საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის
ქართული უნივერსიტეტი

ხელნაწერის უფლებით

ინფორმატიკის, მათემატიკისა და საბუნებისმეტყველო
მეცნიერებათა სკოლა (ფაკულტეტი)

საგანმანათლებლო პროგრამა - ბიოტექნოლოგია

ნინო დუმბაძე

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 ნაშრომის

სადისერტაციო მაცნე

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

თბილისი
2017 წელი

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

სამეცნიერო ხელმძღვანელი:

1. გიორგი ალექსიძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი.

2. ნუგზარ ალექსიძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი.

ოფიციალური ოპონენტები:

1. ნანა კოტრიკაძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი.

2. მადონა ჩაჩუა
ბიოლოგიის მეცნიერებათა აკადემიური დოქტორი.

დისერტაციის დაცვა შედგება 2017 წლის 10 თებერვალს, 12 საათზე.

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

მისამართი: 0162, თბილისი, ილია ჭავჭავაძის №53ა, II-კორპუსი, აკადემიკოს ილია ვეკუას სახელობის აუდიტორია №104.

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

სადისერტაციო მაცნე დაიგზავნა 2017 წლის 10 იანვარს.

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი

ტექნიკურ მეცნიერებათა
აკადემიური დოქტორი **თეიმურაზ კივილაძე**

სარჩევი

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა.....4
კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები.....5
ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და ძირითადი შედეგები 6
კვლევის თეორიული და მეთოდოლოგიური საფუძვლები.....7
ნაშრომის თეორიული ღირებულება.....8
ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა.....8
დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა.....9

ნაშრომის ძირითადი შინაარსი

თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა.....9
თავი II. კვლევის ობიექტი და მეთოდები.....9
თავი III. კვლევის შედეგები და მათი განხილვა.....10
დასკვნები.....18
დისერტაციის თემასთან დაკავშირებული
პუბლიკაციების ნუსხა.....20

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა

თანამედროვე ბიოლოგიის ერთ-ერთ ცენტრალურ საკითხს ბიოლოგიური ამოცნობის ფენომენი წარმოადგენს. უკანასკნელ ხანებში სულ უფრო მკვიდრდება აზრი იმის შესახებ, რომ ბიოლოგიური ამოცნობის ფუნქციის მატარებელია გარკვეული ტიპის ნახშირწყლები და მათთან სპეციფიკური დაკავშირების უნარის მქონე ცილები – ლექტინები (A. Pusztai, et all., 2008).

ლექტინები პირველად აRმოჩენილი იქნა მცენარეებში ჯერ კიდევ 1888 წელს. დღეისათვის ასობით მცენარეული ლექტინია გამოყოფილი და ბიოქიმიურად დახასიათებული. ლექტინების უნიკალური თვისების გამო ისინი წარმატებით გამოიყენება ბიოლოგიაში, ბიომედიცინაში, ბიოტექნოლოგიაში, სოფლის მეურნეობაში, მედიცინასა და მეცნიერების სხვა სფეროებში, როგორც კვლევის ინსტრუმენტები, აფინური ადსორბენტები სხვადასხვა გლიკოკონიუგატების, უჯრედებისა და ორგანელების გამოსაყოფად; როგორც სპეციფიკური ბიოლოგიური ზონდები მემბრანების ნახშირწყლოვანი ტოპოგრაფიის დასადგენად; აRმოჩნდა, რომ მათ ხშირად ჰორმონული მოქმედების უნარი გააჩნიათ, იწვევენ უჯრედების პროლიფერაციას, გააჩნიათ იმუნოტროპული, ანტიმიკრობული, ანტივირუსული, ანტისიმსივნური მოქმედების უნარი და სხვა (R. Hamid et all., 2010).

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 უშუალო მონაწილეობას უნდა ღებულობდნენ მცენარისათვის ისეთი სასიცოცხლო მნიშვნელობის პროცესებში, როგორიცაა: განაყოფიერება, ზრდა და განვითარება, ნივთიერებათა ტრანსპორტი, ჰორმონების მსგავსი მოქმედება, ფიტოიმუნიტეტი, სიმბიოზი და სხვა (J. M. Van Damme tt all.,2000).

ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, მცენარეულ ობიექტებში ლექტინების გამოვლენა და მათი ფიზიოლოგიური და ბიოლოგიური ფუნქციების შესწავლა წარმოადგენს თანამედროვე

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

კვლევის ძირითადი მიზანი და ამოცანები

სადისერტაციო ნაშრომის ძირითად მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა ხალხურ მედიცინაში ფართოდ გამოყენებული საქართველოს ენდემური სამკურნალო მცენარე, მთის სვინტრის ***(Polygonatum obtusifolium Miscz.)*** (R. Gagnidze. 2005) ლექტინების ფიზიოლოგიური როლი მცენარის ქსოვილთა უჯრედებში, მოგვეხდინა მისი იდენტიფიკაცია და ბიოლოგიური აქტივობის შესწავლა, რაც ერთის მხრივ გააფრთოვებდა წარმოდგენებს მცენარეული ლექტინების ბიოლოგიური როლის შესახებ და მეორეს მხრივ შექმნიდა წინაპირობას მისი, სოფლის მეურნეობაში, ბიოტექნოლოგიაში, ბიომედიცინაში, მედიცინაში და მეცნიერების სხვა სფეროებში შესაძლო გამოყენების შესახებ.

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

- გამოგვევლინა მცენარე სვინტრში ლექტინური აქტივობის მქონე ცილები.
- შეგვესწავლა მათი შემცველობა მცენარე სვინტრის სხადასხვა ორგანოთა ქსოვილებში.
- დაგვედგინა მათი შემცველობის განაწილება მცენარის ფიზიოლოგიური მდგომარეობით მკვეთრად განსხვავებულ სხადასხვა ორგანოთა ქსოვილებში.
- დაგვემუშავებინა მცენარე სვინტრიდან ლექტინის ინდივიდუალური მოლეკულების სახით გამოყოფისა და გასუფთავების მეთოდი.
- შეგვესწავლა ლექტინის ინდივიდუალური მოლეკულის ფიზიკურ-ქიმიური თვისებები.
- მოგვეხდინა ლექტინის ინდივიდუალური მოლეკულის ბიოქიმიური თვისებების შესწავლა.
- შეგვესწავლა სვინტრის ლექტინის ანტიკანცეროგენული აქტიურობა ადამიანის კიბოს უჯრედებზე.

- შეგვესწავლა სვინტრის ლექტინის იმუნომოდულატორული აქტიურობა ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონულეარულ უჯრედებზე.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და ძირითადი შედეგები

ნაშრომის მეცნიერულ სიახლეს წარმოადგენს ჩვენს მიერ დამუშავებული მეთოდით მანოზა-სპეციფიკური ახალი ლექტინის (SABA-1) იდენტიფიკაცია საქართველოს ენდემური სამკურნალო მცენარე მთის სვინტრიდან *(Polygonatum obtusifolium Miscz.)*, მიღებული მონაცემები მოცემული ლექტინის ფიზიკური-ქიმიური და ბიოქიმიური თვისებების, ფიზიოლოგიური როლისა და მულტი ბიოლოგიური აქტივობების შესახებ. ნაჩვენებია, რომ ლექტინური აქტივობის ცილებს შეიცავს მცენარის მხოლოდ მიწისქვედა ორგანოები (ფესვი, ფესურა და კვირტი). ნაჩვენებია, რომ ლექტინის ყველაზე მაღალი შემცველობით გამოირჩევა ფესურა, ხოლო ყველაზე დაბალით კვირტის ქსოვილები. გამოვლენილია, რომ ლექტინის მაღალი შემცველობა ფიქსირდება მცენარის ზრდადამთავრებულ, მოსვენების სტადიაზე მყოფ მიწისქვედა ორგანოთა 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 გამოყოფისა და გასუფთავების ახალი მეთოდი. მოწოდებული მეთოდი საშუალებას იძლევა მიღებული ლექტინი გამოყოფილი იქნას ინდივიდუალური მოლეკულის სახით (გასუფთავების ხარისხი - 789) და მაღალი პემაგლუტინაციური აქტივობით (0.000095 მგ/მლ)

ნაჩვენებია, რომ ანალიზირებული 18 განსხვავებული ტიპის ნახშირწყლებიდან სვინტრის ფესურიდან იზოლირებული ლექტინი სპეციფიკურობას ავლენს მხოლოდ D-მანოზის მიმართ, რაც მიუთითებს, რომ იგი მიეკუთვნება მანოზა-სპეციფიკური ლექტინების კლასს.

მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის ფიზიკო-ქიმიური თვისებების შესწავლამ გამოავლინა, რომ მისი ნატიური

მოლეკულის მეოთხეული სტუქტურა წარმოდგენილია დიმერის სახით და მისი მოლეკულური მასა შეესაბამება 30 kDa-ს, შედგება 2 თანაბარი მოლეკულური მასების მქონე სუბერთეულისაგან, არ შეიცავს ნახშირწყლებს და მიეკუთვნება მეროლექტინების კლასს.

მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის ბიოქიმიური თვისებების შესწავლის შედეგად, დადგენილ იქნა, რომ ლექტინი თერმოსტაბილურია (ინაქტივირდება 60^0C-ზე) და ხასიათდება მაღალი ჰემაგლუტინაციური აქტივობით. ლექტინური აქტიურობა ვლინდება pH-ის ფართო დიაპაზონში (pH 5.5-დან pH 9.0-მდე) და მაქსიმალური აქტიურობა აღინიშნება pH 7.0-8.0 ფარგლებში, ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტიურობაზე გავლენას არ ახდენს ორვალენტიანი მეტალის იონები (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}).

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

კვლევის თეორიული და მეთოდოლოგიური საფუძვლები

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 გელფიტ-რაციული ქრომატოგრაფიის, აფინურ სორბენტებზე აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდები; პრეპარატული და ანალიზური ელექტროფორეზი პოლიაკრილამიდის გარდიენტულ გელში; 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 ანალიზისა და მულტისკანის გამოყენებით.

ნაშრომის თეორიული ღირებულება

სადისერტიაციო ნაშრომში წარმოდგენილი შედეგები აღრმავებენ თეორიულ ცოდნას მცენარეული ლექტინების ფიზიოლოგიური როლის შესახებ. მიღებული შედეგების საფუძველზე გამოთქმულია მოსაზრება მცენარეული ლექტინების დამცველობითი ფუნქციების შესახებ. კვლევის შედეგები ქმნის ფუნდამენტს ლექტინების დამცველობითი ფუნქციების საველე პირობებში შესწავლისათვის და სახავს პერსპექტივას, რომ სოფლის მეურნეობაში ისინი გამოყენებულ იქნან, როგორც მცენარეების ანტიმიკრობული ბუნებრივი აგენტები. წარმოდგენილი კვლევის შედეგები აღრმავებს მეცნიერულ ცოდნას ლექტინების ანტისიმსივნური და იმუნოტროპული მოქმედების მოლეკულური მექანიზმების შესახებ.

ნაშრომის პრაქტიკული ღირებულება.

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, რომ ლექტინ SABA-1-ს მცენარე სვინტრში გააჩნია დამცველობითი როლი, რომ ლექტინი SABA-1 შესაძლოა

გამოყენებულ იქნას ონკოლოგიასა და იმუნოლოგიაში როგორც სადიაგნოსტიკო და კვლევის საშუალება და არსებობს პერსპექტივა იმისა, რომ კლინიკურ მედიცინაში ლექტინი SABA-1 დაინერგოს, როგორც ანტიკანცეროგეული და იმუნოტროპული სამკურნალო პრეპარატი.

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა.

დისერტაცია მოიცავს: შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას, კვლევის ობიექტს და მეთოდებს, კვლევის შედეგებს და განხილვას, დასკვნებს, გამოყენებული ლიტერატურის სიას (151 წყარო). იგი ილუსტრირებულია 10 ცხრილით და 22 სურათით. ნაშრომის მოცულობა 117 გვერდია.

ნაშრომის ძირითადი შინაარსი

თავი I. ლიტერატურის მიმოხილვა

ლიტერატურის მიმოხილვაში წარმოდგენილია მცენარეული ლექტინების ისტორიული მიმოხილვა და განმარტება, ლექტინების კლასიფიკაცია. განხულულია ლექტინების ბიოქიმიური თვისებები, ლექტინების სპეციფიკურობა ნახშირწყლების მიმართ, ლექტინების გავრცელება მცენარეებში, მათი განაწილება მცენარეთა ორგანოებსა და ქსოვილებში და მათი შემცველობის დინამიკა. წარმოდგენილია ლიტერატურული მონაცემები და სხვადასხვა კონცეფციები მცენარეებში ლექტინების ფიზიოლოგიური როლის შესახებ. განხილულია ლექტინების როლი მცენარის ზრდა-განვითარების, მცენარეთა განაყოფიერების, მცენარეთა დაცვის, სიმბიოზის, ნახშირწყლების ტრანსპორტისა და დაგროვების პროცესებში. განხილულია ლექტინების გამოყენების სფეროები მეცნიერების სხდახვა დარგებში. წარმოდგენილია კვლევის შედეგები ლექტინების ანტისიმსივნური და იმუნომოდულატორული აქტივობის შესახებ.

თავი II. კვლევის ობიექტი და მეთოდები

კვლევის ობიექტი. სადისერტაციო ნაშრომში კვლევის ობიექტად შერჩეული იქნა ხალხურ მედიცინაში ფართოდ გამოყენებული საქართველოს ენდემური სამკურნალო მცენარე, მთის სვინტრი ***(Polygonatum obtusifolium Miscz.)***. სამეცნიერო ლიტერატურაში ცნობილია, რომ სვინტრი ფართოდ გამოიყენება

ადამიანის მრავალი დაავადებების პრევენციისა და მკურნალობის მიზნით. ექსპერიმენტებში გამოყენებული იქნა სვინტრის როგორც მიწისზედა (ღერო, ფოთოლი, კვირტი, ყვავილი და თესლები) ასევე მიწისქვეშა ნაწილები (ფესურა, ფესვი და დამატებითი კვირტები).

კვლევის მეთოდები. ნაშრომში გამოყენებულია ბიოქიმიური, მცენარეთა ფიზიოლოგიის, იმუნოლოგიისა და ადამიანის უჯრედთა სუსპენზიური კულტურების თანამედროვე მეთოდები და ხელსაწყო-დანადგარები. შემუშავებულია ლექტინის გამოყოფისა და გასუფთავების მეთოდი, სადაც გამოყენებული იქნა ექსტრაქციის, ფილტრაციის, ულტრა და სტერილიზაციური ფილტრაციის, ცენტრიფუგირების, ამონიუმის სულფატით ფრაქციონირების, მაღალი წნევის, თხევადი ქრომატოგრფიისა და აფინური ქრომატოგრაფიის მეთოდები.

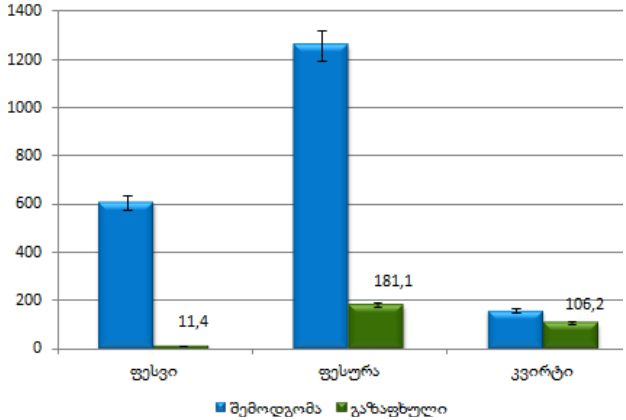
ლექტინის ფიზიკურ-ქიმიური დახასიათების მიზნით გამოყენებულია მაღალი წნევის გელ-ფილტრაციული ქრომატოგრაფიის, ნატიური და დისოცირებულ პირობებში ცილების გრადიენტული ელექტროფორეზის, შაქრების მიმართ სპეციფიკურობის დადგენის ტაკაჩისა და სხვა მეთოდები. ლექტინის შემცველობას, აქტიურობასა და სპეციფიკურ აქტიურობას ვსაზღვრავდით სამი განსხვავებული მეთოდით: ტაკაჩის მეთოდით (ვიზუალურად იმულოგიურ პლანშეტებზე), ჩვენს მიერ შემუშავებული ფოტოკოლორიმეტრული მეთოდით და სინათლის მიკროსკოპის გამოყენებით. ადამიანის კიბოსა და პერიფერიული სისხლის მონონუკლელურ უჯრედებს ვღებულობდით ჯანმრთელი და სიმსივნით დაავადებული დონორებიდან შესაბამისი სადიაგნოსტიკო დოკუმენტაციის თანხლებით. ციტოტოკსიკურ და მიტოგენურ აქტიურობას ვსაზღვრვდით in vitro ექსპერიმენტებში მოკლევადიან უჯრედთა სუსპენზიურ კულტურებზე MTT-მეთოდისა და მულტისკანის გამოყენებით.

კვლევის შედეგებს ვამუშავებდით სტატისტიკურად სტიუდენტის კრიტერიუმის გამოყენებით.

თავი 3. კვლევის შედეგები და მათი განხილვა

კვლევის პირველ ეტაპზე შესწავლილ იქნა ლექტინის შემცველობა სვინტრის მიწისზედა (ღერო, ფოთოლი, ყვავილი) და მიწისქვეშა (ფესვი, ფესურა და კვირტი) ნაწილებში. კვლევის შედეგებმა გამოავლინეს, რომ ლექტინური აქტივობის ცილებს შეიცავდა მხოლოდ სვინტრის მიწისქვეშა ნაწილები (ფესვი, ფესურა, დამატებითი კვირტი).

კვლევის მეორე ეტაპზე ექსპერიმენტებში შესწავლილ იქნა მცენარე სვინტრის, ფიზიოლოგიური მდგომარეობით მკვეთრად განსხვავებული (გაზაფხულსა და შემოდგომაზე მოპოვებული), მზარდ და ზრდადსრულებულ მიწისქვედა ორგანოებში (ფესვი, ფესურა და დამატებითი კვირტი) მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის (SABA-1) შემცველობა და განაწილება. ასეთ მიდგომას უნდა გამოევლინა, ლექტინის ბიოლოგიურ ფუნქციასთან მიმართებით, ახალი კანონზომიერებები.



სურ.1. ლექტინების შემცველობა მზარდ და ზრდადასრულებულ (გაზახულისა და შემოდგომის) სვინტრის მიწისქვეშა ნაწილებში.

როგორც სურათიდან ჩანს, შემოდგომის ფესურაში ყველაზე მაღალია ლექტინის შემცველობა და იგი 10-ჯერ აღემატება გაზაფხულის ფესურაში ლექტინის შემცველობას.

კვლევის შემდეგ ეტაპზე შემუშავებული იქნა სვინტრის ფესურიდან ლექტინ SABA–1-ის გამოყოფისა და გასუფთავების მეთოდი. გასუფთავების ყოველ ეტაპზე ისზღვრებოდა ა ცილოვანი

ფრაქციების ჰემაგლუტინაციური აქტიურობა და ლექტინ SABA – 1-ის გასუფთავების ხარისხი. სვინტრის ფესურის ლექტინის გასუფთავების ძირითადი ეტაპები მოიცავდა 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.

აღნიშნული მეთოდის გამოყენებით სვინტრის ფესურის უხეში ექსტრაქტიდან მიღებული იქნა ლექტინ SABA–1 ინდივიდუალური მოლეკულების სახით და გასუფთავების ხარისხმა შეადგენდა 789.

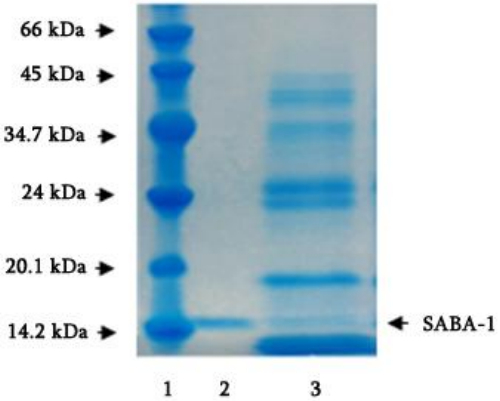
კვლევის შემდგომ ეტაპზე შეწავლილ იქნა ლექტინ SABA-1-ის ბიოქიმიური თვისებები და მახასიათებლები.

ცდების სპეციალურ სერიებში შევისწავლეთ ლექტინ SABA-1-ის სპეციფიკურობა სხვადასხვა ტიპის ნახშირწყლების მიმართ:Gგალაქტოზა, მეთილ-გალაქტოზა, D-მანოზა, D-გლუკოზა, რამნოზა, N-აცეტილ-D-გლუკოზამინი, გალაქტურონის მჟავა, ფრუქტოზა, ინოზიტი, არაბინოზა, რიბოზა, მელიბიოზა, ლაქტოზა, ცელობიოზა, საქაროზა, რაფინოზა და α-მეთილ-მანოპირანოზიდი. აღნიშნული 18 ნახშირწყლის ანალიზის შედეგად დაგენილ იქნა, რომ SABA-1-ის ჰემგლუტინაციურ აქტიურობას თრგუნავდა მხოლოდ D-მანოზა და α-მეთილ-მანოპირანოზიდი, მინიმალური კონცენტრაციით 50 და 25 mM შესაბამისად.

კვლევის შემდგომ სერიებში, მაღალი წნევის გელ-ფილტრაციის ქრომატოგრაფიული მეთოდისა და საკალიბრო სტანდარტული ცილების (მარკერების) გამოყენებით, დაგენილ იქნა აფინურად გასუფთავებული SABA-1-ის ინდივიდუალური, ნატიური მოლეკულური მასა. საკალიბრო მრუდის გათვლების მიხედით დადგენილი იქნა, რომ ნატიური SABA–1-ის მოლეკულური მასა შეადგენდა 30 000 Da.

SABA-1-ის მეოთხეული სტრუქტურის დასადგენად, ცდების შემდგომ ეტაპზე, ვახდენდით ნატიური SABA-1 მოლეკულების დენატურაციას ნატრიუმის დოდეცილსულფატის თანაობისას

(SDS) და მის ელექტროფორეზს პოლიაკრილამიდის გელში (სურ.2).

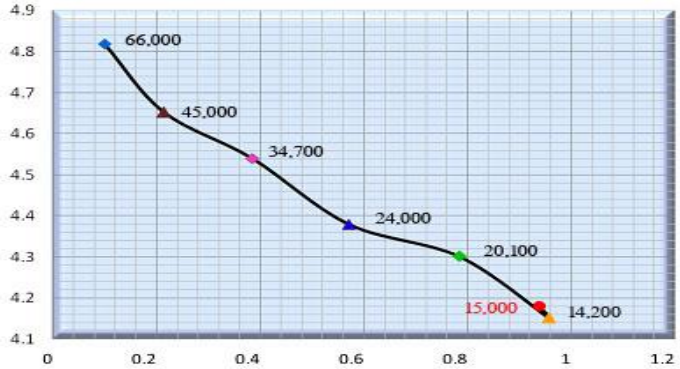


სურ.2. ლექტინი SABA–1-ისა და სტანდარტული მარკერული ცილების ელექტროფორეგრამა. ელექტროფორეზი დისოცოაციის პირობებში (SDS-თანაობისას) პოლიაკრილამიდის გრადიენტულ გელში (10-25%).

1. მარკერები, მოლეკულური წონების დიაპაზონია: 14 000–70 000 Da, გელში ჩატვირთული სინჯების მოცულობაა 1-10 მკლ. (ხარის შრატის ალბუმინი- 66 000; ოვალბუმინი-45 000; პეპსინი-34 700; ტრიფსინოგენი -24 000; β-ლაქტოგლობულინი -20 100; ლიზოციმი-14 200).
2. ლექტინი SABA-1, აფინური ქრომატოგრაფიით გასუფთავებული.
3. Toyopearl HW-55 სვეტზე გელფილტრაციული ქრომატოგრაფიის შედეგად მიღებული ლექტინ SABA-ის შემცველი ცილების ფრაქცია.

ელექტროფორეგრამაზე ტრეკი 2 გვიჩვენებს, რომ აფინური ქრომატოგრაფიის შედეგად გასუფთავებული SABA-1, დისოცირებულ პირობებში მიგრირებს ერთი კომპაქტური ზოლით, რაც ადასტურებს, რომ იგი წარმოადგენს გასუფთავების შედეგად მიღებულ SABA-1-ის ინდივიდულარ პოლიპეპტიდებს თანაბარი მოლეკულური მასებით.

Log.Mol.Weight



Rf

სურ.3. ლექტინ SABA-1-ისა და სტანდარტული მარკერული ცილების ელექტროფორეგრამის მიხედვით აგებული საკალიბრო მრუდი.

სურ.3-ზე წარმოდგენილი საკალიბრო მრუდის სასუალებით დაგენილ იქნა, რომ ლექტინ SABA-1-ის შემადგენელი სუბერთეულების მოლეკულური მასა თანაბარია და შეადგენდა 15.000 Da. ამრიგად გელფილტრაციისა და ელექტროფორეზის მეთოდების გამოყენებით ნაჩვენები იქნა, რომ SABA-1-ის ნატიური მოლეკულის მასა 30 000 Da-ია და შედგება ორი თანაბარი, 15 000 Da მოლეკულური მასის მქონე, პოლიპეპტიდური სუბერთეულისაგან, შესაბამისად მისი მეოთხეული სტრუქტურა წარმოდგენილია ჰომოდიმერის სახით და მიეკუთვნება ჰოლოლექტინების კლასს.

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. როგორც ცხრილ 1-სა და სურ. 4 -ზე წარმოდგენილი მონაცემები გვიჩვენებენ ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია კარგად გამოხატული ციტოტოკსიკური აქტიურობა, შესწავლილ (ადამიანის კანის, ფილტვის, საკვერცხისა და სარძევე ჯირკვლის) სიმსივნური უჯრედების პირველად

კულტურებზე. შედეგები თვალნათლივ მიუთითებენ, რომ აღინიშნებოდა პირდაპირი დადებითი კორელაცია ლექტინის მზარდ კონცენტრაციასა და მის ციტოტოქსიკურ აქტიურობას შორის. როგორც ცხრილი 4-დან ჩანს 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 1.

ლექტინი SABA-1-ის ციტოტოკსიკური ეფექტი ადამიანის კანის, ფილტვის, საკვერცხის და მკერდის სიმსივნური ქსოვილებიდან მიღებულ 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	67	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***
სარძევე ჯირკვლის	AV	0.322	0.261	0.192	0.104	0.321
	NC(%)	100	80	59	32	100
	GI (%)	***0***	***20***	***41***	***68***	***0***

$p<0.01$

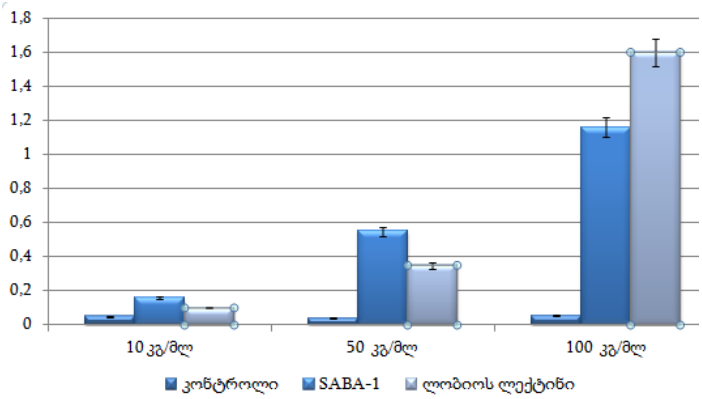
AV - საშუალო სიდიდე (შთანთქმის ინდექსის სამჯერადი გაზომვის საშუალო მაჩვენებელი).

NC(%) - უჯრედების რაოდენობა (% კონტროლიდან).

GI (%) - ზრდის ინჰიბირება %-ში.

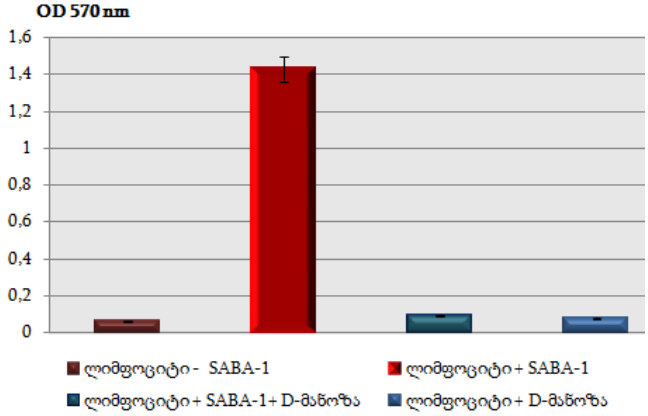
ცდების შემდგომ სერიებში შეწავლილი იქნა D-მანოზის გავლენა SABA-1-ის ციტოტოკსიკურ აქტიურობაზე. როგორც ცხრილში წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, SABA-1-ის ინკუბაცია D-მანოზასთან სრულად აინჰიბირებდა აღნიშნული ლექტინის ციტოტოკსიკურ აქტიურობას. მიღებული შედეგები მიუთითებენ, რომ SABA-1-ის ციტოტოქსიკური ეფექტი კიბოს უჯრედებზე, განპირობებული უნდა იყოს მისი სპეციფიკური ურთიერთქმედებით კიბოს უჯრედების ზედაპირზე არსებული D-მანოზის შემცველ მემბრანულ რეცეპტორებთან და აპოპტოზური (თვითგანადგურების) მაინდუცირებელი სიგნალის გადაცემით.

შემდგომ ექსპერიმენტებში ნაჩვენები იქნა ლექტინ SABA-1-ისა და ლობიოს ლექტინის გავლენა პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების პროლიფერაციაზე. როგორც სურ.4 - დან ჩანს, კონტროლთან შედარებით ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია მკვეთრად გამოხატული მიტოგენური აქტიურობა. წარმოდგენილი მონაცემები გვიჩვენებენ, რომ SABA-1-ის მიტოგენური აქტიურობა, ისევე როგორც ლობიოს ლექტინის შემთხვევაში, დამოკიდებულია კონცენტრაციაზე და ეს დამოკიდებულება გამოიხატება მათ დადებით კორელაციაში.



სურ 4. ლექტინ SABA-1-ის სხადახვაა კონცენტრაციის გავლენა ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების პროლიფერციაზე.

როგორც სურ.5-იდან ჩანს SABA-1-ის 100 მკგ/მლ კონცენტრაცით მოქმედების შედეგად გამოწვეული ლიმფოციტების პროლიფერაციული აქტიურობა (15-ჯერ) აღემატება კონტროლებს ((1)-ლიმფოციტები და (4)-ლიმფოციტები + D-მანოზა). ნაჩვენებია ასევე, რომ SABA-1-ის ინკუბაცია D-მანოზასთან, სრულად აინჰიბირებს აღნიშნული ლექტინის მიტოგენურ აქტიურობას.



სურ.5. D-მანოზა -ის გავლენა SABA-1-ის პროლიფერაციურ აქტიურობაზე.

1.კონტროლი (ლიმფოციტები ლექტინის გარეშე)
2.საცდელი (ლიმფოციტები + ლექტინი SABA-1)
3.საცდელი (ლიმფოციტები + ლექტინი SABA-1+ D-მანოზა)
4.კონტროლი (ლიფოციტები + D-მანოზა)

ამრიგად, მიღებული მონაცემები მოწმობენ, რომ ლექტინ SABA-1 გააჩნია მკვეთრად გამოხატული მიტოგენური აქტიურობა ადამიანის მონონუკლეარული უჯრედების მიმართ.

სადისერტაციო ნაშრომში წარმოდგენილი ფუნდამენტური და გამოყენებითი მიმართულებით ჩატარებული კვლევის შედეგების საფუძველზე შემოთავაზებულია მოსაზრება ლექტინი SABA-1-ის დამცველობითი როლის შესახებ მცენარე სვინტრში და მისი ბუნებრივ ანტიმიკრობულ საშუალებად გამოყენების პერსპექტივის შესახებ. ასევე გამოთქმულია მოსაზრება SABA-1-ის

ონკოლოგიაში და იმუნოლოგიაში სადიაგნოსტიკო და კვლევის საშუალებად გამოყენების და მომავალში კლინიკურ მედიცინაში ანტიკანცეროგეული და იმუნოტროპული სამკურნალო პრეპარატად დანერგვის პერსპექტივის შესახებ.

დასკვნები

1. დადგენილია სვინტრის ორგანოებიდან ლექტინების საექტრაქციო ხსნარის ოპტიმალური შემადგენლობა (0,9% NaCl, 40mM K^+-ფოსფატის ბუფერი, pH 7.4, 0,1% β-მერკაპტოეთანოლამინი).
2. სამი განსხვავებული მეთოდით (მიკროსკოპული, პლანშეტზე მიკროტიტრაციისა და ფოტოკოლორიმეტრული) გამოვლენილია სვინტრის ლექტინის უნარი გამოიწვიოს ბოცვრის ტრიფსინიზირებული ერითროციტების, ადამიანის სხადასხვა ტიპის კიბოს უჯრედების აგლუტინაცია. დადგენილია, რომ ლექტინი არ იწვევეს ადამიანის სისხლის I(0); II(A); III(B) და IV(AB) ჯგუფის ნატიური ერითროციტების აგლუტინაციას.
3. შესწავლილია ლექტინების შემცველობა სვინტრის მიწისზედა (ღერო, ფოთოლი, ყვავილი, თესლი) და მიწისქვეშა (ფესვი, ფესურა, დამატებითი კვირტი) ორგანოებში. ნაჩვენებია, რომ ლექტინური აქტივობის ცილებს შეიცავს მცენარის მხოლოდ მიწისქვედა ორგანოთა ქსოვილები (ფესვი, ფესურა და დამატებითი კვირტი).
4. ნაჩვენებია, რომ ლექტინების ყველაზე მაღალი შემცველობით გამოირჩევა მცენარის შემოდგომის, მოსვენების მდგომარეობაში მყოფი, ფესურა.
5. დამუშავებულია სვინტრის ფესურადან ლექტინის 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 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. მოწოდებული მეთოდი საშუალებას იძლევა მიღებული ლექტინი გამოყოფილი იქნას

ინდივიდუალური მოლეკულის სახით (გასუფთავების ხარისხი - 789) და მაღალი ჰემაგლუტინაციური აქტივობით (0.000095 მგ/მლ).

6. ანალიზირებული 18 განსხვავებული ტიპის ნახშირწყლებიდან სვინტრის ფესურიდან იზოლირებული ლექტინი სპეციფიკურობას ავლენდა მხოლოდ D-მანოზის მიმართ. რაც მიუთითებს, რომ იგი მიეკუთვნება მანოზა-სპეციფიკური ლექტინების კლასს.

7. ლექტინ SABA–1-ის ფიზიკო-ქიმიური თვისებების შესწავლის შედეგად დაგენილ იქნა, რომ მისი ნატიური მოლეკულის მეოთხეული სტუქტურა წარმოდგენილია დიმერის სახით და მისი მოლეკულური მასა შეესაბამება 30 kDa-ს, შედგება 2 თანაბარი მოლეკულური მასის მქონე სუბერთეულისაგან, არ შეიცავს ნახშირწყლებს და მიეკუთვნება მეროლექტინების კლასს.

8. ლექტინ SABA–1-ის ბიოქიმიური თვისებების შესწავლის შედეგად, დადგენილ იქნა, რომ ლექტინი თერმოსტაბილურია (ინაქტივირდება 60^0C-ზე) და ხასიათდება მაღალი ჰემაგლუტინაციური აქტივობით. ლექტინური აქტიურობა ვლინდება pH-ის ფართო დიაპაზონში (pH 5.5-დან pH 9.0-მდე) და მაქსიმალური აქტიურობა აღინიშნება pH7.0-8.0 დიაპაზონში, ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტიურობაზე გავლენას არ ახდენს ორვალენტიანი მეტალის იონები (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}).

9. ნაჩვენებია, რომ ლექტინი SABA-1 სპეციფიკურად უკავშირდება ადამიანის სიმსივნის უჯრედებს და იწვევს მათ აგლუტინაციას. D-მანოზა სრულად აინჰიბირებს აღნიშნული ლექტინით სიმსივნური უჯრედების აგლუტინაციას.

10. ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია კონცენტრაციაზე დამოკიდებული ციტოტოკსიკური აქტიურობა სიმსივნის უჯრედების პირველად კულტურებზე (ადამიანის კანის, საკვერცხის, ფილტვისა და სარძევე ჯირკვლის). D-მანოზა იწვევს აღნიშნული ლექტინის ციტოტოკსიკური აქტივობის ინჰიბირებას.

11. დაგენილია, რომ ლექტინ SABA-1-ს გააჩნია კონცენტრაციაზე დამოკიდებული მიტოგენური აქტიურობა ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების მიმართ. ნაჩვენებია, რომ D-მანოზა იწვევს აღნიშნული ლექტინის მიტოგენური აქტივობის ინჰიბირებას.

დისერტაციის თემასთან დაკავშირებული პუბლიკაციების ნუსხა

1. Nino Dumbadze, Nugzar Aleksidze, Giorgi Alexidze. Isolation and Biochemical Characterization of Mannose-Specific Lectin from Georgian Endemic Plant *Polygonatum obtusifolium* Miscz. Rhizomes. Bulletin of the Georgian national academy of sciens, vol. 6, no. 2, 2012.
2. Nino Dumbadze, Nugzar Aleksidze, Giorgi Alexidze. Distribution of Mannose-specific Lectin in Physiologically Distinct Parts of the Plant Mountainous Solomon's Seal (*Polygonatum obtusifolium* Miscz. ex Grossh.). Bulletin of the Georgian national academy of sciens, vol. 8, no. 2, 2014.
3. Nino Dumbadze, Nugzar Aleksidze, Giorgi Alexidze. Anticancerogenic Activity of the Polygonatum Mannose-Specific lectin Isolated From Georgian Endemic Mountain Plant *Polygonatum obtusifolium Miscz*. Rhizomes. Bulletin of the Georgian national academy of sciens, vol. 10, no. 1, 2016.
4. Nino Dumbadze, Nugzar Aleksidze, Giorgi Alexidze. Purification and Characterization of Mannose-Specific Lectin Isolated from the Rhizomes of Georgian Endemic Plant *Polygonatum obtusifolium Miscz.* (ბეჭდვაშია).
5. G. Alexidze, N. Dumbadze, N. Aleksidze. Purification and Characterization of Novel Lectin from the Georgian Endemic Plant *Polygonatum obtusifolium Miscz*. with Anticancer Activity. Horizons in Cancer Research. (ბეჭდვაშია).
6. ნინო დუმბაძე, გიორგი ალექსიძე., მცენარე სვინტრის (*Polygonatum obtusifolium Miscz.*) ფესურიდან მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის გამოყოფა გასუფთავება და ფიზიკურ-ქიმიური დახასიათება. **სამეცნიერო კონფერენცია** - „ბიოლოგიისა და ბიომედიცინის აქტუალური პრობლემები", 31 მაისი, 2012, გვ.14.

საქართველოს საპატრიარქოს წმიდა ანდრია პირველწოდებულის სახელობის
ქართული უნივერსიტეტი

Грузинский университет имени Святого Андрея
Первозванного при Патриархии Грузии

На правах рукописи

Школа (факультет) информатики, математики и естественных наук

Образовательная программа - Биотехнология

Нино Думбадзе

Изучение биохимических свойств, физиологической роли и биологической активности манноза-специфического лектина эндемического растения Грузии горной купены (*Polygonatum obtusifolium Miscz.*)

Диссертационный вестник

труда, представленного на соискание
академической степени доктора биологии

Направление - 05 Природоведческие науки
Отрасль/специальность - 0504 Биология/Науки, изучающие жизнь

Тбилиси
2017 год

Диссертационная работа выполнена в Грузинском университете имени Святого Андрея Первозванного при Патриархии Грузии, факультета информатики, математики и естественных наук

Научный руководитель: 1. **Георгий Алексидзе**
доктор биологических наук, профессор
2. **Нугзар Алексидзе**
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **1.Нана Котрикадзе**
доктор биологических наук, профессор
2.Мадона Чачуа
академический доктор биологических наук

Защита диссертации состоится 10 февралья 2017 года в 12 часов, на заседании Диссертационной комиссии Школы (факультета) информатики, математики и естественных наук Грузинского университета имени Святого Андрея Первозванного при Патриархии, Грузии.

Адрес: 0162, Тбилиси, Илья Чавчавадзе №53[a], аудитория им. И.Векуа №104.

Вы можете ознакомиться с диссертацией в Научной библиотеке Грузинского университета имени Святого Андрея Первозванного при Патриархии Грузии

Диссертационный вестник был разослан 10 января 2017 г.

Учёный Секретарь Диссертационного совета,

академический доктор технических наук Теймураз Кивиладзе

Оглавление

Общая характеристика труда

Актуальность темы..... 24
Основная цель и задачи исследования.....25
Научная новизна труда и основные результаты.....26
Теоретические и методологические основы исследования.....27
Теоретическая ценность труда.....28
Практическая ценность труда.....28
Объем и структура диссертации.....28

Основное содержание труда

Глава I. Обзор литературы.....29
Глава II. Объект и методы исследования.....29
Глава III. Результаты исследования и их обсуждение.....30
Заключение.....37
Перечень публикаций, связанных с темой диссертации.....40

Общая характеристика труда

Актуальность темы.

Одним из центральных вопросов современной биологии является феномен биологического распознавания. В научной литературе все более укрепляятся мнение о том, что носителями этой функции являются углеводы определенного типа и белки, имеющие способность специфического связывания с ними – лектины (A. Pusztai, et all., 2008).

Лектины впервые были обнаружены в растениях еще в 1888 году. В настоящее время выделено более сотен растительных лектинов и дана их биохимическая характеристика. Ввиду уникального свойства лектинов они успешно используются в наиболее разнообразных сферах науки: в биологии, биомедицине, биотехнологии, сельском хозяйстве, медицине и других научных сферах. Сегодня лектины широко используются как инструменты исследования, аффинные адсорбенты для выделения разных гликоконъюгатов клеток и органелл; как специфические биологические зонды они будут играть большую роль в установлении углеводной топографии мембран; было выявлено, что они часто имеют способность гормонального действия, вызывают пролиферацию клеток, имеют способность иммунотропного, антимикробного, антивирусного, антиопухолевого действия и пр. (R. Hamid et all., 2010).

Несмотря на такое широкое применение лектинов, к сожалению, их физиологическая роль в растениях, из которых происходит их выделение, пока что остается непонятной. Хотя в имеющихся на сегодняшний день литературных данных указывается, что лектины должны принимать непосредственное участие в таких жизненно необходимых процессах для растения, как: плодовитость, рост и развитие, транспорт веществ, подобные гормонам действия, фитоиммунитет, симбиоз и пр. (J. M. Van Damme tt all.,2000).

Если в настоящее время хорошо изучена роль лектинов в реакциях биологического распознавания, характерных для поверхности клетки, то мало известно об их участии в

метаболических реакциях, происходящих внутри клетки. Хотя следует отметить, что в последнее время получены достаточно интересные данные и в отношении этого направления. Так, например, изучение субклеточной локализации лектинов выявило их наличие в мембранах органелл растительной клетки, что практически определило изучение функций лектинов в таких сравнительно автономных органеллах клеток как митохондрии, ядра, хлоропласты и пр.

Исходя из вышеуказанного, выявление лектинов в растительных объектах и изучение их физиологических и биологических функций является одной из актуальных проблем отраслей современной биологии, биотехнологии, сельского хозяйства, медицины и других научных отраслей.

Основная цель и задачи исследования

Основной целью диссертационного труда являлось изучение физиологической роли лектинов горной купены ***(Polygonatum obtusifolium Miscz)*** - широко применяемого в народной медицине эндемического лечебного растения Грузии (R. Gagnidze., 2005), в клетках тканей растения, осуществление идентификации и изучение их биологической активности, что с одной стороны расширило бы представления о биологической роли растительных лектинов, и с другой стороны создало бы предпосылку возможного использования лектинов в отраслях сельского хозяйства, биотехнологии, биомедицины, медицины и в других научных отраслях.

Задачи: для осуществления основной цели диссертационного труда были поставлены следующие конкретные задачи:

- Выявление белков, имеющих лектиновую активность, в растении купена.
- Изучение их содержания в тканях различных органов растения купена.
- Установление распределения их содержания в тканях разных органов растения, явно отличающихся физиологическим состоянием.

- Разработка метода выделения лектина в виде индивидуальных молекул из растения купена и его очистки.
- Изучение физико-химических свойств индивидуальной молекулы лектина.
- Изучение биохимических свойств индивидуальной молекулы лектина.
- Изучение антиканцерогенной активности лектина купены на раковых клетках человека.
- Изучение иммуномодуляторной активности лектина купены на мононуклеарных клетках периферической крови человека.

Научная новизна и основные результаты труда

Научной новизной труда является идентификация нового манноза-специфического лектина из эндемического растения Грузии - горной купены *(Polygonatum obtusifolium Miscz)* посредством разработанного нами метода; полученные данные о его физико-химических и биохимичкеских свойствах, а также о физиологической роли и мульти биологической активности манноза - специфически нового лептина в растительной купене. Показано, что самым высоким содержанием лектинов отличается корневище, а самым низким содержанием лектинов - ткани почки. Выявлено, что высокое содержание лектинов фиксируется в тканях подземных органов, находящихся на стадии покоя закончившего рост растения, в частности, в осеннем корневище - самое высокое содержание лектинов, и оно в 10 раз превышает содержание лектинов в корневище, находящемся на весенней стадии активного развития роста.

Разработан новый метод выделения лектина из корневища купены и его очистки. Предоставленный метод дает возможность выделения полученного лектина в виде индивидуальной молекулы (степень очистки - 789) и с высокой гемагглютинационной активностью (0.000095 мг/мл).

Показано, что лектин, изолированный от корневища купены, из 18 проанализированных разного типа углеводов проявляет специфичность только в отношении D-маннозы, что указывает на его принадлежность к классу манноза-специфических лектинов.

Изучение физико-химических свойств манноза-специфического лектина выявило, что его четвертичная структура нативной молекулы представлена в виде димера, и его молекулярная масса соответствует 30 kDa, состоит из 2-х субъединиц, имеющих одинаковую молекулярную массу, не содержит углеводы и относится к классу меролектинов.

В результате изучения биохимических свойств манноза-специфического лектина было установлено, что лектин термостабилен (инактивируется при 60^0C) и характеризуется высокой гемагглютинационной активностью. Лектиновая активность проявляется в широком диапазоне pH (от pH 5.5-до pH 9.0) и максимальная активность отмечается в диапазоне pH 7.0-8.0, На гемагглютинационную активность лектина не оказывают влияния ионы двухвалентного металла (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}).

В исследовательских работах, где был изучен спектр биологической активности лектина, показано, что Лектин SABA-1 имеет зависящую от концентрации цитотоксическую активность в отношении первичных культур опухолевых клеток (кожи, легких, яичников и молочных желез человека). Установлено, что лектин SABA-1 имеет зависящую от концентрации митогенную активность в отношении мононуклеарных клеток периферической крови человека. Показано, что D-манноза вызывает ингибирование цитотоксической активности указанного лектина.

Теоретические и методологические основы исследования

Методологическими основами диссертационного труда являлись новейшие современные методы исследования биохимии, биофизики, биотехнологии, иммунологии и канцерогенеза. В исследованиях были использованы: метод центрифугирования, колориметрический и спектрофотометрический методы; метод микротитрации, микроскопный и фотоколориметрический методы определения лектиновой активности и агглютинации клеток; метод гель-фильтрационной хроматографии высокого давления, метод аффинной хроматографии на аффинных сорбентах; препаративный и аналитический электрофорез в градиентных гелях

полиакриламида; определение углеводов в составе белков с использованием электрофореза и реагента Шиффа; метод определения цитотоксической активности на первичных краткосрочных суспензионных культурах раковых клеток человека, метод определения митогенной активности на краткосрочных суспензионных культурах периферической крови человека с применением МТТ и мультискана.

Теоретическая ценность труда

Представленные в диссертационном труде результаты углубляют теоретические знания о физиологической роли растительных лектинов. На основании полученных результатов высказано мнение о защитной функции растительных лектинов. Результаты исследования создают фундамент для изучения защитных функций лектинов в полевых условиях и выражают перспективу их использования в сельском хозяйстве в качестве антимикробных природных агентов растений. Представленные результаты исследования углубляют знания о молекулярных механизмах антиопухолевого и иммунотропного действия лектинов.

Практическая ценность труда

Представлены соображения о биологической роли и мульти биологических активностях манноза-специфического лектина эндемического лечебного растения Грузии - горной купены ***(Polygonatum obtusifolium Miscz)***. В частности высказано соображение о защитной роли лектина SABA-1 в растении купена, ее использования в качестве диагностического средства и средства исследования в онкологии и иммунологии, и о его внедрении в перспективе в качестве антиканцерогенного и иммунотропного препарата в клинической медицине.

Объем и структура диссертации

Диссертация включает: вступление, обзор литературы, объект и методы исследования, результаты и обсуждение исследования, выводы, список использованной литературы (151 источника). Она иллюстрирована 10 таблицами и 22 картиной. Объем труда - 117 страниц.

Основное содержание труда

Глава I. Обзор литературы

В обзоре литературы представлены исторический обзор и толкование растительных лектинов, классификация лектинов. Рассмотрены биохимические свойства лектинов специфичность лектинов в отношении углеводов, распространение лектинов в растениях, их распределение в органах и тканях растения и динамика их содержания. Представлены литературные данные и разные концепции о физиологической роли лектинов в растениях. Рассмотрена роль лектинов в процессах роста и развития растения, процессах плодовитости растений, процессах защиты растений, процессах симбиоза и процессах транспорта и накопления углеводов, и функции запасных белков лектинов. Рассмотрены сферы применения лектинов в разных сферах науки. Представлены результаты исследования об антиопухолевой и иммуномодуляторной активности лектинов

Глава II. Объект исследования и методы исследования объекта

В диссертационном труде объектом исследования было выбрано широко используемое в народной медицине эндемическое лечебное растение Грузии - горная купена *(Polygonatum obtusifolium Miscz)*.

Известно, что горная купена (известное с древнейших времен как соломонова печать) является важным лечебным растением. В научной литературе известно, что они широко используются с целью превенции и лечения многих заболеваний человека.

Исходя из вышеуказанного, объектом исследования было выбрано эндемическое растение Грузии - горная купена. В эксперименте были использованы как наземные части купены (стебель, лист, почка, цветок и семена), так и подземные части купены (корневище, корень и подземные почки).

Методы исследования. В труде использованы биохимические, современные методы физиологии растений, канцерогенеза, иммунологии и суспензионных культур клеток человека, и приборы

- оборудование. Разработан метод выделения и очистки лектина, в котором были использованы методы экстракции, фильтрации, ультра и стерилизационной фильтрации, центрифугирования, фракционирования сульфатом аммония, хроматографии высокого давления и газовой хроматографии и аффинной хроматографии.

С целью физико-химической характеристики лектина использованы методы гель-фильтрационной хроматографии высокого давления, градиентного электрофореза белков в нативных и диссоциированных условиях, метод Дагена Такача специфичности в отношении сахаров и прочие методы.

Содержание, активность и специфическую активность лектина определяли тремя различными методами: визуально на иммунологическом планшете методом Такача, разработанным нами фотоколориметрическим методом и с использованием светового микроскопа.

Раковые клетки и мононуклеиновые клетки периферической крови человека мы получали от здоровых доноров и доноров с опухолью, в сопровождении диагностической документации. Цитотоксическую и митогенную активность определяли в экспериментах in vitro на кратковременных суспензионных культурах клеток с применением МТТ-метода и мультискана.

Эксперименты проводились минимум с 5-разовым повторением и статистически обрабатывали результаты исследования с использованием метода Стьюдента.

Глава 3.Результаты исследования и их обсуждение

Согласно литературным данным, содержание лектинов в тканях растения не является постоянным, и оно меняется в период онтогенеза. Соответственно с целью установления биологической роли лектинов в экспериментах часто используют физиологический подход. В частности, изучают содержание лектинов в органах растения, и ее зависимость от физиологического состояния растения и соответственно этих органов.

На первом этапе исследования было изучено содержание лектинов в наземных частях купены (стебель, лист, цветок) и

подземных частях (корень, корневище и почка) весенней купены. Результаты исследования выявили, что белки лектиновой активности содержали только подземные части купены (корень, корневище и почка).

На втором этапе физиологического подхода к исследованию, в экспериментах были изучены явно различающиеся по физиологическому состоянию растущие и завершившие рост подземные органы (корень, корневище и почка) растения купена (собранные весной и осенью), на содержание маннозаспецифического лектина (SABA-1). Такой подход, по нашему мнению, должен был выявить новые закономерности в отношении биологической функции лектинов.

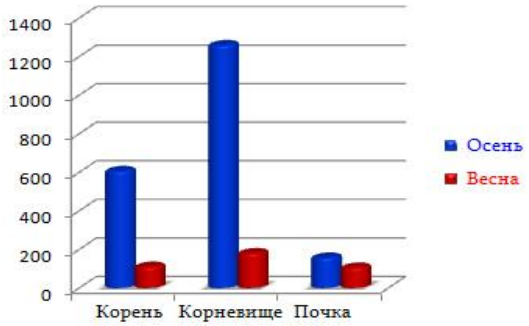


Рис.1. Содержание лектина в подземных частях растущей и завершивший рост (весенней и осенней) купены.

Как видно из рисунка, в осеннем корневище самое высокое содержание лектинов и оно в 10 раз превышает содержание лектинов в весеннем корневище. Полученные результаты указывают на высокую мобильность лектинов корневища купены. А положительная корреляция этого последнего с физиологической стадией покоя растения, дает основание предположить, что лектины в тканях осенней купены выполняют защитные функции.

На следующем этапе исследования был разработан метод выделения лектина SABA – 1 из корневища купены и его очистки. Основные этапы очистки лектина корневища купены включали 7 стадий: 1). получение белкового экстракта из корневища; 2).

хроматография на колонке Toyopearl HW-55; 3). фракционирование из колонки белков, содержащих элюированный SABA – 1, сульфатом аммония; 4). термическая обработка при +60^{0}C в течение 30 минут; 5). обработка ацетоном; 6). хроматография на колонке Toyopearl HW-55; 7). аффинная хроматография глутаральдегидом на фиксированной колонке. В результате очитски SABA – 1 был очищен 789 раз.

На следующем этапе исследования были изучены биохимические качества и характеристики индивидуальных молекул лектина SABA-1.

В специальных сериях опытов мы изучили специфичность лектина SABA-1 в отношении разного типа углеводов: Галактоза, Метил-галактоза, α-метил манопиранозид, Маноза, Рафиноза, D-глюкоза, Рамноза, N-ацетил D-глюкозамин, Галактуроновая кислота, Фруктоза, Инозит, Арабиноза и Рибоза. Полученные результаты выявили, что 18 анализирумых сахаров геммагглютинирующая активность SABA-1 ингибируется лишь D-маннозой и альфа-метил-манопиранозидом при минимальном концентрации 50 и 25 мМ соответсвенно.

В результате изучения биохимических свойств, было установлено, что лектин SABA-1 является термостабильным (инактивируется при 60^{0}C) и характеризуется высокой гемагглютинационной активностью. Лектиновая активность проявляется в широком диапазоне pH (от pH 5.5 до pH 9.0), и максимальная активность отмечается в диапазоне pH 7.0-8.0, на гемагглютинационную активность лектина не оказывают влияния ионы двухвалентного металла (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}).

В следующих сериях исследования, с использованием хроматографического метода гель-фильтрации высокого давления и стандартных калибровочных белков (маркеров), была установлена индивидуальная нативная молекулярная масса SABA-1, очищенного аффинным хроматогрфическим методом. Согласно расчетам калибровочной кривой установлено, что молекулярная масса нативного SABA–1 составляет 30 000 **Da.**

Для установления четвертичной структуры лектина SABA-1 купены. На следующем этапе опытов нами осуществлялась

денатурация молекул нативного SABA-1 в сопровождении додецилсульфата натрия (SDS) и определялись молекулярные массы и количество его составных субъединиц методом электрофореза в градиентном геле полиакриламида (10-25%),с использованием калибровочных стандартных белков (маркеров).

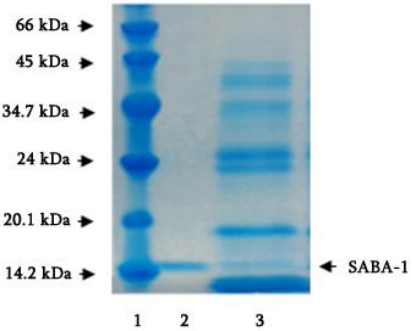


Рис.2.Электрофореграмма электрофореза лектина SABA–1 и стандартных маркированных белков в условиях диссоциации в градиентном геле полиакриламида (10-25%) (в сопровождении SDS)

1. маркеры, диапазон молекулярных весов е 14 000–70 000 Da, объем погруженных в гель пробе 1-10 мкл (альбумин - 66 000; овальбумин – 45 000; пепсин – 34 700; трипсинген -24 000; β-лактоглобулин – 20 100; лизоцим – 14 200).
2. Лектин SABA–1, очищенный методом аффинной хроматографии.
3. Фракция белков, содержащих лектин SABA-1, полученная на колонке Toyopearl HW-55 в результате гель-фильтрационной хроматографии.

Согласно представленной на рисунке 2 электрофореграмме на 1-ом треке показан профиль мигрирования маркеров с известным молекулярным весом. Трек 2 показывает, что SABA–1, очищенный в результате аффинной хроматографии, в диссоцированных условиях мигрирует в пределах одной компактной полосы, что подтверждает, что он является полипептидом молекулярного веса, равного молекулярному весу SABA–1, полученного в результате очистки.

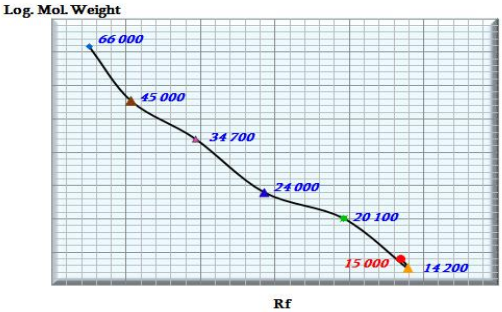


Рис.3. Калибровочная кривая для лектина SABA–1 и стандартных маркерных белков, построенная в результате электрофореза в условиях диссоциации в градиентном поле полиакриламида (10-25%) (в сопровождении SDS), полученная согласно электрофореграмме.

Согласно калибровочной кривой, представленной на рис.3, было установлено, что молекулярная масса составных субъединиц лектина SABA–1 одинакова и составляет 15.000 Da.

Таким образом, с применением методов гель-фильтрации и электрофореза показано, что его нативная молекулярная масса равна 30 000 Da и состоит из двухполипептидных субъединиц, имеющих одинаковую молекулярную массу 15 000 Da и относится к классу меролектинов.

В специальных экспериментах было изучено влияние лектина SABA-1 на злокачественные опухолевые клетки человека. В частности было изучено цитотоксическое действие лектина SABA-1 на опухолевые клетки в первичных краткосрочных суспензионных культурах.

В таблице 1 представлено влияние лектина SABA-1 разных концентраций на первичные культуры опухолевых клеток. Также представлены результаты влияния его специфического сахара маннозы на цитотоксическую активность лектина SABA-1. Представленные как в таблице, данные показывают, что лектин SABA-1 имеют хорошо выраженную цитотоксическую активность в отношении первичных культур опухолевых клеток любого типа (кожи, легких, яичников и молочных желез человека). Результаты

наглядно показывают, что отмечается прямая положительная корреляция между растущей концентрацией лектина и его цитотоксической активностью.

Таблица 1

Цитотоксический эффект лектина SABA-1 на 48-часовые суспензионные культуры раковых клеток, полученных из опухолей кожи, легких, яичников и груди

Типы опухолы	**SABA-1 μg/ml**	**0**	**10**	**50**	**100**	**SABA-1+ D-манноза (400 mM)**
Кожи	AV	0.326	0.283	0.166	0.091	0.320
	NC(%)	100	87	51	28	100
	GI (%)	***0***	***13***	***49***	***72***	***0***
Яичников	AV	0.318	0.218	0.176	0.130	0.315
	NC(%)	100	67	54	40	100
	GI (%)	***0***	***33***	***46***	***60***	***0***
Легких	AV	0.328	0.277	0.179	0.121	0.329
	NC(%)	100	85	55	37	100
	GI (%)	***0***	***15***	***45***	***63***	***0***
Молочных желез	AV	0.322	0.261	0.192	0.104	0.321
	NC(%)	100	80	59	32	100
	GI (%)	***0***	***20***	***41***	***68***	***0***

$p<0.01$

AV - средняя величина (средний показатель трехразового измерения индекса поглощения).

NC(%) - количество клеток (от % контроля).

GI (%) - ингибирование роста , %.

В дальнейших сериях опытов было изучено влияние D-маннозы на цитоскопическую активность SABA-1. Как следует из представленных в таблице данных, видна инкубация SABA-1 с D-маннозой, полностью ингибировала цитоскопическую активность указанного лектина.

Полученные результаты казывают, что цитоскопический эффект SABA-1 в отношении раковых клеток должен быть

обусловлен его специфическим взаимодействием с содержащими D-маннозу мембранными рецепторами, существующими на поверхности раковых клеток, посредством передачи апоптозного индуцирующего сигнала (самоподавления).

Представленные результаты исследования дают возможность высказать предположение об перспективе использовании лектина SABA-1 в онкологии. В частности, с одной стороны он может быть успешно использован, как диагностическое средство выявления поверхностных маркеров опухолевых клеток, а с другой стороны порождает перспективу, что после дополнительных испытаний лектин SABA-1 может быть внедрен в клиническую медицину, как антиканцерогенное лечебное средство.

В дальнейших экспериментах было изучено влияние лектина SABA-1 на мононуклеарные клетки периферической крови человека. В частности, нами изучалась митогенная активность лектина SABA-1 в отношении лимфоцитов в экспериментах in vitro, с использованием метода МТТ. На рис. 4 представленное влияние лектина SABA-1 и лектина фасоли на пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови. Как следует из рисунка, по сравнению с контролем лектин SABA-1 имеет явно выраженную митогенную активность.

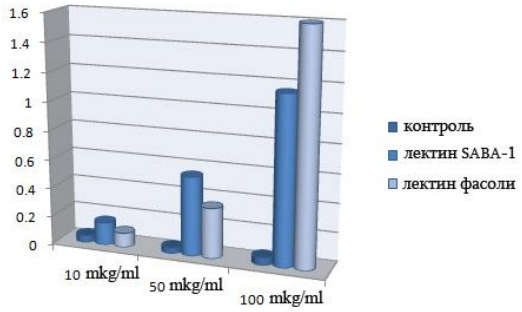


Рис.4. Влияние разных концентраций лектина SABA-1 на пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови человека

В дальнейшей серии опытов было изучено влияние D-маннозы, ингибирующей его лектиновую активность, на пролиферационную активность SABA-1. Как следует из рисунка, пролиферационная активность лимфоцитов, вызванная в результате в результате действия SABA-1 концентрацией 100 мкг, в 15 раз превышала контроль (1-лимфоциты и 4-лимфоциты + D-манноза). Также показано, что инкубация SABA-1 с D-маннозой, полностью ингибировала митогенную активность указанного лектина.

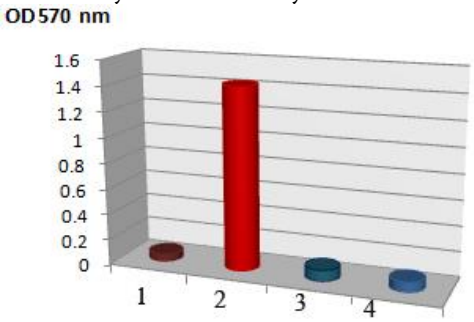


Рис. 5. Влияние D-маннозы на пролиферативную активность SABA-1

1. Контроль (лимфоциты без лектина)
2. Опытный (лимфоциты + лектин SABA-1)
3. Опытный (лимфоциты + лектин SABA-1+ D-манноза)
4. Контроль (лимфоциты + D-манноза)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что лектин SABA-1 проявляет ярко выраженную митогенную активность в отношении мононуклеарных клеток человека. В основе митогенной активности лектина SABA-1 лежит передача индуцирующего сигнала для бласттрансформации лимфоцитов, которая обеспечивает специфическое взаимодействие между содержащими D-маннозу мембранными рецепторами, существующими на поверхности мононуклеарных клеток, и лектином SABA-1.

Заключение

1. Установлен оптимальный состав экстракционного раствора лектинов из органов купены и оптимальное время их экстракции. Показано, что при использовании экстракционного раствора PBS (0,9% NaCl, 40mM K+ - буфер фосфата, pH 7.4, 0,1% β-меркаптоэтаноламин) и в условиях 30 мин. экстракции максимально осуществляется экстракция белков из разных органов купены, имеющих лектиновую активность.
2. Выявлена тремя разными методами (микроскопическим методом, методом микротитрации и фотоколориметрическим методом) способность лектина купены вызвать агглютинацию трипсинизированных эритроцитов кролика, разных типов раковых клеток человека. Установлено, что лектин не вызывает агглютинацию нативных эритроцитов кролика и нативных эритроцитов групп I(0); II(A); III(B) и IV(AB) крови человека.
3. Изучено содержание лектинов в наземных органах (цветок, лист, стебель, семена) и подземных органах (корень, корневище и почка) купены.
4. Установлено, что содержание лектинов в органах наземной части купены различное и меняется согласно физиологическому состоянию растения. В частности, показано, что наиболее высоким содержанием лектина выделяется корневище, а самым низким содержанием - ткани почки. Выявлено, что высокое содержание лектинов фиксируется в тканях подземных органов, находящихся на стадии покоя закончившего рост растения, в частности, в осеннем корневище самое высокое содержание лектинов, и оно в 10 раз превышает содержание лектинов в тканях корневища, находящегося в стадии активно растущего развития весной.
5. Разработан метод выделения лектина из корневищв купены и его очистки который включает 7 стадий: 1). получение белкового экстракта из корневища; 2). хроматография на колонке Toyopearl HW-55; 3). фракционирование из колонки белков, содержащих элюированный SABA – 1, сульфатом аммония; 4). термическая обработка при +60^{0}C в течение 30 минут; 5). обработка ацетоном; 6). хроматография на колонке Toyopearl HW-55; 7). аффинная

хроматография с фиксирующим глутаральдегидом на колонке. Полученный метоод дает возможность выделить полученный лектин в виде индивидуальных молекул (степень очистки -789) и с высокой гемаглютинационной активностью (0.000095 мг/мл).

6. Лектин, изолированный от корневища купены, из 18 проанализированных разного типа углеводов проявляет специфичность только в отношении D-маннозы, что указывает на его принадлежность к классу манноза-специфических лектинов.

7. В результате изучения физико-химических свойств манноза-специфического лектина было установлено, что его четвертичная структура нативной молекулы представлена в виде димера, и его молекулярная масса соответствует 30 kDa, состоит из 2-х субъединиц, имеющих одинаковую молекулярную массу, не содержит углеводы и относится к классу меролектинов.

8. В результате изучения биохимических свойств манноза-специфического лектина было установлено, что лектин термостабилен (инактивируется при 60^0C) и характеризуется высокой гемагглютинационной активностью. Лектиновая активность проявляется в широком диапазоне pH (от pH 5.5-до pH 9.0) и максимальная активность отмечается в диапазоне pH 7.0-8.0, На гемагглютинационную активность лектина не оказывают влияния ионы двухвалентного металла (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}).

9. Показано, что лектин SABA-1 специфически связывается с опухолевыми клетками человека и влечет их агглютинацию. D-манноза полностью ингибирует агглютинацию опухолевых клеток посредством указанного лектина.

10. Лектин SABA-1 имеет зависимую от концентрации цитотоксическую активность в отношении первичных культур опухолевых клеток (кожи, легких, яичников и молочных желез) человека. D-манноза вызывает ингибирование цитотоксической активности указанного лектина.

11. Установлено, что лектин SABA-1 имеет зависящую от концентрации митогенную активность в отношении мононуклеарных клеток периферийной крови человека. Показано, что D-манноза вызывает ингибирование митогенной активности указанного лектина.

Перечень публикаций, связанных с темой диссертации

1. Nino Dumbadze, Nugzar Aleksidze, Giorgi Alexidze. Isolation and Biochemical Characterization of Mannose-Specific Lectin from Georgian Endemic Plant *Polygonatum obtusifolium* Miscz. Rhizomes. Bulletin of the Georgian national academy of sciens, vol. 6, no. 2, 2012.
2. Nino Dumbadze, Nugzar Aleksidze, Giorgi Alexidze. Distribution of Mannose-specific Lectin in Physiologically Distinct Parts of the Plant Mountainous Solomon's Seal (*Polygonatum obtusifolium* Miscz. ex Grossh.). Bulletin of the Georgian national academy of sciens, vol. 8, no. 2, 2014.
3. Nino Dumbadze, Nugzar Aleksidze, Giorgi Alexidze. Anticancerogenic Activity of the Polygonatum Mannose-Specific lectin Isolated From Georgian Endemic Mountain Plant Polygonatum obtusifolium Miscz. Rhizomes. Bulletin of the Georgian national academy of sciens, vol. 10, no. 1, 2016.
4. Nino Dumbadze, Nugzar Aleksidze, Giorgi Alexidze. Purification and Characterization of Mannose-Specific Lectin Isolated from the Rhizomes of Georgian Endemic Plant *Polygonatum obtusifolium Miscz.* (ბეჭდვაშია).
5. G. Alexidze, N. Dumbadze, N. Aleksidze. Purification and Characterization of Novel Lectin from the Georgian Endemic Plant *Polygonatum obtusifolium Miscz*. with Anticancer Activity. Horizons in Cancer Research. (ბეჭდვაშია).
7. ნინო დუმბაძე, გიორგი ალექსიძე., მცენარე სვინტრის (Polygonatum obtusifolium Miscz.) ფესურიდან მანოზა-სპეციფიკური ლექტინის გამოყოფა გასუფთავება და ფიზიკურ-ქიმიური დახასიათება. **სამეცნიერო კონფერენცია** - „ბიოლოგიისა და ბიომედიცინის აქტუალური პრობლემები“, 31 მაისი, 2012, გვ.14.