუგანტების წარმოქმნის თვისებას. ერთ-ერთი ლექტინი, რომელიც მარკერად გამოიყენება, არის ლობიოს ლექტინი – PHA. ლექტინების ისეთი კომერციული პრეპარატები როგორიცაა რიცინი და აბრინი გამოიყენება ანტისხეულების წარმოქმნის პროცესების შესასწავლად. მაკროფაგების ზედაპირზე არსებული მანოზა-სპეციფიკური ლექტინი იკავშირებს ანტიგენ-ანტისხეულის კომპლექსს და ასეთი სახით ხელს უწყობს მაკროფაგების მიერ მათ განადგურებას (Kovatchev 1989).

ლექტინების გარდა მიტოგენური უნარი გააჩნიათ ანტიგენებს, აგრეთვე ბაქტერიულ ენდო- და ეგზოტოქსინებს. მაგრამ ლექტინის მიერ გამოწვეული მიტოგენური აქტივობა არის პოლიკლონური და მაღალი აქტივობის (70-80%-მდე), შედეგად მთელი იმუნური სისტემა მოდის მოქმედებაში. ნაჩვენებია აგრეთვე, რომ რიგი მცენარეული ლექტინი იწვევს კალუსის გაყოფას in vitro. მაგალითად, სოიას ლექტინი ავლენს მიტოგენურ აქტივობას სოიას კალუსის უჯრედების მიმართ, რაც კავდება ლექტინის სპეციფიკური მონოსაქარიდით (Howard 1977). PHA მიტოგენურია თამბაქოს კალუსის, ქერისა და ბარდის ფესვის ბუსუსების მიმართ (Borrebaeck 1989). კვლევები ამ მიმართულებით გრძელდება.

თავი 2. ექსპერიმენტული ნაწილი

კვლევის ობიექტი და მეთოდები

2.1. კვლევის ობიექტი

სადისერტაციო ნაშრომში კვლევის ობიექტად შერჩეული იქნა ხალხურ მედიცინაში ფართოდ გამოყენებული საქართველოს ენდემური სამკურნალო მცენარე, მთის სვინტრი (***Polygonatum obtusifolium Miscz***) (Gagnidze 2005). უძველესი დროიდან ცნობილია სახელწოდებით - ''სოლომონის ბეჭედი''.

სურ. 2. მთის სვინტრი (*Polygonatum obtusifolium Miscz*). მცენარის მიწისზედა და მიწისქვედა ნაწილები.

საქართველოს ტყეებში ბუჩქნარებსა და მდელოებზე გვხვდება სვინტრის 5 სახეობა, მათგან ერთი *(Polygonatum glaberrimum)* კავკასიის ენდემია, ერთი *(Polygonatum obtusifolium)* — საქართველოსი.

ცნობილია, რომ **სვინტრი (Polygonatum)** მრავალწლოვანი ბალახოვანი მცენარეა შროშანსებრთა (**Convallariaceae)** ოჯახიდან (Gagnidze 2005). ამ სახეობის მცენარეები ფართოდ გამოიყენება ადამიანის მრავალი დაავადებების პრევნციისა და მკურნალობის მიზნით. მაგალითად, სვინტრის ფესურის ნაყენს ფართოდ იყენებენ ფილტვების, ზედა სასუნთქი გზების, მწვავე ბრონქიტის, ღვიძლის, ვირუსული დაავადებების, ტუბერკულოზის, კუჭის წყლულის, ართრიტების, რადიკულიტის, იშიაზის, შაქრიანი დიაბეტის, გინეკოლოგიური დაავადებების, იმპოტენციის, ჭრილობების, აბსცესების,

დერმატიტების და სხვა დაავადებების სამკურნალოდ. ცნობილია, რომ სვინტრი გამოიყენება სიმსივნეების მკურნალობისა და პროფილაქტიკისათვის, დაქვეითებული იმუნიტეტის აღდგენისათვის, ეს უკანასკნელი კი განაპირობებს ორგანიზმის გაახალგაზრდავებას და მის ქმედითუნარიანობის ამაღლებას სიბერისას. სამეცნიერო ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ აღნიშნული მცენარეებიდან მრავალფეროვანი ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთებია გამოყოფილი (Sandeep 2013). მათ შორის არიან ლიგნინები, ფლავონოიდები, კუმარინები, ფენოლები, ცხიმოვანი მჟავეები, სტეროიდები, ტრიტერპენები, ტანინები და ალკალოიდები. მიუხედავად ამისა დღეისათვის ის აქტიური სუბსტანციები, რომლებიც განაპირობებენ ზემოთ აღნიშნულ სამკურნალო ეფექტებს ფაქტიურად შეუსწავლელია და ტრადიციულ კლინიკურ მედიცინაში ჯერ კიდევ დაუნერგავი რჩება. ამასთან ერთად, გარდა რამოდენიმე სამეცნიერო პუბლიკაციისა, სადაც ნაჩვენებია სვინტრის შაქრის დამკავშირებელი ცილების-ლექტინების ანტივირუსული და ანტიკანცეროგენული აქტივობა ქსოვილთა კულტურებში in vitro, მცირე რამ არის ცნობილი სვინტრის ისეთ სასიცოცხლო მნიშვნელობის ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთებზე, როგორიცაა ცილები და განსაკუთრებით სვინტრის ლექტინები.

ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, კვლევის ობიექტად შერჩეული იქნა საქართველოს ენდემური მცენარე მთის სვინტრი. ექსპერიმენტებში გამოყენებული იქნა სვინტრის როგორც მიწისზედა ნაწილები (ღერო, ფოთოლი, ყვავილი და თესლი), ასევე მიწისქვედა ნაწილები (ფესვი, ფესურა და დამატებითი კვირტი).

2.2. ლექტინების გამოყოფის მეთოდი

სვინტრის ფესურებს ვაქუცმაცებდით და ვახდენდით ჰომოგენიზაციას ბლენდერის ტიპის ჰომოგენიზატორით. ხსნადი ცილოვანი ფრაქციის მისაღებად ექსტრაქციას ვახდენდით სხვადასხვა შედგენილობის საექსტრაქციო ხსარებით: 1) 0,9% NaCl, 0,04M K^+-ფოსფატის ბუფერი, pH 7,4; 2) 0,9% NaCl, 0,04M K^+-ფოსფატის ბუფერი, pH 7,4, 0,1% β-მერკაპტოეთანოლი (β-M); 3) 0,9% NaCl, 0,04M K^+-ფოსფატის ბუფერი, pH 7,4, 1% პოლივინილპიროლიდონი(PVP); 4) 0,9% NaCl, 0,04M K^+-ფოსფატის ბუფერი, pH 7,4, 0.5 mM ფენილმეთილსულფანილფტორიდი (PMSF). ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობების შერჩევის მიზნით, ვითვალისწინებდით ნედლეულისა და საექსტრაქციო

ხსნარის ფარდობას (w/v = 1/5; 1/10; 1/20), pH-ს (5.0, 6.0, 7.0, 7.4, 8.0, 9.0) და დროს (15, 30, 45, 60 წთ.). ჰომოგენატს ვათავსედით მაგნიტურ სარეველაზე საექსტრაქციო დროის გათვალისწინებით, ჰომოგენატს ვფილტრავდით ორმაგ დოლბანდში და ფილტრატს ვაცენტრიფუგირებდით 15 000 ბრ/წთ 15 წთ-ის განმავლობაში. ცილის ნაწილობრივი გასუფთავებისა და ფრაქციონირების მიზნით შემდეგ ეტაპზე ვახდენდით სუპერნატანტის ამონიუმის სულფატით $(NH_4)_2SO_4$ ცილების გამომარილებას 0-20, 0-40, 0-60, 0-80% გაჯერების პირობებში (Скоупс 1985). გამომარილებულ სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 20 000 ბრ/წთ 20 წთ (“Beckman“ SW-27 როტორი), +4^{0}C ტემპერატურის პირობებში. ნალექს ვხსნიდით მინიმალური მოცულობის საექსტრაქციო ხსნარში, ვაჰომოგენიზირებდით შუშის ბურთულიან ჰომოგენიზატორში და კვლავ ვაცენტრიფუგირებდით 8 000 ბრ/წთ 15 წთ-ით (ცენტრიფუგა ТУ5.375-4172-78, როტორი РУ180). სუპერნატანტს ვფილტრავდით Whatman CG/C და sinpor-0,45-0,22μM ფილტრში, ჭარბი არაორგანული იონების მოცილებას ვახდენდით დიალიზით G-10 სეფადექსის სვეტზე (50 x 2,7 სმ) ან amicon-ის ტიპის კონცენტრატორში (mod. 52, Millipore 10 000 NMWL მემბრანა) ულტრაფილტრაციით. ექსტრაქტებს ვინახავდით მაცივარში +4^{0}C ტემპერატურის პირობებში.

2.3. სვინტრის სხვადასხვა ნაწილებში ლექტინების რაოდენობრივი განაწილება ფიზიოლოგიური მდგომარეობის მიხედვით

შესწავლილი იქნა სვინტრის მიწის ზედა (ღერო, ფოთოლი, ყვავილი, თესლი) და მიწისქვეშა (ფესვი, ფესურა, დამატებითი კვირტი) ნაწილებში ლექტინების რაოდენობრივი განაწილება. მცენარე სვინტრს ვიღებდით შემოდგომაზე, როდესაც მცენარე გადადის მოსვენების სტადიაში და გაზაფხულზე, მცენარის აქტიური ზრდა-განვითარების დროს. სვინტრის მიწისქვეშა და მიწისზედა ცალკეულ ნაწილებს ვაქუცმაცებდით და ვახდენდით მათ ჰომოგენიზაციას ბლენდერის ტიპის ჰომოგენიზატორით ან ფაიფურის ჯამზე. ხსნადი ცილოვანი ფრაქციის მისაღებად ექსტრაქციას ვახდენდით ზემოთ აღწერილი მეთოდის მიხედვით.

2.4. ლექტინის ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით

ექსტრაგირებული ლექტინების ნაწილობრივი გასუფთავებისა და კონცენტრირების მიზნით ვახდენდით ამონიუმის სულფატით გამომარილებას 0-90 %-ით გაჯერებით. ნალექს ვხსნიდით მინიმალური მოცულობის ბუფერში. ამისათვის ვსაზღვრავდით ექსტრაქტის მოცულობას და ვითვლიდით მარილის იმ რაოდენობას, რომელიც საჭირო იყო მოცემულ ექსტრაქტში საერთო ცილის დალექვისათვის (60გ/100მლ) (Скоупс 1985). განსაზღვრული რაოდენობის ამონიუმის სულფატს ვუმატებდით ექსტრაქტს და ვურევდით 30 წთ განმავლობაში. ექსტრაგირებულ ცილებს ვინახავდით -10°C-ის პირობებში.

ცილების საფეხურებრივი ფრაქციონირების მიზნით, დალექვის თითოეულ ეტაპზე ცილის ხსნარს ვუმატებდით მარილის საჭირო რაოდენობას თანდათანობით, მუდმივი მორევის პირობებში. მარილის გახსნის შემდეგ მორევას ვაგრძელებდით 20 წთ განმავლობაში. ცილის სუსპენზიას 1 საათით ვაყოვნებდით მაცივარში -10°C-ზე, შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით 20 000 g-ზე 20 წთ +4^{0}C-ზე, ვიღებდით სუპერნატანტს, ვზომავდით მის მოცულობას და ვითვლიდით მარილის რაოდენობას, რომელიც საჭირო იყო ფრაქციონირების შემდგომი ეტაპისათვის. ნალექს ვხსნიდით მინიმალური მოცულობის იმავე ბუფერში და ვსაზღვრავდით ლექტინურ აქტივობას. ჭარბი არაორგანული იონების მოცილებას ვახდენდით დიალიზით G-10 სეფადექსის გელ-ფილტრაციულ სვეტზე (50x2,7 სმ) ან ულტრაფილტრაციით.

2.5. ლექტინური აქტივობის განსაზღვრის მეთოდები

ლექტინურ აქტივობას ვსაზღვრავდით იმუნოლოგიურ პლანშეტზე, ვიზუალურად, ჰემაგლუტინაციური ტესტით ბოცვრის ტრიფსინიზებულ ერითროციტებზე, ტაკაჩის მიკროტიტრაციის მეთოდით (Liener 1976; Takatsy 1967). ლექტინურ აქტივობას ვაფასებდით ცილის იმ მინიმალური კონცენტრაციის (მგ/მლ) მიხედვით, რომელიც იწვევდა ბოცვრის ტრიფსინიზირებული 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: $SHA=T^{-1}C^{-1}$ 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 მგ/მლ ერთეულებში). **ლექტინების შემცველობაზე** ვმსჯელობდით საერთო ცილის რაოდენობის შეფარდებით ლექტინურ აქტივობასთან (პირობითი აგლუტინაციური ერთეული - HU (Hemagglutination Units).

2.6. 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 ტრიფსინიზირებული ერითროციტების სუსპემზია. საანალიზო კიუვეტაში ვუმატებდით ლექტინურ აქტივობაზე საცდელი ცილების ფრაქციას, ხოლო საკონტროლოში იმავე მოცულობის ფიზიოლოგიურ ხსნარს. საკონტროლო კიუვეტაში სინათლის გამტარობას 670 ნმ ტალღის სიგრძეზე მივიჩნევდით 100%-ად, ხოლო საანალიზოში ამ მაჩვენებლის ცვლილებას დროში ვაფიქსირებდით ფოტოკოლორიმეტრზე მიერთებული თვითმწერის საშუალებით.

2.7. ბოცვერის ტრიფსინიზირებული ერითროციტების მომზადება

ბოცვერის სისხლი სწრაფად გადაგვქონდა Na-ციტრატის შემცველ ფიზიოლოგიურ ხსნარში (38% 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 ტრიფსინს. რაოდენობით სხნარის ყოველ 1 მლ-ზე. ამის შემდეგ ერითროციტების სუსპენზიას ვათავსებდით საინკუბაციოდ თერმოსტატში 1 საათის განმავლობაში $+37^0C$ ტემპერატურის პირობებში. ინკუბაციის შემდეგ ერითროციტებს სამჯერ ვრეცხავდით ცენტრიფუგირების გზით, სამედიცინო ცენტრიფუგაზე, 100 g-ზე 10 წთ-ის განმავლობაში. ისევ ვსაზღვრავდით ჰემატოკრიტს და ფიზიოლოგიური ხსნარზე

ვამზადებდით ერითროციტების 2% სუსპენზიას, რომელსაც ვიყენებდით ჰემაგლუტინაციური აქტივობის განსაზღვრის მიზნით.

2.8. სვინტრის ლექტინის გამოყოფა და გასუფთავება

ლექტინების ექსტრაქციის მიზნით სვინტრის ფესურებს ვაქუცმაცებდით და ვაჰომოგენიზირებდით ბლენდერის ტიპის ჰომოგენიზატორში. ხსნადი ცილოვანი ფრაქციის მისაღებად ექსტრაქციას ვახდენდით შემდეგი შემადგენლობის საექსტრაქციო ხსნარით: 0,9% NaCl, 0,1% β-მერკაპტოეთანოლი (β-M), 0,04M K^+-ფოსფატის ბუფერი, pH 7,4; ექსტრაქციას ვახდენდით ნედლეულისა და საექსტრაქციო ხსნარის ფარდობა (w/v = 1/5). ხსნადი ცილების მაქსიმალური ექსტრაქციის მიზნით ჰომოგენატს ვდგამდით მაგნიტურ სარეველაზე 30 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე. ექსტრაქტს ვფილტრავდით ორმაგ დოლბანდში და ფილტრატს ვაცენტრიფუგირებდით 15 000 ბრ/წთ 15 წთ-ის განმავლობაში. სუპერნატანტს ვფილტრავდით Whatman CG/C და sinpor-0,45-0,22μM ფილტრში. ლექტინის ნაწილობრივ გასუფთავებისა და ფრაქციონირების მიზნით ვახდენდით ცილების გამოლექვას ამონიუმის სულფატით $(NH_4)_2SO_4$ 0-70% გაჯერების პირობებში. გამომარილებული ცილების სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 8 000 ბრ/წთ 5 წუთის განმავლობაში. სუპერნატანტს ვაცილებდით დეკანტაციით და ცილების ნალექს ვხსნიდით მინიმალური მოცულობის PBS-ის ხსნარში. ცილის ხსნარს ვადისპერგირებდით შუშის ჰომოგენიზატორში და ვაცენტრიფუგირებით 8 000 ბრ/10 წუთის განმავლობაში. სუპერნატანტს ვაგროვებით დეკანტაციით და ამონიუმის სულფატის მარილის მოსაცილებლად ვადიალიზებდით ქრომატოგრაფიულად G-10 -ის სვეტზე (1.6 X 40 სმ). დიალიზირებულ ცილოვან ფრაქციას ვათავსებდით 15 წუთის განმავლობაში 60^0 C-ზე რაც საშუალებას იძლეოდა მოგვეცილებინა თერმოლაბილური ცილები. შემღვრეული ცილების ხსნარს ვათავსებდით ყინულოვან აბაზანაში 30 წუთის განმავლობაში და ვაცენტრიფუგირებდით 18 000 ბრ/წთ 10 წუთის განმავლობაში. ნალექს ვაცილებდით და სუპერნატანტიდან ცილებს ვლექავდით 5 მოცულობა ცივი აცეტონით. ნარევს ვაცენტრიფუგირებდით 3 000 ბრ-ზე 15 წუთი და ვხნიდით მინიმალური მოცულობის PBS-ის ხსნარში. აცეტონის მიმართ ლაბილურ ცილებს ვაცილებდით

ცენტრიფუგირებით 3 000 ბრ/წთ 15 წუთით, სუპერნატანტიდან ვახდენდით ლექტინის შემდგომ გასუფთავებას.

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

ლექტინური აქტივობის მქონე ცილოვანი ფრაქციის გასუფთავებას ვახდენდით Toyopearl HW-55 - ის სვეტზე (3.57 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 280 nm ტალღაზე. სვეტიდან ელუირებულ ცილოვან ფრაქციებს ვამოწმებდით ლექტინურ აქტივობაზე. აფინური ქრომატოგრაფია - გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებულ ტრიფსინიზირებული ერითროციტებით სვეტზე. ლექტინური აქტივობის მქონე ცილოვანი ფრაქციიდან ლექტინის შემდგომ გასუფთავებას ვახდენდით აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდით გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებული ტრიფსინიზირებული ერითროციტების სვეტზე (1.6x20 სმ) HPLC-ით (LKB). ელუციის სიჩქარე შეადგენდა 0.5 მლ/წთ. დეტექტირებას ვახდენით 220 nm სიგრძის ტალღაზე. ფიზიოლოგიური ხსნარით გაწონასწორებული აფინური სვეტის სორბენტზე იმობილიზებული ლექტინის ელუციას ვახდენთ მჟავე pH-ის მქონე ხსნარით (40 mM გლიცინ-HCL, pH 3.5) - A-ხსნარი, ხოლო საკონტროლო ცდებში ლექტინის სპეციფიკური შაქრის, 50 mM D-mannose შემცველი ფიზიოლოგიური ხსნარით (PBS, pH 7.4) - B-ხსნარი. A-ხსნარით ელუირებულ ცილოვან ფრაქციას ვადიალიზებდით PBS-ის მიმართ, ხოლო B-ხსანრით ელუირებულ ცილოვან ფრაქციას - მჟავე pH-ის მქონე ხსნარით. A-ხსნარის მიმართ სადიალიზო პარკებში 24 საათის განმავლობაში $+4^0$ C-ზე. თავისუფალ ლექტინთან დაკავშირებული α-methyl-mannopyranoside მოლეკულების მოსაცილებლად. დიალიზატიდან ლექტინებს ვლექავდით ამონიუმის სულფატით გამომარილების მეთოდით (0-70%). გამომარილებული ცილების ნალექს ვხნიდით მინიმალური მოცულობის PBS -ის ხსნარში და ვაცენტიფუგირებდით 8 000 ბრ/წთ 10 წთ. ლექტინური აქტივობის მქონე სუპერნატანტს ვადიალიზებდით და ვიყენებდით შემდგომ ცდებში.

2.10. ლექტინის გასუფთავება პრეპარატული ელექტროფორეზით ნატიურ პირობებში

1. პრეპარატულ ელექტროფორეზს ვატარებდით პოლიაკრილამიდის კონცენრტაციის 3-25 % გრადიენტულ გელში (4 მმ სისქის) დევისის სისტემის გამოყენებით (Davis 1962). ელექტროფორეზის შემდეგ გელს რამოდენიმე წამით ვათავსებდით დისტილირებულ წყალში და ამის შემდეგ ვღებავდით 0.3 M $CuCl_2$-ის ხსნარით 5 წუთის განმავლობაში. გელში გამოვლენილ ცილოვან ზოლებს ვჭრიდით და ელუციას ვახდენდით 0.25 MEDTA / 0.25 M Tris-HCl-ის ხსნარით (Lee 1987).

2. ცილების ელუცია ელექტროფორეზის გამოყენებით. ელექტროფორეზს ვატარებდით მინის მილაკებში (1 X 1.5 სმ) 7.5%-იანი პოლიაკრილამიდის გელში SDS-ის გარეშე. დენის ძალა შეადგენდა 5 mM-ს თითოეულ მილაკზე, ხოლო ელექტროფორეზის ხანგრძლივობა - 2.5 საათს. ელექტროფორეზის დამთავრების შემდეგ ერთ-ერთ გელს ვღებავთ 0.125%-იანი კუმასი G-250 საღებავით. გელში ცილოვანი ზონების გამოვლენის შემდეგ დანარჩენი გელებიდან ვჭრიდით შესაბამის ცილოვან ზონებს. ელუციას და კონცენტრირებას ვახდენდით ერთდროულად ელექტროფორეზის მილაკებში (1.5 X 10 სმ). უკანასკნელში ვასხამდით 30%-იან პოლიაკრილამიდის გელს (სისქე 0.4 სმ) და პოლიმერიზაციის შემდეგ ვუმატებდით 500 მკლ 15%-იანი გლიცერინის ხსნარს. გლიცერინის ხსნარზე ვაფენდით 5%-იანი პოლიაკრილამიდის გელს (სისქე 0.4 სმ). რომელზეც ვათავსებდით გელიდან ამოჭრილ ცილოვან ზონებს, ვასხამდით ელექტროდის ბუფერს, რომელიც შეიცავდა 0.001 %-იან ბრომფენოლ ლურჯი ხსნარს და ვატარებდით ელექტროფორეზს მანამ, სანამ საღებავი არ გადავიდოდა პოლიაკრილამიდის 30 %-იან გელში. ელექტროფორეზის დამთავრების შემდეგ, სამედიცინო შპრიცით, ფრთხილად ვხვრეტდით 30 %-იანი პოლიაკრილამიდის გელის და ვაგროვებდით ცილოვან ფრაქციებს.

2.11. ცილების ანალიზური ელექტროფორეზი ნატიურ პირობებში

ცილების ელექტროფორეზს ნატიურ პირობრბში ვატარებდით მილებში (5 მმ X 10 მმ), 1 % პოლიაკრილამიდის გელში Davis-ის სისტემის მიხედვით (Davis 1962). ელექტროფორეზის ხანგრძლივობა იყო 2.5 საათი გელის თითოეულ მილიმეტრზე 2-3 mA დენის ძალის ზემოქმედებით. მარკერებად ვიყენებდით ცნობილი მოლეკულური

მასის მქონე შემდეგ სტანდარტულ ცილებს (kDa): თირეოგლობულინი (330), ფერიტინი (220), ალბუმინი (67), კატალაზა (60), ლაქტატ-დეჰიდროგენაზა (36). ფერიტინი (18.5). გელებს ვღებავდით 0.2% Cumassie Blue G-250 საღებავით (Blakesley 1977).

2.12. ცილების ანალიზური ელექტროფორეზი დისოცირებულ პირობებში

ცილების ელექტროფორეზს დისოცირებულ პირობებში ვატარებდით Laemmli-ის სისტემის გამოყენებით (Laemmli 1970) 1.2 მმ სისქის, პოლიაკრილამიდის კონცენტრაციის 10-25% გრადიენტის გელში 0.1% SDS-ის თანაობისას. ელექტროფორეზი მიმდინარეობდა Hoefer scientific instruments SE-200 ტიპის ხელსაწყოში 3.5 საათის განმავლობაში გელის თითოეულ მილილიტრზე 2 mA დენის ძალის თანაობისას. ელექტროფორეზის მარკერებად ვიყენებდით დაბალმოლეკულურ სტანდარტულ ცილებს (kDa): ფოსფორილაზა (96), ალუმინი (67), ოვალბუმინი (43), კარბოანჰიდრაზა (30), ტრიპსინის ინჰიბიტორი (21.1), ლაქტალბუმინი (14.4). გელი იღებებოდა 0.2% Cumassie G-250 საღებავით (Boezi 1977).

2.13. 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: N-აცეტილ-D-გლუკოზამინი, N-აცეტილ-D-გლაქტოზამინი, D-მანოპირანოზიდი, D-გალასტურონის მჟავა, L-ფუკოზა, D-მანოზა, D-გლუკოზამინი, D-გალაქტოზა, D-გლუკოზო-6-ფოდფატი, მელიბიოზა, ლაქტოზა, D-ცელობიოზა, D-გალაქტოზამინი, L-რიბოზა, საქაროზა, D-გლუკოზა, 2-დეზოქსი-D-გლუკოზა. 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 კონცენტრაცია 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).

2.14. 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.

2.15. ლექტინების ჰემაგლუტინაციური აქტივობის დამოკიდებულების შესწავლა წყალბად-იონების კინცენტრაციაზე

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 pH5.0 - pH9.5 დიაპაზონის PBS ბუფერში 0.5 ერთეულით ზრდის მიხედვით. აგლუტინაციისათვის ვიყენებთ შესაბამისი pH-ის მქონე PBS ბუფერულ ხსნარებს.

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.

2.17. 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 1 500 g-ზე 15 წუთი. სუპერნატანტებში ვსაზღვრავდით ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას.

2.18. გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებული ერითროციტების ქრომატოგრაფიული სვეტის მომზადება

ბორცვის ერითროციტების ტრიფსინიზაციას ვახდენდით ზემოთ აღწერილი მეთოდი.

ვამზადებდით ტრიფსინიზირებული ერითროციტების 2%-იან სუსპენზიას გლუტარალდეჰიდის 2.5%-იან, ან 5%-იან ხსნარზე. ხსნარი მზადდება სააგლუტინაციო ბუფერზე (pH 7.4) და ვაყოვნებდით +4^{0}C-ზე სანჯღრეველაზე 17 სთ-ის განმავლობაში. ნალექს ვრეცხავდით 4-ჯერ დიდ მოცულობა სააგლუტინაციო ბუფერში და ვახდნდით ცენტრიფუგირებას (700 g, 10 წთ). ვადგენდით ჰემატოკრიტს და ვამზადებდით ერითროციტების 25-იან სუსპენზიას სააგლუტინაციო ბუფერზე მიმზადებული 1 M გლიცინის ხსნარზე (pH 7.4). ვაყოვნებდით +4^{0}C-ზე სანჯღრეველაზე 17 სთ-ის განმავლობაში. ნალექს ვრეცხავდით 4-ჯერ დიდ მოცულობა სააგლუტინაციო ბუფერში ცენტრიფუგირებით (700 g, 10 წთ). ჰემატოკრიტის განსაზღვრის შემდეგ ნალექს ვურევდით ბიოგელ P-150-ში შეფარდებით 1:10 დავამზადებდით გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებული ერითროციტების აფინურ სვეტზე ზომით 75x20 მმ.

სვეტს კარგად ვრეცხავდით ჯერ სააგლუტინაციო ბუფერით, შემდეგ 0.2 M გლიცინ-HCl-ის ბუფერით (pH 3.0). გამოყენების წინ სვეტს ვაწონასწორებდით სააგლუტინაციო ბუფერით.

2.19. აფინური ქრომატოგრაფია გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებული ერითროციტების სვეტზე

აფინურ ქრომატოგრაფიას, გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებული ერითროციტების სვეტზე, ვატარებდით შემდეგ პირობებში: სააგლუტინაციო ბუფერით გაწონასწორებულ სვეტზე დაგვქონდა საკვლევი ცილა სვეტის საკუთარი სიჩქარით. დაუკავშირებელი ცილის ელუციას ვასხენდით სააგლუტინაციო ბუფერით, ხოლო სპეციფიკურად დაკავშირებული ცილისას - 0.05 M გლიცინ-HCl-ის ბუფერით (pH 3.0). 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.

2.20. 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 280 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; Остерман 1985).

კალიბრირების მიზნით გამოვიყენეთ შემდეგი სტანდარტული ცილები (kDa): დექსტრანი (2,000), ალბუმინი (66), კარბონიკ ანჰიდრაზა (29), ციტოქრომი (12,4).

2.21. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა

ცილის რაოდენობას ვსაზღვრავდით ლოურის მეთოდით (Lowry O.H. et. al., 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.

2.22. პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების პროლიფერაციის შესწავლა ტეტრაზოლიუმზე დაფუძნებული კოლორიმეტრული (MTT) ტესტით

პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების გამოყოფას ვახდენდით სიმკვრივის გრადიენტში. ამ მიზნით წინამხრის ვენიდან ვიღებდით 10 მლ სისხლს და ვაზავებდით ჰენქსის ხსნარით (Gibco) 1:1 შეფარდებით, შემდეგ 10 მლ ნარევს ვაშრევებდით 3 მლ ფიკოლ-ჰიპაკის (Sigma) 1.077 გრ/ლ სიმკვრივის გრადიენტზე, ვაცენტრიფუგირებდით 40 წთ 800 g-ზე +4^0 C-ზე. ვიღებდით ინტერფაზიდან მონონუკლეარულ უჯრედებს, ორჯერ ვრეცხავდით ჰენქსის ხსნარით, ვაცენტრიფუგირებდით 400 g-ზე 15 და 10 წთ-ის განმავლობაში. უჯრედებს ვასუსპენდირებდით 1 მლ RPMI-1640-ში (Sigma) და ვსაზღვრავდით მათ რაოდენობას 1 მლ-ში ჰემოციტომეტრის საშუალებით N=A×10000, სადაც A არის უჯრედების რიცხვი ჰემოციტომეტრის 16 ფანჯარაში.

გამოყოფილი პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების კონცენტრაცია მიგვყავდა 2×10^6 უჯრედი/მლ-მდე არე RPMI-1640-ში, რომელიც შეიცავდა 10% ინაქტივირებულ ხბოს ემბრიონულ შრატს (FCS)(Sigma) და 1% პენიცილინ/სტრეპტომიცინის (P/S) ნარევს. ბრტყელძირიან 96-ფოსოიან მიკროპლანშეტში შეგვქონდა დუბლიკატებად გამოსაკვლევი სუსპენზიის 100 მკლ, 20 მკლ მიტოგენი. საკონტროლო ფოსოებში მიტოგენს არ ვუმატებდით. გარდა ამისა, საკონტროლო ფოსოებში ვუმატებდით 100 მკლ, ხოლო დანარჩენებში 80 მკლ RPMI-1640 არეს. ამრიგად, ფოსოში არეს საბოლოო მოცულობა მიგვყავდა 200 მკლ-მდე. მიტოგენებად ვიყენებდით კონკანავალინ A-ს (კონ-A) და ჭიაფერას (Phytolacca americana) მიტოგენს (pa-1) შემდეგი კონცენრტაციებით: 1 მკგ/მლ, 10 მკგ/მლ, 100 მკგ/მლ. მიკროპლანშეტს ვაინკუბირებდით 72 სთ-ის განმავლობაში 37^{0}C-ზე 5%-იანი CO_2-ის ატმოსფეროში. საინკუბაციო პერიოდის შემდეგ მიკროპლანშეტის თითოეულ ფოსოში ვამატებდით 20 მკლ 3-(4,5-დიმეთილთიაზოლ-2-ილ)-2,5-დიფენილტეტრაზოლიუმ ბრომიდის (MTT) (Sigma) ხსნარს (5 მგ/მლ PBS-ში) და მიკროპლანშეტს ისევ ვაინკუბირებდით 4 სთ-ის განმავლობაში. MTT არის წყალში ხსნადი ყვითელი საღებავი, რომელიც, ცოცხალი უჯრედები სუნთქვით ჯაჭვში მონაწილე აქტიური მიტოქონდრიული დეჰიდროგენაზების საშუალებით,

გარდაიქმნება წყალში უხსნად ლურჯ ფორმაზანის კრისტალებად. ამდენად, ფორმაზანის წარმოქმნის დონე კორელირებს ცოცხალი უჯრედების რაოდენობასთან, რადგანაც მკვდარ უჯრედებს არ შეუძლიათ MTT-ის რედუქცია. 4 საათიანი ინკუბაციის შემდეგ ფოსოებში შეიმჩნეოდა წარმოქმნილი ფორმაზანის კრისტალები. თითოეული ფოსოდან ვიღებდით 170 მკლ სუპერნატანტს ისე, რომ არ დარღვეულიყო წარმოქმნილი ფორმაზანის მთლიანობა და ვამატებდით 100 მკლ 10%-იან SDS/0.01M HCl ხსნარს კრისტალების გასახსნელად, ვარხევდით მიკროპლანშეტს სულ მცირე 10 წთ-ით მაინც, შემდეგ კი ვაინკურებდით 3 სთ-ის განმავლობაში 37^0C-ზე.

ოპტიკურ სიმკვრივეს ვსაზღვრავდით მულტისკან Biotek EL 312 -ის საშუალებით 570 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

2.23. ციტოტოქსიკურობის შესწავლა in vitro ექსპერიმენტებში ადამიანის ავთვისებიანი სიმსივნეების პირველად მოკლევადიან სუსპენზიურ კულტურებზე

ლექტინის ციტოტოქსიკური ანტისიმსივნური აქტივობა შესწავლილ იქნა in vitro ტესტის გამოყენებით, რომელიც ძირითადად გამოიყენება პრეპარატის წინასწარი გამოცდის მიზნით (Wilson 1989; Gorbunova 1991). ტესტში გამოყენებული იყო ადამიანის კანის, საკვერცხის, ფილტვისა და სარძევე ჯირკვლის ავთვისებიანი სიმსივნეების პირველადი მოკლევადიანი სუსპენზიური კულტურები.

ექსპერიმენტებში გამოყენებული იყო ადამიანის ავთვისებიანი სიმსივნური ქსოვილები, რომელსაც გვაწვდიდა თბილისის ნაციონალური ონკოლოგიური ცენტრი. ოპერაციის შემდგომ სისივნურ ქსოვილზე ტარდებოდა ციტოლოგიურ-ჰისტოლოგიური გამოკვლევა რის შედეგადაც ვღებულობდით დასკვნას სიმსივნის ტიპის შესახებ.

სიმსივნის ქსოვილს ვათავსებთ $+4^0$ C ტემპერატურაზე, არე-199-ში, რომლის შემადგენლობაში შედიოდა ანტიბიოტიკები (პენიცილინი, სტრეპტომიცინი). არეში მოთავსებულ ქსოვილს რამდენჯერმე ვუცვლიდით აღნიშნულ ხსნარს რის შედეგადაც ქსოვილს ვასუფთავებდით სისხლის უჯრედების, სისხლძარღვების, ქსოვილის გარსებისა და ნეკროზული უბნებისაგან.

შემდგომ ეტაპზე, სკალპელისა და მაკრატლის საშუალებით, ქსოვილს ვაქუცმაცებდით მცირე ზომის ფრაგმენტებად და ვრეცხავდით კვლავ არე-199-ით. ყოველი გარეცხვის შემდეგ ხსნარს ვაცილებდით დეკანტაციით. ამ პროცედურას ვიმეორედით მანამ, სანამ მაქსიმალურად არ მოვაცილებდით შემაერთებელი ქსოვილის ნარჩენებსა და ერითროციტებს.

შემდგომ ეტაპზე ქსოვილის ფრაგმენტებს ვათავსებდით 37^0C-ზე შემთბარ 0,25% ტრიფსინის ხსნარში (1 გრამ ქსოვილზე 10-15 მლ) და ვაინკუბირებდით ერლემეიერის კოლბაში 37^0 C-ზე 1 სთ განმავლობაში, მუდმივი ნჯღრევის პირობებში.

ინკუბაციის დამთავრების შემდეგ დალექილი ქსოვილის ფრაგმენტების ზედა ხსნარს ფრთხილად ვასხამდით გვერდითი მილით და ქსოვილის ფრაგმენტებს ისევ ვუმატებდით ტრიფსინის ხსნარს და ვაინკუბირებდით სანჯღრეველაზე 1 საათი 37^0 C-ზე. ინკუბაციის დამთავრების შემდეგ სუსპენზიას ვფილტრავდით კაპრონის ფილტრში (ჯერ 100, შემდეგ 20 მილიმიკრონი ზომის ფორებიანი ფილტრი). ფილტრატს ვაცენტრიფუგებთ 1 000 ბრ/წთ 7 წთ განმავლობაში.

დალექილ უჯრედებს ვასუსპენდირებდით საკვებ არეში RPMI-1640, რომელიც შეიცავდა მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის ემბრიონის შრატის (კონცენტრაციიტ 10%) და 50 მკგ/მლ გენტამიცინს.

უჯრედების სუსპენზიიდან ვიღებდით 50 მკლ მოცულობას და ვუმატებდით 50 მკლ ვიტალურ საღებავს (ტრიპანის ლურჯი 0,2 % ხსნარი PBS-ში). ცოცხალი უჯრედების რაოდენობას ვითვლიდით გორიაევის ბადეში, მიკროსკოპის საშუალებით.

მიღებული შედეგების მიხედვით ვამზადებდით უჯრედების სუსპენზიას საკვებ არეში, უჯრედების რიცხვი იყო 10^6-უჯრედი 1 მლ საკვებ არეში.

ცდის რეჟიმი:

საინკუბაციო არე - RPMI-1640, რომელიც შეიცავს 10% მსხვილფეხა რქოსანი პირუტყვის ემბრიონის შრატს და 50 მკგ/მლ გენტამიცინს.

სიმსივნური უჯრედების რაოდენობა - 10^6 უჯრედი/მლ, იმუნოლოგიური პლანშეტის თითოეულ ფოსოში - 5.10^5 უჯრედი.

პრეპარატის კონცენტრაცია - 100 - 50 - 10 მკგ/მლ.

კონტროლში სინჯების რაოდენობა - 5.

პრეპარატის სხვადასხვა კონცენტრაციისთვის სინჯების რაოდენობა - 5.

გამოცდის რეჟიმი: საცდელ სინჯებში პრეპარატის ერთჯერადი შეტანა.

ეფექტის შეფასება - კოლორიმეტრული ანალიზის (MTT) მეთოდი.

ექსპერიმენტებში ვიყენებდით 96 ფოსოიან პლანშეტს. ფოსოებში ვასხამდით 50 მკლ უჯრედების სუსპენზიას. საკონტროლოს ვუმატებდით 50 მკლ საკვებ არეს, საცდელს - 50 მკლ სხ/სხ კონცენტრაციის პრეპარატის ხსნარს (პრეპარატს ვხსნიდით საკვებ არეში). ინკუბაცია მიმდინარეობდა 20-24 საათის განმავლობაში CO_2 - ინკუბატორში, 37^0 C- ზე, 5% CO_2-ისა და სრული ტენიანობის პირობებში.

ინკუბაციის დამთავრების შემდეგ თითოეულ ფოსოს ვუმატებდით 20 მკლ 5 მგ/მლ MTT ხსნარს და 3 სთ განმავლობაში ვაინკუბირებდით CO_2 - ინკუბატორში. შემდეგ თითოეულ ფოსოს ვუმატებდით 100 მკლ საექსტრაქციო ბუფერს (10% SDS 50% იზობუტანოლი 0,01N HCl). ურევდით 10 წუთის განმავლობაში სანჯღრეველაზე, შედეგად ხდებოდა ფორმაზანის კრისტალების გახსნა.

ოპტიკურ სიმკვრივეს ვსაზღვრავდით მულტისკან Biotek EL 312 მთვლელის საშუალებით, 570 ნმ სიგრზის ტალღაზე.

LD50-ს ვადგენდით უჯრედების რიცხვის (%) პრეპარატის კონცენტრაციაზე (მკგ/მლ) დამოკიდებულების მიხედვით.

ციტოტოქსიკურობას ვსაზღვრავდით ციტოტოქსიკური აქტივობის კრიტერიუმით - ED-50, რომელიც წარმოადგენს პრეპარატის იმ დოზას, რომელიც ციტოტოქსიკურია ავთვისებიანი უჯრედების 50%-თვის. მიღებულია, რომ აქტივობის მინიმალური კრიტერიუმი ED50≤100 მკგ/მლ. ციტოტოქსიკურობის პროცენტს ვთვლიდით შემდეგი ფორმულით:

$$C/K\ (\%) = \frac{\text{დაზიანებული უჯრედების საშუალო რაოდენობა ცდაში}}{\text{დაზიანებული უჯრედების საშ. რაოდენობა კონტროლში}} \mathbf{X\ 100\ \%}$$

აქტივობის მინიმალური კრიტერიუმი C/K(%) ≥ 125

არასპეციფიკური ციტოტოქსიურობის გამოსარიცხად ვიყენებდით ნორმალური ფიბრობლასტების სუსპენზიურ კულტურას.

2.24. სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციის განსაზღვრა ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით

ექსპერიმენტებში გამოყენებული იქნა ადამიანის ავთვისებიანი სიმსივნის ქსოვილებიდან იზოლირებული უჯრედები, რომლებიც ცდის დაწყებამდე სუსპენდირებული იყო საკვებ არეში (RPMI -1640). ცდის დაწყების წინ სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით სამედიცინო ცენტრიფუგაში 1 000 ბრუნი 7 წთ-ის განმავლობაში. უჯრედების ნალექს ვასუსპენდირებდით PBS-ში. სიმსივნის უჯრედების რაოდენობა შეადგენდა 10^6 უჯრედი/მლ. ხსნარის 0.2 მლ შეგვქონდა ფოტოკოლორიმეტრის (ФК-3) საკონტროლო და საცდელ კიუვეტაში. საცდელ კიუვეტაში შეგვქონდა 100 მკლ 0.2 მგ ლექტინი SABA-1 და 670 ნმ ტალღაზე ვზომავდით სინათლის სხივის გატარების მაჩვენებელს, რომლის კინეტიკას ვიწერდით თვითმწერის საშუალებით. სიმსივნური უჯრედების სედიმენტაციის კინეტიკას, რომელიც გამოიხატებოდა სინათლის გატერების მაჩვენებლის ზრდაში ვაკვირდებოდით 100% გამტარებლობის ჩვენებამდე, ანუ როდესაც მიიღწევოდა სიმსივნური უჯრედების სრული სედიმენტაცია საცდელ კიუვეტაში.

კვლევის შედეგებს ვამუშავებდით სტატისტიკურად სტიუდენტის t ტესტის ($p \leq 0,05$) გამოყენებით.

ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო შემდეგი ქიმიური რეაქტივები: PMSF (“Sigma”, გერმანია), DTT (“Serva” გერმანია,), EDTA (“Sigma”, აშშ), ნატრიუმის აზიდი (“Serva”, გერმანია), SDS (“Sigma”, აშშ), ტრიტონ X-100 (“Ferak”, გერმანია), გლუტარალდეჰიდი (“Sigma”, აშშ), GlcNAc, D-Man, D-Gal, D-Glc, Lac, L-Fuc, GalNAc (“Sigma”, აშშ), აკრილამდი, მეთილენბისაკრილამიდი, ამონიუმის პერსულფატი, ტმდა, გლიცინი (“Reanal”, უნგრეთი), კუმასი G-250 (“Sigma”, აშშ), ბიოგელი P-150, 100-200 mesh (wet) (“Bio-Rad”, Cslif.), სეფადექსი G-10, G-25 (“Pharmacia”, შვეცია),

თავი 3. კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

3.1. სვინტრის ფესურიდან ლექტინების ექსტრაქციის პირობები

საკვლევი სამუშაოს საწყის ეტაპზე შემუშავებული იქნა ზრდა დასრულებული სვინტრის ფესურიდან ლექტინური აქტივობის მქონე ხსნადი ცილოვანი ფრაქციის ექსტრაქციის ოპტიმალური პირობები. კერძოდ, ცდების პირველ სერიებში ვადგენდით სხვადასხვა შედგენილობის საექსტარქციო ხსნარისა და საექსტარქციო დროის გავლენას სვინტრის ფესურადან ცილოვანი ფრაქციის ექსტრაქციასა და ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე **(ცხრ.1).**

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 აგრეთვე, რომ მჟავე არის პირობებში, ხშირ შემთხვევაში აღინიშნება, უჯრედული ცილების ინაქტივაცია და დენატურაცია. ამის გამო, მცენარეული ლექტინების საექსტრაქციოდ, ვიყენებდით ნეიტრალური pH-ისა და 0,15-0,2 M იონური ძალის მქონე ხსნარს, როგორიცაა ფოსფატის ბუფერი (PBS), კერძოდ ვიყებებით ფოსფატის ბუფერს შემდეგი შემადგენლობით: 0,9% NaCl, 0,04M KH_2PO_4, pH7,4. ლექტინების მაქსიმალური გამოსავლიანობის მიზნით შემოწმებულ იქნა აგრეთვე სხვადასხვა შედგენილობის საექსტრაქციო ხსნარები:

1). PBS (pH 7,4);

2). PBS + 0,1% β-მერკაპტოეთანოლი;

3). PBS + 1% PVP - პოლივინილპიროლიდონი;

4). PBS + 0,5mM PMSF (pH 7,4);

ექსტრაქციის ოპტიმალური დროის შესარჩევად, ექსტრაქციას ვახდენდით 15, 30, 45 და 60 წუთის განმავლობაში.

ცხრილში №1 წარმოდგენილია სვინტრის ფესურის ექსტრაქტების ლექტინური აქტივობა სხვადასხვა საექსტრაქციო არეებისა და საექსტრაქციო დროის მიხედვით.

ცხრილი 1.

საექსტარქციო დროისა და სხვადასხვა შედგენილობის საექსტარქციო ხსნარის გავლენა სვინტრის ფესურის ცილის კონცენტრაციასა და ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე

PBS შემადგენლობა	დრო (წთ)	ტიტრი	ცილის კონცენტრაცია მგ/მლ	ლექტინური აქტივობა მგ/მლ	სპეციფიკური აქტივობა მლ/მგ
PBS 0,9%NaCl + 40mM KH_2PO_4 pH 7,4	15	2^3	0.720±0,012	0.023±0,012	11.1±0,012
	30	2^3	0.752±0,010	0.024±0,010	10.6±0,010
	45	2^3	0.816±0,012	0.026±0,012	9.8±0,012
	60	2^3	0.832±0,020	0.026±0,020	9.6±0,020
PBS 0,9%NaCl + 40mM KH_2PO_4 0.1% β-M, pH 7,4	15	2^4	0.976±0,020	0.015±0,020	16.4±0,020
	30	2^5	1.264±0,012	0.010±0,012	25.3±0,012
	45	2^5	1.408±0,014	0.011±0,014	22.7±0,014
	60	2^5	1.648±0,011	0.013±0,011	19.4±0,011
PBS 0,9%NaCl + 40mM KH_2PO_4 1% PVP, pH 7,4	15	2^4	0.992±0,020	0.016±0,020	16.1±0,020
	30	2^5	1.336±0,011	0.010±0,011	24.0±0,011
	45	2^5	1.352±0,014	0.011±0,014	23.6±0,014
	60	2^5	1.344±0,012	0.010±0,012	23.8±0,012
PBS 0,9%NaCl + 40mM KH_2PO_4 0.5mM PMSF, pH 7,4	15	2^4	0.872±0,011	0.013±0,011	18.3±0,011
	30	2^4	1.072±0,014	0.016±0,014	14.9±0,014
	45	2^4	1.160±0,015	0.018±0,015	13.8±0,015
	60	2^4	1.208±0,020	0.019±0,020	13.2±0,020

როგორც ცხრილიდან ჩანს, სვინტრის ფესურიდან ლექტინის (SABA-1) მაქსიმალური ქსტრაქცია ხდება ფოსფატური ბუფერით (0,9% NaCl, 40mM K+-ფოსფატის ბუფერი, pH 7,4, 0,1% β-მერკაპტოეთანოლამინი; ექსტრაქციის დრო 30 წთ; სვინტრის ფესურის წონისა და საექსტრაქციო ხსნარის მოცულობის შეფარდება - 1გრ/20მლ), ცილის მინიმალური კონცენტრაცია, რომელიც იწვევდა აგლუტინაციას, შეადგენდა

0,010 მგ/მლ, შესაბამისად, სპეციფიკური აქტივობა შეადგენდა ყველაზე მაღალ მაჩვენებელს - 25,3 მლ/მგ.

PMSF შეტანა საექსტრაქციო ხსნარში არ ცვლიდა ექსტრაქტის ჰემაგლუტინაციური და სპეციფიკური აქტივობის მაჩვენებლებს, რაც მიუთითებს სვინტრის ფესურის ლექტინების მდგრადობაზე პროტეოლიზური ფერმენტების მოქმედების მიმართ.

PVP-ს შეტენა საექსტრაქციო ხსნარში აგრეთვე არ იწვევდა ექსტრაქტის ჰემაგლუტინაციური აქტივობის ცვლილებას, რაც მიგვანიშნებს, რომ სვინტრის ფესურის ქსოვილში არსებული ფენოლური ნაერთები გავლენას არ ახდენენ სვინტრის ფესურის ლექტინის აქტივობაზე.

ცდების შემდგომ სერიებში შესწავლილი იქნა საექსტრაქციო ხსნარის მოცულობის გავლენა სვინტრის ფესურიდან ექსტრადირებული ცილის კონცენტრაცის, ლექტინური აქტივობის, სპეციფიკური აქტივობისა და ლექტინების შეცველობის მაჩვენებლებზე. წარმოდგენილი შედეგებიდან გამომდინარე, საექსტრაქციო ხსნარის სახით ვიყენებდით 0,9% NaCl, 40mM K+-ფოსფატის ბუფერს, pH 7,4, 0,1% β-მერკაპტოეთანოლის თანაობისას.

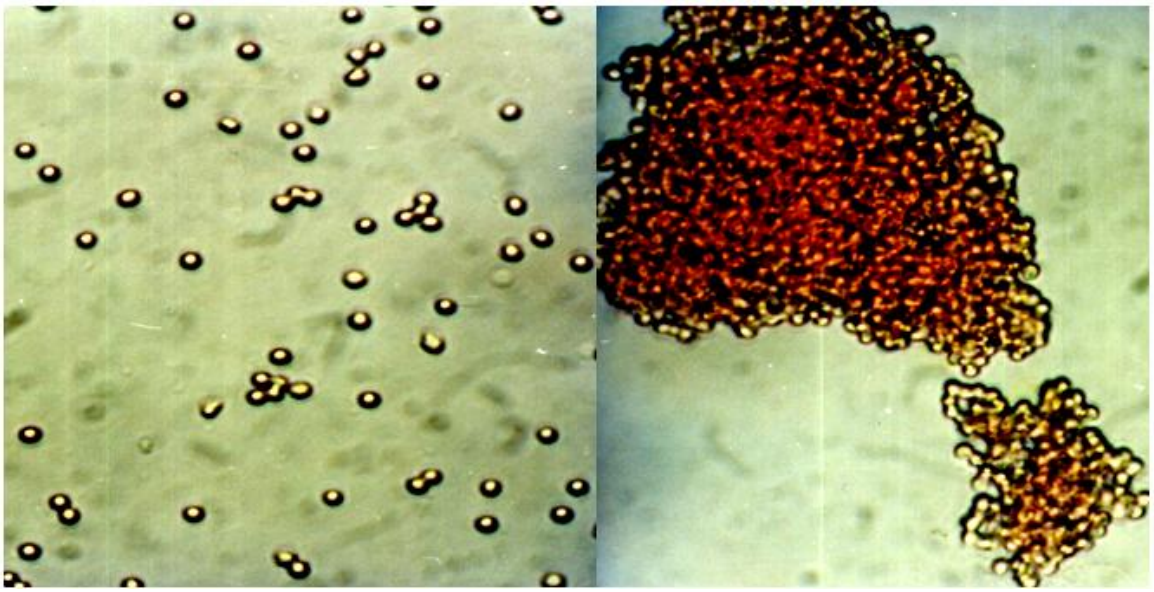
კვლევის შემდეგ ეტაპზე ვიკვლევდით სვინტრის ფესურის წონისა და საექსტრაქციო ხსნარის მოცულობის ოპტიმალურ თანაფარდობას, სადაც ლექტინების მახასიათებლები გვექნებოდა ყველაზე მაღალი.

ცხრილი 2.

ცილის კონცენტრაციის, ლექტინური აქტივობის, სპეციფიკური აქტივობსა და ლექტინის შემცველობის მაჩვენებლებლების დამოკიდებულება სვინტრის ფესურის წონისა და საექსტრაქციო ხსნარის მოცულობის თანაფარდობაზე.

ნედლეული/ PBS გრ/მლ	ტიტირი	ცილა მგ/მლ	ლექტინური აქტივობა მგ/მლ	სპეციფიური აქტივობა მლ/მგ	ლექტინის შემცველობა HU
1:5	2^8	1.344±0,012	0.0013±0,012	190.4±0,012	1033±0,012
1:10	2^7	0.890±0,010	0.0017±0,010	143.8±0,010	524±0,010
1:20	2^6	0.616±0,020	0.0024±0,020	103.9±0,020	257±0,020

მიღებული შედეგები (ცხრ. 2) გვიჩვენებენ, რომ სვინტრის ფესურის წონისა და საექსტრაქციო ხსნარის მოცულობის ყველაზე ოპტიმალური შეფარდებაა 1/5 (ნედლეული (გრ)/საექსტრაქციო ხსანარი (მლ)). აღნიშნული შეფარდების მქონე საექსტრაქციო ხსნარის გამოყენებისას ფიქსირდება ტიტრის (2^8), ცილის კონცენტრაციის (1.344), ლექტინური (0.0013), სპეციფიკური აქტივობის (190.4) და ლექტინების შემცველობის ყველაზე მაღალი მაჩვენებლები.



1 2

სურ. 3. ლექტინ SABA-1-ის გავლენა ბოცვრის ტრიფსინიზირებული ერითროციტების აგლუტინაციაზე.

1. კონტროლი (ერითროციტები ლექტინ SABA-1-ის გარეშე).

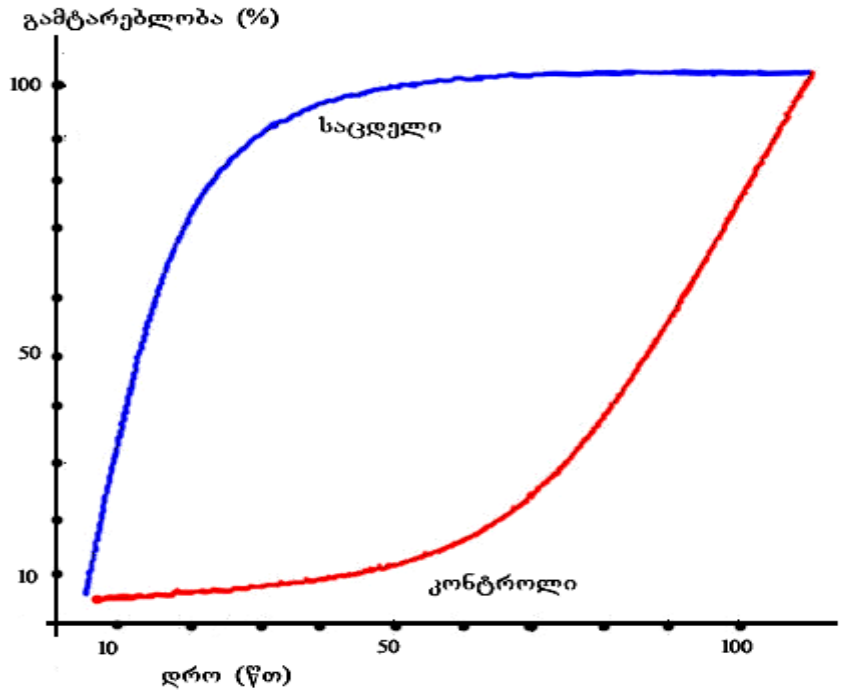
2. საცდელი (ერითროციტები ლექტინ SABA-1-ის თანაობისას)

ამრიგად, სვინტრის ფესურიდან ლექტინური აქტივობის მქონე ცილების ექსტრაქცია მაქსიმალურად ხდება შემდეგ პირობებში: საექსტრაქციო ხსნარი - ფოსფატის ბუფერი (0,9% NaCl, 40 mM K+-ფოსფატის ბუფერი, pH 7.4, 0,1% β-მერკაპტოეთანოლი), ექსტრაქციის დრო - 30 წუთი, ნედლეულისა და საექსტრაქციო ხსანარის თანაფარდობა - 1/5.

3.2. ლექტინ SABA-1 - ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობის განსაზღვრა ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით

ლიტერატურიდან ცნობლია, რომ ტაკაჩის მიკროტიტრაციის მეთოდით ლექტინური აქტივობის ვიზუალურად განსაზღვრისას ხშირ შემთხვევაში ფიქსირდება მოჩვენებითი ჰემაგლუტინაცია. კერძოდ ცნობლია, რომ ასეთი სახის არტეფაქტები შეიძლება გამოიწვიოს პოლისაქარიდებმა, ფენოლურმა ნართებმა და თვით დაზიანებულმა იმუნოლოგიურმა პლანშეტებმაც კი. აღნიშნულის გათვალისწინებით ჰემაგლუტინაციის პროცესის კინეტიკას ვსაზღვრავდით ჩვენს მიერ დამუშავებული ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით.

სურ. 4–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 20 წუთის შემდეგ, საკონროლოში იგივე მაჩვენებელი კი ფიქსირდება მხოლოდ 90 წუთის შედეგ. ეს შედეგი იმაზე მიგვანიშნებს, რომ მაქსიმალური სისწრაფით ხდება სხივის განვლადობის გაზრდა ლექტინი SABA-1-ით ერითროციტების აგლუტინაციის გამო მათი სწრაფად დალექვით, კონტროლთან შედარებით.



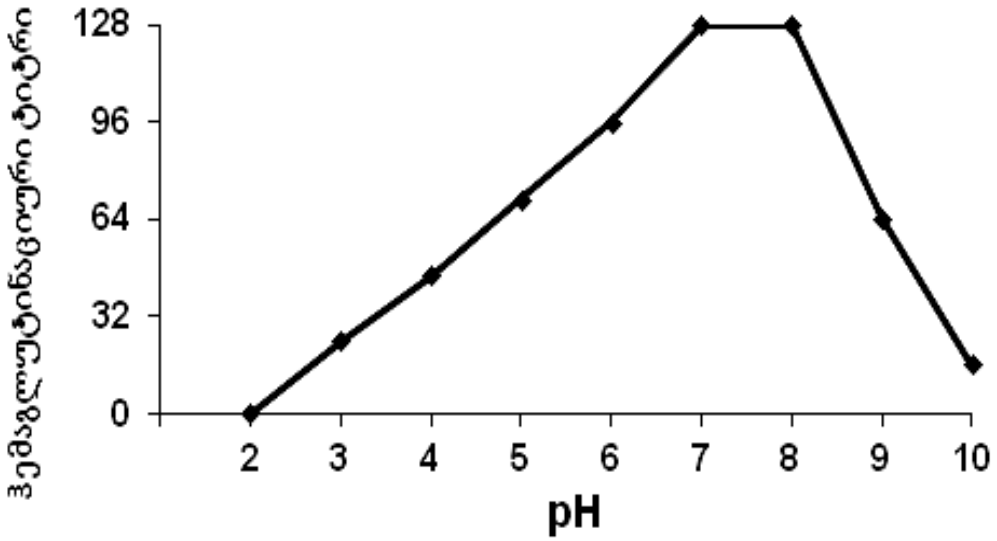
სურ.4. სვინტრის ფესურის ლექტინით (SABA-1) ერითროციტების ჰემაგლუტინაციური აქტივობის კინეტიკა. კონტროლი – ტრიფსინიზებული ერითროციტები

ლექტინების გარეშე; **საცდელი** - ტრიფსინიზებული ერითროციტები ლექტინების თანაობისას.

ამგვარად, მიღებული შედეგებით დასტურდება, რომ სვინტრის ფესურიდან გამოყოფილ ცილოვან ფრაქციას, გააჩნია ჭეშმარიტი ჰემაგლუტინაციური აქტივობა.

3.3. წყალბად-იონების გავლენა სვინტრის ლექტინ SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ H^+-იონების კონცენტრაცია გავლენას ახდენს არა მხოლოდ ცილების პოლიპეპტიდური ჯაჭვის სხვადასხვა ჯგუფების იონიზაციის ხარისხზე, არამედ მთლიანად ცილის მოლეკულის სტრუქტურულ-ფუნქციონალურ მდგომარეობაზე. როგორც ცნობილია მცენარეული ლექტინების უმრავლესობა აქტივობას ავლენს pH-ის ფართო დიაპაზონში, აქტივობის მაქსიმუმით - ნეიტრალურ არეში. თუმცა, არსებობს ლექტინები, რომლებიც მაქსიმალურ აქტივობას ავლენენ H^+-იონთა კონცენტრაციის გარკვეულ მნიშვნელობაზე. ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა სხვადასხვა pH-ის მქონე საექსტრაქციო ბუფერული ხსნარების გავლენა SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე **(სურ. 5)**.

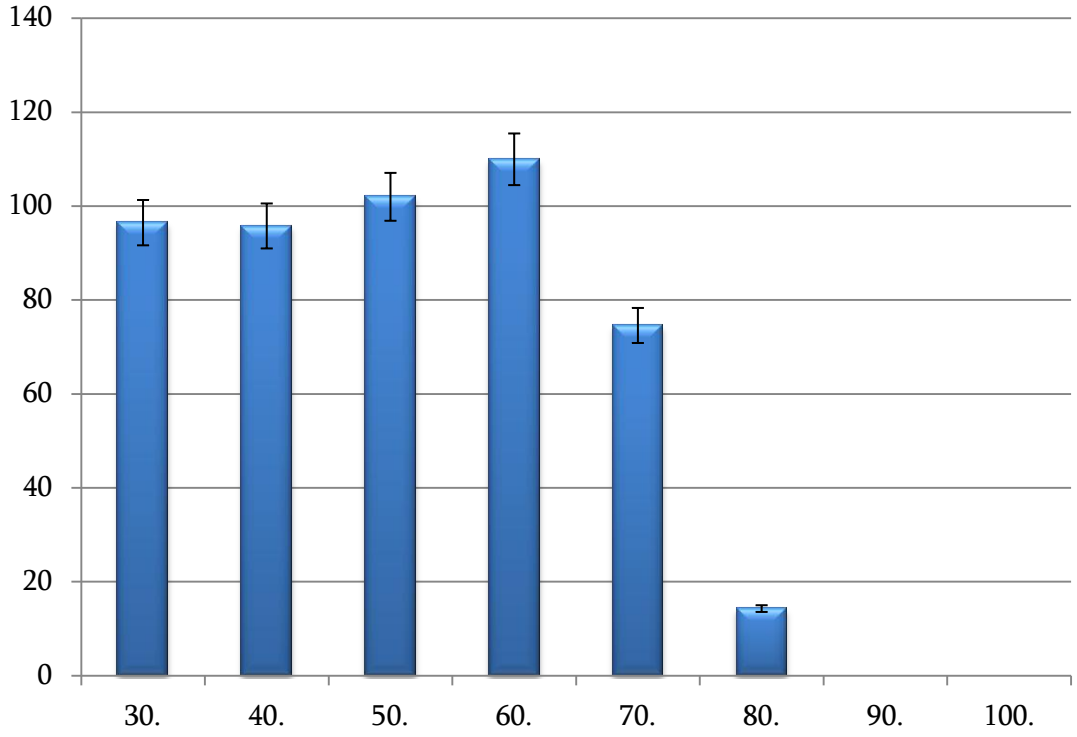


სურ.5. H^+-ის იონების კონცენტრაციის გავლენა ლექტინი SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე.

როგორც სურ.5–იდან ჩანს pH 7.0–8.0-ის ფარგლებში ფიქსირდება ლექტინ SABA-1-ის ყველაზე მაღალი ჰემაგლუტანაციის ტიტრი და ჰემაგლუტინაციური აქტივობა.

3.4. ტემპერატურის გავლენა ლექტინ SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე

ცდების შემდგომ სერიებში შევისწავლეთ ტემპერატურის გავლენა ლექტინ SABA-1-ის სპეციფიკურ აქტივობაზე (სურ.6). ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ ლექტინების ზოგიერთი წარმომადგენელი გამოირჩევა თერმოსტაბილურობით, რის გამოც ამ თვისებას ხშირ შემთხვევაში იყენებენ მათი გასუფთავების მიზნითაც. კერძოდ, ლექტინების მდგრადობა მაღალი ტემპერატური მიმართ, საშუალებას იძლევა, თერმული დამუშავებით, ლექტინების შემცველი უხეში ცილოვანი ფრაქციებიდან მოცილებული იქნას თერმოლაბილური ბალასტური ცილები.



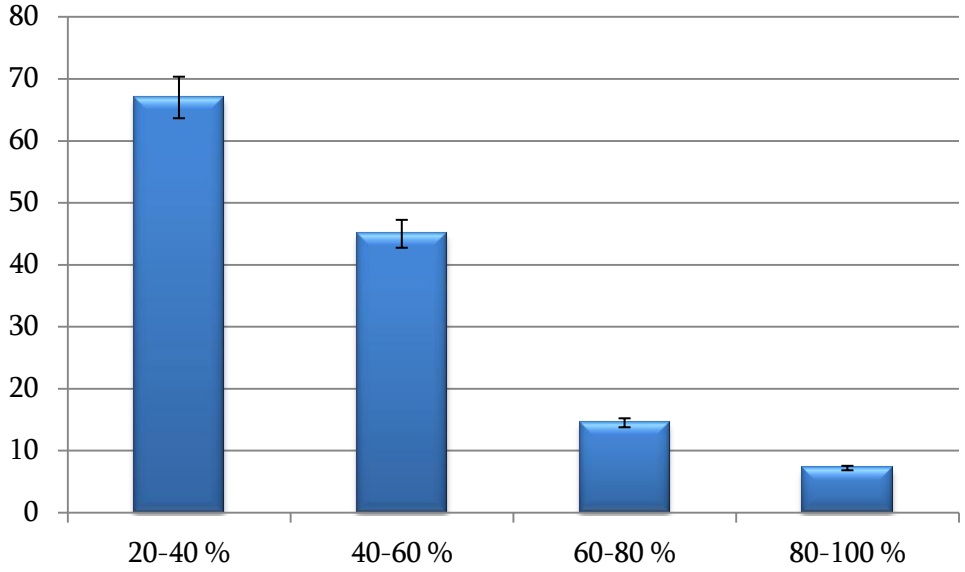
სურ. 6. ტემპერატურის გავლენა ლექტინი SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციურ სპეციფიკურ აქტივობაზე აქტივობაზე. (ორდინატაზე - სპეციფიური აქტივობა. აბსცისაზე - ტემპერატურა C⁰).

როგორც სურ. 6-დან ჩანს, SABA-1 სრულად ინარჩუნებს ლექტინური აქტივობის უნარს +60^{0}C-ზე 15 წთ-ის განმავლობაში გაცხელების პირობებში. ტემპერატურის შემდგომი მატებისას აღინიშნება ლექტინის თანდათანობითი ინაქტივაცია, 90-100^{0}C-ზე კი ჰემაგლუტინაციური აქტივობა მაქსიმალურად კავდება. ამგვარად, მიღებული შედეგები მიუთითებენ, რომ ლექტინი SABA-1 მიეკუთვნება თერმოსტაბილური ცილების კლასს.

3.5. ლექტინ SABA-1-ის ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით

ლექტინ SABA-1-ის ნაწილობრივი გასუფთავების მიზნით ცდების შემდგომ სერიებში ვახდენდით ექსტრაქტების ფრაქციონირებას ამონიუმის სულფატით (სურ. 7). აღნიშნული მეთოდი, ცილის ბიოქიმიაში, წარმატებით გამოიყენება ცილების ნაწილობრივი გასუფთავებისა და კონცენტრირების მიზნით.

როგორც სურ.7-დან ჩანს, ლექტინების მაქსიმალური სპეციფიკური ჰემაგლუტინაიური აქტივობა ვლინდება ფრაქციებში, რომლებიც მიიღება ამონიუმის სულფატით 20-40% და 40-60%-ით გაჯერებისას. ამგვარად, მიღებული შედეგები მიუთითებენ, რომ სვინტრის ფესურის ექსტრაქტიდან ლექტინების მაქსიმალური გამოლექვა ხდება ამონიუმის სულფატის 0-60% გაჯერების პირობებში.



სურ. 7. სვინტრის ფესურის ექსტრაქტის ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით, სხვადასხვა გაჯერების პირობებში და მიღებული ფრაქციების სპეციფიკური ჰემაგლუტინაციური აქტივობა.

მიღებული შედეგების საფუძველზე შემდგომ კვლევებში ლექტინების გასუფთავების ერთ-ერთ ეტაპად ვიყენებდით ამონიუმის სულფატით ფრაქციონირებას 0-70% გაჯერების პირობებში.

3.6. ლექტინ SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე ორვალენტიანი იონების გავლენა

ლექტინის მოლეკულისათვის აგლუტინაციური აქტივობის გამოსავლენად მნიშვნელოვანია ორვალენტიანი იონების თანაობა, რომელიც ზოგიერთი მონაცემის თანახმად, იწვევს ნახშირწყალ-დამკავშირებელი ცენტრის და მთლიანი მოლეკულის სტაბილიზაციას. შესაბამისად, სპეციალურ ცდებში შევისწავლეთ ჩვენს მიერ გამოყოფილი ლექტინ SABA-1-ის აგლუტინაციურ აქტივობაზე Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}-ის აგრევე EGTA და EDTA-ას გავლენა. აღმოჩნდა, რომ 10 mM EGTA და EDTA-ს ხსნარში დიალიზი, რომელიც იწვევდა ორვალენტიანი კატიონების შებოჭვას, ასევე ზემოხსენებული იონების დამატება საბოლოო კონცენტრაციით 5 mM არ ახდენდა გავლენას ლექტინი SABA-1-ის ლექტინურ აქტივობაზე. შესაბამისად გაკეთდა დასკვნა, რომ ჩვენს მიერ გამოყოფილი ლექტინის ჰემაგლუტინაციური აქტივობისათვის არ არის აუცილებელი ორვალენტიანი კატიონების თანაობა, თუმცა ეს საბოლოოდ არ გამორიცხავს ლექტინის მოლეკულაში მტკიცედ ბმული კათიონის არსებობას.

3.7. ლექტინ SABA-1-ში ნახშირწყლების შემცველობა

ცნობილია, რომ მცენარეული ლექტინების უმრავლესობა გლიკოპროტეინული ბუნებისაა ანუ შეიცავენ კოვალენტურად დაკავშირებულ ნახშირწყლოვან კომპონენტს. აღნიშნულიდან გამომდინარე, სპეციალურად შევისწავლეთ ლექტინ SABA-1-ის მოლეკულაში შაქრის შემცველობა შიფის რეაგენტის გამოყენებით. ექსპერიმენტების შედეგებმა დაადასტურეს, რომ ლექტინი SABA-1 არ შეიცავს ნახშირწყლებს და შესაბამისად არ მიკუთვნება რთული ცილების, გლიკოპროტეინების კლასს.

3.8. ლექტინ SABA-1-ის ნახშირწლების მიმართ სპეციფიკურობის შესწავლა

ლექტინების გარკვეული თვისებაა შაქრებთან მათი სპეციფიკური დაკავშირების უნარი. ამიტომ ლექტინების შაქრების მიმართ სპეციფიკურობის შესწავლა

უმნიშვნელოვანს ეტაპს წარმოადგენს ახალი ლექტინის ბიოქმიური დახასიათებისათვის.

აქედან გამომდინარე, ჩვენ შევისწავლეთ ლექტინ SABA-1-ის სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ (ცხრილი 3). ლექტინების ნახშირწყლებთან სპეციფიკურ ურთიერთქმედებას ყურადღება მიაქციეს მას შემდეგ, რაც შეამჩნიეს, რომ მონოსაქარიდები თრგუნავენ ლექტინების ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას. ამ შემთხვევაში ნახშირწყლები გვევლინებიან ჰაპტენების როლში და თრგუნავენ ლექტინის აქტიურ ცენტრს. ამ პრინციპიდან გამომდინარე, ლექტინების ნახშირწყლებისადმი სპეციფიკურობა შეიძლება განისაზღვროს იმ მონოსაქარიდების და/ან ოლიგოსაქარიდების მიხედვით, რომლებიც აინჰიბირებენ ლექტინებით განპირობებულ აგლუტინაციურ რეაქციებს.

როგორც ცხრილი 3–დან ჩანს საანალიზოდ გამოყენებული იყო 18 ნახშირწყალი: D-გალაქტოზა, მეთილ-გალაქტოზა, N-აცეტილ-D-გლუკოზამინი, მანოზა, ალფა-მეთილმანოპირანოზიდი, ლაქტოზა, D-გლუკოზა, ფრუქტოზა, ინოზიტი, რამნოზა, არაბინოზა, L-რიბოზა, გალაქტურონის მჟავა, საქაროზა, ცელობიოზა, მელიბიოზა, რაფინოზა, (საწყისი კონცენტრაციით 200 mM).

ცხრილი 3.

ლექტინ SABA-1-ის სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ.

ნახშირწყლები (საწყისი კონცენტრაცია 200 mM)	ჰემაგლუტინაციური აქტივობის ინჰიბირება	ნახშირწყლის მინიმალური მაინჰიბირებელი კონცენტრაცია (mM)
გალაქტოზა	-	
მეთილ-გალაქტოზა	-	
α-მეთილ-მანოპირანოზიდი	+	25
მანოზა	+	50
რაფინოზა	-	
D-გლუკოზა	-	
რამნოზა	-	

N-აცეტილ-D-გლუკოზამინი	-	
გალაქტურონის მჟავა	-	
ფრუქტოზა	-	
ინოზიტი	-	
არაბინოზა	-	
რიბოზა	-	
მელიბიოზა	-	
ლაქტოზა	-	
ცელობიოზა	-	
საქაროზა	-	
რაფინოზა	-	

+ თრგუნავს ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას.

- არ თრგუნავს ლექტინურ აქტივობას.

ცხრილში წარმოდგენილი მონაცემები გვიჩვენებენ, რომ ექსპერიმენტებში ანალიზირებული შაქრებიდან ლექტინი SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა კავდება მხოლოდ მანოზას, α-მეთილმანოპირანოზიდის თანაობისას.

მიღებული შედეგები მიუთითებენ, რომ ჩვენს მიერ სვინტრის ფესურიდან გამოყოფილი და ნაწილობრივ გასუფთავებილი ლექტინი SABA-1, შაქრების მიმართ სპეციფიკურობის მიხედვით, მიეკუთვნება მანოზა-სპეციფიკური ლექტინების, ხოლო სტრუქტურული ორგანიზაციის მიხედვით ჰოლოლექტინების კლასს.

3.9. ლექტინ SABA-1-ის შემცველობა და განაწილება სვინტრის მზარდ და ზრდადასრულებულ მიწისზედა და მიწისქვედა ორგანოებში

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, ლექტინების შემცველობა მცენარის ქსოვილებში არ არის მუდმივი და იგი იცვლება მცენარის ზრდა-განვითარებაზე დამოკიდებულებით. შესაბამისად ლექტინების ბიოლოგიური როლის დადგენის მიზნით სწავლობენ ლექტინების შემცველობას მცენარის ორგანოებში ფიზიოლოგიური მდგომარეობისაგან დამოკიდებულებით.

კვლევის პირველ ეტაპზე შევისწავლეთ ლექტინების შემცველობა გაზაფხულზე სვინტრის მიწისზედა (ღერო, ფოთოლი, ყვავილი) და მიწისქვეშა (ფესვი, ფესურა, დამატებითი კვირტი) ნაწილებში (ცხრ.4). კვლევის შედეგად დადგენილ იქნა, რომ მიწისზედა ნაწილების ექსტრაქტები იწვევდა ბოცვრის ტრიფსინიზირებული ერითროციტების ლიზისს, რის გამოც შეუძლებელი გახდა მათ ექსტრაქტებში ჰემაგლუტინაციური აქტივობის დადგენა. როგორც ცნობილია სვინტრში დიდი რაოდენობითაა წარმოდგენილი საპონინები, რაც იწვევს ერითროციტების ლიზისს. მიუხედავად ამისა ჩვენს მიერ გამოყენებული მეთოდი არ უარყოფს სვინტრის მიწისზედა ნაწილებში ლექტინების არსებობას. ამიტომ შემდგომი კვლევები ითხოვდა მეთოდოლოგიური მიდგომის შერჩევას.

ცხრილი 4.

გაზაფხულზე მოპოვებული სვინტრის სხვსდასხვა ორგანოში ლექტინ SABA-1-ის შემცველობა.

გაზაფხული					
მცენარის ორგანოები	**C მგ/მლ**	**T**	**HA მგ/მლ**	**SHA მლ/მგ**	**LC**
ფესვი	1,56±0,012	2^4	0,070±0,012	10,25±0,012	111,4±0,012
ფესურა	1,63±0,020	2^5	0,045±0,020	19,63±0,020	181,1±0,020
დამატებითი კვირტი	1,70±0,011	2^2	0,080±0,011	2,35±0,011	106,2±0,011
ფოთოლი	1,56±0,012	-	-	-	-
ღერო	1,63±0,020	-	-	-	-
ყვავილი	1,70±0,014	-	-	-	-

C - ცილის კონცენტრაცია, T - ჰემაგლუტანციის ტიტრი, HA - ლექტინური ჰემაგლუტანციური აქტივობა, SHA - სპეციფიკური ჰემაგლუტინაციური აქტივობა, LC - ლექტინის შემცველობა.

ფიზიოლოგიური კვლევის მეორე ეტაპზე შევისწავლეთ მცენარე სვინტრის, გაზაფხულსა და შემოდგომაზე მოპოვებული, მზარდი და ზრდა დასრულებული

მიწისქვედა ორგანოებში (ფესვი, ფესურა და დამატებითი კვირტი) ლექტინ SABA-1-ის შემცველობა და რაოდენობრივი განაწილება. ჩვენი აზრით ასეთ მიდგომას უნდა გამოევლინა, ლექტინების ბიოლოგიურ ფუნქციასთან მიმართებით, ახალი კანონზომიერებები (ცხრ. 5).

ცხრილი 5.

გაზაფხულსა და შემოდგომაზე მოპოვებული სვინტრის მიწისქვედა ორგანოებში ლექტინ SABA-1-ის შემცველობა.

შემოდგომა					
მიწისქვეშა ნაწილები	**C მგ/მლ**	**T**	**HA მგ/მლ**	**SHA მლ/მგ**	**LC**
ფესვი	0,85±0,020	2^5	0,007±0,020	37,6±0,020	607±0,020
ფესურა	0,76±0,022	2^6	0,003±0,022	84,2±0,022	1260±0,022
დამატებითი კვირტი	0,98±0,014	2^3	0,031±0,014	8,16±0,014	158±0,014
გაზაფხული					
ფესვი	1,56±0,012	2^4	0,070±0,012	10,25±0,012	111,4±0,012
ფესურა	1,63±0,020	2^5	0,045±0,020	19,63±0,020	181,1±0,020
დამატებითი კვირტი	1,70±0,011	2^2	0,080±0,011	2,35±0,011	106,2±0,011

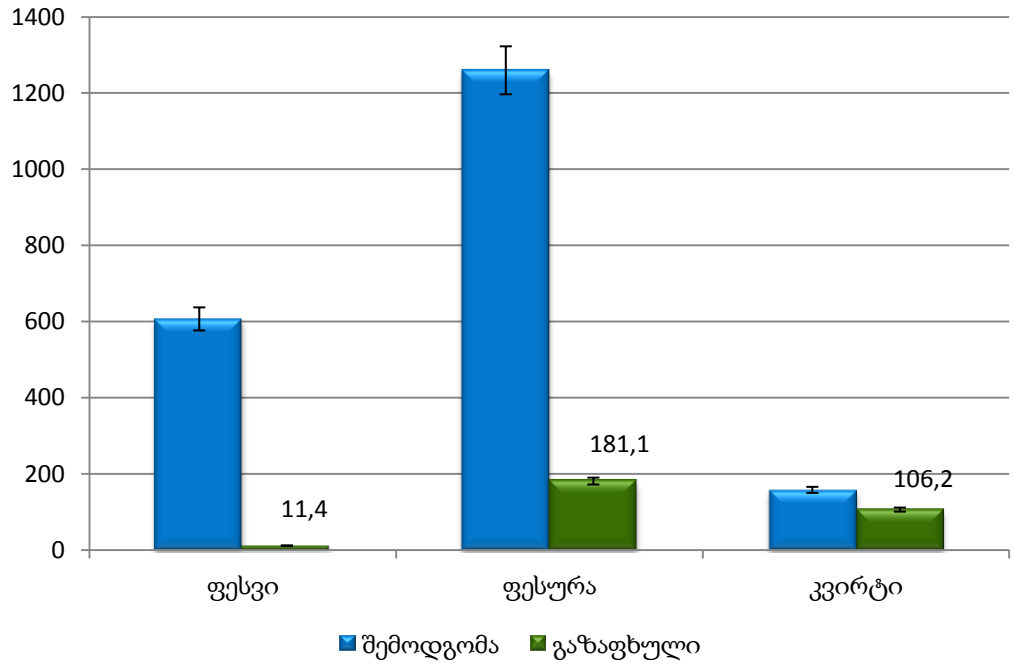
C - ცილის კონცენტრაცია, T - ჰემაგლუტინაციის ტიტრი, HA - ლექტინური ჰემაგლუტინაციური აქტივობა, SHA - სპეციფიკური ჰემაგლუტინაციური აქტივობა, LC - ლექტინის შემცველობა.

როგორც ცხრ. 5-დან ჩანს, შემოდგომაზე მოპოვებული სვინტრის მიწისქვედა ორგანოებიდან ცილის კონცენტრაცია ყველაზე მაღალია დამატებითი კვირტის ექსტრაქტში. ამავე დროს ლექტინების ისეთი მახასიათებლების მაჩვენებლები, როგორიცაა T, HA, SHA და LC, ყველაზე მაღალი მნიშვნელობით ფიქსირდება ფესურას ექსტრაქტში. გაზაფხულზე მოპოვებული სვინტრის მიწისქვედა ორგანოებში, შემოდგომისაგან განსხვავებით, ცილების რაოდენობა თითქმის 2-ჯერ არის გაზრდილი,

მიუხედავად ამისა ლექტინის მახასიათებლები - T, HA, SHA და LC ფესვის, ფესურასა და დამატებითი კვირტის ექსტრაქტებში მკვეთრად არის შემცირებული.

მიღებული კვლევის შედეგები საფუძველს გვაძლევს დავასკვნათ, რომ ლექტინების ყველაზე მაღალი შემცველობა ფიქსირდება შემოდგომაზე მოპოვებული სვინტრის მიწისქვედა ფესურაში. აღსანიშნავია, რომ მისი ფიზიოლოგიური მდგომარეობა შეესაბამება მცენარის მოსვენების მდგომარეობაში გადასვლას.

ზემოთ წარმოდეგენილი შედეგების საფუძველზე გაკეთებული დასკვნის თვალსაჩინო მაგალითია სურ.8, სადაც მოცემულია შემოდგომისა და გაზაფხულის სვინტრის მიწისქვედა ნაწილებში ლექტინების განაწილება.



სურ. 8. ლექტინების შემცველობა მზარდი და ზრდა დასრულებული (შემოდგომისა და გაზახულის) სვინტრის მიწისქვეშა ნაწილებში.

როგორც სურ. 8-დან ჩანს შემოდგომის ფესურაში ყველაზე მაღალია ლექტინების შემცველობა და იგი თითქმის 10-ჯერ აღემატება გაზაფხულის ფესურაში ლექტინების შემცველობას.

მიღებული შედეგები მიუთითებენ სვინტრის ფესურის ლექტინების მაღალ მობილურობაზე. ამ უკანასკნელის დადებითი კორელაცია მცენარის მოსვენების ფიზიოლოგიურ სტადიასთან, გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ ლექტინები შემოდგომის სვინტრის ფესურას ქსოვილებში ასრულებენ დამცველობით ფუნქციებს.

ცნობილია, რომ სვინტრი მრავალწლოვანი მცენარეა. პირველ წელს მის ძირითად ფუნქციას წარმოადგენს ფესურას წარმოქმნა, რომელიც მცენარის ზრდისა და განვითარების დამთავრების შემდგომ გადადის მოსვენების მდგომარეობაში და ინახება ნიადგში მომავალი წლის გაზაფხულამდე. ხოლო ყოველ შემდგომ წელს მცენარე წარმოქმნის ფესურის ნამატს, მასზე განვითარებული კვირტიდან. შესაბამისად ნიადაგში ფესურის მოსვენების სტადიაზე ანუ შენახვის პერიოდში, მასში სამარაგო ნივთიერებები დაცული უნდა იქნას გარემომცველ ნიადაგში არსებული პათოგენური მიკროორგანიზმებისაგან. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგები და ლიტერატურის მიმოხილვაში წარმოდგენილი მონაცემები მცენარეთა ფესვიდან და თესლებიდან სეკრეტირებული ლექტინების ანტიმიკრობული აქტივობის შესახებ, გვაძლევენ საშუალებას გამოვთქვათ ვარაუდი, რომ სვინტის ფესურის მანოზა სპეციფიკური ლექტინი სწორედ ასეთი მოქმედების მქონე ანტიმიკრობულ აგენტს უნდა წარმოადგენს და შესაბამისად ასრულებს დამცველობით და ეკოლოგიურ ფუნქციებს.

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე ლექტინის ყველაზე მაღალი შემცველობა სვინტრის ფესურაშია, რაც მიუთითებს მცენარის აღნიშნილი ორგანოს გამოყენების უპირატესობაზე მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის მაქსიმალური რაოდენობით გამოსაყოფად.

3.10. ლექტინ SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა ბოცვრის ნატიური და ტრიფსინიზირებული ერითროციტების მიმართ

ცდების შემდგომ სერიებში შევისწავლეთ შემოდგომის სვინტრის მიწისქვეშა ნაწილების ექსტრაქტების ლექტინური მახასიათებლები (C, T, HA, SHA) ბოცვრის ნატიური (არატრიფსინიზირებული) და ტრიფსინიზირებული ერითროციტების მიმართ.

ცნობილია, რომ ზოგიერთი ლექტინი ჰემაგლუტინაციური აქტივობის გამოვლენისათვის არ საჭიროებს ბოცვრის ერითროციტების ტრიფსინიზაციას. ასეთი ლექტინები თანაბრად ავლენენ ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას, როგორც ნატიური, ისე ტრიფსინიზირებული ერითროციტების მიმართ. ამიტომ ლექტინური აქტივობის შესწავლა, ნატიური ერითროციტების გამოყენებით, საშუალებას იძლევა დროის, რეაქტივებისა და საერთოდ ჰემაგლუტინაციური აქტივობის განსაზღვრის მეთოდის

გამარტივებისა. ამ მიზნით ცდების შემდგომ სერიებში შევისწავლეთ შემოდგომის სვინტრის მიწისქვედა ნაწილების ექსტრაქტების ლექტინური მახასიათებლები (C, T, HA, SHA) ბოცვრის ნატიური და ტრიფსინიზირებული ერითროციტების მიმართ.

ცხრილი 6.

შემოდგომაზე მოპოვებული სვინტრის მიწიქვეშა ნაწილების ექსტრაქტების ლექტინური მახასიათებლების შესწავლა ნატიური და ტრიფსინიზირებული ერითროციტების მიმართ.

სვინტრის მიწისქვედა ნაწილები	**ბოცვრის ერითროციტები**	**T**	**HA მგ/მლ**	**SHA მლ/მგ**	**C მგ/მლ**
ფესვი	ნატიური (არატრიფსინიზ. ერითროციტები)	2^2	0,053±0,022	4,71±0,022	0,85±0,022
ფესურა		2^3	0,024±0,031	10,55±0,031	0,76±0,031
დამატებითი კვირტი		2^1	0,123±0,014	2,04±0,014	0,98±0,014
ფესვი	ტრიფსინიზ. ერითროციტები	2^5	0,007±0,022	37,6±0,022	0,85±0,022
ფესურა		2^6	0,003±0,031	84,2±0,031	0,76±0,031
დამატებითი კვირტი		2^3	0,031±0,014	8,16±0,014	0,98±0,014

როგორც ცხრ. 6-იდან ჩანს შემოდგომაზე მოპოვებული სვინტრის მიწიქვეშა ნაწილების ექსტრაქტების ლექტინების მახასიათებლები, ტრიფსინიზირებული ერითროციტების გამოყენებისას მიღებული, 8-10-ჯერ აღემატება ნატიური ერითროციტების გამოყენებისას მიღებულ მაჩვენებლებს. მიღებული შედეგები მიუთითებენ, რომ სვინტრის ლექტინის ჰემაგლუტინაციური მახასიათებლების გამოსავლენად აუცილებელია ბოცვრის ერითროციტების ზედაპირის მანოზა შემცველი რეცეპტორების ეკრანირება ტრიფსინიზაციის გზით.

3.11. ლექტინ SABA-1-ის ჰემაგლუტინაციური აქტივობა ადამიანის პერიფერიულის სისხლის I(0); II(A); III(B) და IV(AB) ჯგუფების ნატიური ერითროციტების მიმართ

სპეციალურ ცდებში შეწავლილ იქნა შემოდგომის სვინტრის მიწისქვედა ნაწილების ექსტრაქტების ჰემაგლუტინაციის უნარი, ადამიანის პერიფერიული სისხლის ყველა ჯგუფის ნატიური ერითროციტების მიმართ.

ჰემაგლუტინაციის ტესტში ძირითადად იყენებენ ბოცვრის ნატიურ და ტრიპსინით დამუშავებულ ერითროციტებს, ვინაიდან ისინი, სხვა ორგანიზმების ერითროციტებთან შედარებით, განსაკუთრებული მგრძნობელობით გამოირჩევიან. არსებობენ ლექტინები, რომლებიც არ ავლენენ ლექტინურ აქტივობას ბოცვრის ერითროციტების მიმართ, თუმცა იწვევენ, მაგალითად, ადამიანის, ცხვრის, ვირთაგვისა და სხვა ცხოველის ერითროციტების აგლუტინაციას. ძუძუმწოვრების უჯრედების გამოყენებით ლექტინის დამკავშირებელი თვისებების შესწავლას, როგორც წესი, მიმართავენ მისი ბიოლოგიური აქტივობისა და იმუნოლოგიური კვლევის ინსტრუმენტის სახით გამოყენების პოტენციალის შესაფასებლად. გარდა ამისა, პრაქტიკული მნიშვნელობა აქვს ლექტინების სპეციფიკურ ურთიერთქმედებას ადამიანის სისხლის სხვადასხვა ჯგუფის ერითროციტებთან. ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია, რომ რიგი ლექტინი ხასიათდება სეროლოგიური სპეციფიკურობით და გააჩნია პრაქტიკული გამოყენება.

ცხრილი 7.

შემოდგომის სვინტრის მიწისქვეშა ნაწილების ექსტრაქტების ჰემაგლუტინაციის უნარი ადამიანის პერიფერიულის სისხლის I(0); II(A); III(B) და IV(AB) ჯგუფების ნატიური ერიტროციტების მიმართ.

სვინტრის მიწისქვეშა ნაწილები	C მგ/მლ	ადამიანის პერიფერიული სისხლის ნატიური ერითროციტების ჰემაგლუტინაცია			
		I (0) ჯგუფი	II (A) ჯგუფი	III (B) ჯგუფი	IV (AB) ჯგუფი
ფესვი	0.85±0.02	-	-	-	-

ფესურა	0.76±0.03	-	-	-	-
კვირტი	0.98±0.01	-	-	-	-

ცხრ. 7-ში წარმოდგენილი მონაცემები ერთმნიშვნელოვნად მიუთითებენ, რომ სვინტრის ლექტინები არ რეაგირებენ ადამიანის სისხლის არც ერთი ჯგუფის ნატიურ ერიტროციტებთან და შესაბამისად არ გააჩნიათ მათი აგლუტინაციის უნარი. ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ ბევრი მცენარეული ლექტინი in vitro ექსპერიმენტებში ავლენენ იმუნოტროპულ, ანტიკანცეროგენულ, ანტიმიკრობულ და სხვა სახის ბიოლოგიურ აქტივობებს, თუმცა მათი ტრადიციულ მედიცინაში სამკურნალო საშუალებებად დანერგვა ვერ ხეხდება, ორგანიზმის მიმართ ტოქსიკური მოქმედების გამო, რაც ხშირ შემთხვევაში გამოწვეულია სისხლში ერითროციტების აგლუტინაციით.

მიღებული შედეგები, სადაც ნაჩვენებია, რომ სვინტრის მანოზა-სპეციფიკური ლექტინი არ იწვევს ადამიანის ნატიური ერითროციტების აგლუტანაციას, მნიშვნელოვანი ფაქტორია სვინტრის ლექტინების უსაფრთხო სამკურნალო საშუალებად გამოყენების პერსპექტივაში.

3.12. ლექტინ SABA – 1-ის გამოყოფა, გასუფთავება და ბიოქიმიური დახასიათება

ინდივიდუალური ცილების სახით ლექტინების გამოყოფა წარმოადგენს არა მხოლოდ აუცილებელ ეტაპს მისი შემდგომი დახასიათებისათვის, არამედ, მან შეიძლება მოგვცეს მეტად მნიშვნელოვანი ინფორმაცია in vivo პირობებში ლექტინების ფუნქციონირების მექანიზმების თავისებურებების შესახებ.

სურ.9-სა და ცხრ.8-ში წარმოდგენილია სვინტრის ფესურის ლექტინის გასუფთავების ძირითადი ეტაპები. ასევე, გასუფთავების ყოველ ეტაპზე მიღებული ცილოვანი ფრაქციების ჰემაგლუტინაციური აქტივობა და ლექტინ SABA-1-ის გასუფთავების ხარისხი. როგორც ცხრილიდან ჩანს, სვინტრის ფესურის ლექტინის გასუფთავების ძირითადი ეტაპები მოიცავს 7 სტადიას: 1. ფესურიდან ცილოვანი ექსტრაქტის მიღება: 2. ქრომატოგრაფია Toyopearl HW-55 -ის სვეტზე; 3. სვეტიდან

ელუირებული SABA-1-ის შემცველი ცილების ფრაქციონირება ამოინიუმის სულფატით; 4. თერმული დამუშავება +60^{0}C-ზე 30 წთ-ის განმავლობაში. 5. აცეტონით დამუშავება. 6. ქრომატოგრაფია Toyopearl HW-55 -ის სვეტზე; 7.აფინური ქრომატოგრაფია გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებულ ერითროციტების სვეტზე.

ცხრილი 8.

SABA-1 -ის გასუფთავების ძირითადი ეტაპები

SABA-1 -ის გასუფთავების ძირითადი ეტაპები	**ჰემაგლუტინაციური აქტივობა (მგ/მლ)**	**გასუფთავების ხარისხი**
ექსტრაქტი	0.075±0.022	0
ქრომატოგრაფია	0.0080±0.012	9
ამონიუმის სულფატით ფრაქციონირება	0.0045±0.018	17
თერმოდამუშავება	0.0030±0.015	25
აცეტონით დამუშავება	0.0010±0.012	75
ქრომატოგრაფია	0.0008±0.020	94
აფინური ქრომატოგრაფია	0.000095±0.014	789

ცხრ. 8-იდან ჩანს, რომ გასუფთავების ყოველ მომდევნო ეტაპზე SABA-1-ის შემცველი ცილოვანი ფრაქციების ჰემაგლუტინაციური აქტივობა იზრდება. შესაბამისად, იზრდება SABA-1-ის გასუფთავების ხარისხი. კერძოდ, უხეში ექსტრაქტის ქრომატოგრაფიით მიღებული ლექტინური აქტივობის მქონე პიკის ცილოვან ფრაქციაში ჰემაგლუტინაციური აქტივობაა 0.0080 მგ/მლ, რაც მიუთითებს, რომ ქრომატოგრაფიის შედეგად SABA-1-ის გასუფთავების ხარისხი შეადგენს 9. გასუფთავების შემდგომი ეტაპების გამოყენებამ, რომლებიც თანმიმდევრულად მოიცავდა, ამონიუმის სულფატით ფრაქციონებას, თერმულ და აცეტონით დამუშავებას, გელ-ფილტრაციულ ქრომატოგრაფიასა და აფინურ ქრომატოგრაფიას, გვიჩვენა, რომ გასუფთავების ყოველ შემდგომ ეტაპზე ჰემაგლუტინაციური აქტივობა შესაბამისად

იზრდება 17, 25, 75, 94-ჯერ და ბოლო ეტაპის შემდეგ SABA-1-ის ლექტინური აქტივობა შეადგენა 0.000095 მგ/მლ, ხოლო გასუფთავების ხარისხმა 789 მიაღწია. წარმოდგენილი მონაცემები მიუთითებენ, რომ ჩვენს მიერ შემუშავებული მეთოდით, სვინტრის ფესურიდან ინდივიდუალური მოლეკულების სახით, მიღებული ლექტინი SABA-1 გასუფთავებული იქნა 789-ჯერ.

სვინტრის ფასურა

↓

ჰომოგენიზაცია
ბლენდორში 3 წთ.
ნედლეული + საექტსტრაქციო ხსნარი (1გრ./5მლ)

↓

ექსტრაქცია
მაგნიტურ სარეველაზე 60 წთ.

↓

ფილტრაცია
ორმაგ დოლბანდში

↓

ცენტრიფუგირება
15 000 გრ/წთ 15 წთ

↓

სუპერნატანტი

↓

ფილტრაცია
ცელულოზას ფილტრში

↓

ამონიუმის სულფატით დალექვა
0-70% გაჯერება

↓

სუსპენდირება
ნალექი + PBS

↓

ცენტრიფუგირება
20 000 გრ.წთ 20 წთ

↓

სუპერნატანტი

↓

ფილტრაცია
მილიპორის შუშის ბოჭკოვან ფილტრში

↓

ქრომატოგრაფია
Toyopearl HW-55 -ის სვეტზე

↓

დალექვა ამონიუმის სულფატით

0-60% გაჯერება

↓

სუსპენდირება

ნალექი + PBS

↓

ცენტრიფუგირება

8 000 ბრ.წთ 15 წთ

↓

სუპერნატანტი

↓

ფილტრაცია

მილიპორის შუშის ბოჭკოვანი ფილტრი

↓

თერმოდამუშავება

60^0 ტემპერატურაზე 15 წთ.

↓

თერმოდამუშავება

-10^0 ტემპერატურაზე 15 წთ.

↓

ცენტრიფუგირება

8 000 ბრ.წთ 15 წთ

↓

სუპერნატანტი

↓

ფილტრაცია

მილიპორის შუშის ბოჭკოვანი ფილტრი

↓

აცეტონით დამუშავება

ფილტრატი + ცივი აცეტონი V/V=1/5

შენახვა -10^0 ტემპერატურაზე 3 სთ.

↓

ცენტრიფუგირება

8 000 ბრ.წთ 15 წთ

↓

სუპერნატანტი

↓

ფილტრაცია

მილიპორის შუშის ბოჭკოვანი ფილტრი

↓

ქრომატოგრაფია

Toyopearl HW-55 -ის სვეტზე

↓

აფინური ქრომატოგრაფია

მანოზას ან გლუტარალდჰიდით ფიქსირებული ერითროციტების სვეტზე

↓

სტერილიზაციური ფილტრაცია

მილიპორის მემბრანული ფილტრი (0.22 μm)

↓

ლიოფილიზაცია

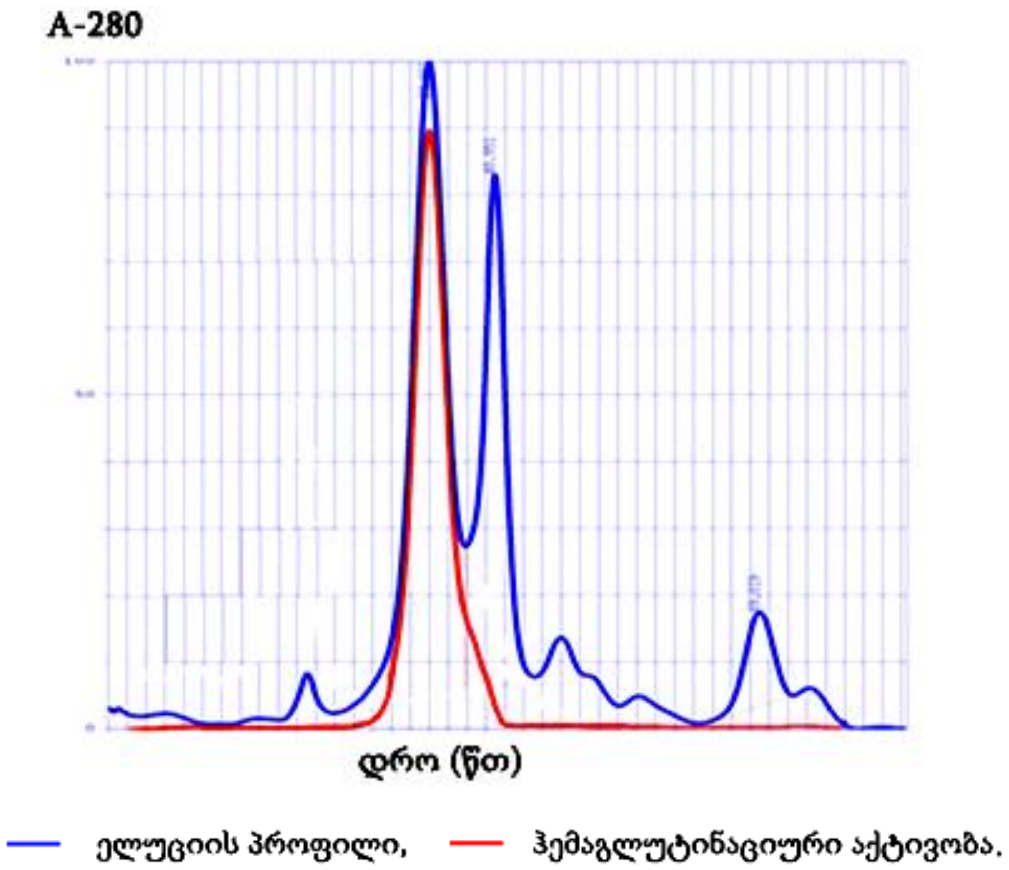
48 სთ.

↓

ლექტინ SABA-1 ინდივიდუალური მოლეკულების ლიოფილიზირები ფხვნილი

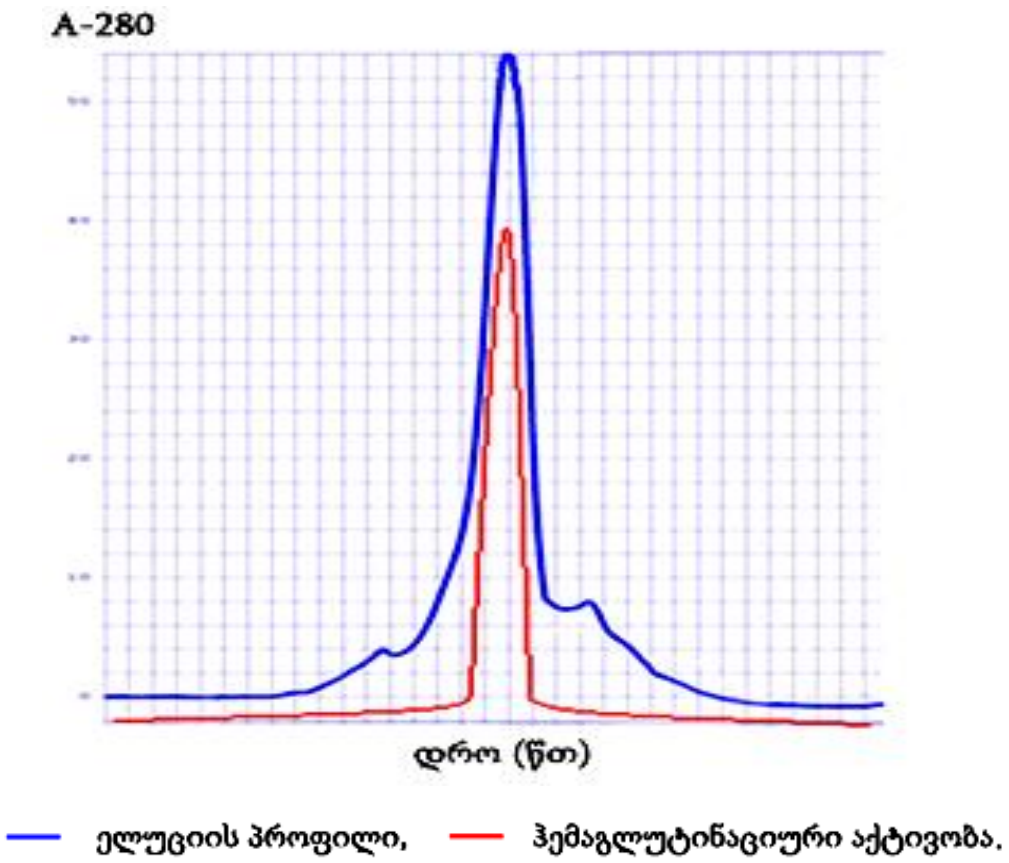
სურ. 9. ლექტინ SABA-1-ის გასუფთავების სრული სქემა.

სურ. 10-ზე წარმოდგენილია ფესურიდან ექსტრაგირებული სუმარული ცილების ფრაქციონირების პროფილი Toyopearl HW-55 - ის სვეტზე. როგორც სურათიდან ჩანს სვეტიდან ელუირდება 9 განსხვავებული მოლეკულური მასების მქონე ცილოვანი ფრაქცია. პარარელურად თითოეულ ელიურებულ ფრაქციაში განვსაზღვრეთ ჰემაგლუტინაციური აქტივობა ლექტინების გამოვლენის მიზნით. როგორც სურათიდან ჩანს, ჰემაგლუტინაციური აქტივობა დაფიქსირდა მხოლოდ ცილებით ყველაზე გამდიდრებულ ფრაქციაში, რაც შეესაბამება სვეტიდან ელიურებულ მე-3 პიკს. აღნიშნულ ფრაქციაში ჰემაგლუტინაციური აქტივობა შეადგენს 0.0008 მგ/მლ.



სურ. 10. სვინტრის ფესურიდან მიღებული უხეში ექსტრაქტის Toyopearl HW-55 - ის სვეტზე ფრაქციონირების ელუციის პროფილი.

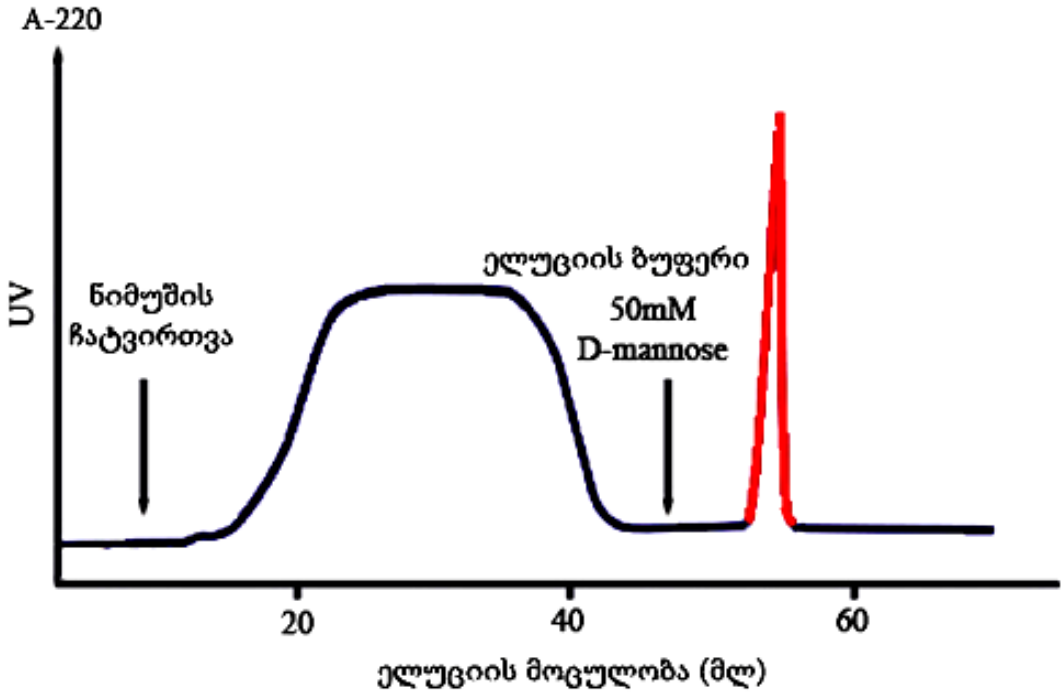
ლექტინ SABA-1-ის შემდგომი გასუფთავების მიზნით ვახდენდით ჰემაგლუტინაციური აქტივობის მქონე ცილოვანი ფრაქციის (ყველაზე მღალი პიკი) ფრაქციონირებას ამონიუმის სულფატით (0-60 %), შემდგომ თერმულ (+60 ^{0}C) და ბოლოს ცივი აცეტონით დამუშავებას. აღნიშნული ბიოქიმიური მეთოდების გამოყენებით მიღებული ცილოვანი ფრაქციიდან SABA-1-ის შემდგომ გასუფთავებას ვახდენდით განმეორებით ქრომატოგრაფიას Toyopearl HW-55 - სვეტზე.



სურ. 11. ამონიუმის სულფატით ფრაქციონირების, თერმო და აცეტონით დამუშავებული სვინტრის ფესურის ცილოვანი ფრაქციის Toyopearl HW-55 -ის სვეტზე ფრაქციონირების ელუციის პროფილი.

როგორც სურათი 11-იდან ჩანს სვეტიდან ელუირებულია 2 მცირე და ერთი დიდი ცილოვანი ფრაქცია. ჰემაგლუტინაციური აქტივობა დაფიქსირებული იქნა სწორედ დიდ ცილოვან ფრაქციაში (პიკი 2). ჰემაგლუტინაციური აქტივობა შეადგენდა 0.0008 მგ/მლ-ზე (ცხრილი 8.).

ლექტინ SABA-1-ის გასუფთავების საბოლოო სტადიაზე ვიყენებდით აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდს. აფინურ სორბენტად გამოვიყენეთ გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებული ტრიფსინიზირებული ერითროციტების სვეტი.

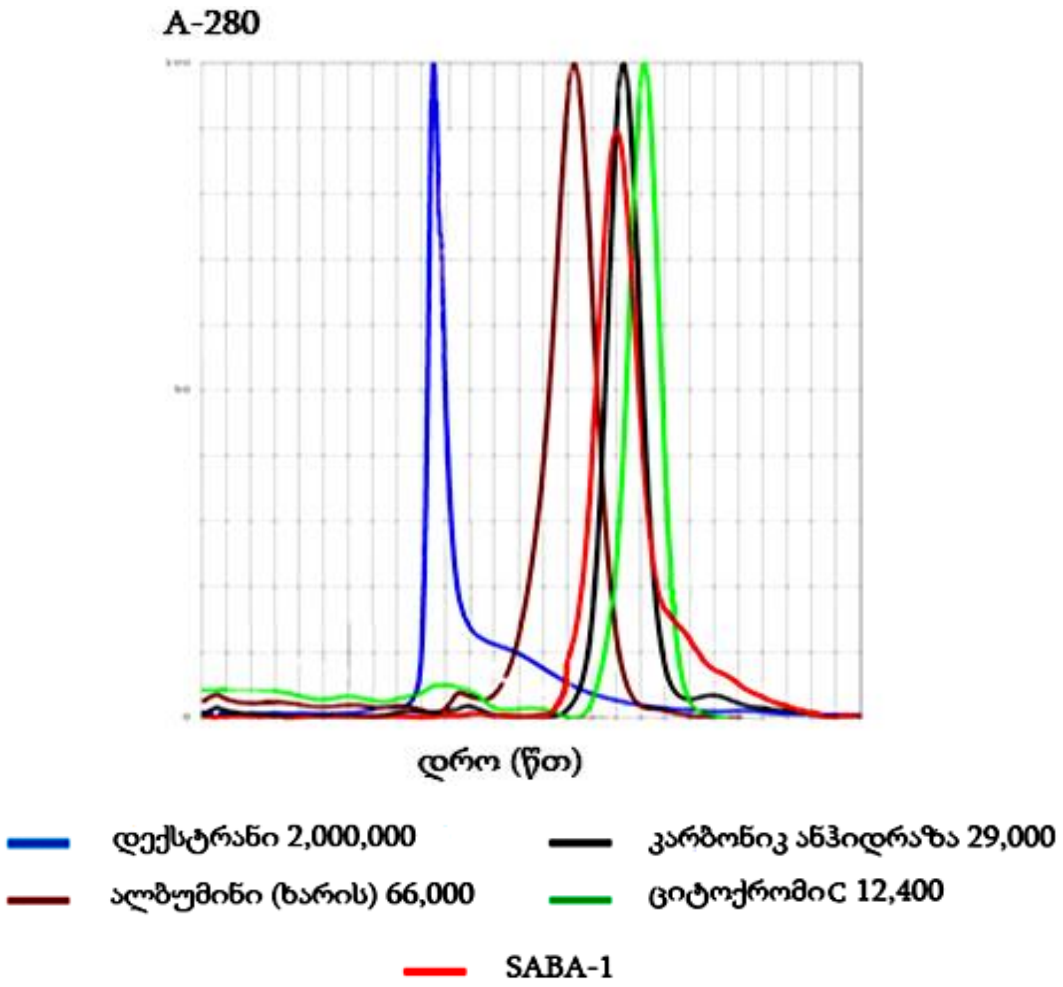


სურ. 12. გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებულ ერითროციტების სვეტზე ლექტინ SABA-1-ის აფინური ქრომოტოგრაფიის პროფილი.

— ჰემაგლუტინაციური აქტივობა.

როგორც სურ.12-იდან ჩანს, ტრიფსინიზირებული ერითროციტების სვეტზე ლექტინის შემცველი ცილოვანი ფრაქციის გატარების შედეგად, PBS-ით ელუირებული იქნა სორბენტზე დაუმაგრებელი ბალასტური ცილები, რომელშიც არ ფიქსირდებოდა ჰემაგლუტინაციური აქტივობა ანუ ლექტინების შემცველობა. ჰემაგლუტინაციური აქტივობის მქონე ციოლოვანი ფრაქცია სვეტიდან SABA-1-ის ელუირება მოვახდინეთ 50 mM D-მანოზის შემცველი ფიზიოლოგიური ხსნარით, მისი ჰემაგლურინაციურმა აქტივობამ შეადგინა 0.000095 მგ/მლ.

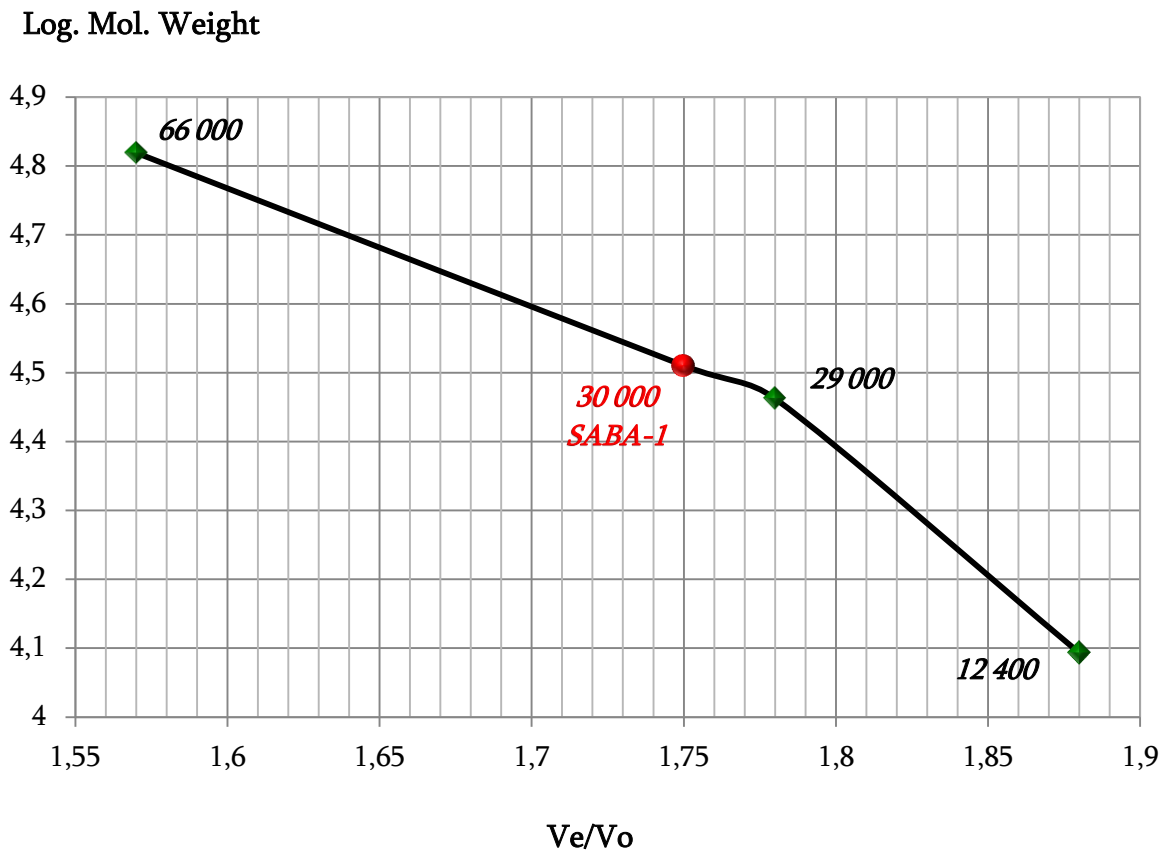
კვლევის შემდგომ ეტაპზე, გელ-ფილტრაციის მეთოდის და საკალიბრო სტანდარტული ცილების გამოყენებით, დაგენილ იქნა აფინურად გასუფთავებული SABA-1-ის მოლეკულური მასა (სურ.13).



სურ.13. Toyopearl HW-55 სვეტზე საკალიბრო მარკერული ცილებისა და აფინური ქრომატოგრაფიით გასუფთავებილი ლექტინ SABA-1-ის ელუციის პროფილი.

სვეტის თავისუფალი მოცულობა (V_0) და ცილების ელუციის მოცულობა (Ve) განსაზღვრული იყო შესაბამისი ცილების პიკის წვერების მიხედვით.

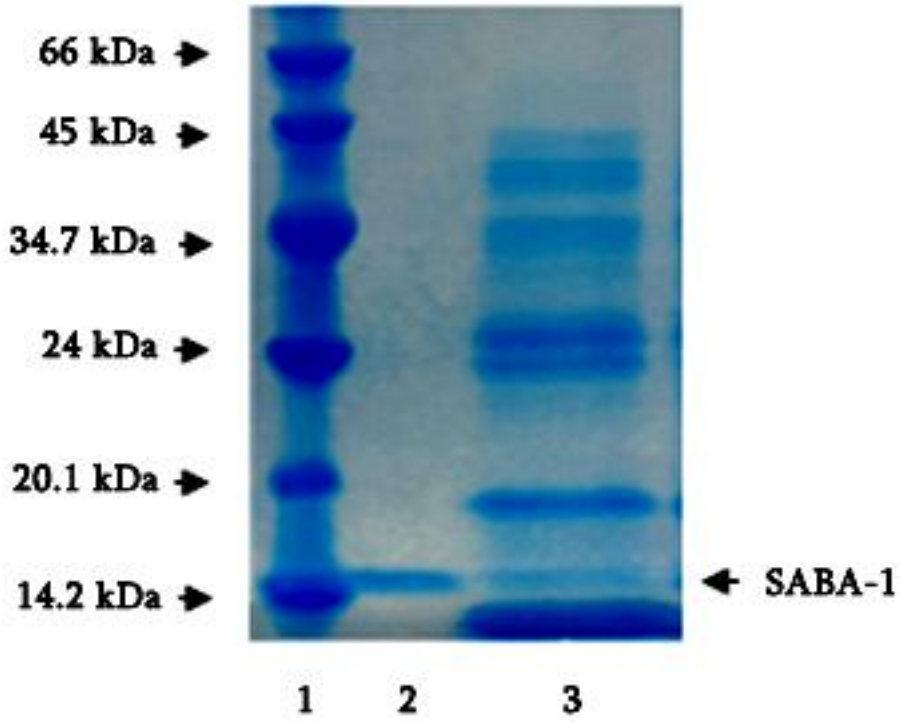
როგორც სურათი 13-ზე წარმოდგენილი ქრომატოგრაფიის პროფილი გვიჩვენებს აფინურად გასუფთავებული SABA-1-ის ფრაქცია (წითელი მრუდი) სვეტიდან ელუირდება მარკერული ცილების ალბუმინის (66 000 Da) და კარბოანჰიდრაზას (29 000 Da) შორის და მიახლოებულია უკანასკნელის ელუციის პროფილთან.



სურ.14. საკალიბრო მრუდი მარკერული ცილებისა და აფინური ქრომატოგრაფიით გასუფთავებული ლექტინ SABA -1-ისათვის, აგებული Toyopearl HW-55 სვეტზე ქრომატოგრფიის ელუციის პროფილების მიხევით.

სურ.14-ზე წარმოდგენილი საკალიბრო მრუდი, რომელიც აგებული იყო მარკერული ცილების ქრომატოგრაფიის ელუციის პროფილის მიხედვით, გამოყენებულ იქნა SABA–1-ის ნატიური მოლეკულის მოლეკულური მასის დასადგენად. საკალიბრო მრუდის გათვლების მიხედით დადგენილი იქნა, რომ ნატიური SABA–1-ის მოლეკულური მასა **30 000 Da**-ია.

SABA-1-ის მეოთხეული სტრუქტურის დასადგენად, ცდების შემდგომ ეტაპზე ვახდენდით ნატიური SABA-1-ის დენატურაციას ნატრიუმის დოდეცილსულფატით (SDS) და ვსაზღვრავდით მისი შემადგენელი სუბერთეულების მოლეკულურ მასებსა და რაოდენობას ელექტროფორეზის მეთოდით პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელში (10-25%), საკალიბრო სტანდართული ცილების (მარკერების) გამოყენებით.



სურ.15. სტანდარტული მარკერული ცილებისა და ლექტინ SABA–1-ის პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელში (10-25%), SDS-ის თანაობისას, ელექტროფორეზის ელექტროფორეგრამა.

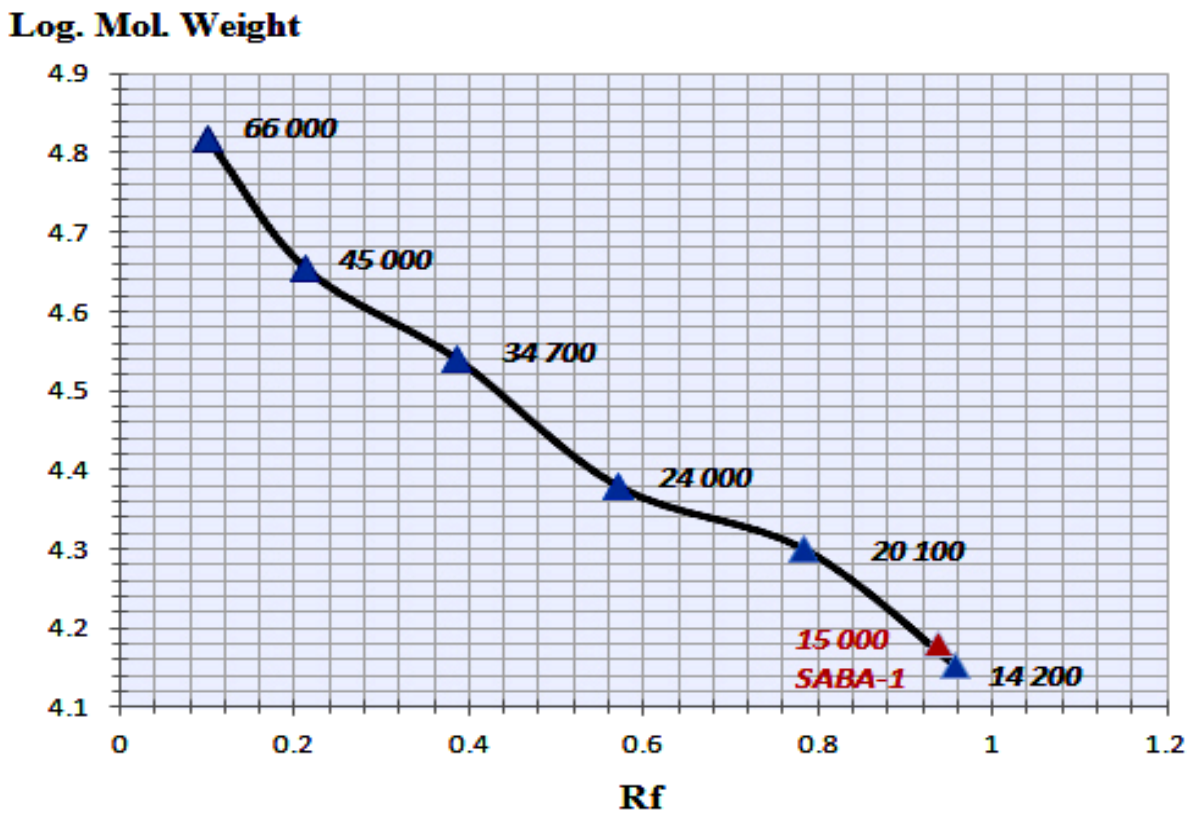
<u>1-ტრეკი</u> - მარკერები, მოლეკულური წონების დიაპაზონი 14 000–70 000 Da, გელში ჩატვირთული სინჯების მოცულობაა 1-10 მკლ. (ალბუმინი - 66 000; ოვალბუმინი - 45 000; პეპსინი - 34,700; ტრიფსინგენი - 24 000; β-ლაქტოგლობულინი - 20 100; ლიზოციმი - 14 200).

<u>2 ტრეკი</u> - ლექტინი SABA–1, აფინური ქრომატოგრაფიით გასუფთავებული.

<u>3 ტრეკი</u> - ლექტინ SABA-1-ის შემცველი ცილების ფრაქცია, რომელიც მიღებულია Toyopearl HW-55 სვეტზე გელფილტრაციული ქრომატოგრაფიის შედეგად.

წარმოდგენილი ელექტროფორეგრამის მიხედვით, 1-ელ ტრეკზე ნაჩვენებია ცნობილი მოლეკულური მასის 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 SABA–1-ს, რომლის წილი უმნიშვნელოა აღნიშნული ცილების ფრაქციაში. მე-2 ტრეკი გვიჩვენებს, რომ აფინური ქრომატოგრაფიის შედეგად გასუფთავებული SABA–1, დისოცირებულ პირობებში

მიგრირებს ერთი კომპაქტური ზოლით, რაც ადასტურებს, რომ იგი წარმოადგენს გასუფთავების შედეგად მოღებულ SABA–1-ის თანაბარი მოლეკულური მასის მქონე პოლიპეპტიდებს.



სურ. 16. ლექტინ SABA–1-ისათვის აგებული სტანდარტული მარკერული ცილების საკალიბრო მრუდი, პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელში (10-25%) ელექტროფორეზის შედეგად მიღებული ელექტროფორეგრამის მიხედვით.

სურათზე წარმოდგენილია ელექტროფორეგრამის მიხედვით აგებული საკალიბრო მრუდი SABA–1-ის შემადგენელი სუბერთეულების მოლეკულური მასის დასადგენად. საკალიბრო მრუდის მიხედვით დაგენილ იქნა, რომ SABA-1-ის შემადგენელი სუბერთეულების მოლეკულური მასა თანაბარია და შეადგენს 15 000 Da. ამრიგად, შემუშავებულია სვინტრის ფესურიდან მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის გამოყოფისა და გასუფთავევების მეთოდი. აღნიშნული მეთოდით იდენტიფიცირებული ლექტინ SABA–1-ის ჰემაგლუტიონაციურმა აქტივობამ შეადგინა 0.000095 მგ/მლ, ხოლო გასუფთავების ხარისხმა 789-ს. გელ-ფილტრაციისა და ელექტროფორეზის მეთოდების გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ SABA-1-ის მოლეკულური მასა 30, 000 Da-ია და შედგება ორი თანაბარი 15, 000 Da მოლეკულური მასის მქონე სუბერთეულისაგან.

აღსანიშნავია, რომ ჩვენს მიერ იზოლირებული ლექტინი SABA-1, ზოგიერთი ფიზიკურ-ქიმიური და სტრუქტურული ორგანიზაციის მახასიათებლებით, განსხვავდება რიგი ავტორების მიერ სვინტრის სხვა სახეობების ფესურიდან იზოლირებული ლექტინებისაგან. კერძოდ, სვინტრის შემდეგი სახეობებიდან - ***Polygonatum multiflorum, Polygonatum odoratum*** და ***Polygonatum cyrtonema,*** გამოყოფილი მანოზა-სპეციფიკური ლექტინები განსხვადებიან როგორც ერთმანეთისაგან, ასევე ჩვენს მიერ იზოლირებული ლექტინ SABA-1-ისაგან ნატიური და შემადგენელი სუბერთეულების მოლეკულური მასებით, სუბერთეულების რაოდენობითა და მეოთხეული სტრუქტურით. მაგალითად ***Polygonatum multiflorum***-ის ლექტინის ნატიური მოლეკულის მოლეკულური მასა შეადგენს 56,000 Da, მეოთხეული სტრუქტურა წარმოადგენილია ტეტრამერის სახით და შედგება 4 თანაბარი 14,000 Da მოლეკულური მასის სუბერთეულისაგან (Van Damme 1996). ***Polygonatum odoratum***-ის ლექტინის ნატიური მოლეკულის მოლეკულური მასა შეადგენს 45,000 Da, წარმოადგენს ტეტრამერს და შედგება 4 თანაბარი 11,300 Da მოლეკულური მასის სუბერთეულისაგან (Liu, B. 2009; Li, C. 2014), ხოლო ***Polygonatum cyrtonema***-ს ლექტინს არ გააჩნია მეოთხეული სტრუქტურა ვინაიდან მისი, როგორც ნატიური ასევე სუბერთეულის მოლეკულური მასა შეადგენს 15,900 Da (Bao Jinki 1996).

ამრიგად, შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ საქართველოს ენდემური მცენარე მთის სვინტრის ***(Polygonatum obtusifolium Miscz)*** ფესურიდან, ჩვენს მიერ შემუშავებული მეთოდით მიღებულია ახალი, მანოზა-სპეციფიკური ლექტინი SABA-1. მისი ნატიური მოლეკულის მეოთხეული სტუქტურა წარმოდგენილია დიმერის სახით და შეესაბამება 30 kDa-ს, შედგება 2 თანაბარი მოლეკულური მასების მქონე სუბერთეულისაგან და მიეკუთვნება ჰოლოლექტინების კლასს.

3.13. ლექტინ SABA-1-ის გავლენა ადამიანის ავთვისებიანი სიმსივნის უჯრედებზე

როგორც ლიტერატურის მიმოხილვაში წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, მცენარეული ლექტინები ფართოდ გამოიყენება ბიომედიცინის სხვადასხვა სფეროში.

ლექტინებს იყენებენ როგორც სიმსივნური უჯრედების ზედაპირულ მარკერებს და შესაბამისად, ისინი წარმატებით გამოიყენება ონკოლოგიაში, როგორც

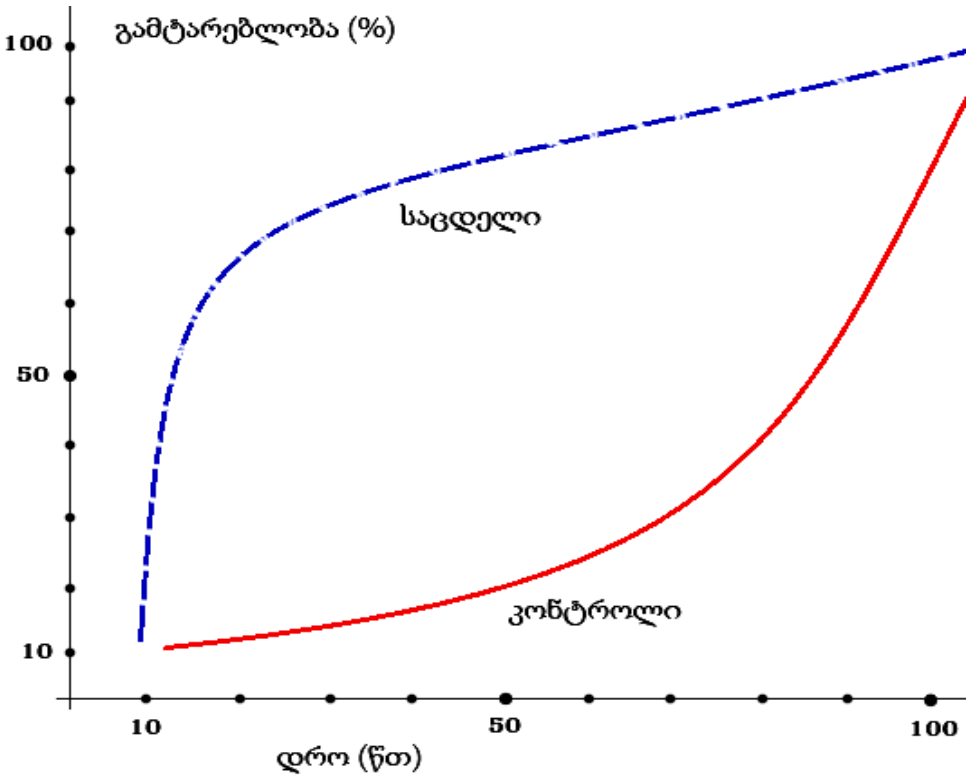
სადიაგნოსტიგო საშუალება. ამასთან ერთად, ბოლო წლებში დაგროვდა კარგად დოკუმენტირებული მასალა ლექტინების ანტისიმსივნური აქტივობის შესახებ. მაგალითად, ანტისიმსივნური მოქმედებით გამოირჩევიან გალაქტოზა-სპეციფიკური ლექტინები, კერძოდ კონ-A (typical legume lectin), თუმცა, ბოლო წლებში, გამოვლენია რიგი მანოზა-სპეციფიკური ანტისიმსივნური აქტივობის მქონე ლექტინებიც (Rabia Hamid et all, 2013).

ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, ჩვენთვის განსაკუთრებულ ინტერესს წარმოადგენდა შეგვესწავლა საქართველოს ენდემური მცენარე მთის სვინტრის ფესურიდან გამოყოფილი ახალი მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის ანტისიმსივნური მოქმედების შესაძლო მოლეკულური მექანიზმები.

3.13.1. ლექტინ SABA-1-ით სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაცია

ექპერიმენტებს ვატარებდით ადამიანის ავთვისებიანი სიმსივნის ქსოვილებიდან იზოლირებულ სიმსივნურ უჯრედთა მოკლევადიან სუსპენზიურ კუტურებზე, როგორც ეს კვლევის მეთოდებშია აღწერილი.

როგორც, ლიტერატურულ მიმოხილვაში მოყვანილი ლექტინების განმარტება განსაზღვრავს, ამ პოლივალენტურ, შაქრის დამკავშირებელ, ცილებს გააჩნიათ უნარი გამოიწვიონ ყველა იმ უჯრედების აგლუტინაცია, რომელთა ზედაპირზე განლაგებულია ლექტინის სპეციფიკური შაქრების შემცველი რეცეპტორები. შესაბამისად, პირველ ეტაპზე ვსწავლობდით ლექტინ SABA-1-ით ადამიანის ავთვისებიანი სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციის უნარს. უნდა აღინიშნოს, რომ სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაცია პლანშეტზე ვიზუალურად ძნელად ფიქსირდება, ამიტომ, სპეციალურ ცდებში, ვიყენებდით აგლუტინაციის განსაზღვრის ფოტოკოლორიმეტრულ მეთოდს (იხილეთ კვლევის მეთოდები). ვახდენდით ლექტინ SABA-1-ის ინკუბაციას სიმსივნურ უჯრედებთან, რაც იწვევდა სარეაქციო ხსნარში სხივის გამტარობის მკვეთრ ზრდას, კონტროლთან შედარებით.



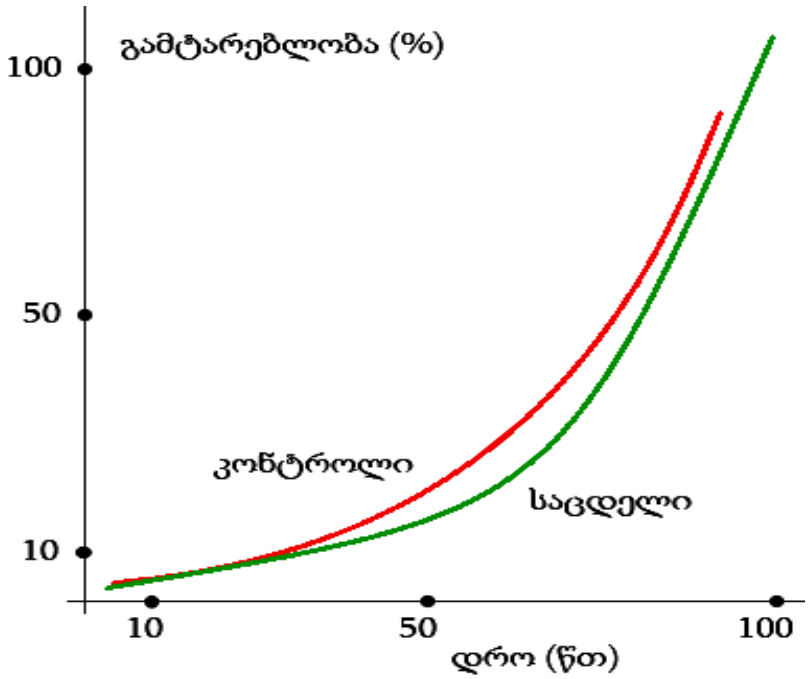
სურ.17. ლექტინ SABA-1-ით სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციის კინეტიკა ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით.

<u>საცდელი</u> - სიმსივნის უჯრედები ლექტინ SABA-1-ის თანაობისას.

<u>კონტროლი</u> - სიმსივნის უჯრედები ლექტინ SABA-1-ის გარეშე.

თუ გავითვალისწინებთ მექანიზმს, რომელიც საფუძვლად უდევს ლექტინების მიერ სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციას, შეიძლება გამოვთქვათ ვარაუდი, რომ ლექტინ SABA-1-ით სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაცია განპირობებული უნდა იყოს სიმსივნური უჯრედების ზედაპირზე არსებული სპეციფიკური რეცეპტორებით და/ან მათი მისაწვდომობით ლექტინ SABA-1-ისათვის.

ლექტინ SABA-1-ით სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციის მოლეკულური მექანიზმის შესასწავლად, გამოყენებული იქნა ჰაპტენ-ინჰიბიტორული ტექნიკა, რომელიც ითვალისწინებს ლექტინის შაქრის დამკავშირებელი ცენტრების ეკრანირებას სპეციფიკური შაქრებით. ასეთი მიდგომა იწვევს ლექტინის მიერ უჯრედების აგლუტინაციის დათრგუნვას.



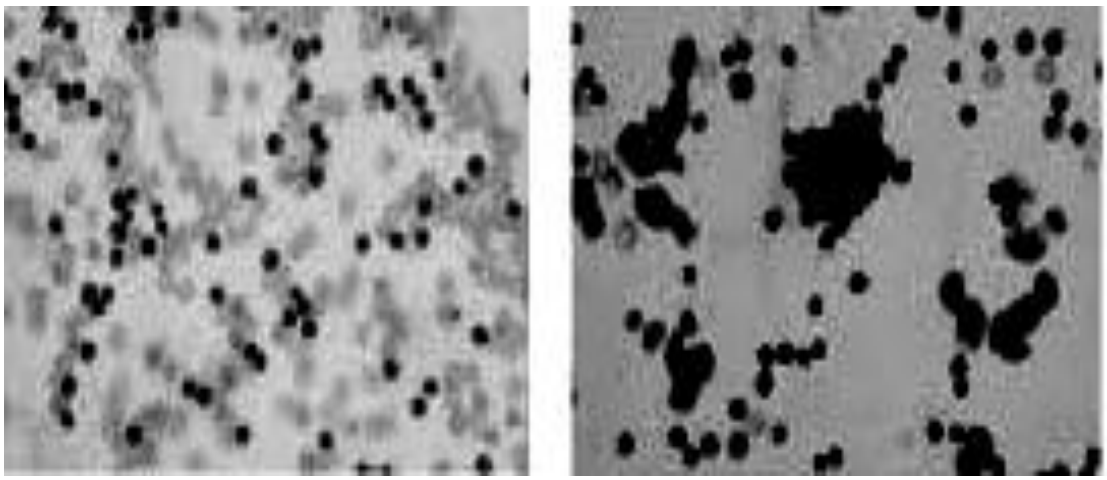
სურ.18. ლექტინ SABA-1-ით სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციის მანოზით ინჰიბირების განსაზღვრა ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით.

<u>საცდელი</u> - სიმსივნის უჯრედები ლექტინ SABA-ისა და მანოზას თანაობისას.

<u>კონტროლი</u> - სიმსივნის უჯრედები ლექტინის გარეშე.

როგორც სურ.18-იდან ჩანს ლექტინ SABA-1-ის პრეინკუბაცია მანოზასთან და ამის შემდგომ მისი ინკუბაცია ადამიანის ავთვიასებიანი სიმსივნის უჯრედების სუპენზიასთან არ იწვევს სინათლის გამტარებლობის ცვლილებას და ფაქტიურად კონტროლის ანალოგიურია.

სპეციალურ ექსპერიმენტებში შეწავლილი იქნა ლექტინ SABA-1-ით კანის სიმსივნის უჯრედების აგლუტინაცია. როგორც სურ.19-იდან ჩანს, ლექტინის გარეშე სიმსივნის უჯრედები დიფუზიურად არის გაბნეული სასაგნე მინაზე მოთავსებულ სარეაქციო არეში (1), ხოლო ლექტინთან ინკუბაციის შემთხვევაში წარმოქმნის შეწებებულ, ანუ აგლუტინირებულ, სიმსივნური უჯრედების გროვებს (2).



1 2

სურ.19. ლექტინ SABA-1-ით კანის სიმსივნის უჯრედების აგლუტინაცია სინათლის მიკროსკოპის ქვეშ.

1. <u>კონტროლი</u> - კანის სიმსივნური უჯრედები.

2. <u>საცდელი</u> - კანის სიმსივნური უჯრედები ლექტინი SABA-1-ის თანაობისას.

ამგვარად, მიღებული შედეგები მიუთითებენ, რომ ლექტინი SABA-1 სპეციფიკურად უკავშირდება ადამიანის სიმსივნურ უჯრედებს და იწვევს მათ აგლუტინაციას, შესაბამისად, ისახება პერსპექტივა, აღნიშნული ლექტინი გამოყენებულ იქნას ონკოლოგიაში სადიაგნოსტიკო საშუალებად, როგორც სიმსივნური უჯრედის ზედაპირული მარკერი.

3.13.2. ლექტინ SABA-1-ის ციტოტოქსიკური აქტივობა ადამიანის სიმსივნური უჯრედების მიმართ

ლექტინ SABA-1-ის დაკავშირება სიმსივნური უჯრედის ზედაპირზე ლოკალიზებულ მანოზას შემცველ რეცეპტორებთან, კლასიკური მაგალითია ლიგანდ-რეცეპრტორული ურთიერთქმედების, რომელიც საფუძვლად უდევს უჯრედში სასიგნალო ინფორმაციის გადაცემას. ცნობლია, რომ სიგნალის გადაცემა აინდუცირებს უჯრედის საპასუხო რეაქციებს, რომლებიც თვისობრივად დამოკიდებულია სასიგნალო ინფორმაციაზე. მაგალითად, სასიგნალო ინფორმაცაზე უჯრედის საპასუხო რეაქცია შეიძლება იყოს პროლიფერაციული აქტივობის მაინდუცირებელი ან პირიქით, მაინჰიბირებელი და სხვა.

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, სპეციალურ ექსპერიმენტებში შესწავლილი იქნა ლექტინ SABA-1-ის გავლენა ადამიანის ავთვისებიანი სიმსივნის უჯრედებზე. კერძოდ, შესწავლილი იქნა ლექტინ SABA-1-ის ციტოტოქსიკური მოქმედება სიმსივნური უჯრედების პირველად მოკლევადიან სუსპენზიურ კულტურებში (იხილე კვლევის მეთოდები).

ექსპერიმენტებში გამოყენებული იყო ადამიანის კანის, საკვერცხის, ფილტვისა და სარძევე ჯირკვლის ავთვისებიანი სიმსივნის ქსოვილები, რომლებსაც გვაწვდიდა თბილისის ნაციონალური ონკოლოგიური ცენტრი, ჩატარებული ოპერციის შემდგომ.

ცხრ.9-სა და სურ.20-ზე წარმოდგენილია სიმსივნური უჯრედების პირველად კულტურებზე ლექტინ SABA-1-ის სხვადასხვა კონცენტრაციების გავლენა. ასევე წარმოდგენილია ლექტინ SABA-1-ის ციტოტოკსიკურ აქტივობაზე, მისი სპეციფიკური შაქრის, მანოზას გავლენის შედეგები.

როგორც ცხრილსა და სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები გვიჩვენებენ ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია კარგად გამოხატული ციტოტოკსიკური აქტივობა ყველა ტიპის სიმსივნური უჯრედების პირველად კულტურებზე. შედეგები თვალნათლივ მიუთითებენ, რომ აღინიშნება პირდაპირი დადებითი კორელაცია ლექტინის მზარდ კონცენტრაციასა და მის ციტოტოქსიკურ აქტივობას შორის. კერძოდ, ნაჩვენებია რომ ლექტინის კონცენტაციის ზრდასთან ერთად იზრდება მისი ციტოტოკსიკური აქტივობა კიბოს უჯრედების მიმართ. ექსპერიმენტების შედეგები გვიჩვენებენ, რომ ლექტინ SABA-1-ის მაქსიმალური ციტოქსიკური ეფექტი კანის, საკვერცხის, ფილტვისა და სარძევე ჯირკვლის კიბოს უჯრედების მიმართ ფიქსირდება მისი 100 მკგ/მლ კონცენტრაციისას და შეადგენს 72, 60, 63 და 68%-ს შესაბამისად (ცხრილი 9).

ცხრილი 9.

ლექტინ SABA-1-ის ციტოტოკსიკური ეფექტი ადამიანის კანის, საკვერცხის, ფილტვისა და მკერდის სიმსივნეებიდან მიღებული კიბოს უჯრედების 48 საათიან სუსპენზიურ კულტურებზე.

სიმსივნის ტიპები	SABA-1 µg/ml	0	10	50	100	SABA-1+ D-მანოზა (400 mM)
კანის	AV	0.326	0.283	0.166	0.091	0.320
	NC (%)	100	87	51	28	100

	GI (%)	*0*	*13*	*49*	*72*	*0*
საკვერცხის	AV	0.318	0.218	0.176	0.130	0.315
	NC(%)	100	76	54	40	100
	GI (%)	*0*	*33*	*46*	*60*	*0*
ფილტვის	AV	0.328	0.277	0.179	0.121	0.329
	NC (%)	100	85	55	37	100
	GI (%)	*0*	*15*	*45*	*63*	*0*
მკერდი	AV	0.322	0.261	0.192	0.104	0.321
	NC (%)	100	80	59	32	100
	GI (%)	*0*	*20*	*41*	*68*	*0*

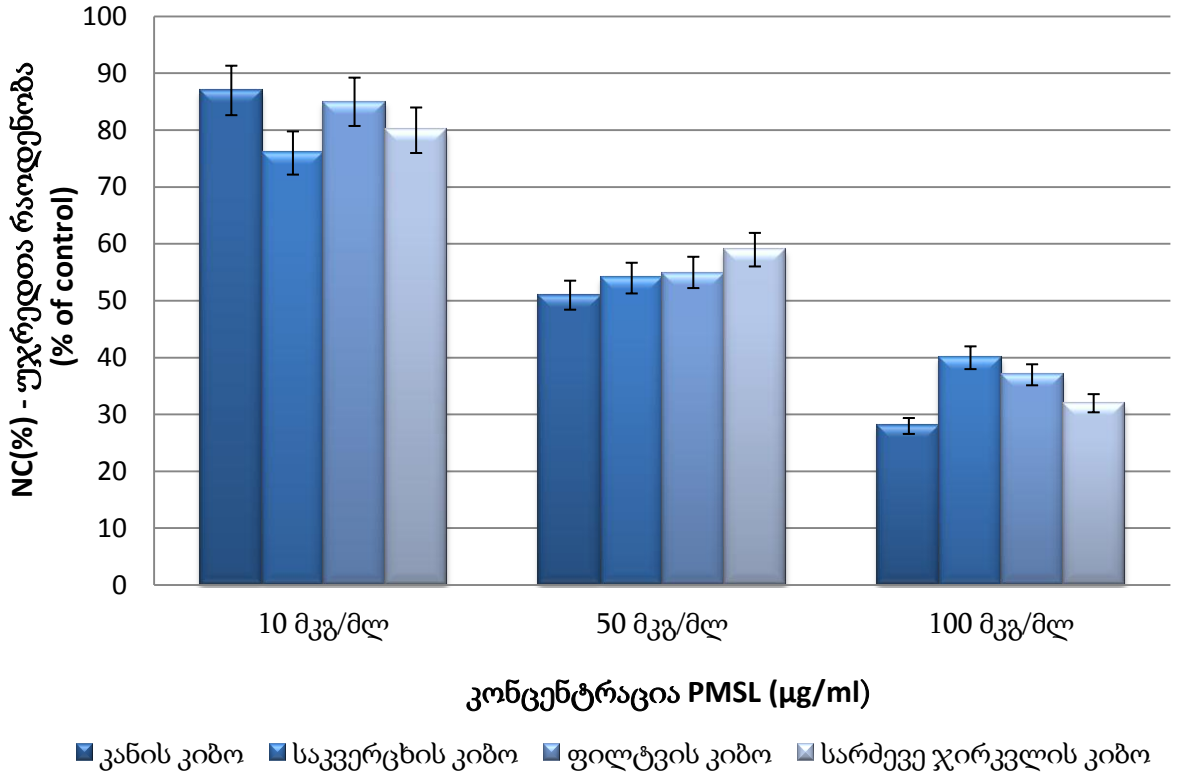
p<0.02

AV - **საშუალო სიდიდე (შთანთქმის ინდექსის სამჯერადი გაზომვის საშუალო მაჩვენებელი)**

NC (%) - უჯრედების რაოდენობა (% კონტროლიდან)

GI (%) - ზრდის ინჰიბირება %

როგორც ცხრილსა და სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები გვიჩვენებენ ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია კარგად გამოხატული ციტოტოკსიკური აქტივობა ყველა ტიპის სიმსივნური უჯრედების პირველად კულტურებზე. შედეგები თვალნათლივ მიუთითებენ, რომ აღინიშნება პირდაპირი დადებითი კორელაცია ლექტინის მზარდ კონცენტრაციასა და მის ციტოტოქსიკურ აქტივობას შორის. კერძოდ, ნაჩვენებია რომ ლექტინის კონცენტაციის ზრდასთან ერთად იზრდება მისი ციტოტოკსიკური აქტივობა კიბოს უჯრედების მიმართ. ექსპერიმენტების შედეგები გვიჩვენებენ, რომ ლექტინ SABA-1-ის მაქსიმალური ციტოქსიკური ეფექტი კანის, საკვერცხის, ფილტვისა და სარძევე ჯირკვლის კიბოს უჯრედების მიმართ ფიქსირდება მისი 100 მკგ/მლ კონცენტრაციისას და შეადგენს 72, 60, 63 და 68%-ს შესაბამისად (ცხრილი 9).



სურ. 20. ლექტინ SABA-1-ის ციტოტოკსიკური აქტივობა ადამიანის კანის, საკვერცხის, ფილტვისა და სარძევე ჯირკვლიდან იზოლირებულ კიბოს უჯრედების პირველად სუსპენზიურ კუტურებზე.

ცდების შემდგომ სერიებში SABA-1-ის კიბოს უჯრედებზე ციტოტოკსიკური მოქმედების მოლეკულური მექანიზმების გამოვლენის მიზნით შეწავლილი იქნა D-მანოზის გავლენა SABA-1-ის ციტოტოკსიკურ აქტივობაზე. ადრეულ პუბლიკაციებში ჩვენს მიერ ნაჩვენები იქნა, რომ SABA-1-ის შაქრის დამკავშირებელი ცენტრები მაღალ სპეციფიკურობას ავლენდნენ D-მანოზას მიმართ. როგორც ცხრ.9-ში წარმოდგენილ მონაცემებიდან ჩანს, SABA-1-ის ინკუბაცია D-მანოზასთან, რომელიც იწვევდა მისი შაქრის დამკავშირებელი ცენტრების ეკრანირებას, სრულად აინჰიბირებდა აღნიშნული ლექტინის ციტოტოკსიკურ აქტივობას ექსპერიმენტებში გამოკვლეული სიმსივნური უჯრედების მიმართ.

მიღებული შედეგები მიუთითებენ, რომ SABA-1-ის ციტოტოქსიკური ეფექტი კიბოს უჯრედებზე, განპირობებული უნდა იყოს მისი სპეციფიკური ურთიერთქმედებით სიმსივნური უჯრედების ზედაპირზე არსებული D-მანოზას

შემცველ მემბრანულ რეცეპტორებთან და აპოპტოზური (თვითგანადგურების) მაინდუცირებელი სიგნალის გადაცემით.

წარმოდგენილი კვლევის შედეგები საშუალებას გვაძლევენ გამოვთქვათ მოსაზრება, ლექტინ SABA-1-ის ონკოლოგიაში გამოყენების შესახებ. კერძოდ, ერთის მხრივ იგი წარმატებით შეიძლება იქნას გამოყენებული, როგორც სიმსივნური უჯრედების ზედაპირული მარკერების გამოსავლენი სადიაგნოსტიკო საშუალება, ხოლო, მეორეს მხრივ კი ბადებს პერსპექტივას, რომ ლექტინი SABA-1, დამატებითი კვლევების შემდეგ, დანერგილი იქნას კლინიკურ მედიცინაში, როგორც ანტიკანცეროგენული სამკურნალო საშუალება.

3.13.3. ლექტინ SABA-1-ის მიტოგენური აქტივობა ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების მიმართ

როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, ლექტინების მიერ უჯრედების აგლუტინაციის უნარი არ შემოიფარგლება ერითროციტებით. ლექტინები იწვევენ ადამიანისა და ცხოველური ორგანიზმის ისეთი უჯრედების აგლუტინაციასაც, როგორიცაა ლიმფოციტების სუბპოპულაციები, შესაბამისად მათ წარმატებით იყენებენ გარკვეული ტიპის ლიმფოციტების იზოლაციის მიზნით.

ლიტერატურული მონაცემებით ცნობილია ასევე, რომ ლექტინების სპეციფიკური დაკავშირება იმუნიტეტის რიგ უჯრედებთან იწვევს უჯრედის მემბრანის სტრუქტურულ-ფუნქციონალურ ცვლილებას და აინდუცირებს უჯრედში მიმდინარე პროცესებში მთელ რიგ ძვრებს. განსაკუთრებულ ყურადღებას იპყრობს ლექტინების მიტოგენური აქტივობა ლიმფოციტების მიმართ.

ბოლო წლებში ინტენსიურად მიმდინარეობს სამუშაოები ახალი მიტოგენური ლექტინების გამოსავლენად, რაც გამოწვეულია ლექტინი-მიტოგენების ფართო გამოყენებით იმუნოლოგიაში უჯრედების პროლიფერაციული პროცესების შესასწავლად და, რაც განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია, დარღვეული იმუნიტეტის აღმდგენი იმუნოტროპული სამკურნალო პრეპარატების შექმნის მიზნით.

საკითხის აქტუალობიდან გამომდინარე, შემდგომ ექსპერიმენტებში, შესწავლილი იქნა ლექტინ SABA-1-ის გავლენა ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარულ უჯრედებზე (ცხრ.10). კერძოდ, ვსწავლობდით ლექტინ SABA-1-ის

მიტოგენურ აქტივობას ლიმფოციტების მიმართ in vitro ექსპერიმენტებში MTT მეთოდის გამოყენებით.

ცხრილი 10.

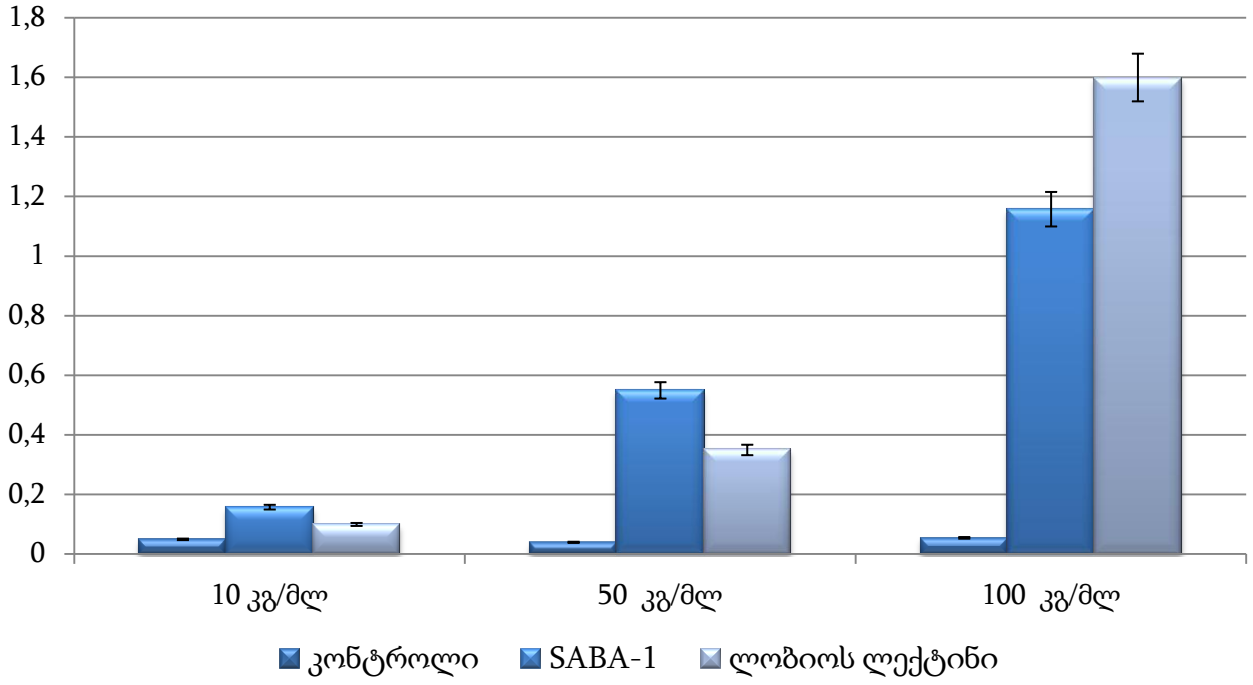
ლექტინ SABA-1-ის მიტოგენური აქტივობა ლიმფოციტების მიმართ in vitro ექსპერიმენტებში.

კონცენტრაცია (მკგ/მლ)	**კონტროლი** (AV)	**SABA-1** (AV)	**ლობიოს ლექტინი** (AV)
10	0.050	0.158	0.10
50	0.040	0.550	0.35
100	0.055	1.158	1.60

p<0.03

AV - საშუალო სიდიდე (შთანთქმის ინდექსის ხუთჯერადი გაზომვის საშუალო მაჩვენებელი).

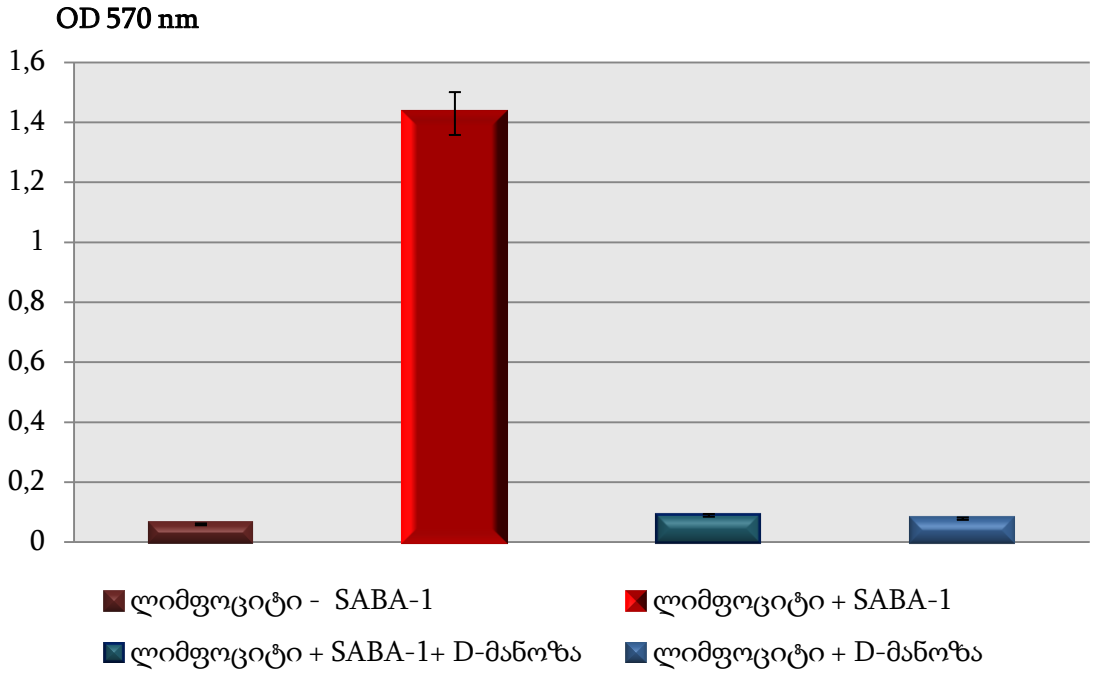
სურ.21-ზე ნაჩვენებია ლექტინ SABA-1-ისა და ლობიოს ლექტინის გავლენა პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების პროლიფერაციაზე. კონტროლთან შედარებით ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია მკვეთრად გამოხატული მიტოგენური აქტივობა. ჩატარებული კვლევები გვიჩვენებენ, რომ SABA-1-ის მიტოგენური აქტივობა, ლობიოს ლექტინის მსგავსად, დამოკიდებულია კონცენტრაციაზე და ეს დამოკიდებულება გამოიხატება მათ დადებით კორელაციაში. ლექტინ SABA-1-ის განსხვავებული მზარდი კონცენტრაციიდან (10, 50, 100 მკგ/მლ) მონონუკლეარული უჯრედებისათვის მაღალი მიტოგენური აქტივობა ფიქსირდებოდა 100 მკგ/ მლ კონცენტრაციის შემთხვევაში და შთანთქმის მაჩვენებელი შეადგენდა 1.158.



სურ.21. ლექტინ SABA-1-ის სხვადახვა კონცენტრაციის გავლენა ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების პროლიფერაციაზე.

SABA-1-ის მიტოგენური აქტივობის მოქმედების მოლეკულური მექანიზმების გამოვლენის მიზნით, ცდების შემდგომ სერიებში შეწავლილი იქნა D-მანოზას გავლენა SABA-1-ის მიტოგენურ აქტივობაზე.

როგორც სურ.22-დან ჩანს, SABA-1-ის (100 მკგ/მლ კონცენტრაცით) მოქმედების შედეგად გამოწვეული ლიმფოციტების პროლიფერაციული აქტივობა მნიშვნელოვნად (21-ჯერ) აღემატება კონტროლს. ნაჩვენებია ასევე, რომ SABA-1-ის ინკუბაცია D-მანოზასთან, სრულად აინჰიბირებს აღნიშნული ლექტინის მიტოგენურ აქტივობას.



სურ. 22. D-მანოზას გავლენა SABA-1-ის პროლიფერაციულ აქტივობაზე.

ამრიგად, მიღებული მონაცემები მოწმობენ, რომ ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია მკვეთრად გამოხატული მიტოგენური აქტივობა ადამიანის მონონუკლეარული უჯრედების მიმართ. ლექტინ SABA-1-ის მიტოგენურ აქტივობას საფუძვლად უდევს ლიმფოციტების ბლასტტრანსფორმაციის მაინდუცირებელი სიგნალის გადაცემა, რომელსაც უზრუნველყოფს მონონუკლეარული უჯრედების ზედაპირზე არსებულ მანოზას შემცველ მემბრანულ რეცეპტორებსა და ლექტინ SABA-1-ს შორის სპეციფიკური ურთიერთქმედება.

წარმოდგენილი კვლევის შედეგების საფუძველზე შეგვიძლია გამოვთქვათ მოსაზრება ლექტინ SABA-1-ის იმუნოლოგიაში გამოყენების პერსპექტივის შესახებ. კერძოდ, იგი შეიძლება წარმატებით იქნას გამოყენებული:

ა) მონონუკლეარული უჯრედების ზედაპირული ტოპოგრაფიის შესასწავლად;

ბ) როგორც, გარკვეული ტიპის მონონუკლეარული უჯრედების ზედაპირული მარკერების გამოსავლენი, სადიაგნოსტიკო და იზოლაციის საშუალებად;

დ) როგორც მიტოგენი, კლინიკურ მედიცინაში დაინერგოს იმუნოტროპულ საშუალებად.

დასკვნები

1. დადგენილია სვინტრის ორგანოებიდან ლექტინ SABA-1-ის საექტრაქციო ხსნარის ოპტიმალური შედგენილობა (0,9% NaCl, 40mM K^+-ფოსფატის ბუფერი, pH 7.4, 0,1% β-მერკაპტოეთანოლი) და ექსტრაქციის ოპტიმალური დრო (30 წუთი).
2. სამი განსხვავებული (მიკროსკოპული, პლანშეტზე მიკროტიტრაციისა და ფოტოკოლორიმეტრული) მეთოდით გამოვლენილია ლექტინ SABA-1-ის უნარი გამოიწვიოს ბოცვრის ტრიფსინიზირებული ერითროციტების, ადამიანის სხვადასხვა ტიპის კიბოს უჯრედების აგლუტინაცია. დადგენილია, რომ ლექტინი SABA-1 არ ადამიანის სისხლის I(0); II(A); III(B) და IV(AB) ჯგუფის ნატიური ერითროციტების აგლუტინაციას.
3. შესწავლილია ლექტინ SABA-1-ის შემცველობა სვინტრის მიწისზედა (ღერო, ფოთოლი, ყვავილი, თესლი) და მიწისქვედა (ფესვი, ფესურა, დამატებითი კვირტი) ორგანოებში. ნაჩვენებია, რომ ლექტინური აქტივობის ცილებს შეიცავს მცენარის მხოლოდ მიწისქვედა ორგანოთა ქსოვილები (ფესვი, ფესურა და დამატებითი კვირტი).
4. დადგენილია, რომ ლექტინის შემცველობა სვინტრის მიწისქვედა ნაწილის ორგანოებში განსხვავებულია და იცვლება მცენარის ფიზიოლოგიური მდგომარეობის მიხედვით. ნაჩვენებია, რომ ლექტინის ყველაზე მაღალი შემცველობით გამოირჩევა ფესურა, ხოლო ყველაზე დაბალი შემცველობით დამატებითი კვირტის ქსოვილები. გამოვლენილია, რომ ლექტინის ყველაზე მაღალი შემცველობა ფიქსირდება შემოდგომის ფესურაში.
5. დამუშავებულია სვინტრის ფესურიდან ლექტინ SABA-1-ის გამოყოფისა და გასუფთავების მეთოდი, რომელიც მოიცავს 7 სტადიას: 1. ფესურიდან ცილოვანი ექსტრაქტის მიღება; 2. ქრომატოგრაფია Toyopearl HW-55 -ის სვეტზე; 3. სვეტიდან ელუირებული SABA–1-ის შემცველი ცილების ფრაქციონირება ამონიუმის სულფატით; 4. თერმული დამუშავება +60^0 C-ზე 30 წთ-ის განმავლობაში; 5. აცეტონით დამუშავება; 6. ქრომატოგრაფია Toyopearl HW-55-ის სვეტზე; 7. აფინური ქრომატოგრაფია გლუტარალდეჰიდით ფიქსირებულ ერითროციტების

სვეტზე. მოწოდებული მეთოდი საშუალებას იძლევა ლექტინი გამოყოფილი იქნას ინდივიდუალური მოლეკულის სახით (გასუფთავების ხარისხი - 789) და მაღალი ჰემაგლუტინაციური აქტივობით (0.000095 მგ/მლ).

6. ლექტინი SABA-1 ნახშირწყალ-სპეციფიკურობას ავლენს D-მანოზის მიმართ. რის გამოც SABA-1 მივაკუთვნეთ მანოზა-სპეციფიკური ლექტინების კლასს.
7. ლექტინ SABA-1-ის ფიზიკურ-ქიმიური თვისებების შესწავლის შედეგად დაგენილ იქნა, რომ მას გააჩნია მეოთხეული სტრუქტურა და წარმოდგენილია დიმერის სახით. SABA-1-ის მოლეკულური მასა 30 kDa-ია და შედგება 2 თანაბარი მოლეკულური მასების მქონე სუბერთეულისაგან, არ შეიცავს ნახშირწყლებს და მიეკუთვნება ჰოლოლექტინების კლასს.
8. დადგენილ იქნა, რომ ლექტინი SABA-1 თერმოსტაბილურია, მაქსიმალურ ლექტინურ აქტივობას ავლინდება pH 7.0-8.0 ფარგლებში, ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე გავლენას არ ახდენს ორვალენტიანი იონები (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}).
9. ნაჩვენებია, რომ ლექტინი SABA-1 სპეციფიკურად უკავშირდება ადამიანის სიმსივნურ უჯრედებს და იწვევს მათ აგლუტინაციას. D-მანოზა აინჰიბირებს აღნიშნული ლექტინით სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციას.
10. ლექტინ SABA-1-ს ახასიათებს კონცენტრაციაზე დამოკიდებული ციტოტოკსიკური აქტივობა სიმსივნური უჯრედების პირველად კულტურებზე. D-მანოზას თანაობისას ლექტინის ციტოტოკსიკური აქტივობა კავდება.
11. დაგენილია, რომ ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია კონცენტრაციაზე დამოკიდებული მიტოგენური აქტივობა ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების მიმართ. ნაჩვენებია, რომ D-მანოზა აკავებს აღნიშნული ლექტინის მიტოგენური აქტივობას.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Алексидзе Г. Я., Выскребенцева Э. И. Субклеточная локализация лектинов в корнеплоде сахарной свеклы разного возраста// Физиология растений.-1986.-Т.33. С.213-216.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Королёв Н.П. Лектины – инструменты для исследования биологических мембран. Успехи современной биологии 1978. №3. 463-476.
6. Королёв Н.П. Функции лектинов в клетках. Итоги науки и техники.т.1.М.: Винити. 1984. -216 с.
7. Лахтин В.М. Лектины в исследовании белков и углеводов. Итоги науки и техники. 1987. т.2. -254с.
8. Лахтин В.М.. Лектины - регуляторы мета,олизма. Биотехнология. 1986, с.66-77.
9. 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.
10. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. -Львов: Выща Школа, 1981.с.66-77.
11. Любимова Н.В. Салькова Е.Г. Фитолектины во взаимоотношениях растений и патогенных микроорганизмов. 1985.
12. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.:Наука, 1985.-с.535.
13. Семенов И.Л., Выскребенцева Э. И., Алексидзе Г.Я. Структура и функции биологических мембран растений. Новосибирск: Наука, 1985. с.47-54.
14. Скоупс Р. Методы очистки белков. М. 1985. с.365.

15. Alexidze G.Ya., Litvinov A.I., Vyskrebenceva E.I.. The Model of Calvin Cycle Enzyme Organization on Thylakoid Mebranes with the Involvovement of the Photosystem 1 lectin. Russian Journal of Plant Physiology, 1987, 49, 1, pp.137-142.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Basu D., Appukuttan P.S. Plant lectins specific for N-acetil-α-D galactosamine. J. Bioscien., 1983, v.5, p.131-135.
20. 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.
21. Bao Jinku , Xu Pinglong , Zhou Hong , Zeng Zhongkui , Zou Jian., Study on molecular stability of Polygonatum crytonema Hua. lectin II. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2000, 16(1): pp.142-144.
22. Boezi J. A. Anew staining technique for proteins in polyacrilamide gels using Coomassie Brilliamt Blue G250. Anal. Biochem., 1977, v. 82, p. 580-582.
23. Borrebaeck C. A., Mattiasson B. O., Distribution of a lectin in tissues of Phaseolus vulgaris. Physiol. Plant, 1983, v. 5, p. 29-32.
24. Borrebaeck C. A., Carlson R. A Lectins as mitogens. B. Van Driessche E. Structure and function of Leguminosae lectins. In: Franz, H. (ed.) Advances in lectin research,Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York London, Paris, Tokyo, 1989, v. 1, 2 p. 10-22, 73-119.
25. Bowles D.J. Lectins of plant cells: Properties and possible functions. Elsevier biomedical press. 1982, p.171-176.

26. Bowles D.J. Lectins as componenet of plant membranes. Plant organelles, 1979, v. 9, p. 165-177.
27. Bowles D.J., Kauss H. Characterisation, enzymatic and lectin properties of isolated membranes from Phaseolus aureus. Biochem. Biophys.Acta,1976, v.243, p.360-374.
28. Boyd W., Requera R. Hemagglutinating substances in various plants. J. Immunol. 1949, v.62, p.333-339.
29. Boyd W.C. The lectins: their present status. Vox. Sang,. 1963, v. 8, p. 1-32.
30. Branden C., Tooze J.Intraduction to Protein Structure, Second edition, Garland Sci. Pub., 1999.
31. Breborowicz J., Filas V."Application of lectins for immunohistochemical studies of prostate". Book of abstracts Interlec 11. 1989, pp.11.
32. Brewin N.J., Development of the legume root nodule. Ann. Rev. Cell Biol., 1991, v.7, p.191-226.
33. Calvert H. E. et. Al. Role of lectins in plant microorganism interactions. Ultrastructural localization of soybean lectin-binding sites on Rhizobium japonicam. Canadian J. Microbiol., 1978, v. 24, p. 785-793.
34. Clarke A. Knox R., Jermyn M. Localization of lectins in legume cotyledons. J. Cell Sci., 1975, v.19, p.157-167.
35. Cunningham B., Hemperly J., Hopp T. Favin versus Con-A circularly permuted amino acid sequences. Pros. Natl. Acad. Sci., 1979, v. 76, p. 3218-3222.
36. Davis B. J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, pp. 404-427.
37. 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.
38. De Boeck, Lis H., Tilbergh H., Sharon N., Lootiens F. Binding of simple carbohydrates and some of their chromophoric derivatives to soybean agglutinin as followed by titrimeric procedures and stopped flow kinetics, J. Biol. Chem., 1984, v. 259.
39. De Mejia EG., 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.

40. 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.
41. Diaz CL., Spaink HP., Wijffelman CA. et al. "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.
42. Duk M., Lisowska E., Kordowicz M., Wasniowska K. Studies on the specificity of the binding site of Vicia graminea anti-N lectin. Eur. J. Biochem., 1982, v. 123, p. 105-112.
43. 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.
44. 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.
45. Etzler M. E. Distribution and properties of a lectin-like glycoprotein from leaves and stems of Dolichos biflorus: implications on the role of lectins in plant. J. Biosci, 1983, v. 5, suppl. 1, p. 1-7.
46. Etzler M. et al. Subcellular localizations of two Dolichos biflorus lectins. Plant Physiol., 1984, v. 76, p. 871-878.
47. 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. '' 1993; Europ. J. Immun. v-23 p.179-185.
48. Fett W. F., Sequeira L. A new bacterial agglutinin from soybean. Isolation, partial purification and characterization. Plant Physiol., 1980, v. 66, p. 847-852.
49. 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.
50. 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.
51. Franz H., Ziska P., Kindt A. Biochem. J., 195, 481-484, 1981.

52. Gabius H. J. Glycoscience. 1998.
53. 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.
54. 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.
55. Gagnidze R., Vascular Plants of Georgia: A Nomenclatural Checklist. 2005, pp.194.
56. 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.
57. Goldstein I.J., Poretz R.D. Isolation, physico-chemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins.Mol.Biol.:The lectins,1986,621-326
58. 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.
59. 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.
60. Gould N., Scheinberg S. Isolation and charactrisation of two anti-A phytohemagglutinins from Phaseolus lunatus (Thorogreen). Arch. Bioph. Bioch., 1970, v. 137, p. 1-9.
61. Gurtler L., Horstmann H. Subunits of toxin and agglutinin of Ricinus communis. Bioch. Bioph. Acta, 1973, v. 295, p. 582-594.
62. Hamblin J., Kent SP. ‘’Possible role of phytohaemagglutinin in Phaseolus vulgaris.’’ L. Nat. New. Biol. 1973, v.245, pp. 28-30.
63. Hamid R. and Masood A. Plant Lectins: A Biochemical study. Lap Lambert Acad. Publishing, 2010, pp. 232.
64. Hapner K. D., Hobbins J. E. Isolation and properties of a lectin from sainfoin (Onobrychis viciifolia). Biochim. Biophis. Acta, 1979, v. 580, p. 186-197.
65. 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.

66. Houston L. L., Dooley T. P. Binding of two molecules of 4-MUG or $-MU N-acetylgalactosamine to tha B chains of ricin and Ricinus communis agglutinin and to purified ricin B chain. J. Biol. Chem., 1982, v. 257.
67. 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.
68. Howard J., Shanon L., Oki L., Murashiga Soybean agglutinin. A mitogen for soybean callus cells. Exp.Cell. Res., 1977, v.107, p.448-450.
69. 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.
70. Hudgin R. L., Pricer W. E., Ashwell G., Stockert R. J., Morell A. G. The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, p. 5536-5543.
71. 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.
72. Jiang Q.-L., Zhang S., Tian M., Zhang S.-Y., Xie T., Chen D.-Y., Chen Y.-J., He J., Liu J., Ouyang L. and Jiang X. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. Cell proliferation. 2015. V. 48, Issue 1, pp 17–28.
73. 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.
74. Khan, H., M. Saeed and N. Muhammad., Pharmacological and phytochemical updates of Polygonatum. Phytopharmacology, 2012, 3: pp.286-308.
75. 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.
76. Kijne J. W., Schaal L. A. M., De Vries G. E. Pea lectins and the recognition of Rhizobium leguminosarum. Plant Sci. Lett., 1980, v. 18, p. 65-74.

77. Kocourek J., Horejsi V. A note on the resent discussion on definition of the term Lectin. Lectins Biol. Biochem. Clinical Biochem., 1983, v.3.
78. 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.
79. Kosourek j., Horejši V. A note on the resent discussion on definition of the term Lectin. Lectins Biol. Biochem.Clinical Biochem., v.3, 1983.
80. Kovatchev D. "Lectins as a tool in clinical immunological assays". Book of abstracts Interlec 11. 1989, pp.40.
81. Laemli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970, 227, 680-685.
82. Lamb J., Shibata S., Goldstein IJ. ''Purification and characterization of Griffonia simplicifolia leaf lectins.'' Plant Physiol. 1983, v. 71, p. 879-887.
83. Law I. J., Strijdom W. Rele of lectins in the specific recognition of Rhizobium by Lotononis bainesii. Plant Physiol., 1984, v. 74, p. 779-785.
84. Lee C., Levin A., Branton D. Cooper staining: Afive minute protein stain for polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry, 1987, v. 166, p. 308-312.
85. Li, C.; Chen, J.; Lu, B.; Shi, Z.; Wang, H.; Zhang, B.; Zhao, K.; Qi, W.; Bao, J.; Wang, Y. Molecular switch role of Akt in Polygonatum odoratum lectin-induced apoptosis and autophagy in human non-small cell lung cancer A549 cells. PLoS One 2014, 9, e101526.
86. Liener I. Phytohemagglutinins (phytolectins). Ann. Rev. Plant Physiol., 1976, v.27, p.291-319.
87. Lis H., Sharon N. Lectins as molecules and tools. Ann. Rev. Biochem., 1986, v.55, p.35-67.
88. Lis H., Sharon N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. Eur.J. Biochem., 1993, v.218, p. 1-27.
89. Lis H., Sharon N. The biochemistry of plant lectins phytohemaglutinins. Ann. Rev. Biochem., 1973, v.42, p.541-574.

90. Liu, B.; Zhang, B.; Min, M.W.; Bian, H.J.; Chen, L.F.; Liu, Q.; Bao, J.K. Induction of apoptosis by Polygonatum odoratum lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. Biochim. Biophys. Acta 2009, 1790, 840–844.
91. 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.
92. Luther P.,Theise H., Chatterjee B. The lectin from Viscum album: isolacion, characterization and structure. Int. J. Bioch., 1980, v. 11, p. 429-435.
93. 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.
94. Manen J. F., Pusztai A. Immunocytochemical localization of lectins in cell of Phaseolus vulgaris L. seeds. Planta, 1982, v. 155, p. 328-334.
95. Mailonier G., Privat J., Monsigny M., Kahlem G., Durand R. Isoelement, proptietes, physico-chim. Et localisation in vivo dune phytohemagglutine (lectine) de Phaseolus vulgaris L/ Physiol. Veg., 1973, v. 11, p. 519-537.
96. Mirelman D., Galun F., Sharon N., Lotan R. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. Nature, 1975, v. 256, p. 414-416.
97. Mishkind M., Raikhel N. V., Palevitz B. A., Keegstra K. Immunocytochemical localization of wheat germ agglutinin in wheat. 3. Cell Biol., v. 92, p. 753-764.
98. Morre A. L., Proudlove M. O. In isolation of membranes and organelles from plant cells, 1983, v. 30, p. 153.
99. Morten Bagge Hansen, Svend Erik Nielsen and Kurt Berg., Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell groeth/cell kill. Journal of Immunological Methods, 1989, 119, pp.203-210.
100. Mosmann T., Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Vytotoxicity Assays. Journal of Immunological Methods, 1983, 65, pp.55-63.
101. 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.

102. 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.

103. 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.

104. Pandolfino E., Christie D., Munske G. Activation of Con-A by Cd2+. J. Biol. Chem., 1980, v. 225, p.8772-8775.

105. Peng, H.; Lv, H.; Wang, Y.; Liu, Y.H.; Li, C.Y.; Meng, L.; Chen, F.; Bao, J.K. Clematis montana lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities. Peptides 2009, 30, 1805–1815.

106. Peumans W. J., Kellens J. T., Allen A. K., Van damme E. J. Isolation and characterisation of a seed lectin from edderberry (Sanbucus nigra L.) and its relationship to the bank lectins. Carbohydr. Res., 1991, v. 213, p. 7-17.

107. Peumans W.J., Van Damme E.J.M. Lectins as plant defence proteins. Plant Physiol., 1995, v. 109, pp.347-352.

108. Peumans W.J., Nsiba-lubeki M., Carlier A.R., Driessche V.E.. Planta, 1984, 160, 220-228.

109. Peumans W.J., Verhaert P. et al., FEBS Letters 396, 261-265, 1996.

110. Pistole Th. G. Interaction of Bacteria and Fungi with lectins and lectin-like substances. Ann. Rev. Microbiol. 1981. 35: 85-112 .

111. Quinn J. M., Etzler M. E. Isolation and characterization of a lectin from the roots of Dolichos biflorus. Arch. Biochem. Biophys., 1987, v. 258, p. 535-544.

112. 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.

113. Rajindar S. Sandhu, Ranbir S. Reen. Distribution, specificity and in vivo function of phytolectins. Lectins – Biology, Biochem., Clin. Biochem. Vol.2: Proc.of the Fourth lectin meeting. Copenhagen, June 1981.

114. 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.

115. 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.

116. 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.

117. 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.

118. Roberts D., Etzler M. Slime mold lectis. International rev. Of cytology, 1982, v. 75, p. 61-99.

119. 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.

120. Roberts D.D., Goldstein I.J. Adenine binding sites of the lectin from lima beans (Phaseolus lunatus L.). J. Biol. Chem., 1983, v. 258, pp. 13820-13824.

121. 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.

122. Rouge P. Edute de la phytohemagglutinine des grains de lectine au couns de la germination et des premiers stode du developpent de la plante. Evolution dans les cotyledons. C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D., 1974, v. 278, p. 449-452.

123. Rűdiger H. On the physiological role of plant lectins.Bioscience.1984.34.2.95- 99.

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

125. Sandeep K. Singh1, Seema Singh2, Sanjeev K Verma3, Piyush Jain1, Vinod K. Dixit1, Sanjeev Solanki1. 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.

126. Sequera L., Graham T.L. Agglutination of avirulent strains of Phaseolus solanacearum by potato lectin. Physiol. Plant Pathol., 1977, v.11, p. 43-54.

127. 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.

128. 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.

129. 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.

130. Shaanan B., Lis H., Sharon N. Structure of a legume lectin with an ordered N-linked carbohydrate in complex with lactose. Science, 1991, v. 254, p. 862-866.

131. Smmits K., Van Damme E. J., Peumens W. J. Developmental regulation of lectin and allinase synthesis in garlic bulbs and leaves. Plant Physiol., 1997, v. 113, p. 765-771.

132. 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.

133. Sze Kwan Lam and Tzi Bun Ng,. Lectins: production and practical applications., 2011, 89(1): 45–55.

134. 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.

135. Takatsy G., Symp. Series Immunobiol. Standar. 4, 275-280, 1967.

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

137. 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), p.469-71.

138. Tammy Yau , Xiuli Dan , Charlene Cheuk Wing Ng and Tzi Bun Ng. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. Molecules 2015, 20, 3791-3810;

139. 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: 2147-51.

140. 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.

141. Van Damme EJ1, Barre A, Rougé P, Van Leuven F, Balzarini J, Peumans WJ. Molecular cloning of the lectin and a lectin-related protein from common Solomon's seal (Polygonatum multiflorum). Plant Mol Biol. 1996 Jun;31(3):657-72.

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

143. 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.

144. 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.

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

146. Willy J. Peumans. Characterization and molecular cloning of two different type 2 ribosome-inactivating proteins from the monocotyledonous plant Polygonatum multiflorum. FEBS Journal. 2000, 267, (9) pp. 2746–2759.

147. 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.

148. Wright C. The crustal structure of wheat germ agglutinin at 2.2 A resolution. J. Mol. Biol., 1977, v. 111, p. 439-457.

149. Yang Y1, Xu HL, Zhang ZT, Liu JJ, Li WW, Ming H, Bao JK. Characterization, molecular cloning, and in silico analysis of a novel mannose-binding lectin from Polygonatum odoratum (Mill.) with anti-HSV-II and apoptosis-inducing activities. Phytomedicine. 2011, 15;18 pp. 8-9.

150. 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), p.247-59.

151. 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.