

ISSN 0494-7304 0207-4508

TARTU ÜLIKOOLI
TOIMETISED

УЧЕННЫЕ ЗАПИСКИ ТАРТУСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS

870

ИЗУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ
ЛЕКТИНОВ

Том 2

ЛЕКТИНЫ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Труды по химии

TARTU  1989

TARTU ÜLIKOOLI TOIMETISED
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ТАРТУСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS
Alustatud 1893.a. VIHK 870 ВЫПУСК Основаны в 1893.г.

ИЗУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКТИНОВ

Том 2

ЛЕКТИНЫ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

Труды по химии



ТАРТУ 1989

Редакционная коллегия:

Т.Илометс, К.Кизанд, Т.Пюсса, Р.Уйбо /отв.редактор/

В выпуске опубликуются материалы I республиканской конференции посвященной 100-летию открытия первых лектинов / г.Тарту и г.Таллинн, 31 мая - 2 июня 1988 г./

Библиография:

Уч. зап. Тарт. ун-та. - 1989. - Вып.870 - С.

Arch.
Tartu Ülikooli
Raamatukogu
10266

Ученые записки Тартуского университета.

Выпуск 870.

ИЗУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКТИНОВ.

Том 2. Лектины в биологии и медицине.

На русском языке.

Тартуский университет.

ЭССР, 202400, г.Тарту, ул.Ülikooli, 18.

Ответственные редакторы К. Кизанд, Р. Уйбо.

Корректор И. Кингс.

Подписано к печати 19.09.1989.

MB 01513.

Формат 60x90/16.

Бумага писчая.

Машинопись. Ротапринт.

Учетно-издательских листов 13,62. Печатных листов 15,0+1 вк.

Тираж 700.

Заказ № 676.

Цена 2 руб. 70 коп.

Типография ТУ, ЭССР, 202400, г.Тарту, ул.Тийги, 78.



П.Г. Стильмарк около 1900 г.
Фотография сделана в Пярну (Эстония),
где он работал врачом в 1895–1923 гг.



П.Г. Стильмарк (22.07.1860-23.06.1923)

ФИТОЛЕКТИНЫ ВО ВЗАИМОТНОШЕНИЯХ РАСТЕНИЙ И ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Н.В. Любимова, Е.Г. Салькова

Институт биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, г. Москва

Проблема межклеточного узнавания растениями патогенных микроорганизмов на уровне рецептор-лигандного взаимодействия и включения генетического механизма устойчивости растений к инфекционным болезням является центральной проблемой фитоиммунитета. Однако до настоящего времени не ясна природа рецепторов и лигандов, обеспечивающих процесс межклеточного узнавания партнеров, пути образования и транспорта через цитоплазматическую мембрану растительной клетки сигнальных молекул, экспрессирующих гены хозяина, ответственные за защитные реакции.

Способность лектинов "распознавать" тонкие различия в структуре углеводов клеточной стенки микроорганизмов послужила отправной точкой для предположения относительно их участия в межклеточном узнавании при инфицировании растений патогенными микроорганизмами /6/.

Удобной моделью для изучения механизмов межклеточного узнавания и индуцирования защитных реакций хозяина является система клубни картофеля *Solanum tuberosum* L. - возбудитель фитофтороза, гриб *Phytophthora infestans* (Mont.) de By. Для этого гриба характерно наличие специализированных рас, способных поражать одни сорта картофеля (совместимость) и не поражать другие (несовместимость) /3/.

Из клубней картофеля выделен водорастворимый лектин (ЛКК), состав и структура которого хорошо изучены /II, I3/. Он представляет собой гидроксипролинбогатый высокогликозилированный (на 50 %) гликопротеин, представленный в растении мономер-димерной системой с мол. массой мономера 50 кД. Углеводный компонент молекулы содержит арабинозу (91%), га-

лактозу (5 %), глюкозу (3 %), глюкозамин (1 %) и другие сахара в меньшем количестве. Аминокислотный состав представлен гидроксипролином (42 %), лизином (16 %), серином (9 %), пролином (9 %) и другими аминокислотами в меньшем количестве. Гликозилированная часть молекулы лектина представляет собой пептидную цепь, связанную через остатки гидроксипролина с β -арабанофуранозидами и через остатки серина с α -галактопиранозидами. Лектиновая активность молекулы определяется ее негликозилированной частью, осуществляется через остатки триптофана и тирозина, имеет два центра связывания углеводов. Лектиновая активность соединения специфически блокируется олигомерами N-ацетил-D-глюкозамина, с длиной цепи 2-5 остатков, соединенных по β -1,4 связям.

Однако трудно себе представить, как водорастворимое соединение может обеспечить рецептор-лигандное взаимодействие, осуществляющее прочный межклеточный контакт. Более логично предположить, что подобную функцию выполняет какой-то структурносвязанный, а точнее - мембраносвязанный компонент растительной клетки. И действительно, в последнее время во фракции клеточных стенок и препарате плазмалеммы, выделенных из клубней картофеля, обнаружено присутствие экстензина, во многом сходного с ЛКК /8, 19/. Экстензин также представляет собой гидроксипролинбогатый высокогликозилированный гликопротеин, обладающий гемагглютинирующей способностью, специфичной по N-ацетил-D-глюкозамину. Возможно экстензин "сшивает" плазмалемму с клеточной стенкой /4/. 20 % лектинов картофеля составляет ЛКК и 80 % - экстензин. Предполагается, что водорастворимый ЛКК является предшественником структурносвязанного экстензина /9/. Установлено, что в растениях в ответ на инфицирование патогенными микроорганизмами увеличивается содержание гидроксипролинбогатого гликопротеина /12/.

Вышеизложенное дает основание полагать, что экстензин (или его изоформы) может участвовать в создании межклеточного контакта при инфицировании картофеля возбудителем фитофтороза, который, в свою очередь, необходим для включения защитных реакций хозяина. Однако прямых доказательств такого предположения пока не имеется.

На участие фитолектинов в формировании взаимоотношений картофеля и возбудителя фитофтороза указывают результаты модельных опытов с использованием ЛКК /1/. Лектин агглютинировал проросшие цистоспоры как совместимой, так и несовместимой рас патогена. Флуоресцеинмеченный лектин связывался с поверхностью гиф обеих рас гриба. Гаптен лектина подавлял как реакцию агглютинации, так и связывание меченого лектина с микроорганизмом. Кинофотографическое наблюдение за инфицированием клубней картофеля возбудителем фитофтороза свидетельствует о том, что *in vivo* инфекционные гифы гриба как совместимой, так и несовместимой рас с одинаковой скоростью разрушали стенку растительной клетки и прочно связывались с ее плазмалеммой. Анализ инфицированной ткани, а также суспензии проросших цистоспор гриба с грубой микросомальной фракцией гомогената тканей клубней показал, что гаптен лектина резко снижал степень связывания плазмалеммы картофеля с поверхностью патогена. Из целого ряда соединений (пентозы, гексозы, дисахариды, метилсахариды, аминосахара, ламинаран) только специфический гаптен картофельного лектина ингибировал развитие защитной реакции сверхчувствительности картофеля в ответ на инфицирование несовместимой расой возбудителя фитофтороза. Можно предположить, что причиной такого действия гаптена является предотвращение межклеточного узнавания партнеров на уровне лектин-углеводного взаимодействия при контакте растительной плазмалеммы с поверхностью инфекционной гифы гриба.

Наши исследования сконцентрированы на изучении взаимодействия препаратов изолированной плазмалеммы клубней картофеля с компонентами клеточной поверхности мицелия возбудителя фитофтороза; роли фитолектина в межклеточном распознавании партнеров и индуцировании устойчивости хозяина к патогену; структурно-функциональной перестройки растительной плазмалеммы как фактора, определяющего переход клетки из нативного состояния восприимчивости (неактивная клетка) в состояние потенциальной устойчивости, сверхчувствительности в распознавании метаболитов патогена (активированная клетка) /2/.

Установлено, что плазмалемма картофеля обладает лекти-

новой активностью, специфически подавляемой гаптенем картофельного лектина. В составе компонентов клеточной поверхности мицелия возбудителя фитофтороза выявлено наличие гликопептида, содержащего остатки глицозамина и глюкана, предположительно аналогичного по структуре и функциям известным супрессорам этого патогена, подавляющим защитные реакции растения. Плазмалемма картофеля связывала как гликопептиды, так и глюканы гриба; при этом гликопептиды подавляли лектиновую активность плазмалеммы, а глюканы на таковую не влияли.

Согласно литературным данным /10/, интактные клетки клубней картофеля не способны к быстрой защитной реакции (реакции сверхчувствительности) в ответ на инфицирование возбудителем фитофтороза. Контакт с несовместимой расой патогена или раневой стресс (нарезание клубней на диски и выдерживание последних при комнатной температуре в течение нескольких часов) индуцировали в ткани состояние потенциальной устойчивости. Как показали наши исследования, метаболиты патогена или раневой стресс вызвали значительное изменение структурных и функциональных свойств плазмалеммы картофеля: повышение проницаемости мембран, активацию синтеза плазмалемных белков, увеличение активности мембраносвязанных катион-зависимых АТФаз, повышение "текучести" липидного компонента мембраны и ненасыщенности жирных кислот, многократную активацию гемагглютинирующей способности плазмалемных везикул /2/. Такая "активированная" раневым стрессом плазмалемма связывала большое количество гликоконъюгатов клеточной поверхности патогена и была более чувствительна в распознавании метаболитов разных рас гриба, чем нативная /2/.

На основании полученных данных и анализа литературы, предполагается следующая гипотетическая схема взаимоотношений картофеля и возбудителя фитофтороза /1/. Очевидно, что межклеточное распознавание растения и патогена осуществляется на уровне контакта мембраносвязанных компонентов растительной клетки с клеточно-поверхностными метаболитами инфекционной гифы патогена. Такой контакт осуществляется посредством лектин-углеводного взаимодействия. Следует отме-

тить, что мембраносвязанный фитолектин может выполнять рецепторную функцию при распознавании растением широкого набора патогенов, поскольку способен взаимодействовать со специфической углеводной группой, включенной в состав различных макромолекул, локализованных на клеточной поверхности различных патогенов. Имеются сведения об участии лектина картофеля в узнавании хозяином грибов /1/, бактерий /18/, вирусов /5/.

Тесный межклеточный контакт партнеров инициирует включение неспецифического внутриклеточного механизма устойчивости растения к инфекционным заболеваниям. По-видимому, контакт необходим для ферментативного образования сигнальных молекул - олигосахаридов, из клеточных стенок хозяина или патогена. Под олигосахаридами подразумеваются фрагменты β -глюканов, хитина и хитозана, олигогалактурониды, состоящие из 2-10 углеводных единиц со строгой пространственной конфигурацией, способные экспрессировать гены растительной клетки, ответственные за защитные реакции хозяина /15, 7/. Не исключено, что лектины, обладая хитиназной активностью /17/, могут непосредственно участвовать в образовании сигнальных молекул. В литературе обсуждается также возможность участия лектин-углеводного взаимодействия в образовании трансмембранных каналов, обеспечивающих транспорт углеводов внутрь клетки /16/. Это, в свою очередь, указывает на возможность медиации лектинами трансмембранного переноса сигнальных молекул. Такая полифункциональность характерна для лектинов, однако механизм ее мало изучен.

Экспрессия генов растительной клетки олигосахаридами проявляется в активации многочисленных защитных реакций растения: накоплении гидроксипролинбогатого гликопротеина и этилена, активации хитиназ и β -глюкозидаз, синтезе ингибитора протеиназ, образовании некроза и накоплении в нем фитоалексинов, лигнификации ткани /15/. Важное место в реакции растительной клетки на контакт с метаболитами патогена занимает структурная и функциональная перестройка ее плазмалеммы. Направленная активация мембранных процессов, по-видимому, определяет повышение чувствительности растительной клетки к действию метаболитов патогена и быструю "сверхчув-

ствительную" ее гибель под влиянием токсических для хозяина C_{20} полиеновых жирных кислот гриба: арахидоновой и эйкозопентаеновой /14/. В некротизированной ткани через несколько часов погибает патоген, очевидно, под действием накапливающихся фитоалексинов. Так блокируется распространение инфекции в растении; растение проявляет устойчивость к инфекционному заболеванию.

В восприимчивой комбинации при поражении картофеля фитофторозом также имеет место лектин-углеводное взаимодействие при межклеточном контакте партнеров. Однако это не приводит к "активации" клетки хозяина. По-видимому, супрессоры совместимой расы гриба, комплементарные данному сорту растения, подавляют "активацию" клетки, возможно, вследствие ингибирования синтеза белка *de novo*. "Неактивированная" растительная клетка остается малочувствительной к токсическим метаболитам гриба, медленно погибает при инфицировании патогеном, в ней медленно и в меньших количествах накапливаются фитоалексины. Гибель гриба в ткани замедлена, и его гифы успевают проникнуть в соседние клетки, распространяются все дальше и дальше. Так проявляется восприимчивость растения к патогену.

Л и т е р а т у р а

1. Любимова Н.В., Салькова Е.Г. // Приклад. биохимия и микробиол., 1988. - Т. 24.
2. Любимова Н.В., Шувалова Е.П., Лахтин В.М., и др. // Материалы конференции "Изучение и применение лектинов". - Таллинн, 31 мая-2 июня, 1988.
3. Метлицкий Л.В., Озерецковская О.Л. Фитоалексины. - М.: Наука, 1973. - 175 с.
4. Семенов И.Л., Выскребенцева Э.И., Алексидзе Г.Я. // Структура и функции биологических мембран растений. - Новосибирск: Наука, 1985. - С. 47-54.
5. Adam G., Heegard P., Bog-Hansen T.C. // J. Virological Methods. - 1987. - Vol. 17. - P. 263-275.
6. Albersheim P., Anderson-Prouty A.J. // Ann.Rev.Plant Physiol. - 1975. - Vol. 26. - P. 31-52.

7. Albersheim P., Darvill A.G. // *Scientific American*, 1985. - Vol. 253. - N 3. - P. 58-64.
8. Casalongue C., Lezica R.P. // *Plant Cell Physiol.* - 1985. - Vol. 26. - N 8. - P. 1533-1539.
9. Driessche E., Beeckmans S., Dejaegere R. et al. // *Lectins IV* (Ed. T.C. Bog-Hansen). - Berlin: Walter de Gruyter, 1985. - P. 567-582.
10. Furuichi N., Tomiyama K., Doke N. // *Phytopathol.* - 1979. - Vol. 69. - N 7. - P. 734-736.
11. Hobst G.-J., Martin S.R., Allen A.K. et al. // *Biochem. J.* - 1986. - Vol. 233. - N 4. - P. 731-736.
12. Mazau D., Esquerre-Tugaye M.T. // *Physiol. Molecul. Plant Pathology.* - 1986. - Vol. 29. - N 2. - P. 147-157.
13. Matsumoto I., Jimbo A., Mizuno Y. et al. // *J. Biol. Chem.* - 1973. - Vol. 258. - N 5. - P. 2886-2892.
14. Preisig C.L., Kuc G. // *Archives of Biochem. and Biophysics.* - 1985. - N 1. - P. 379-389.
15. Ryan C.A. // *Ann. Rev. Cell Biol.* - 1987. - Vol. 3.- P. 295-317.
16. Sandhu R.S., Reen R.S. // *Lectins* (Ed. T.C. Bog-Hansen). - Berlin: Walter de Gruyter, 1982. - P. 113-136.
17. Schlumbaum A., Mauch F., Vogeli U. et al. // *Nature.* - 1986. - Vol. 324. - N 6095. - P. 365-367.
18. Sequeira L. // *The cell surface in plant growth and development* (Ed. K. Roberts) *J. Cell Sci. Suppl.* - 1985. - Vol. 2. - P. 301-316.
19. Wilson L.G., Fry J.C. // *Plant Cell Environment.* - 1986. - Vol. 9. - N 4. - P. 239-260.

ЛЕКТИНЫ В ИССЛЕДОВАНИИ СТРУКТУРЫ УГЛЕВОДНЫХ ЦЕПЕЙ ГЛИКОПРОТЕИНОВ

М.Д. Луцк, С.И. Кусень

Институт биохимии им. А.В. Палладина АН УССР,
Львовское отделение

Одним из наиболее перспективных направлений использования лектинов является применение их в исследовании структуры углеводных цепей гликополимеров. Методология основана на избирательном связывании лектина с соответствующей углеводной детерминантой олигосахаридной цепи полимера и практически не отличается от иммунохимического подхода. Отсюда одно из важных достоинств метода – высокая чувствительность, характерная для иммунологических методов и недостижимая или труднодостижимая для существующих физико-химических методов исследования структуры гликополимеров. Ниже рассмотрены вопросы структуры гликопротеинов, на которые могут быть получены ответы при использовании лектинов в качестве структурных зондов.

Идентификация гликопротеиновых фракций после разделения белковых смесей методом электрофореза в гелях – задача, часто встречающаяся в биологических исследованиях. Обычно для выявления углеводов применяется метод окраски Шифф-йодной кислотой (ШИК) либо альциановым голубым /6, 7/. Предложен также метод дифференциального маркирования сиаловых кислот или галактозы гликопротеинов тритием с последующей радиоавтографией /3/.

Применение лектинов позволяет эффективно решить эту задачу, при этом чувствительность метода намного превосходит ШИК-реакцию, а по сравнению с радионуклидным методом он менее трудоемок и занимает меньше времени. Применяемый нами способ состоит в получении реплики фореграммы на нитроцеллюлозном листке с последующей обработкой различными лектинами, маркированными флуоресцентной или пероксидазной меткой. Минимальный набор лектинов для выявления гликопротеинов состоит из конканавалина А, лектина фасоли и арахиса. При возможности его можно расширить за счет лектинов чечевицы, клешевины, пшеницы, сои, улитки, бобовника, софору. Полное описание

метода приведено в опубликованной работе /2/.

Важным достоинством способа идентификации гликопротеинов по связыванию лектинов является значительное расширение информации о количестве гликопротеиновых фракций. Окраска с помощью ШИК-реакции позволяет выявить только те фракции, которые содержат много углеводов, — либо за счет высокого относительного содержания сахаров, либо вследствие высокого содержания этой фракции в анализируемой пробе. С помощью лектинов можно выявить значительно большее число гликопротеиновых фракций, так как благодаря высокой чувствительности ферментативной метки они позволяют обнаруживать минимальные количества гликопротеина. Например, в эритроцитарных мембранах человека фракции ШИК-I, Ia, 2, 3 представлены гликопротеинами муцинового типа, содержащими O-гликозильные цепи. Они же выявляются и с помощью связывания лектина арахиса после десалирования. С помощью лектинов фасоли и чечевицы выявляются фракции гликопротеинов, содержащие N-гликозильные цепи (белок зоны 3 и в области зон 4.1-4.5), которые при окраске ШИК не видны.

Особенно ценен метод при анализе гликопротеинов клеточной мембраны, где он позволяет наблюдать весьма сложный спектр гликопротеинов; при окраске ШИК спектр намного проще вследствие низкой чувствительности реакции.

По связыванию набора лектинов с гликопротеином можно определить, какого типа углеводные цепи (O- или N-гликозильные) входят в их состав, а при наличии обоих типов цепей примерно оценить их соотношение. Анализ поддается как чистые гликопротеины, так и отдельные фракции гликопротеинов сложной смеси после разделения ее методом электрофореза и получения нитроцеллюлозной реплики.

Нами установлено, что селективным реагентом на O-гликозильные цепи является лектин арахиса, который связывается с O-гликанами после предварительного десалирования их мягким кислотным гидролизом. Избирательностью к O-гликозильным цепям обладает также лектин хлебного дерева, однако, она несколько ниже, чем у арахиса. В отличие от лектина арахиса, наличие сиаловой кислоты в олигосахариде не блокирует взаимодействия с лектином хлебного дерева, поз-

тому последний перспективен для разделения O- и N-гликанов методом аффинной хроматографии. Для окончательных выводов относительно избирательности лектина хлебного дерева требуется больше данных о взаимодействии его с различными модельными гликопротеинами и сахарами.

Связывание соевого агглютинина с гликопротеинами напоминает таковое для лектина арахиса, однако агглютинин сои более избирателен к углеводам и выявляет только некоторые Р_{NA}⁺-фракции мембран эритроцитов человека.

N-гликаны могут быть выявлены по связыванию конканавалина А, лектина чечевицы, клещевины и фасоли. Судить о наличии N-гликанов по связыванию одного из указанных лектинов, в частности Кон А, рискованно, так как связывание лектинов этого типа зависит от степени ветвления N-гликозильной цепи. Известно, что Кон А взаимодействует с двухантенными цепями, в то время как 3- и 4-антенные цепи практически с Кон А и лектином чечевицы не взаимодействуют. Лектин клещевины недостаточно селективен к N-гликанам, так как он специфичен к дисахаридной детерминанте N-ацетиллактозамина, которая может быть и в составе O-гликанов. Лектин фасоли (эритроагглютинин) избирателен к N-гликозильным цепям, однако сродство и селективность его к 2-, 3- и 4-антенным цепям изучена недостаточно. Вместе с тем, анализ взаимодействия перечисленных, а также других лектинов, с гликопротеинами содержит возможность более подробной структурной характеристики N-гликозильных цепей, однако для реализации этой возможности необходимо уточнить взаимодействие препаратов с углеводными детерминантами.

С помощью лектинов можно оценить количество углеводных цепей O- или N-типа в молекуле гликопротеина. Для этого нами разрабатывается метод анализа кинетики связывания лектина с известным количеством гликопротеина, иммобилизованного на нитроцеллюлозной мембране. Способ оценки количества связанного лектина зависит от характера метки и может быть флуорометрическим, радиометрическим или каким-либо другим. По анализу кинетической кривой связывания можно определить количество мест связывания (т.е. количество углеводных цепей) на I моль гликопротеина. В качестве иллюстрации приво-

дим данные о количестве углеводных цепей тиреоглобулина, определенных по связыванию флуоресцирующих лектинов (таблица I). Достоинством метода является его неdestructивный характер, а также высокая чувствительность. На наш взгляд, он представляет интерес и заслуживает дальнейшей разработки и усовершенствования.

Т а б л и ц а I

Характеристики связывания лектинов с тиреоглобулином человека

Сокращенное обозначение лектина	Количество связываемого лектина, моль/моль	K_d связывания / $\times 10^7$ M/
Con A	10,1	0,9
LCL	5,2	2,6
RCA	12,2	1,1
PVA	9,5	4,5
WGA	9,3	21,0

Мол. масса тиреоглобулина 670 кДа, количество углеводных цепей типа А равно 9, количество цепей В - 14 на молекулу /9/.

Наличие характерных или специфических для изучаемого гликопротеина углеводных детерминант может быть выявлено с помощью набора лектинов. Ниже приведен список известных в настоящее время специфических лектинов и узнаваемых ими углеводных детерминант (таблица 2).

Т а б л и ц а 2

Лектины, специфичные к характерным углеводным детерминантам

Лектин	Структура углеводной детерминанты	
	1	2
Агглютинин виноградной улитки	GalNAc α 1-R, антиген Форсмана, антиген А	
Агглютинин тетрагонолобуса пурпурного	L-Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc-, антиген Н типа II	
Агглютинин утесника европейского, тип I	Антиген Н типа I	

I	2
Агглютинин гриффонии обыкновеннолистной, тип IY	Антиген Le ^b
Лектин бобовника анагириolistного	L-Fuc ₄ I--R
Агглютинин алеуры оранжевой	L-Fuc ₄ I--6GlcNAc
Лектин икры вьюна	Антиген B
Лектин мечехвоста	NeuNAc 2--R

Анализ структуры гликопептидов и олигосахаридов с помощью лектинов разработан слабо и находится практически в зачаточном состоянии, однако открывающиеся возможности представляют несомненный интерес. Они обсуждаются ниже, вопросы же отщепления олигосахаридов, их разделения и получения индивидуальных цепей здесь не обсуждаются.

Анализ взаимодействия олигосахарида с лектинами можно проводить либо аффинной техникой путем определения адсорбции сахара на иммобилизованном лектине, либо определяя ингибиторную активность углевода в реакциях гемагглютинации, преципитации или коагуляции гликополимера, вызываемых лектином. Анализ структуры углеводных цепей зависит от типа связи с белком. В O-гликозильных цепях возможно оценить степень их разветвления, для чего необходимо определить соотношение минимальных угнетающих концентраций (ИК) десиализованного углевода относительно лектинов клещевины и арахиса. В случае неразветвленной цепи, представляющей собой дисахарид Gal₂I--3GalNAc, соотношение ИК RCA/ИК PNA будет намного выше, чем у разветвленной цепи. В последней содержится дополнительно один или большее число остатков N-ацетиллактозамина, который будет способствовать взаимодействию с RCA и угнетать связывание с PNA.

При расщеплении по Смитсу /5/ неразветвленная цепь распадается после предварительного десиалирования до продуктов, не взаимодействующих с PNA и другими лектинами. Продук-

ты деградации десиазированной разветвленной цепи содержат нередуцирующие остатки N-ацетилглюкозамина, поэтому они будут взаимодействовать с агглютинином пшеницы и, возможно, с конканавалином А и его аналогами. Следует заметить, что известные O-гликозильные цепи мембранных гликопротеинов имеют небольшую степень разветвленности, тогда как углеводные компоненты секретируемых муцинов имеют в своем составе очень сложные высокомолекулярные структуры /1, 5/.

Исследование N-гликанов в первую очередь включает определение степени ветвления цепи (2-, 3-, 4-антенные цепи). Взаимодействие олигосахаридов с высоким сродством с Кон А, лектинами чечевицы, гороха указывает на 2-антенную структуру. При расщеплении по Смитсу 3- - 4-антенные цепи дают продукты, взаимодействующие с агглютинином пшеницы из-за наличия нередуцирующих остатков N-ацетилглюкозамина /5/. Дифференцирование 3- и 4-антенных цепей с помощью лектинов в настоящее время невозможно вследствие отсутствия препаратов с необходимой специфичностью. Вполне возможно, однако, что такие лектины существуют, и целенаправленный поиск их важен и необходим.

Исследование групповых детерминант, особенно в составе O-гликанов, проводится с помощью лектинов, приведенных в таблице 2. Особый интерес представляют остатки фукозы, которые обуславливают целый ряд специфичностей - H, Le^a, Le^b, Le^x, Le^y. К сожалению, лектины не перекрывают всех названных специфичностей, поэтому наряду с ними желательнее использовать специфические анти-H и анти-Le сыворотки.

В заключение считаем необходимым обратить внимание на то, что для правильной интерпретации результатов, полученных с помощью лектинов, необходимо хорошо знать их тонкую углеводную специфичность. К сожалению, на сегодня только небольшое количество лектинов охарактеризовано достаточно подробно /4, 8/. Трудность подобных исследований состоит в недоступности сложных олигосахаридов известной структуры, используемых в качестве гаптенных. Как альтернативу мы предлагаем изучать взаимодействие лектинов со стандартными гликопротеинами, для которых структура углеводных цепей установлена (тиреоглобулин, фетуин, трансферрин, орозомукоид,

овомукоид, гликофорин А, муцины с известной серологической специфичностью и т.п.). Это не заменяет информации, получаемой с помощью олигосахаридных гаптеннов, однако позволяет сориентироваться в специфичности того или иного лектина и определить его избирательность к типу углеводных цепей.

На основании изложенных данных можно сделать вывод, что лектины представляют собой весьма ценные реагенты в исследовании структуры углеводных цепей гликопротеинов.

Л и т е р а т у р а

1. Деревицкая В.А. Некоторые проблемы химии гликопротеинов // Прогресс химии углеводов. - М.: Наука, 1985. - С. 97-126.
2. Луцик М.Д., Кусень С.И. // Укр. биохим. журн. - 1987. - 59. - № 6. - С. 3-9.
3. Fukuda M., Fukuda M. Cell surface glycoproteins and carbohydrate antigens in development and differentiation of human erythroid cells // The Biology of Glycoproteins.-New-York-London: Plenum Press, 1984. - P. 183-234.
4. Goldstein I., Hayes C. // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1978. - Vol. 35. - P. 127-340.
5. Irimura T., Nicolson G. // Carbohydr. Res. - 1983. - Vol. 115. - N 1. - P. 209-220.
6. Keyser J. // Anal. Biochem. - 1964. - Vol. 9. - N 2. - P. 249-252.
7. Krueger R., Schwartz N. // Analyt. Biochem. - 1987.- Vol. 167. - N 2. - P. 295-300.
8. Osawa T., Tsuji T. // Ann. Rev. Biochem. - 1987.-Vol. 56. - P. 21-42.
9. Spiro R. // J. Biol. Chem. - 1965. - Vol. 240. -N 4. - P. 1603-1610.
10. Tsuji T., Tsunehisa S., Watanabe Y., Yamamoto K., Tohyama H., Osawa T. // J. Biol. Chem. - 1983. - Vol. 258. - N 10. - P. 6335-6339.

ЗНАЧЕНИЕ ЛЕКТИН-УГЛЕВОДНЫХ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ В ФОРМИРОВАНИИ БАКТЕРИАЛЬНО-РАСТИТЕЛЬНЫХ СИМБИОТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Л.В. Косенко, Т.М. Ковалевская

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного
АН УССР

Физиологическая роль лектинов в биотропных взаимодействиях на всех уровнях живого до настоящего времени окончательно не выяснена. Несмотря на то, что тезис об участии углеводовсодержащих веществ и комплементарно специализированных к ним белков – лектинов в распознавании биотических партнеров не оспаривается, намечаются лишь контуры наших представлений о функционировании обоих типов этих биополимеров при коммуникации микро- и макроорганизмов. Полисахариды, также как и лектины, являются высокоспециализированными молекулами и обладают широким спектром биологической активности. Поверхностное расположение полисахаридов в микробной клетке определяет их функциональную роль во взаимоотношениях с другими микро-, а также макроорганизмами. Известно, какое большое влияние оказывают бактериальные полисахариды на функционирование системы иммунитета (СИ) человека и животных. Показано, что они являются иммуномодуляторами, индукторами целого ряда биологических стратегий СИ.

Изучение регуляторных механизмов растений только начинается. Некоторые успехи достигнуты в исследовании развития взаимоотношений между растениями и патогенными микроорганизмами. Установлены первые реакции ответа растения-хозяина на контакт или внедрение фитопатогена. Выявлены вещества (олигосахарины), обладающие регуляторными функциями /5/. Молекулярно-химические основы формирования симбиотических структур изучены совсем мало. Результаты исследований ряда авторов за последние 15 лет позволяют предположить, что кооперирование партнеров на ранних этапах формирования симбиоза происходит с участием лектинов растений и поверхностно локализованных полисахаридов микроорганизмов. Однако вопрос о значении углеводов-белковой рекогниции симбионтов в установлении их контактов является крайне дискуссионным. Способность бактериальных полисахаридов взаимодействовать с лек-

тинами растений-хозяев не оспаривается. Сомнению подлежит селективность лектин-углеводных взаимосвязей.

Целью нашей работы было установить селективность взаимодействия растительных лектинов и бактериальных полисахаридов в зависимости от симбиотических свойств обоих партнеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили симбиотические пары, образованные в результате сочетания одного из 10 штаммов *Rhizobium leguminosarum* и одного из четырех растений-хозяев: кормовых бобов (*Vicia faba* L.), гороха (*Pisum sativum* L.), вики (*Vicia sativa* L.) и чечевицы (*Lens culinaris*).

Экзополисахариды (ЭПС) получали из освобожденной от клеток бактерий культуральной жидкости высаливанием сернокислым аммонием (50 % насыщения). Липополисахариды экстрагировали из сухих клеток бактерий водно-фенольной смесью при 65°C в течение 15 мин по методу Вестфала, очищали с помощью 2 %-ного цетавлена в 0,5 М NaCl /1/.

Лектины получали экстракцией из муки семян бобовых растений физиологическим раствором в течение 1 ч, высаливали сернокислым аммонием (60-80 % насыщения). Очищали аффинной хроматографией с использованием в качестве аффинного сорбента сефадекса Г-100 /3/.

Степень лектин-углеводного сродства симбионтов определяли по степени угнетения активности лектинов экзо- и липополисахаридами, определяемой реакцией подавления геммагглютинации (РПА). Результаты выражены в процентах /4/.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимоотношения симбиотических партнеров, за некоторыми исключениями, строго специфичны. Это означает, что клубеньковые бактерии одного вида способны заражать только свойственное им растение-хозяин. Однако бактерии вида *R. leguminosarum* способны вступать в симбиоз с целой группой бобовых растений, представители которой принадлежат к различным видам. Это кормовые бобы, горох, вика и чечевица.

Основным моментом при изучении селективности взаимо-

связей близкородственных бобово-ризобияльных пар мы считали количественный критерий оценки их лектин-углеводного сродства. Дело в том, что при анализе различного рода проявлений взаимодействия клубеньковых бактерий (кл.б.) с бобовыми растениями методологическим подходом в подавляющем числе случаев является принцип: "да-нет" и значительно реже: "больше-меньше". Вместе с тем сравнительный количественный анализ исследуемых явлений позволяет выделить специфические акты на фоне неспецифических событий. В связи с тем, что сам процесс прикрепления ризобий к корневым волоскам растения-хозяина изучен достаточно полно /6/, мы изучали совместимость симбионтов на уровне молекулярного взаимодействия компетентных структур системы рекогниции, что должно было выявить лектин-углеводные взаимосвязи симбиотических партнеров как бы в чистом виде, без тех дополнительных влияний, которые всегда сказываются, когда исследуется функционирующая биотическая структура или ее компоненты. Для этого из бактерий, выращенных *ex planta*, выделяли поверхностно локализованные полисахариды - ЛПС и ЭПС, из семян растений-хозяев получали лектины, а затем определяли активность их взаимодействия. Известно, что лектины семян и корней изучаемых растений сходны между собой по углеводной специфичности и другим свойствам /7, 8, 9/.

Нами было установлено, что и ЛПС, и ЭПС всех десяти изучаемых штаммов бактерий взаимодействовали с лектинами всех четырех растений-хозяев и не подавляли гемагглютинирующей активности лектинов несвойственных им партнеров - сои и пшеницы (эти лектины были любезно предоставлены нам М.Д. Луциком). При этом было обнаружено, что бактериальные полисахариды наибольшую степень сродства проявляют по отношению к лектину своего доминирующего растения-хозяина (из клубеньков которого они были выделены): полисахариды кл.б. кормовых бобов - к лектинам кормовых бобов, полисахариды кл.б. гороха - к лектинам гороха, полисахариды кл.б. вики и чечевицы - к лектинам вики и чечевицы /2/.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что присоединение растительных лектинов к бактериальным рецепторам носит выраженный селективный характер. Селективность углевод-

белковых взаимосвязей симбионтов определяется прежде всего таким важным свойством, как специфичность. Для несвойственного подбора пар *R. leguminosarum* - пшеница или соя мы получили ответ "нет", а для всех естественных симбионтов - "да", причем во втором случае было также установлено, что более узкая приуроченность ряда бактерий этого вида к одному какому-то бобовому растению в пределах заражаемого круга хозяев определяется большей или меньшей степенью лектин-полисахаридного сродства: чем оно выше, тем специфичней симбиоз. Это легко объясняется тем, что близкородственные симбиотические структуры не должны принципиально различаться между собой, но могут варьировать по степени молекулярно-химического соответствия симбионтов.

Полученные данные представляют собой, с одной стороны, химическое обоснование феномена перекрестной заражаемости целой группы бобовых растений одним видом клубеньковых бактерий, а с другой, являются химическим истолкованием существования внутри вида *R. leguminosarum* отдельных узкогомологических групп бактерий. Оба явления можно объяснить совместимостью симбионтов, одним из факторов которой является комплементарность углеводов-белковых детерминант системы рекогниции. Исходя из обнаруженного факта существования отдельных групп симбионтов внутри рассматриваемых симбиотических структур далее исследования проводили с узкогомологическими парами: кл.б. кормовых бобов - доминирующее растение-хозяин.

Для установления, могут ли полисахариды ризобий определять их симбиотический потенциал, нами были выбраны пять штаммов клубеньковых бактерий кормовых бобов, отличающихся между собой такими важными для микросимбионтов свойствами, как эффективность (азотфиксирующая активность) и конкурентоспособность (рисунок I). Сравнительная оценка аффинного связывания бактериальных полисахаридов с лектином кормовых бобов позволила установить, что степень ЛПС-лектинового сродства бобово-ризобияльных партнеров коррелирует с эффективностью симбиоза (азотфиксирующей способностью) штаммов, а ЭПС-лектинового сродства - с их конкурентоспособностью. Это позволяет сделать предположение, что бактериальные по-

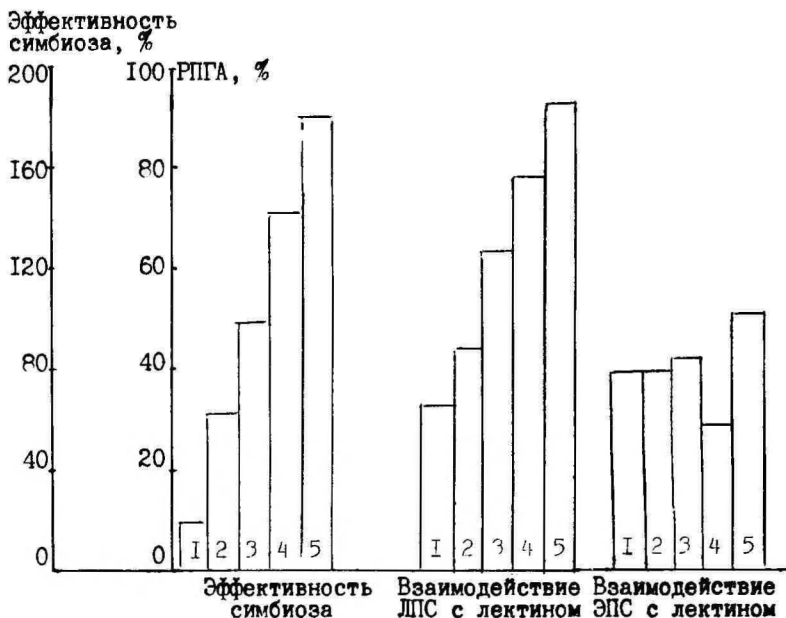


Рис. I. Степень сродства лектина одного сорта кормовых бобов (Полесские) к ЛПС и ЭПС пяти штаммов *R. leguminosarum* (*Vicia faba*): 1-шт. А⁻К⁻ (неэффективный, высококонкурентоспособный), 2-шт. А (малоэффективный, среднеконкурентоспособный), 3-шт. 86 (среднеэффективный, неконкурентоспособный), 4-шт. А⁺К⁻ (высокоэффективный, неконкурентоспособный), 5-шт. А⁺К⁺ (высокоэффективный, высококонкурентоспособный).

лисахариды играют неравнозначную роль при установлении симбиотических контактов: ЭПС, будучи расположенным на крайних периферических участках микробной клетки, первым вступает во взаимодействие с растением-хозяином и выступает посредником бактерий на самых ранних этапах кооперирования, а ЛПС как составная часть клеточной стенки бактерий участвует на стадии закрепления их на корневом волоске.

Известно, что потенциально способные к активной азот-фиксации клубеньковые бактерии оказываются неэффективными на некоторых сортах растения-симбионта. Если это явление связано с физиолого-биохимическим несоответствием партнеров, то проявляется ли это уже на самых ранних стадиях формиро-

вания симбиоза – в процессе распознавания их друг другом? Для выяснения этого вопроса была использована другая модель эксперимента. Мы изучали степень сродства ЛПС и ЭПС одного штамма кл.б. кормовых бобов к лектинам трех сортов растения-хозяина, различающихся между собой по отзывчивости к микросимбионту: на двух из них ("Аушра" и "Дайва") изучаемый штамм проявлял высокую эффективность симбиоза, а на третьем ("Йнгева") был практически неэффективен (рисунок 2).

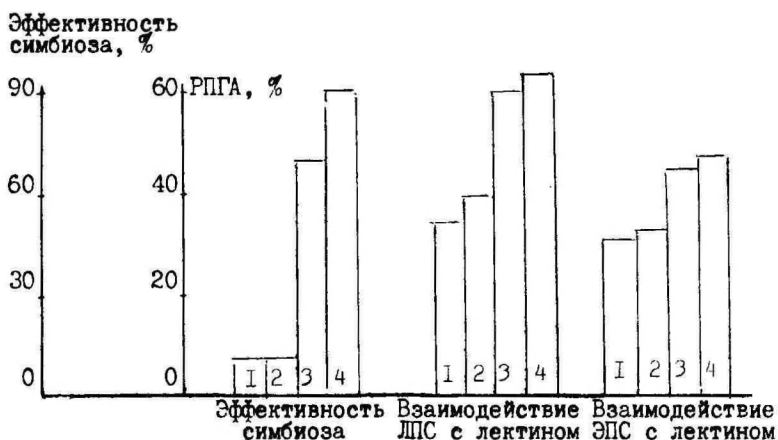


Рис. 2. Степень сродства ЛПС и ЭПС одного штамма *R. leguminosarum* (*Vicia faba*) 86 к лектинам трех сортов кормовых бобов: 1, 2-лектины сорта Йнгева, 3-сорта Дайва, 4-сорта Аушра.

Из семян двух отзывчивых сортов нами было получено по одному характерному для этого вида растений и хорошо описанному в литературе лектину. Из третьего, неотзывчивого сорта, был выделен не один, а два маннозо(глюкозо)специфичных лектина, суммарное количество которых в семенах было в 4-5 раз меньше, чем в других сортах. Однако они отличались друг от друга минимальными ингибирующими дозами сахаров и некоторыми другими свойствами. Активность взаимодействия обоих лектинов неотзывчивого сорта с ЛПС и ЭПС была ниже, чем у лектинов двух других сортов, т.е. при эффективном симбиозе степень лектин-рецепторного сродства симбионтов оказалась вы-

ше, чем при неэффективном. Это означает, что в зависимости от качественной и количественной соотношенности белковых детерминант лектинов растений к полисахаридам бактерий представители различных сортов растения-хозяина могут определять реализацию симбиотического потенциала клубеньковых бактерий, исходно способных к активной азотфиксации. Кроме того, мы еще раз подтвердили, что более высокой эффективности симбиоза соответствует и более высокая лектинсвязывающая активность ЛПС.

Коррелятивная зависимость между ЛПС-лектиновым средством и эффективностью симбиоза – конечным результатом деятельности обоих симбионтов – указывает на исключительно важную триггерную роль ЛПС в симбиотическом процессе. По аналогии с действием бактериальных ЛПС в системе человека и животных, ЛПС *R. leguminosarum* может служить индуктором программ симбиотического кооперирования, которая запускается при взаимодействии ЛПС с лектином корневого волоска. Если это так, то направление и сила ответа растения-хозяина будет зависеть от свойств лектина (или фонда лектинов), уровня его содержания в растении, свойств и уровня содержания бактериальных рецепторов, стереохимических особенностей компетентных структур макромолекул, а также конкретных условий их взаимодействия. Полученные результаты частично иллюстрируют это положение. Наиболее эффективные симбиотические пары удовлетворяют всем требованиям: высокий уровень содержания лектина в растении-хозяине, высокий уровень содержания бактериальных рецепторов, высокая степень полисахарид-лектинового средства (77–90 %). Среднеэффективные симбиотические пары характеризовались высоким уровнем содержания лектинов и полисахаридов, но меньшей их комплементарностью (44–63 %). У неэффективных пар при высоком уровне рецепторов наблюдалась либо низкая степень полисахарид-лектинового средства (33–44 %) при высоком содержании лектинов, либо средняя степень средства, но при меньшем по сравнению с другими растениями-хозяевами содержании лектина.

Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что микробные полисахариды содержат специализированную информацию о симбиотической потенции клубеньковых бактерий:

их специфичности, эффективности, азотфиксирующей активности, конкурентоспособности и др., которая опосредуется через систему углеводов-белковой рекогниции микро- и макросимбионтов, а степень лектин-полисахаридного сродства содержит информацию о потенциальных возможностях конкретной бобово-ризобияльной пары. Несмотря на то что мы, к сожалению, не знаем полного сценария основных событий специфических межмолекулярных взаимодействий, мы считаем, что у нас есть основания рассматривать бактериальные полисахариды и растительные лектины как компоненты системы, ответственной не только за формирование симбиоза, но и за его функционирование.

Л и т е р а т у р а

1. Захарова И.Я., Косенко Л.В. // Методы изучения микробных полисахаридов. - Киев: Наукова думка, 1982. - 192 с.
2. Косенко Л.В., Ковалевская Т.М., Захарова И.Я. // Микробиология. - 1987. - Т. 56. - Вып. 4. - С. 698.
3. Луцки М.Д. // Биохимия. - 1974. - Т. 39. - Вып. 4. - С. 811.
4. Луцки М.Д., Панасюк Е.М., Антонюк В.А. и др. // Методы исследования углеводной специфичности лектинов: Методич. рекомендации. - Львов, 1985. - 22 с.
5. Albersheim P., Darvill A.G., McNeil M. et al. // Proc. NATO Adv. Study Inst., Porto Portese, Aug 23-Sept. 2, 1982". - New York, London, 1983. - P. 293.
6. Dazzo F.B., Truchet G.L. // Current developments in biological nitrogen fixation / Ed. by N.S. Subra Rao. London. E. Arnold, 1984.
7. Hosselet M., Van Driessche E., Van Poucke M., Kanarek L. // Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry. - Berlin, New York, Walter de Gruyter. - 1983. - Vol. 3. - P. 549.
8. Kato G., Maruyama Y., Nakamura M. // Plant and Cell Physiol. - 1981. - Vol. 22. - P. 759.
9. Kijne J.W., Schaal van der I.A.M., Diaz C.L. et al. // ibid. - P. 521.

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ ГЕМАГГЛЮТИНИНОВ (ЛЕКТИНОВ) ПОЧВЕННЫХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

В.Е. Никитина, Ю.В. Итальянская, Л.В. Карпунина, С.К. Курасина, Е. Г. Пономарева, Л.С. Федорова, Л.И. Позднякова
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
АН СССР, г. Саратов

В последние годы значительно возрос интерес к лектинам и агглютиниnam бактерий, играющим существенную роль в биологии микроорганизмов. Одной из главных причин повышенного внимания являются данные о ведущей роли бактериальных лектинов и агглютининов во взаимодействии "патоген-хозяин". Наиболее полно охарактеризованы среди бактериальных лектинов гемагглютинины энтеропатогенных бактерий. Показано, что эти белки (включая экзотоксины) участвуют в специфической адгезии бактерий к животным клеткам, которая предшествует развитию инфекционного процесса /2/.

Мало изучены лектины почвенных азотфиксирующих бактерий, находящихся в симбиотических и ассоциативных взаимоотношениях с высшими растениями. При изучении специфических взаимоотношений ризобий и растительных клеток в симбиотической азотфиксирующей системе до недавнего времени основная роль в обеспечении адгезии бактерий к корням бобовых растений отводилась растительным лектинам. Однако в последнее время появились сведения об обнаружении гемагглютининов у ризобий /6/. Предположительно им отводится та же роль, что и лектинам патогенов - роль адгезинов, обеспечивающих специфическое прикрепление бактериальных клеток к корням растения-хозяина. Изучение лектинов почвенных азотфиксирующих бактерий может способствовать как наиболее полному пониманию молекулярных основ взаимодействия "бактерия-растение", "бактерия-бактерия", так и определенному вкладу в фундаментальные исследования физиологической роли лектинов в самой бактериальной клетке.

Целью настоящего исследования было обнаружение и изучение лектинов некоторых представителей рода азоспирилл, бацилл и ризобий.

Начальным этапом наших исследований явилось изучение

лектинов азоспирилл. Гемагглютинирующая активность (ГА) была обнаружена у двух типовых штаммов и 28 штаммов, выделенных из-под диких и культурных злаков Саратовской области. Для большинства "диких" культур отмечена специфичность к сложным углеводсодержащим соединениям, таким, как нейраминная кислота, глюкуроновая кислота, фруктозо-1,6-дифосфат. С клеточной поверхности типовых штаммов *Azospirillum brasilense* Sp 7 и *Azospirillum lipoferum* 59b были выделены лектины, специфичные к L-фукозе, L-арабинозе и глюкуроновой кислоте соответственно.

Из "диких" штаммов были выбраны две культуры *A. brasilense* 75 и *A. lipoferum* 43, относящиеся к тем же видам, что и типовые, но выделенные из-под пшеницы Саратовская-29, районированной в Саратовской области.

Лектин, выделенный с клеточной поверхности *A. brasilense* 75, обладал специфичностью к L-арабинозе, L-рамнозе и L-маннозе, а лектин *A. lipoferum* 43 - к глюкозо-1,6-дифосфату.

Были изучены зависимость адгезивных свойств указанных выше штаммов от лектиновой активности, взаимодействие лектинов с компонентами растительных корней и влияние фукозоспецифичного лектина на прорастание семян.

Адгезивные свойства микроорганизмов изучают, используя в качестве тест-объектов эпителиальные клетки, эритроциты, кусочки органов, тканевые и органые культуры /8, 7/. Наиболее простой и универсальной моделью для изучения адгезии микроорганизмов являются эритроциты.

Ранее нами было установлено, что все изучаемые штаммы азоспирилл агглютинируют человеческие эритроциты 0(I) группы крови, причем ГА-активность клеток *A. brasilense* Sp 7 избирательна по отношению к этим эритроцитам. Для оценки взаимосвязи лектиновой активности бактерий с их адгезивными свойствами проводилось сравнительное вычисление индекса адгезивности бактерий по методу Брилиса с соавт. /1/. Сравнивали культуры с лектиновой активностью, выращенные на безазотистой среде, и бактерии, лишенные этой активности, выращенные на среде, богатой азотом.

Результаты проведенного исследования представлены на рисунке 1. Полученные данные свидетельствуют о том, что бак-

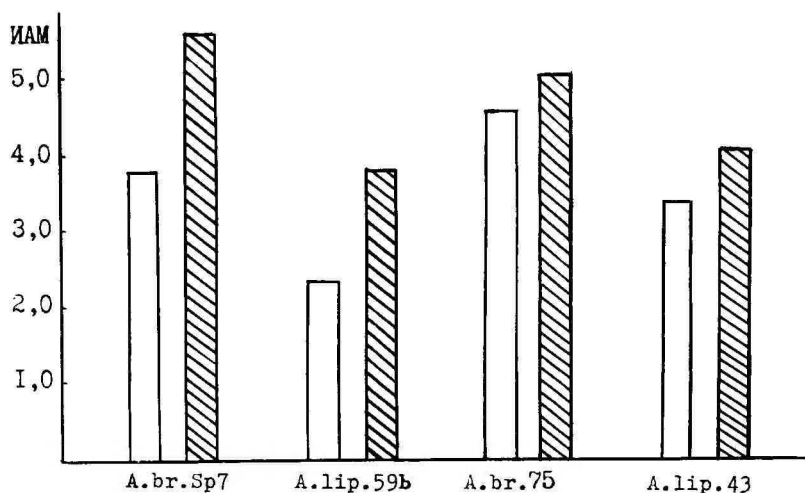


Рис. I. Зависимость адгезивных свойств азоспирилл от лектиновой активности.

- - лектиновая активность отсутствует;
 ▨ - титр гемагглютинации 1:16

териальные клетки с выраженной лектиновой активностью обладают и более высокой адгезивностью. Самый высокий индекс адгезивности отмечен у клеток *A. brasilense* Sp 7, что объясняется, по-видимому, повышенным сродством этих клеток к эритроцитам O(I) группы крови. Следует отметить также, что у бактерий типовых штаммов азоспирилл индекс адгезивности ниже, чем у "диких" культур.

Интересен тот факт, что бактериальные клетки с элиминированной ГА-активностью сохраняют, хотя и на более низком уровне, свои адгезивные свойства. При этом сохраняется полярное прикрепление клеток к эритроцитам, характерное для гемагглютинирующих бактерий.

Возможно, эти данные объясняются существованием двойного механизма адгезии. По мнению ряда исследователей /5/, на участке, где происходит специфическая адгезия, к которой от-

носится и адгезия за счет углеводов-белкового взаимодействия, существует и другой тип адгезии, возможно, неспецифической, которая играет определенную роль в укреплении и поддержании специфического взаимодействия; с другой стороны, выращивание бактерий в присутствии значительных количеств азота может и не приводить к полному ингибированию синтеза лектина, а вызывать какие-либо конформационные перестройки в его молекуле, либо частичное блокирование углеводов-связывающих участков, что приводит к потере поливалентности, а, следовательно, агглютинирующей способности белка, но сохраняет способность, хотя и ослабленную, к адгезии. Вопросы участия лектинов в специфической адгезии требуют дальнейшего изучения.

Одним из проявлений специфического взаимодействия лектинов с гликоконъюгатами является образование преципитатов. При изучении симбиотических взаимоотношений ризобияльных клеток с бобовыми растениями метод преципитации растительных лектинов с полисахаридными компонентами клеточной поверхности ризобий наряду с другими методами использовался для доказательства специфического узнавания на уровне "штамм бактерий - вид растения" /4/.

Для изучения реакции преципитации лектинов с экстрактами корней использовали один из вариантов иммунодиффузии в геле - метод интерфазных колец преципитации по Kato et al. /4/. Из корней 7-дневных проростков пшеницы получали фракции экзокомпонентов - мембранную и цитозольную /3/.

Т а б л и ц а

Реакция преципитации лектинов азоспирилл с экстрактами корней пшеницы Саратовская-29

Фракции	Титр преципитации лектинов (0,01 %)			
	A.br. Sp7	A.lip. 59b	A.br. 75	A.lip. 43
Экзокомпоненты	2-4	2-4	32	16
Цитозольная	16	16	4	2-4
Мембранная	4	8	64	8

Как показано в таблице, лектины всех изучаемых штаммов азоспирилл в той или иной степени преципитировали компоненты экстрактов корней пшеницы, однако характер взаимодействия и титры преципитации были различными. Самый высокий титр в реакции преципитации с экзокомпонентами и мембранной фракцией наблюдался у лектина *A. brasilense* 75. Титр преципитации лектина *A. lipoferum* 43 был несколько ниже. Лектины типовых штаммов *A. brasilense* Sp 7 и *A. lipoferum* 59 преципитировали поверхностные компоненты корневых экстрактов довольно слабо. При взаимодействии с цитозольной фракцией титр преципитации этих лектинов был выше.

Результаты проведенных исследований показывают, что лектины бактериальных штаммов, выделенных из-под пшеницы, проявляют большее сродство к поверхностным компонентам корней, чем лектины типовых штаммов. Однако для полного суждения о роли бактериальных лектинов в межклеточном узнавании необходимы дальнейшие исследования специфических и неспецифических взаимодействий лектинов с растительными компонентами, в том числе и тех взаимодействий, которые не сопровождаются образованием преципитатов.

В последние годы появляется все больше сведений о том, что бактериальные лектины могут не только выступать в роли адгезинов, но и, являясь полифункциональными биополимерами, проявлять различные биологические свойства /9/.

Нами было обнаружено (рисунок 2), что фукозоспецифичный лектин *A. brasilense* Sp 7 оказывает, в зависимости от концентраций, регулирующее влияние на скорость прорастания семян пшеницы сорта Саратовская-29. Семена прорастивали в растворе лектина разной концентрации в течение четырех суток. Среднюю длину корней полученных проростков сравнивали с длиной корней контрольных растений, выращенных в физиологическом растворе. Установлено, что раствор лектина с концентрацией белка 500 мкг/мл полностью подавляет способность семян пшеницы к прорастанию. Ингибирующее действие лектина оказалось обратимым: семена, удаленные из раствора лектина, промытые и помещенные в физиологический раствор, восстанавливали способность к прорастанию. При снижении концентрации лектина в 50 раз наблюдался обратный эффект — стимуляция

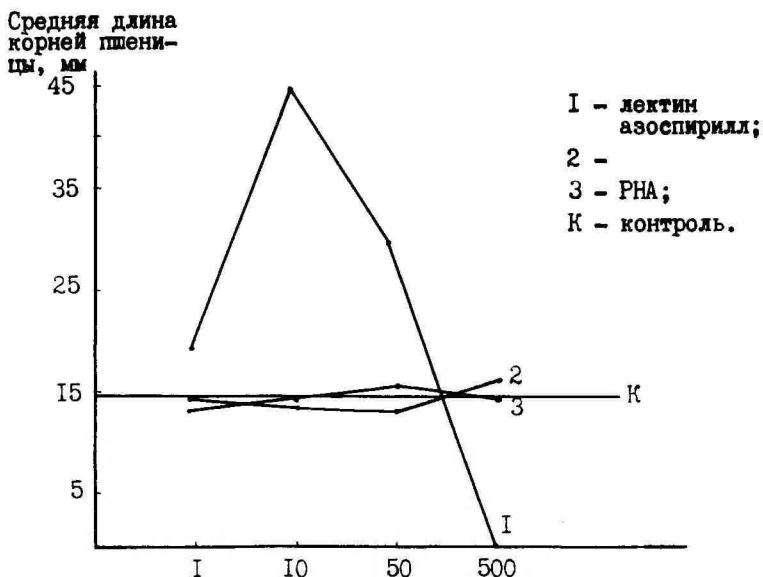


Рис. 2. Влияние лектина *A. brasilense* Sp 7 на способность семян пшеницы к прорастанию.

прорастания зерновок. С дальнейшим снижением концентрации стимулирующей эффект лектина ослаблялся, и при разведении исходного раствора в 500 раз скорость прорастания семян не отличалась от контрольной. Лектины растительного происхождения - лектин зародышей пшеницы и фитогемагглютинин фасоли, взятые в тех же концентрациях, не оказывали влияния на прорастание семян. Наблюдаемый эффект под действием фукозоспецифичного лектина, видимо, связан с его влиянием на митотическую активность растительных клеток.

Начаты исследования лектинов бактерий родов *Bacillus* и *Rhizobium*. Выделены препараты лектинов из *Bacillus polymyxa* I460, специфичные к глюкуроновой кислоте, фруктозо-1,6-дифосфату, D-галактозамину HCl, D-глюкозамину HCl, как с поверхности клеток, так и из культуральной среды. Обнаружены и выделены гемагглютинины из ризобияльных клеток *Rhizobium leguminosarum* I003.

Необходимо дальнейшее изучение физико-химических и био-

логических свойств бактериальных лектинов с целью выяснения их роли в функционировании азотфиксирующих симбиотических систем.

Л и т е р а т у р а

1. Брилис В.И., Брилис Т.А., Ленцлер Х.П., Ленцлер А.А. // Лабораторное дело. - 1986. - № 4. - С. 210-212.
2. Езепчук Д.В. Патогенность как функция биомолекул. - М.: Медицина, 1985.
3. Методы биохимического анализа растений / Под ред. В.В. Полевого, Г.Б. Максимова. - Л.: Изд-во ЛГУ, 1978. - 192 с.
4. Kato G., Maruyama Y., Nakamura M. // Argic.Biol.Chem. - 1980. - Vol. 44. - P. 2843-2855.
5. Kato G., Maruyama Y., Nakamura M. // Plant and Cell Physiol. - 1981. - Vol. 22. - N 5. - P. 759-771.
6. Kijne J.W., van der Schaal C.A.U., Diaz C. L., van Iren F. // Lectins /Eds Bog-Hansen T.C. and Splenger G.A. - Berlin; New York: W. de Gruyter and Co. - 1983. - Vol. 3. - 521 p.
7. Källénus G., Korhonen T. // Enterobacterial surface antigens, 1985. - P. 321-332.
8. Microbial adhesion and aggregation / Ed. Marschall K. - Berlin; Heidelberg; New York; Tokyo, 1984.
9. Roth J. The lectins molecular probes in cell biology and membrane research. - Jena: Gustav Fisher Verlag, VEB, 1978. - 185 p.

ДЕЙСТВИЕ КОНКАВАЛИНА А НА СЕКРЕЦИЮ ФЕРМЕНТОВ У КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

В.В. Лупашин, А.Б. Циоменко, И.С. Кулаев
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР,
г. Пущино

В последнее время лектины нашли широчайшее применение в исследовании структуры и функции клеточной поверхности. Помимо основного свойства - вызывать агглютинацию клеток, многим из них присущи и другие особенности, приводящие к нарушению некоторых фундаментальных процессов в биологических объектах. Известно, что многие лектины проявляют митоген-

ные, цитолитические и токсические свойства. Лектины могут нарушать биосинтез и функционирование ферментных систем, что особенно ярко проявляется в тех случаях, когда ферменты являются гликопротеинами.

Инструментом нашего исследования служил фитолектин конканавалин А (кон А), выделенный Самнером в 1919 году из мотыльковой канавалии *Canavalia ensiformis*. Молекула кон А состоит из четырех идентичных субъединиц. Каждая субъединица представляет собой глобулярный белок с молекулярной массой 25 кД. С углеводсвязывающим участком, который имеется у каждой субъединицы, может связываться только один гликозильный остаток. Молекула кон А содержит также ионы Mn^{2+} и Ca^{2+} , необходимые для проявления углеводсвязывающей активности. Кон А способен связывать маннозу, глюкозу, N-ацетилглюкозамин и их производные. Наибольшей комплементарностью к связывающим центрам кон А обладает дрожжевой маннан и маннозосодержащие гликопротеины.

Все известные на настоящий момент дрожжевые секретируемые белки являются гликопротеинами, во всяком случае на стадии предшественника. Высокомолекулярные полиманнозные цепи присоединяются к полипептиду через хитобioзный мостик по остаткам аспарагина. Кроме такого N-гликозилирования, дрожжевые гликопротеины часто O-гликозилированы, в этом случае короткие маннанные цепочки присоединяются по остаткам серина и треонина. Углеводная часть таких типичных для клеточной оболочки ферментов, как кислая фосфатаза (КФ) и инвертаза, составляет до 50 % их молекулярной массы.

Изучение молекулярных механизмов секреторного процесса у дрожжевых организмов представляет определенный научный и практический интерес, особенно усилившийся в последние годы в связи с использованием дрожжей для биотехнологических целей — синтеза чужеродных белков и получения их в секретируемой форме.

Для успешного изучения секреторного процесса необходимо создать условия, в которых секретируемый белок был бы легко доступен определению. Чтобы получить такую возможность исследователи прибегают к широко распространенному методу протопластирования: с помощью литических комплексов клеточная

стенка разрушается полностью, в случае протопластов, или частично, в случае сферопластов. Клетки после такой обработки, естественно, нельзя считать интактными. Однако при их помещении в специально подобранные жидкие среды удается наблюдать выход вновь синтезированных компонентов периплазмы и клеточной стенки во внешнюю среду.

Используя технику протопластирования и изучая закономерности секреции некоторых гликопротеинов у дрожжевых протопластов и сферопластов, нам удалось существенно расширить понимание процессов регуляции их биосинтеза и секреции /3/.

Если на протопласты с полностью удаленной клеточной стенкой подействовать определенными концентрациями кон А, то будет наблюдаться подавление многих биохимических реакций, в том числе и биосинтез секретируемых гликопротеинов (рисунок I).

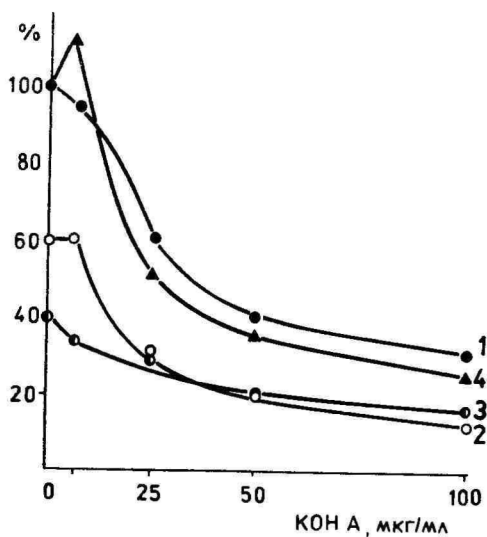


Рис. I. Зависимость биосинтеза и секреции кислой фосфатазы, а также включения (³H)-лейцина в белок, от концентрации кон А у протопластов. За 100 % принята активность КФ в контроле. 1 — общая активность, 2 — секретируемая активность, 3 — активность, связанная с протопластами, 4 — включение (³H)-лейцина.

Совершенно по-иному обстоит дело, если клеточную стенку удалить не полностью, а частично, то есть, если лектином подействовать на сферопласты (рисунок 2). В этом случае кон А вызывает эффект, выражающийся не в общем подавлении белкового синтеза, а в избирательном торможении секреции гликопротеинов клеточной оболочки, например, КФ и инвертазы.

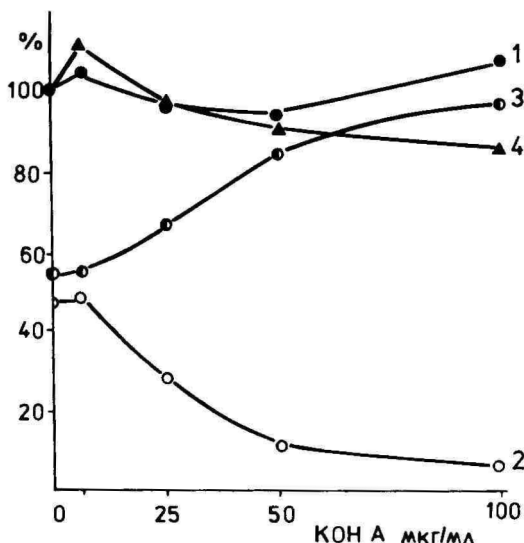


Рис. 2. Зависимость биосинтеза и секреции кислой фосфатазы, а также включения (³H)-лейцина в белок, от концентрации кон А у сферопластов. За 100 % принята активность КФ в контроле. 1 — общая активность, 2 — секретируемая активность, 3 — активность, связанная с сферопластами, 4 — включение (³H)-лейцина.

Таким образом нам удалось показать, что воздействуя на измененную клеточную поверхность, можно вызвать избирательное торможение секреции гликопротеинов без нарушения их синтеза.

Однако секретировать в среду гликопротеины могут не только клетки, лишённые оболочки, но и интактные дрожжи. При росте на богатых питательных средах в культуральную жид-

кость экспортируется до 40 % инвертазы и КФ. Применяв лектин для изучения секреции белков целыми клетками, мы прежде всего установили, что лектин в широких пределах его концентраций не влиял на рост клеток. В то же время, подобно тому, как это наблюдается у сферопластов, кон А специфически тормозил экспорт КФ и инвертазы, вызывая их накопление внутри клеток.

На рисунке 3 показано влияние различных концентраций лектина на распределение КФ в клетках и среде. Полное прекращение экспорта фермента наступало при концентрации кон А 400 мкг/мл. Важно отметить, что даже при полном подавлении экспорта КФ при указанной концентрации и выше, кон А не вызывал изменения активности КФ, локализованной в клеточной оболочке, то есть определяемой на целых клетках.

Более детальное рассмотрение характера действия кон А приведено на рисунке 4. Так, если клетки росли в присутствии той концентрации лектина, которая тормозила экспорт, то вся активность КФ, предназначенная для выхода в культуральную среду, накапливалась внутри клеток. Возможность ее выхода могла быть создана путем введения в среду ингибитора связывания лектина- α -метилманнозида. Одновременное внесение α -метилманнозида и ингибитора белкового синтеза-циклогексимида не мешало выходу фермента. Это указывало на то, что экспортированный белок не был синтезирован de novo. Выход накопленного фермента можно было предотвратить путем обработки клеток ингибитором дыхания - азидом натрия перед внесением α -метилманнозида. Это свидетельствовало об энергозависимости процесса прохождения фермента через плазмалемму. Последнее из указанных обстоятельств было продемонстрировано с помощью цитохимической реакции на КФ. Только при обработке клеток азидом натрия удалось зафиксировать накопление КФ в примембранном слое клеток /2/.

Аналогичные результаты были получены нами для другого секретируемого фермента - инвертазы.

Механизм действия лектина на процесс секреции не ясен. Предполагается, что кон А взаимодействует с углеводсодержащими рецепторами, ассоциированными с плазмалеммой. Различный эффект лектина определяется разной доступностью этих

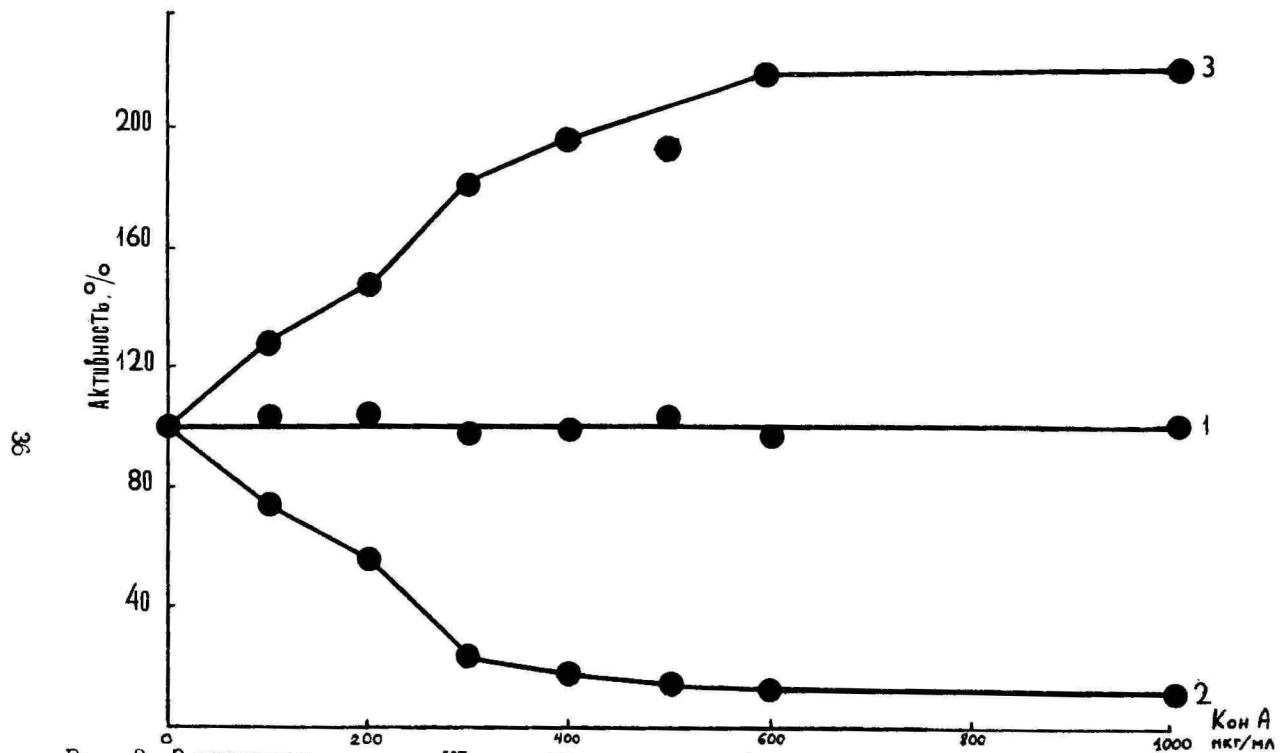


Рис. 3. Зависимость экспорта КФ от концентрации кон А в среде. 1 - активность КФ внутри клеток, 2 - в клеточной оболочке, 3 - в культуральной жидкости. Внутриклеточную активность определяли в лизате протопластов.

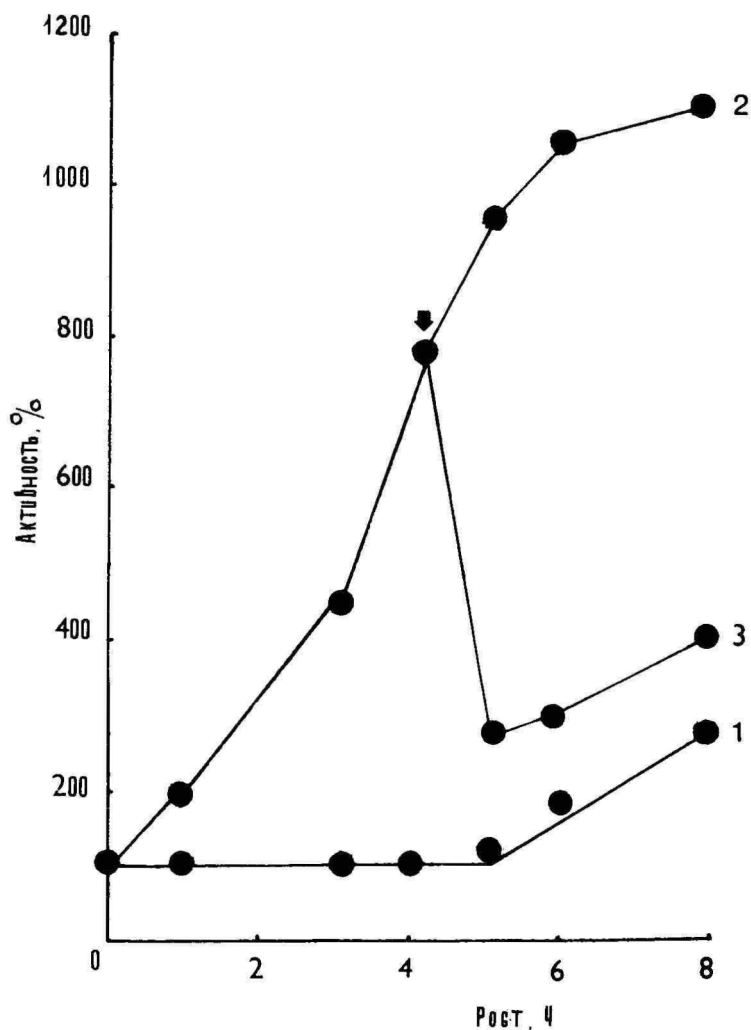


Рис. 4. Накопление экспортируемой КФ внутри клеток, обусловленное кон А, и снятие этого эффекта α -метилманнозидом. 1 - внутриклеточная активность КФ в контрольном варианте, 2 - добавление кон А, 500 мкг/мл, 3 - следующее за кон А внесение α -метилманнозида (0,5 М) и циклогексида (10 мкг/мл). Стрелкой отмечен момент внесения α -метилманнозида и циклогексида.

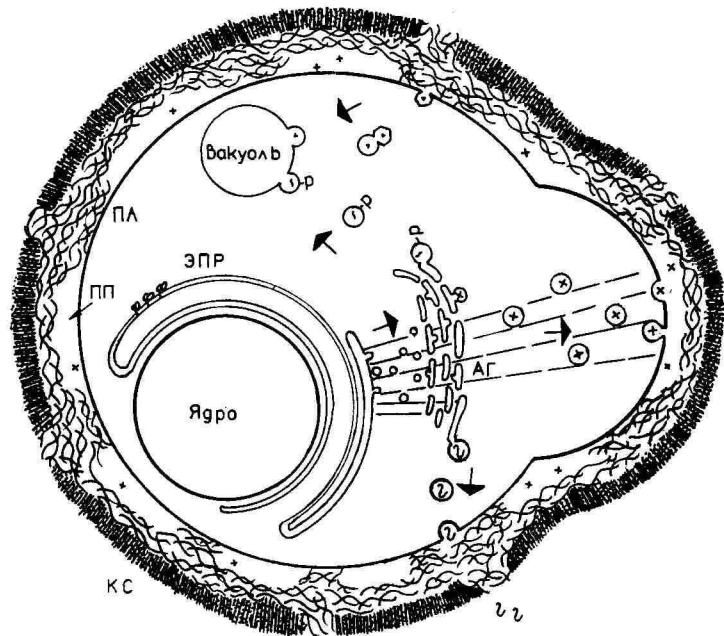


Рис. 5. Схема секреции белков у дрожжей. КС - клеточная стенка, ПП - периплазматическое пространство, ПЛ - плазмалемма, АГ - аппарат Гольджи, ЭПР - эндоплазматический ретикулум.

рецепторов для внешних агентов у интактных клеток и клеток, частично или полностью лишенных клеточных стенок.

Таким образом, на интактных клетках лектин полностью тормозит только экспорт ферментов в окружающую среду. На основании полученных данных, а также наших работ по определению проницаемости клеточной оболочки дрожжей /2/ и изучению секреции гетерологичных белков /1/, нами предложены существенные дополнения в схеме секреции белков у дрожжевых организмов (рисунок 5). В ней предусмотрено разветвление терминальной стадии секреторного процесса на два независимых потока: доставляющего ферменты клеточной оболочки на периферию клетки и обеспечивающего экспорт белков в окружающую среду. С помощью конканавалина А можно полностью разобщить эти потоки.

Л и т е р а т у р а

1. Скрябин К.Г., Циоменко А.Б. и др. Биотехнология, 1987. - Т. 3. - С. 312.
2. Циоменко А.Б., Лупашин В.В. и др. Микробиология, 1987. - Т. 56. - С. 797.
3. Циоменко А.Б., Рязанова Л.П. и др. Биохимия, 1983. - Т. 271. - С. 1000.

РОЛЬ ЛЕКТИНОВ В ФОРМИРОВАНИИ ЖИВЫХ СИСТЕМ РАЗНЫХ УРОВНЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Л.И. Линевиц

Институт биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, г. Москва

Лектины, главным свойством которых является специфическое связывание с углеводами определенного строения, участвуют в клеточном узнавании, поскольку клеточная поверхность включает углеводы или углеводсодержащие полимеры. Под узнаванием понимают специфически направленное и пространственно организованное установление контактов между молекулами биополимеров. Такие контакты устанавливаются при стерической дополнителности (комплементарности) взаимодействующих поверхностей /2/. В.А. Энгельгардт в своей статье "О некоторых атрибутах жизни: иерархия, интеграция, узнавание" пишет:

"Это значение так велико и настолько выражено именно в процессах живого мира, что есть основание видеть в нем, как уже делают некоторые авторы, типичный атрибут жизни такого же порядка, как, например, организация; это, впрочем, тем более обосновано, что именно для возникновения организации явления узнавания, несомненно, играют роль одного из ключевых факторов" /2/.

Создатель теории происхождения жизни А. И. Опарин /1/ рассматривает межмолекулярные взаимодействия как важный фактор эволюции, а явления самосборки всевозрастающей сложности — как определенные стадии эволюционного процесса.

Лектин-углеводное взаимодействие, определяющее узнавание клеток по их поверхности, является организованным принципом становления жизни на разных ступенях иерархии, что является при рассмотрении следующего ряда систем возрастающей сложности: одноклеточные (прокариоты и эукариоты), простейшая форма многоклеточности (колониальные микроорганизмы), многоклеточные (губки и высшие организмы), межвидовые сообщества, взаимовыгодные (симбиоз в лишайниках и азотфиксирующих микроорганизмах) и антагонистические (патосистемы бактерии — растения, бактерии — животные).

По одноклеточным эукариотам узнавание изучено на дрожжах, у которых выражено половое узнавание. Выделены и изучены компоненты клеточной поверхности дрожжей, обладающие лектиновой активностью, и полимеры углеводной природы, специфически связывающиеся с этими веществами, локализованными в оболочке клеток противоположного пола.

Клеточное узнавание при развитии колониальных микроорганизмов изучено на слизевиках. Такие вещества, как дискоидин и паллидин, которые являются лектинами, ответственны за стадии агрегации одноклеточных форм слизевиков в многоклеточные формы. Формирование при этом колонии с внутренней организацией — первый шаг на пути возникновения многоклеточных организмов, поэтому их изучение представляет особый интерес для эволюционной теории.

В межклеточных и межтканевых взаимодействиях, которые представляют собой универсальный интегрирующий механизм целостности организма на всех этапах эволюции, лектины и спе-

цифические для них углеводы и углеводсодержащие полимеры клеточных поверхностей также играют большую роль. Особенно наглядно это продемонстрировано на губках. Роль лектинов в клеточных узнаваниях у высших животных еще не изучена, однако широкое распространение лектинов в животных дает возможность предположить, что и у высших организмов в основе клеточного узнавания лежат механизмы, сходные с изученными на более простых организмах - колониальных формах и губках.

На экологическом уровне, т.е. при образовании систем взаимовыгодных и невыгодных сообществ, участие лектинов показано на весьма многочисленных примерах. Так, доказано участие лектинов в образовании лишайников - симбионтов водорослей и грибов. Доказано, что эукариотический организм - гриб - выделяет лектин, который узнает совместимый вид прокариотического организма - водоросли и связывается за счет углеводсодержащих компонентов его поверхности.

Особенно интенсивно в последние годы изучается механизм образования симбиотической системы клубеньковые бактерии - бобовое растение. Изучение молекулярных основ взаимодействия микро- и макросимбионтов показало, что это крайне сложный и многофакторный процесс, детали которого еще не ясны. Связывание бактерий с клетками корневого волоска кажется наиболее важным этапом становления симбиотической системы, однако для формирования клубенька необходимы по крайней мере еще три стадии: узнавание бактериями корневых волосков до связывания с ними, внедрение бактерий внутрь корневых волосков вслед за связыванием и превращение бактериальных клеток в бактериоиды, т.е. форму, в которой протекает процесс азотфиксации. На всех этапах образования симбиотической системы и в процессе ее дальнейшего функционирования ведущая роль принадлежит углеводсодержащим биополимерам клеточной поверхности бактерий и их взаимодействию с лектинами.

В последние десятилетия интенсивно изучается роль лектинов при антагонистических взаимоотношениях видов. Получены данные об углевод-лектиновом узнавании в образовании различных патосистем: при бактериальных и грибных заболеваниях растений и животных. Особенно наглядно показано, что взаимоотношения партнеров в сообществах высших растений с бакте-

риями и грибами определяется углевод-лектиновым узнаванием на примере взаимодействия картофеля с вирулентными и авирулентными штаммами бактерий и пшеницы с патогенным грибом.

Только начинается изучение роли лектинов в развитии инфекционных заболеваний животных и человека. Результаты исследований последних лет с большой убедительностью говорят о том, что инфекционному процессу предшествует специфическая адгезия бактерий к животной клетке, которая является следствием лектин-углеводного узнавания. Роль такого узнавания в адгезии, предшествующей началу инфекционного процесса, установлена при изучении взаимодействия кишечной палочки со слизистой кишечника. Аналогично идет адгезия возбудителя брюшного тифа, холерного вибриона и возбудителей других инфекционных заболеваний. Лектины, по-видимому, имеют значение не только в начале развития заболевания, но и на дальнейших его этапах. Так, показано, что некоторые эндотоксины по механизму действия сходны с такими лектинами, как абрин и рицин. Дифтерийный токсин был подвергнут весьма интенсивному изучению, в результате которого было показано, что он может быть рассмотрен как модель токсина с лектиновой активностью.

Уже сейчас можно утверждать, что главной функцией лектинов является узнавание углеродсодержащих компонентов клеточных поверхностей, которое на каждом из уровней организации ведет ко все возрастающей интеграции. Углевод-белковое узнавание здесь проявляется как организационный принцип становления жизни разных ступеней иерархии. Дальнейшее изучение этой категории должно помочь понять природу жизни в целом. Поэтому исследование лектинов как компонентов узнающей системы является весьма перспективным направлением биохимии, имеющим большое общеприкладное значение.

Л и т е р а т у р а

1. Опарин А.И. Материя - жизнь - интеллект. - М.:Наука, 1977.

2. Энгельгардт В.А.//Современное естествознание и материалистическая диалектика. - М.: Наука. - С. 342.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ КОНКАВАЛИНА А НА ТУЧНЫЕ КЛЕТКИ

Г.М. Кравцов, Е.Э. Граевская, Н.О. Дулин,

Е.Н. Гончаренко, Ю.Б. Кудряшов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Лектин-Кон А и антитела к IgE стимулируют тучные клетки к выделению биогенного амина - гистамина /3/. В механизме действия на тучную клетку Кон А и анти-IgE много общего. Кон А и анти-IgE инициируют подвижность поверхностных рецепторов, что сопровождается агрегацией белков мембраны, то есть приводит к образованию кластеров /9/. Оба соединения вызывают увеличение уровня свободного кальция и активацию фосфоинозитидного цикла в тучных клетках - ступеней, необходимых для индукции экзоцитоза /6/. Поэтому механизм действия Кон А на тучные клетки можно рассматривать как модель событий, происходящих при активации мастоцитов *in vivo*. В настоящее время практически отсутствуют данные о роли цитоскелета в секреции тучных клеток. Далеки от завершения исследования, направленные на изучение конкретных механизмов передачи сигнала от рецептора к внутриклеточным компонентам мастоцитов.

В представленном исследовании рассматриваются следующие вопросы:

- Роль цитоскелета в рецепции Кон А;
- место протеинкиназы С в секреции тучных клеток, индуцированных Кон А;
- взаимосвязь фосфорилирования белков и высвобождения гистамина при действии на тучные клетки Кон А.

При фиксации тучной клетки глutarовым альдегидом в ней можно заметить базальную мембрану (плазматическую) и рядом как бы внутреннюю мембрану, видимо, образование, состоящее из микрофиламентов, темноокрашенные секреторные гранулы и ярко выраженное ядро. После выделения цитоскелета с помощью обработки мастоцитов тритоном X-100 форма клетки сохраняется, хотя и не видно плазматической мембраны, гранулы совершенно прозрачны, организованной микрофиламентной системы не наблюдается. Микротубулярная система не просматривается как на целых фиксированных клетках, так и на цитоскелете, что

согласуется с данными других авторов, полученных в самое последнее время /2/.

Для определения мест связывания Кон А с тучными клетками мастоциты обрабатывали FITC-Кон А (250 мкг/мл), часть клеток после отмывки от флуоресцентного лектина фиксировали глицеральным альдегидом, из другой части получали цитоскелет и также фиксировали. FITC-Кон А связывается как с цельными клетками, так и с обработанными тритоном X-100 мастоцитами. Из полученных нами данных следует, что при связывании Кон А с рецептором образуются кластеры (кэпы), и рецептор Кон А непосредственно связан с элементами цитоскелета. Еще одно важное доказательство участия цитоскелета в рецепции Кон А было получено при электрофорезе белков целых клеток и цитоскелета на полиакриламидном геле. Как видно из рисунка I, полоса белка около 30 кДа присутствует на электрофореграмме белков целых отмываемых клеток и во фракции цитоскелетных белков.

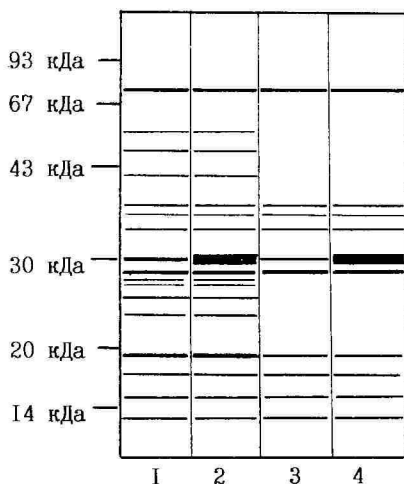


Рис. I. Схема электрофореграммы белков тучных клеток и цитоскелета после воздействия на них Кон А.

1. Контроль, клетки;
2. Кон А (30 мкг/мл);
3. Контроль, цитоскелет;
4. Кон А (30 мкг/мл), цитоскелет.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что одна из субъединиц рецептора Кон А тучных клеток прямо связана с белками цитоскелета, и при взаимодействии с лектином, по-видимому, меняется подвижность цитоскелетного каркаса, что приводит в конечном счете к образованию кластеров.

После связывания Кон А с рецептором тучных клеток происходят увеличение содержания свободного Ca^{2+} и дегрануляция. Повышение концентрации свободного кальция связано с открыванием рецепторзависимых кальциевых каналов /1/. В то же время, как известно из данных литературы /5/, Кон А очень быстро (в течение 30 с) вызывает через активацию фосфолипазы С усиление обмена фосфоинозитидов с образованием диацилглицерина - вторичного посредника передачи сигнала /8/. Диацилглицерин вместе с Ca^{2+} активирует протеинкиназу тучных клеток /7/. Соединение, имитирующее действие Ca^{2+} и диацилглицерина на протеинкиназу С - опухолевый промотор, форболовый эфир, в нашем случае 12-0-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетат (ТРА), - усиливает высвобождение гистамина из тучных клеток.

В связи с этим можно предположить, что один из механизмов секреции, индуцированной Кон А, непосредственно связан с активацией протеинкиназы С. Для проверки этого положения было проведено сравнительное исследование влияния Кон А и ТРА на фосфорилирование белков тучных клеток. ТРА вызывает усиление фосфорилирования белков с молекулярными весами 14,5; 20, 28, 36, 47, 62-65, Кон А усиливает фосфорилирование белков с молекулярными весами 14,5; 20-28 кДа (рисунок 2). Сравнивая кинетики высвобождения гистамина и фосфорилирования белков, следует отметить, что повышение фосфорилирования белков 14,5; 20, 23-25 и 28 кДа наблюдается как при действии ТРА, так и Кон А и совпадает по времени с дегрануляцией. На основании этих экспериментов нельзя ответить на вопрос, фосфорилирование какого класса белков (белки плазматической мембраны, гранул, цитозоля или цитоскелета) играют ключевую роль в экзоцитозе мастоцитов. Известно, что процесс секреции в тромбоцитах, хромафинных клетках, нейтрофилах, клетках поджелудочной железы и нервных окончаниях /4/

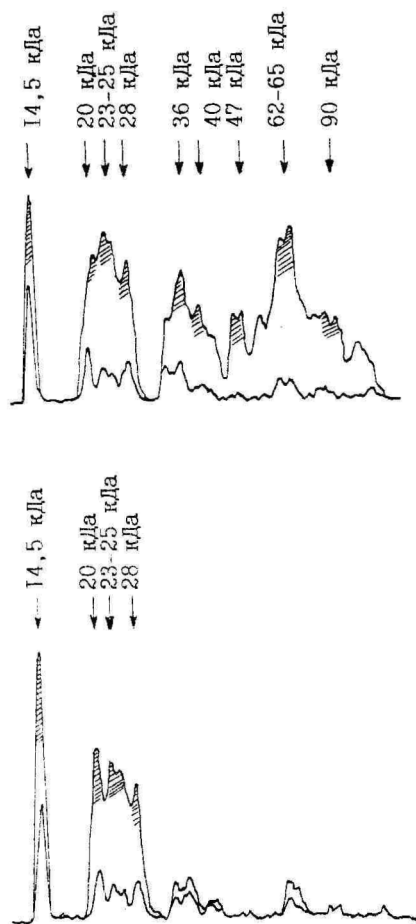


Рис. 2. Влияние ТРА (а) и Кон А (б) на фосфорилирование белков тучных клеток. Денситограмма, стрелками указан молекулярный вес белков, фосфорилирование которых стимулируется ТРА (10 М) и Кон А (30 мкг/мл).

сопровождается усилением фосфорилирования цитоскелетных белков, что приводит к модификации объема и формы клеток. В связи с этим фосфорилированию цитоскелетных белков отводят ключевую роль в механизме экзоцитоза.

Учитывая все вышесказанное, а также то, что рецептор Кон А сцеплен с белками цитоскелета мастоцитов, мы исследовали состав и фосфорилирование белков цитоскелета при действии на тучные клетки ТРА и Кон А. После обработки мастоцитов тритоновым X-100 в полиакриламидном геле разделяются белки с молекулярными весами 13, 14,5; 16, 19, 28, 30, 35, 58, 71 кДа. Основными белками цитоскелета являются белки 28, 30, 33, 35 кДа, остальные являются минорными компонентами. Базальное фосфорилирование в основном наблюдается в белках 14,5; 16, 18, 24, 49 кДа. Кон А усиливает фосфорилирование цитоскелетных белков с молекулярным весом 14, 16, 18, 49 кДа. Аналогичное усиление фосфорилирования белков цитоскелета наблюдается и при воздействии ТРА на мастоциты.

Итак, можно заключить, что при влиянии Кон А на тучные клетки, один из механизмов действия лектина связан с активацией протеинкиназы С, и, возможно, других киназ, что приводит к усилению фосфорилирования белков цитоскелета мастоцитов. Последнее, по-видимому, сказывается на полимеризации филаментов цитоскелета, определяющих перемещение секреторных гранул к плазматической мембране при экзоцитозе.

Л и т е р а т у р а

1. Граевская Е.Э., Кравцов Г.М., Ломакин Н.Н., Гончаренко Е.Н. 1988, I-я Республиканская конф. "Изучение и применение лектинов" (в печати).

2. Akagi, Mioshi K., Tasaka K. // J. Electron. Microsc., 1986. - Vol. 35. - Suppl. 3. - P. 2629-2630.

3. Goth A., Johnson A.R. // Life Sci. - 1975. - Vol. 16. - P. 1201-1214.

4. Hutton J.C. // Cell Calcium. - 1986. - Vol. 7. - P. 339-352.

5. Imai A., Izhizuka Y., Nakashima S., Nozawa Y. // Archiv Biochem. Biophys. - 1984. - Vol. 232. - P. 259-268.

6. Kazimierzczak W., Diamant B. // Progress in Allergy.- 1978. - Vol. 24. - P. 295-365.

7. Nishizuka Y.//Nature.- 1984.-Vol.308.- P.7603-7609.
8. Nishizuka Y.//Science.- 1986.-Vol.233.- P. 305-320.
9. Segal D.M., Taurog J.D., Metzger H.//Proc.Natl. Acad. Sci (USA). - 1977. - Vol. 74. - P. 2993-2997.

ЛЕКТИНОПОДОБНЫЙ ХАРАКТЕР ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА ЧЕЛОВЕКА СО СПЕЦИФИЧЕСКИМ ЭРИТРОЦИТАРНЫМ РЕЦЕПТОРОМ

Е.Л. Саенко, В.В. Басевич

Институт биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, г. Москва

Церулоплазмин (ЦП:ЕС I.16.3.1) - медьсодержащий глико-протеин α_2 -глобулиновой фракции плазмы крови - может выполнять в организме ряд важных физиологических функций /6/. Чрезвычайно важна защита церулоплазмином эритроцитов (ЭР) от разрушающего действия кислородсодержащих радикалов. Ранее было показано /1/ существование на мембране ЭР специфических рецепторов ЦП. Для выяснения возможного механизма физиологического действия ЦП нами изучено *in vitro* взаимодействие ^{125}I -ЦП с интактными ЭР, мембранными фрагментами ЭР и с ЭР, обработанными протеолитическими ферментами и нейроминидазой. Определена углеводная специфичность рецептора ЭР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ЭР подготавливали согласно /7/. Мембраны ЭР готовили методом гемошока с последующей гомогенизацией телей ЭР /5/. ЦП человека очищали хроматографией на DEAE Тоурорат I ("Тоур Soda", Япония). Использованный в работе ЦП ($A_{610}/A_{280}=0,04 \pm 0,042$) являлся гомогенным по электрофорезу ($M_r = 132000$). Меченый ^{125}I -ЦП получали по методу /4/. Удельная радиоактивность меченого ЦП составляла 1000 ± 1500 имп/фМоль за 1 мин. Эксперименты по связыванию проводили при 4°C . ЭР ($4 \cdot 10^7$ клеток) или эквивалентное им количество мембран ЭР инкубировали с $0,1-1,1$ нМ ^{125}I -ЦП в буферном растворе, содержащем 1 мМ CaCl_2 , $0,01$ М трис·НСI, 158 мМ NaCl, pH 7,4 (объем 1 мл). В экспериментах с мембранами ЭР буферный раствор содержал дополнительно 0,03 % тритона X-100. Инкубирование проводили в течение 16-18 часов. ЭР осаждали центрифугированием при $8000 \times g$ в течение 3 мин, осадок трехкратно промывали буфе-

ром. Мембраны ЭР осаждали центрифугированием при 20000 хг в течение 15 мин. Осадок суспендировали и собирали на фильтре GF/C ("Whatman", Англия). Для определения неспецифического связывания ЦП с ЭР в инкубационную смесь в случае интактных ЭР добавляли 2 мМ ЭДТА ("Serva", ФРГ), вместо 1 мМ CaCl₂, а в случае мембран — 200-кратный избыток немеченого ЦП (20 ÷ 200 нМ). Специфическое связывание находили, вычитая из полного связывания неспецифическую компоненту. Для оценки констант связывания (K_d) и концентрации рецептора (Q₀) использовали координаты Скэтчарда. Обработку ЭР химотрипсином, трипсином, папаином, проназой Е ("Merck", ФРГ) и нейрорамидазой из vibrio cholerae ("Calbiochem", США) проводили при 37°C в течение 40 мин (148 мМ NaCl, 10 мМ CaCl₂, 0,01 М трис·HCl, pH 7,4). После инкубирования ферменты удаляли путем многократного промывания ЭР 100-кратным избытком изотонического буфера при 4°C. Электрофоретическую подвижность ЭР измеряли на установке "Parhoqu ant-2" ("Carl Zeiss" ГДР).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для характеристики взаимодействия ЦП с ЭР была измерена кинетика связывания ¹²⁵I-ЦП с ЭР. Связывание достигало равновесия за 8–10 часов. На рисунке приведена зависимость уровня связывания от концентрации Ca²⁺. При низких концентрациях Ca²⁺ уровень связывания был таким же, как и в присутствии ЭДТА (2 мМ). В отличие от Ca²⁺, Mg²⁺ в диапазоне концентраций от 10 мкМ до 5 мМ на связывание ЦП с ЭР не влиял. Неспецифическое связывание ЦП с ЭР нелинейно зависело от концентрации ¹²⁵I-ЦП. Определены константа диссоциации комплекса ¹²⁵I-ЦП-ЭР в изотоническом буфере в присутствии Ca²⁺ (1 мМ) и количество связывающих центров (16,3 · 10⁻¹⁵ моль на 40 млн. ЭР). Необратимая диссоциация комплекса ¹²⁵I-ЦП-ЭР в изотоническом буфере в присутствии Ca²⁺ (1 мМ) протекает медленно (T_{1/2} = 53 ч). В присутствии 1 мМ ЭДТА T_{1/2} = 17 ч, а в изотоническом буфере T_{1/2} = 22 ч.

Изучено влияние структурной целостности ЭР на связывание ¹²⁵I-ЦП. Найденные значения констант диссоциации комплексов ЦП с ЭР и с фрагментами мембран близки и равны соот-

ветственно 1,0 нМ и 0,78 нМ. Также показано, что общая радиоактивность ^{125}I -ЦП, связанного с интактными ЭР и с фрагментами мембран, разрушенных гемошоком ЭР, достоверно совпадает. При этом в цитозоле разрушенных ЭР радиоактивность отсутствовала.

Для выяснения природы рецептора ЦП ЭР были обработаны пятью ферментами. Установлено существование корреляции между снижением уровня связывания и электрофоретической подвижностью обработанных ЭР (коэффициент корреляции 0,97). Однако в случае обработки ЭР химотрипсином уровень специфического связывания в два раза превышал уровень специфического связывания с интактными ЭР.

Показано, что уровень специфического связывания ^{125}I -ДЦП (ЦП с удаленными концевыми остатками сиаловой кислоты) на интактных ЭР в 9-10 раз ниже, чем ^{125}I -ЦП. Это свидетельствует о специфичности рецептора к концевым остаткам сиаловой кислоты ЦП.

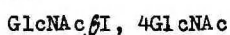
Для выяснения углеводной специфичности рецептора ЭР изучено связывание ^{125}I -ЦП с ЭР в присутствии различных углеводов, представляющих собой фрагменты углеводной части молекулы ЦП /3/, либо звенья этих фрагментов. Связывание ^{125}I -ЦП с ЭР ингибируется $\text{GlcNAc}\beta\text{I}$, 4GlcNAc и фукозой, причем L-фукоза обладает большей ингибиторной способностью, чем D-фукоза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

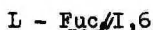
Хотя в работе /1/ и сообщалось о существовании рецепторов ЦП на мембране ЭР, осталось однако неясным: происходит ли транспорт ЦП через мембрану внутрь ЭР. Нами было показано, что как при 4°C , так и при 37°C транспорта ЦП через мембрану ЭР не происходит. Отсутствие транспорта через мембрану ЭР, а также близкие значения констант связывания с мембранами и интактными ЭР указывают на тот факт, что воздействие ЦП человека на ЭР человека определяется процессами взаимодействия молекулы гликопротеина с мембранными рецепторами. Образование комплекса ^{125}I -ЦП-ЭР происходит, по-видимому, с участием мембраносвязанного или внутриклеточного Ca^{2+} . Существенными для взаимодействия ЦП со специфическими

рецепторами ЭР являются концевые остатки сиаловой кислоты как Ц, так и рецепторного участка. Такой вывод можно сделать на основании наблюдаемой корреляции между снижением уровня специфического связывания Ц на ЭР и электрофоретической подвижностью обработанных ЭР, поскольку известно, что плотность поверхностного заряда ЭР, от которой зависит электрофоретическая подвижность ЭР, определяется наличием в мембране ЭР остатков сиаловой кислоты /2/. Трипсин, папаин и проназа удаляют остатки сиаловой кислоты вследствие разрушения сиалогликопротеинов мембраны, нейроаминидаза избирательно отщепляет остатки сиаловой кислоты. Химотрипсин, в отличие от четырех названных ферментов, разрушает мембранные гликопротеины, содержащие небольшое количество сиаловой кислоты (белки полосы 3) и, по-видимому, уменьшает пространственные ограничения рецепторного взаимодействия.

Специфичность рецептора ЭР по отношению к L-фукозе и GlcNAc I, 4GlcNAc вполне объяснима, так как двухантенная структура углеводной части молекулы Ц включает следующий фрагмент /3/:



(фрагмент I)

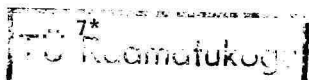


Ингибирование связывания ^{125}I -Ц с ЭР двухантенной структурой углеводной части Ц, показанное нами, является дополнительным подтверждением специфичности рецептора ЭР к фрагменту I.

Таким образом, можно констатировать, что рецептор Ц на ЭР специфически связывает лишь два участка углеводной цепи Ц: концевые остатки сиаловой кислоты и удаленный от конца углеводный фрагмент I. Резюмируя, можно заключить, что специфичное взаимодействие Ц с рецепторами ЭР имеет лектиноподобный характер.

Л и т е р а т у р а

1. Barnes G., Frieden E. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. - 1984. - Vol. 125. - N 1. - P. 157-162.
2. Emmelot P. // Eur. J. Cancer. - 1973. - Vol. 9. - P. 319-333.



3. Endo M., Suzuki K., Schmid K. // J. Biol. Chem. - 1982. - Vol. 257. - N 15. - P. 8755-8758.
4. Hunter W.M., Greenwood F.C. // Nature. - 1962. - Vol. 194. - N 4828. - P. 495-496.
5. Pfeffer S.R., Swislocki N.I. // Mech. of Ag. and Dev. - 1982. - Vol. 18. - P. 355-367.
6. Stocks J., Gutteridge J.M., Sharp J.R. // Clin. Sci. Mol. Med. - 1974. - Vol. 47. - P. 223-233.
7. Tanaka Y., Eriomin V.A., Kavamura Y. et al. // J. Biochem. - 1983. - Vol. 94. - N 3. - P. 841-847.

УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕКТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК

О.В. Дрченко, Е.П. Ветрова, О.А. Хомутовский,
М.Д. Луцки, О.Ф. Передерей

Институт проблем онкологии им. Р.Е. Кавецкого АН УССР,
Институт биохимии им. А.В. Палладина АН УССР, Киев

Использование лектинов в электронной цитохимии позволяет не только определить природу углеводных детерминант поверхностных рецепторов и оценить степень их распределения, но и связать тип распределения лектиновых рецепторов с особенностями тонкого строения изучаемых клеток.

Лектины, наряду с антителами, стали важным инструментом в исследованиях структуры клеточной поверхности. С помощью лектинов стало возможным идентифицировать отдельные гликопротеины на молекулярном уровне, а благодаря специфичности их взаимодействия с углеводами, появилась возможность дифференцировать определенные углеводные группы на поверхности клетки, что является существенным дополнением характеристики клеток разного происхождения.

Лимфоидные линии являются клонами клеток, находящихся на разных стадиях дифференцировки, и служат моделью для всестороннего изучения маркеров различных ступеней дифференцировки лимфоидных клеток.

Данное исследование проводили на лимфоидных линиях человека В- и Т-клеточного происхождения: RPMI-1788, Daudi, Yurkat, MOLT-4. Использовали лектины клебсины (RCA), сои (SBA), улитки (HPL), арахиса (PNA), завязи пшеницы (WGA). Выделение лектинов в чистом виде и их конъюгация с маркера-

ми - ферритином (F) и коллоидным золотом (Au) - проведена М.Д. Луциком.

Цитохимическую реакцию выявления рецепторов лектинов проводили на отмытой забуференным физиологическим раствором от среды инкубации суспензии клеток, предварительно кратковременно префиксированных 0,1 %-ным глутаровым альдегидом. Условия проведения цитохимической реакции зависели от используемого метода выявления (прямого или непрямого) маркера и лектина. При прямом методе выявления материал обрабатывали конъюгатами лектинов в течение двух часов. При непрямом методе выявления префиксированные клетки обрабатывали нативными лектинами в течение 1-2 часов. После отмытки клетки конъюгировали в течение одного часа тиреоглобулин-коллоидным золотом или овомукоид-коллоидным золотом. Для доказательства специфичности связывания при использовании каждого лектина проводили контрольные эксперименты в присутствии соответствующего углевода-ингибитора в 0,5 M концентрации или 0,1 %-ного овомукоида (для WGA).

После проведения цитохимической реакции клетки фиксировали 4 %-ным глутаровым альдегидом на 0,1 M какодилатном буфере, дофиксировали 2 %-ным раствором O_3O_4 , содержащим 1,8 % $K_4Fe(CN)_6$, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заключали в арадит. Все этапы, кроме последнего, проводили при 4°C. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратомографе ЛКВ (Швеция) и просматривали с помощью микроскопа JEM-100B (Япония).

Культура клеток RPMI-1788 (лимфобластоидная линия клеток периферической крови человека, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр) и культура клеток Daudi (В-клеточная линия из лимфомы Беркитта) представлены мононуклеарными клетками с фенотипическими признаками В-лимфоцитов. Культура клеток MOLT-4 (Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз) и культура клеток Yurkat (Т-клеточная лимфома) не обладали столь выраженным полиморфизмом, как мононуклеары В-клеточных линий. Хотя для каждой линии характерен некоторый полиморфизм, все же можно установить определенный клеточный тип, свойственный данной линии. Электронномикроскопические признаки менее ценны для разделения клеточных линий по проис-

хождению, однако можно выделить несколько характерных признаков, стабильных для изученных линий.

Округлое ядро в клетках Т-клеточных линий расположено в центре клетки, вокруг которого в небольшом ободке цитоплазмы наблюдается незначительное количество органелл, а гранулярный эндоплазматический ретикулум представлен короткими канальцами, рассеянными по цитоплазме. Розетки гликогена, видимые в электронном микроскопе без специальной обработки, обнаруживаются только в клетках Т-клеточных культур.

В В-клеточных линиях цитоплазма занимает значительную площадь, в которой находится ядро изрезанной формы или с глубокой инвагинацией. Гетерохроматин ядра занимает большую площадь по сравнению с клетками культуры MOLT-4 и Yurkat. Количество цитоплазматических органелл, среди которых гранулярный эндоплазматический ретикулум хорошо развит, значительно больше. Следует отметить, что по развитости элементов гранулярного эндоплазматического ретикулума в культуре RPMI-1788 можно выделить клетки с разной степенью выраженности гранулярного эндоплазматического ретикулума, что подтверждает данные цитохимических исследований о способности клеток этой культуры при культивировании дозревать до более дифференцированных форм. Большое количество микроворсинок на поверхности клеток характерно для линий В-клеточного происхождения.

Таким образом, наиболее подготовлены к активным контактным взаимодействиям клетки В-клеточных линий. На их поверхности имеются многочисленные отростки, на которых можно предполагать наличие разнообразных рецепторов. Если учесть, что клетки всех исследованных культур гетерогенны по происхождению и степени дифференцировки, то можно предвидеть, что спектр их рецепторов довольно широк.

На поверхности клеток культуры Daudi конъюгаты PNA-Au обнаружены в небольшом количестве. Результаты, полученные с помощью конъюгатов другого лектина этой же D-галактозоспецифической группы - RCA-Au, почти аналогичны. Конъюгаты RCA-Au в виде редких, единичных зерен располагаются на поверхности почти упорядоченно. Конъюгаты WGA-(ovo-Au), связывающиеся с N-ацетил-D-глюкозаминозильными сахарными детерми-

нантами рецепторов, располагались на поверхности в виде кластеров.

При исследовании В-клеточной культуры RPMI-1788 мы использовали только один лектин сои, и конъюгаты SBA-Au и SBA-F выявлены лишь в виде одиночных гранул, следовательно, в гликокаликсе клеток данной культуры N-ацетил-D-галактозаминозильные детерминанты почти отсутствуют.

При изучении локализации поверхностных рецепторов на клетках Т-лимфоидных культур установлено: на поверхности клеток линии MOLT-4 лектин D-галактозоспецифической группы RCA, конъюгированный с коллоидным золотом, представлен почти непрерывным слоем гранул, а конъюгаты WGA-Au располагаются в виде кластеров. На поверхности клеток культуры Yukkat конъюгаты HPL-F, SBA-F, WGA-Au располагаются в виде кластеров, а конъюгаты PNA-Au обнаруживаются лишь изредка на небольшой части клеток.

Следует отметить, что расположение рецепторов на поверхности клеток В- и Т-лимфоидных культур в основном не зависело от функционального состояния подлежащих участков цитоплазмы, если судить по наличию в этих участках клетки различных органелл. Однако в клетках культур Т-клеточного происхождения над активными участками цитоплазмы расположение конъюгатов часто бывает кластерного типа.

Таким образом, на поверхности клеток всех исследованных лимфоидных линий выявлены рецепторы, тропные к WGA, причем располагаются они только в виде кластеров. Согласно данным литературы, углеводные сахарные детерминанты, связывающие этот лектин, являются обязательными компонентами гликокаликса опухолевых клеток. При этом все трансформированные вирусом клетки связывают WGA и агглютинируются им, в то время как исходные клетки только связывают WGA, но не агглютинируются. Предполагается, что активация тропных к WGA рецепторов происходит лишь после малигнизации клеток. Кроме того, трансформированные клетки закономерно связывают еще три лектина: RCA, SBA, Con A.

Дальнейшее изучение распределения рецепторов на лимфоидных линиях с расширением набора лектинов будет способствовать обнаружению углеводных детерминант, специфических для клеток разного генеза и степени дифференцировки.

РОЛЬ МЕМБРАННЫХ РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ ЛЕКТИНОВ В ПРЕОДОЛЕНИИ ГЕМАТОТИМИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ПРЕДШЕСТВЕННИКАМИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

И.Д. Рябина, И.В. Мирошниченко, А.А. Ярилин
Институт иммунологии Минздрава СССР, г. Москва

Способность мигрировать в тимус является специфическим признаком предшественников Т-лимфоцитов (ПТЛ). Экспериментальные данные относительно поверхностных структур этих клеток, обеспечивающих преодоление гематотимического барьера, непроницаемого не только для других клеток, но и для крупных молекул, в литературе отсутствуют /3/.

Можно предположить, что ПТЛ обладают суммой свойств поверхности, которые обеспечивают их взаимодействие с распознающими структурами гематотимического барьера. По-видимому, существенным элементом процесса проникновения ПТЛ в тимус является адгезия ПТЛ к клеткам, формирующим барьер, на основе взаимного распознавания их поверхностных компонентов. Очевидно, что природа этого взаимодействия должна быть иной, чем в случае хоминга зрелых лимфоцитов в периферические лимфоидные органы. В качестве одного из возможных механизмов, лежащих в основе миграции ПТЛ в тимус, может быть рассмотрено углеводно-белковое лектиновое распознавание, достаточно широко распространенное в биологических системах, что и сделано в данном исследовании.

В работе использованы клетки костного мозга нормальных и бестимульных мышей линии BALB/c, а также гибридов (CBA x x C57Bl/6) F₁ из питомников АН СССР "Центральный" и АМН СССР "Столбовая". Клетки фракционировали методами отрицательной и положительной иммуноадсорбции /I/ с использованием антисывороток к маркеру Т-клеток антигену Thy-1 и маркеру ПТЛ SC-I; в результате получали фракции, обогащенные ранними SC-1⁺Thy-1⁻ и поздними SC-1⁺Thy-1⁺ ПТЛ. Рецепторы для лектинов определяли с помощью набора лектинов, меченных изотиацианатом флуоресцеина (препараты предоставлены М.Д. Луциком, Львовское отделение Института биохимии им. А.В. Палладина АН УССР) методом проточной иммуноцитофлуориметрии на приборе Ерх. Для оценки миграции ПТЛ в тимус клетки прижизненно метили изотиацианатом флуоресцеина (изомер I, "Sig-

ма"), вводили внутривенно мышам, облученным за 3-4 часа в дозе 8,5 Гр, через 3 часа извлекали и суспендировали тимус и методом проточной цитофлуорометрии определяли содержание в суспензии меченых клеток.

Прежде чем оценивать роль лектинового распознавания в преодолении гематотимического барьера, следовало определить наличие на поверхности ПТЛ рецепторов для различных лектинов. На рисунке I представлены данные об экспрессии рецепторов для 8 лектинов на клетках костномозговых суспензий, обогащенных ПТЛ, находящимися на трех стадиях развития.

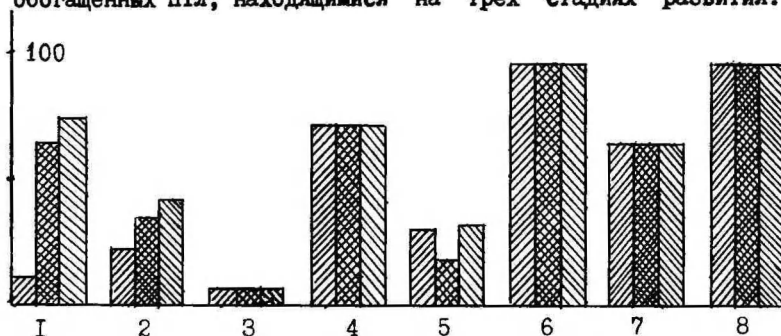


Рис. I. Сравнение лектиновых рецепторов у ПТЛ разной степени зрелости. Обозначения: Рецепторы к лектинам PNA (1), SBA (2), софору (3), улитки (4), Кон А (5), проростков пшеницы (6), бобовника (7), чечевицы (8). По оси ординат - процент положительных клеток.

Наиболее ранние из них, ПТЛ мышей nude, $SC-1^{+}Thy-1^{-}$ -клетки, не испытывавшие влияния тимусных гормонов. Следующему этапу соответствуют $SC-1^{+}Thy-1^{-}$ -клетки костного мозга эутимусных мышей - ранние ПТЛ, на которые могли влиять гормоны тимуса, но не вызвали их дифференцировку в более зрелые клетки. Наконец, поздние $SC-1^{+}Thy-1^{+}$ -ПТЛ, образующиеся из ранних ПТЛ после действия на них гормонов тимуса. Все три типа суспензий содержали значительные примеси других клеток, однако различия между ними сводились именно к различию стадий созревания ПТЛ.

Во всех трех типах суспензий содержание рецепторов для некоторых лектинов было одинаковым. Это касается рецепторов для лектинов чечевицы и проростков пшеницы (оба типа рецеп-

торов содержатся почти на 100 % клеток), лектинов бобовника и улитки (около 70 %). Содержание клеток, экспрессирующих рецепторы для Кон А, варьирует без ясной закономерности: на SC-1⁺Thy-1⁻-клетках эутиmusных мышей оно меньше (около 20%), чем на клетках двух других типов (33-34 %). Рецептор для лектина софоры выражен на единичных клетках (3-5 %) суспензий, содержащих ранние ПТЛ, и на 10 % клеток суспензий, содержащих поздние ПТЛ. Еще более существенно аналогичная закономерность проявляется в отношении рецепторов для лектинов сои и арахиса. По мере созревания процент SBA⁺-клеток увеличивается в последовательности 24, 34, 43, процент PNA⁺-клеток - в последовательности 16, 66, 78, что, очевидно, отражает изменение экспрессии соответствующих рецепторов по мере дифференцировки ПТЛ.

Поскольку наиболее вероятным фактором, определяющим развитие ПТЛ в костном мозге, является активность циркулирующих гормонов тимуса, мы оценили также влияние препарата гормонов тимуса, тимотропина на экспрессию лектиновых рецепторов на ПТЛ. Из рисунка 2 следует, что подобная обработка не влияла на экспрессию рецепторов для всех лектинов, кроме Кон А, агглютининов арахиса и сои, в то время как обработка нейроаминидазой нехолерного вибриона практически во всех случаях усиливала экспрессию рецепторов. Число клеток, несущих рецептор для Кон А, несколько снижалось, число SBA⁺-клеток возрастало на 5 %, тогда как число PNA⁺-клеток увеличивалось очень существенно (на 23 %) - в такой же степени, как при обработке нейроаминидазой (на 27 %). Не исключено, что эффект тимотропина в какой-то степени обусловлен десенсилизацией активации эндогенных ферментов.

В связи с тем, что наиболее закономерные изменения, индуцируемые тимотропином на поверхности ПТЛ, касались рецепторов для лектинов сои и арахиса и, учитывая, что обработка тимотропином существенно усиливает проникновение ПТЛ в тимус /2/, мы исследовали роль лектиновых рецепторов в миграции ПТЛ в тимус.

Обычно через 3 часа после введения 10^6 - 10^7 клеток костного мозга в тимус проникает $2-5 \times 10^3$ меченых клеток, т.е. около 0,1 % от введенной дозы. Обработка тимотропином вво-

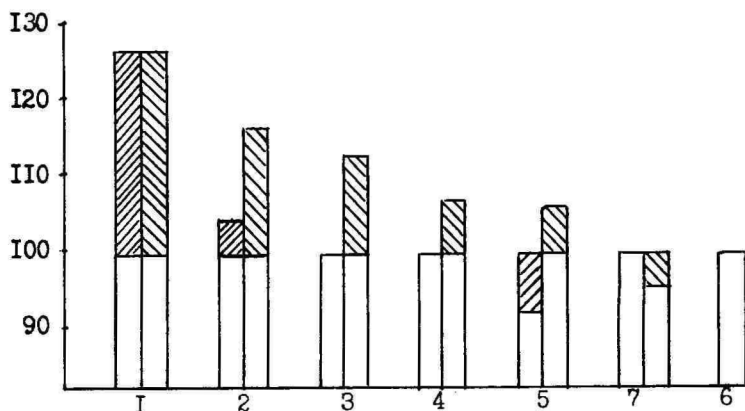




Рис. 2. Изменение рецепторов под влиянием тимотропина и нейроаминидазы. Обозначения: Рецепторы к лектинам PNA (1), SBA (2), софы (3), улитки (4), Кон А (5), проростков пшеницы (6), бобовника (7).
 Обработка тимотропином , нейроаминидазой .
 По оси ординат - изменения процента положительных клеток по отношению к необработанным клеткам, принятым за 100 %.

димых клеток увеличивает это количество примерно в 2 раза (рисунок 3). Примерно такой же результат дает обработка клеток нейроаминидазой, способствующая, как и тимотропин, экспрессии рецепторов для лектинов арахиса и сои, а также появлению антигена Thy-1, свидетельствующему о переходе ПТЛ на стадию поздних ПТЛ.

Блокада рецепторов для лектина сои на клетках костного мозга 5-кратно ослабляла миграцию меченых клеток в тимус, а блокада рецепторов для лектина арахиса ослабляла ее в 10 раз, практически доводя до уровня фона. В обоих случаях блокада осуществлялась путем обработки клеток немечеными препаратами соответствующих лектинов.

Представленные данные свидетельствуют о различной роли концевых сахаров мембранных гликопротеинов ПТЛ в преодолении гематотимического барьера. С наибольшей определенностью можно говорить об участии в этом процессе клеточных рецепторов, имеющих концевой дисахарид β -галактози-*N*-ацетилгалактозамин, который распознает лектин арахиса (его компо-

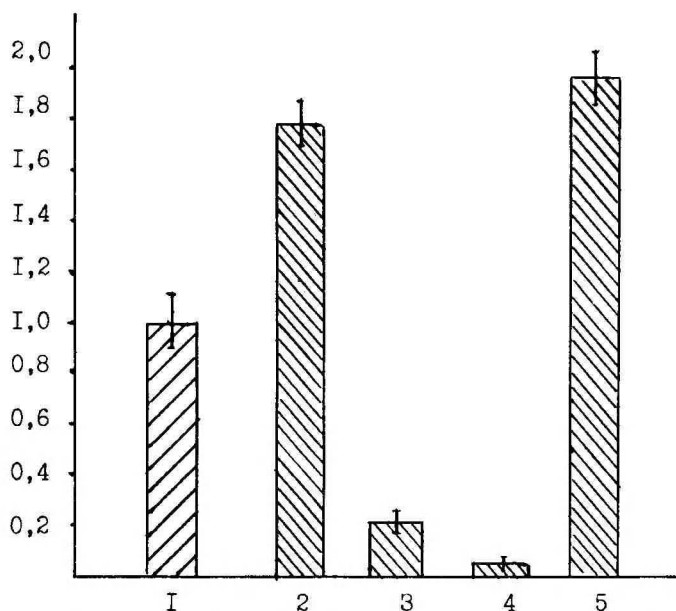


Рис. 3. Изменение хоминга ТЛ после различных обработок. Обозначения: без обработки (I), обработка нейроамидазой (2), SBA (3), PNA (4) и тимотропином (5). По оси ординат - индекс стимуляции миграции по отношению к контролю (необработанные клетки), принятому за I.

нент N-ацетилгалактозамин распознает лектин сои). Действительно, блокада N-ацетилгалактозамина лектином сои лишь частично подавляет миграцию ТЛ в тимус, тогда как блокада дисахарида лектином арахиса полностью предотвращает преодоление клетками гематотимического барьера. По-видимому, тот же результат дает блокада этого дисахарида при сиапировании мембранных гликопротеинов. Очевидно, это является причиной неспособности PNA⁻-зрелых Т-клеток проникать в тимус. С другой стороны, обращает на себя внимание сходство действия де-сиапирования клеток на поступление ТЛ в тимус и на захват зрелых лимфоцитов печенью. Возможно, в обоих случаях в распознавании клеток участвуют тканевые лектины со сходной специфичностью, близкой к специфичности лектина арахиса.

Разумеется, лектиновое распознавание не исчерпывает всех механизмов, которые лежат в основе преодоления ПТЛ гематотимического барьера. Достаточно упомянуть о роли совместимости по некоторым аллоантигенам /2/. Определенную роль в этом процессе играют, очевидно, стадиспецифические структуры поверхности ПТЛ, отсутствие которых препятствует миграции в тимус, например, PNA⁺-кортикальных тимоцитов. По-видимому, в индукции экспрессии этих структур состоит (наряду с усилением экспрессии рецепторов для лектинов арахиса и сои) усиливающее действие гормонов тимуса на миграцию ПТЛ в тимус. По-видимому, это действие проявляется в двух ситуациях - в костном мозгу, когда действие циркулирующих гормонов тимуса подготавливает ПТЛ к миграции в тимус, и в процессе преодоления гематотимического барьера, когда клетки оказываются в зоне досягаемости тимусных гормонов, что способствует проникновению их в орган, как бы усиливая целенаправленность процесса при его осуществлении.

Л и т е р а т у р а

1. Мирошниченко И.В., Ярилин А.А., Шарова Н.И., Акназарова Р.Х., Рябинина И.Д., Филатов А.В. //Иммунология. - 1987. - № 2. - С. 29-32.
2. Ярилин А.А., Мирошниченко И.В., Рябинина И.Д., Филатов А.В.//Бюл. exper. биол. - 1986. - № 10. - С. 447-449.
3. Lahey K.D., Pereira G.//Anat.Res. - 1977. - Vol. 189. - P. 545.

РОЛЬ ЛЕКТИНА ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК
КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ С КЛЕТОЧНО-ПОВЕРХНОСТНЫМИ
МЕТАБОЛИТАМИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФИТОФТОРОЗА

Н.В. Любимова, Е.П. Шувалова,
В.М. Лахтин, М.Л. Давлетшина

Институт биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, г. Москва

Работа посвящена изучению первых этапов взаимоотношений растений и патогенных микроорганизмов на примере системы клубни картофеля - гриб, возбудитель фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de By. Для этого гриба характерно наличие специализированных рас, способных поражать одни сорта картофеля (совместимость) и не поражать другие (несовместимость) /7/.

Целью исследований являлось: 1. Изучение процесса межклеточного распознавания партнеров на уровне взаимодействия препаратов изолированных цитоплазматических мембран растительных клеток с компонентами клеточной поверхности мицелия патогена. 2. Выявление роли фитолектина в межклеточном узнавании и индуцировании устойчивости картофеля к патогену. 3. Изучение структурно-функциональной перестройки плазмалеммы растительной клетки под влиянием внешних воздействий как фактора, определяющего переход клетки из нативного "неактивного" состояния в "активное" состояние сверхчувствительности по отношению к воздействию метаболитов патогена.

Из клубней картофеля методом аффинной хроматографии на хитине выделен лектин (ЛКК) в гомогенном состоянии, согласно данным ДДС-электрофореза в ПАГе. Химический анализ показал, что это гидроксипролинбогатый высокогликозилированный (на 50%) гликопротеин, специфически связывающий олигомеры N-ацетил-Д-глюкозамина, состоящие из 2-5 остатков, связанных по β -1,4 связям /12, 10/.

Установлено, что препарат плазмалеммы из клубней картофеля обладает лектиновой активностью, специфичной к N-ацетил-Д-глюкозамину, аналогично ЛКК /11/. В работе использо-

вали препараты плазмалеммы, выделенные из активированных раневым стрессом тканей клубней картофеля и неактивированных (раневая и нативная плазмалеммы).

Методом солевого осмотического шока получены клеточно-поверхностные гликоконъюгаты мицелия несовместимой и совместимой рас гриба /II, 4/. Фракционирование соединений методом колоночной хроматографии, УФ- и ИК-спектроскопии, ГЖХ и аминокислотный анализ показали (рисунки I-5), что в состав гликоконъюгатов входят гликопептиды и β -глюканы. Гликопептиды имеют мол. массу порядка 2000 Д и содержание углеводов и белков в соотношении 4:1. Углеводная часть молекулы содержит глюкозу и арабинозу, аминокислотный анализ, наряду с широким набором аминокислот, выявил наличие глюкозамина. β -глюканы имеют мол. массу порядка 6000 Д, не содержат белка, состоят только из остатков глюкозы, по-видимому, связанных по β -1,3- β -1,6 связям, аналогичные известным супрессорам возбудителя фитофтороза, подавляющим защитные реакции картофеля на инфицирование патогеном /8/.

Взаимодействие препаратов нативной и раневой плазмалеммы с суммарными препаратами гликоконъюгатов совместимой и несовместимой рас гриба, а также с отдельными фракциями гликопептидов и β -глюканов изучено по связыванию флуоресцеин-меченых препаратов (рисунок 6), тушению собственной белковой флуоресценции плазмалеммы (рисунок 7), изменению термотропных переходов плазмалеммы с использованием флуоресцентного зонда 3-метоксибензантрацена (рисунок 8) и подавлению лектиновой активности плазмалеммы (таблица) /4, 6, 5/. Установлено, что как нативная, так и раневая плазмалеммы взаимодействовали с гликоконъюгатами совместимой и несовместимой рас гриба. При этом раневая плазмалемма связывала большее количество гликоконъюгатов и была более чувствительна в распознавании метаболитов разных рас, чем нативная. Гликоконъюгаты несовместимой расы в большем количестве связывались плазмалеммой, чем гликоконъюгаты совместимой расы. Отмечено четкое различие в характере тушения флуоресценции плазмалеммы гликопептидами и β -глюканами (рисунок 9). При этом глюканы, связываясь с плазмалеммой, не влияли на ее гемагглютинирующую активность, в то время как гликопептиды значительно ее подавляли (таблица).

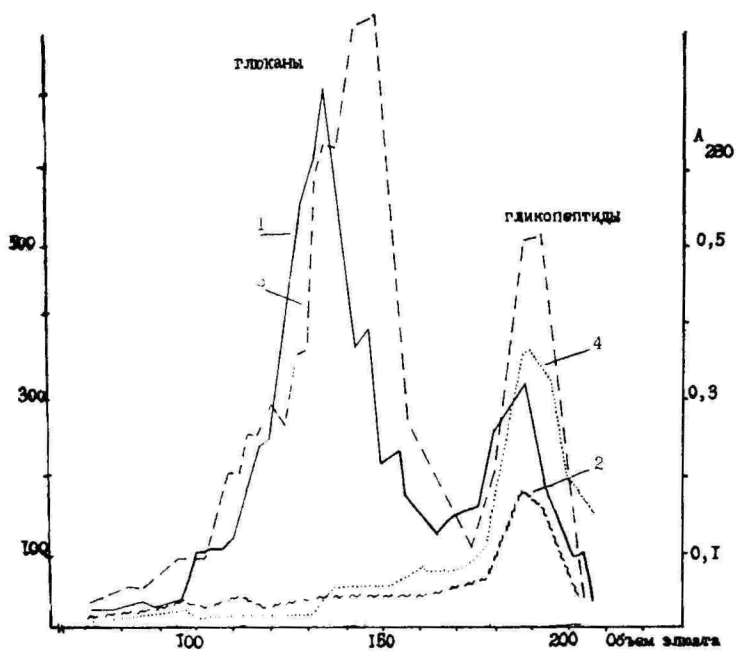


Рис. 1. Профиль элюции с сефадекса С-75 гликоконъюгатов патогена:

- | | | |
|---|------------|--------------------|
| 1 | - углеводы | совместимой расы |
| 2 | - белки | совместимой расы |
| 3 | - углеводы | несовместимой расы |
| 4 | - белки | несовместимой расы |

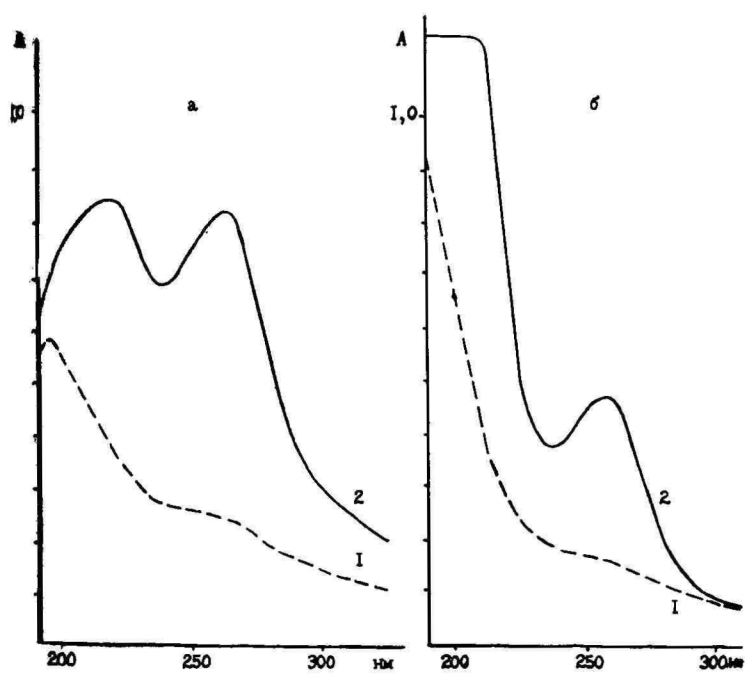


Рис. 2. Спектры поглощения в УВ-свете гликанов (1)
и гликопептидов патогена (2):

а - совместимая раса;
б - несовместимая раса

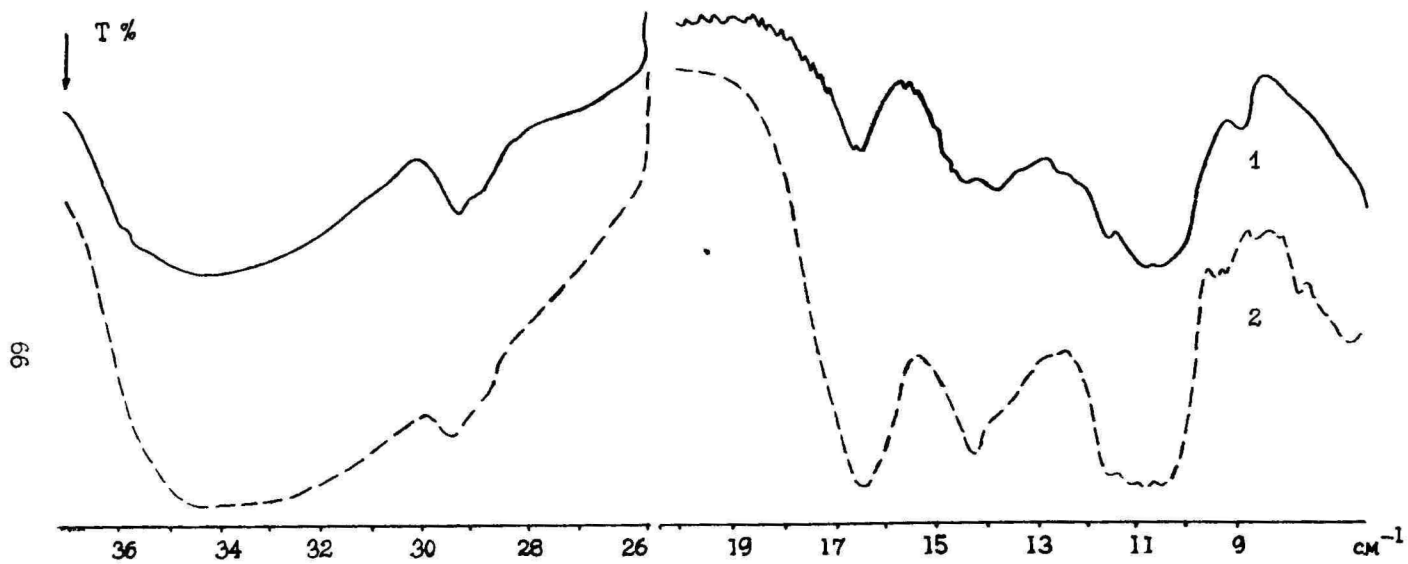


Рис. 3. Инфракрасные спектры глюканов (1) и гликопептидов (2) совместимой расы патогена

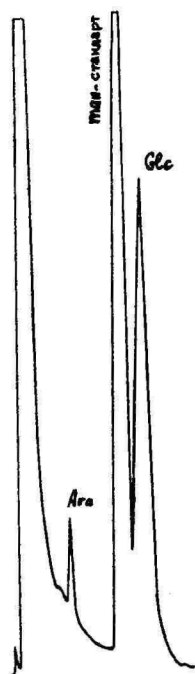


Рис. 4. Газожидкостная хроматограмма ацетатов альдонитрилов гликопептида совместимой расы патогена после кислотного гидролиза

По-видимому, на плазмалемме имеются как рецепторы-лектины, связывающие по N-ацетил-Д-глюкозамину гликопептиды клеточной поверхности патогена, так и другие рецепторы, не обладающие лектиновой активностью, связывающие β -глюканы, супрессоры возбудителя фитофтороза.

Известно, что воздействие метаболитов патогена или раневого стресса на клубни картофеля проявляется в индуцировании в растении состояния потенциальной устойчивости к забо-

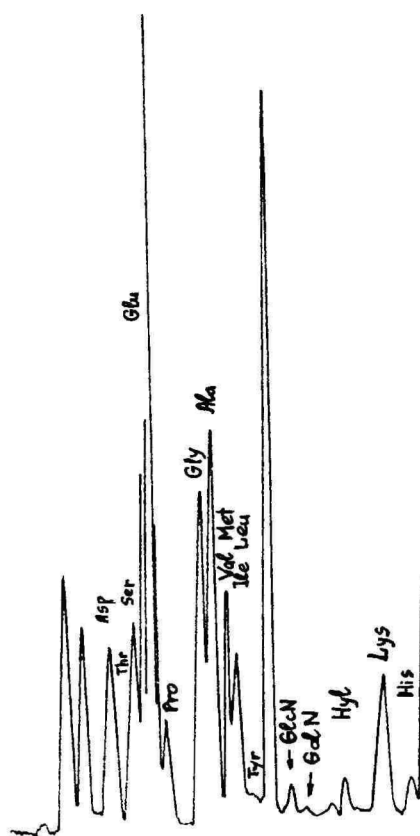


Рис. 5. Аминокислотный состав гликопептида совместимой расы патогена

леванию /9/. Можно полагать, что механизм такого действия определяется структурно-функциональной перестройкой растительной плазмалеммы под влиянием внешних воздействий. Как показали исследования /1-3/, такого рода стрессовые воздействия вызывали повышение проницаемости плазмалеммы, активацию на уровне транскрипции синтеза плазмалемных белков, уве-

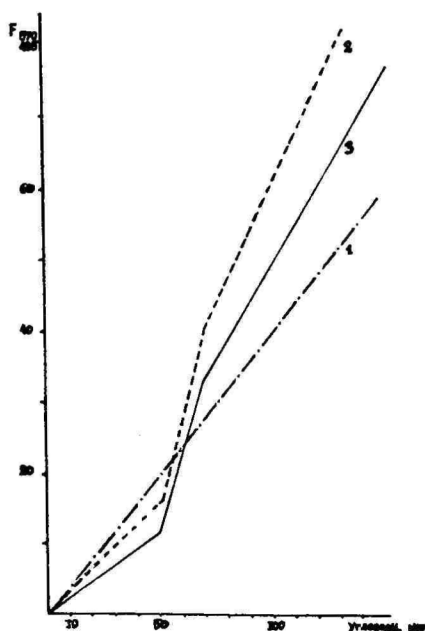


Рис. 6. Взаимодействие флуоресцеин-меченых гликоконъюгатов патогена с препаратом нативной плазмалеммы картофеля:

- 1 - контроль (гликоконъюгаты)
- 2 - гликоконъюгаты несовместимой расы
- 3 - гликоконъюгаты совместимой расы + плазмалемма

личение "текучести" липидного матрикса плазмалеммы вследствие повышения ненасыщенности жирных кислот, активацию мембраносвязанных катион-зависимых транспортных АТФаз, многократное увеличение лектиновой активности плазмалемных везикул /1-3/.

На основании полученных данных и анализа литературы можно предположить, что процесс межклеточного распознавания растений и патогенных микроорганизмов осуществляется на

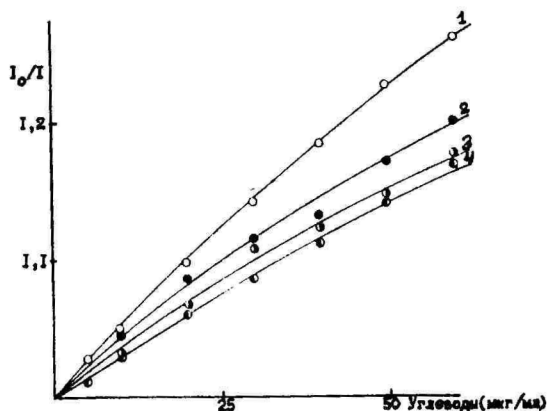


Рис. 7. Тушение флуоресценции плазмалеммы (Ш) картофеля гликоконъюгатами (ГК) патогена (в координатах Штерна-Фольмера):

- 1 - раневая Ш + ГК несовместимой расы
 2 - нативная Ш + ГК несовместимой расы
 3 - раневая Ш + ГК совместимой расы
 4 - нативная + ГК совместимой расы

Таблица

Подавление гемагглютинирующей способности препаратов плазмалеммы из картофеля гликопептидами возбудителя фитофтороза*

Плазмалемма	Гликопептиды	
	совместимой расы	несовместимой расы
Нативная	8	20
Раневая	20	100

Примечание: * В таблице приведены концентрации гликопептидов (мкг гликопептида/мкг плазмалемного белка), вызывающие заметное ингибирование гемагглютинации; даны средние арифметические значения трех независимых опытов.

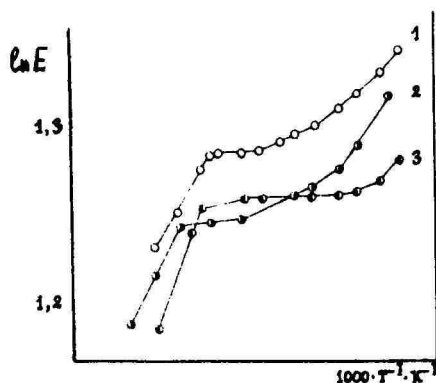


Рис. 8. Изменение флуоресценции зонда 3-метоксибензантрона в препарате раневой плазмалеммы картофеля под действием гликоконъюгатов патогена (в координатах Арениуса):

- 1 - плазмалемма (контроль)
- 2 - гликоконъюгаты совместимой расы
- 3 - гликоконъюгаты несовместимой расы + плазмалемме

уровне взаимодействия мембраносвязанных компонентов растительной клетки с клеточно-поверхностными метаболитами инфекционной гифы гриба, посредством лектин-углеводного связывания. Вследствие межклеточного узнавания метаболизм растительной клетки претерпевает значительные изменения. Важное место в этих процессах занимает структурно-функциональная перестройка ее плазмалеммы, которая, очевидно, приводит к повышению чувствительности клетки в распознавании метаболитов гриба и быстрому включению защитной реакции сверхчувствительности. В совместимой комбинации супрессоры гриба, комплементарные поражаемому сорту растения, подавляют механизм активации клетки, возможно, также посредством рецепции на растительной плазмалемме. Предполагается, что синтез плазмалемных белков-рецепторов, по-видимому, активируется процес-

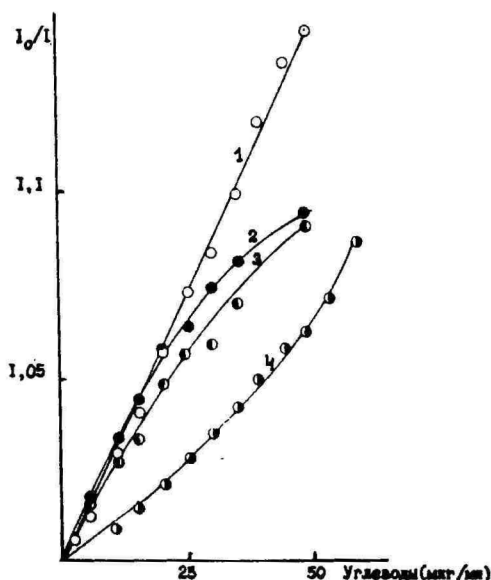


Рис. 9. Тушение флуоресценции раневой плазмалеммы картофеля гликопептидами и β -глюканами патогена (в координатах Штерна-Фольмера):

- | | | |
|-----|------------------|--------------------|
| 1 - | гликопептиды | совместимой расы |
| 2 - | гликопептиды | несовместимой расы |
| 3 - | β -глюканы | совместимой расы |
| 4 - | β -глюканы | несовместимой расы |

сом межклеточного распознавания партнеров или раневым стрессом.

Л и т е р а т у р а :

1. Любимова Н.В., Верулидзе Г.Р. // Биохимия. - 1984. - Т. 49. - № 5. - С. 781-786.

2. Любимова Н.В., Верулидзе Г.Р., Метлицкий Л.В. // Физиология растений. - 1987. - Т. 33. - № 1. - С. 135-142.

3. Любимова Н.В., Лахтин В.М., Бинюков В.И., Шувалова Е.П. // Приклад. биохимия и микробиология. - 1988. - Т.24. - № 1. - С. 102-109.
4. Любимова Н.В., Лахтин В.М., Шувалова Е.П. и др. // Физиолог. растений, 1988. - Т. 35.
5. Любимова Н.В., Салькова Е.Г. // Приклад. биохимия и микробиология. - 1988. - Т. 24.
6. Мерзляк М.Н., Кашулин П.А., Любимова Н.В. и др. // Тезисы Всесоюзной конференции "Структурная динамика биологических мембран и ее роль в регуляции фотобиологических и ренепторных процессов". - Минск, 1988, 23 мая - 1 июня.
7. Меглицкий Л.В., Озерецковская О. Л. Фитоалексины. - М.: Наука, 1973. - 175 с.
8. Озерецковская О.Л., Васюкова Н.И., Леонтьева Г.В. и др. Фактор расовой специфичности возбудителя фитофтороза // Изв. АН. СССР, сер. Биологическая, 1982. - Т. 6. - С.852-866.
9. Furuchi N., Tomiyama K., Doke N. //Phytopathol.-1979. - Vol. 69. - N 7. - P. 734-736.
10. Hobst G.-J., Martin S.R., Allen A.K. et al. //Biochem. J. - 1986. - Vol. 233. - N 4. - P. 731-736.
11. Lakhtin V.M., Lubimova N.V. // Lectin-carbohydrate interaction under potato blight. - Proceedings of the 9th International Symposium on Glycoconjugates, Lille, July 6-11, 1987. - G. 18.
12. Matsumoto I., Jimbo A., Mizuno Y. et al. Purification and characterization of potato lectin // J. Biol.Chem.-1983. - Vol. 258. - N 5. - P. 2886-2892.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛЕКТИНА ИЗ КАРТОФЕЛЯ С ГЛИКОПОЛИМЕРАМИ
 CORYNEBACTERIUM SEPEDONICUM PSEUDOMONAS SOLANACEARUM

Л.Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии
 им. Д.К. Заболотного АН УССР

В последние годы обсуждаются вопросы участия гликополимеров в процессах узнавания при инфицировании растений. Аналогично животным, явление узнавания в растениях может вовлекать комплементарное взаимодействие гликополимеров одного из организмов с лектинподобным компонентом другого. Биологические функции лектинов во взаимодействии хозяин-паразит до

сих пор не ясны, но известно, что эти механизмы имеют адаптированный характер и способствуют созданию устойчивости растения к заражению микроорганизмами. То есть одна из функций лектинов может заключаться в том, что аналогично иммунной системе иммунокомпетентных организмов, они фиксируют патогенные микроорганизмы и тем самым способствуют их разрушению. Эта крайне важная линия защиты растений только в редких случаях нарушается фитопатогенами, что приводит к развитию инфекционного процесса.

Поскольку *Corynebacterium sepedonicum* и *Pseudomonas solanacearum* являются патогенами картофеля, нами из клубней картофеля был выделен лектин и исследовано его взаимодействие с полисахаридами, липополисахаридами и внеклеточными гликополимерами.

Полисахариды (ПС) из *C. sepedonicum* были выделены мягким щелочным гидролизом клеток с дальнейшим осаждением спиртом и очисткой ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-ТСК геле /I/. Липополисахариды (ЛПС) экстрагировали из клеток *P. solanacearum* 45% водным фенолом при 65–68°C (2 ч). Для выделения O-специфического полисахарида и фракций ЛПС гидролизovali 1% уксусной кислотой (100°C, 2 ч).

Осадок липида отделяли центрифугированием (25 000 x g, 40 мин), а супернатант концентрировали до объема ~ 10 мл и фракционировали на колонке (70,0 x 3,0 см) с сефадексом Г-50, используя 0,025 М пиридин-ацетатный буфер, pH 4,5.

Внеклеточные гликополимеры фракционировали ионообменной хроматографией на колонках (90,0 x 2,0 см) с ДЭАЭ-ТСК гелем. Было получено 3 фракции гликополимеров, элюирующихся буфером различной ионной силы (0,01 М; 0,25 М и 0,50 М NaCl₂PO₄, pH 6,0): нейтральный гликополимер (ГП I) и два заряженных (ГП 2 и ГП 3).

Изучение ПС, изолированных из *C. sepedonicum* 7756 и 7757, показало, что повторяющееся звено их представлено гексасахаридом, состоящим из четырех остатков рамнозы, одного остатка фукозы и одного - β -гексурановой кислоты. Внеклеточные гликополимеры этих штаммов содержали в своем составе глюкозу, фукозу, арабинозу.

В ЛПС *P. solanacearum* в качестве нейтральных моносахари-

дов обнаружены рамноза, рибоза, ксилоза, глюкоза, гептоза в соотношении 2,1:0,37:0,26:0,36:0,30, а также следы фукозы. Глюкозамина содержалось 8,25%.

Внеклеточные гликополимеры *P.solanaseagm*: исходный, ГП I, ГП 2, ГП 3 содержали в качестве преобладающего моносахарида рамнозу, в меньших количествах - глюкозу, галактозу, маннозу, ксилозу, фукозу в различных соотношениях. В составе всех исследованных гликополимеров обнаружены глюкозамин и галактозамин, однако соотношения их различны: в ГП I - 1:1, ГП - 2 - 1:3,4, ГП 3 и в исходном ГП - 1:20,0 и 1:22,0 соответственно.

Лектин из картофеля был выделен, как описано ранее /4/.

Исследования показали, что ЛПС и внеклеточные гликополимеры *S.serebonicum*, а также ЛПС *P.solanaseagm* и его отдельные компоненты - O-специфический полисахарид и кор-олигосахарид в концентрациях от 2,0 мг до 0,8 мкг не тормозят агглютинацию эритроцитов лектином из картофеля.

Из данных литературы /5/ известно, что лектин картофеля агглютинирует ЛПС как вирулентных, так и авирулентных штаммов, хотя последние слабее, а экзополисахарид (ЭПС) вирулентных штаммов подавляет агглютинацию. В связи с этим нами было исследовано взаимодействие внеклеточного гликополимера *P.solanaseagm* и его фракций с лектином из картофеля и показано, что все они тормозят реакцию гемагглютинации эритроцитов кролика в присутствии лектина: минимальная ингибирующая доза (в пробе) составляла для исходного ГП - 0,08 мкг, ГП I и ГП 2 - 0,01 мкг, а ГП 3 - 0,7 мкг.

Одна из функций лектинов растений - защитная, поэтому при взаимодействии с авирулентными фитопатогенными штаммами они их связывают в результате реакции сахаров ЛПС с лектином, что приводит к иммобилизации патогена, и растение в дальнейшем не инфицируется.

В присутствии же внеклеточного гликополимера, который взаимодействует с активным центром лектина, агглютинации ЛПС лектином не происходит.

Поэтому возможно, что роль внеклеточного гликополимера в индукции заболевания заключается в том, что, находясь за пределами бактериальной клетки, он взаимодействует со всеми

доступными участками на лектине растения и тем самым способствует патогену свободно размножаться во внутриклеточном пространстве растения и синтезировать новый внеклеточный гликополимер, который будет связывать следующую молекулу лектина. Возможно даже образуется комплекс лектина с гликополимером, токсичный для растения, который и вызывает увядание. Такое предположение согласуется с отсутствием синтеза внеклеточного гликополимера шероховатыми мутантами /3/, являющимися авирулентными.

Л и т е р а т у р а:

1. Варбанец Л.Д. Структурно-функциональные исследования полисахаридов *Corynebacterium michiganense* subsp. *seropedonicum* // Микробил. журн. - 1987. - № 5. - С. 22-27.

2. Методы химии углеводов / Под ред. Н.К. Кочеткова. - М.: Мир, 1967. - 512 с.

3. Driguez P., Demery-Lafforgue D., Frigalet A., Dupin P., Samain D., Asselineau J. Comparative studies of lipopolysaccharide and exopolysaccharide from a virulent strain of *Pseudomonas solanacearum* and from three avirulent mutants // J. bacteriol. - 1985. - Vol. 162. - N 2. - P. 504-509.

4. Methods in Enzymology. Ed. Ginsburg. - 1978. - Ac. Press N-Y, S-F, L. - P. 340-345.

5. Sequeira L., Graham T. Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas phaseolicola* by potato lectin // Phytol. Plant Pathol. - 1977. - Vol. 11. - N 1. - P. 43-54.

ВЗАИМОТНОШЕНИЯ В СИСТЕМЕ ВОЗБУДИТЕЛЬ ФИТОФТОРОЗА-КАРТОФЕЛЬ НА УРОВНЕ ЛЕКТИНОВ

Б.Б.-О. Громова

Всесоюзный научно-исследовательский институт
защиты растений, г. Ленинград

В последнее время все чаще встречаются публикации, посвященные особой группе белков и гликопротеидов со специфическими свойствами - агглютинировать клеточные элементы крови лектинами.

Несмотря на широкий фронт работ по изучению лектинов, к ним продолжает проявляться интерес, поскольку все еще недостаточно ясна их роль в растении. Мы остановимся на значении лектинов во взаимоотношениях патоген-растение-хозяин.

В 1950 г. Круре было установлено, что фитолектины распознают слабые различия в структуре углеводов. Это послужило основанием для предположения о включении их в процессы клеточного узнавания – взаимодействия не только между клетками растения, но и между клетками микроорганизма и растения. Целая серия исследований связывает с эндогенными лектинами проявление защитных механизмов организма, которые выражаются якобы в блокировке патогена, осуществляемой лектинами хозяина. Подобные исследования касаются в основном бактериальных и вирусных патогенов. Они базируются на предположении, что агглютинины бобовых участвуют в присоединении азотфиксирующих бактерий к корням растений. Исследования, отражающие роль лектинов растения в проявлении устойчивости к фитопатогенным грибам, полны противоречивых сведений. Так, в одних случаях защитные механизмы лектинов проявляются в ингибировании прорастания спор, роста гиф, синтеза клеточных стенок грибов, лизисе зооспор, агглютинации прорастающих цистоспор грибов. В других случаях, несмотря на то что лектины не проявляют перечисленных свойств, действие их тоже трактуется как защитное, но уже не благодаря прямому действию на патогенный микроорганизм, а в результате подавления комплементарного взаимодействия между полисахаридами клеточных стенок патогена и лектином клеток хозяина.

Каковы же функции лектинов в системе микро-макроорганизм на молекулярном уровне и, в частности, в системе картофель – *Phytophthora infestans* Mont. de Bary?

Для определения свойства устойчивости картофеля к возбудителю фитофтороза используют клубни и листья. Следовательно, необходимо установить значение лектинов листьев и клубней во взаимоотношении патоген-хозяин. О наличии лектинов в клубнях картофеля имеется ряд публикаций, факт наличия лектинов в листьях необходимо было установить и изучить их свойства и функции.

Проведенными исследованиями были идентифицированы эри-

троагглютинины в соке листьев картофеля, в различных фракциях белков: водорастворимых, полученных аммонийносернокислым фракционированием, в белках мембран хлоропластов. Кроме того, в белках грибкицы возбудителя фитофтороза картофеля также были идентифицированы агглютинины.

В связи с тем, что вопросы паразитизма решались нами на основании представления об иммунохимическом сходстве белков фитопатогена и растения, представлялось необходимым дифференцировать антигены, образующие в перекрестной реакции полосы преципитации, ответственные за проявление сходства агглютининов картофеля и патогена.

Для выделения лектинов были использованы методы ионообменной и аффинной хроматографии. Данные, полученные в результате колончатой хроматографии, свидетельствуют о гетерогенности лектина. Так, после ДЕАЕ-хроматографии было получено четыре группы эритроагглютинирующих элюатов. Электрофоретический анализ этих элюатов выявил гетерогенность каждого и различия по электроподвижности. Объединенные после ДЕАЕ-хроматографии агглютинирующие элюаты, нанесенные на колонку с КМ-целлозой, образовали один пик (ЛЛЦ). ЛЛЦ при электрографическом исследовании разделились на четыре фракции. Лектины листьев, полученные методом аффинной хроматографии на овальбумине из белка куриного яйца (Л/О) в геле агар-агара в веронал-ацетатном буфере, рН 8,55, разделились на четыре компонента, проявив при этом самую низкую подвижность. Суммированные результаты электрофоретического разделения после хроматографии на целлозолах и овогеле показали, что компоненты лектинов по электроподвижности соответствуют почти всем компонентам водорастворимых белков с катодной подвижностью.

Преципитирующая активность лектина позволила осуществить их иммунохимический анализ, в результате была выявлена более сложная структура ЛЛЦ. Обнаруживаются компоненты не только в катодной части иммунофореграммы, но и в анодной. Иммунологический анализ лектинов, выделенных аффинной хроматографией на овогеле, свидетельствует о том, что это довольно сложная группа. Четко выявляется основная часть с низкой

подвижностью в геле агар-агара (Л/0) и группа (Л/0-2), незначительно представленная в количественном отношении. Кроме того, установлено, что два электрофоретических компонента лектина клубней, обнаруживаемые в ПААГ и невыявляемые при разделении в агаре, были проявлены при иммунофорезе и охарактеризованы как гетерогенные структуры.

Таким образом, анализ лектинов листьев и клубней выявил их различия в электрофоретических и иммунохимических свойствах, хотя имеются и сходные структуры. Кроме того, исследования с использованием конкурентного ингибирования биологической активности показали, что лектины листьев и клубней несколько отличаются и по углеводной специфичности. Известно, что гаптенем лектина клубней являются олигомеры N-ацетил-D-глюкозамина. Мы определили, что гаптенем лектинов листьев является мономер этого аминсахара.

Немаловажной характеристикой для познания свойств лектина является его функциональная активность. Наши исследования показали, что в выделенных агглютинирующих биополимерах листьев и клубней картофеля обнаруживается ферментативная активность, например, в ЛЛЦ - пероксидазная активность. Из шести определяемых ферментов в Л/0 было установлено наличие эстеразной и пероксидазной активностей.

Наряду с указанными свойствами, было установлено, что лектинам из листьев картофеля свойственна функция ингибирования. Нами впервые выделен ингибитор трипсина (ИТА) из лектинов листьев методом аффинной хроматографии на трипсин-агарозе. ИТА из лектина агглютинирует эритроциты, при электрофоретическом исследовании он представлен двумя компонентами, которые по подвижности соответствуют двум из четырех компонентов лектинов с овогеля. Аналогичную подвижность проявляет также ИТА, выделенный из суммарной фракции белков листьев. Сходные с Л/0 и с ИТА эритроагглютинирующую активность и электрофоретическую подвижность, выявляемые при иммуноэлектрофорезе, обнаруживает ингибитор химиотрипсина (ИХА), выделенный из суммарной фракции белков листьев.

Для выявления роли лектинов во взаимоотношениях с фитопатогеном на молекулярном уровне необходимо установить обнаруживают ли они иммунохимическое сходство с биополимерами

патогена и какова доля их участия в этом взаимодействии. Было установлено, что при взаимодействии с сыворотками к разным расам возбудителя фитофтороза, отличающихся генотипом, не выявляется специфики. Во всех случаях иммунохимически сходными с патогеном оказались отдельные компоненты ЛЛЦ, соответствующие по подвижности фракциям, характерным роду *Solanum*. При этом спектры сходства лектинов листьев как с эндогенными мицелиальными, так и с эррацеллюлярными белками патогена, были похожи. В противоположность ЛЛЦ основные компоненты Л/О не выявляли иммунохимического сходства с протеинами возбудителя фитофтороза. Основные компоненты ИГА и ИХА также не были сходны с патогеном. Иммунохимически сходными с биополимерами патогена оказались лектины клубней (ЛК-6-100). При этом спектры сходства с патогеном у агглютинирующих и неагглютинирующих биополимеров клубней совпадали.

Кроме того, что было обнаружено иммунохимическое сходство на уровне лектинов растения и биополимеров патогена, представлялось целесообразным выявить, участвуют ли лектины растения в ответной реакции на заражение фитопатогеном. При сравнении количественных изменений лектинов листьев на заражение растения разными расами в пределах одинаковых по растворимости белков наблюдаются изменения, не связанные с вирулентностью патогена. Например, в цитоплазматических и вакуолярных белках при заражении расой 4 и I. 2. 3. 4 наблюдается увеличение титра агглютинации в сравнении со здоровыми растениями, в то время как в периферических мембранных белках происходит снижение титра в обоих случаях. Причем, чем больше усиливается синтез лектинов в одних белках, например, вакуолярных, тем значительно снижается в других — мембранных. По-видимому, процессы в клетке зараженного растения, происходящие на уровне синтеза лектинов, направлены на стабилизацию метаболизма до уровня здорового растения.

Исследования свидетельствуют также о локализации лектинов в большинстве электрофоретических компонентов белков листьев и клубней картофеля, о том, что лектины ответственны за проявление неспецифического взаимодействия между патогеном и растением. Хотя мы располагаем ограниченными данными, можно допустить, что в распознавании, а также в проявлении

совместимости патогена и растения (в частности, возбудителя фитофтороза и картофеля) немаловажное значение имеют лектины-ингибиторы, которые могут инактивировать протеиназы патогена, предотвращая проявление паразитизма, или осуществлять регуляцию взаимоотношений в системе патоген-хозяин.

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕКТИНОВ ПШЕНИЦЫ

А.М. Ямалеев, А.А. Ямалеева, З.В. Петрова
Отдел биохимии и цитохимии Башкирского научного
центра Уральского отделения АН СССР

Всеобщность распространения и широкий набор функций лектинов позволяют предположить об их защитной роли в растениях, выполняющих в данном случае функцию неспецифической защиты от болезней грибного происхождения. Как известно, успех селекционной работы по иммунитету пшеницы к грибным болезням во многом связан с быстрым прогрессом в области растительной молекулярной биологии, в частности лектинов, которые функционируют в процессах, идущих с участием межклеточного узнавания (растение-хозяин-патоген). Биохимические свойства агглютининов зародышей пшеницы широко описаны. Однако свойства агглютининподобного белка взрослых растений до настоящего времени исследованы слабо. Кроме пшеницы, лектины также идентифицированы в листьях и корнях несколько других видов растений. Иммуноцитохимические исследования показали, что как в зародышах, так и во взрослых растениях лектины сосредоточены в органах, которые находятся в почве во время прорастания, роста и развития. Установлено, что лектины большей частью расположены в поверхностных слоях этих органов. Интересно отметить, что связь между лектинами корня и листа и лектинами семени все еще находится под вопросом, потому что белки могут проявлять значительные биохимические различия. Чтобы лучше понять функции лектинов пшеницы и контроль их экспрессии, мы иммунохимически охарактеризовали агглютинины зародышей в связи с геномным составом пшеницы.

Трехгеномный гексаплоид *T.aestivum* (мягкая пшеница) является основным хлебом человечества. Исходя из огромной важности задачи борьбы с возбудителями грибных болезней этой

пшеницы путем создания устойчивых сортов, все больше возрастает роль редких видов пшеницы и ее диких сородичей с разным геномным составом. Так, донорами первого генома (А) полиплоидных пшениц считаются *T.urartu*, *T.monococcum*, *T.boeoticum*.

Современные культурные пшеницы принадлежат главным образом к двум полиплоидным видам — *T.durum* и *T.aestivum*. Первый относится к тетраплоидным пшеницам и имеет геномную формулу AABB, второй — к гексаплоидам с геномной формулой AABBDD. Итак, образование лектинов в развивающемся зерне происходит под контролем одного (у диплоидной пшеницы), двух (у тетраплоидной пшеницы) или трех геномов (у гексаплоидной пшеницы) при участии разных тканевых и клеточных структур.

Методом двойной иммунодиффузии были изучены лектины пшениц *T.urartu*, *T.boeoticum* и *T.monococcum* — представителей генома А. При проявлении антисывороткой на *T.timopheevii* в спектре лектинов *T.monococcum* и *T.boeoticum* выявляется по 5 компонентов. Интересно отметить, что в этих спектрах линии идентичны как по числу, так и по интенсивности. В белках *T.urartu* в аналогичных условиях выявляются 3–4 компонента, два из которых проявляются очень интенсивно. При проявлении этих антигенов сывороткой на *T.persicum* выясняется следующее: в спектре лектинов *T.urartu* выявляется пять компонентов, два из которых не обнаруживаются в белках *T.boeoticum* и *T.monococcum*. Следует отметить, что спектры *T.monococcum* и *T.boeoticum* при проявлении антисывороткой на *T.persicum* отличаются наличием перекрестов, что говорит о некоторой их специфичности.

Таким образом, иммунохимический анализ лектинов из семян доноров генома А пшеницы показывает, что по характеру, числу и интенсивности белковых компонентов наибольшую идентичность проявляют к *T.timopheevii* (AAGG) лектины *T.boeoticum* и *T.monococcum*, тогда как спектр лектинов *T.urartu* несколько отличается от них и проявляет большую гомологию с тетраплоидной пшеницей (геномный состав AABB). С другой стороны, идентичность *T.boeoticum* и *T.monococcum* по антигенному составу свидетельствует о том, что оба эти вида имеют общий геном. Последнее подтверждается исследованиями спирторастворимых белков-глиадинов.

Сравнительный анализ лектинов из семян доноров генома В (*Ae. longissima*, *Ae. speltoides*, *Ae. bicornis*, *Ae. sharonensis*) дал возможность выявить их гетерогенность и специфичность. Сыворотка на лектины *T. timopheevii* выявляет наибольшее число компонентов среди изученных видов эгилопсов в спектре лектинов *Ae. speltoides*. При проявлении данной сывороткой наибольшую идентичность обнаруживают лектины *Ae. longissima*, *Ae. bicornis*, *Ae. sharonensis*. У них проявляется одинаковое число компонентов, хотя и отмечено некоторое перераспределение в интенсивности и расположении линий. Таким образом, иммунохимический анализ лектинов *Ae. speltoides* и других доноров генома В пшеницы сывороткой на *T. timopheevii* позволяет судить об их филогенетической близости, т.е. в становлении *T. timopheevii* с генотипом AG участвовал *Ae. speltoides*, внесший в этот генотип геном G.

Сравнительный иммунохимический анализ лектинов различных доноров генома пшеницы позволил выяснить следующее: в лектинах *Ae. tauschii* (геном Д) гомологичной сывороткой выявляется 5 компонентов, наиболее интенсивными из которых являются первый, третий и четвертый от старта компоненты в иммунодиффузии. Несколько обедненными при этом оказались спектры *Ae. longissima* (геном В) и *T. urartu* (геном А). Заслуживает внимания, что четвертый компонент *Ae. tauschii* сильно проявляется также в спектре *T. urartu* и очень слабо в лектинах *Ae. longissima*. Таким образом можно заключить, что доноры разных геномов гексаплоидной пшеницы обладают специфичными спектрами иммунопреципитации.

Были исследованы также между собой лектины *Ae. speltoides*, *T. timopheevii*, *T. persicum*, *Ae. longissima*. При проявлении лектинов вышеуказанных видов сывороткой на белки *T. timopheevii* в гомологичных белках выявляется 5-6 компонентов. В спектре *Ae. speltoides* обнаруживаются медленно движущиеся интенсивные линии. Однако, одна очень четкая линия быстрой подвижности отсутствует в спектре лектинов *T. timopheevii*, но присутствует в лектинах *Ae. speltoides*. Возможно этот белковый компонент маркирует геном А. *T. timopheevii*. Лектины *T. persicum* и *Ae. longissima* сывороткой *T. timopheevii* проявляются менее гетерогенно. В их спектрах отсутствует

компонент, специфичный для генома G.

Иммунохимическая дифференциация геномов A, AB, AG по лектинам дала следующие результаты. Антисыворотка на гексаплоидную пшеницу Московская 35 полным набором AABVDD в гомологичных реакциях дает наиболее богатый спектр. Сходные спектры выявляются в лектинах *T.spelta*. Сравнительно более близкими по идентичности и характеру спектрами вслед за *T.spelta* обладают *T.persicum*, затем *T.urartu*. Спектры *T.monococcum* и *T.timopheevii* дали данной сывороткой обедненное число компонентов, что указывает на некоторую филогенетическую отдаленность этих видов.

Был проведен сравнительный иммунохимический анализ лектинов генома D, Геномов AB и AVD в связи с устойчивостью их к пыльной и твердой головне. Лектины представителей генома D, AB, AVD при проявлении антисывороткой на гексаплоидную пшеницу обнаруживают гетерогенные и специфичные спектры. Все три представителя гексаплоидных пшениц - Московская 35, Санзар, *T.spelta* - дают между собой наиболее сходные спектры. Данной сывороткой устойчивый к пыльной и твердой головне сорт Санзар-2 дает наиболее богатый спектр. Среди изученных гексаплоидных пшениц более обедненным спектром обладают лектины *T.spelta*, который характеризуется восприимчивостью к головневым болезням.

Спектры лектинов *T.persicum*, *T.turgidum* и *T.timonovum* очень сходны между собой: практически все выявленные данной сывороткой компоненты идентичны, что говорит о близости происхождения их геномов. Следует отметить, что проявляющиеся очень интенсивно в спектре лектинов *Ae.tauschii* (геном D) компоненты, практически отсутствуют в лектинах представителей геномов AB при проявлении сывороткой на геном AVD.

Таким образом, в результате иммунохимического анализа лектинов доноров геномов пшеницы были обнаружены различия между ними как по специфичности, так и по гетерогенности белковых компонентов. Тетраплоидные виды пшеницы по лектинам четко распределяются на две группы соответственно их геномному составу. При изучении видов пшеницы наблюдаются также различия и внутри геномных групп. В литературе имеются сведения о том, что пшеница и ее дикие сородичи с раз-

ным геномным составом обладают высокой консервативностью генов 5_g ДНК и рДНК, имеющих важное функциональное значение. Применительно к лектинам работы в этом плане имеют важное значение для решения актуальных проблем происхождения, генетики и селекции пшеницы.

ВЛИЯНИЕ АГГЛУТИНИНА ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ (АЗП) НА НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ АССОЦИАТИВНОГО АЗОТФИКСИРУЮЩЕГО МИКРООРГАНИЗМА *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

М.А. Галкин

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Академии наук СССР, г. Саратов

Способность азоспирилл фиксировать молекулярный азот влияет на физиологию культурных злаков, ассоциированных с ними. Изменение азотфиксирующей активности (АА) под действием высокомолекулярных веществ растительного происхождения позволяет судить о степени взаимодействия партнеров и имеет важное практическое значение, позволяя вести скрининг сортов по максимальному выходу эффектора, увеличивающего АА, в ризоплан и ризосферу. Удобной моделью для изучения влияния высокомолекулярных веществ, выделяемых пшеницей, на процесс азотфиксации у азоспирилл может служить агглютинин зародышей пшеницы (АЗП), возможность выхода которого в ризосферу и его присутствие в ризоплане убедительно доказано в работах /6, 7/.

Большинство работ, посвященных влиянию лектинов на физиологию клетки, выполнены на эукариотических объектах, однако в нескольких публикациях рассматривается подобное влияние лектинов на микроорганизмы. Так, в работах /5, 9/ показано активирующее воздействие *Con A* на рост *Bacillus cereus*, потребление кислорода, активность дегидрогеназ и фосфатаз, α -глюкозидазы и продукцию Ц-ГМФ. Взаимодействие ФГА с некоторыми фитопатогенными микроорганизмами исследовалось в работе /3/, где показано, что небольшие концентрации лектина значительно увеличивают продукцию Ц-ГМФ и активность дегидрогеназ. Наконец, ранее нами была показана высокая активность АЗП по отношению к процессу азотфиксации у *A. brasilense* Sp7. Сходный эффект обнаружен для лектиноподобных белков риса /8/.

Суммируя данные о физиологическом действии лектинов на клетку, представляется уместным привести цитату из монографии М.Д. Луцка /2/: "... лектины выполняют роль информативных молекул, передающих сигнал внутрь клетки и вызывающих сдвиги в метаболизме".

Целью настоящей работы было изучение влияния АЗП на АА и ряд культуральных параметров (рН, pO_2 , фаза роста), связанных с процессом азотфиксации у *A. brasilense* Sp 245.

Штамм *A. brasilense* Sp 245 был получен из группы коллекционных культур ИБФРМ АН СССР, АЗП получали по методике, предложенной для группы растительных белков лабораторией биохимии ИБФРМ АН СССР. В качестве контрольного белка использовали BSA (Serva). Культивирование микроорганизмов, добавление лектина и оценку азотфиксации проводили, как описано ранее /1/. АА выражали в мг N_2 /мг сухих веществ (с.в.) суспензии/сутки.

Было установлено, что АЗП стимулирует процесс азотфиксации у *A. brasilense* Sp 245, причем наблюдаемый эффект максимален при концентрации лектина, равной 0,5-1 мкг/мл, а сам вид зависимости (рисунок 1) напоминает зависимость, полученную для *A. brasilense* Sp7 /1/. При 30-минутной преинкубации АЗП с 5% раствором N-ацетил-D-глюкозамина эффект исчезал. Исследования показали, что обнаруженный эффект для *A. brasilense* Sp245 максимален в середине логарифмической фазы роста культуры и практически исчезает к началу стационарной фазы (рисунок 2). Это хорошо согласуется с литературными данными /1/.

Из литературы /4/ известно, что оптимум парциального давления кислорода pO_2 для азотфиксации у азоспирилл равен 0,015 атм. Было изучено ингибирующее влияние кислорода, содержащегося в газовой фазе, на процесс азотфиксации в присутствии АЗП в концентрации 0,5 мкг/мл. Кислород вводился в количестве 5 и 10% от общего содержания газов. Результаты показывают, что если 5% содержания O_2 приводит в контроле к уменьшению АА до 0,123 мг N_2 (мг с.в.) сут., а 10% его содержание полностью блокирует процесс азотфиксации, то в присутствии АЗП АА оказалась равной соответственно 0,283 и 0,073 мг N_2 /1 мг с.в./сут. BSA, добавляемый в среду в

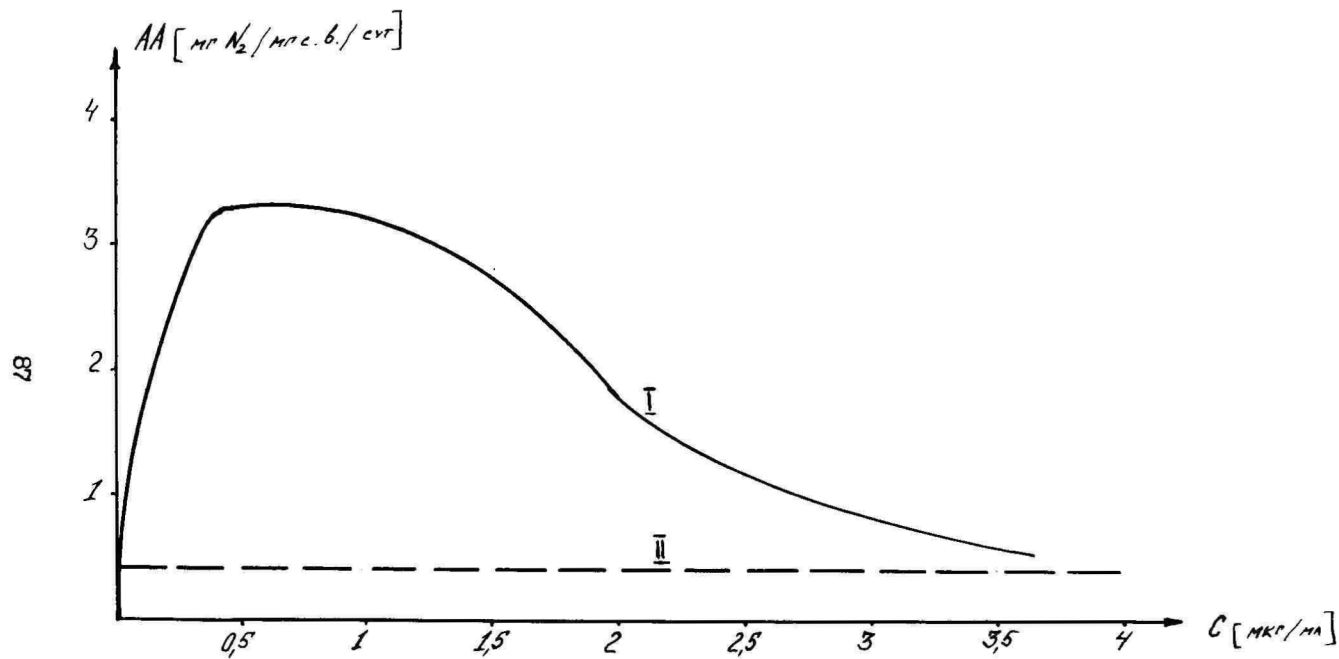


Рис. I. Зависимость азотфиксирующей активности (AA) *A. brasilense* Sp 245 от концентрации АЗП (I) и BSA (II)

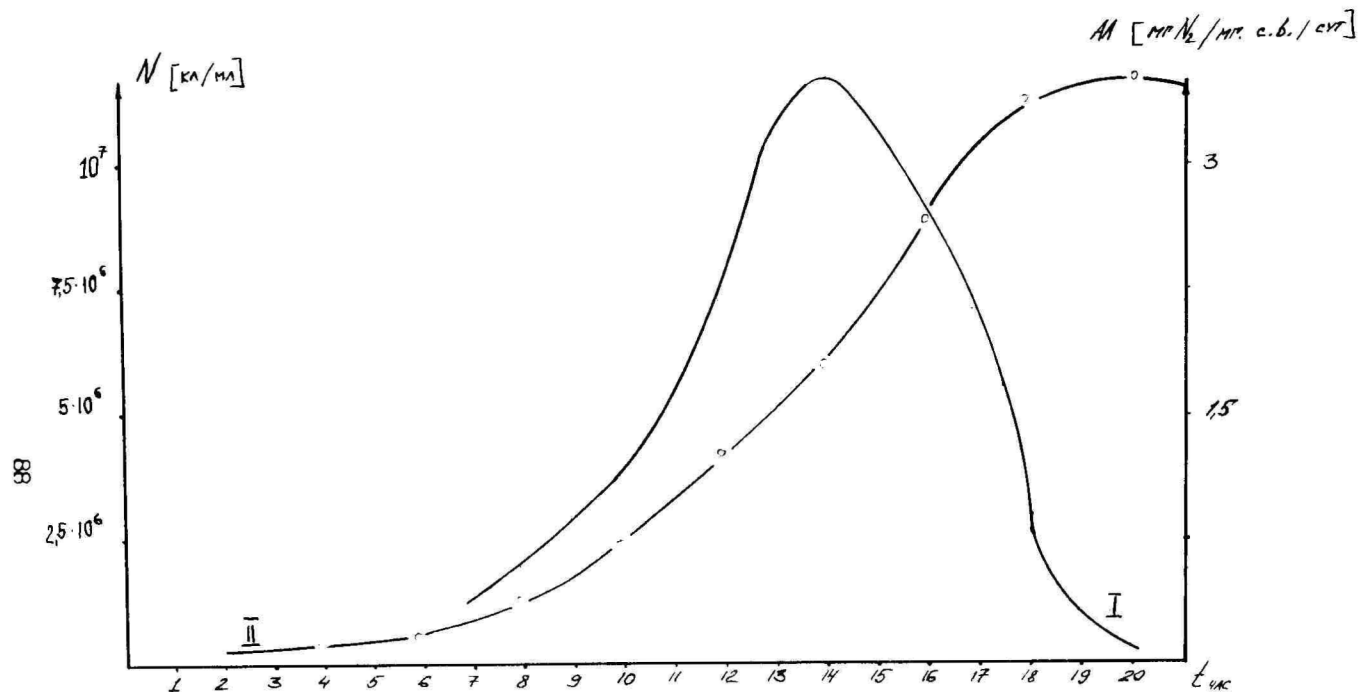


Рис. 2. Зависимость азотфиксирующей активности (AA) в присутствии 0,5 мкг/мл АЗП от возраста культуры *A. brasilense* Sp 245. AA - (I). Количество клеток в мл - N (II)

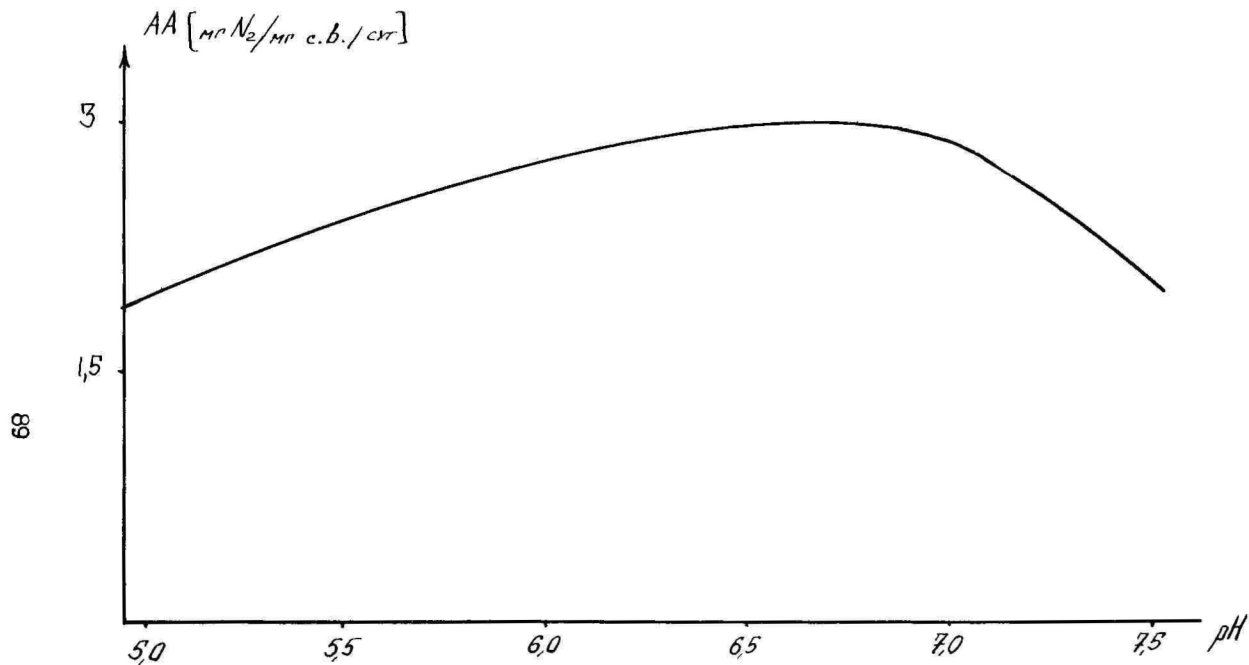


Рис. 3. Зависимость азотфиксирующей активности (AA) *A. brasilense* Sp 245 в присутствии 0,5 мг/мл АЗП от pH среды культивирования

той же концентрации, подобного эффекта не вызывал.

Была установлена зависимость активирующего воздействия АЗП в концентрации 0,5 мкг/мл на АА от рН среды культивирования (рисунок 3).

Существование эффекта активации процесса азотфиксации у азоспирилл в присутствии АЗП в достаточно широком диапазоне рН культуральной среды (5-7,5) и вид зависимости эффекта от рН позволяют предположить, что электростатические взаимодействия "микроорганизм-лектин" не играют существенной роли в механизме возникновения эффекта. Отсутствие вышеописанного эффекта при преинкубации лектина с гаптенем (N-ацетил-D-глюкозамин) свидетельствует об известной специфичности процесса взаимодействия АЗП с микроорганизмами, а зависимость степени усиления АА от возраста культуры наводит на мысль о лабильном характере связывания АЗП поверхностными структурами микробных клеток.

В заключение автор выражает благодарность сотруднику группы растительных белков лаборатории биохимии ИБФРМ АН СССР Семенову С.В. за помощь в выделении АЗП.

Л и т е р а т у р а

1. Галкин М.А., Никитина В.Е. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. - 1987, XXIII. - Вып. 3. - С. 389-391.
2. Луцик М.Д., Панасюк Е.М., Луцик А.Д. Лектины. - Львов: Изд-во Львов. ун-та, 1981. - С. 76.
3. Casteresana M.C. et al. // J. Phytopathol. - 1987. - Vol. 149. - N 4. - P. 345-358.
4. Hartman A. et al. // J. Bacteriol. - 1987. - Vol.169. - N 3. - P. 944-948.
5. Lau T.M., Chan K.Y. // Microbios. - 1984. - Vol. 39.- P. 137-150.
6. Mishkind M., Palevitz B.A., Raikhel N.V. // Sci. - 1983. - Vol. 220. - N 4603. - P. 1290-1292.
7. Stinissen H.M., Chrispeels M.J., Peumans W.J.// Planta. - 1985. - Vol. 164. - P. 278-286.
8. Tabary F., Balandreau J., Bourrillon R. // Biochem. - Biophys. Res. Commun.- 1984.- Vol.119.- N 2.- P-549-555.
9. Tabary F., Frenoy J. // Biochem. J. - 1985. - Vol. 229. - P. 687-692.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИЗОФОРМ ЛЕКТИНА ПШЕНИЦЫ В
БЕККРОСНЫХ ЛИНИЯХ СОРТА САРАТОВСКАЯ 29 И
МОНОСОМНЫХ ЛИНИЯХ СОРТА САРАТОВСКАЯ 46

Л. И. Крапивина

Институт биохимии и физиологии растений и
микроорганизмов АН СССР, г. Саратов

Количественное содержание изоформ лектина пшеницы варьирует в зависимости от ее сорта. Известно, что синтез субъединиц каждого изолектина кодируется генами определенного генома /3, 4/, поэтому содержание изоформ может зависеть непосредственно от изменений в геномах этих сортов.

В работе использовались экстракты из зерновок двух сортов гексаплоидных пшениц Саратовская 29 (С29) и Саратовская 46 (С46), а также беккроссные линии сорта С29, которые отличались от родительского сорта содержанием Lr генов, несущих устойчивость к бурой ржавчине, и моносомные линии по геному AA сорта С46, созданные на основе серии Чайнис Спринг. Анализ изолектинов осуществлялся с помощью метода ионообменной хроматографии на колонке с SP - сефадексом /4/.

Элюционные образцы изолектинов моносомных линий представлены на рисунке Ia, беккроссных линий на рисунке Ib.

Таблица

Содержание изолектинов в моносомных линиях по геному AA сорта С46 и беккроссных линиях сорта С29

Сорт, линия	Содержание изолектинов, %		
	CL _{AA}	CL _{BB}	CL _{DD}
	M ± m	M ± m	M ± m
I	2	3	4
С46-эуплоид	53,0±0,04	34,0±0,03	13,0±0,06
1А-моно	21,0±0,06	48,0±0,04	31,0±0,05
2А-моно	54,0±0,05	32,0±0,04	15,0±0,03
3А-моно	55,0±0,03	34,0±0,03	11,0±0,05
4А-моно	52,0±0,04	25,0±0,05	23,0±0,04

Продолжение табл.

I	2	3	4
5A-моно	51,0 \pm 0,04	38,0 \pm 0,04	11,0 \pm 0,03
6A-моно	52,0 \pm 0,05	35,0 \pm 0,03	13,0 \pm 0,03
7A-моно	50,0 \pm 0,06	31,0 \pm 0,05	15,0 \pm 0,04
Саратовская 29	36,2 \pm 0,03	59,2 \pm 0,05	4,5 \pm 0,02
C29AM2	19,4 \pm 0,04	24,6 \pm 0,03	55,9 \pm 0,03
C29	28,1 \pm 0,06	36,6 \pm 0,03	35,3 \pm 0,03
Агро 2	13,0 \pm 0,03	20,3 \pm 0,04	66,7 \pm 0,07
Агро 4	39,1 \pm 0,05	43,8 \pm 0,04	17,2 \pm 0,05
Ясар 29/377	30,0 \pm 0,06	60,0 \pm 0,04	9,0 \pm 0,05

По содержанию изолектинов от эуплоида отличается только 1A-моно линия. Она содержит CL_{AA} в 2,5 раза меньше, чем эуплоид, CL_{BB} в 1,5 раза, а CL_{DD} в 2,4 раза больше, чем в С46. Таким образом, уменьшение количества первой изоформы вызывает увеличение второй и третьей, содержание CL_{AA} снижается наполовину.

В отличие от моносомных линий изменения в содержании изоформы беккроссных линий наблюдались во всех линиях, наименее ярко они выражены в линии Ясар 29/377. Интродукция 1g генов из различных видов пырея имела общую тенденцию к снижению содержания CL_{AA} и CL_{BB} и увеличению содержания CL_{DD} . Так, в линиях C29AM2 количество CL_{DD} возросло в 12,4 раза, Агро 2 - в 14,7, C29 Agr - в 7,8 раза. Наибольшее снижение CL_{AA} отмечено в линии C29AM2 - в 1,9 раза, а изоформы CL_{BB} - в линии Агро 2 - в 2,9 раза.

Таким образом, гетерогенность распределения отдельных изоформ лектина пшеницы в моносомных линиях по генотипу АА сорта М46 и беккроссных линиях сорта С29 свидетельствует о генетическом контроле синтеза изолектинов и зависимости активности генов, кодирующих отдельные субъединицы, от изменений в геноме. Так, интродукция генов из пырея связана со значительным повышением титра агглютинации и увеличением содержания изолектина. Нехватка одной хромосомы аллельной пары 1A-моно линии сорта С46 приводит к снижению содержания CL_{AA}

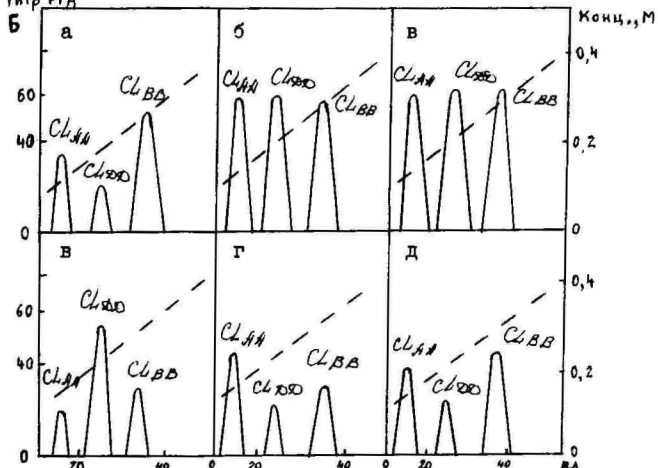
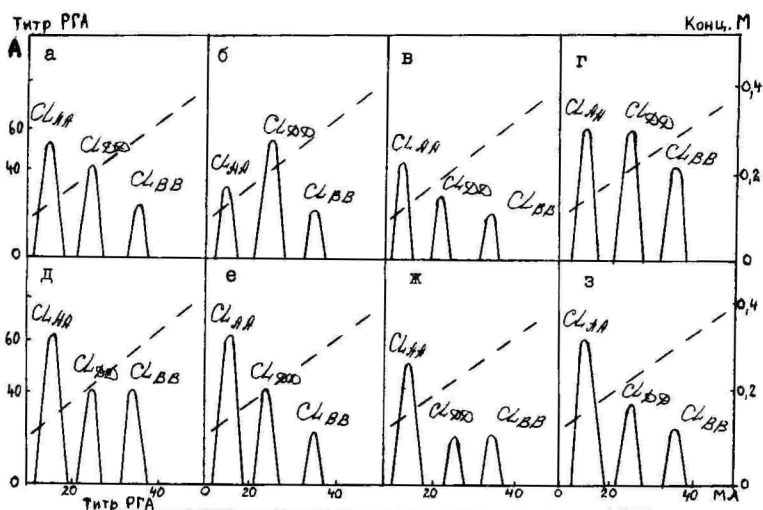


Рис. Изоэлектрины моносомных линий по генуму АА гексаплоидной пшеницы Саратовская 46 (А) и безкроссных линий гексаплоидной пшеницы сорта Саратовская 29 (Б):

А: а - зуплоид: С46; б-з - моносомные линии

Б: а - сорт С29; б - С29АП2; в - С29 г. Агро 2; д - Агро 4, е - Ясар 29/377

в два раза, а также к изменению содержания других изоформ.

Таким образом, гетерогенность распределения изолектинов в эуплоидах С29 и С46, моносомных и беккроссных линиях позволяет использовать их в качестве биохимического маркера в цитогенетических и генетических исследованиях. Лектин пшеницы может быть дополнительным белковым маркером длинного плеча первой гомеогруппы хромосом /1, 2, 3/.

Л и т е р а т у р а :

1. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. - Львов: Вища школа, 1981. - 155 с.

2. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. - М.: Наука, 1985. - 271 с.

3. Peumans W.J., Stinissen H.M., Carlier A.R. // *Planta*. - 1982. - Vol. 154. - P. 562-567.

4. Stinissen H.M., Peumans W.J., Law C.N., Payne P.L.// *Theor. Appl. Genet.* - 1983. - Vol. 67. - P. 53-58.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АГГЛЮТИНИНА ИЗ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ (АЗП) ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ (АЦ) ИЗ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА БЫКА

Ф.Б. Зайцева, В.М. Петров, В.М. Липкин
Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина
АН СССР, г. Москва

Аденилатциклазная система (АЦС) представляет собой ферментативный комплекс, осуществляющий синтез циклического аденозин-монофосфата в ответ на связывание гормона клеткой-мишенью. Она состоит из трех функционально различающихся белков: рецептора, ГТФ-связывающего регуляторного белка и собственно каталитического компонента - фермента аденилатциклазы. В коре головного мозга быка обнаружены две формы аденилатциклазы: кальмодулин-чувствительная (КМ-чувствительная) и кальмодулин-независимая. Первая форма составляет примерно 20% от общего количества фермента в мозге, или менее 0,001% всего мембранного белка /1, 3/. Данная работа посвя-

цена выделению КМ-чувствительной АЦ из коры головного мозга быка.

Перед солубилизацией мембраны обрабатывались буфером с 2М NaCl, что позволило удалить часть периферических белков, а также эндогенный кальмодулин без потери аденилатциклазной активности. Солубилизацию белков проводили буфером с 0,5% Луброл-РХ при весовом соотношении белок-детергент 1:3. Кальмодулин-чувствительные белки выделяли из препарата солубилизованных мембран при помощи КМ-сефарозы (КМ иммобилизовали на ВгСН-сефарозу 4В с плотностью 0,8 мг/мл сорбента). Полученный препарат кальмодулин-чувствительной аденилатциклазы на этом этапе был очищен в 1300 раз, удельная активность его составляла 0,66 мкМ/мг мин.

Аденилатциклаза является гликопротеином и сорбируется на иммобилизованном АЗП /2/. Это свойство фермента использовали на следующем этапе его очистки на АЗП-сефарозе (АЗП иммобилизовали на ВгСН-сефарозу 4В с плотностью 5 мг/мл сорбента в присутствии 20 мМ N-ацетилглюкозамина /НАГА/. Сорбент инкубировали 5 часов ($t^{\circ} = +4^{\circ}\text{C}$) с препаратом АЦ после КМ-сефарозы. Аденилатциклазу элюировали буфером с 0,3 М НАГА при $+20^{\circ}\text{C}$. В результате получили препарат кальмодулин-чувствительной аденилатциклазы, с конечным выходом 3,5%, очищенной в 12 000 раз по сравнению с исходными мембранами. Удельная активность препарата 5-6 мкМ/мг мин (таблица I). В присут-

Таблица I

Выделение КМ-чувствительной аденилатциклазы
из 500 г коры головного мозга быка

Этап очистки	Удельная ферментативная активность нМ/мг мин	Общая активность		Белок		Очистка препарата
		нМ/мин	%	мг	%	
1	2	3	4	5	6	7
Мембраны	0,5	7500	100	15000	100	1
Мембраны обработанные 2 М NaCl	1,0	7500	100	7500	50	2

Продолжение табл.

I	2	3	4	5	6	7
Солубилизация 0,5 Луброл-РХ	1,3	6000	80	4500	30	2,6
Хроматография на КМ-сеф.	660	530	7	0,8	0,0053	1300
Хроматография на АЗП-сеф.	6000	260	3,5	0,044	0,0003	12000

ствии 5 мкМ кальмодулина аденилатциклазная активность препарата увеличивалась в 2,5 раза, а под действием 50 мкМ форсколина в 8 раз. По данным электрофоретического анализа, в денатурирующих условиях (0,1% ДДС-Na/ молекулярная масса фермента составляет 160 ± 5 кД). Для проведения структурных исследований фермент получали в гомогенном состоянии при помощи электроэлюции из геля после электрофореза. Определяли аминокислотный и углеводный составы аденилатциклазы (таблица 2). Предполагается, что N-концевая аминокислота фермента блокирована. Показано, что КМ-независимая форма аденилатциклазы, в отличие от КМ-чувствительной, не сорбируется на АЗП-сефарозе.

Таблица 2

Характеристика аминокислотного и углеводного составов КМ-чувствительной аденилатциклазы

Аминокислота, сахар	Моль %
I	2
Asx	8,3
Thr	7,4
Ser	9,1
Glx	11,9
Pro	5,2
Gly	12,4
Ala	6,6
Val	5,8
Met	1,8

Продолжение табл. 2

I	2
Ile	8,0
Leu	8,1
Tyr	3,0
Phe	2,8
His	1,6
Lys	3,9
Arg	3,9
Fuc	10,74
Man	12,84
Gal	5,74
GlcNAc	70,66
Белок, %	86,18
Углеводы, %	13,82

Л и т е р а т у р а

1. Neer E.J. // J. Biol. Chem. - 1974. - Vol. 249. - P. 6527-6531.
2. Pfeuffer E., Mollner S., Pfeuffer T. // EMBO J. - 1985. - Vol. 4. - P. 3675-3679.
3. Westcott K.R., La Porte D.C., Storm D.R. /// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1979. - Vol. 76. - P. 204.

ЛЕКТИНЫ ГЕНЕРАТИВНЫХ ОРГАНОВ И ИХ РОЛЬ В РАСПОЗНАВАНИИ
ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ПЫЛЬЦЫ И ПЕСТИКА

Е.Л. Гольнская, Е.Б. Корвацкая

Киевский государственный университет им. Т.Г. Шевченко

Экспериментально обнаружено неизвестное ранее свойство пестиков цветковых растений синтезировать эндогенные лектины.

В качестве объекта исследования использовали примулу об-

ратноконическую - гетеростильное растение с гетероморфной системой несовместимости.

Методом дробного этанольного фракционирования из неопыленных, легитимно и иллегитимно опыленных пестиков выделены суммарные лектины. Разработан метод оценки относительной активности индивидуальных сахаров в реакции торможения эритроагглютинации применительно к совокупности лектинов. Сравнена относительная активность 12 простых сахаров в реакциях ингибирования.

Установлено, что лектины неопыленных пестиков длинностолбчатой формы достоверно активнее ингибируются L-арабинозой, глюкозой, галактитом, а лектины неопыленных пестиков короткостолбчатой формы - галактозой, ксилозой, фруктозой. Наряду с этим, неопыленные пестики каждой формы примулы содержат лектины, которые ингибируются сахарами, проявившими максимальную активность относительно лектинов пестиков противоположной формы примулы.

При легитимном опылении каждой формы ингибирование лектинов сахарами, характерными для неопыленных пестиков данной формы, снижается, а ингибирование сахарами, характерными для противоположной формы, усиливается. Эти процессы не наблюдаются при иллегитимном опылении. Данное явление расценивается как свидетельство использования лектинов определенной специфичности, свойственных преимущественно неопыленным пестикам, в ходе прогамной фазы оплодотворения.

Суммарные лектины, выделенные из пестиков, разделяли методами гельфильтрации на сефадексах. Определяли общее число белковых фракций, характер распределения белковых пиков на элюционной кривой, а также распределение белковых фракций, обладающих и не обладающих агглютинирующей способностью (далее - агглютинирующие и неагглютинирующие белки).

Установлено, что белки неопыленных пестиков длинностолбчатой формы на элюционной кривой распределяются в виде двух пиков с объемами выхода 64 мл (свободный объем колонки) и 214 мл (основной пик). Первый из них содержит агглютинирующие белки, второй - также и неагглютинирующие белки.

Белки, выделенные из пестика спустя 24 ч после легитимного опыления выходят из колонки также двумя пиками. Отмеча-

ется существенное смещение основного пика в направлении фракции с меньшим порядковым номером ($V_e = 190$ мл). Белки, выделенные из пестика спустя 24 ч после иллегитимного опыления, выходят из колонки также двумя пиками, при этом характерно смещение объема выхода основного пика в сторону фракций с большим порядковым номером ($V_e = 220$ мл). Зарегистрировано перемещение на элюционной кривой агглютинирующих белков в сравнении с неопыленным пестиком. При опылении агглютинирующие белки обнаружены также в зоне низких экстинкций, в последних фракциях элюата.

Агглютинирующие и неагглютинирующие белки, элюированные с колонки, гидролизовали в кислой среде и определяли состав аминокислот на аминокислотном анализаторе типа ААА-881. Агглютинирующие белки, которые вымываются в свободном объеме колонки, по составу аминокислот отличаются от остальных фракций и, вероятно, не являются их агрегатами.

Агглютинирующие белки основного пика неопыленных пестиков характеризуются высоким содержанием основных и кислых аминокислот. При опылении аминокислотный состав белков пестика сравнительно с контролем меняется. Отмечены некоторые общие для легитимного и иллегитимного опыления тенденции, а также существенные отличия. В обоих вариантах наблюдается снижение содержания основных и кислых аминокислот и увеличение количества нейтральных. При легитимном опылении увеличивается содержание глутаминовой кислоты, при иллегитимном — глутаминовой и аспарагиновой кислот (либо их амидов). При легитимном опылении несколько увеличивается содержание пролина, отмечено необычайно высокое содержание оксипролина, — явление, которое не проявляется ни в одном из вариантов опыта. Если сумму всех аминокислот гидролизата принять за 100%, то по абсолютному содержанию доля оксипролина составит 41,5% от суммы аминокислот. При иллегитимном опылении увеличивается содержание пролина, однако оксипролин не определяется.

Характерной особенностью белков, которые вымываются в зоне низких экстинкций, следует считать максимальное содержание пролина. Известно, что пролин у всех без исключения растений играет особую роль в метаболизме растущих пыльцевых трубок и может непосредственно включаться в состав специфици-

ческих белков стенки пыльцевой трубки. Гликопротеины с высоким содержанием оксипролина выявлены в составе пыльцевых трубок некоторых растений. Высокое содержание пролина и оксипролина в составе агглютинирующих белков, обнаруженное в наших экспериментах, может свидетельствовать об участии агглютинирующих белков в процессах роста пыльцевых трубок.

Агглютинирующие и неагглютинирующие белки, элюированные с колонки, прибавляли в серии разведений к искусственной среде, на которой выращивались пыльцевые трубки примулы, в сочетаниях, имитирующих легитимное и иллегитимное опыление. Установлено, что агглютинирующие белки неопыленных пестиков длинностолбчатой формы стимулировали рост легитимных пыльцевых трубок и ингибировали рост иллегитимных. Неагглютинирующие белки не влияли на рост легитимных трубок и ингибировали рост иллегитимных.

Белки, выделенные из пестиков спустя 24 ч и после легитимного опыления, проявили иное воздействие на рост пыльцевых трубок. В этом варианте ингибирующее влияние белков на рост пыльцевых трубок не определяется. Стимулирование проявляется сильнее относительно иллегитимной пыльцы, которая не участвовала в опылении. При всех вариантах опыта длина пыльцевых трубок на средах с добавками агглютинирующих белков была выше таковых на средах с добавками неагглютинирующих белков.

Агглютинирующие белки, выделенные из пестиков спустя 24 ч после иллегитимного опыления, при всех разведениях ингибировали рост иллегитимных пыльцевых трубок, а при высоких концентрациях ингибировали и рост легитимных пыльцевых трубок. При низких концентрациях рост легитимных пыльцевых трубок стимулировался.

Таким образом, в ходе прогамной фазы оплодотворения с агглютинирующими белками пестиков примулы происходят определенные превращения, которые выявляются в изменении их способности ингибироваться простыми сахарами, изменении профиля элюции при гель-хроматографии в таких, как изменение аминокислотного состава белков и изменение характера их влияния на рост пыльцевых трубок. Отмеченные процессы нельзя отнести к категории случайных явлений.

Совершенно очевидно, что реакция гемагглютинации, сыгравшая такую важную роль в исследовании лектинов, в природных условиях никогда не реализуется. В эксперименте при участии лектинов форменные элементы крови и другие клетки, а также макромолекулы, группируются в физиологически неактивные конгломераты. Возникает вопрос, не является ли способность лектинов вызывать гемагглютинацию, свойственную этому классу гетерополимеров, проявлением их функциональной роли — способности участвовать в организации физиологически активных надмолекулярных и субклеточных структур, когда упорядоченное целое характеризуется большими возможностями, чем сумма составляющих.

Одним из достижений молекулярной биологии является понимание, что многие биополимеры, которых считали растворимыми и потому обособленными, в действительности образуют строго упорядоченные системы, надмолекулярные комплексы, и это является необходимым условием их биологической активности.

Белки, состоящие из субъединиц, могут обладать сложной иерархической организацией. Ферменты объединяются друг с другом в метаболические ансамбли. Отдельные ферментативные реакции формируют согласованное функциональное целое. В свою очередь, многие ферменты, представляющие собой сложные многокомпонентные системы, связаны в комплексы с плазматическими мембранами пластид, митохондрий и др.

О природе межмолекулярных взаимодействий, обуславливающих надмолекулярную организацию биополимеров, известно очень мало. Нами выдвигается гипотеза, что в организации пространственной организации молекул и надмолекулярных структур, связанных с выполнением их функций, участвуют лектины, и в этом заключается их универсальная роль в жизнедеятельности клетки. Возможно, что лектины, биополимеры и субклеточные структуры имеют в своем составе унифицированные элементы сборки, при помощи которых объединяются в надмолекулярные комплексы.

Лектины по-видимому участвуют и в построении мембран и стенки пыльцевой трубки, структура которых, возможно, программируется мембраной интины. Лектины могут обеспечивать контакт и взаимодействие пузырьков аппарата Гольджи с мем-

браной пыльцевой трубки в зоне роста. Формально эти процессы напоминают реакцию гемагглютинации при участии лектинов, но отличаются от нее тем, что конечным результатом является не конгломерат клеток, а специализированная функционально активная структура. Следует подчеркнуть, что лектины являются носителями ионов Ca^{2+} , роль которых в создании внутримолекулярных, межмолекулярных и межклеточных контактов необычайно велика.

В соответствии с развиваемыми здесь представлениями распознавание при участии лектинов в процессах взаимодействия пыльцы и пестика заключается, очевидно, в обеспечении пространственной ориентации и функционального объединения компонентов растущей пыльцевой трубки и метаболитов пестика.

ЛЕКТИН ПЫЛЬЦЫ ТАБАКА: СЕКРЕТОРНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ В ПРОЦЕССЕ РОСТА ПЫЛЬЦЕВЫХ ТРУБОК И ЕГО РЕГУЛЯЦИЯ

К. В. Ильченко

Институт ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, г. Киев

Наличие лектинов в генеративных органах было показано у целого ряда покрытосеменных /1, 2/. Обнаруженные в этих работах количественные изменения лектинсодержащих фракций и их углеводной специфичности при легитимном и иллегитимном опылении у примулы позволили предположить, что лектины играют существенную роль в контроле опыления у растений, вовлекаясь во взаимодействие между пыльцой и пестиком /1/.

Вместе с тем хорошо известно, что у некоторых видов, в частности у табака, в критических этапах такого взаимодействия участвуют растущие пыльцевые трубки. Чтобы говорить об участии лектинов в контроле роста пыльцевых трубок табака, следовало доказать их наличие в составе пыльцы, выявить пути вовлечения лектина во взаимодействие с пестиком и определить возможные способы регуляции этих метаболических путей.

Работа проводилась на примере пыльцы двух видов табака: *Nicotiana glauca* Link et Otto и *N. tabacum* L. Все операции с пыльцой и пыльцевыми трубками проводили как было описано ранее /4/. Условия экстрагирования лектина были подобраны экспериментально. Экстрагирующая смесь содержала трис-глицино-

вый буфер, рН 8,3, 0,2% аскорбиновой кислоты, 1% поливинилпирролидона, 2% 2-мекаптоэтанола. Белок определяли по методу Брэдфорда /5/. Все операции с кровью и постановка иммунологических реакций осуществлялись по общепринятой методике /3/.

Тестирование сырых экстрактов пыльцы с помощью реакции гемагглютинации позволило обнаружить лектиновую активность в их составе. Лектиновая активность обнаруживалась в осадке после высаливания белков сульфатом аммония, что свидетельствует о белковой природе ее носителя. Определены некоторые свойства лектина:

- он не терял активности после экспозиции в течение 30 мин при 65⁰С,
- специфично агглютинировал эритроциты голубя и человека, а также паппинизированные эритроциты курицы;
- специфичность лектина к углеводам в результате испытания 8 моно- и 3 дисахаридов установить не удалось;
- внеклеточные белки пыльцы не содержат лектина, что свидетельствует о его локализации в цитоплазме вегетативной клетки.

Вместе с тем, в ходе роста пыльцевых трубок *in vitro* лектин определялся в составе культуральной среды, что свидетельствует о его секреторном выделении. Как абсолютная, так и удельная активность секретированного лектина увеличивались в ходе роста пыльцевых трубок (рисунки 1, 2). Значение удельной активности тотального препарата лектина, полученного из зрелой, непроросшей пыльцы составляло 71 ед/мг белка для пыльцы *N.alata* и 167 ед/мг - для *N.tabacum*, а через 24 ч роста пыльцевых трубок активность секретированного лектина достигала в случае *N.alata* 250 ед/мг, а в случае *N.tabacum* 715 ед/мг, что, соответственно, в 3,5 и 4,3 раза выше, чем в сухой пыльце (рисунок 2). Сравнивая эти данные, можно отметить, что возрастание удельной активности лектина связано скорее с возрастанием его абсолютной активности, чем со снижением количества суммарного секретированного белка. По-видимому, в ходе роста пыльцевых трубок происходит постоянное выделение дополнительных порций лектина.

Для выяснения механизмов регуляции секреции лектина определялась зависимость этого процесса от содержания внекле-

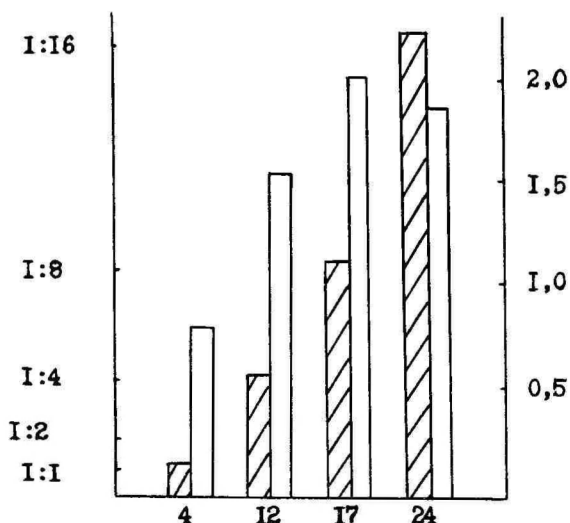


Рис. 1. Динамика секреции суммарного белка и лектина в ходе роста пыльцевых трубок
 ▨ - титр РГА □ - содержание белка в культуральной среде, мг/мл

точного кальция в среде роста пыльцевых трубок, а также эффект некоторых других веществ, модулирующих секрецию белков у животных. При изменении содержания внеклеточного кальция в интервале от 10^{-8} М до 10^{-2} М (таблица I) обнаружено, что абсолютная активность выделенного лектина изменяется незначительно, за исключением вариантов с низким (10^{-8} – 10^{-7} М) содержанием внеклеточного Ca^{2+} . Введение в культуральную среду ионофора X-537A показало, что воздействие внеклеточного кальция на секреторный процесс опосредуется путем воздействия его на внутриклеточный пул Ca^{2+} .

Удельная активность секретируемого лектина изменяется в более широких пределах. Наиболее высокое ее значение зарегистрировано при 10^{-5} М внеклеточного кальция. Однако учи-

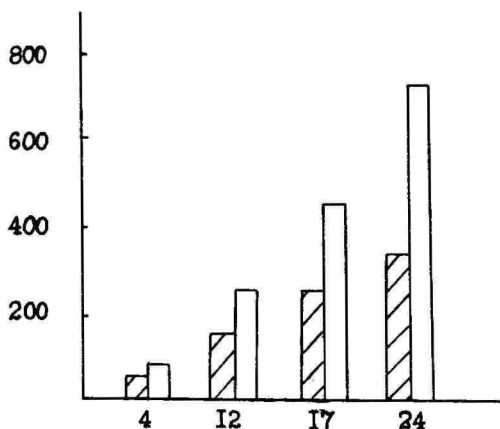


Рис. 2. Изменение удельной активности секретированного лектина ед/мг белка

▨ - *N.alata*

□ - *N.tabacum*

Таблица I

Влияние ионов Ca^{2+} на секрецию лектина
пыльцевыми трубками

Концентрация кальция и способ ее создания	Активность лектина	
	абсолютная	удельная
I	2	3
Са-ЭГТА буфер + ионофор X-537A		
$10^{-2}M$	I:4	73,5
$10^{-3}M$	I:8	113,6
$10^{-4}M$	I:16	200,0
$10^{-5}M$	I:8	581,4
$10^{-6}M$	I:4	240,4
$10^{-7}M$	I:4	142,8
$10^{-8}M$	I:1	14,5
Са-ЭГТА буфер без ионофора		
$10^{-8}M$	I:2	45,5

Продолжение табл. I

I	2	3
$10^{-7}M$	1:2	100,0
$10^{-6}M$	1:4	208,3
$10^{-5}M$	1:8	526,3
без буфера		
$10^{-8}M$	1:8	140,8
$10^{-7}M$	1:8	160,0
$10^{-6}M$	1:16	297,6
$10^{-5}M$	1:16	240,0
$10^{-4}M$	1:8	200,0
$10^{-3}M$	1:8	163,3
$10^{-2}C$	1:8	333,3

тывая результаты определения абсолютной активности, можно заключить, что изменение удельной активности в большей степени определяется изменением количества секретированного суммарного белка, но не специфической активности лектина. По-видимому секреция лектина ингибируется при низких концентрациях Ca^{2+} , а увеличение его содержания выше $10^{-6}M$ происходит Ca-независимым способом.

В результате изучения влияния на секрецию лектина других модуляторов получены сходные результаты: удельная активность лектина изменяется сильнее, чем абсолютная, изменение удельной активности в большей степени определяется изменением секреции суммарного белка (таблица 2).

Таблица 2

Влияние модуляторов секреции на выделение лектина растущими пыльцевыми трубками

Тестируемое вещество	Активность лектина	
	абсолютная	удельная
I	2	3
Контроль	1:32	166,7

Продолжение табл. 2

I	2	3
Толбутамид	I:4	50,0
Нитроглицерин	I:16	43,5
Нитроглицерин + толбутамид	I:64	250,0
Фторид натрия	I:1	2,5
Фторид натрия + толбутамид	I:16	500,0
Ионофор X-537A	I:2	6,2
Ионофор X-537A + толбутамид	I:8	166,7
Теофиллин	I:4	100,0
Теофиллин + толбутамид	I:8	33,3
Папаверин	I:8	166,7
Папаверин + толбутамид	I:16	200,0
АТФ	I:4	83,3
АТФ + толбутамид	I:4	55,5
АМФ	I:1	4,1
АМФ + толбутамид	I:2	50,0

Активация секреции белка приводит, как правило, к снижению удельной и очень часто – абсолютной активности лектина. Введение в такую систему толбутамида для снятия эффекта модулятора приводит к увеличению как абсолютной, так и удельной активности лектина. При подавлении секреции белков метилксантинами абсолютная активность лектина всегда выше в присутствии толбутамида, чем без него.

По-видимому, секреция лектина пыльцевыми трубками осуществляется независимым, конститутивным путем, или даже стимулируется толбутамидом. Конститутивность секреции лектина указывает на важную роль этого белка и его выделения при осуществлении роста пыльцевых трубок. Секреция представляет собой удобный путь введения лектина во взаимодействие пыльцевых трубок и пестика.

Л и т е р а т у р а :

Г. Гольнская Е.Л.; Башкирова Н.В. Томчук Н.Н. // Физиол. раст. – 1976. – Т. 23. – № 1. – С. 88.

2. Гольнская Е.Л. // Молек. биол. - Киев, 1979. - № 23. - С. 34.

3. Луцик М.Д., Панасюк Е.М., Антоноук В.А., Луцик А.Д. Методы поиска лектинов (фитогемагглютининов) и определения их иммунохимической специфичности. - Львов: Изд-во Львовского мединститута, 1980. - 20 с.

4. Шпилевая С.П., Ильченко К.В. // Докл. АН УССР. Сер. Б. - 1984. - № 8. - С. 78.

5. Bradford M. // Anal. Biochem. - 1976. - Vol. 72. - N 1 - 2. - P. 248.

ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА ИЗ СЕМЯН СОИ НА СТРУКТУРУ И ЭНЕРГО- ТРАНСФОРМИРУЮЩИЕ РЕАКЦИИ ХЛОРОПЛАСТОВ

И.М. Жесткова, Ю.Г. Молотковский

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева АН СССР

Экзогенные лектины способны индуцировать или модифицировать ряд процессов, осуществляемых на мембранах различного типа вызывать изменения структурной организации мембран. Исследование таких эффектов служит в настоящее время продуктивным способом получения информации, необходимой для создания концепции физиологической роли лектинов.

Становится все более очевидным, что исследование мембранного уровня действия не может ограничиваться рамками плазматической мембраны, поскольку как гликоконъюгаты, так и лектины обнаружены в мембранах большинства органелл. Это предполагает функционирование в них эндогенной лектин-рецепторной системы. Вместе с тем, внутриклеточные мембраны еще не стали объектом систематического изучения.

Хлоропласты, согласно публикациям последнего времени /2, 4/, обладают компетентностью к галактозоспецифическим лектинам. При экзогенном действии на мембраны оболочки и тилакоидов они вызывают аналогичные другим типам мембран эффекты - агглютинацию, изменение жидкостности липидного бислоя и, по косвенным данным, модифицируют работу систем, ответственных за процесс трансформации энергии света. Это допускает возможность регулирования лектинами функциональной

активности хлоропластов. В настоящей работе изложены результаты исследований влияния лектина из семян сои на светозависимые реакции хлоропластов.

Работа выполнена на хлоропластах без оболочки, выделенных из листьев бобов по стандартной методике /1/. Лектин экстрагирован из муки семян сои с последующей очисткой аффинной хроматографией и лиофилизацией выделенного белка. При электрофорезе препарат обнаруживал одну диффузную полосу. Агглютинирующая активность, тестированная на 2% суспензии трипсинизированных эритроцитов кролика в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,2 составляла < 0,15 мкг/мл. По собственным и литературным данным /3/, лектин специфически связывается с остатками N-ацетилгалактозамина и галактозы. Белок насыщен по центрам связывания Ca^{2+} и Mg^{2+} .

На рисунке I показана зависимость скорости фотофосфорилирования изолированных хлоропластов от концентрации лектина. Максимальное ингибирование наблюдалось при концентрации 100 мкг/мл, дальнейшее увеличение не изменяло достигнутого эффекта.

Предварительная инкубация с галактозой как конкурентным углеводом предотвращала ингибирующее влияние лектина на фотофосфорилирование. Это подтверждает, что его ингибирование определяется взаимодействием лектина с углеводными остатками на поверхности тилакоидов.

Эффективность действия лектина в гипотонической среде оказалась заметно выше в сравнении со средой, оптимальной для функционирования хлоропластов. Несомненно, это связано с увеличением доступности лектин-связывающих компонентов в результате перехода мембран в набухшее состояние.

Значимых величин ингибирование достигало лишь после достаточно продолжительного выдерживания хлоропластов с лигандом (рисунок 2). Еще более медленно развивалась агглютинация хлоропластов. Первые признаки образования конгломератов визуально наблюдались через 2-2,5 часа. Маловероятно поэтому, что подавление фосфорилирования явилось следствием адгезионных взаимодействий тилакоидных мембран.

Сопоставимую с выделенным лектином способность ингибировать фосфорилирование и агглютинировать хлоропласты обна-

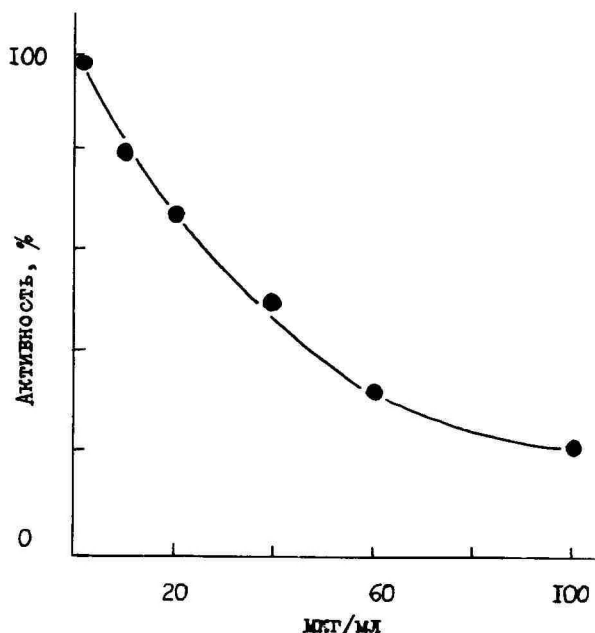


Рис. 1. Зависимость скорости синтеза АТФ от концентрации лектина. Хлоропласты инкубированы с лектином 15 мин. Кофактор транспорта электронов - феназинметасульфат. 100% активности соответствует 495 мкмоль АТФ · мг хлорофилла⁻¹ · час⁻¹

ружили и другие специфичные к галактозилам лектины, в том числе ризин, лектин фасоли обыкновенной и арахиса. Эти результаты представляются важными с точки зрения универсальности действия углеводсвязывающих белков.

Прединкубация хлоропластов с лектином в темноте в течение 15 мин замедляла скорость реакции Хилла, определяемой по восстановлению феррицианида в среде, не содержащей фосфатацепторной системы (таблица 1).

Ингибирование носило выраженную концентрационную зависи-

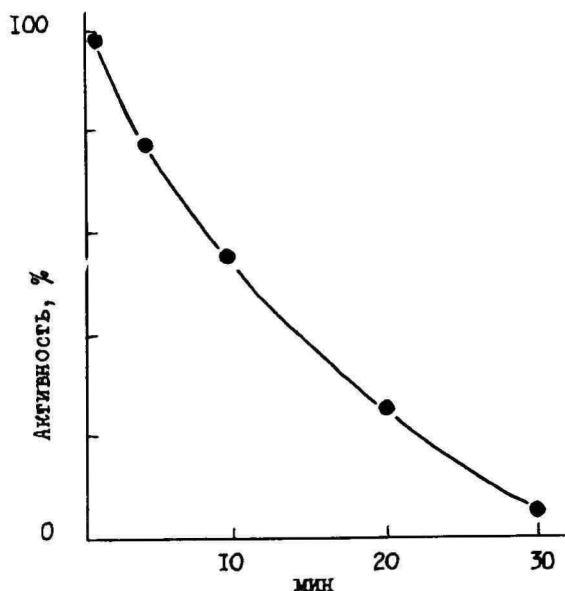


Рис. 2. Временная зависимость действия лектина на фотофосфорилирование. На оси абсцисс время инкубации хлоропластов с лектином (60 мкг/мл). 100% активности соответствует $410 \text{ мкмоль АТФ} \cdot \text{мг хлорофилл}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$

Таблица I

Действие лектина на реакцию Хилла (мкмоль восстановл. феррицианида $\cdot \text{мг хлорофилла}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$)

В а р и а н т	- FCCP %		+5 мкМ FCCP %	
-Лектин	117	100	314	-100
+Лектин 12 мкг/мл	103	88	88	28
+Лектин 30 мкг/мл	67	57	16	5

мость. Обнаружено, что степень ингибирования резко увеличилась при дезэнергизации мембран внесением в среду прото-

нофора фторкарбонилцианидфенилгидразона (FCCP) (таблица 1). Аналогичные результаты получены с хлоропластиками, предварительно обработанными ЭДТА, что открывает в мембранах канал свободной диффузии H^+ . Усиление ингибирующего влияния лектина на транспорт электронов в дезэнергизированных хлоропластах пока не поддается рациональному объяснению.

Уникальной особенностью тилакоидных мембран является количественное преобладание галактолипидов. Логично допустить, что галактолипиды наделены функцией мембранных рецепторов, и обнаруженные нами эффекты, полностью или частично, есть результат их взаимодействия с лектином.

С помощью липофильного флуоресцентного зонда дифенилгексатриена изучено состояние липидного бислоя мембран после воздействия на них лектина. Обнаружено, что величина поляризации флуоресценции встроенного в мембраны дифенилгексатриена увеличивается под влиянием лектина в пределах 19% (таблица 2).

Таблица 2

Поляризация флуоресценции (P) дифенилгексатриена
в хлоропластах под действием лектина

Вариант	P	P	Возбуждение при 360 нм, флуоресценция при 460 нм. Инкубирование хлоропластов с лектином (60 мкг/ мл) в течение 15 мин.
-лектин	0,26±0,02		
+лектин	0,31±0,02	0,05	

Повышение поляризации флуоресценции липофильного зонда в данном случае свидетельствует о более плотной упаковке липидов в бислое под влиянием лектина и уменьшении их ротационно-вращательной подвижности. Наблюдаемый масштаб изменений дает возможность предположить локальные изменения организации липидного бислоя.

В принципе возможны два варианта механизмов наблюдаемого явления: связывание лектина с галактолипидами, либо с компонентами электронтранспортной цепи гликопротеидной природы, что сказывается на подвижности липидов в анулярном слое.

Приведенные данные позволяют отнести лектины, по крайней мере специфичные к галактозе, к числу природных модификаторов функциональной активности хлоропластов. Кроме того, они указывают на возможность существования в тилакоидных мембранах специфических рецепторов, углеводный компонент которых несет галактозу, и допускают существование эндогенных лектинов, способных связываться с детерминантной группой таких рецепторов. Возникновение лектин-рецепторного комплекса может служить способом регулирования транспорта электронов и фотосинтеза в целом.

Л и т е р а т у р а:

1. Жесткова И.М., Молотковский Ю.Г. // Физиол. раст. - 1984. - Т. 31. № 1. С. 90-97.
2. Goltzev V., Kantcheva M., Doltchinkova V., Kovatchev D. // Cell Electrophor. Proc. Int. Meet., Rostock, Sept. 24-28. - Berlin, New York, 1985. - P. 691-696.
3. Lis H., Joubert Fr.J., Sharon N. // Phytochemistry. - 1985. - Vol. 24. - P. 2803-2809.
4. Nandy P., Dattachoudhury M., Chakrabarti P. // Proc. Indian Acad. Sci. - Vol. 59. - N 6. - P. 437-440.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНКАВАЛИНА А ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ ГОРОХА

Л.В. Косенко, М.А. Пацева, В.М. Лахтин
Институт микробиологии и вирусологии
им. Д.К. Заболотного АН УССР

Участие полисахаридов *Rhizobium* в процессах формирования бобово-ризобияльного симбиоза предполагает наличие у близкородственных штаммов бактерий индивидуальных особенностей полисахаридного комплекса, определяющих симбиотические свойства микросимбионтов. Ранее мы показали, что экзополисахариды (ЭПС) пяти штаммов клубеньковых бактерий (кл.б.) гороха имеют одинаковый моносахаридный состав /1/. В них

обнаружены глюкоза, галактоза, глюкуроновая и пировиноградная кислоты, что подтверждает данные литературы о сходстве ЭПС *Rhizobium leguminosarum* не только между собой, но и с ЭПС *R. trifolii* и *R. phaseoli* /3/, а также нерегулярные компоненты: манноза и неидентифицированный липофильный сахар ($X_{\text{Трам}} = 0,82$), содержание которых варьировало от штамма к штамму. При этом были установлены коррелятивные зависимости: прямая - между количеством маннозы в полисахаридах и такими симбиотическими свойствами клубеньковых бактерий, как эффektivность ($r = +0,89$) и азотфиксирующая активность ($r = +0,80$), обратная - по отношению к вирулентности ($r = -0,73$) и конкурентоспособности ($r = -0,94$). Это указывало на возможную сигнальную роль маннозы в системе углеводов-белкового "узнавания" растений-хозяев и их микропартнеров. Поскольку от количественного содержания маннозы в экзополисахаридах зависит проявление симбиотических свойств бактерий, то можно предположить, что манноза влияет на лектинсвязывающую способность ЭПС. Однако при изучении активности взаимодействия лектина гороха с ЭПС изучаемых бактерий четких результатов по ингибирующей активности ЭПС в связи с присутствием в них маннозы обнаружено не было. Это можно объяснить тем, что кооперирование симбиотических партнеров - процесс многоплановый, в котором функционирование их углеводов-белковой системы рекогниции обеспечивается взаимодействием многих химических факторов, суммарное влияние которых маскирует вклад маннозы в лектин-рецепторные взаимосвязи симбионтов.

Для выявления индивидуальной роли маннозы в лектинсвязывающей способности ризобияльных полисахаридов использовали конканавалин А (Кон А), который, как известно, проявляет значительную структурную аналогию с лектином гороха, одинаковую с ним специфичность, но более дифференцированно "отличает" маннозу от глюкозы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали пять штаммов *Rhizobium leguminosarum*, полученных из Всесоюзной коллекции.

ЭПС получали из освобожденной от клеток бактерий культуральной жидкости путем осаждения серноокислым аммонием (50%

насыщения). Лектин экстрагировали из муки семян гороха 0,9%, NaCl, очищали аффинной хроматографией с использованием сефадекса Г-100 /2/. Активность взаимодействия ЭПС с лектинами определяли реакцией подавления гемагглютинирующей активности лектинов (РПГА). Результаты выражали в процентах.

Лектин-аффинную хроматографию проводили на колонках (6,5 x 0,5 см), заполненных сефарозой 4В-Кон А (опыт) и сефарозой 4В (контроль), уравновешенных трис-буфером, рН 7,2. Элюировали тем же буфером. Объем проб составлял 0,05 мл. Содержание углеводов в пробах определяли по реакции с фенолом и серной кислотой /4/. Моносахаридный состав фракций устанавливали методом газожидкостной хроматографии в виде пентаацетатов полиолов, условия проведения ГЖХ описаны в /2/.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении активности взаимодействия ЭПС с Кон А в растворимой форме (проведение РПГА в планшетах) показано, что наиболее сильными ингибиторами гемагглютинирующей активности Кон А являются экзополисахариды, содержащие большие количества маннозы. Кон А-связывающая способность ЭПС, расположенных по убыванию содержания в них маннозы: 3,7% (шт. 2526), 1,6-1,3% (шт. 2406 и 250а), 0,5-0,3% (шт. 2496 и 2485), составляла соответственно 37, 28-22 и 14-12%. Это позволяло предположить, что манноза, либо являющаяся структурным компонентом ЭПС, либо входящая в состав полисахаридного комплекса, может усиливать активность взаимодействия ЭПС клубеньковых бактерий гороха с маннозоспецифичными лектинами. Для подтверждения этого мы проводили лектин-аффинную хроматографию исследуемых экзополисахаридов с использованием Кон А, иммобилизованного на сефарозе 4В. При проведении обычной гель-хроматографии на сефарозе 4В, работающей как молекулярное сито, было показано, что ЭПС всех изучаемых штаммов гетерогенны или полидисперсны, что видно из элюционных профилей, представленных на рисунке. В состав полисахаридного комплекса входит не менее двух-четырех компонентов. Вместе с тем элюционные профили ЭПС всех пяти штаммов очень сходны между собой. Поведение этих же гликополимеров в условиях проведения лектин-аффинной хроматографии (сефароза

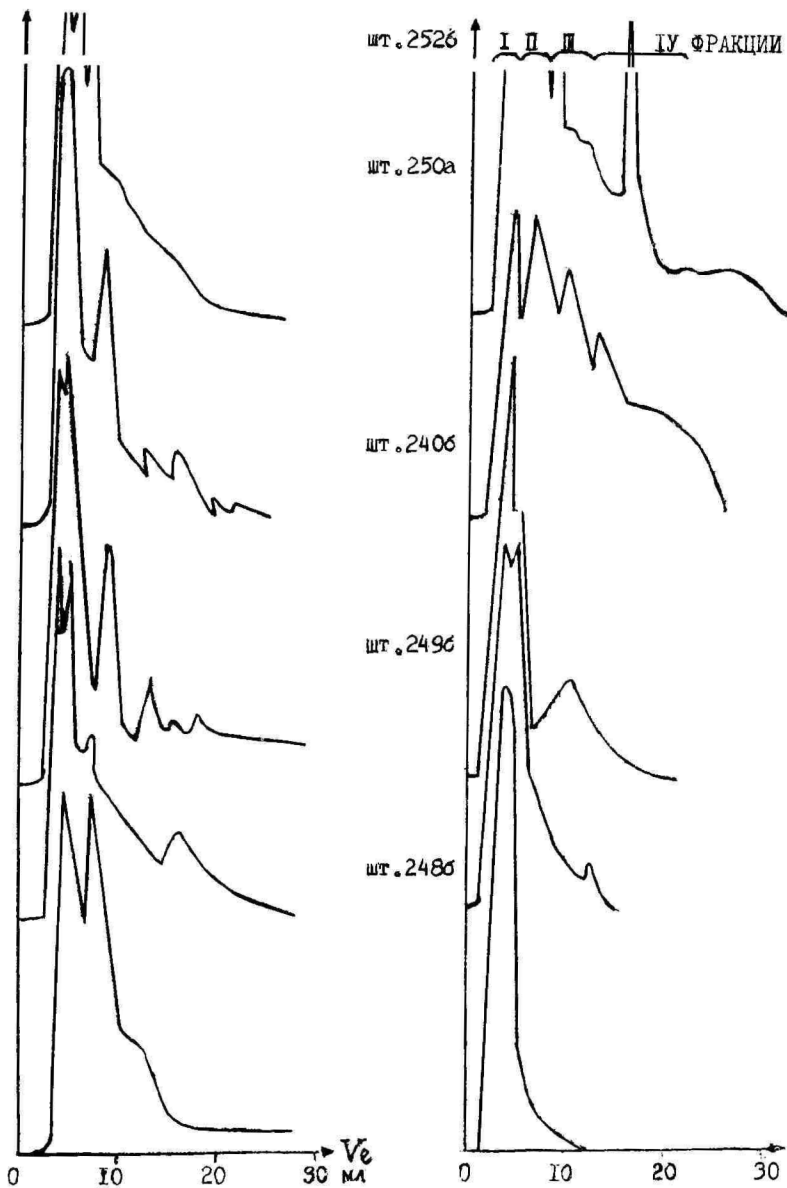


Рис. Лектин-аффинная хроматография ЭПС клубеньковых бактерий гороха (колонка 6,5x0,5 см):
 А - сефароза 4В; сефароза 4В-Кон А

4В-Кон А) изменяется в зависимости от содержания в них маннозы. Это особенно заметно при сравнении ЭПС штаммов 2526 и 2486, содержащих 3,7 и 0,3% маннозы, соответственно. Аффинная задержка выхода ЭПС с колонки была наибольшей для ЭПС, содержащих большее количество маннозы: объем элюции ЭПС по мере уменьшения в них маннозы составляет 30, 25, 17, 13 и 10 мл.

Для решения вопроса, являются ли экзополисахариды кл.б. гороха гетерогенными или полидисперсными, что вообще характерно для бактериальных полисахаридов, мы изучали моносахаридный состав четырех фракций, выделенных из ЭПС шт. 2526 на колонке сефароза 4В-Кон А. Результаты представлены в таблице.

Таблица

Моносахаридный состав фракций ЭПС R.
leguminosarum 2526 (% от суммы сахаров)

Фракции объем элюции	Глю- коза	Галак- тоза	Ман- ноза	Неиденти- фицирован- ный сахар X	Соотношения глюкозы:галакто- зы:маннозы: X
0-4,0	76,3	21,3	1,3	1,1	4:1:0,05:0,05
44,0-7,5	73,5	18,8	2,2	5,5	4:2:0,1:0,3
7,5-13,5	73,3	17,5	2,8	6,4	4:1:0,2:0,4
13,5-23,0	68,0	8,2	8,8	15,4	8:1:1:2

Примечание: Вследствие малого количества материала содержание глюкуроновой и пировиноградной кислот не определяли.

Полученные данные однозначно указывают на существование в полисахаридном комплексе ЭПС, по крайней мере, двух индивидуальных полисахаридов. Первые три фракции очень сходны между собой и, по нашему мнению, представляют полидисперсный материал с характерным для ЭПС кл.б. гороха составом. IV фракция содержит основное количество маннозы и неидентифицированного сахара X. Присутствие этих сахаров в небольших количествах в I-III фракциях, возможно, является результатом их загрязнений IV фракцией.

Установление присутствия маннозосодержащего компонента в полисахаридном комплексе ЭПС кл.б. гороха представляет интерес в связи с существованием ризобияльного маннозо-, но не глюкозоспецифичного /5/ лектина, обнаруженного нами у всех пяти изучаемых штаммов, различающихся по проявлению его активности в зависимости от симбиотических свойств бактерий, и свидетельствуют о сложном характере лектин-углеводных взаимосвязей симбионтов. Проведенные исследования демонстрируют возможность использования конканавалина А, как и других лектинов, для изучения функциональных детерминант углеводсодержащих полимеров, а также возможности лектин-аффинной хроматографии для разделения гликополимеров.

Л и т е р а т у р а:

1. Дубовенко М.А., Косенко Л.В. //Микроорганизмы в сельском хозяйстве: Тезисы докл. III Всес. науч. конф. - М., 1986. - С. 104.

2. Ковалевская Т.М., Косенко Л.В., Захарова И.Я. - Микробиология, 1985. - Т. 53. - Вып. 5. - С. 810.

3. Луцик М.Д. - Биохимия, 1974. - Т. 39. - Вып. 4. - С. 811.

4. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. // Anal. Chem. - 1956. - Vol. 28. - N 3. - P. 350.

5. Kijne J.W., Schaaf van der I.A.M., Diaz C.L. et al. - Lectins: Biology, biochemistry, clinical biochemistry. Berlin, New York, Walter de Gruyter, 1983. - Vol. 3. - P. 521.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКТИНОВ ЛЮПИНА С ЦЕЛЬЮ ВЫЯСНЕНИЯ ИХ УЧАСТИЯ В СИСТЕМЕ БОБОВЫЕ РАСТЕНИЯ - КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ

Е.Д. Кругова, С.М. Маличенко, М.В. Стадник,
Н.И. Назаренко, Е.П. Старченков

Институт физиологии растений и генетики АН УССР, г. Киев

В процессе "узнавания" клубеньковыми бактериями бобовых растений устанавливаются межклеточные контакты и формируется

биологическая система. В такой системе, образующейся в случае совместимых видов, проявляется основное качество симбиоза – способность фиксировать молекулярный азот /1, 3/.

Предполагают, что в основе специфичности взаимодействия определенного вида ризобий со свойственным им бобовым растением может лежать способность лектина корней растения-хозяина узнавать и связывать углеводные рецепторы на поверхности клеток симбиотических бактерий /5, 6/. Лектиновая гипотеза установления контакта при формировании симбиотической системы у бобовых в настоящее время находится в центре внимания исследователей. В связи с полифункциональной ролью лектинов и особой их гипотетической функцией у бобовых, мы исследовали лектиновую активность люпина, в котором до настоящего времени эти белки не изучались, а также влияние некоторых факторов на активность фитогемагглютинаина корней люпина.

В качестве тест-системы для определения активности лектина использовали агглютинацию куриных эритроцитов. Углеводную специфичность определяли методом ингибирования лектина углеводами /4/. Лектины выделяли из муки семян и корней проростков люпина при помощи ступенчатого элюирования этанолом /2/.

Нами было установлено, что семена, корни проростков и корневые клубеньки люпина обладают гемагглютинирующей активностью. Как видно из данных таблицы I, титр лектина по РГА изменяется в зависимости от вида эритроцитов, возраста растений, степени разведения белка (таблица I). Далее была определена углеводная специфичность лектинов из семян и корней люпина по торможению интенсивности эритроагглютинации. Установлено, что фитогемагглютинины из семян и корней люпина являются галактозоспецифичными; кроме того, их активные центры комплементарны к нескольким углеводным остаткам, которые не полностью идентичны для препаратов белков из данных объектов.

Одним из доказательств лектиновой гипотезы "узнавания" симбионтов могло бы служить снижение содержания лектинов в корнях при повышении концентрации в среде ионов NO_3^- и NH_4^+ , угнетающих образование клубеньков. В связи с этим мы провели ряд опытов, в которых исследовали действие высоких доз азота

и инокуляции клубеньковыми бактериями на содержание растворимых лектинов в корнях проростков люпина.

Таблица I

Титр лектина в зависимости от объекта исследования и вида эритроцитов

Вариант опыта	Вид эритроцитов	Разведение белка	Титр лектина по РГА
Проростки люпина	0,1% взвесь эритроцитов курицы	I : 8	I : 4
	0,1% взвесь эритроцитов курицы	I : 3	I : 128
	0,2% взвесь эритроцитов барана	I : 1,5	нет агглютинации
Семена люпина	0,1% взвесь эритроцитов курицы	I : 3	I : 128
	0,1% взвесь эритроцитов человека	I : 3	I : 2
	0,1% взвесь эритроцитов человека	I : 8	I : 4
Клубеньки растений	0,1% взвесь эритроцитов курицы	I : 3	I : 64

Растения выращивали в кюветах, заполненных речным песком, куда вносили питательную смесь Гельригеля с 2,5 или 1,5 нормы азота. Контрольный вариант был без азота и инокуляции. Анализировали верхний и нижний участки корня. Было показано (таблица 2), что минеральный азот увеличивает уровень растворимых лектинов в корнях люпина на первых этапах роста растения, однако это не может служить косвенным доказательством участия лектинов в процессе узнавания клубеньковыми бактериями бобового растения, так как высокие концентрации азота ингибируют образование клубеньков. В то же время инокуляция семян люпина перед посевом клубеньковыми бактериями также увеличивает активность лектина в нижней части корня. У 3-дневных растений на фоне высокой дозы азота лектиновая активность выше в верхнем участке корня.

Таблица 2

Влияние азота и инокуляции на содержание лектина в корнях проростков люпина (Активность в 50 мкл, ЕА)

Варианты	Фракции C_2H_5OH , %	3-дневные		10-дневные	
		участки корня			
		верхний	нижний	верхний	нижний
Контроль без азота	30	4	4	16	16
	40	-	-	8	8
	50	-	4	4	8
	60	2	4	4	4
	76	4	4	16	16
1,5 нормы азота	30	64	4	4	4
	40	64	32	8	8
	50	16	16	16	32
	60	32	16	4	4
	76	8	8	16	8
Инокуляция	30	4	4	8	128
	40	+	4	16	32
	50	+	+	4	32
	60	2	4	8	16
	76	4	4	16	16
1,5 нормы азота + ино- куляция	30	4	4	4	16
	40	32	2	8	4
	50	64	4	32	8
	60	128	4	8	4
	76	128	2	2	4

Примечание: - - отсутствие активности
+ - фракция активна без разведения

Обнаружен сложный характер зависимости активности лектинов от наличия минерального азота и инокуляции, но явно проявляется стимулирующее действие инокуляции как в верхнем участке корня (зоне дальнейшего образования муфты клубень-

ков), так и в нижнем - зоне корневых волосков.

Таким образом, увеличение активности лектина в ответ на инокуляцию специфическими к данному бобовому растению клубеньковыми бактериями служит подтверждением лектиновой гипотезы распознавания партнеров при установлении симбиоза.

Л и т е р а т у р а

1. Базилинская М.В. Использование биологического азота в земледелии. Обзорная информация. ВНИИТЭИСХ. - М., 1985. - С. 56.

2. Кругова О.Д., Маліченко С.М., Гладун М.В. // Тези доповідей, У Укр. біохім: 3-е изд., част. 2. - Київ. 1987. - 31 с.

3. Линевиц Л.И. // Успехи биол. химии. - 1979. - Т. 20.- С. 71-94.

4. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. - Львов: Вища школа - 1981. - С. 149.

5. Dazzo F.B., Georges L. Truchet. Interactions of Lectins and their Saccharide Receptors in the Rhizobium // J. Membrane Biol. - 1983. - Vol. 73. - P. 1-16.

6. Dazzo F.B., Jonke W.E., Brill W.J. // Biochim. et biophys. Acta. - 1978. - Vol. 35. - N 539. - P. 276-286.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕГУЛЯЦИИ БИОСИНТЕЗА ЛЕКТИНОВ БАКТЕРИЙ РОДА *VACILLUS*

В.С. Подгорский, Э.А. Коваленко
Институт микробиологии и вирусологии
им. Д.К.Заболотного АН УССР, г. Киев

Бактериальные лектины в настоящее время вызывают пристальное внимание ученых в связи с возможностью их применения наряду с растительными, а также ввиду ряда преимуществ по сравнению с последними (они обладают высокой удельной активностью, большим разнообразием по углеводной специфичности; получение бактериальных лектинов более технологично и

т.д.). Особый интерес представляют продуцируемые в среду, так называемые лектины "свободного типа" или внеклеточные лектины, что связано с простотой их выделения и дешевизной получаемых препаратов. Об этой группе лектинов имеются лишь единичные сообщения /4, 5, 6/, данные же о физиологических особенностях роста бактерий – продуцентов внеклеточных лектинов – и закономерностях биосинтеза этих биологически активных веществ отсутствуют.

Эффективность процессов синтеза, осуществляемых бактериями, зависит прежде всего от физиологических свойств бактерий, состава питательной среды и способов ведения процесса. Обеспечив оптимальные условия глубинного культивирования продуцентов, можно достичь значительного увеличения их продуктивности. Так как синтез внеклеточных лектинов (как и цитоплазматических) регулируется окружающей средой, нами было изучено влияние внешних условий на образование этих соединений спорообразующими аэробными бактериями рода *Bacillus* (на примере представителей наиболее распространенного вида *B. subtilis*; штаммы: 605 ИМВ, 668 ИМВ, 685 ИМВ из коллекции отдела антибиотиков ИМВ АН УССР).

Определение динамики накопления лектинов в культуральной жидкости при росте продуцентов в периодическом режиме культивирования и при использовании различных биостимуляторов показало, что для каждой культуры временной промежуток синтеза лектинов ограничен поздней экспоненциальной и ранней стационарной фазами роста бактериальных штаммов /1, 2/, что является особенностью внеклеточных лектинов бацилл. Установлено также, что температура 37°C является оптимальной как для роста продуцента, так и биосинтеза лектинов (рисунок 1).

Данные представляются нам интересными, так как для лектинов, секретируемых в экспоненциальной фазе роста, непрерывное культивирование (хемостат) может обеспечить идеальные условия для достижения устойчивых уровней этих внеклеточных белков.

Для выполнения определенных функций лектины бактерий должны четко реагировать на среду, непосредственно окружающую данный микроорганизм, и, следовательно, состав питательной среды может оказывать определенное влияние на биосинтез лектинов бациллами.

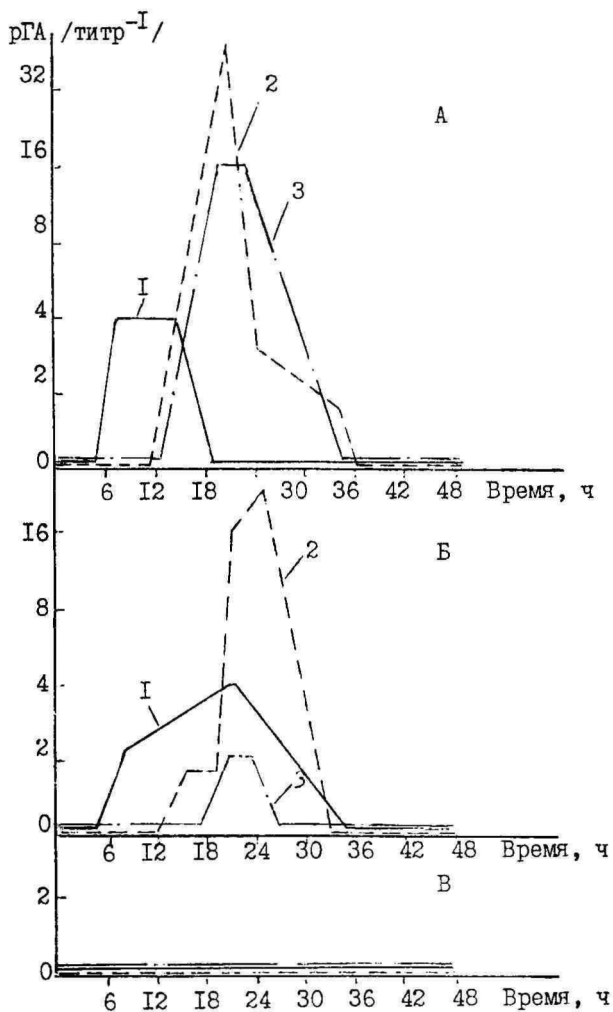


Рис. 1. Влияние температуры культивирования на динамику биосинтеза внеклеточных лектинов *B. subtilis* :

rGA - реакция гемагглютинации;

штаммы: 1 - 605 ИМВ, 2 - 668,
3 - 685 ИМВ;

температура: А - 37°C; Б - 30°C;
В - 42°C

Поскольку лектины являются углеводсвязывающими белками, необходимо было установить взаимосвязь между наличием в среде того или иного углевода и лектинпродуцирующей способностью культур, а также выяснить роль отдельных углеводов в регуляции синтеза лектинов. С этой целью глюкоза в контрольной среде Гаузе /3/ заменялась на эквивалентное количество галактозы, лактозы или фруктозы.

Отмечена существенная зависимость удельной лектиновой активности культуральной жидкости исследуемых культур от внесения в среду определенных углеводов (рисунок 2). В отдельных случаях активность увеличивалась в десятки раз (рисунок 2, В).

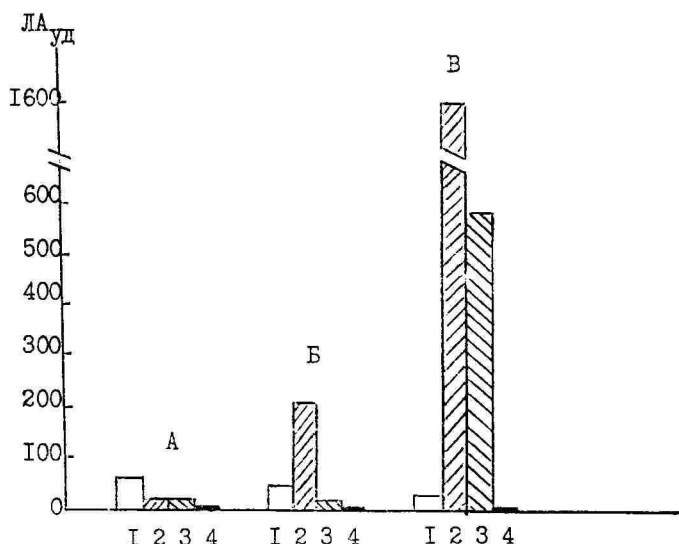


Рис. 2. Влияние различных углеводов в среде на биосинтез внеклеточных лектинов *B. subtilis*:

ЛА_{уд} - титр -I рГА/мл белка в мл культуральной жидкости;

штаммы: А - 605 ИМВ; Б - 668 ИМВ;
В - 685 ИМВ;

углеводы: 1 - глюкоза; 2 - галактоза; 3 - лактоза; 4 - фруктоза

Так как одни и те же углеводы могут выступать в качестве индукторов синтеза лектинов для одних штаммов и репрессоров для других, мы считаем, что регуляция секреции лектинов может осуществляться доступными источниками углерода.

Проведенные нами исследования являются начальным и необходимым этапом работы с бактериями – продуцентами лектинов, который позволит перейти к дальнейшей более тонкой физиологической и биохимической регуляции, а также улучшению лектинпродуцирующей способности штаммов методами генной инженерии. Для этого требуется индивидуальный подход к каждому организму с учетом знания динамики биосинтеза лектинов и влияния на этот процесс факторов внешней среды.

Л и т е р а т у р а:

1. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.А. // Микробиол. журн. – 1988. – Т. 50. – № 2. – С. 12–16.
2. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. // Киев: Наукова думка, 1982. – 278 с.
3. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова И.Б. // Киев: АН УССР, Минздрав УССР, 1983. – 49 с.
4. Das Gupta B.R., Sugijama H. // Can. J. Microbiol. – 1977. – Vol. 23. – P. 1257–1260.
5. Gilboa-Garber N. // Meth. Enzymol. – 1982. – Vol. 83. – P. 378–385.
6. Sheladia V.L., Charber J.P., Guevara J., Evans D.J. // J. Bacteriol. – 1982. – Vol. 152. – N 2. – P. 757–761.

ПРИНЦИПЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АГГЛЮТИНАЦИИ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛЕКТИНОВ НА ОСНОВЕ МЕТОДА СПЕКТРОТУРВИДИМЕТРИИ

И.Б. Жулин, С.Ю. Щеголев

Институт биохимии и физиологии растений и
микроорганизмов АН СССР, г. Саратов

Недостатками ряда известных методов исследования клеточной агглютинации являются их невысокая информативность и низкая точность (визуальное определение титра агглютинации в

лунках, микроскопия, включая цитохимические методики, фотометрия при одной длине волны света λ /10/, либо сложность методик и их приборного обеспечения (кондуктометрические и флуоресцентные счетчики частиц, лазерная фотон-корреляционная спектрометрия /1/).

В работах /2, 8/ для количественного анализа ранних стадий агглютинации, на которых примерно за 30+60 мин образуются агрегаты из нескольких частиц (максимально порядка десяти), использован метод спектротурбидиметрии /4, 7/, реализуемый на обычной спектрофотометрической аппаратуре (ФЭК, СФ, Спекорд и т.п.). При использовании традиционного варианта метода /4, 7/ для клеток с диаметром d около 1 мкм (бактерии и некоторые форменные элементы крови) или для частиц с $d \leq 0,1$ мкм (споры ряда бактерий, некоторые вирусы, рибосомы, отдельные типы липосом и мембранных везикул) погрешности определения размера и числовой концентрации частиц N достигают максимумов /6/ (порядка 30% для d и более 60% для N).

Как будет показано в данной работе, отмеченные затруднения можно устранить, если ограничить задачу корректным определением относительных изменений размера и концентрации частиц при агглютинации. При этом существенно упрощаются процедуры определения изменений d и N . В частности, отпадает необходимость в использовании специальных калибровок /4, 6, 7/ и компьютерной обработки результатов спектротурбидиметрии /7/.

Учитывая, что при агглютинации объемная концентрация клеток (субклеточных или иных частиц) остается неизменной, можно получить

$$i = N_1 / N_2 = d_2^3 / d_1^3, \quad (1)$$

где N - число частиц (например, клеток или агрегатов) в единице объема суспензии, d - диаметр сферических частиц эквивалентной монодисперсной системы со значениями N , равными числовой концентрации частиц реальной взвеси. Здесь и далее индексами "1" и "2" обозначены значения соответствующих параметров до и после агглютинации. Параметр i показыва-

ет во сколько раз уменьшается концентрация N и, кроме того, ему можно придать смысл среднего эффективного числа клеток (частиц), вошедших в состав одного агрегата /2/.

Обозначая i^* измеренное значение i (в отличие от истинного - см. ниже), получаем

$$i^* = [(2 - n_2) / (2 - n_1)]^{3/2}, \quad n < 2 \quad (2)$$

$$i^* = (D_2 / D_1)^3 / (\bar{n} - 1), \quad \bar{n} \neq 1 \quad (3)$$

где D - оптическая плотность суспензии, $n = -\Delta \lg D / \Delta \lg \lambda$, $\bar{n} = (n_1 + n_2) / 2$. Величину n определяют по результатам измерений D при нескольких значениях λ в диапазоне оптической прозрачности компонентов суспензий ($\Delta \lambda \approx 200-300$ нм)/4,7/. По формуле (3) при $\bar{n} = 4$ ($d \ll \lambda$ - рэлеевские частицы) $i^* = D_2/D_1$, при $\bar{n} = 2$ ($d \sim \lambda$) $i^* = (D_2/D_1)^3$, при $\bar{n} = 0$ ($d \gg \lambda / (\mu - \mu_0)$, где μ и μ_0 - показатели преломления частиц и окружающей их среды) $i^* = (D_1/D_2)^3$. Эффективность соотношений (2), (3) анализировали в компьютерном эксперименте, основные результаты которого приведены на рисунке 1.

По значениям D_2/D_1 , n_1 и n_2 , рассчитанным для модели оптически "мягких" сферических частиц /5/ при заранее заданных значениях i , определяли i^* , используя формулы (2), (3). Данная модель может служить хорошим приближением для описания некоторых оптических свойств суспензий агглютинирующих клеток или субклеточных частиц /9/. Сравнивая значения i^* с i , оцениваем систематическую погрешность, которая является следствием ряда допущений, принятых при выводе формул (2), (3). Заметим, что при получении соотношения (3), не накладывались принципиальные ограничения на показатель преломления, форму частиц и степень полидисперности систем (в отличие от формулы (2)), а также на геометрию измерительного устройства (о влиянии последней см. работу /9/).

Принимая во внимание, что стандартное оборудование позволяет надежно регистрировать значения $|\Delta n| \gtrsim 0,1$ и $|D_2/D_1 - 1| \gtrsim 0,03 \pm 0,05$, находим, что i^* отличается от i не более,

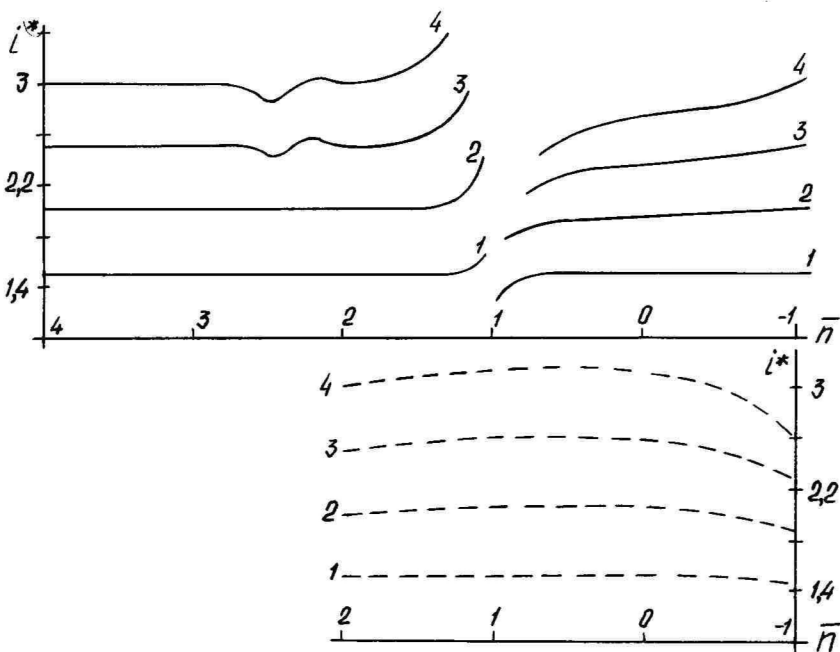


Рис. 1. Зависимость i^* от \bar{n} по формулам (3) и (2) (штрихи) при $i = 1,5$ (1), 2 (2), 2,5 (3) и 3 (4)

чем примерно на 10% при выполнении условий: $1,5 \leq i \leq 5$ при $-0,5 \leq \bar{n} \leq 1,7$ (для формулы (2)); $1,2 < i \leq 5$ при $1,6 \leq \bar{n} \leq 4$ и $1,2 \leq i \leq 2,5$ при $-1 \leq \bar{n} \leq 0,5$ (для формулы (3)). Ограничение по i сверху не является существенным, поскольку при больших значениях i временной интервал агглютинации можно разбить на последовательные отрезки с оптимальными изменениями параметров (например, с i_a^* и i_b^*) и найти значение i^* для исходного интервала по очевидному равенству $i^* = i_a^* \cdot i_b^*$). Данный прием позволяет расширить область применения формул (2), (3) по параметру \bar{n} .

Значения $\bar{n} > 2$ характерны для клеток и субклеточных

частиц с $d < 1$ мкм (некоторые бактерии и их споры, вирусы, рибосомы, липосомы и мембранные везикулы), $\bar{n} \lesssim 2 - d \gg 1$ мкм (крупные бактерии, тромбоциты и др.), $\bar{n} \approx 1 - d \approx 5-10$ мкм (эритроциты, хлоропласты, митохондрии и т.д.), $\bar{n} \approx 0 - d \gg 10$ мкм (дрожжи и т.п.). Важно, что погрешность определения i^* по формуле (3) достаточно мала вблизи значений $\bar{n} = 4$ и $\bar{n} = 2$ (см. выше).

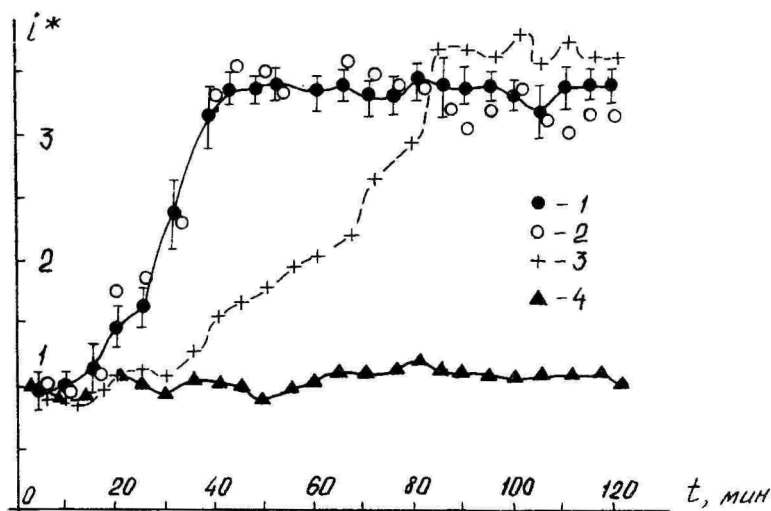


Рис. 2. Зависимость i^* от времени t при агглютинации WGA (50 мкг/мл) (1,2) и ConA (100 мкг/мл) (3) подвижных (1) и обездвиженных (2) клеток *A. brasilense* Sp 245 и *St. aureus* 209-P (3) в сравнении с контролем (*A. brasilense* Sp 245 без лектина) (4)

На рисунке 2 приведены результаты экспериментального анализа реакции агглютинации бактерий *Staphylococcus aureus* 209-P и *Azospirillum brasilense* Sp 245 под действием Con A и WGA (Pharmacia). Использовали подвижные и обездвиженные (добавление 10 мкМ карбонилцианид-хлорфенилгидразона), не лишенные жизнеспособности клетки. *A. brasilense*. Условия выра-

щивания и препарирования культур приведены в работах /3, 2/. Постановка опытов по агглютинации была аналогична описанной ранее /2/. Спектротурбидиметрию проводили на приборе СФ-26, снабженном диафрагмой для уменьшения эффекта малоуглового рассеяния света /9/.

Скорость увеличения параметра i^* для стафилококков, содержащих приблизительно по 10 клеток в исходных агрегатах, оказалась примерно вдвое ниже, чем для первоначально одиночных клеток азоспирилл. Установленное нами фактическое совпадение скоростей реакции агглютинации подвижных и обездвиженных клеток *A. brasiliense* Sp 245, вероятно, иллюстрирует отмеченную в работе /II/ способность подвижных бактерий к агрегации в естественных условиях их обитания.

Л и т е р а т у р а:

1. Ерш И.Г., Муратов Л.С., Новожилов С.Ю., Штокман Б.М., Штокман М.И. // Доклады АН СССР. - М., 1986. - Т. 287. - С. 1239.
2. Жулин И.Б., Панасенко В.И., Ступникова С.К., Щеголев С.Ю. // Биофизика, 1984. - Т. 29. - С. 857.
3. Жулин И.Б. // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Л.: Изд-во ЛГУ, 1988.
4. Кленин В.И., Щегослев С.Ю., Лаврушин В.И. Характеристические функции светорассеяния дисперсных систем. - Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1977.
5. Хюлст ван де Г. Рассеяние света малыми частицами. - М.: Изд-во иностр. лит., 1961.
6. Хлебцов Н.Г., Щеголев С.Ю., Кленин В.И., Френкель С.Я. // Оптика и спектроскопия. - 1978. - Т. 45. - С. 710.
7. Кленин В.И., Хлебцов Н.Г. Применение мини- и микро-ЭВМ при определении параметров дисперсных систем спектротурбидиметрическим методом. - Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1984.
8. Щеголев С.Ю., Семак Н.Н., Котусов В.В., Игнатов В.В. А.С. № 1251908 СССР. - 1986. Б.И. - № 31.
9. Latimer P., Wamble F. // Appl. Opt. - 1982. - Vol.21. - P. 2447.
10. Liener I.E. // Arch. Biochem. Biophys. - 1955.- Vol. 54. - P. 223.

11. Sjoblad R.D., Doetch R.N., Emala C.W. // Arch. Microbiol. - 1985. - Vol. 142. - P. 101.

ЛЕКТИНЫ КАК РЕГУЛЯТОРЫ ЗАВЯЗЫВАНИЯ ПЛОДОВ И ЭМБРИОГЕНЕЗА У ГРУШИ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ОПЫЛЕНИЯ

В.Н. Самородов, С.В. Пospelов
Сельскохозяйственный институт, г. Полтава

На значимость лектинов в прохождении эмбриональных процессов впервые обратили внимание советские ученые, сформулировав димерную гипотезу несовместимости у растений с участием фитогемагглютининов /3/.

В настоящее время роль лектинов в оплодотворении глубоко и всесторонне изучается, о чем свидетельствуют материалы международной конференции "Биотехнология и экология пыльцы", проходившей в июле 1985 года в Массачусетском университете, США /6/. Общим выводом этих работ является то, что в основе реакции самонесовместимости у цветковых растений лежит взаимодействие между лектинподобными компонентами пыльцы и рецепторами пестика-гликопротеинами.

Однако исследований по регуляции эмбриональных процессов экзогенными лектинами явно не достаточно /1-2; 4; 5/. Тем не менее данные этих работ указывают на высокую физиологическую активность лектинов и перспективность их применения в селекции, генетике, растениеводстве.

Учитывая это, мы на протяжении трех лет изучали влияние лектина пестиков кукурузы - конмаидина, на завязывание плодов и образование семян у двух сортов груши при естественном и искусственном самоопылении, а также в отсутствие опыления.

Было установлено, что конмаидин при нанесении на цветки увеличивает завязывание плодов, как в отсутствие опыления, так и при самоопылении. При этом эффект стимуляции определяется концентрацией вещества в довольно широких пределах, от 0,1 до 0,0001% (таблица 1). Это еще раз убеждает нас, что лектины имеют отношение к проявлению самонесовместимости у растений. В связи с этим важно и то, что созревшие плоды в подавляющем большинстве не содержат семян, являясь партенокарпическими. Интересно, что сходные данные по стимуляции

партекарпии были получены от воздействия лектина фасоли обыкновенной на цветки груши сорта Вильямс и мужскостерильные формы томата /5/.

Таблица I

Влияние конмаидина на завязывание плодов у груши сорта Любимица Клаппа (среднее за три года)

В а р и а н т	Созревших плодов, %	
	в отсутствие опыления	естественное самоопыление
Без обработки (контроль)	0,00	2,25
Обработка раствором конмаидина, %		
0,1	1,07	4,25
0,01	1,98	6,73
0,001	3,62	3,44
0,0001	4,67	3,92
0,00001	2,10	2,10
Естественное перекрестное опыление	2,83	2,83

Примечание: Различия существенны на I-5% уровнях значимости.

Полученные в результате действия конмаидина партенокарпические плоды по степени своего развития не уступают плодам контроля. Для максимальной стимуляции завязывания партенокарпических плодов конмаидин следует наносить дважды, с интервалом в сутки, в фазу полного цветения или начала опадения лепестков.

Полученные в наших экспериментах бессемянные плоды не столь сужены, как те, которые завязываются при действии на цветки ауксинов и гиббереллина, не имеют наростов и разрастаний в области чашечки. Подобная закономерность для бессемянных плодов груши и томата отмечалась ранее при использовании лектинов бобовых культур /5/. Это свидетельствует о различиях механизмов регуляции развития бессемянных плодов на вариантах с конмаидином и при использовании ауксинов и гиббереллина. Следует отметить и то, что конмаидин более ак-

тивен в стимуляции партенокарпии у груши, нежели кинетин и ауксины, уступая лишь гиббереллину.

У сортов, склонных к генетическому апомиксису, в отсутствие опыления конмаидин стимулировал завязывание плодов с семенами. В среднем на один плод приходилось не более двух семян. Из некоторых семян получены матроклинные сеянцы.

Описанные эффекты действия конмаидина внедрены в производство, защищены авторским свидетельством СССР.

Л и т е р а т у р а:

1. А.С. П65337 А (СССР) Способ стимулирования партенокарпии у груш - В.Н. Самородов, Е.Л. Гольнская, С.В. Поспелов, А.И. Коваль, В.А. Слепцов, В.С. Фисун. Заявл. 21.04. 1983, № 3583411; Оpubл. в Б.И., 1985, № 25; МКИ А 01 № 65/00.

2. Болелова З.А., Лесневич Л.А. Петрушина М.П. и др. // Сельхоз. биология. - 1984. - № 2. - С. 57-60.

3. Гольнская Е.Л., Глеба Ю.Ю. // II съезд Всесоюз. о-ва генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова / Москва: 31 янв. - I февр. 1972 г. / - М.: Наука, 1972. - Вып. I. - С. 48.

4. Машанов В.И., Шоферистова Е.Г. // Всесоюзное совещание по отдаленной гибридизации растений и животных (Москва, 3-5 февр. 1981 г.) М.: ВАСХНИЛ. 1981. - С. 369-370.

5. Bangerth F., Götz G., Buchloh G. // Pflanzenphysiol. - 1972. - Vol. 66. - N 4. - S. 375-377.

6. Mulcahy D.Z., Mulcahy G.B., Ottaviano E. // Biotechnology and Ecology of pollen. Springer. - New York, 1986. - 528 p.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ЛЕКТИНОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ ТЮЛЕНЯ

И.Ю. Сахаров, В.М. Лахтин

НИИ биологически активных веществ гидробионтов МЗ СССР

Щелочная фосфатаза (щелочная фосфоэстераза, № 3.1.3.1.) катализирует гидролитическое расщепление различных фосфомоноэфиров с образованием фосфат-иона и соответствующего спир-

та, фенола, липида или углевода /2, 3/. Хотя биохимическая роль щелочной фосфатазы понята не до конца, известно, что этот фермент активно участвует в процессах оссификации, транспорта фосфата, утилизации гликогена /5/.

Известно, что изоферменты щелочной фосфатазы животного происхождения являются гликопротеидами, что позволяет использовать для их идентификации и разделения иммобилизованные лектины /1, 4/. Так, для определения изоферментного состава щелочной фосфатазы тюленя нами исследовалось взаимодействие ферментного препарата с лектинами чечевицы, пшеницы и улитки. Как видно из таблицы, первые два лектина эффективно ассоциируют с молекулами щелочной фосфатазы, в то время как лектин улитки индифферентен по отношению к изучаемому ферменту. Эти данные указывают на гликопротеидный характер тюленьей фосфатазы.

Учитывая одинаковую моносахаридную специфичность лектина чечевицы и конканавалина А, мы с помощью колоночной хроматографии на иммобилизованном конканавалине А выделили изофермент, специфичный к последнему лектину (изофермент К). При этом более 60% ферментативной активности сорбируется на аффинном носителе, тогда как другая часть, не взаимодействуя с конканавалином А, сходит с колонки в свободном объеме (пик I). Нам удалось показать, что в изоферменте К щелочной фосфатазы тюленя углеводы составляют 23% молекулярной массы.

Изоферменты щелочной фосфатазы, содержащиеся в пике I, были подвергнуты дальнейшему анализу с применением лектинов гороха, пшеницы, клещевины и фасоли (таблица I). Большая часть ферментативной активности сорбируется на нерастворимом лектине пшеницы, в меньшей степени щелочная фосфатаза реагирует с лектинами гороха и клещевины, а лектин фасоли с тюленьей фосфатазой не реагирует вовсе.

На основании данных о взаимодействии фермента с лектинами, для которых характерна олигосахаридная специфичность, нами предложены следующие углеводные структуры для изоферментов щелочной фосфатазы из тонкого кишечника тюленя (рисунок I). Так, изофермент К содержит, по-видимому, углеводную последовательность типа I, связанную с остатком аспарагина белковой части молекулы фермента. К этому заключению мы при-

Таблица 1

Взаимодействие лектинов с препаратами щелочной
фосфатазы тюленя

Источник лектина	Процент сорбированного фермента	
	суммарный препарат щелочной фосфатазы	щелочная фосфа- таза (пик I)
Горох	-	44
Пшеница	75	77
Улитка	0	-
Чечевица	65	-
Клещевина	-	15
Фасоль	-	0

Таблица 2

Аминокислотный состав изофермента К щелочной
фосфатазы тюленя*

Аминокислоты	Изофермент К щелочной фосфатазы из тонкого кишечника тюленя	Щелочная фосфатаза из тонкого кишечника быка
Asp	61	61
Thr	40	37
Ser	38	24
Glu	60	53
Pro	31	30
Gly	43	45
Ala	42	60
Val	38	42
Ile	23	12
Leu	50	38
Tyr	14	20
Phe	25	15
His	27	14
Lys	35	22
Arg	22	21

* Данные рассчитаны на одну субъединицу фермента.

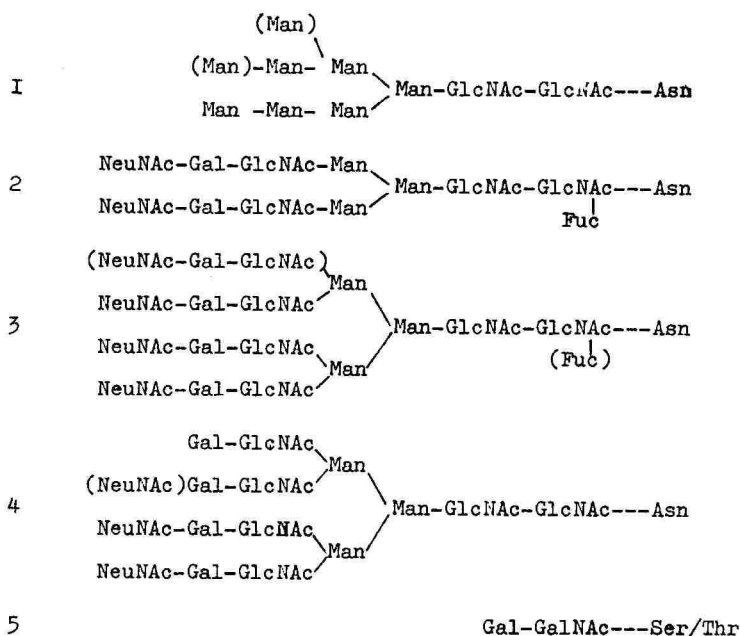


Рис. I. Предполагаемые структуры углеводной части изоферментов щелочной фосфатазы из тонкого кишечника толена:

- 1 - олигоманнозидного типа;
- 2 - комплексного типа (фукозилированные биантенные);
- 3 - комплексного типа (сиалированные три- и тетраантенные);
- 4 - комплексного типа (частично десилированные три- и тетраантенные);
- 5 - муцинового типа

шли на основании данных о его специфическом связывании с конканавалином А. Более того, в этой молекуле изофермента, которая также ассоциирует с лектином чечевицы, присутствуют олигосахариды типа 2. Наличие структур 3 и 4 в изоферментах

щелочной фосфатазы тюленя подтверждается взаимодействием с агглютинином пшеницы и лектином клешевины. По-видимому, некоторая часть из этих полиантенных структур фукозилирована, на что указывают данные, полученные с лектином семян гороха. Структуры типов 3 и 4 содержат блокированные остатки галактозы (лейкоагглютинирующая форма лектина фасоли), причем концевым остатком в этих последовательностях является N-ацетилнейраминовая кислота (лектин пшеницы). Отсутствие взаимодействия изоферментов щелочной фосфатазы с лектином улитки при наличии связывания с лектином клешевины указывает на вероятное присутствие структуры типа 5.

Таким образом, приведенные факты свидетельствуют о наличии минимум трех изоферментов щелочной фосфатазы в тонком кишечнике молодых особей (не более I месяца) тюленя. В связи с тем, что большую часть ферментативной активности в препарате щелочной фосфатазы представляет изофермент К, специфически сорбирующийся на конканавалине А, именно этот фермент и был использован в дальнейших экспериментах.

Препарат щелочной фосфатазы, элюированный с конканавалин А-сефарозы, имеет удельную активность, равную 1500 единиц на мг белка. В электрофорезе в денатурирующих условиях молекулярный вес равен 70000, в то время как в градиентном электрофорезе в отсутствие денатурирующих воздействий молекулярный вес фермента - 260000.

Для изучаемого изофермента К щелочной фосфатазы тюленя был определен аминокислотный состав. Изофермент К содержит значительное количество отрицательно заряженных аминокислот, что и обуславливает, по-видимому, слабокислый характер молекулы (рН = 5,5). Сравнение аминокислотного состава изофермента К с составом щелочной фосфатазы из тонкого кишечника быка показало, что данные молекулы весьма схожи между собой. Однако следует отметить более низкое содержание в тюленьей фосфатазе остатков тирозина и аланина при одновременном обогащении, хотя и незначительном, серином, изолейцином, лейцином, фенилаланином, гистидином и лизином. В дальнейшем нами планируется детальное изучение молекулярных и каталитических свойств изофермента К щелочной фосфатазы тюленя и, в частности, определение последовательностей O- и N-связанных углеводных цепей выделенного изофермента.

Л и т е р а т у р а:

1. Лахтин В.М. // Биотехнология, 1985. - Т. I. - № 5. - С. II-27.
2. Ehle H., Muller E., Horn A. // FEBS Letters.- 1985. - Vol. 183. - N 2. - P. 413-416.
3. Fernby H.N. // The Enzymes (Boyer D., ed.).- 1971. - Vol. 4. - P. 417-447.
4. McComb R.B., Bowers G. N., Posen S. // Alkaline Phosphatase, Plenum Press. - New York, 1979.
5. Whitby L.G., Moss D.W. // Clin. et chim. acta. - 1975. - Vol. 59. - N 2. - P. 361-367.

МЕЧЕННЫЕ ЛЕКТИНЫ В ИЗУЧЕНИИ ПОВЕРХНОСТИ РАЗВИВАЮЩИХСЯ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Г.Г. Скибо, Л.М. Коваль, М.Д. Луцик, Н.И. Кононенко
Институт физиологии им. А.А. Богомольца АН УССР, г Киев
Институт биохимии им. А.В. Палладина АН УССР, г. Львов

Процессы клеточной дифференцировки имеют основополагающее значение в понимании нормального органогенеза и эмбрионального созревания. Значительное место в этих процессах отводится межклеточным взаимоотношениям, главная роль в которых принадлежит поверхностной мембране. В связи с этим для определения некоторых факторов, участвующих в дифференцировке нервной ткани, необходимо знание структурных компонентов мембран нервных клеток в процессе их развития у функционально различных типов нервных и глиальных клеток, сопровождающих процесс дифференцировки. Согласно современным представлениям, в качестве структур, участвующих в процессах узнавания, адгезии и дифференцировки выступают гликопротеиды и гликолипиды плазматической мембраны, часто объединяемые единым термином "гликоконъюгаты" /3/.

В настоящей работе приводятся результаты исследования углеводных компонентов поверхности развивающихся функционально отличных нервных и глиальных клеток с помощью лектинов, маркированных электронноплотной меткой (коллоидным золотом).

В качестве модельной системы были использованы монослойные культуры диссоциированных клеток спинного мозга и спинальных ганглиев, позволяющих иметь неповрежденную, легко доступную для реагентов поверхность мембраны нейронов на различных этапах их дифференцировки - от разобщенных нейробластов до стадии зрелых нейронов.

Для диссоциации использовали спинной мозг и специальные ганглии 12-14-дневных мышинных эмбрионов, у которых в этот период завершается формирование двигательных и чувствительных нейробластов. Ткани диссоциировали механическим способом и культивировали в монослой по ранее описанной методике /1/ в течение 12 суток на аklarовой подложке, покрытой уплотненным коллагеном или поли-1-лизинном. Идентификацию функционально различных клеточных типов (нейронов спинного мозга и чувствительных ганглиев) осуществляли с помощью светового микроскопа. После проведения цитохимической реакции ультратонкие срезы залитых в эпон-араддит участков клеточного монослоя, содержащего тела названных типов клеток, просматривали на электронном микроскопе JEM -1000X.

В работе использовали набор конъюгированных с золотом лектинов, обладающих специфичностью к следующим углеводным детерминантам: 1) N-ацетил-Д-галактозамину - лектин *Helix pomatia*-HPL, *Phaseolus limensis*-LPA; 2) N-ацетил-глюкозамину и N-ацетил-нейраминовой кислоте - лектин *Triticum vulgare*-WGA; 3) N-ацетил-лактозамину - лектин *Ricinus communis*-RCA; 4) 1-фукозе - лектин *Lotus tetragonolobus*-TPL; 5) Д-маннозе - лектин *Lens culinaris*-LcL. Величина гранул коллоидного золота варьировала от 16 до 20 нм. Контрольные эксперименты на специфичность связывания лектинов проводили в присутствии 0,5 М соответствующего углевода ингибитора.

Изучение нейронов и глии монослоя на 12-ые сутки культивирования показало, что на плазмалемме обоих типов нейронов экспонированы N-ацетилгалактозамин, N-ацетиллактозамин, N-ацетилхитобиозамин и нейраминная кислота, Д-манноза. Изучаемые нейроны не имели детерминант, содержащих 1-фукозу, которые четко выявлялись на мембране глиальных клеток.

Плотность и распределение одинаковых углеводных остатков на поверхности мембраны различных типов нейронов имели су-

щественные отличия. Комплексы HPL-Au на мембране нейрона чувствительного ганглия были достаточно многочисленны, гранулы золота располагались в виде кластеров. Места связывания на мембране нейронов спинного мозга были редкими, располагались без определенной ориентации, в виде единичных гранул. Тропные по отношению к N-ацетил-D-глюкозаминным остаткам и нейраминовой кислоте комплексы WGA-Au были, напротив, немногочисленны на мембране нейронов спинальных ганглиев и множественными - на поверхности сомы мультиполярных нейронов спинного мозга, однако в обоих случаях они располагались по периметру соматической мембраны одинаково в виде кластеров. Распределение N-ацетил-лактозаминных остатков, выявляемых RCA-Au, было аналогичным распределению меченого HPL. Наиболее выраженной для двух типов клеток была разница в плотности размещения углеводных детерминант, связывающих RCA: очень высокая на мембране чувствительной клетки, где гранулы располагались настолько плотно друг к другу, что могли образовывать сплошную линию, и очень низкая - на поверхности клетки спинного мозга, где отмечались единичные гранулы золота по всему периметру соматической мембраны.

Изучение топографии гликоконъюгатов поверхности отдельной нервной и глиальной клеток в процессе дифференцировки на различных сроках культивирования обнаружило, что хотя общие характеристики углеводного кода функционально разных нейронов, описанных выше, сохраняются, тем не менее имеют место различия в структуре и распределении углеводных детерминант в пределах отдельных участков нервной клетки (сома, аксон, дендриты, конусы роста, контакты). Так, например, в пределах нейрона спинного мозга отмечалось прогрессивное увеличение мест связывания HPL и WGA лектинов по направлению от сомы к отросткам. Связывание RCA характеризовалось противоположной тенденцией, аксоны и дендриты содержали большое количество мест связывания с кластерным распределением. Конусы роста не связывали лектины, за исключением RCA. В межклеточных щелях выявлялись довольно многочисленные детерминанты IBA.

Обнаруженные различия в распределении углеводных детерминант на поверхности мембраны отдельных участков нервной клетки позволяют предполагать, что они являются отражением

различий в функционировании каждой из областей нейрона на соответствующем этапе его дифференцировки /2/. В то же время функционально различные типы нервных клеток могут иметь свои, специфичную углеводную сигнатуру наружной поверхностной мембраны. Такой вывод позволяет согласиться с гипотезой R.W.Sperry /4/, утверждающей, что нейроны, в зависимости от занимаемого ими положения в определенной системе, могут иметь химические различия в виде соответствующих меток на поверхности, которые позволяют аксонам узнавать либо аналогичную, либо комплементарную метку на поверхности нейронмишеней. Последнее предполагает участие плазмалеммальных углеводных кодов в механизмах, определяющих морфогенетические события как на уровне развивающегося нейрона, так и на уровне, характеризующем развитие нервной системы в целом.

Л и т е р а т у р а:

1. Скибо Г.Г., Коваль Л.М. Ультраструктурные характеристики синаптогенеза в монослойных культурах спинного мозга. - Нейрофизиология. - 1984. - Т. 16. - № 3. - С. 336-343.

2. Скибо Г.Г., Коваль Л.М., Луцик М.Д. Электронноцитохимическое выявление углеводных детерминант поверхностной мембраны культивируемых нейронов. - ДАН СССР, 1988. - Т. 300. - № 4.

3. Moscona A.A. The cell Surface in Development. John Wiley. Sons Inc. - New York, 1974. - P. 186.

4. Sperry R.W. Chemoaffinity in orderly growth of herve fiber patterns and connections. - Proc. Nat. Acad. Sci. US. - 1963. - Vol. 50. - P. 703-711.

ЛЕКТИНЫ, ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИПОСОМ. РАЗЛИЧИЯ В СВЯЗЫВАНИИ НОРМАЛЬНЫМИ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ

Л.В. Гордеева, А.А. Богданов (мл.)

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Институт экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН СССР,
г. Москва

Известно, что на поверхности животной клетки имеются уг-

леводсодержащие центры связывания лектинов. Количество этих центров не увеличивается при злокачественной трансформации клетки /3; 5/. Однако трансформированные клетки способны агглютинировать в суспензии при гораздо более низких (5-10 раз) концентрациях лектинов, чем нормальные /4/. Остается неясным, какие особенности поверхности трансформированной клетки придают ей повышенную способность к агглютинации.

Мы предлагаем модель для изучения межклеточной агглютинации, где одна из взаимодействующих клеток заменена на липосому с иммобилизованным на ее поверхности лектином.

Получение малых моноламеллярных липосом, конъюгированных с конканавалином А (сopA), было описано ранее /1/. В данной работе были использованы также липосомы, конъюгированные с агглютинином из завязи пшеницы (WGA/5/). Эксперименты выполняли на различных линиях нормальных и трансформированных мышечных фибробластов: МЭФ (мышечные эмбриональные фибробласты), L, 3Т3, sv 3Т3. Клетки выращивали на покровных стеклах, отмывали от среды и инкубировали в капле суспензии липосом при 37°C в течение 15-20 мин /1/. В ряде опытов клетки снимали со стекол раствором Версена, отмывали и использовали в виде суспензии. Степень связывания липосом, конъюгированных с лектином (лектин-липосом), с поверхностью клеток оценивали с помощью микрофлуориметрии. Для этого в липосомальную мембрану вводили флуоресцентный маркер периленоилфосфатидилхолин. Флуоресценцию измеряли в относительных единицах. Ноль прибора устанавливали по собственной флуоресценции клеток, отмывтых от среды раствором Хенкса. В каждом эксперименте измеряли флуоресценцию 3-4 участков площадью 3,1 мкм² на поверхности каждой из 15-20 клеток.

После отмывки от несвязавшихся липосом на поверхности клеток сохранялась диффузная флуоресценция. Специфичность сорбции липосом оценивали по подавлению их связывания с клетками в присутствии ингибиторов. Так, в случае сop A-липосом связывание подавлялось на 70-75% при добавлении в инкубационную среду L-метил-D-маннопиранозида (таблица I). Однако оно не уменьшалось, если клетки предварительно обрабатывали липосомами без лектина. При использовании WGA-липосом 80% связывания угнеталось в присутствии N-ацетилглюкоз-

амина. Ту часть тотального связывания, которая исчезала при инкубациях с соответствующими сахарами, мы стали называть "специфическим" связыванием, т.е. обусловленным взаимодействием клеточных рецепторов с лектинами на поверхности липосом (таблица 2).

Таблица 1

Микрофлуориметрия клеток, инкубированных с сод А-липосомами*

Клетки	α -метил-D-маннопиранозид (20 мМ)	Интенсивность флуоресценции, отн. ед. ^{жж}
L	-	16,2 \pm 0,5
	+	4,8 \pm 0,3
L ^{жжж}	-	15,8 \pm 0,9
	+	3,2 \pm 0,3
МЭФ	-	6,5 \pm 0,2
	+	2,1 \pm 0,4
МЭФ ^{жжж}	-	9,7 \pm 0,6
	+	2,8 \pm 0,2
SV 3ТЗ	-	12,5 \pm 1,1
	+	3,0 \pm 0,3
3ТЗ	-	4,3 \pm 0,1
	+	1,1 \pm 0,1

Примечание: * Концентрация липида 1 мг/мл,

^{жж} Измеряли интенсивность флуоресценции единицы площади клеточной поверхности. Результаты представлены в виде $M \pm m$ (15-20 клеток),

^{жжж} Клетки предварительно обработаны трипсином (0,01%, 30 с).

Таблица 2

Микрофлуориметрия клеток, инкубированных с WGA-липосомами*

Клетки	N-ацетилглюкозамин (50 мМ)	Интенсивность флуоресценции
L	-	45,0 \pm 0,2
	+	9,0 \pm 0,2

I	2	3
МЭФ	-	21,0 \pm 0,9
	+	4,0 \pm 0,2

Примечание: * Концентрация липида 1,7 мг/мл.

Проведено сравнение связывания лектин-липосом с двумя парами линий нормальных и трансформированных фибробластов: МЭФ-Л, ЗТЗ-SV ЗТЗ. Установлено, что клетки линии Л специфично связывают в 2,5 раза больше соп А-липосом и в 2 раза больше WGA-липосом на единицу поверхности клетки, чем эмбриональные фибробласты. На поверхности SV ЗТЗ клеток специфическое связывание соп А-липосом было в 3 раза выше, чем на клетках линии ЗТЗ (таблицы 1, 2). Тот же эффект был получен на суспендированных клетках. Трансформированные фибробласты линии Л, обработанные соп А-липосомами в суспензии, флуоресцировали в 2,5 раза ярче, чем нормальные фибробласты.

Для пары линий фибробластов Л и МЭФ установлена зависимость связывания соп А-липосом от концентрации внесенного в инкубационную среду липида. С Л-клетками связывается в 2-2,5 раза больше соп А-липосом в широком диапазоне концентрации липида (от 0,01 до 1 мг/мл). Дополнительные измерения показали, что в указанном диапазоне сохраняется линейная зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации флуоресцентного липида.

Кратковременная обработка мышинных эмбриональных фибробластов трипсином приводила к увеличению специфического связывания соп А-липосом в 1,6 раза. Трипсинизация Л-клеток не вызывала такого эффекта (таблица 1). По контрасту с соп А-липосомами связывание липосом без лектина с МЭФ и Л было примерно одинаковым и уменьшалось в 2 раза после обработки трипсином.

Различия в связывании лектин-липосом нормальными и трансформированными клетками нельзя объяснить оптическими эффектами, обусловленными разницей в степени распластанности нормального и трансформированного фибробласта. В таком случае

мы бы наблюдали аналогичные различия в связывании флуоресцентно меченых лектинов. Однако, свободный конканавалин А при использовании высоких концентраций (50-200 мкг/мл) связывался даже лучше (в 1,2 раза) нормальными фибробластами линии МЭФ, чем L-клетками. Это связывание угнеталось на 90% в присутствии α -метил-D-маннопиранозида. Свободный WGA (100-200 мкг/мл) в 1,1 раза лучше связывался МЭФ по сравнению с L. Это связывание также было специфично.

Таким образом, молекула лектина, присоединившись к липосоме, приобретает новое свойство, которого не было у свободных лектинов: повышенное сродство к трансформированным, а также к обработанным трипсином нормальным клеткам. Такое же свойство приобретает молекула лектина, присоединившись к поверхности клетки. Поскольку мембрана липосомы является моделью клеточной мембраны, хотя и крайне упрощенной, можно предположить, что и механизмы связывания лектин-липосом с клетками сходны с механизмами опосредуемого лектинами связывания клеток друг с другом.

Известно, что трансформированные фибробласты имеют более ворсинчатую поверхность, чем нормальные. Возможно, ворсинки облегчают многоточечное связывание лектин-липосом, что приводит к образованию более стабильных комплексов липосом с клеткой. В настоящее время мы предпринимаем попытки визуализировать лектин-липосомы на поверхности нормальных и трансформированных фибробластов с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

Каково бы ни было объяснение избирательного связывания трансформированными клетками липосом с иммобилизованным лектином, из представленной работы можно сделать следующие выводы:

1. Важные свойства опосредуемого белком межклеточного узнавания могут быть воспроизведены в более простой системе протеолипосомаклетка.

2. Иммобилизация векторных молекул на поверхности малых липосом приводит к существенным изменениям свойств самих липосом, а именно, к приобретению способности избирательно связываться некоторыми типами трансформированных клеток.

Л и т е р а т у р а :

1. Богданов А.А., мл., и др. // Биол. мембраны, 1986. - Т. 3. - С. 674-684.
2. Bogdanov A.A., jr., Klivanov A.L., Torchilin V.P. // FEBS Letters. - 1988. - Vol. 231. - P. 381-384.
3. Cline M.J., Livingston D.C. // Nature New Biol.-1971. - Vol. 232. - P. 155-156.
4. Nicolson G.L. // Int. Rev. Cytol. - 1974. - Vol. 39.- P. 89-189.
5. Ozanne B., Sambrook J. // Nature New Biol. - 1971. - Vol. 232. - P. 156-160.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ТРАНСПОРТА ИОНОВ КАЛЬЦИЯ И ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ГИСТАМИНА ИЗ ТУЧНЫХ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ КОНКАНАВАЛИНА А

Е.Э.Граевская, Г.М.Кравцов, Н.Н.Ломакин, Е.Н.Гончаренко
Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова
ЦНИИ Минздрава СССР, г. Москва

При взаимодействии Кон А с плазматической мембраной различных клеток изменяются ионные потоки и электрические свойства мембраны, формирующие физиологический ответ (деление, секреция) /3/. Следствием рецепции Кон А на тучной клетке является усиление секреции из нее гистамина /5/. Известно, что повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} - триггер дегрануляции мастоцитов /2/. Предполагается, что лектин, подобно антииммуноглобулину Е, мобилизует пул кальция внешней среды /4/. Однако остаются практически не изученными следующие вопросы: 1) влияет ли Кон А на электрический потенциал мастоцитов, 2) какой путь (потенциал- или рецептор-зависимый) входа кальция предпочтителен при действии Кон А на тучные клетки, 3) какие механизмы участвуют в регуляции транспорта Ca^{2+} и, как следствие, в дегрануляции мастоцитов.

В настоящей работе мы исследовали влияние Кон А на мембранный потенциал, транспорт $^{45}Ca^{2+}$, концентрацию свободного Ca^{2+} и секрецию гистамина из тучных клеток крыс. Кроме того,

предпринята попытка изучить влияние модификаторов уровня цАМФ на перечисленные процессы.

Кон А в зависимости от концентрации усиливает высвобождение гистамина из тучных клеток крыс линии Kyoto Wistar. Одновременно наблюдается увеличение концентрации свободного Ca^{2+} , измеренного с помощью флуоресцентного зонда quin 2 (рисунок 1). Возникает вопрос, усиливает ли Кон А проницае-

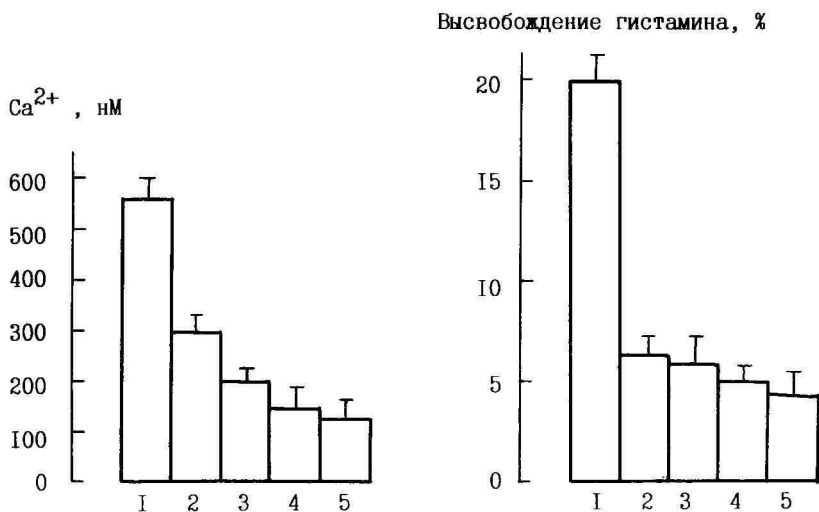


Рис. 1. Влияние Кон А на концентрацию свободного кальция (1) и высвобождение гистамина (2)

мость плазматической мембраны тучной клетки или лектин высвобождает Ca^{2+} из внутриклеточных депо. С этой целью исследовано влияние Кон А на поглощение внеклеточного радиоактивного кальция в нагруженных и ненагруженных quin 2 мастоцитах. Как видно из рисунка 2а, добавление Кон А к тучным клеткам повышает в них содержание $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Результаты, полученные по транспорту $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в нагруженные quin 2 мастоциты, свидетельствуют в пользу того, что Кон А увеличивает поток радиоактивного кальция через плазматическую мембрану

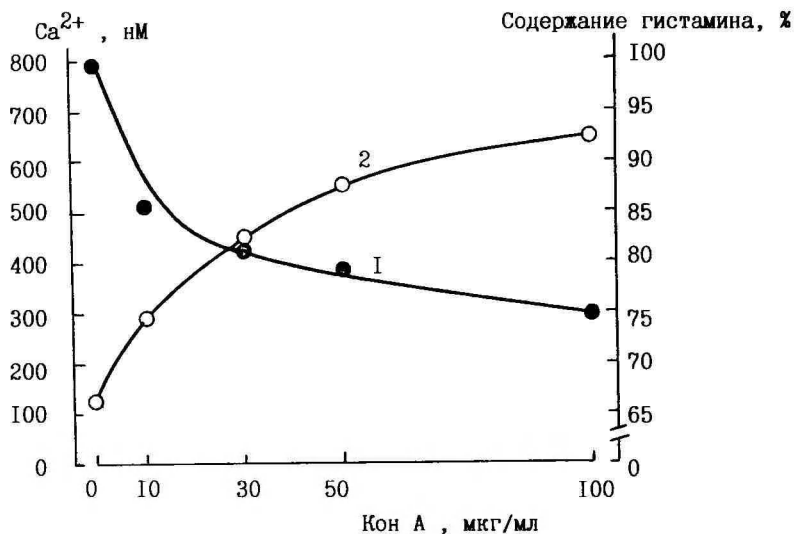


Рис. 2. Влияние модификаторов уровня цАМФ на концентрацию внутриклеточного кальция (а) и высвобождение гистамина из тучных клеток (б), стимулированных конканавалином А:

- 1- КонА (50 мкг/мл);
- 2- дибутирил цАМФ (1 мМ);
- 3- форсколин (100 мкМ);
- 4- теofilлин (2 мМ);
- 5- контроль

тучных клеток (рисунок 2). Увеличение входа Ca^{2+} может осуществляться либо через потенциалзависимые, либо через рецепторзависимые каналы, либо по смешанному механизму. Деполаризующие агенты: КСI, вератрин, убаин не влияют на трансмембранный потенциал, измеренный с помощью флуоресцентного красителя 3,3 дипропилтиодикарбоцианин йода $dis-C_3-$ /6/, не изменяют внутриклеточную концентрацию свободного Ca^{2+} и секрецию гистамина из тучных клеток. Следовательно, в тучных клетках процесс экзоцитоза не определяется трансмембранным потенциалом, и кальциевые каналы не оперируются потенциалом. Кон А (50 мкг/мл) несколько снижает флуоресценцию $dis-C_3-$ (5),

что свидетельствует о гиперполяризации мембраны (на 10–15 мВ). Таким образом, эффект Кон А на вход Ca^{2+} не связан с деполяризацией плазматической мембраны тучной клетки с открытием потенциалзависимых Са-каналов. Вероятно, основная часть Ca^{2+} поступает в мастоциты через рецепторзависимые каналы.

Как известно, увеличение концентрации цАМФ в тучных клетках ингибирует их дегрануляцию /6/. В то же время, например для тромбоцитов, показано, что увеличение уровня цАМФ блокирует рецепторзависимое поглощение кальция /1/. Можно предположить, что и в тучных клетках аденилатциклазная система и связанная с ней протеинкиназа А регулирует активность рецепторзависимых Са-каналов. В наших экспериментах соединения, увеличивающие уровень цАМФ в клетках (теофиллин, форсколин, дибутирил-цАМФ), практически полностью ингибируют вход $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в мастоциты и устраняют дегрануляцию (рисунок 3). При действии дибутирил-цАМФ на тучные клетки, т.е. при активации протеинкиназы А, наблюдается усиление фосфорилирования белков с молекулярным весом 14–25 кДа, по-видимому, влияющее на активность рецепторзависимых Са-каналов, индуцированных Кон А.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что при действии Кон А на тучную клетку открываются рецепторзависимые кальциевые каналы и увеличивается внутриклеточная концентрация свободного Ca^{2+} , что приводит к секреции. Механизм обратной регуляции активности этих каналов осуществляется, по-видимому, через протеинкиназу А.

Л и т е р а т у р а:

1. Авдонин П.В., Алтухова И.П. Биохимия, 1985. 50. – С. 1235–1240.
2. Гущин И.С. // Немедленная аллергия клетки. – М.: Медицина, 1976.
3. Gelfand E.W., Cheung R.K., Mills G.B., Grinstein S.J. // Immunology. – 1987. – Vol. 138. – P. 527–531.
4. Ishizaka T., Ishizaka K. // Progress in Allergy. – 1984. – Vol. 34. – P. 188–235.

5. Siraganin P.A., Siraganin R.P. // J. Immunology. - 1974. - Vol. 112. - P. 2117-2125.

6. Winslow C.M., Austen K.F. // Progress in Allergy. - 1984. - Vol. 34. - P. 236-270.

МОГУТ ЛИ ФЕРМЕНТЫ, ПРЕВРАЩАЮЩИЕ УГЛЕВОДНЫЕ СУБСТРАТЫ, БЫТЬ ЛЕКТИНАМИ?

И.Н. Павлова

Институт микробиологии и вирусологии АН УССР, г. Киев

Вот уже полтора десятка лет ведется дискуссия вокруг определения понятия "лектин". Отсутствие единого мнения исследователей объясняется не только недостаточностью наших знаний о физиологической роли лектинов, но и неиссякаемым потоком информации о наличии лектиновых свойств у многочисленных белков с различными функциями. Являются ли они все лектинами?

Официальное определение лектинов основано на критериях, предложенных I.J. Goldstein et al. /4/: "Лектины - углеводсвязывающие белки или гликопротеины иммунного происхождения, которые агглютинируют клетки и/или преципитируют гликоконъюгаты. Они должны нести не менее двух углеводсвязывающих центров". Это определение и было принято Номенклатурным комитетом Комиссии по биохимической номенклатуре в 1981 г. /2/.

По мнению других авторов /3, 5/, для признания белка лектином гемагглютинирующие свойства у него необязательны, достаточно и одного углеводсвязывающего центра, если белок (неиммунной природы) способен к специфическому узнаванию и обратимому связыванию углеводной части сложных гликополимеров. Вместе с тем, эти авторы считают, что одним из требований, предъявляемых к лектинам, является отсутствие ферментативной активности, по крайней мере по отношению к сахарам, с которыми они связываются. Наши соображения касаются главным образом этой части определения понятия "лектин".

Если на основании определения /4/, из ранга лектинов исключаются только те ферменты, у которых совпадают субстратсвязывающий и каталитический центры, то Н. Franz et al. /3/ отказывают в праве быть названными лектинами всем без исключения ферментам. J. Kocourek, V. Hořejší /5/ оставляют в ранге лектинов только те, которые проявляют ферментатив-

ные свойства, отличные от способности трансформировать углеводный субстрат. Правомочна ли такая дискриминация в отношении группы углеводспецифичных ферментов? Конечно же, нет. Искусственность такого ограничения очевидна. Признавая право называться лектинами (естественно, при наличии свойств, соответствующих критерию "лектин") за ферментами, трансформирующими углеводную часть гликоконъюгатов и, вследствие этого, нарушающими или изменяющими структуру сложной молекулы, лектинологи должны признать, что нет оснований не считать лектинами ферменты, изменяющие структуру полимера в его углеводной части.

В качестве примера ферментов, имеющих все основания быть признанными лектинами, можно назвать исследованные в нашей лаборатории грибную галактозооксидазу /1/ и бактериальную маннаназу /6/. Первая из них осуществляет окисление галактозы у 6-го атома углерода с образованием галактодиальдозы, вторая гидролитически расщепляет концевые α -1, 2/3/-маннозидные связи в дрожжевом полисахариде - маннанае. Оба фермента, являющиеся гликопротеинами, содержат, по крайней мере, два углеводсвязывающих центра, один из которых (каталитический) ингибируется рядом веществ, специфических для данного фермента, другой же (субстратсвязывающий, или лектиновый) остается при этом без изменений и позволяет ферменту осуществлять специфическое связывание на углеводах, в частности, на углеводных рецепторах эритроцитов, способствуя их агглютинации. Такое связывание специфично и ингибируется определенными сахарами. Оба фермента обладают митогенным действием, что установлено в реакции бласттрансформации лимфоцитов. Все, сказанное выше, однозначно свидетельствует в пользу наличия у этих двух микробных ферментов именно тех свойств, которыми характеризуются лектины. Поэтому вполне корректно и другое заключение: эти микробные лектины проявляют ферментативные свойства.

Наличие лектиновых свойств у ферментов (или ферментативных свойств у лектина) можно рассматривать как полифункциональность биополимера, как более полную реализацию возможностей белковой молекулы и, в частности, как эволюционное развитие ее функций. При этом вполне логично лектиновое

свойства биополимера рассматривать как первичные, так как начальный этап взаимодействия двух сложных молекул составляет связывание, осуществляемое за счет слабых физико-химических связей (лектиновых). Однако эти слабые, нековалентные связи имеют большое значение для поддержания определенной структуры в биополимерах и их комплексах. Именно они обеспечивают комплементарность поверхностей взаимодействующих молекул, служат важными ориентирами, обеспечивающими точное совмещение молекул.

Связывание двух реагентов, лектина и углевода в нашем случае, сопровождается изменением энтальпии одного или обоих партнеров вследствие появления новых связей. Изменение энергетического состояния молекулы сопровождается ее конформационной перестройкой, которая иногда оказывается критической в смысле обнаружения в ориентации новых функциональных групп. Конформационная перестройка в молекуле белка-лектина и его углеводсодержащего партнера может с большой степенью вероятности привести к возникновению ансамбля аминокислот, приобретающих реакционную способность. Последние, в свою очередь, при наличии комплементарных участков на полимере с углеводом-рецептором, осуществляют связывание и определенные превращения его молекулы. В цепи этих превращений, кроме уже упоминающихся выше слабых химических взаимодействий, могут иметь место и ковалентные. Образование ковалентной связи как естественное развитие химических взаимодействий вновь проявившихся функциональных групп на белке-лектине или углеводсодержащем партнере может вести к событиям, составляющим каталитическое взаимодействие в реакции, именуемой фермента - тивной. Таким образом, возникновение ферментативных свойств у лектинов можно рассматривать как явление вторичное, возникшее в процессе эволюционного развития биополимера. Очевидно, то же самое верно и для других активностей лектинов. Поэтому нам кажется очень заманчивым предложение /3/ объединить в одну группу все углеводсвязывающие белки. Такое объединение логично и основывается на общности определенных химических структур, составляющих углеводсвязывающие центры. В этом случае уже возможна классификация с разделением лектинов на группы с учетом физиологических функций (уже уста-

новленных или пока только предполагаемых).

При таком подходе по мере расширения наших знаний о роли лектинов в организме определяющие их критерии, несомненно, будут пересмотрены и изменены, а само понятие "лектин" либо станет более крупной категорией, объединяющей разнофункциональные группы углеводсвязывающих белков, либо же это название сохранится за группой биополимеров с определенной, специфичной функцией. Пока же абсолютно целесообразно все белки, отвечающие требованиям, которые предъявляются сегодня к лектинам, включать в эту категорию вне зависимости от приущих им физиологических активностей, включая ферментативную.

Л и т е р а т у р а:

1. Захарова И.Я., Буглова Т.Т., Тихомирова А.С. В: Ферменты, трансформирующие галактозу. - Киев: Наукова думка, 1988. - С. 7-89.
2. Dixon H.B.F. // Nature. - 1981. - Vol. 292. - P. 192.
3. Franz H., Žiřka P., Mohr J.J. // Acta histochem. - 1982. - Vol. 71. - P. 19-21.
4. Goldstein I.J., Hughes R.C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N. // Nature. - 1980. - Vol. 285. - P. 66.
5. Kocourek J., Hořejší V. // Nature. - 1981. - Vol. 290. - P. 188.
6. Zacharova I.Y., Tamm V.E., Pavlova I.N. // Methods in Enzymology. - Vol. 160: ed. W.A. Wood, S.T. Kellogg, Academic Press. - San Diego. - 1988. - P. 620-626.

СКРИНИНГ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ НА СОДЕРЖАНИЕ ЛЕКТИНОВ И ИХ ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ

Е.С. Купцова, Н.А. Пронина, Е.Е. Семененко
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
АН СССР, г. Москва

Известно, что в различного рода биотехнологических процессах требуется широкий спектр лектинов, обладающих разной специфичностью к углеводам. Лектины обнаружены почти во всех живых организмах: от простейших до высших как растений, так

и животных. Однако в доступной нам литературе совершенно нет сведений о лектинах микроводорослей – одноклеточных фотоавтотрофных организмов /1, 3/. Помимо чисто прикладного характера, изучение лектиновой активности одноклеточных водорослей как модельной системы, имеющей один хлоропласт на клетку, удобно для познания таких процессов, связанных с функционированием хлоропластных мембран, как внутриклеточный транспорт, а также регуляция собственно фотосинтетического выделения кислорода.

В работе исследовались одноклеточные зеленые водоросли: *Chlorella* sp.K (C-1), *Coellastrum sphaericum* (H-248) – пресноводные, *Dunaliella salina* (D-209) – галофильные; золотистые – *Monochrysis lutheri* (P-27I); красные водоросли – *Porphyridium aeruginosum* и *Porphyridium cruentum* (P-27I) из коллекции водорослей (IPPAS) Института физиологии растений АН СССР.

Суспензии водорослей выращивались в условиях интенсивной культуры в накопительном режиме, при круглосуточном освещении с 1,7% CO₂ и оптимальной для каждого вида температурой. Наличие лектинов тестировали методом гемагглютинации по способности агглютинировать эритроциты кролика. Использовали 2% суспензию трипсинизированных эритроцитов в 10 мМ фосфатном буфере pH 7,2. Каждой постановке соответствовали два контроля: 1) эритроциты в физиологическом растворе и 2) конканавалин А с эритроцитами. Учет гемагглютинации велся визуально через 2 ч при комнатной температуре. Суспензию водорослей гомогенизировали и с помощью дифференциального центрифугирования разделяли на растворимую фракцию и фракцию нерастворимых клеточных компонентов. Дальнейшее фракционирование вели по схеме (рисунок). При фракционировании мембранных белков в градиенте плотности сахарозы идентифицированы /2/ две фракции хлоропластных мембран (II и III) и фракция мембран плазмалеммы и клеточной стенки (V). Эти фракции обрабатывали тритоном X-100 и, кроме того, осадок после обработки тритоном X-100 солубилизировали с помощью SDS в различных температурных режимах.

Как видно из таблицы I, во всех исследуемых видах водорослей не обнаружена агглютинирующая активность во фракции

МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

		СОЛОБИЛИЗАЦИЯ				
хп.м	I					
хп.м	II					
хп.м	III					
цп.м	IV	SDS	тритон	твин	№ 40	цвиттер-гента
цп.м	V					
тритон	тритон	SDS	70°С	ацетон	70°	ацетон
	30°	50°	90°			

Рис. Схема фракционирования мембранных белков водорослей. Клеточные фракции, тестируемые на гемагглютинирующую активность, обозначены звездочкой

растворимых белков в отличие от мембранных.

Для экстракции лектинов применяли водные, солевые и буферные растворы с варьированием рН. Использование таких экстрагентов как 0,9% NaCl, 0,5% KCl, 0,1 М ЭДТА не приводило к обнаружению лектиновой активности в растворимой фракции. Можно было бы предположить, что лектины в растворе присутствуют совместно с гаптенами, которые не дают возможности

Таблица I

Скрининг одноклеточных водорослей на содержание лектинов

Название вида	Гемагглютинирующая активность	
	растворимые белки	мембранные белки
Chlorella sp. K	-	+
Coelastrum sphaericum	-	+
Dunaliella salina	-	+
Monochrysis lutheri	-	+
Porphyridium cruentum	-	+
Porphyridium aerogineum	-	+

проявляться лектиновой активности. Известно, что лектины должны освобождаться при кислом pH из-за диссоциации их комплекса с гаптенами. Однако изменение pH в широком диапазоне от 5,2 до 7,8 не приводило к проявлению гемагглютинирующей активности растворимой фракции белка водорослей.

Таблица 2

Агглютинирующая активность различных фракций клеток *Chlorella* sp. K

Растворимые белки		Мембранные белки	
Суммарная фракция	-	2% Тритон X-100	+++ 0,98 мкг/мл
Высаливание сульфатом аммония:		2% тритон + 1% цвиттергент	++ 1,8 мкг/мл
30%	-	1% Np 40	+
80%	-	1% SDS	+
		1% твин 20	+

Фракцию мембранных белков солубилизировали с помощью различных детергентов в различных температурных режимах как переосаждением ацетоном, так и без него. Результаты, представленные в таблице 2, показывают, что максимальная гемагглютинирующая активность обнаружена при обработке белков 2% тритоном X-100. Как нагревание, так и переосаждение ацетоном приводят к потере у данной фракции агглютинирующей активности.

Таблица 3

Локализация гемагглютинирующей активности в клетках *Chlorella* sp. K

	Хлоропластные мембраны	Плазмалемма
	мкг белка/мл	
Тритон X-100	1,6	2 10^{-2}
Тритон → SDS		
30°, 60 мин	0	1,3
50°, 30 мин	0	2,1
90°, 5 мин	1,6	0

У клеток *Chlorella* sp.К агглютинирующая активность проявляется (таблица 3) как во фракции тилакоидных мембран, так и в мембранах плазмалеммы. Максимальная активность достигается при обработке мембран плазмалеммы 2% тритоном X-100.

У *Dunaliella salina* (таблица 4) максимальная гемагглютинирующая активность обнаруживается во II фракции хлоропластных мембран после обработки 2% тритоном X-100.

Таблица 4

Локализация агглютинирующей активности в клетках
Dunaliella salina

Растворимые белки		Мембранные белки, мкг белка/мл	
Суммарная фракция	0	Суммарная фракция	3,1
Высаливание сульфатом аммония:		II фракция хлоропластных мембран	0,32
30%	0	III фракция хлоропластных мембран	1,4
80%	0		

Приведенные данные впервые показывают наличие гемагглютинирующей активности у различных видов микроводорослей, что может свидетельствовать о присутствии в них альголектинов - лектинов одноклеточных водорослей. Максимальное проявление активности в хлоропластных мембранах и в мембранах плазмалеммы может быть связано, очевидно, с регуляторной ролью лектинов в процессах транспорта и функционирования фотосинтетического аппарата одноклеточных водорослей.

Л и т е р а т у р а

1. Лахтин В.М. Лектины в исследовании белков и углеводов. Итоги науки и техники, серия Биотехнология, ВИНТИ. - М., 1987. - Т. 2. - 288 с.

2. Пронина Н.А., Семенов В.Е. Локализация связанной карбоангидразы в мембранах клеток хлореллы. Физиология растений, 1988, 35. - Вып. I. - С. 51-60.

3. The lectins. Properties, Functions and Applications

ВЛИЯНИЕ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКОЙ ИНДУКЦИИ НА ИЗМЕНЕНИЕ
ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТИ В СТЕБЛЕВЫХ АПЕКСАХ
РАСТЕНИЙ ПРИ ПЕРЕХОДЕ К ЦВЕТЕНИЮ

Э.Н. Комарова, Э.И. Выхребенцева,
Э.Л. Миляева, Г.Я. Алексидзе

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева АН
СССР, г. Москва

Тбилисский государственный университет, г. Тбилиси

В работах P. Albersheim и других авторов показано, что из клеточных стенок под действием специфических гликолитических ферментов выделяются вещества - олигосахарины (углеводной природы, содержащие от 2 до 15 моносахаридных цепочек), обладающие гормоноподобным действием /4/. Показано, что олигосахарины могут служить регуляторами морфогенеза растений /4, 5/. Так как лектины являются белками, специфически связывающими гликоконъюгаты, они должны обладать способностью взаимодействовать с олигосахаридами и, следовательно, могут влиять на процессы роста и морфогенеза.

Процесс фотопериодической индукции цветения начинается с листовой фазы. В листьях под действием света и темноты осуществляется цепь последовательных реакций, в результате которых происходит биосинтез гормонов цветения. Под влиянием гормонов, транспортирующихся из листьев в стеблевые апексы, в них происходят морфогенетические изменения, приводящие к цветению /3/. Вероятно, лектины и олигосахарины, наряду с гормонами цветения, могут принимать участие в регуляции морфогенеза стеблевых апексов при переходе к цветению. В связи с этим в настоящей работе было изучено влияние фотопериодической индукции на изменение лектиновой активности в стеблевых апексах при переходе к цветению.

Объектом исследования служили стеблевые апексы растений двух противоположных фотопериодически чувствительных типов:

рудбекии двуцветной, зацветающей на длинном дне (ДД: 16 ч света + 8 ч темноты) и периллы красной, зацветающей на коротком дне (КД: 8 ч света + 16 ч темноты). Стеблевые апексы растений, находящиеся на неблагоприятной для цветения длине дня, служили контролем, опытные растения получали фотопериодическую индукцию: рудбекии - с I ДД по I7 ДД, периллы - с I КД по 20 КД.

Показано, что при переходе к цветению стеблевые апексы растений проходят последовательно морфогенетические стадии: вегетативную, эвокации и репродуктивную /2/.

Мембраносвязанные лектины извлекали 0,05% раствором тритона X-100 после обработки материала соевым буферным раствором 0,9% NaCl + 20 mM калий-фосфат pH 7,8. Лектиновую активность определяли по минимальному количеству белка, которое вызывает гемагглютинацию трипсинозирванных эритроцитов кролика /1/. Было испытано 12 простых сахаров, которые использовались в качестве гаптен.

В стеблевых апексах рудбекии и периллы обнаружены как мембраносвязанные, так и свободные лектины, у периллы - только мембраносвязанные. В вегетативных стеблевых апексах рудбекии содержание свободных лектинов в 3,2 раза превышает содержание мембраносвязанных лектинов (таблица I).

Таблица I

Содержание лектинов в меристеме стеблевых апексов рудбекии при различной фотопериодической индукции

Стадии развития апексов	Число длинных дней	Содержание лектинов (в относительных агглютинирующих единицах)	
		мембраносвязанные	свободные
Вегетативная - контроль	0 ДД	139	507
	1 ДД	126	121
Эвокации	4 ДД	503	506
	5 ДД	9840	20
Репродуктивная	9 ДД	859	512
	17 ДД	256	49

В начальный период эвокации (I ДД, 4 ДД) уровень мембраносвязанных и свободных лектинов одинаков, но к 5 ДД содержание мембраносвязанных лектинов возрастает в 70 раз по сравнению с вегетативным состоянием, при этом содержание свободных лектинов снижается в 25 раз. С переходом в репродуктивное состояние (9 ДД и I7 ДД) уровень мембраносвязанных лектинов постепенно уменьшается, но остается выше контроля. Наряду с этим содержание свободных лектинов увеличивается к 9 ДД и падает к I7 ДД. Однако уровень в последнем остается в 10,3 раза ниже контроля. Возрастание содержания мембраносвязанных лектинов может быть связано как с переходом свободных лектинов в мембраносвязанное состояние, так и с их синтезом *de novo*.

В отличие от рудбекии, у периллы содержание мембраносвязанных лектинов постепенно увеличивается к 5 КД и 9 КД (фаза эвокации) и превышает уровень контроля (вегетативная стадия) в 2,3 раза (таблица 2).

Таблица 2

Содержание лектинов в стеблевых меристемах периллы при различной фотопериодической индукции

Стадии развития апексов	Число коротких дней	Содержание лектинов (в относительных агглютинирующих единицах)	
		мембраносвязанные	свободные
Вегетативная - контроль	0 КД	2250	нет
Эвокация	5 КД	2500	нет
	9 КД	5200	нет
Репродуктивная	I2 КД	I157	нет
	20 КД	48I50	нет

В репродуктивной фазе содержание мембраносвязанных лектинов снижается, но после 20 КД возрастает в 2I раз по сравнению с контролем.

У обоих видов растений максимум лектиновой активности

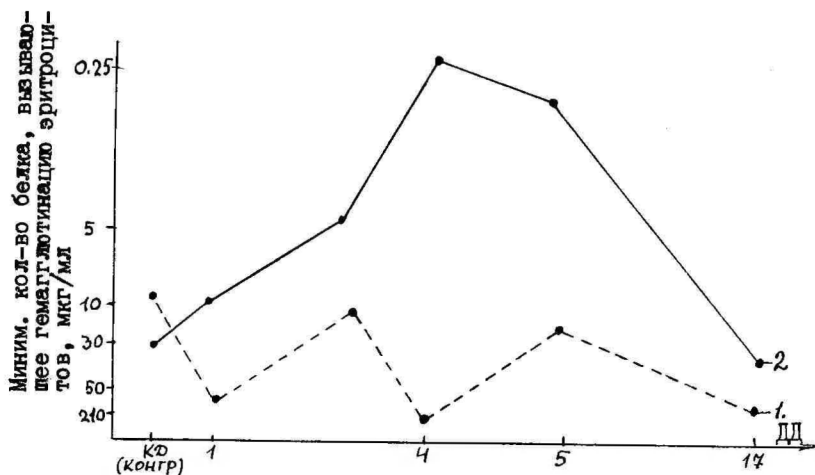


Рис. 1. Изменение лектиновой активности в стеблевых апексах рудбекии при переходе к цветению:
 1 - активность свободных лектинов;
 2 - активность мембраносвязанных лектинов

достигается к 5-му дню ДД и КД, т.е. в конце эвокации (рисунки 1, 2). На репродуктивной стадии в стеблевых апексах выявлен противоположный характер изменений лектиновой активности: снижение у рудбекии, повышение - у периллы.

При переходе к цветению меняется не только количество лектинов, но и их качественный состав. У рудбекии в контроле активность мембраносвязанных лектинов подавляется полностью простыми сахарами в концентрации от 0,15 мМ до 30 мМ; сахарозой, галактозой, арабинозой, арабитолом, фукозой, лактозой, меллибозой. При этом фруктоза, манноза, N-ацетилглюкозамин, сахароза и целлобиоза ингибируют лектиновую активность при меньших концентрациях. В начале стадии эвокации (1 ДД) сохраняется та же тенденция. Но после 4 ДД и 5 ДД чувствительность лектинов к фукозе, галактозе, маннозе, фруктозе, N-ацетилглюкозамину, целлобиозе, лактозе и меллибозе отсутствует. Только сахароза и галактоза ингибируют в этом случае лектиновую активность. В репродуктивной стадии (9 ДД, 17 ДД) лектины не чувствительны к сахарам.

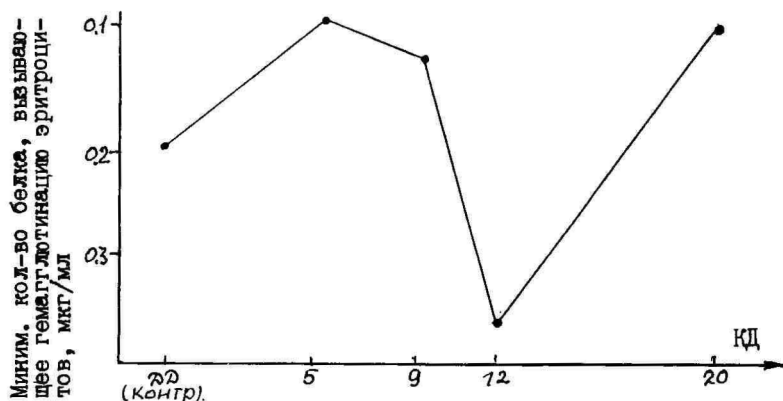


Рис. 2. Изменение активности мембраносвязанных лектинов в стеблевых апексах периллы при переходе к цветению

В отличие от рудбекии, мембраносвязанные лектины периллы различаются по чувствительности к тем же простым сахарам. 5 сахаров: галактоза, арабиноза, фуктоза и меллибиоза ингибируют лектиновую активность при высокой концентрации, остальные — при пониженной концентрации. В стадии эвокации (9 ДД) только арабиноза, галактоза и лактоза ингибируют лектиновую активность, к остальным исследуемым простым сахарам лектины не чувствительны. В репродуктивной фазе (20 КД) лектины чувствительны к арабинозе. Остальные 11 сахаров не ингибируют лектиновую активность.

Обнаруженные изменения в действии простых сахаров на лектиновую активность могут свидетельствовать о различном сродстве лектинов к простым сахарам, а также о возможном изменении в составе лектинов или в изменении их конформации.

Полученные нами данные позволяют сделать следующие выводы: 1. В стеблевых апексах длиннодневной рудбекии обнаружены как свободные, так и мембраносвязанные лектины, у короткодневной периллы — только мембраносвязанные лектины. 2. При переходе к цветению в стеблевых меристемах рудбекии и перил-

лы максимум активности мембраносвязанных лектинов наблюдается в начале фазы эвокации, снижение активности - в репродуктивной фазе. 3. В апексах рудбекии и периллы показано не только изменение активности мембраносвязанных лектинов, но и различное сродство лектинов к простым углеводам. 4. Наличие в стеблевых апексах рудбекии и периллы мембраносвязанных лектинов, неодинаковое сродство лектинов к простым углеводам и изменение лектиновой активности в начале фазы эвокации, когда в стеблевых апексах происходит смена морфогенеза с вегетативного на репродуктивный, может свидетельствовать о возможном участии лектинов в процессе перехода растений к цветению.

Л и т е р а т у р а:

1. Алексидзе Г.Я., Выхребенцева Э.И., Королев Н.П. // Физиология растений. - 1984. - Т. 31. - № 6. - С. 1021-1027.
2. Миляева Э.Л. и др. // Гормональная регуляция онтогенеза растений. - М.: Наука, 1984. - С. 187-202.
3. Чайлахян М.Х. // Регуляция цветения высших растений. - М.: Наука, 1988.
4. Albersheim P. // Sci. Amer. - 1975. - Vol. 232. - N 4. - P. 80-95.
5. Gollin D.J., Darvill A.G., Albersheim P. // Biol. Cell. - Vol. 51. - P. 275-280.

ЛЕКТИНЫ КАК ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ В ИЗУЧЕНИИ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОК
ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ

Д.Ф.Глузман, Л.М.Скляренко, М.Д.Луцки
Институт проблем онкологии им. Р.Е.Кавецкого
АН УССР

К группе гистогенетических и дифференцировочных маркеров, которые могут найти широкое применение в диагностике опухолевых заболеваний кроветворной и лимфоидной ткани, могут быть отнесены рецепторы лектинов, локализованные на поверхностных мембранах клеток.

Нами было предпринято гистохимическое исследование углеводсодержащих компонентов лимфоцитов периферической крови здоровых людей /4/, кроветворных клеток эмбриональной печени, клеток небных миндалин при хроническом тонзиллите в фазе компенсации /1/, клеток крови и лимфатических узлов при злокачественных лимфопролиферативных заболеваниях - остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ), хроническом лимфолейкозе (ХЛЛ), волосатоклеточном лейкозе (ВКЛ), неходжкинских злокачественных лимфомах (НЗЛ) (18 больных). Проводилось также изучение В- и Т-клеточных линий, полученных из трансформированных вирусом Эпштейна-Барр лимфоцитов (RPMI-8226 и EB-3) и малигнизированных лимфоидных клеток (Rayi и Molt-4).

Использовали набор из семи лектинов, конъюгированных с пероксидазой хрена /5/, охватывающих специфичность к D-маннозе, D-галактозе, N-ацетил-D-галактозамину, N-ацетил- β -D-глюкозамину. Среди них были лектин чечевицы (LCL), агглютинин арахиса (PNA), агглютинин клеверины (RCA), лектин виноградной улитки (HPL), лектин сои (SBA), лектин софоры японской (SYA), агглютинин зародышей пшеницы (WGA). Одновременно проводилось цитохимическое изучение мазков крови (определение активности кислой фосфатазы, кислой неспецифической эстеразы, α -нафтилацетатаэстеразы, PAS-реакция), иммуноцитохимическое определение рецепторов и антигенов поверхностных мембран с использованием моноклональных антител, полученных в нашем институте, Институте клинической он-

кологии ВОНЦ АМН СССР, Институте иммунологии МЗ СССР /1, 3, 4/.

При гистохимическом определении рецепторов лектинов мононуклеары из гепаринизированной венозной крови выделяли с помощью дифференциального центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho = 1,076-1,078$) при 20°C . Суспензию клеток трижды отмывали ЗФР путем центрифугирования в течение 5 мин при 400 г и доводили до конечной концентрации 2×10^6 /мл. Ткань небных миндалин и лимфатических узлов измельчали ножницами в ЗФР или среде Хэнкса, pH 7,2-7,4. При наличии погибших клеточных элементов взвесь клеток наслаивали на фиколл-верографин. Жизнеспособность клеток определяли в тесте витального окрашивания 0,2%-ным раствором трипанового синего в изотоническом растворе NaCl. Взвесь клеток наносили в виде капель на предметные стекла на 20 мин при 4°C . Надосадочную жидкость отсасывали пастеровской пипеткой. Предметные стекла с осевшими на них клетками тщательно высушивали под вентилятором. Они могут храниться нефиксированными при 20°C в течение 24 часов и в случае необходимости завернутыми в алюминиевую фольгу при -20°C в течение 2-6 дней. После этого их достают из холодильной камеры, выдерживают при комнатной температуре 15 мин, извлекают из фольги и фиксируют.

Апробировали различные фиксаторы, но оптимальной признана фиксация в забуференном формол-ацетоне pH 6,6-6,8 в течение 45 сек при 20°C . После фиксации предметные стекла тщательно промывали ЗФР и повторяли промывку после каждого последующего этапа.

При определении рецепторов к указанным выше лектинам, за исключением WGA, клетки обрабатывали нейраминидазой. Предварительно с целью блокирования альдегидных групп поверхностных мембран клеток на стекла наносили 0,1M раствор NH_4Cl на 30 мин при 4°C . Затем после промывки ЗФР на 30 мин при 37°C ex tempore приготовленный ФР, содержащий 0,02M ацетатного буфера pH 5,6, 1mM Ca^{++} , 0,02 ИЕ активности нейраминидазы.

После этого на клетки на 3 часа при 4°C наносили конъюгаты лектинов с пероксидазой в рабочем разведении. Разве-

ление лактинов в ЗФР также производится *ex tempore*. За рабочее принималось наибольшее разведение реагента, при котором еще выявлялась активность пероксидазы. В наших исследованиях оно обычно составляло 1:1000. Определение рабочей концентрации реагентов проводили с учетом активности пероксидазы в тесте ELISA или на нитроцеллюлозном фильтре путем приготовления последовательных разведений исходных конъюгатов и последующего нанесения проявляющего раствора.

На последнем этапе гистохимического выявления рецепторов лектинов на фиксированные в пару 10%-ного нейтрального формалина препараты наносится на 20 мин тот же проявляющий раствор следующего состава: 40 мг бензицина (Ferak, Berlin, ФРГ), 10 мл 40° спирта и 0,02 мл 3%-ного раствора перекиси водорода. Ядра клеток окрашивали 2%-ным раствором метилового зеленого.

При просмотре препаратов в светооптическом микроскопе на наличие рецепторов к соответствующему лектину указывало появление коричневого цвета конечных продуктов ферментативной реакции на мембранах лимфоидных клеток, не содержащих эндогенной пероксидазы. Для контроля специфичности гистохимических реакций применяли предварительную обработку клеток соответствующими углеводами-ингибиторами.

Столь подробное описание методики обусловлено тем, что определение рецепторов лектинов прямым пероксидазным методом на изолированных и фиксированных клетках в цитологических препаратах ранее не проводилось.

У здоровых людей в периферической крови лишь на небольшом проценте лимфоцитов были экспрессированы рецепторы лектинов. Так, содержание PNA⁺ клеток не превышало 4%, HPL⁺ - 3% и LCL⁺ клеток - 4%. В ткани миндалин, где содержится немало антигенстимулированных лимфоидных клеток, некоторые из которых имеют признаки иммунобластов или плазматизированных лимфоцитов, PNA⁺ клетки составляли до 53%, почти столько же было HPL⁺ клеточных элементов (58%), содержание клеток, экспрессирующих рецепторы SBA, равнялось 44%, RCA - 25%. В составе миндалин, по имеющимся данным /5/, PNA⁺ лимфоциты обнаруживались среди SIG⁺C3d⁺ и SIG⁺C3d⁻ клеток и среди крупных E-SIG⁻ лимфоидных клеток. В

ходе наших последующих исследований, которые будут проведены с использованием двойной ферментной метки — лектинов, конъюгированных с пероксидазой, и моноклональных антител к дифференцировочным антигенам Т- и В-лимфоцитов в иммуноцитохимической реакции АРААР (щелочная фосфатаза — антищелочная фосфатаза) — мы попытаемся ответить на вопрос, какие именно субпопуляции лимфоцитов реагируют с указанными лектинами.

Довольно высокий процент клеток, реагирующих с РНА, SBA и НРЛ, обнаружен среди кроветворных клеток печени эмбриона. Так, у 12-14-недельного плода человека соответствующие показатели были равны 26, 24 и 28%. Среди них могли быть предшественники В-лимфоцитов и претимические предшественники Т-лимфоцитов /7, 10/.

Клетки линии RPMI-8226 представлены В-клетками, находящимися на различных стадиях дифференцировки. Об этом свидетельствует наличие поверхностных и цитоплазматических иммуноглобулинов (μ - и δ -цепей), СЗ-, Fc_G и Fc_M-рецепторов поверхностных мембран, антигенов, выявляемых анти-В-клеточными моноклональными антителами ИПО-10 и ИПО-3, выраженная гетерогенность по цитоморфологическим и цитохимическим признакам (активности кислой фосфатазы и кислой неспецифической эстеразы). На 60-75% клеток этой линии и линии EB-3 обнаруживались рецепторы РНА, 90 и 80% клеток соответственно реагировали с SBA и только 15% — с НРЛ. При изучении злокачественных В-клеток линии Рау1, полученных из клеток лимфомы Беркитта (африканского типа), также на 70-80% определялись рецепторы РНА, SBA и на 60-70% клеток рецепторы НРЛ. На клетках линии Molt -4 (Т-ОЛЛ) обнаруживались рецепторы РНА (90%), SBA (53%) и НРЛ (46%). Представленные результаты находятся в соответствии с имеющимися данными о том, что РНА реагирует с ранними предшественниками В-клеток и В-клетками на антигензависимых этапах дифференцировки, а также клетками-предшественниками Т-лимфоцитов, с последними реагируют также SBA и НРЛ /8, 9/. В отношении SBA и НРЛ до сих пор, по сведениям из доступной литературы, было только известно, что первые связываются с частью В-лимфоцитов, а вторые — с В-

лимфоцитами в эмбриональной печени /6, 7, 2/.

Нами проводились также исследования по иммунофенотипированию различных цитологических вариантов ОЛЛ у детей, выделяемых в соответствии с FAB-классификацией. В качестве маркеров использовались панель моноклональных антител к дифференцировочным антигенам Т- и В-лимфоцитов, Ia-подобному (HLA-DR) антигену, антигену O-ОЛЛ, стандартные цитохимические реакции. Оказалось, что при ОЛЛ "общего типа" и пре-В-ОЛЛ количество PNA⁺ бластных клеток не превышало 4-10%, SBA⁺, SJA⁺, HPL⁺ клеток - 2-5%. При ОЛЛ Т-клеточного происхождения рецепторы к PNA были экспрессированы на 70-80% бластов, HPL - на 50%, SJA - на 20%.

По полученным данным, определение рецепторов к лектинам, подобно тесту М-розеткообразования, может быть использовано для дифференциальной диагностики В-ХЛЛ и НЗЛ лимфоцитарного типа в стадии лейкемизации. В первом случае в периферической крови обнаруживается 3-20% PNA⁺ лимфоцитов, количество SBA⁺, ICL⁺ и HPL⁺ клеток составляет не более 2-5%, во втором - 50-90% клеток содержат рецепторы PNA, 40% SJA и 30% - ICL.

При одной из редких разновидностей хронических лимфо-пролиферативных заболеваний, волосатоклеточном лейкозе, в крови и селезенке обнаруживалось столь же высокое содержание PNA⁺ клеток - 70-83%. Содержание ICL⁺ клеток составляло 2-15%, SBA⁺ - 8%, HPL⁺ - 8-25%. Эти данные служат еще одним подтверждением возникновения ВКЛ из В-клеток на относительно поздних стадиях дифференцировки.

Анализ представленных материалов свидетельствует о перспективности изучения рецепторов лектинов для познания основных закономерностей дифференцировки лимфоидных клеток и изменений, происходящих в процессе злокачественной трансформации. В практическом плане важным представляется более широкое использование набора лектинов, наряду с энзимоцитохимическими и иммуноцитохимическими маркерами, в качестве вспомогательных критериев для уточненной диагностики различных форм и вариантов гемобластозов.

Л и т е р а т у р а:

И. Барышников А.Ю., Тулицын Н.Н., Крыжанов М.А. и др.// Докл. АН СССР. - 1985. - № 3. - С. 753-759.

2. Глузман Д.Ф., Бебешко В.Г., Надгорная В.А. и др. Эмбриональное кроветворение и гемобласты у детей. - Киев: Наукова думка, 1988. - 200 с.

3. Пинчук В.Г., Сидоренко С.П., Ветрова Е.П. и др. // Экспериментальная онкология. - 1986. - 8, № 6. - С. 41-46.

4. Филатов А.В., Вацурин П.С., Королев А.Г. и др. // Биотехнология. - 1987. - 3, № 6. - С. 756-762.

5. Хомутовский О.А., Луцик М.Д., Передерей О.Ф. Электронная гистохимия рецепторов клеточных мембран. - Киев: Наукова думка, 1986. - 168 с.

6. Hsu S.M., Ree H.Y. // J. Histochem. Cytochem. - 1983. - Vol. 31. - N 4. - P. 538-546.

7. Osmond D.G. // Eur. J. Immunol. - 1984. - Vol. 14. - P. 495-502.

8. Raedler A., Raedler E. // J. Cancer Res. Clin. Oncol. - 1985. - Vol. 109. - N 1. - P. 245-251.

9. Raedler A., Raedler E., Becker N. et al. // Immunology. - 1982. - Vol. 46. - N 2. - P. 321-327.

10. Richard I., Boumsell L., Coppin H. et al. // J. Immunol. - 1981. - Vol. 127. - N 1. - P. 252-255.

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ЛЕКТИНЫ В ОПРЕДЕЛЕНИИ АКТИВНОСТИ ГЛИКОЗИЛТРАНСФЕРАЗ

А.Д. Михайлов

Всесоюзный онкологический научный центр
АМН СССР, г. Москва

В последнее десятилетие повышается интерес к изучению гликозилтрансфераз как потенциальных маркеров ряда злокачественных опухолей, поскольку эти ферменты тесно связаны с синтезом многих гликопротеинов, уровень которых повышен у онкологических больных. Речь идет об опухолеассоциированных антигенах гликопротеиновой природы - таких как раковоэмбриональный антиген, антигены Са-125, СА-19-9, СА-15-3; а также так называемых гликопротеинах "острой фазы" - орозсмукциде, альфа-1-антитрипсине, альфа-1-химотрипсине и других: все они содержат аспарагин-связанные олигосахаридные цепи различной степени разветвленности с более или менее высоким

содержанием маннозы.

В нашей лаборатории модифицирован метод определения сиалилтрансферазы (ЕС.2.4.99.1) и фукозилтрансферазы (ЕС.2.4.1.68) с использованием иммобилизованных лектинов. В основу метода положен тот факт, что сыворотка крови человека как при патологии, так и в норме содержит некоторое количество свободных сиалил- и фукозилтрансферазы, однако, в ней практически не обнаруживаются фосфонуклеотидные производные фукозы (гуанозиндифосфофукоза, ГДФ-Фук) и сиаловой кислоты (цитидинмонофосфосиаловая к-та, ЦМФ-Сиал), являющиеся субстратами указанных ферментов. Такое положение делает маловероятным экстрацеллюлярное фукозилирование и сиалирование гликопротеинов и косвенно приводит к тому, что сыворотка крови относительно богата гликопротеинами с терминальной структурой их углеводных цепей $\text{Gal } 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc } 1 \rightarrow$. Такие гликопротеины могут служить как акцептором фукозы, присоединяемой фукозилтрансферазой к GlcNAc связи $1 \rightarrow 3$, так и акцептором сиаловой кислоты, присоединяемой сиалилтрансферазой к Gal связи $1 \rightarrow 6$. Понятно, что внесение в сыворотку крови экзогенного меченого радиоактивным изотопом ГДФ-Фук (или ЦМФ-Сиал) приведет к формированию меченого гликопротеина в количестве, пропорциональном активности фермента образца и времени реакции. Время инкубации реакционной смеси подбирается таким образом, чтобы избежать насыщения акцепторных сайтов и в то же время получать значимое количество продукта реакции.

Методика проведения анализа довольно проста: 200 мкл образца разбавляются 1 мл буферного раствора и к смеси добавляется избыток меченого углеродом-14 ГДФ-Фук (или ЦМФ-Сиал). После инкубации реакция останавливается насыщенным раствором динатриевой соли ЭДТА, которая удаляет из реакционной среды ионы марганца, необходимые для функционирования фермента. После остановки реакции в смесь вводят 0,5 мл суспендированного агарозного геля с ковалентно иммобилизованными лектинами, специфичными к альфа-d-маннозе *Canavalia ensiformis* либо *Pisum sativum*. Маннозосодержащие гликопротеины, в том числе продукты энзиматического мечения, связываются с гелем, который после этого несколько раз

промывается и радиометрируется на гамма-счетчике.

Наши данные показали, что при иммобилизации на CNBr - активированной агарозе в соотношении 3 мг на 1 мл геля коэффициент корреляции при их использовании в измерении энзиматической активности сиалилтрансферазы по данным тестирования 48 проб составил 0.92; при измерении активности фукозилтрансферазы в тех же образцах - 0.89. Таким образом, можно сделать вывод об отсутствии влияния типа лектина на результаты измерений этим методом при одинаковой моносахаридной специфичности лектинов.

В сравнении с известными методами разработанный нами способ является наиболее технологически доступным и имеет высокую аналитическую чувствительность - около 0,4 нмоль/мл/ч для обеих трансфераз. Метод прошел предварительную клиническую апробацию - исследована сыворотка крови 48 человек: 8 больных раком легкого, 5 - незлокачественными заболеваниями этого органа, 17 детей с острым лимфобластным лейкозом, 7 больных раком яичников и 11 здоровых лиц. Показано, что уровень фукозилтрансферазы показан преимущественно у больных эпителиальными злокачественными опухолями (у 11 из 15 пациентов). Тест на сиалилтрансферазу, по имеющимся данным, не оказался специфичным, что ставит под сомнение его диагностическую значимость для всех типов злокачественных опухолей.

ПОНИЖЕННОЕ СРОДСТВО АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНА
ПЛАЗМЫ КРОВИ К ФИТОГЕМАГГЛЮТИНИНУ ПРИ РАКЕ
ЖЕЛУДКА

Е.П.Сморodin, О.А.Куртенков

Институт экспериментальной и клинической
медицины МЗ Эстонской ССР, г. Таллинн

Известно, что при онкологических заболеваниях в организме нарушен характер гликозилирования, что приводит к появлению в крови и на раковых клетках гликоконъюгатов с измененной углеводной структурой /3, 10, 15/. Подобные структуры могут быть распознаны и изучены с применением монокло-

нальных антител /9/ и лектинов /6, 7, 15/. Исследование гликопротеидов по связыванию с лектинами дает ценную информацию о микрогетерогенности и является перспективным методом диагностики различных заболеваний /12/. В настоящей работе исследовали связывание с лектинами альфа-2-макроглобулина (α_2M) крови здоровых людей и больных раком желудка.

МЕТОДИКА

α_2M выделяли из свежей плазмы крови по ранее описанным методам /1, 2/. Перекрестный лектин-иммуноэлектрофорез проводили по методике, описанной Bog-Hansen T.C., 1973 /4/. В качестве лектина использовали фитогемагглюктинин (ФГА-П), ("Difco", США). Пробы анализировали электроиммунодиффузией по методу Лорелла /14/ и оценивали связывание α_2M с ФГА и лектинами гемолимфы *Limulus polyphemus* /3/, (гемолимфа любезно предоставлена доктором E. Cohen, Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, N.Y., USA). Определяли также антипротеазную активность препаратов α_2M и анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия /1/. Препараты α_2M анализировали также по подвижности в градиенте полиакриламидного геля и исследовали микрогетерогенность по заряду методом изоэлектрофокусирования /3/.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделенные аффинной хроматографией препараты α_2M плазмы крови здоровых людей (n=4) и больных раком желудка (n=4) исследовали методом перекрестного лектин-иммуноэлектрофореза /5/ (рисунок 1). При этом было показано, что α_2M плазмы здоровых связывается с ФГА на $60,35 \pm 4,44\%$, α_2M плазмы больных на $43,60 \pm 4,86\%$, $t = 2,55$, $P < 0,05$. При электрофорезе в первом направлении в геле с ФГА α_2M иногда разделялся на компоненты, так как были отмечены пики преципитации с антисывороткой к α_2M , имевшие двойную вершину (электрофорез в перпендикулярном направлении). Эти данные свидетельствуют о характерной микрогетерогенности α_2M по углеводной структуре. Подобная микрогетерогенность по связыванию с конканавалином А отмечена для орозомукоида при раке и воспалении

толстого кишечника /11/; компоненты орозомукоида, не связывающиеся с конканавалином А, имеют более разветвленную структуру олигосахаридной цепи.

α_2M плазмы крови больных раком желудка имеет меньшее сродство к ФГА, чем α_2M плазмы здоровых людей /3/. Аналогичные результаты были получены при исследовании связывания альфа-I-антитрипсина и ферритина с конканавалином А /15, 17/. α_2M также связывается с лектинами беспозвоночного *Limulus polyphemus*, однако не получено достоверных различий в связывании α_2M здоровых лиц и больных раком желудка. Аналогичное исследование сывороток крови с водно-солевым экстрактом арахиса (*Arachis hypogaea*) показало, что пики преципитации α_2M с антисывороткой переменны. Отмечено даже увеличение размера пика в опыте (инкубация с лектином) по сравнению с контролем. Вероятно, этот артефакт связан с увеличением электрофоретической подвижности образующегося комплекса α_2M - лектин, такой комплекс может плохо вторично проявляться антителами к α_2M .

Такие моносахариды, как N-ацетил-D-галактозамин, D-галактоза и L-фукоза при концентрациях $5 \cdot 10^{-3}$ - $5 \cdot 10^{-2}$ М, не влияли на связывание α_2M с ФГА /3/. Считается, что ФГА имеет специфичность по N-ацетил-D-галактозамину, так как именно этот углевод ингибирует агглютинацию эритроцитов /18/. α_2M связывается с ФГА, хотя и не содержит в составе олигосахаридной части этого углевода /8/. Принятая специфичность ФГА условна, так как для связывания важна комплементарность углеводной части гликопротеида и лектина. Так, гликопептид эритроцитов человека превосходит N-ацетил-D-галактозамин по ингибированию агглютинации эритроцитов почти в 10^5 раз /13/. Для связывания ФГА с гликопротеидами важна не только внешняя, но и внутренняя углеводная структура, содержащая D-маннозу. Кроме того, более крупные гликопротеиды эритроцитов имеют значительно большее сродство к ФГА, чем гликопептиды, полученные обработкой трипсином /13/.

Препараты α_2M , выделенные из плазмы крови разных людей, отличались по удельной антипротеазной активности и по связыванию с ФГА в процентах. Между этими величинами отмечена корреляция (рисунок 2), $r=0,865$, $t=4,57$, $P < 0,01$.

Для комплекса α_2M с трипсином получены значения связывания с ФГА и лектинами гемолитины соответственно на 7 и 9% выше, чем для нативного α_2M , хотя и α_2M , и комплекс имели одинаковые пики преципитации с антителами к α_2M . Это пример того, как лектин распознает структурные изменения α_2M , связанные с ограниченным протеолизом. Как известно, лектины и поликлональные антитела неодинаково чувствительны к структурным изменениям гликопротеидов при денатурации /5/. Отмеченное различие по сродству α_2M к ФГА использовано нами для разработки способа дифференциальной диагностики рака желудка.

Рак желудка выявляется в 88% (положительная реакция), у здоровых или больных незлокачественными заболеваниями желудка в 88-90% реакция отрицательная. У больных раком другой локализации положительная реакция выявляется в 69% (толстый кишечник, поджелудочная железа).

Применение лектинов значительно расширяет возможности биохимических методов исследования. Прежде было показано, что α_2M плазмы крови больных раком желудка, в отличие от α_2M здоровых людей, тормозит blastogenesis лимфоцитов на ФГА /1/. Для исследования биохимической природы этого феномена препараты α_2M крови здоровых и больных анализировали по антипротеазной активности, методом электрофореза с додецилсульфатом натрия и в градиенте полиакриламидного геля, методом изоэлектрофокусирования, но не обнаружили достоверных различий /1, 3/. Однако сравнительное исследование по связыванию с ФГА выявило достоверное снижение связывания, характерное для α_2M плазмы больных раком желудка. Низкие значения связывания α_2M с ФГА характерны также для сыворотки крови беременных /16/. Характерные особенности углеводной структуры α_2M при раке и при беременности свидетельствуют об измененном характере гликозилирования гликопротеидов. Такая модификация гликопротеидов, возможно, является одним из механизмов возникновения иммунодепрессии.

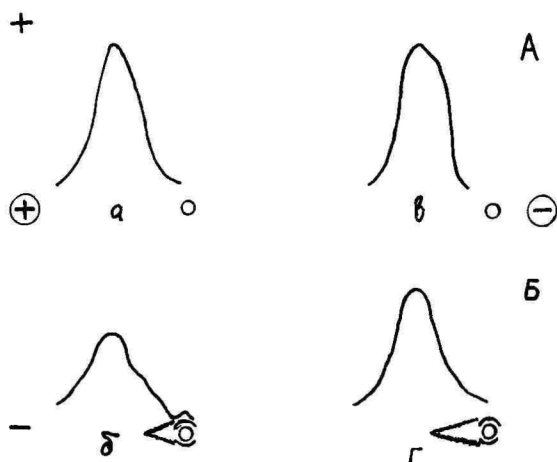


Рис. 1. Перекрестный лектин-иммуноэлектрофорез препаратов α_2M в геле агарозы:

А - контроль (электрофорез в первом направлении в геле без ФГА);

Б - опыт (электрофорез в первом направлении в геле с ФГА);

а, б - α_2M плазмы здорового человека;

в, г - α_2M плазмы больного раком желудка

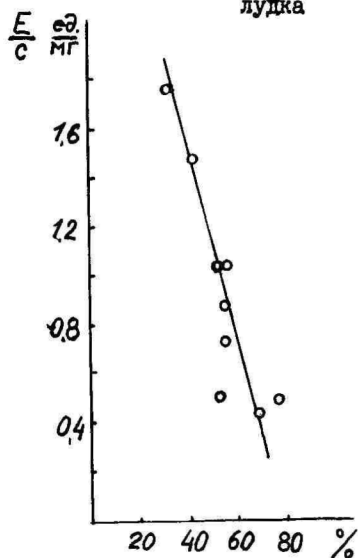


Рис. 2. Зависимость удельной антипротеазной активности препаратов α_2M от связывания α_2M с ФГА.

Л и т е р а т у р а

1. Куртенков О.А., Смородин Е.П. // Экспериментальная онкология. - 1983. - 5, № 2. - С. 55-57.
2. Смородин Е.П. Способ выделения альфа-2-макроглобулина. Авт. свид. № 1090406, А61 К35/14, 21.01.82, 07.05.84.
3. Смородин Е.П., Куртенков О.А. // Экспериментальная онкология. - 1986. - 8, № 2. - С. 42-45.
4. Bøg-Hansen T.C. // Anal. Biochem. -1973. - Vol.56. - N 2. - P. 480-488.
5. Bøg-Hansen T.C., Bjerrum O.J., Brogren C.H. // Anal. Biochem. - 1977. - Vol. 81. - N 1. - P. 78-87.
6. Chapman A.J., Gallagher J.T., Beardwell C.G., Chalet S.M. // J. Endocrinol. - 1984. - Vol. 103. - N 1. - P. 111-116.
7. Cooper H.S. // Hum. Pathol. - 1984. - Vol. 15. - N 10. - P. 111.
8. Dunn J.T., Spiro R.G. // J. Biol. Chem. - 1967. - Vol. 242. - N 23. - P. 5556-5563.
9. Nakomori S., Nudelman E., Levery S.B., Patterson C.M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1983. - Vol. 113. - P. 791-798.
10. Nakomori S., Nudelman E., Levery S.B., Kannagi R. // J. Biol. Chem. - 1984. - Vol. 259. - N 7. - P. 4672-4680.
11. Hansen J.-E., Jensen S.P., Norgaard-Pedersen B., Bøg-Hansen T.C. // Electrophoresis. - 1986. - Vol. 7. - N 4. - P. 180-183.
12. Hinnerfeldt F.R., Albrechtsen J., Bøg-Hansen T. C. // Electrophor. '82: Adv. Meth. Biochem. and Clin. Appl. Proc. Int. Conf. Electrophor., Athens, 21-24 Apr., 1982. - Berlin, New York, 1983. - P. 567-576.
13. Kornfeld R., Kornfeld S. // J. Biol. Chem. - 1970. - Vol. 245. - N 10. - P. 2536-2545.
14. Laurell C.-B. // Scand. J. Clin. Lab. Invest, 1972. - Vol. 29. - Suppl. 124. - P. 21-73.
15. Restenberg I., Guizar-Vázquez J., Penaloza R. // J. Nat. Cancer Inst. - 1978. - Vol. 61. - N 4. - P. 961-965.
16. Ryatsep V.J., Kurtenkov O.A., Smorodin E.P. // Tumor Biology. - 1985. - Vol. 6. - N 4. - P. 394.
17. Tommasi M., Liotta A., Alessandrello, Cappelli G. // Nucl. Med. and Biol. Adv. Proc. 3rd World Congr., Paris,

29.aug.-2.Sept.,1982.-Vol.4.-Oxford e.a.,1983.- P.3321-3323.

18. Wright R.K., Copper E.L. // Comp. Biochem. and Physiol. - 1979. - Vol. B 63. - N 1.- P. 13-18.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА К АГГЛЮТИНИНУ
АРАХИСА И ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ОТВЕТА НА ФГА У
ТИМОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРЕПАРАТОВ ТИМУСНЫХ
ГОРМОНОВ

М.Ф.Никонова, М.Г.Михна, А.А.Ярилин

Институт иммунологии Минздрава СССР, г. Москва

T-клетки экспрессируют рецепторы к ряду лектинов, в том числе к агглютиниону арахиса (Peanut agglutinin) - PNA. В тимусе, где T-клетки в процессе дифференцировки приобретают поверхностные характеристики и функциональные свойства зрелых лимфоцитов, PNA связывается с ~ 85% незрелых тимоцитов, локализующихся в кортикальной зоне. Характерной особенностью поверхностной мембраны данных клеток является наличие терминальных остатков D-галактозы - дисахарида Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc, не экранированных сиаловой кислотой /9/. Эти участки и являются рецептором для связывания PNA. В процессе иммунологического созревания происходит сиалирование поверхностных гликопротеинов и, вследствие этого, потеря способности к связыванию PNA. Клетки тимуса, несущие рецептор к PNA, различаются не только по локализации (PNA⁺ - в кортикальной зоне, а PNA⁻ - в медуллярной), но и по степени иммунологической зрелости и, следовательно, по фенотипическим и функциональным особенностям. Для кортикальных тимоцитов, характерно, в частности, большее содержание Thy-1,2 антигена и отсутствие способности отвечать бласттрансформацией на митоген ФГА. На медуллярных тимоцитах утрачивается рецептор к PNA, плотность Thy-1,2 антигена снижается и они приобретают способность к пролиферативному ответу на ФГА.

Дифференцировка тимоцитов происходит под влиянием гормонов тимуса. В настоящее время выделен, изучен и охарактеризован целый ряд препаратов, содержащих тимусные гормоны: тимозин /7/, сывороточный тимусный фактор /5/, тимопоэтин /6/ и др. Кроме того, получены отечественные аналоги этих

препаратов: тимоптин /4/, тактивин /1/, тималин /2/.

Действие тимусных гормонов может быть связано со степенью зрелости клеток-мишеней и направлено на различные этапы дифференцировки Т-клеток. В данной работе проводили сравнительное изучение влияния отечественных препаратов тимуса на определенный этап созревания Т-лимфоцитов - дифференцировку кортикальных тимоцитов в медуллярные.

Эксперименты проводили на мышах линии СВА, у которых извлекали тимус и готовили клеточную суспензию. Тимоциты разделяли на РПА⁺ и РПА⁻ фракции /8/ путем агглютинации с РНА (1 мг/мл) и последующего наслаивания на 20% лошадиную сыворотку. Затем отобранные РНА⁺ клетки обрабатывали D-галактозой (0,3 М) и дважды отмывали. Экспрессию рецепторов к РНА определяли с помощью иммуноферментного метода в клеточной суспензии с использованием конъюгата РНА-пероксидаза /3/. Плотность мембранного Thy-1,2 антигена исследовали в цитотоксическом тесте с использованием антисыворотки к Thy-1,2 антигену и комплемента морской свинки. Функциональное созревание РНА⁺ тимоцитов оценивали в 72-часовом тесте бласттрансформации, измеряемой по включению ³H-тимидина, в присутствии ФГА, взятого в субоптимальной дозе.

Кратковременная, 1-часовая инкубация тимоцитов с тимоптином при 37°C приводила к уменьшению числа РНА⁺ клеток до 58,1%, в то время как у тимоцитов, к которым была добавлена культуральная среда, процент РНА⁺ клеток был равен 82,8 (рисунк), что соответствует нормальному содержанию РНА⁺ клеток в тимусе /9/. Эффект тимоптина проявляется только в определенном диапазоне доз. В подобной же концентрации проявлялось действие тимоптина на экспрессию Thy-1,2 антигена. В то время, как при разведении антисыворотки к Thy-1,2 антигену 1:32 процент мертвых клеток в контроле и у обработанных тимоптином клеток был практически одинаков и равен, соответственно 89,0 и 91,5, при разведении антисыворотки 1:64 процент выявляемых клеток, положительных по Thy-1,2 антигену, в опыте резко падал (39,0), а в контроле уменьшался незначительно (82,0). Эти данные указывают на то, что при действии препарата в определенных концентрациях часть тимоцитов не только утрачивает рецепторы к РНА, но и

снижает экспрессию Thy-1,2 антигена, т.е. приобретает фенотипические признаки зрелых Т-клеток.

Тималин и тактивин также вызвали фенотипическую модификацию клеток. Для тактивина активные дозы, вызывающие утрату тимоцитами способности связывать РНА, соответствуют 10^{-1} -1 мкг/мл. У тималина рабочая концентрация и для ослабления экспрессии Thy-1,2 антигена и для утраты РНА-рецептора составляет 10^{-1} мкг/мл.

Таким образом, исследуемые препараты тимусных гормонов (тимоптин, тактивин, тималин) влияют на фенотипические изменения незрелых тимоцитов в зрелые. Это влияние реализуется в узком диапазоне доз.

Параллельно с изучением изменения фенотипа под влиянием тимусных гормонов проводилось исследование функционального созревания тимоцитов при участии этих факторов. Обработка тимоцитов тимоптином в дозе 10 мкг/мл приводила к приобретению РНА⁺-клетками пролиферативной активности в ответ на действие ФГА (ИС=6,19). Доза тимоптина, уменьшенная вдвое, не усиливала клеточной пролиферации. Тималин в концентрации 5 мкг/мл вызывал увеличение ФГА-стимулированной пролиферации РНА⁺ тимоцитов в 2,83 раза, в больших концентрациях эффект не проявлялся. В то же время тактивин оказывал стимулирующее действие в более широком диапазоне доз - 1 и 0,1 мкг/мл, индексы стимуляции составляли 2,50 и 3,93, соответственно. Следовательно, для того, чтобы под действием препаратов гормонов тимуса тимоциты приобрели способность к пролиферативному ответу, необходимо применять их в определенных концентрациях (таблица).

Таким образом, под действием тимусных гормонов происходят изменения РНА⁺ тимоцитов, которые можно трактовать как проявления фенотипического и функционального созревания РНА⁺ тимоцитов. Для тактивина диапазон доз, вызывающих исчезновение рецептора к РНА и функциональное созревание клеток, совпадает. Другие препараты (тимотропин, тималин) реализуют свое действие на поверхности мембраны в более низких концентрациях, чем это необходимо для функционального созревания.

Как уже упоминалось, рецептором для РНА на незрелых

Таблица

Влияние тимоптина, тактивина и тималина на спонтанную пролиферацию RNA^+ -timoцитов и их бласттрансформацию в ответ на ФГА

Препарат	Конц., мкг/мл	Спонтанная пролиферац., имп/мин	Пролиферац. под действ. ФГА, имп/мин	ИС	P
Контроль	2	184 ± 43	280 ± 64	1,50	$> 0,05$
Тимоптин	5	396 ± 94	264 ± 50	0,67	$> 0,05$
"-	10	132 ± 1	817 ± 84	6,19	$< 0,001$
Тималин	5	150 ± 18	425 ± 120	2,83	$< 0,001$
"-	10	203 ± 53	90 ± 18	0,44	$> 0,05$
Тактивин	10^{-2}	191 ± 96	295 ± 186	1,54	$> 0,05$
"-	10^{-1}	220 ± 64	864 ± 187	3,93	$< 0,01$
"-	1	256 ± 40	639 ± 123	2,50	$< 0,05$

timoцитах является терминальный остаток D-галактозы, который сиалируется в процессе созревания клеток. Вследствие этого утрачивается способность к связыванию данного лектина. Уменьшение под воздействием тимусных гормонов способности тимоцитов к связыванию RNA может быть обусловлено либо сиалированием поверхностной мембраны, либо маскировкой рецепторов вследствие иных перестроек структуры мембран. Для выяснения этого вопроса были поставлены опыты по дополнительной обработке тимоцитов нейроаминидазой одновременно и после воздействия одного из препаратов тимусных гормонов - тимоптина. Сама по себе обработка нейроаминидазой способствует появлению рецепторов почти на всех тимоцитах (99,0%) по сравнению с интактным контролем (82,8%). Тимоптин снижал экспрессию RNA -рецептора до 73,3%. В то же время при совместной обработке клеток тимоптином и нейроаминидазой процент RNA^+ клеток составлял 84,6, т.е. число RNA^+ клеток было ниже, чем при обработке одной нейроаминидазой. Это свидетельствует о том, что моделирующее действие тимоптина, как, возможно, и других подобных факторов, на экспрессию RNA -рецептора опосредуется не через воздействие на процесс сиалирования мембранных гликопро-

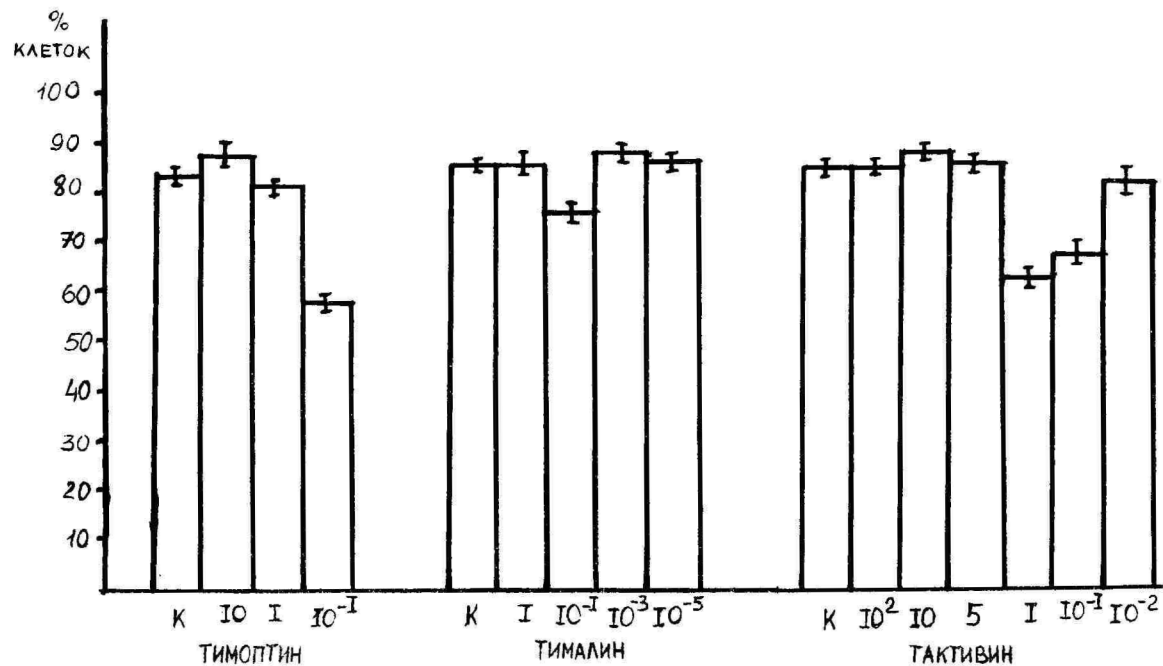


Рис. Изменение экспрессии рецептора к РПА на тимоцитах под влиянием тимоптина, тималина и тактивина

теинов или же не только через этот механизм.

Таким образом, сравнительное изучение отечественных препаратов тимусных гормонов: тимоптина, тактивина и тималина показало, что все они в определенных дозах способствуют фенотипическому (утрата PNA-рецептора и снижение плотности Thy-I,2 антигена) и функциональному (приобретение способности отвечать пролиферацией на субоптимальную дозу ФГА) созреванию PNA⁺ кортикальных тимоцитов в PNA⁻ медуллярные. То, что мишенью для их действия является данный тип изучаемых клеток, свидетельствует о комплексности препаратов. Так, при детальном изучении влияния на дифференцировку PNA⁺ тимоцитов других препаратов (тимостимулин) и синтетических фрагментов тимусных гормонов нами показано, что таким действием обладают отнюдь не все препараты. Кроме того, фенотипические модификации не обязательно сопровождаются функциональным созреванием PNA⁺ клеток. Последнее достигается, по-видимому, действием специфического сигнала определенных тимусных гормонов.

Л и т е р а т у р а

1. Арион В.Я.//Итоги науки и техники. Серия:Иммунология. - М., 1981. - Т. 9. - С. 10-50.
2. Морозов В.Е., Хавинсон В.Х., Писарев О.А.//Докл.АН СССР, 1977. - Т. 223. - № 3. - С. 491-494.
3. Никонова М.Ф., Михна М.Г., Сорокина Н.И. и др. // Иммунология. - 1987. - № 5. - С. 58-61.
4. Ярилин А.А., Мирошниченко И.В., Михна М.Г. и др.// Иммунология. - 1986. - № 3. - С. 23-26.
5. Bach J.F., Dardenne M., Plean J.M. //Nature.-1977. - Vol. 266. - P. 55.
6. Goldstein G., Schlesinger G.H. // Lancet. - 1975.- Vol. 11. - N 7928. - P. 256-259.
7. Low T.L., Goldstein A.L. // Thymic Hormones and Lymphokines, 1984. - P. 21-35.
8. Reisner J., Linker-Israeli M., Sharon N. // Cell. Immunology. - 1976. - Vol. 25. - P. 129-134.
9. Sharon N. // Adv. Immunol. - 1983. - Vol. 34. - P. 213-298.

СЕЛЕКТИВНОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КЛОНОВ МЕТОДАМИ ЛЕКТИНОВОЙ ГИСТОХИМИИ

А.Д.Луцки, Е.С.Детик
Львовский медицинский институт

Применение лектинов в качестве селективных гистохимических маркеров — пример прикладного использования уникальных свойств этих биологически активных веществ для решения задач морфологии.

В основе способности лектинов избирательно окрашивать определенные кланы клеток, а в ряде случаев дифференцировать отдельные субпопуляции в составе неразличимых по другим морфо-гистохимическим признакам клеточных элементов, лежит способность каждого конкретного лектина проявлять максимальное сродство к гликополимерам строго определенного строения. В данном случае первоочередную роль, по-видимому, играют дополнительные факторы связывания — характер гликозидной связи, конфигурация и разветвленность олигосахаридной цепи, влияние близлежащих к концевому моносахаридному остатку химических радикалов и функциональных групп /5/. Таким образом, если возможность присутствия одного из шести распознаваемых лектинами моносахаридных остатков в составе гликополимеров определенной популяции клеток и его отсутствие в окружающих тканевых структурах представляется весьма маловероятной, то с учетом дополнительных факторов связывания количество возможных вариантов гликоконъюгатов, дифференцируемых с помощью лектинов, резко возрастает. Соответственно повышается вероятность присутствия определенной разновидности гликополимеров в одной клеточной популяции и их отсутствия у соседних. Обнаруженные нами возможности применения лектинов в качестве селективных гистохимических маркеров суммированы в таблице I.

Способность тех или иных лектинов избирательно связываться с определенными популяциями клеток, как правило, можно обнаружить лишь в результате эмпирических поисков, так как влияние дополнительных факторов связывания, равно как и отсутствие исчерпывающей информации относительно структуры подавляющего большинства тканевых и клеточных гликоконъюга-

тов, делают невозможным теоретическое прогнозирование результатов гистохимических реакций. Анализ данных литературы показал, что используемые в настоящее время лектин-рецепторные системы не предусматривают абсолютной селективности маркирования: клетки или элементы экстрацеллюлярного матрикса выявляются при обработке тем или иным лектином на фоне ареактивности окружающих тканевых структур отдельного органа или ткани; в целом организме, как правило, всегда находятся линии или популяции клеток, проявляющие повышенное сродство к данному лектину.

Наш опыт работы с лектинами показывает, что для эффективного проведения селективного гистохимического маркирования с помощью лектинов необходим ряд предпосылок. В частности, исследуемый орган или ткань должны отличаться разнообразием составляющих структурных компонентов, включая возможно большее число клеточных популяций, элементов внеклеточного матрикса с различными гистохимическими характеристиками. Рецепторы лектинов должны располагаться равномерно в цитоплазме клеток, либо занимать их обширные компартменты. Более четко маркируются клетки с низким ядерно-цитоплазматическим соотношением, поскольку ядро и карิโอлема, как правило, лишены рецепторов лектинов. Маркирование клеток только на основе выявления гликоконъюгатов в составе плазмалеммы затруднительно в связи с недостаточной интенсивностью окрашивания, а также наличием в составе плазмалеммы большинства клеток разнообразных гликополимеров, что снижает селективность маркирования.

Для воспроизведения результатов, полученных различными авторами, необходимо соблюдение оригинальных условий фиксации, подготовки гистологического материала для исследования, способов метки лектинов и обработки ими срезов /5/. Необходимо учитывать, что гистотопография рецепторов лектинов определяется генетическими факторами и зависит от вида, линии животных /13/, а у человека — от способности отдельных клеточных популяций к экспрессии антигенов групп крови системы АВН. В частности, для гистохимического обнаружения антигенных детерминант групп крови человека в составе отдельных групп клеток используют лектины долихоса и улетки

Таблица I

Селективное маркирование лектинами клеток, элементов экстрацеллюлярного матрикса человека и животных

Клетки, неклеточные тканевые структуры, селективно связывающие лектин	Видовая принадлежность	Наименование лектина	Источник литературы
Эндотелиоциты аорты	Человек	Лектин бобовника анагирилистного	4
Нейрофильные сегментоядерные гранулоциты	Человек	Лектин арахиса, лектин сои	2
Нейроциты автономных ганглиев аорты	Человек	Лектин сои	4
Внутренняя эластическая мембрана артерий	Человек	Лектин сои	6
Эпителиоциты больших слюнных желез, продуцирующие инсулиноподобный белок	Человек, крыса	Конканавалин А	8
Тканевые базофилы	Человек, крыса	Лектин арахиса, лектин сои	8
Клетки выводных протоков поднижнечелюстной и подъязычной слюнных желез	Крыса	Лектин бобовника анагирилистного	8
Клетки серозных поддунной подъязычной слюнной железы	Крыса	Конканавалин А, лектин клешевины	8
Клетки эпителиальной выстилки желудка	Крыса	Лектин зародышей пшеницы	6
Щечные мукоциты собственных желез желудка	Крыса	Лектин сои	6
Паристальные glanduloциты собственных желез желудка	Крыса	Лектин зародышей пшеницы	6
Нейроциты автономных ганглиев поднижнечелюстной слюнной железы	Крыса	Конканавалин А	7
Фолликулоциты яичника	Мышь	Лектин сои	I
Прозрачная оболочка овоцитов	Мышь	Лектин зародышей пшеницы	I
Лuteоциты яичника	Мышь	Лектин арахиса, лектин бобовника анагирилистного	I
Клетки эпителиальной выстилки яйцевода	Мышь	Лектин зародышей пшеницы	I
Клетки эпителиальной выстилки матки и желез эндометрия	Мышь	Лектин бобовника анагирилистного	I
Сперматогенный эпителий извитых семенных канальцев (акросомы)	Мышь	Лектин сои	I
Клетки эпителиальной выстилки канальцев придатка семенника	Мышь	Конканавалин А	I

(анти-А), изолектин бандерейн и лектин яичников рыбы вьюна (анти-В), а также утесника европейского (анти-Н) /9, 10, 11, 14, 15/.

Лектины позволяют не только идентифицировать отдельные кланы клеток, но и выявлять субпопуляции в составе неразличимых по другим морфо-гистохимическим признакам клеточных групп, а также проводить обнаружение морфологически и топографически разнородных клеток организма, выполняющих общую функцию. С помощью маркирования лектинами возможно уточнение существующих классификаций компонентов различных видов тканей, установление линейной принадлежности тех или иных клонов клеток в составе органов животных-химер /13, 16/. Следует отметить, что в ряде случаев лектины по постоянству маркирования отдельных патологически измененных линий клеток превосходят даже моноклональные антитела /12/.

Установлено, что рецепторы лектинов сохраняются в трупном материале в течение 24-48 ч и более, причем существует коррелятивная зависимость между временем, прошедшим с момента наступления смерти и редукцией связывания лектинов с теми или иными гистологическими структурами. В частности, показано, что связывание лектина клешевины с миофибриллами миокардиоцитов, элементами почечных клубочков, базальной мембраной эпидермиса крысы и человека сохраняется неизменным в течение 24 ч и редуцируется через 48 ч после наступления смерти. Связывание этого же лектина гликополимерами эпителиоцитов канальцев нефронов остается неизменным вплоть до 48 ч после наступления смерти, полная редукция связывания отмечалась только на 8-е сутки /3/. Таким образом, изменения в маркировании лектинами могут найти применение в судебно-медицинской практике в качестве дополнительных критериев при определении времени наступления смерти.

Картирование структурных компонентов органов и тканей человека и экспериментальных животных может принести несомненную пользу при изготовлении гистологических препаратов, предназначенных для учебных целей.

Л и т е р а т у р а

1. Волкова О.В., Луцик А.Д., Детюк Е.С. и др. Углеводные детерминанты органов репродуктивной системы мыши по данным использования лектинов различной специфичности // Арх. Луцик А.Д.

2. Дмитрук И.М., Зербино Д.Д., Луцик А.Д. Рецепторы лектинов в переходно-клеточных опухолях мочевого пузыря // Вопр. онкологии. - 1987. - Т. 33. - № 4. - С. 60-65.

3. Зеленгуров В.М., Луцик А.Д., Луцик М.Д., Петровская Н.Ю. Экспериментальное исследование посмертных изменений тканевых структур с применением лектинов клешиевины обыкновенной // Суд. мед. эксперт. - 1979. - Т. 22. - № 4. - С. 31-34.

4. Зербино Д.Д., Луцик А.Д., Котик А.Е. и др. Расслаивающая аневризма аорты: гистохимическое исследование с применением набора лектинов различной углеводной специфичности // Арх. пат. - 1987. - Т. 49. - № 3. - С. 20-24.

5. Луцик А.Д., Детюк Е.С. Применение лектинов в светооптической гистохимии (методические аспекты) // Арх. анат. - 1987. - Т. 92. - № 6. - С. 74-89.

6. Луцик А.Д., Котик А.Е. Применение полутонких срезов для гистохимического исследования углеводсодержащих биополимеров клеток и тканей с помощью лектинов // Бюл. экспер. биол. мед. - 1985. - Т. 100. - № 12. - С. 755-758.

7. Луцик А.Д., Яшенко А.М., Детюк Е.С. Связывание лектинов структурами поднижнечелюстной слюнной железы крыс в постнатальном онтогенезе при тиреоидной патологии // Арх. анат. - 1987. - Т. 92. - № 2. - С. 40-48.

8. Луцик А.Д., Яшенко А.М., Детюк Е.С., Луцик М.Д. Рецепторы лектинов в слюнных железах крыс в процессе постнатального развития // Арх. анат. - 1986. - Т. 91. - № 8. - С. 27-34.

9. Луцик М.Д., Луцик А.Д. Препараты лектинов для диагностики групповых антигенов крови // Тез. докл. II Всесоюз. съезда гематологов и трансфузиологов. - М., 1985. - С. 308.

10. Laden S.A., Schulte B.A., Spicer S.S. Histochemical evaluation of secretory glycoproteins in human salivary

glands with lectinhorseradish peroxidase conjugates // J. Histochem. Cytochem. - 1984. - Vol. 32. - N 9. - P. 965-972.

II. Mazzuca M., Lhermitte M., Lafitte J.J., Roussel P. Use of lectins for detection of glycoconjugates in the glandular cells of the human bronchial mucosa // J. Histochem. Cytochem. - 1982. - Vol. 30. - N 9. - P. 956-966.

12. Miettinen M., Holthöfer H., Lehto V. et al Ulex europaeus I lectin as a marker for tumors derived from endothelial cells // Am.J.Clin.Path.-1983.-Vol.79.-N 1.-P32-36.

13. Ponder B.A.G. Lectin histochemistry // Immunocytochemistry. Practical application in pathology and biology (Eds.J.M.Polak,S. van Noorden).Bristol,1983. - P. 129-142.

14. Schulte B.A., Spicer S.S. Light microscopic histochemical detection of sugar residues in secretory glycoproteins of rodent and human tracheal glands with lectin-horseradish peroxidase conjugates and the galactose oxidase-Schiff sequence //J.Histochem.Cytochem.-1983.-Vol.31.-P.391.

15. Schulte B.A., Poon K.C., Rao K.P.P., Spicer S.S. Lectin histochemistry in human cervix // Histochem.J.-1985. - Vol. 17. - N 6. - P. 627-654.

16. Yamagami T., Hosaka M., Mori M. Classification of skeletal muscles with lectin binding // Cell. Mol. Biol. - 1985. - Vol. 31. - N 4. - P. 241-249.

АНТИВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ЛЕКТИНОВ КАЛАНХОЭ

А.И.Евтушенко

Киевский медицинский институт

В последнее время в вирусологической практике для изучения взаимодействия вирусов и клеток, структуры вирусных частиц находят широкое применение лектины. Связывая углеводные остатки оболочек, лектины также могут инактивировать вирусы. Связь лектина с вирусом может разрываться при введении в систему специфических ингибиторов лектинов.

Антивирусной активностью обладают многие известные лектины. Так, конканавалин А и ФГА, связывая рецепторы, блокируют адсорбцию вирусов на клетках. В культуре клеток эти

лектины ингибируют репродукцию вирусов простого герпеса, Сендай, осповакцины, псевдобешенства, краснухи, ЕСНО, везикулярного стоматита, полиомиелита, орто- и парамиксовирусы /2-6/.

Целью наших исследований явилось изучение антивирусных свойств препаратов из растений рода Каланхоэ в отношении вирусов различных таксономических групп.

При сравнительном изучении 58 видов Каланхоэ выявлены 8 растений, препараты которых обладают высокой вирулицидной активностью в отношении вирусов полиомиелита II типа, Коксаки В-1, Коксаки В-6, вирусов везикулярного стоматита, гриппа, бактериофага Т2.

Экспериментально обоснован метод выделения антивирусного фактора каланхоэ, включающий предварительную очистку колоночной хроматографией с использованием в качестве сорбентов грубодисперсного бентонита и ионно-обменной смолы ФАФ. Метод позволяет очистить препарат на 80% от балластных белков и на 30% от углеводов с сохранением исходной антивирусной активности. Для выделения непосредственно активного начала наиболее эффективным оказался способ, основанный на этанольном осаждении. При этом удается не только выделить, но частично и сконцентрировать активное начало.

Лектины каланхоэ обладают способностью в различной степени агглютинировать эритроциты человека, курицы, лошади, барана, кролика.

Обнаружена корреляция между гематглютинирующей и антивирусной активностью каланхоэ. Такая зависимость прослеживается практически для всех видов каланхоэ. Корреляция сохраняется на этапах очистки и выделения антивирусного начала, когда препараты освобождаются от многих балластных веществ.

По имеющимся в литературе данным, содержание лектинов в растениях подвержено изменениям в течение года. Максимальное их количество накапливается в период наиболее интенсивного развития того вегетативного органа (семена, корни, кора и т.д.), в котором они содержатся /1/. Как показали специально проведенные эксперименты и анализ данных, полученных при изучении вирулицидных свойств, для каланхоэ также

свойственны колебания антивирусной активности на протяжении года. Наблюдаются два пика антивирусной активности — весенний и летне-осенний. Максимумы активности совпадают с началом бутонизации и периодом наиболее интенсивного роста каланхоэ.

Механизм антивирусного действия лектинов состоит в конкурентном связывании вирусных рецепторов. При этом вирусные частицы теряют свою инфекционность и склеиваются (вирулицидное действие). Вирусостатическая активность лектинов проявляется в основном на ранних этапах вирусной репродукции и объясняется связыванием клеточных рецепторов, необходимых для прикрепления вирусов. Лектины могут и блокировать участки клеточной мембраны, участвующие в выходе вирусов из клетки, что выражается в ингибировании поздних этапов вирусной репродукции /3, 6/.

При изучении механизма антивирусного действия лектинов каланхоэ с использованием электронной микроскопии показано, что непосредственно инактивирующее действие препаратов сопровождается склеиванием вирусных частиц, изменением их морфологии, однако, разрушения вирусов не происходит. Другое проявление антивирусной активности каланхоэ состоит в торможении адсорбции вирусов на клетках. При предварительной обработке культур клеток препаратами каланхоэ вирусы вообще теряют способность адсорбироваться на таких клетках. Выраженный профилактический эффект проявляют каланхоэ и при экспериментальной гриппозной инфекции на уровне целостного организма.

Л и т е р а т у р а

1. Boyd W. The lectins: their present status // Vox Sanguinis. - 1963. - Vol. 8. - P. 1-32.

2. Cartwright B. Effect of concanavalin A on vesicular stomatitis virus maturation. // J.Gen.Virol.-1977.-P.249.

3. Ito M., Barron A. Enhancement by phytohaemagglutinin of inactivation of herpes simplex virus by concanavalin A. // J. Gen. Virol. - 1976. - Vol. 33. - P. 259-266.

4. Stitz L., Reinacher M., Becht H. Studies on the inhibitory effects of lectins on muco-virus release // J.Gen.

Virol. - 1977. - Vol. 34. - P. 523-530.

5. Takehara M. Effect of plan lectins on polykaryocyte formation by vesicular stomatitis virus in BHK-21 cells. // *Microbiol. and Immunol.* - 1979. - Vol. 23. - P. 921-925.

6. Urade M., Sato M., Yoshida H., Sirasuma K., Miyaraki T., Yamamoto N. Effect of concanavalin A on the infectivity of rubella virus and its variants. // *Arch. Virol.* - 1978. - Vol. 56. - P. 359-363.

ОБНАРУЖЕНИЕ ИНСУЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В
ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ И НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ
КЛЕТКАХ НЕЙРОБЛАСТОМЫ C1300 N18

Н.М.Гулая, Е.С.Гаврилюк, М.Д.Луцки,
О.Ф.Передерей

Институт биохимии им. А.В.Палладина
АН УССР, Киев

Вопрос о наличии и распределении инсулиновых рецепторов на поверхности нервных клеток долгое время оставался не выясненным. В последние годы было показано, что в различных отделах нервной системы имеются специфические рецепторы для связывания инсулина. Описаны некоторые характеристики этих рецепторов /4, 6/. Большинство исследований посвящено их изучению в мембранах, выделенных из различных отделов мозга. Работ, посвященных изучению инсулиновых рецепторов в культивируемых нервных клетках, немного /2, 7/.

Цель настоящей работы состояла в выявлении, идентификации и характеристике инсулиновых рецепторов на мембранах клеток нейробластомы C1300 N18, адаптированных к среде Игла.

Для морфологического выявления инсулиновых рецепторов на поверхности клеток в работе впервые использован препарат стабильного комплекса инсулина с коллоидным золотом, которое является весьма удобной меткой в электронной цитохимии. Одновременно с помощью меченого коллоидным золотом овомукоида выявляли гликопротеины, связывающие агглютинин зародышей пшеницы (WGA). Агглютинин зародышей пшеницы использован в связи с тем, что помимо других гликопротеинов он

обладает высоким сродством к инсулиновым рецепторам /3/.

Электронномикроскопические исследования инсулиновых рецепторов клеток нейробластомы проводили, используя комплекс инсулин - коллоидное золото, полученный по ранее описанному для других белков методу /1/. Коллоидное золото стабилизировали инсулином при pH 6,0-6,5, добавляя на каждые 10 мл 0,01%-ного раствора коллоидного золота 60 мкг хроматографически чистого инсулина. Рецепторы агглютинина (WGA) на мембране выявляли непрямым методом, обрабатывая клетки раствором нативного агглютинина (20 мкг/мл) в течение 30 мин, а затем после отмывания от несвязанного агглютинина раствором комплекса овомукоида-коллоидное золото. Агглютинин пшеницы и комплекс овомукоида с коллоидным золотом получены описанным ранее способом /1/.

Реакцию связывания меченных коллоидным золотом комплексов проводили во флаконах Карреля на отмтых забуференным физраствором и кратковременно префиксированных 0,1%-ным глутаровым альдегидом клетках. Время инкубации с комплексом инсулин-коллоидное золото составляло 1 час при 4°C. Для доказательства специфичности связывания проводили контрольные эксперименты в присутствии немеченного инсулина. Дальнейшая обработка клеток для электронномикроскопического исследования осуществлялась общепринятым способом /1/. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме УМТП-4 и просматривали в электронном микроскопе ГБОУ (Япония).

В результате электронно-цитохимического исследования инсулиновых рецепторов с помощью комплексов инсулина с коллоидным золотом установлено, что данный лиганд не проникает через целые плазматические мембраны неповрежденных клеток. Комплексы меченого инсулина располагаются исключительно в области вликокаликса на расстоянии 12 нм от поверхности плазматических мембран. Гранулы коллоидного золота распределяются на поверхности клеток неравномерно, собираясь иногда в группы из двух и более частиц. Подобное неравномерное распределение гликопротеиновых рецепторов на поверхности клеток нейробластомы отмечается также при использовании в качестве лиганда агглютинина (WGA). Возможности и целесообразность применения WGA в данных экспери-

ментах основаны на том, что в молекуле инсулинового рецептора имеются углеводные детерминанты, с которыми связывается данный агглютинин /3/.

Следует отметить, что предложенный метод маркирования инсулина коллоидным золотом менее трудоемок, чем описанный в литературе способ получения конъюгатов инсулина с ферритином /5/. Частицы коллоидного золота, по сравнению с другими электронно-плотными метками, в частности ферритином, более удобны для наблюдения как в просвечивающей, так и в сканирующей микроскопии. Высокая электронная плотность значительно облегчает количественный анализ меток на микрофотографиях.

Специфичность связанного меченого коллоидным золотом инсулина с инсулиновым рецептором доказывается в контрольных экспериментах при избытке немеченого инсулина. В этих случаях метка на поверхности клеток выявляется только в следовых количествах.

Количественный анализ полученных данных свидетельствует о том, что связывание инсулина, маркированного коллоидным золотом, на поверхности дифференцированных клеток увеличивается почти в 10 раз ($0,7 \pm 0,1$ и $6,83 \pm 1,3$ гранул на 1000 нм длины мембраны на срезе недифференцированной и дифференцированной клетки).

Результаты, полученные с использованием WGA, аналогичны данным, полученным с конъюгатом инсулин-коллоидное золото. Однако количество гранул на поверхности клеток было в три раза выше. Это объясняется тем, что кроме инсулиновых рецепторов WGA связывается с рядом других гликопротеинов.

Полученные результаты свидетельствуют, что число и распределение инсулиновых рецепторов зависят от функционального состояния клеток. Экспрессия рецепторов на мембране увеличивается почти в 10 раз в результате клеточной дифференцировки.

Л и т е р а т у р а

1. Хомутовский О.А., Луцки М.Д., Передерей О.Ф. // Электронная гистохимия рецепторов клеточных мембран. - Киев: Наукова думка, 1986. - 168 с.

2. Ciaraldi T., Robbins R., Leidy J.W. et al. // Endocrinology. - 1985. - Vol. 116. - N 6. - P. 2179-2185.

3. Cuatrecasas P. // J. Biol. Chem. - 1973. - Vol. 248. - N 1. - P. 3528-3534.

4. Hendricks S.A., Agardh C.D., Taylor S., Roth J. // J. Neurochem. - 1984. - Vol. 43. - N 5. - P. 1302-1309.

5. Jarett L., Smith R.M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1975. - Vol. 72. - N 9. - P. 3526-3530.

6. Lowe W.J., Lekoith D. // Endocrinology. - 1986. - N 4. - P. 1669-1677.

7. Rinehart C.A., Chen K.Y. // Biochim. et biophys. acta. - 1984. - Vol. 802. - N 3. - P. 515-523.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ СДВИГИ ЛЕКТИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРУЮЩИХСЯ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ СИ300

О.А.Хомутовский, О.Ф.Передерей

Институт биохимии им. А.В. Палладина АН УССР, Киев

Результаты многих исследователей свидетельствуют о том, что в процессе дифференциации клеток изменяется состав, структура и метаболизм основных компонентов гликокаликса - гликопротеинов и гликолипидов /6/. Общеизвестно, что именно эти компоненты гликокаликса осуществляют рецепторную функцию плазматических мембран. В настоящей работе изучение рецепторной функции плазматических мембран клеток нейробластомы СИ300 проводилось с помощью лектинов, которые, как известно, обладают специфической тропностью к сахарным детерминантам гликопротеинов, гликолипидов и гликозаминогликанов. Методика использования лектинов для этой цели описана в нашей предыдущей работе /1/.

В работе использовали лектины трех углеводоспецифических групп: галактозоспецифической (RCA), N-ацетил-D-галактозоспецифической (HPL, SBA, LBA) и N-ацетил-D-глюкозаминоспецифической (WGA). Наличие связывания было обнаружено для всех вышеназванных лектинов как в случае недиф-

дифференцированных, так и в случае дифференцированных клеток. В то же время, количество связанных электроноплотных конъюгатов лектинов на поверхности дифференцированных клеток значительно отличалось от такового на поверхности недифференцированных клеток (таблица). Так, количество конъюгатов RCA-Au, SBA-Au и WGA-Au снижалось в 1,7, 20 и 1,8 раза, HPL-Au и LBA-Au увеличивалось в 2 и 1,8 раза. Кроме того, для трех конъюгатов лектинов - RCA-Au, SBA-Au и WGA-Au изменялся характер расположения на поверхности клеток нейробластомы после их дифференциации.

При интерпретации полученных данных необходимо, по-видимому, учитывать следующие моменты: 1) возможность экранирования углеводных детерминант гликоконъюгатов сиаловыми кислотами; 2) жидкостно-кристаллическое состояние бислоя, от которого зависит конформация и подвижность мембранных рецепторов; 3) возможность стерического взаимодействия между частицами маркера.

В настоящее время совершенно очевидно /1/, что связывание некоторых лектинов, в частности SBA, PNA, RCA, с углеводными детерминантами клеточной поверхности в большой мере зависит от степени сиалирования этих детерминант. А именно, по мере сиалирования терминальных остатков олигосахаридов наблюдается потеря сродства к ним вплоть до полного отсутствия связывания. Поэтому обнаруженное нами снижение связывания SBA с поверхностью дифференцированных клеток нейробластомы еще не дает права говорить об уменьшении числа соответствующих рецепторных гликоконъюгатов. Скорее всего факт снижения связывания SBA объясняется тем, что в процессе созревания клеток происходит сиалирование их поверхностных гликопротеинов /3/. В частности, именно на этом основано использование SBA и PNA для выявления главным образом незрелых клеток /3/.

Что касается RCA, то связывание этого лектина также зависит от степени сиалирования олигосахаридных единиц, хотя и в меньшей мере /2/. В то же время, согласно данным Maher и Molday /5/, RCA связывается почти исключительно с одним гликопротеином плазматической мембраны клеток нейробластомы, а именно, с белком M.v. 30 000, с которым в свою

Таблица

Количество конъюгатов лектинов на поверхности
недифференцированных и дифференцированных
клеток нейробластомы CI300 (M^{\pm}_m)

Конъюгат лектина	Углеводная специфичность лектина	Количество гранул на 1000 нм плазматиче- ской мембраны	
		недиф. клетки	диф. клетки
RCA-Au	два β -/I-4/связанных ос- татка галактозы	40,0 \pm 2,40	24,0 \pm 3,90 ^x
HPL-Au	невосстановленный α - N - ацетил- D -галактозамин	12,3 \pm 0,49	25,5 \pm 1,89 ^x
SBA-Au	α - N -ацетил- D -галактоз- амин	50,0 \pm 2,30	2,5 \pm 0,26 ^x
LBA-Au	α - N -ацетил- D -галактоз- амин	2,6 \pm 0,20	4,3 \pm 0,37 ^x
WGA-Au	терминальные невосстанов- ленные N-ацетилглюкоз- амин- или N-ацетилнейро- миновая кислота	34,0 \pm 6,9	19,4 \pm 1,5 ^x

x - различия достоверны, $P < 0,05-0,001$

очередь связывается и WGA , тропность которого не снижа-
ется при сиапировании олигосахаридов. Однако нами обнару-
жено (таблица), что количество связанных конъюгатов WGA-Au
с поверхностью клеток нейробластомы снижается после их диф-
ференцировки. Принимая во внимание изложенное, можно пред-
положить, что при дифференцировке клеток нейробластомы
уменьшается количество рецепторных полипептидов, с которыми
одновременно связываются как RCA , так и WGA .

Лектины HPL и LBA по углеводной специфичности очень
близки между собой, причем их связывание с олигосахаридами
не ингибируется сиаловыми кислотами /I/. На основании этого
можно предположить, что число рецепторных гликопротеинов,
имевших в качестве углеводной детерминанты α - N -ацетил D -
галактозамин, в процессе дифференцировки клеток нейробласто-
мы увеличивается.

Следует учитывать, что результаты выявления лектиновых
рецепторов методом электронной цитохимии в значительной сте-

пени зависят от стерических взаимодействий как между частями маркера, так и между молекулой рецептора и частицей маркера /7/. Сила этих взаимодействий зависит от удаления сахарной детерминанты от поверхности плазматической мембраны, а также от размера частиц маркера.

В заключение следует сказать, что наличие лектиновых рецепторов на нейтральных клетках было отмечено рядом авторов /5, 8, 4/. Интересно, что во всех исследованиях отмечается накопление участков связывания на пролиферирующих участках аксональных отростков. Более того, Littacue и соотр. /4/ показали, что при дифференцировке в нейритах клеток нейробластомы ряда линий обнаруживается в несколько раз больше фукозосодержащего гликопротеина, чем в телах недифференцированных клеток. На основании этого авторы предположили, что лектиновые рецепторы могут принимать непосредственное участие в формировании аксонов и образовании синапсов. Для подтверждения этого предположения необходимы дальнейшие исследования с использованием как можно большего арсенала лектинов узкой специфичности, причем не только цитохимическими, но и биохимическими методами.

Л и т е р а т у р а

1. Хомутовский О.А., Луцки М.Д., Передерей О.Ф. Электронная гистохимия рецепторов клеточных мембран. - Киев: Наукова думка, 1986. - 168 с.
2. Adair W., Kornfeld S. // J. Biol. Chem. - 1974. - Vol. 249. - N 5. - P. 4696-4704.
3. Dumont F., Nardelli J. // Immunology. - 1979. - Vol. 37. - N 1. - P. 217-224.
4. Littauer U.Z., Giovanni M.Y. // J. Biol. Chem. - 1980. - Vol. 255. - N 11. - P. 5448-5453.
5. Maher P., Molday R. // Biochem. et biophys. acta. - 1981. - Vol. 647. - N 2. - P. 259-269.
6. Monsigny M., Kieda C., Roche A.-C. // Biol. Cell. - 1983. - Vol. 47. - N 2. - P. 95-110.
7. Norisberger M., Taelnline-Vonlanthen M. // Lectins: biology, biochemistry, clinical biochemistry. - Berlin, New York: Gruyter. - 1983. - Vol. 3. - P. 189-197.

8. Raedler A., Raedler E. // J. Cancer Res.Clin.Oncol.
- 1985. - Vol. 109. - N 1. - P. 245-251.

ЛЕКТИНОПОДОБНОЕ ДЕЙСТВИЕ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

Е.И.Асташкин, А.М.Сурин, А.С.Гуковская,
И.С.Николаева, А.В.Лазарев
ВНИИ биотехнологии, г. Москва

B-субъединицы холерного токсина (B-ХТ), ответственные за связывание с поверхностью клетки, селективно взаимодействуют с ганглиозидом G_{M1} , образуя прочные комплексы ($K_{дис.} 10^{-9} - 10^{-10} M$). При этом одна B-субъединица связывается с одной молекулой G_{M1} , а в молекуле токсина присутствуют 5 B-субъединиц. Таким образом, холерный токсин, благодаря 5 B-ХТ, полностью удовлетворяет требованиям, предъявляемым к лектинам: он избирательно узнает специфическую последовательность углеводов, характерную только для G_{M1} , и поливалентно связывается с G_{M1} . Благодаря последнему свойству, токсин способен образовывать на плазматической мембране "шапочки", состоящие из комплексов B-ХТ - G_{M1} .

В 1985 г. было обнаружено митогенное действие B-ХТ на тимоцитах крыс /2/, позже воспроизведенное на ЗТЗ клетках мышей /3/. Известно, что такие растительные лектины, как фитогемагглютинин (ФГА) и конканавалин А (Кон А) запускают пролиферацию Т-лимфоцитов человека и животных. Митогенный эффект этих лектинов связывают с увеличением внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). В связи с этим целью нашей работы заключалась в том, чтобы выяснить, способен ли B-ХТ изменять уровень $[Ca^{2+}]_i$ в тимоцитах крыс.

Уровень $[Ca^{2+}]_i$ в тимоцитах крыс Вистар определяли с помощью флуоресцентного индикатора Квин-2 на флуориметре Хитачи-Ф-4000 по методу Tsien и соавт. /4/. Опыты проводили в термостатируемой камере при 37°C, суспензию клеток (10^6 клеток/мл среды Хенкса) перемешивали с помощью магнитной мешалки.

Добавление B-ХТ к суспензии тимоцитов крыс (1-2 мкг/мл) приводило к увеличению флуоресценции квина. Был зарегистри-

рован аддитивный эффект В-ХТ с Кон А (рис. 1) и В-ХТ с ФГА, что указывает на независимый характер действия В-ХТ и стандартных митогенов. Такие же результаты были получены в работе Dixon и соавт. [1] на тимоцитах крыс Спрег-Доули и Вистар, обработанных В-ХТ и Кон-А.

Влияние В-ХТ на Ca^{2+} пропадало в бескальциевой среде, содержащей 1 мМ ЭГТА, т.е. при действии В-ХТ ионы Ca^{2+} , по-видимому, "поступают" в клетки только из инкубационной среды. Однако ингибиторное действие ЭГТА было зарегистрировано в среде, содержащей 1,3 мМ Ca^{2+} и только 0,1 мМ ЭГТА, которая в данной концентрации не может связать весь кальций инкубационной среды. Изучение взаимодействия В-ХТ с G_{MI} в растворе по смещению собственной флуоресценции В-ХТ в голубую область показало, что ЭГТА в концентрации 0,1-1,0 мМ не влияет на этот процесс.

Одной из важнейших характеристик ионного канала является его специфичность. Если действие В-ХТ на Ca^{2+} обусловлено образованием кальциевого канала через плазматическую мембрану тимоцитов, то интересно было бы проследить за влиянием на этот "канал" других двухвалентных катионов, в частности ионов Mn^{2+} . Оказалось, что Mn^{2+} в концентрации 0,1 мМ полностью подавляет эффект В-ХТ (рисунок 2), при этом Mn^{2+} не влияет на взаимодействие В-ХТ с G_{MI} в растворе. "Канал", образующийся при взаимодействии с тимоцитами В-ХТ был "высокоспецифичен" для ионов Ca^{2+} , т.к. ионы Mn^{2+} через этот "канал" не проходили в отличие от того, что наблюдается при обработке тимоцитов на фоне 0,1 мМ Mn^{2+} иономицином, когда флуоресценция квиона в клетке резко падает до уровня собственной флуоресценции клеток (рисунок 2). Наконец, ингибиторное действие Mn^{2+} в отношении В-ХТ может быть связано с тем, что Mn^{2+} гасит флуоресценцию квиона в инкубационной среде, в которую он выходит из клеток, на который и влияет В-ХТ. Для проверки этого предположения было изучено действие В-ХТ после предварительной его инкубации с избытком G_{MI} на клетки, прокрашенные квином. Увеличение флуоресценции клеток в ответ на добавление В-ХТ, связанного с G_{MI} , сохранялось. Эти данные позволяют предположить, что наблюдаемое увеличение флуоресценции квиона в суспензии тимоцитов, возможно, не обусловлено действием самих В-ХТ на

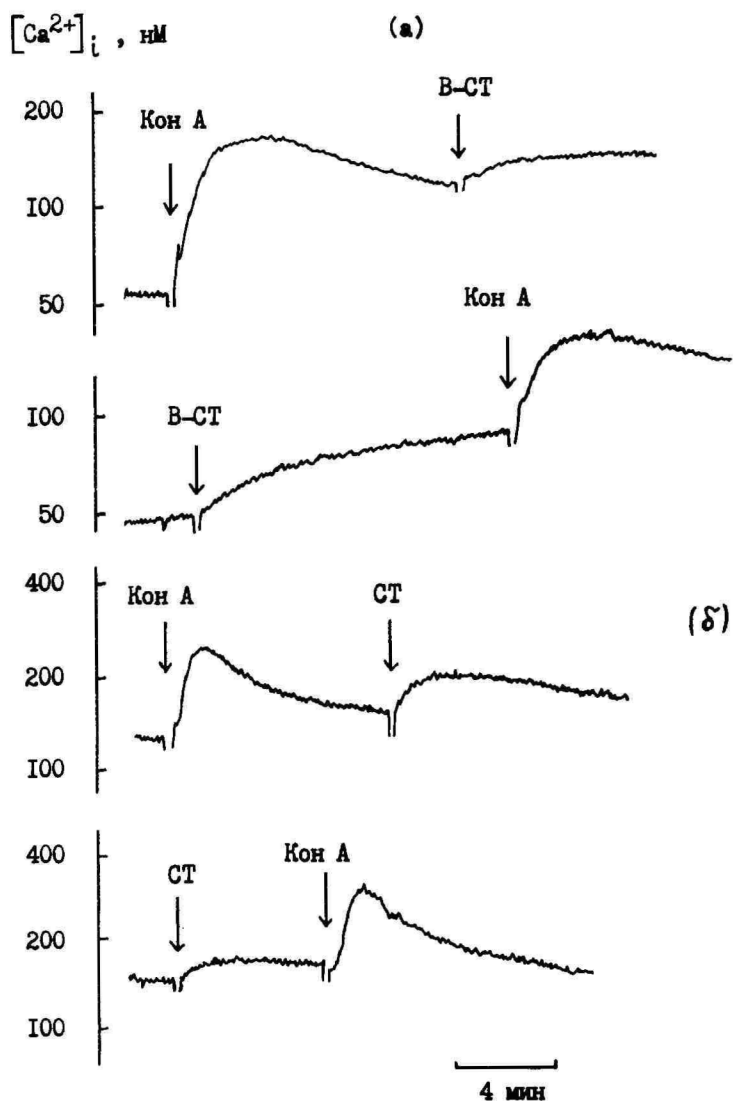


Рис. 1. Влияние конканавалина А (Кон А), В-субъединиц холерного токсина (В-СТ) и холерного токсина (СТ) на концентрацию свободных ионов Ca^{2+} в тимоцитах крысы, рассчитанную по флуоресценции Квин-2

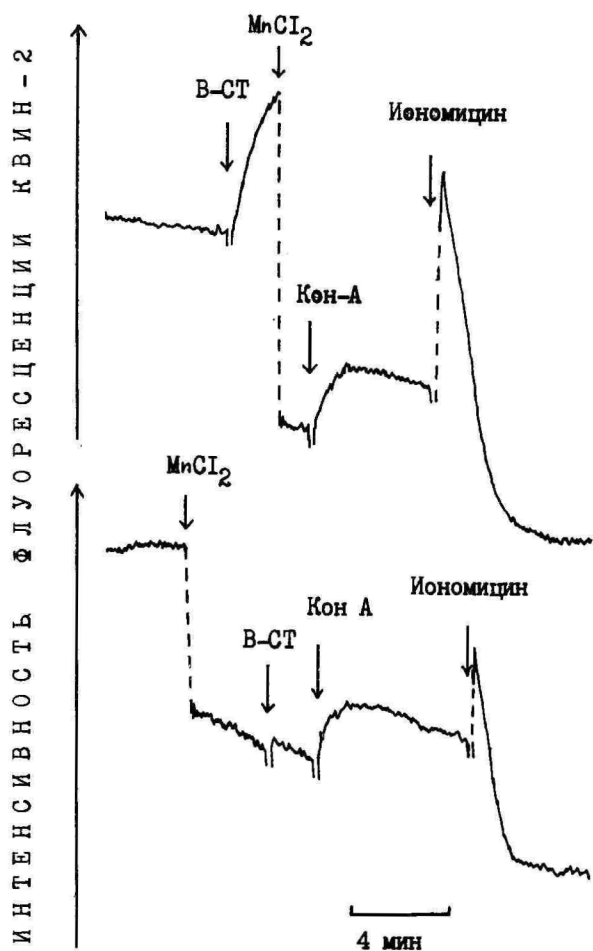


Рис.2. Изменения флуоресценции тимоцитов крысы, нагруженных Са-индикатором Квин-2, под влиянием тушителя флуоресценции $MnCl_2$, В-СТ, Кон А и ионофора иономицина.

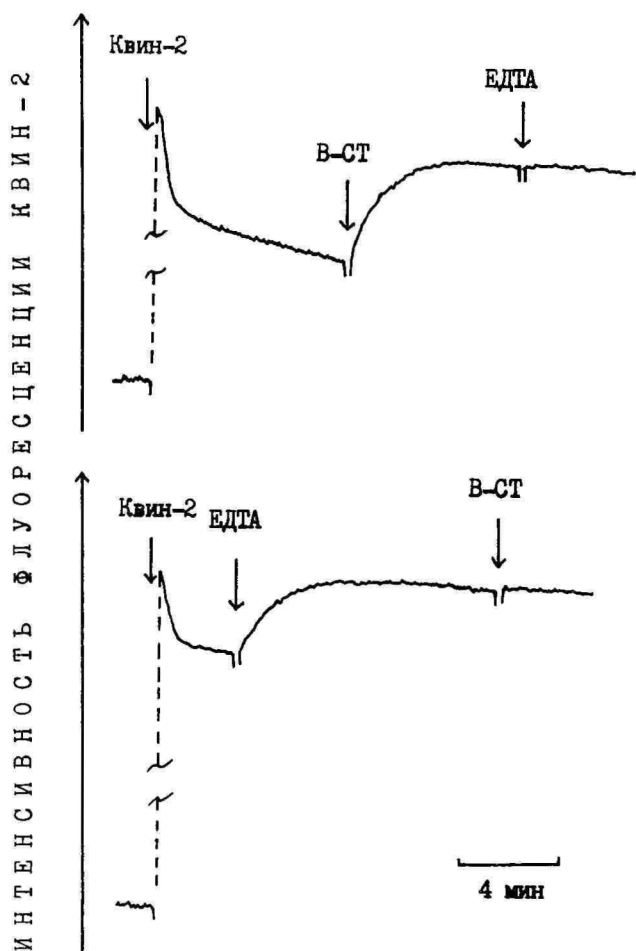


Рис. 3. Влияние В-СТ и EDTA на флуоресценцию Квин-2 кислоты в инкубационной среде без клеток

мембраны клеток. В состав коммерческого препарата, кроме В-ХТ, входят также 1 мМ ЭДТА, 3 мМ азида натрия и 200 мМ хлорида натрия. Очевидно, что действующим началом является один из этих компонентов. Чтобы избавиться от ЭДТА и азида натрия, был проведен диализ коммерческого препарата В-ХТ через амиконовые фильтры. В-субъединицы холерного токсина после диализа в концентрации 1-2 мкг/мл не влияли на флуоресценцию тимоцитов, меченных квином. При этом В-ХТ после диализа эффективно связывались с G_{MI} в растворе. Учитывая эти результаты, в ряде опытов было изучено влияние исходного препарата В-ХТ на клетки, предварительно обработанные препаратом В-ХТ после диализа. В этих опытах исходный В-ХТ увеличивал флуоресценцию клеток, несмотря на то, что все молекулы G_{MI} мембран тимоцитов были, очевидно, уже связаны диализованным В-ХТ. Это еще раз подтверждает предположение, что наблюдаемый эффект не обусловлен мембранотропным действием В-ХТ. Чтобы окончательно убедиться в этом, было изучено влияние В-ХТ на флуоресценцию квиин кислоты, добавленной к инкубационной среде без клеток. И в этом случае В-ХТ увеличивал флуоресценцию квиин кислоты. Последующее добавление ЭДТА на фоне В-ХТ не влияло на флуоресценцию раствора. Первоначальная обработка раствора квиин кислоты ЭДТА сопровождалась эффектом, идентичным действию В-ХТ, последующая добавка В-ХТ также не влияла на флуоресценцию (рисунок 3.).

Эти данные свидетельствуют об отсутствии влияния В-ХТ на $[Ca^{2+}]_i$, а наблюдаемые изменения, по-видимому, обусловлены связыванием следов тяжелых ионов ЭДТА, присутствующей в коммерческих препаратах В-ХТ, которые гасят флуоресценцию квиина в инкубационной среде.

Таким образом, на основании представленных данных, мы приходим к выводу, что митогенный эффект В-субъединиц холерного токсина на тимоциты крыс невозможно объяснить увеличением внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция.

Л и т е р а т у р а

1. Dixon S.J., Stewart D., Grinstein S., Spiegel S. // J. Cell. Biol. - 1987. - Vol. 105. - P. 1153-1161.
2. Spiegel S., Fishman P.H., Weber R.S. // Science. - 1985. - Vol. 230. - P. 1285-1287.
3. Spiegel S., Fishman P.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. - 1987. - Vol. 84. - P. 141-145.
4. Tsien R.Y., Pozzan T., Rink T.J. // J. Cell Biol. - 1982. - Vol. 94. - P. 325-334.

МИТОГЕННАЯ И МУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ФУКОЗОСПЕЦИФИЧНОГО ЛЕКТИНА АЗОСПИРИЛЛ

Ю.В.Итальянская, В.Е.Никитина, Н.П.Панина,
С.К.Кураксина

Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов АН СССР,
Центральная научно-исследовательская
лаборатория Саратовского медицинского
института

В последние годы лектины находят все большее применение в практике медико-биологических исследований в качестве реагентов диагностических тестов, а также, в ряде случаев, в качестве лекарственных препаратов. Широкое использование лектинов (в основном, растительных) в медицине обусловлено уникальными возможностями этих белков как регуляторов метаболических процессов /2/. Одним из наиболее ярких биологических эффектов, проявляемых лектинами, является стимуляция роста и пролиферации покоящихся лимфоцитов /4, 6/. Это свойство впервые обнаружено у ФГА фасоли и определено как митогенная активность.

Активация покоящихся лимфоцитов лектинами - удобная модель для изучения реакции лимфоцитов на специфические антигены, поэтому исследованию названного феномена уделяется значительное внимание. Реакция бластной трансформации лимфоцитов широко применяется в экспериментальной медицине, клинической диагностике. Однако вопрос о механизмах митогенной стимуляции окончательно не выяснен. Предсказать ми-

тогенную активность косвенно, по структуре и физико-химическим свойствам лектинов, в настоящее время не представляется возможным. Единственным критерием является экспериментальное испытание бластогенного эффекта.

В наших исследованиях изучалась митогенная активность фукозоспецифичного лектина почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7. Использовали лимфоциты периферической крови человека 0(I) группы, которые выделяли в градиенте плотности фиколла/3/. Инкубацию с раствором лектина (50 мкг/мл) проводили в течение 90 часов. Морфологический учет результатов эксперимента проводили в мазках, фиксированных метанолом и окрашенных по Романовскому-Гимзе.

Полученные экспериментальные данные показывают, что более трети всех живых лимфоцитов после 80 часов контакта с лектином трансформировались в типичные бласты. В некоторых из этих клеток были отчетливо видны фигуры митоза. Около четверти всех клеток представляли собой переходную форму — так называемые большие лимфоциты с признаками трансформации в бласты. Результаты количественного учета бластогенного эффекта лектина азоспириллы представлены в таблице I.

Таблица I

Митогенная активность фукозоспецифичного лектина азоспириллы в культуре лимфоцитов человека

Условия эксперимента	Время культивирования, ч	Малые и средние лимфоциты	Бластогенный эффект		
			типичные бласты, %	большие лимфоциты	митозы, %
Бактериальный лектин	90	42,0	35,0	23,0	3,0
Контроль	90	98,6	0,6	0,8	-

Таким образом, установлена достаточно выраженная бластная трансформация человеческих лимфоцитов под влиянием фукозоспецифичного лектина азоспириллы, хотя метод морфологического учета реакции бласттрансформации дает несколько заниженный процент измененных клеток, т.к. в результате деления типичных бластов образуются клетки, которые учитываются

как малые лимфоциты.

При выявлении новых лектинов, прежде чем оценить возможность их применения в качестве реагентов в медико-биологических исследованиях, необходимо выяснить, не оказывают ли они повреждающего (например, генотоксического) действия на животные клетки. В настоящее время прочное место в системах оценки генотоксичности новых биологически активных препаратов занимают краткосрочные тесты, основанные на регистрации повреждений генетического аппарата клетки /5/.

Мутагенная активность *ф*укозоспецифичного лектина *A. brasiliense* Sp7 оценивалась с помощью одного из цитогенетических методов — кариологического анализа. Работа выполнена на личинках 4-го возраста *Chironomus plumosus*. Анализировалось состояние структуры полнценных хромосом клеток слюнных желез на цитологических давленных препаратах, окрашенных ацетоорсеином с последующей дифференцировкой в молочной кислоте /1/. Живые личинки, а также изолированные слюнные железы хирономид, экспонировали в растворах бактериального лектина различной концентрации (500 мкг/мл, 50 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл). Время экспозиции 20 часов.

Результаты исследования структурного состояния полнценных хромосом хирономид после экспозиции в растворах лектина азоспирилл показали, что во всех вариантах опыта хромосомы имели четкий рисунок дисков, соответствующий нормальному. Не отмечалось изменения длины хромосом. Хотя имелась тенденция к скативу хромосом после инкубации в исходном растворе лектина (500 мкг/мл), однако различия с контролем были статистически недостоверны (таблица 2). Не отмечено грубых деструктивных изменений хромосом таких, как деспирализация до состояния плоской ленты, грануляция дисков, уширение междисков. Однако низкие концентрации бактериального лектина (10 и 1 мкг/мл) все же вызвали слабые изменения в структуре хромосом. Отмечалась некоторая индукция пуффинговой активности в I и III хромосомах, формирование заметного гетерохроматинового участка в центромерном районе II хромосомы, асимметрия колец Бальбиани в гомологах IV хромосомы. Высокие концентрации лектина таких изменений практически не вызвали.

Таблица 2

Длина хромосом клеток сленных желез хирономид
после экспозиции в растворах лектина азоспирилл
(n=25)

Концентрация лектина, мкг/мл	Длина хромосом, мкм			
	1	2	3	4
500	122,0±5,7	114,3±4,2	78,5±3,1	39,1±2,9
50	138,3±7,3	120,1±6,9	113,8±4,7	50,3±4,6
10	142,5±13,3	135,4±11,1	102,4±8,1	39,9±7,6
1	151,2±9,3	140,4±8,2	131,1±6,5	63,6±2,7
Контроль	145,4±8,9	129,8±6,6	108,3±6,9	53,1±1,8
	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05

Л и т е р а т у р а

1. Анкулова Е.Д. // Онтогенез. - 1987. - № 5. - С. 469-477.
2. Лактин В.М. // Биотехнология. - 1986. - № 6. - С.66-79.
3. Хейфец Л.Б., Абалакин В.А. // Лабораторное дело. - 1973. - № 10. - С. 579-581.
4. Edelman G. // Control of proliferation in animal cells / Eds Clarkson B., Baserga R. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1974. - P. 357-377.
5. Guide to short-term for detecting mitogenic and carcinogenic chemicals. Geneva: World Health Organization, 1985. - 205 p.
6. Larsson E., Coutinho A. // Nature. 1979. - Vol. 280. - P. 239-241.

ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ И СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ГЕМОПОЭЗ
ДЕЙСТВИЕ ЛЕКТИНОВ ИЗ КУКУРУЗНЫХ РЫЛЕЦ

Н.А.Петруша

Институт проблем онкологии им. Р.Е.Кавецкого
АН УССР, г. Киев

Лектины представляют собой гетерополимеры и обладают способностью связываться с различными углеводами клеточной

поверхности, вызывая их агглютинацию. Обнаружено, что рецепторные гликопротеиды для одного и того же лектина в нормальных и злокачественно трансформированных клетках не идентичны. Показано также, что опухолевые клетки содержат большее число рецепторов для лектинов, снабжены большим количеством микроворсинок и имеют более обширную поверхность для контактов /3/.

Злокачественная трансформация клеток сопровождается повышением уровня связывания лектинами клеточных мембран пораженного органа (печень, поджелудочная железа, почки, слизистая желудка и др.). При этом возрастает синтез молекул-рецепторов для лектинов, появляются опухолеспецифические гликопротеиды на поверхности клетки, изменяются характер и интенсивность процессов гликозилирования.

В процессе реверсии культивируемых клеток остеосаркомы человека, индуцированной высокополярными соединениями — диметилсульфоксидом и диметилформамидом, отмечено снижение агглютинации опухолевых клеток в присутствии конканавалина А. После удаления этих индукторов реверсии клетки остеосаркомы возвращались в исходное состояние, проявляя высокую степень агглютинации /1/.

В литературе имеются данные о том, что лектин (фитотоксин/Ф) не оказывает токсического влияния на организм и повышает содержание гемоглобина, число эритроцитов, эозинофилов и ретикулоцитов, а также уменьшает лейкопению /7/.

При перевивке клеток асцитной карциномы Мосида, предварительно обработанных лектинами и РНК-азой, опухоли у животных не возникают, все животные выживают /6/.

Комбинации селективно цитотоксических и иммунопотенцирующих свойств лектина смелы имеет решающее значение для терапевтического действия препаратов смелы /4/.

Введение лектина вызывает увеличение числа лейкоцитов в периферической крови как у контрольных животных, так и у мышей-опухоленосителей, но у последних в большей степени, чем в контроле. Предполагается, что лектины оказывают двоякое действие — стимулируют защитные механизмы организма и разрушают опухолевые клетки /5/.

Лектины из кукурузных рылец, используемые нами в ре-

боте, получали по стандартной методике: дробное этанольное фракционирование, высаливание сульфатом аммония с последующим диализом и лиофильной сушкой /2/.

Общетоксическое и противоопухолевое действие лектинов изучалось на животных с перевивными опухолями. Было использовано два штамма опухолей — саркома 45 и карцинома Герена. Штаммы опухолей перевивали подкожно взвесью опухолевой ткани в изотоническом растворе хлорида натрия. На 3–4-й день после перевивки животных начинали лечение. Курс лечения состоял обычно из 10 инъекций, которые проводили подкожно в противоположный от опухоли бок животного. Противоопухолевое действие оценивали через 24 часа или через 5–6 суток после прекращения инъекций для выявления возможного последствия и выражали в процентах торможения роста опухолей. Опытам по изучению антибластической активности предшествовали исследования по определению острой токсичности, которые проводили при однократном введении в брюшную полость. Учет результатов проводили в течение двух недель. Полулетальные дозы вычисляли методом интерполяции по Беренсу. В случае применения смертельных доз гибель животных наступала либо непосредственно после введения, либо в ближайшие дни. Отмечалась адинамия, анорексия, диарея, нейтрофилез, лимфопения. Существенных изменений количества эритроцитов и гемоглобина не отмечено.

Препараты растворяли *ex tempore*. В опыт обычно брали 2–3 образца для сравнения полученных результатов с данными контрольной группы, а также групп животных, леченных различными образцами. Для первичного отбора препаратов лечебная доза составляла 1/5 от ЛД₅₀. При хорошей переносимости в дальнейших опытах дозу увеличивали.

Изучено 6 образцов лектинов: I фракция (образцы 2 и 3), 2 фракция (образцы 1, 4, 5), 3 фракция (образец 6), из которых 2, 4 и 5 оказались малоактивными в противоопухолевом отношении (2–47% торможения роста опухолей), 1, 3 и 6 значительно ингибировали рост вышеуказанных штаммов (до 74–93%).

Незначительное противоопухолевое действие на саркому 45 и карциному Герена оказывают 4- и 5-е образцы лектина.

Торможение роста опухолей колеблется в пределах 15-37, не превышая 47% (4-й образец в дозе 30 мг/кг при 10-кратном воздействии на саркому 45).

Значительно больший терапевтический эффект наблюдается при действии на саркому 45 первого образца лектина: в дозе 30 мг/кг при ежедневном введении в течение 10 дней достоверно тормозит рост данного штамма на 74%.

В опытах на штамме карциномы Герена при применении указанного режима введения антибластический эффект выражен слабее - 49%.

Противоопухолевую активность проявил второй образец лектина в отношении как карциномы Герена, так и саркомы 45, причем доза препаратов в этих случаях не имела решающего значения. Так, при введении лектина в дозе 20 мг/кг рост саркомы 45 тормозился на 47%, с увеличением дозы в 2,5 раза процент торможения увеличивался только до 60%.

Третий образец в дозе 50-60 мг/кг оказал незначительное противоопухолевое действие на карциному Герена - 39%, саркома 45 оказалась более чувствительной, в этих же дозах ингибирование роста опухоли достигало 60-66%. Наибольшую ингибирующую активность проявил шестой образец лектина: в дозе 60 мг/кг при девятикратном введении в брюшную полость торможение роста саркомы 45 достигало 93%. В этой же дозе карциному Герена шестой образец подавлял на 60%, при увеличении дозы до 120 мг/кг эффекта не отмечено.

В целом следует отметить, что антибластическая активность всех образцов лектина за исключением № 5, наиболее выражена в отношении опухолей соединительнотканного происхождения (саркома 45):

Образцы: 1 - 74%, 2 - 60%, 3 - 66%, 4 - 47%, 6 - 93%.

Как известно, применение большинства противоопухолевых препаратов в онкологической клинике ограничивается их токсичностью, действием на быстро пролиферирующие нормальные ткани, в первую очередь на кроветворение. Нами отмечено весьма важное свойство лектинов повышать количество лейкоцитов периферической крови у животных-опухоленосителей при проведении химиотерапевтического воздействия противоопухолевыми препаратами. При применении противоопухоле-

вого препарата триОЭФ совместно с лектинами, выделенными из кукурузных рылец, у животных наступает нормализация периферической крови. Так, при десятикратном введении триОЭФа в дозе 2,5 мг/кг крысам с перевивной карциномой Герена количество лейкоцитов снижается на 65% и достигает 3,5 Г/л, в то время как при сочетанном применении триОЭФа в той же дозе и 3-го образца лектина число лейкоцитов находилось в пределах нормы 9,5-10 Г/л. Число лейкоцитов в контроле при этом достигало 22,5 Г/л.

Результаты работы являются основанием для продолжения исследований по поиску новых лектинов как противоопухолевых препаратов.

Л и т е р а т у р а:

1. Вядро М.М. // Экспер. онкология. - 1985, 7. - № 2. - С. 46-48.
2. Голынская Е.Л. и др. // Молекул. биол. - 1980, в.27. - С. 4454.
3. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Луцки А.Д. // Лектины. - Львов, 1981.
4. Hartmut F. // Oncol. - 1986. - Vol. 43. - Suppl. - P. 23-24.
5. Robinson E., Mekori T. // J. Med. Sci. - 1971. - P. 83-89.
6. Roveta D., Gota F. // Bol. soc. ital. biol. sperim. 1968. - Vol. 44. - N 20. - P. 1678-1679.
7. Ponzone A., Sacuefis C. // Minerva pediat. - 1971. - Vol. 23. - N 6. - P. 234-240.

ЛЕКТИНЫ КАК ВОЗМОЖНОЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЕ НАЧАЛО У НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Е.Л.Голынская, Н.Ф.Погорелая, В.И.Макаренко
Киевский государственный университет им.Т.Г.Шевченко

Выявление новых источников лектинов в отечественной флоре - важная задача в научном и практическом отношении. Актуальной представляется возможность получения набора лектинов, обладающих в совокупности широким спектром углеводной специфичности.

В Киевском госуниверситете поиски новых источников лектинов проводили среди лекарственных растений. Исследовали

более 300 видов, из которых свыше 80 видов содержали вещества, обладающие способностью агглютинировать эритроциты некоторых животных и птиц, а также эритроциты человека системы АВО.

Выпадение в осадок при этанольном фракционировании, денатурация при продолжительном кипячении, потеря гематтгитирующей способности при обработке протеолитическими антигенами свидетельствуют о белковой природе этих веществ и дают основание отнести их к "классическим лектинам".

Проведено изучение характера взаимодействия эритроцитов доноров четырех основных групп крови в системе АВО с лектинами 24 лекарственных растений. Лектины выделяли при помощи этанольного ступенчатого фракционирования водно-солевых экстрактов лекарственных растений. Реакцию эритроагглютинации при самопроизвольном оседании эритроцитов проводили в иммунологических планшетах. Степень агглютинации оценивали по пятибалльной шкале, принятой в иммунологической практике.

Установлено, что эритроциты четырех групп крови системы АВО реагировали с лектинами двух лекарственных растений с аналогичной активностью. Лектины 14 видов лекарственных растений (29 вариантов опыта из 96) взаимодействовали неодинаково интенсивно с эритроцитами различной групповой принадлежности, либо проявляли сходную активность относительно эритроцитов двух из четырех изученных групп (вероятность 80 и более процентов), таблица I.

Максимальная активность реакции отмечена для эритроцитов группы О, минимальная — для эритроцитов группы А. Последние по способности взаимодействовать с лектинами лекарственных растений уступают эритроцитам остальных групп. Эритроциты группы О превосходят эритроциты остальных групп по интенсивности реакции взаимодействия с лектинами 9 растений и уступают им по активности реакции с лектинами двух растений из 14. Напротив, эритроциты группы А уступают эритроцитам остальных групп по интенсивности взаимодействия с лектинами 9 растений и превосходят их по активности реакции с лектинами трех растений из 14. Соотношение числа растений, с лектинами которых эритроциты группы В превосходят, либо

Таблица I

Достоверность различий по суммарной интенсивности агглютинации эритроцитов доноров различной групповой принадлежности с лектинами отдельных видов лекарственных растений (ΣI)

Код растения	ΣI , условные баллы				$t_{0,5}$	Вероятность, %
	группа крови	$M \pm m$	группа крови	$M \pm m$		
3	O	11,6 \pm 0,40	A	10,1 \pm 0,58	2,13	96,7
7	O	3,4 \pm 0,61	A	1,8 \pm 0,46	2,09	96,3
14	O	1,8 \pm 0,50	A	0,8 \pm 0,23	1,82	93,1
2	O	5,6 \pm 1,11	A	3,7 \pm 0,97	1,29	80,3
9	O	6,0 \pm 0,65	B	4,7 \pm 0,43	1,67	90,5
11	O	1,5 \pm 0,51	B	0,5 \pm 0,23	1,79	92,6
2	O	5,6 \pm 1,11	B	3,6 \pm 1,00	1,34	82,0
2	O	5,6 \pm 1,11	AB	2,7 \pm 1,19	1,78	92,5
3	O	11,6 \pm 0,40	AB	10,7 \pm 0,41	1,57	88,4
11	O	1,5 \pm 0,51	AB	0,6 \pm 0,31	1,56	88,1
10	O	13,8 \pm 0,54	AB	11,9 \pm 1,24	1,41	84,2
5	O	15,9 \pm 0,73	AB	14,4 \pm 0,79	1,40	83,9
14	O	1,8 \pm 0,50	AB	1,0 \pm 0,30	1,36	82,9
8	O	1,3 \pm 0,68	AB	0,4 \pm 0,20	1,27	79,6
13	A	2,9 \pm 0,95	O	1,4 \pm 0,36	1,48	86,1
13	A	2,9 \pm 0,95	B	1,2 \pm 0,29	1,71	91,3
9	A	6,1 \pm 0,72	B	4,7 \pm 0,43	1,67	90,5
11	A	1,7 \pm 0,75	B	0,5 \pm 0,23	1,53	87,4
13	A	2,9 \pm 0,95	AB	1,2 \pm 0,42	1,61	89,3
11	A	1,7 \pm 0,75	AB	0,6 \pm 0,32	1,43	84,7
14	B	1,5 \pm 0,31	A	0,8 \pm 0,23	1,85	93,6
6	B	17,0 \pm 0,84	A	15,3 \pm 0,57	1,56	88,1
12	B	1,1 \pm 0,60	A	0,2 \pm 0,15	1,46	85,6
16	AB	17,4 \pm 1,23	O	15,4 \pm 0,85	1,34	82,0
16	AB	17,4 \pm 1,23	A	14,7 \pm 0,83	1,82	93,1
16	AB	17,4 \pm 1,23	B	15,5 \pm 0,85	1,27	79,6
6	AB	17,1 \pm 1,00	A	15,3 \pm 0,57	1,56	88,1
15	AB	14,9 \pm 1,24	A	12,9 \pm 0,92	1,30	80,6
15	AB	14,9 \pm 1,24	B	12,8 \pm 0,99	1,32	81,3

уступают по активности реакции эритроцитам иной принадлежности, составляет 4:6, а для эритроцитов группы AB - 3:8.

Можно было ожидать, что эритроциты группы O и группы A, для которых в целом зарегистрирована максимальная и минимальная активность относительно лектинов лекарственных

растений, будут противостоять друг другу и по интенсивности реакции эритроагглютинации с лектинами отдельных видов. Однако различия по характеру взаимодействия эритроцитов различной групповой принадлежности с лектинами лекарственных растений отличаются более сложными зависимостями.

В максимальном числе случаев интенсивность реакции эритроцитов группы 0 не совпадает с таковой для эритроцитов группы АВ (8 растений из I4). Только в одном случае характер реакции эритроцитов этих двух групп с лектинами лекарственных растений аналогичен по направленности.

Эритроциты группы 0 несходны по активности с эритроцитами группы А относительно лектинов 5 растений из I4. Из них в 4 случаях преимущество на стороне эритроцитов группы 0, в одном — на стороне эритроцитов группы А, еще в двух случаях активность реакции с лектинами для эритроцитов группы А и группы 0 сходна и достоверно выше таковой для эритроцитов группы В и группы АВ. В наименьшем числе случаев различаются по способности взаимодействовать с лектинами лекарственных растений эритроциты группы 0 и группы В: в 3 случаях их активность сходна и в 3 — контрастна по направленности.

Относительно эритроцитов группы А противоположную по интенсивности взаимодействия с лектинами лекарственных растений позицию занимают эритроциты группы В: в 6 вариантах из I4, когда эритроциты группы А взаимодействуют с лектинами определенных растений с наивысшей активностью, реакция эритроцитов группы В выражена в минимальной степени, и наоборот.

Несходны по активности с эритроцитами группы А также и эритроциты группы АВ. В двух случаях — преимущество на стороне эритроцитов группы А, в 3 — на стороне эритроцитов группы АВ. В трех вариантах обе группы уступают по активности эритроцитам иной принадлежности.

Наибольшее сходство по характеру взаимодействия с лектинами установлено для эритроцитов группы В и АВ: в четырех случаях (из I4) их реакция совпадает, в двух — контрастна.

Установлено, что эритроциты различной групповой принадлежности проявляют достоверно повышенную способность взаимодействовать с лектинами одного лекарственного расте-

ния и достоверно пониженную — с лектинами другого, различного с первым по фармакологическим свойствам.

Интенсивность реакции агглютинации коррелирует с количеством связываемого лектина, которое, в свою очередь, зависит от числа рецепторов на поверхности мембраны эритроцита и их сродства к лектину.

Представляется обоснованным заключение, что максимальная активность взаимодействия эритроцитов доноров определенных групп крови с лектинами отдельных лекарственных растений, которая достоверно превышает таковую для эритроцитов иной групповой принадлежности, свидетельствует о потребности организма в лектинах определенного типа.

В организме человека имеются эндогенные лектины, синтез которых контролируется генетически, и экзогенные лектины, поступающие с пищевыми продуктами. Мы допускаем, что наличие определенного запаса лектинов различной специфичности необходимо для поддержания нормальной жизнедеятельности роста и воспроизведения организма. В свою очередь, изменения нормального уровня лектинов вследствие генетических причин, обеднения пищевой базы либо развития патологического процесса может оказать глубокое влияние на жизнеспособность организма, как это известно для иных биологически активных соединений, например, витаминов, гормонов и др.

В качестве физиологически активных соединений лектины не имеют аналогов. Парные взаимодействия рецептор-лектин являются сигналом, который лежит в основе формирования многих разнонаправленных процессов в биологических системах. Большое число фактов свидетельствует, что лектины являются мощными биологическими стимуляторами, активизирующими защитные силы организма. Поэтому представляется перспективным целенаправленное использование лекарственных растений, содержащих лектины, для поддержания и усиления физиологических функций организма человека с целью профилактики.

С указанной целью авторы рекомендуют использовать 16 видов лектинсодержащих лекарственных растений в соответствии с обнаруженным к ним сродством эритроцитов доноров четырех основных групп крови.

Специфичность и высокая биологическая активность лек-

тинов создают также некоторые новые возможности и в фитотерапии, в частности, возможности подбора активных лектинов за счет лекарственных растений в соответствии с групповой принадлежностью эритроцитов и реактивностью организма больного.

ЛЕКТИНЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В ИММУНОДИАГНОСТИКЕ И ПРОГНОЗИРОВАНИИ

А.А.Осымак, Е.Л.Гольнская, В.И.Макаренко, Л.Р.Сокирко
Госпиталь № 408, г. Киев
Киевский госуниверситет им. Т.Г.Шевченко

Известно, что малигнизация связана с существенными изменениями состава и структуры мембранных гликопротеинов. В ходе процесса превращения нормальных клеток в опухолевые меняется способность клеточных мембран связывать лектины /2, 4-9/.

Нами исследована способность форменных элементов крови взаимодействовать с лектинами в ходе реакции гемагглютинации в норме и при развитии злокачественных новообразований. В качестве тест-объекта с этой целью впервые использовали нативные эритроциты периферической крови человека. Ранее для решения сходной задачи исследовали иммунокомпетентные клетки: моноциты, лимфоциты.

Эритроциты — один из наиболее доступных источников нормальных изолированных клеток, который используют при изучении характера взаимодействия лектинов с рецепторами мембран. Рецепторы на мембранах эритроцитов тождественны таковым на мембранах лимфоцитов. В отличие от лимфоцитов, эритроциты у данного человека представлены однородной популяцией, срок жизни эритроцитов многократно превышает таковой для лимфоцитов. Агглютинация эритроцитов обычно совпадает со связыванием лектина, а интенсивность этого процесса сопряжена с количеством связываемого лектина, которое, в свою очередь, зависит от числа рецепторов на мембране и их сродства к лектину.

Реакции, основанные на агглютинации эритроцитов, весьма чувствительны и специфичны. Использование эритроагглюти-

нации позволяет сохранить природную специфичность и свойства рецепторов для лектинов на мембранах эритроцитов и существенно уменьшить вероятность артефактов.

В качестве иммунодиагностических препаратов использовали набор лектинов, выделенных из 24 лекарственных растений, ранее в этом отношении не изученных. Лектины осаждали из водносолевых экстрактов растений ступенчатым этанольным фракционированием. При выполнении работы ставилась задача наиболее полного извлечения совокупности лектинов, синтезируемых лекарственными растениями (суммарные лектины).

Реакцию эритроагглютинации при самопроизвольном оседании эритроцитов в иммунологических планшетах выполняли по известному способу. Степень агглютинации оценивали визуально прямым определением в каждом из 8 разведений исходного раствора по пятибалльной шкале, принятой в иммунологической практике (в условных баллах) /1/.

Для сравнительной оценки характера взаимодействия эритроцитов доноров и онкологических больных с лектинами лекарственных растений разработана система показателей (таблица I). Основным контролируемым параметром определена суммарная интенсивность реакции эритроагглютинации. Результаты экспериментов обрабатывали методами вариационной статистики.

Исследовали 76 доноров четырех основных групп крови в системе АВО и свыше 50 онкологических больных с заболеваниями желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы, легких.

Показано, что активность взаимодействия эритроцитов доноров различной групповой принадлежности с лектинами лекарственных растений различна. Максимальная активность реакции отмечена для эритроцитов группы 0, минимальная — для эритроцитов группы А. Последние по способности взаимодействовать с лектинами лекарственных растений уступают эритроцитам остальных групп. Эти данные привлекают внимание в связи с тем, что в литературе имеются строгие доказательства наличия связи между группой крови А и некоторыми онкологическими заболеваниями /3/.

Установлено, что по интенсивности взаимодействия с

Таблица I

Показатели сравнительной оценки интенсивности реакции
агглютинации эритроцитов доноров и больных с лектинами
лекарственных растений

Показатель и его условное обозначение	Сущность показателя
Совокупность исследованных растений N	Общее количество растений, используемых в эксперименте для выделения лектинов
Совокупность активных растений n	Количество растений, лектины которых оказались активными относительно эритроцитов донора или больного
Совокупность неактивных растений 0	Количество растений, лектины которых оказались неактивными относительно эритроцитов донора или больного
Совокупность гемолитических растений L	Количество растений, экстракты которых вызвали гемолиз эритроцитов донора или больного
Видовая интенсивность агглютинации $\sum I$	Сумма чисел условных баллов, оценивающих интенсивность агглютинации индивидуальных эритроцитов с лектинами одного вида лекарственных растений при всех разведениях
Суммарная интенсивность агглютинации $\sum N$	Сумма чисел условных баллов, оценивающих интенсивность реакции агглютинации эритроцитов донора или больного с лектинами всех исследованных растений
Титр агглютинации T	Наибольшее разведение раствора, где еще наблюдается агглютинирующий эффект и которое выражается степенью разведения раствора
Суммарный титр агглютинации $\sum T$	Сумма степеней, оценивающих титр реакции агглютинации эритроцитов донора или больного с лектинами всех исследованных растений
	Суммарная интенсивность агглютинации, соотношенная ко всей совокупности исследованных растений
	$\sum N/N$
	Суммарный титр агглютинации, соотношенный ко всей совокупности исследованных растений
	$\sum T/N$
	Суммарная интенсивность агглютинации, соотношенная к совокупности активных растений
	$\sum N/n$
	Суммарный титр агглютинации, соотношенный к совокупности активных растений
	$\sum T/n$

лектинами лекарственных растений эритроциты онкологических больных статистически достоверно уступают эритроцитам доноров всех групп. При использовании критерия знаков для ранжирования рядов доноров и онкологических больных по признаку "суммарная интенсивность агглютинации" не отмечено ни одного случая превышения абсолютного значения вариант для ряда онкологических больных соответствующих им по рангу вариант для ряда доноров. Средние арифметические по указанному признаку для вариационных рядов доноров всех групп и вариационных рядов онкологических больных достоверно различаются между собой. Доверительные границы для средних арифметических генеральных совокупностей доноров четырех групп и онкологических больных по контролируемому параметру не совпадают (таблица 2).

Суммарная интенсивность агглютинации эритроцитов онкологических больных при взаимодействии с лектинами лекарственных растений из предложенного набора снижается на 30-60 и более процентов в сравнении с таковой для эритроцитов доноров. При заболевании не онкологического, а воспалительного характера, указанные различия между донорами и больными не регистрируются.

Различия по суммарной интенсивности эритроагглютинации между донорами и онкологическими больными определяются в первую очередь тем, что эритроциты онкологических больных взаимодействуют с лектинами достоверно меньшего числа лекарственных растений из предложенного набора, а интенсивность реакции в тех случаях, где она еще сохраняется, также падает. Обнаружены растения, с лектинами которых снижение активности взаимодействия эритроцитов онкологических больных особенно значительно и отмечается у подавляющего числа больных. По ряду других растений различия между больными и донорами носят градуальный либо взаимоисключающий характер.

Все изложенное позволяет прийти к заключению, что при развитии злокачественной опухоли в организме больного определенным тип и/или определенное число рецепторов для лектинов на мембранах эритроцитов блокируется, что и обуславливает снижение активности их взаимодействия с лектинами лекарственных растений.

Таблица 2

Статистические показатели для вариационных рядов доноров различных групп крови и онкологических больных по признаку суммарная интенсивность агглютинации эритроцитов при взаимодействии с лектинами лекарственных растений
(в условных баллах)

Варианты	Статистические показатели						* Доверит. гран. для ср. гене- ральной совокупн.
	n	lim	M	σ	m	t_{05}	
Доноры групп крови							
0	25	I40-289	I92	39,8	8,0		I76-208
B	I9	I25-248	I88	33,9	7,8		I73-203
AB	II	I58-256	I89	3I,2	9,4		I7I-207
A	2I	I22-256	I74	36,8	8,0		I58-I90
Онкологиче- ские больные							
Опыт I	I2	53-I6I	II8	35,5	IO,3	4,3	98-I38
Опыт 2	I2	78-I75	I28	26,6	7,7	4,5	II3-I43
Опыт 3	9	78-I50	II7	23,3	7,8	5,1	I02-I32

Примечание: коэффициент Стьюдента (t_{05}) рассчитан для онкологических больных и доноров группы А с минимальным значением признака.

Исследование природы ингибиторов, взаимодействующих с рецепторами для лектинов на мембранах эритроцитов и, по-видимому, также на мембранах иммунокомпетентных клеток в ходе процесса малигнизации, представляет большой теоретический и практический интерес.

Л и т е р а т у р а :

I. Хомутовский О.А., Луцик М.Д., Передерей О.Ф. Электронная гистохимия рецепторов клеточных мембран. - Киев: Наукова думка, 1986. - С. I-I66.

2. Boldt D.H., Nelson M.O. // Cancer. - 1983. - Vol.51. - N 11. - P. 2083-2089.

3. Clarke C.A. Группы крови и заболевания // Штерн К. Основы генетики человека. - М.: Медицина, 1965. - С. 597-627.
4. Koch B., Regnat W., Schedel J., Hermanek H., Leibold W., Kalden J.R. // Immunobiol.-1983.-Vol. 164.-N 2.-P. 99-109.
5. Nicolson G.L. // Biochim., Biophys. Acta.-1976.-P. 57-108.
6. Smiegel W.H., Readler E., Readler A. // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. - 1982. - Vol. 20. - N 3. - P. 131.
7. Speckart S.F., Boldt D.H., MacDermott R.P. // Blood. - 1978. - Vol. 52. - P. 681-695.
8. Stoddart R.W. // Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. - 1979. - Vol. 54. - P. 199-235.
9. Tauber R., Richter L., Park C., Reuter W. // J. Clin. Chem., Clin. Biochem. - 1982. - Vol. 20. - N 3. - P. 132.

**ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ЛЕКТИНОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ
И ОЧИСТКИ РАСТВОРИМЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ИЗ МОЗГА ЖИВОТНЫХ**

М.А.Грудень

НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина АМН СССР, Москва

В настоящее время с целью изучения гликопротеинов мозга, участвующих и обеспечивающих реализацию ряда важнейших межклеточных и внутриклеточных процессов (например, процессов адгезии клеток, рецепции и "узнавания" макромолекул, межклеточных взаимодействий и др.) актуальным является проблема получения данных белков в очищенном виде. Для ее решения перспективным является достаточно новый подход; а именно, использование нового типа аффинных сорбентов - иммобилизованных лектинов /2/. Преимущества данного подхода очевидны и многообразны; так, учитывая известный факт, что удаление углеводной компоненты у большинства биологически активных гликоконъюгатов существенно не влияет на их активность (тем самым не участвуя в формировании активных центров), аффинная хроматография гликопротеинов на иммобилизованных лектинах перспективна с точки зрения сохранения функций выделяемых белков. Промышленных препаратов иммобилизованных лектинов известно немного /1, 4/, подходящим матриксом для иммобилизации лектинов могут служить модифицирован-

ная сефароза, сфероны, пористые стекла, тойперл гель, силихромы. Получение иммобилизованных лектинов повысит их стабильность, обеспечит возможность многократного использования, расширит круг применения в хроматографических процедурах /3/.

Целью настоящей работы явилось получение иммобилизованных на аминосилохроме конканавалина А из *Canavalia ensiformis* /2/ и лектина из *Phytolacca americana* /4/, исследование их сорбционной способности по отношению к гликопротеинам мозга быка, применение в качестве аффинных сорбентов для выделения и очистки данных белков.

В качестве матрикса для иммобилизации использовали модифицированный γ -аминопропилтриэтоксисилохром, который по своим физико-химическим свойствам может быть сравнен с другими макропористыми кремнеземами, например, макропористыми стеклами. Силохром обладает достаточной механической прочностью, химической инертностью к большинству растворителей, регулируемой структурой пор; они не подвергаются биологическим воздействиям, доступны и дешевы. Реакция присоединения лектинов к аминосилохрому протекала в присутствии растворимого метил-*p*-толуолсульфоната-*N*-циклогексил-*N'*-(2/4- β -морфолиноэтил)/карбодимидя (соотношение лектин/КДИ-1/100 при pH 5,0-5,5). Проведенное сравнение различных образцов силихрома с размером пор от 2500 Å до 350 Å и удельной поверхностью от 25 до 130 м²/г с количеством привитых аминогрупп от 220 до 280 мкэкв/г показало, что на всех образцах аминосилохромов происходит примерно одинаковая сорбция при иммобилизации лектинов и в изученных пределах насыщения лектинами нет зависимости от удельной поверхности, в связи с этим работали с аминосилохромом С-120. Процесс иммобилизации лектинов на аминосилохроме зависел от времени реакции (практически через 45-60 минут он стабилизировался) и от pH среды. Выход иммобилизованных лектинов составил через 3 часа иммобилизации для I-28,7 мг/г носителя, для II-34 мг/г носителя. На иммобилизованных препаратах лектинов показано, что сорбция грубой фракции гликопротеинов мозга составляет 10-12 мг/г носителя. Полученные сорбенты использовали для выделения и очистки растворимых кис-

лых и щелочных гликопротеинов мозга быка, который гомогенизируют в 0,01 М Трис-НСI буфере рН 7,5 с добавлением 0,1 М NaCl и 0,025 М ЭДТА, центрифугируют при 21 000g, супернатант подвергают аминокобменной хроматографии на аминосилохроме С-80, несвязавшиеся с сорбентом белки наносят на КМ-сефарозу 4В. Десорбированные 1 М NaCl белки мозга с обеих колонок с ионообменными сорбентами диализуют в присутствии 1 mM CaCl₂. После диализа кислые и щелочные белки подвергают аффинной хроматографии на конканавалине А-аминосилохроме, либо на лектине /4/ -аминосилохроме. Несвязавшиеся с лектином белки отмывают 0,1 М Трис-НСI буфером рН 7,5, а биоспецифически взаимодействующие с сорбентами гликопротеины в обоих случаях десорбируют 0,3 М α-D-метилглюкозидом. От α-D-метилглюкозида освобождаются ультрафильтрацией через фильтр PSSM. Далее кислые и щелочные гликопротеины пропускают через колонки с иммобилизованными на CNBr-сефарозе 6В антителами к кислым и щелочным гликопротеинам печени быка, собирают фракцию мозгоспецифических гликопротеинов, которые дополнительно пропускают через колонку с антителами к тубулину, иммобилизованными на CNBr-сефарозе 6В (содержание антител порядка 3-5 мг/мл геля сефарозы 6В). Дополнительно с целью получения растворимых гликопротеинов, обладающих сродством к мозгоспецифическим белкам S100 проводили аффинную хроматографию выделенных гликопротеинов на иммобилизованных на CNBr-сефарозе 6В белков S100, ранее полученных нами в лаборатории, десорбцию гликопротеинов проводили 20 mM ЭДТА при рН 2,0, после чего подвергали их диализу против 0,01 М Трис-НСI буфера рН 7,0 и анализировали. Иммуноферментным анализом показана тканеспецифичность и видонеспецифичность гликопротеинов, проведен анализ углеводных остатков, содержащихся в них, показана положительная реакция с красителем алциановым синим и реактивом Шиффа. Методами электрофореза при рН 8,3 показана гомогенность препаратов, а электрофорезом в присутствии 1% додецилсульфата натрия установлен их молекулярный вес и субъединичный состав, получены изоэлектрические точки методом изоэлектрофокусирования в тонком слое феррагеля (6%) в интервале рН 3,5-9 (2% амфолины). Выход растворимых гликопротеинов со-

тавил 0,15% от теоретически возможного.

Таблица I

Физико-химические свойства кислых и щелочных растворимых гликопротеинов мозга быка, полученных на иммобилизованном конканавалине А

Наименование гликопротеина	Молекулярная масса кДа субъединичный состав	Изоэлектрическая точка	Сродство к лектину
ГП _{3,49}	25	3,49	+
ГП _{3,70}	100	3,70	+
ГП _{3,70}	25	3,70	+
ГП _{4,32}	50	4,32	-
ГП _{4,32}	30	4,32	-
ГП _{5,25}	200	5,25	+
ГП _{5,25}	120	5,25	-
ГП _{6,10}	350	6,10	-
ГП _{7,20}	200	7,20	-
ГП _{9,40}	100	9,40	-
ГП _{9,40}	80	9,40	+

Таким образом, с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованных растительных лектинах возможно получение растворимых кислых и щелочных гликопротеинов мозга, имеющих в своем составе остатки маннозы и глюкозы, а при использовании дополнительных стадий выделения — получение мозгоспецифических видонеспецифических гликопротеинов с четкими физико-химическими свойствами. Полученные данные являются первичной информацией, необходимой для дальнейшего изучения биологической роли данных гликопротеинов. Необходимо отметить, что многие органоспецифические гликопротеины имеют важное значение для процессов, связанных с дифференцировкой, формированием и поддержанием межклеточных специализированных контактов, а также выполняющих целый ряд внутриклеточных функций. Показано, что в сыворотках крови больных шизофренией выявляются аутоантитела к растворимым кислым гликопротеинам мозга, что дает основания думать о необходимости дальнейшего их изучения в норме и патологии.

Л и т е р а т у р а

1. Ляхтин В.М.//Лектины в исследовании белков и углеводов. Итоги науки и техники//Биотехнология. - Т. 2. - М.: ВИНТИ, 1987.
2. Луцки М.Д., Панасюк В.Н., Луцкий А.Д.//Лектины. Киев: Вища школа, 1981. - С. 114-118.
3. Anderson D.I., Walter R.A. // J. Chromatogr.-1986. - Vol. 376. - N 1. - P. 69-85.
4. Olsson U., Mattiasson B. // J. Chromatogr. - 1986. - Vol. 370. - N 1. - P. 29-37.

РЕГУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА МОНОНУКЛЕАРОВ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

М.Н.Болдырева, Л.П.Алексеев, Е.С.Феденко
Институт иммунологии МЗ СССР, г. Москва

Атопический дерматит - аллергическое заболевание, в патогенезе которого нарушение иммунорегуляции имеет большое значение. Предполагают, что при данном заболевании имеется дефицит супрессорной активности, который приводит к усилению неконтролируемой выработки IgE. Гиперпродукция IgE, вероятно, может быть связана не только с функциональной недостаточностью супрессорных клеток, но и с усилением активности контрасупрессорных клеток, впервые описанных в 1979 г. С.С.Гамбаровым /1/, а затем, независимо от него, в 1981 г. Gershon /4/. Значение контрасупрессии в патогенезе аутоиммунных заболеваний экспериментально подтверждено рядом авторов. Поскольку в литературе отсутствуют сведения об изучении контрасупрессии у лиц, страдающих аллергическими заболеваниями, нам представилось исследовать супрессорную и контрасупрессорную активность у больных атопическим дерматитом.

Было обследовано 37 больных атопическим дерматитом в стадии обострения в возрасте от 14 до 40 лет (21 женщина, 16 мужчин). Контролем служили 41 здоровый донор в возрасте от 13 до 50 лет (35 женщин, 6 мужчин).

Для определения регулирующей активности клеток, сти-

мулированных конканавалином А (Кон А), использовали метод двойной бластной трансформации Shou /5/ в модификации С.С.Гамбарова (рисунок 1). Метод определения контраггнессорной активности основан на отмене супрессии, опосредованной Кон А-стимулированными клетками, свежевиделенными (Инт-Кл), добавленными в тест-культуру (ФГА-Кл) одновременно с супрессорными клетками (Кон А-Кл) в соотношении 1:1:1 (рисунок 1). Контраггнессией считали результат $> 1,0$.

Результаты, полученные нами (таблица 1), свидетельствуют о том, что уровень супрессорной активности Кон-А-стимулированных клеток в модели, предложенной С.С.Гамбаровым несколько ниже, чем при использовании метода Shou /5/, что, вероятно, связано с тем, что в примененной нами методике в качестве тест-клеток использовались мононуклеары, стимулированные фитогемагглютинином (ФГА-Кл) в течение 48 часов (рисунок 1), что по-видимому, снижает чувствительность клеток к супрессирующему воздействию Кон-А-стимулированных клеток. Кроме того, оказалось, что уровень супрессорной активности Кон-А-стимулированных клеток у больных атопическим дерматитом и здоровых доноров практически не различался (таблица 1), из чего, однако, не следует, что супрессорные свойства сравниваемых клеток в самом деле одинаковы, поскольку клетки тест-системы после 48-часовой инкубации с ФГА могут находиться в разном функциональном состоянии у больных атопическим дерматитом и здоровых доноров.

Клетки, инкубированные в течение 48 часов без митогена (рисунок 1), при добавлении их в тест-систему, у здоровых доноров в большинстве случаев не изменяли уровень включения радиоактивной метки в клетки тест-системы. У больных же атопическим дерматитом в 76% случаев (19 из 25) по сравнению с 49% (24 из 49) у доноров ($p < 0,05$) такие клетки увеличивали включение метки в клетки тест-системы (таблица 1).

Таким образом, пока неизвестно, связано ли отсутствие различий в супрессорной активности Кон-А-стимулированных клеток между больными и здоровыми донорами с недостатками новой модели или оно отражает восстановление супрессорной активности клеток у больных в результате действия митогенов. Однако, преимуществом данной модели является то, что она дает

Таблица I

Супрессорная и контрасупрессорная активность у больных
атопическим дерматитом

	$IP_{\text{Кон А}}^*$	$IP_{\text{Кон А}}$	$IP_{\text{Сп}}$	$KC_{\text{Кон А}}$
Больные		$0,77 \pm 0,28$	$1,15 \pm 0,29$	$1,24 \pm 0,43$ 1988
Здоровые доноры	$0,56 \pm 0,03$	$0,78 \pm 0,35$	$1,03 \pm 0,32$	$0,97 \pm 0,36$

Примечание: $IP_{\text{Кон А}}^*$ - значение взято из литерат.источника 3.
~~1988~~ $P < 0,001$

возможность изучать регулирующее действие свежевыделенных клеток на супрессорную систему, исключая прямое действие митогенов на эти клетки. По нашим данным, отмена супрессирующего действия Кон А-стимулированных клеток на тест-систему (контрасупрессия), была выражена в разной степени у больных атопическим дерматитом и здоровых доноров (таблица I). Если у больных контрасупрессорная активность свежевыделенных клеток выявлялась в 75,7% (28 из 37), то у здоровых доноров только в 41,6% (25 из 60) $p < 0,001$.

Для исключения возможности стимулирующего действия на свежевыделенные клетки растворимых факторов, образующихся при совместной инкубации клеток супрессорной системы, их помещали на 16-20 часов в супернатант, образующийся в результате 16-ти часовой инкубации клеток супрессорной системы. Как видно из таблицы 2, величина включения радиоактивной метки в интактные клетки после инкубации в супернатанте не увеличивалась. Таким образом, источником контрасупрессорной активности у больных атопическим дерматитом, по-видимому, являются свежевыделенные клетки.

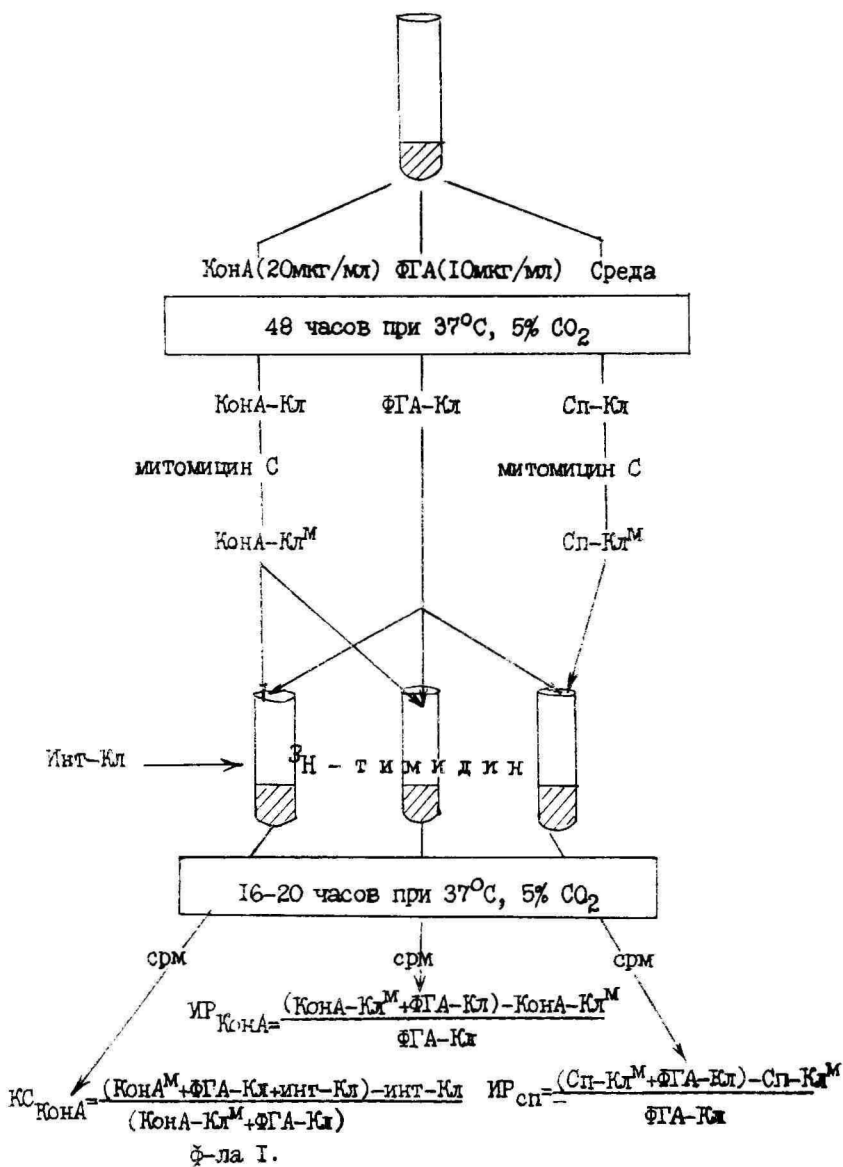


Рис. I. Схема проведения эксперимента

Таблица 2

Влияние супернатанта стимулированных культур на
свежевыделенные клетки

Инт-Кл срм	Супрессорная сума срм	Контрасупрессор- ная с-ма срм	Инт-Кл в супернатан- те от супрессорной с-ма. срм
887	57169	66785	622
54I	50112	61490	758
342	73109	85448	909
316	18174	20049	140
2318	36676	50340	702

Л и т е р а т у р а:

1. Гамбаров С.С. // Биол. ж. Армении. - 1979. - Т. 32. - № 8. - С. 7.
2. Гамбаров С.С., Шахсуваров А.В., Адамян Н.В. и др. // Экспер. и клин. медицина. - 1986. - Т. 23. - № 3. - С. 274.
3. Яздовский В.В., Алексеев Л.П., Ульянова Л.И. и др. // Препараты и методы лечения и диагностики аллергии. - М., 1985. - С. 41.
4. Gershon R.K., Eardley D.D., Durum S. et al. // J. Exp. Med. - 1981. - Vol. 153. - P. 1533.
5. Shou L., Schwartz S.A., Good R.A. // J. Exp. Med. - 1976. - Vol. 143. - P. 1100.

ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНА ARACHIS HYPOGAEAE (PNA) НА
ЦИТАДГЕЗИЮ И ГЕМАГГЛЮТИНАЦИЮ ЛАКТОБАЦИЛЛ И
КИШЕЧНЫХ ПАЛОЧЕК

В.И. Брилис, М.Э. Микельсаар, Р.Х. Касесалу,
Э.И. Тюри, М.М. Утт, А.А. Ленцнер
Тартуский государственный университет

Специфическая ассоциация микроорганизма с клеткой макроорганизма (цитадгезия), осуществляемая путем взаимодействия бактериальных адгезинов с рецепторами клеток макроорганизма, необходима для приживания и сохранения его в микробиоте. У некоторых бактерий адгезины выполняют узнавание

рецепторов по типу углевод-белкового связывания, характерного для лектинов /3, 5/.

Указанный тип связывания имеет место у ряда патогенных микробов, например, у некоторых стрептококков /6, 9/, кишечных палочек /7/, кандид /14/. Поэтому, на наш взгляд, можно рассматривать возможность использования лектинов с лечебно-профилактической целью в качестве ингибиторов цитадгезии. Таково же мнение Н.Л.Ко и др. /11/.

Лектиноподобным взаимодействием могут обладать и некоторые представители микрофлоры организма, в частности, лактобациллы /8, 9, 15/, бактериоиды /13/. Поступая в организм с пищей, лектины микробного, животного или растительного происхождения могут приводить и к выраженным сдвигам в микрораскологии, что было показано J.G. Vanwell и др. /4/, путем введения крысам лектина РНА.

Исследование взаимодействия лектинов с микроорганизмами может дать ценную информацию об углеводном составе клеточных поверхностей, об их функциональном значении. У стрептококков группы В, например, показано, что их лектины способны подавлять фагоцитоз /10, 12, 16/.

Задачей настоящего исследования было изучение взаимодействия растительного лектина *Arachis hypogaeae* (РНА) с лактобациллами из нормальной микрофлоры человека и животных, а также с уропатогенными штаммами кишечных палочек на модели гематглютинации и адгезии микробов к эритроцитам.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы. В работе использовано 20 штаммов микроорганизмов, среди которых 6 штаммов относились к *Lactobacillus acidophilus*, по одному - *L. salivarius*, *L. casei* и *L. plantarum*, 2 - *L. brevis*, 4- *L. fermentum*, один - *L. buchneri*, выделенных от людей, поросят и крыс, а также 4 штамма *Escherichia coli*, изолированных от урологических больных.

Лактобациллы выращивали в среде МРС-I в течение двух суток, а кишечные палочки - в течение суток на скошенном МПА. Цитадгезию определяли по методике В.И. Бриллиса и др. /1, 2/ с применением формализированных эритроцитов человека 0/I группы крови Rh (+). Гематглютинацию изучали после 24-часового отстаивания взвеси при комнатной температуре.

Использовали лектин арахиса - PNA, производства кооператива "Диагностикум" (Львов). Опыты ставили при концентрациях препарата 5 мг/мл и 25 мг/мл; время воздействия 30 мин при 37°C. Опыты выполняли в трех вариантах: при первом - предварительно лектином обрабатывали тест-культуры микроорганизмов; при втором - предварительно с PNA помещали эритроциты; при третьем - PNA добавляли в готовую систему "микроб-эритроцит". При первых двух вариантах после преинкубации клеток их отмывали от остатков лектина центрифугированием (лактобациллы - 1500 об/мин, кишечные палочки - 3000 об/мин, эритроциты - 500 об/мин).

Перед каждым опытом дополнительно изучали аутоагрегацию тест-культур.

Полученные результаты, их обсуждение. В ходе проведенных исследований показано, что лектин арахиса PNA может оказывать существенное влияние на цитадгезию и в некоторой степени изменять геммагглютинирующую способность изученных микроорганизмов (таблица).

По характеру изменения цитадгезии под действием лектина все изученные микроорганизмы подразделялись на две группы. Первую составили микробы, адгезивность которых в значительной степени снижалась, причем при концентрации PNA 25 мг/мл больше, нежели при 5 мг/мл. В ней оказались все взятые в опыт штаммы *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, а также штаммы *L. acidophilus* Л_I, *L. brevis* I-6 и два низкоадгезивных штамма *E. coli* 6290 и 6306.

У штаммов второй группы адгезивность повышалась, причем при 5 мг/мл в большей степени, чем при 25 мг/мл, и особенно после предварительной обработки лектином микробов. Это имело место у 5 из 6 взятых в опыт штаммов *L. acidophilus*, у *L. salivarius* Л_{II}, у *L. brevis* Л₈, а также у двух среднеадгезивных штаммов *E. coli*. Как в первом, так и во втором случае определенной зависимости изменений от происхождения штамма, а у лактобацилл и от степени адгезивности, не наблюдалось.

Влияние лектина арахиса на геммагглютинацию микроорганизмов было менее выраженным, чем на цитадгезию. У большинства тест-микробов геммагглютинирующая активность под дейст-

вием РНА не изменялась. Это касается как штаммов имевших, так и не имевших указанных свойств. В этой группе оказалось 5 из 6 штаммов *L.acidophilus*, все изученные *L.salivarius*, *L.casei*, *L.plantarum*, *E.coli*, а также штаммы *L.fermentum*, L_{10} и *L.brevis* L_8 .

Независимо от результатов контроля, гемагглютинация у остальных 6 штаммов в некоторой степени изменилась: она всегда отсутствовала после обработки лектином микробов и всегда отмечалась в большей или меньшей степени после преинкубации эритроцитов. Если подавление гемагглютинации штамма *L.fermentum* L_9 можно объяснить участием в механизме связывания со стороны микроба остатков D-галактозы или D-галактозамина, которые блокируются лектином, то аналогичная реакция других штаммов требует дальнейшего изучения.

Неоднотипное во многом влияние РНА на цитадгезию и гемагглютинацию лактобацилл еще раз подтверждает наши предыдущие наблюдения, свидетельствующие об отсутствии прямой зависимости между указанными свойствами /I/. Гемагглютинация лактобацилл находится в прямой зависимости от их агрегирующей активности, ибо при наличии гемагглютинации у указанных микробов во всех случаях отмечалась и аутоагрегация.

В отличие от лактобацилл у кишечных палочек известна прямая зависимость между гемагглютинацией и адгезией. Поэтому отсутствие подавления гемагглютинирующих и адгезивных свойств лектином у штаммов *E.coli* 6305 и 6332 говорит в пользу отсутствия у них специфичных РНА углеводных остатков.

В отличие от последних, у ряда штаммов лактобацилл и у штаммов *E.coli* 6290 и 6306 цитадгезия существенно снижалась после прибавления лектина арахиса. Это свидетельствует о блокировании адгезии через D-галактоз- или D-галактозаминовые остатки. На наш взгляд, в этом типе связывания возможны два варианта. Первый — между гликопротеидами гликофорина А эритроцита и остатками D-галактозы или D-галактозамина тейховых кислот микроорганизма, а второй — между гликопротеидами микробов и соответствующими остатками ганглиозидов эритроцита.

Отдельного рассмотрения требуют случаи повышения под действием РНА адгезивности микроорганизмов. Очевидно у них

Таблица

Цитадгезия и гематтглотинация тест-микробов после воздействия лектина арахиса

Штамм	Адге- зив- ность	Аггре- гация	Изменение СПА в % после воздействия РНА (Г/мл)						ГА														
			I		II		III		КОНТ- роль	I		II		III									
			5	25	5	25	5	25		5	25	5	25	5	25								
I группа																							
L. acidophilus L1	с	+	-21,5 [*]	-29,6 [*]	0,9	-47,9 [*]	0	-42,9 [*]	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
L. casei 1-25	с	-	17,6 [*]	-20,6 [*]	0,9	-20,6 [*]	2,7 [*]	-64,6 [*]	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
L. plantarum 7-19	с	-	-42,1 [*]	-44,7 [*]	II,6	-74,4 [*]	-35,9 [*]	-61,2 [*]	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
L. fermentum L9	н	+	35,1 [*]	-10,8 [*]	12,8	-43,2 [*]	-22,4 [*]	-49,3 [*]	+	-	-	+	+	+	+	+	+						
L. fermentum L10	с	+	5,1 [*]	-40,5 [*]	9,5	-31,7 [*]	2,7 [*]	-33,3 [*]	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
L. fermentum L12	с	-	7,8 [*]	-31,4 [*]	8,7	-17,7 [*]	51,0 [*]	-33,3 [*]	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
L. fermentum 1-20	с	-	-29,7 [*]	-68,1 [*]	-40,2 [*]	-47,2 [*]	-25,8 [*]	-45,2 [*]	-	-	-	+	+	-	-	-	-						
L. brevis 1-6	с	-	4,8 [*]	-61,9 [*]	-61,9 [*]	-60,3 [*]	-17,6 [*]	-43,1 [*]	-	-	-	+	+	+	+	+	+						
L. buchneri 1-7	н	-	0	-51,9 [*]	0	-50,0 [*]	-32,6 [*]	-41,4 [*]	-	-	-	+	+	-	-	-	-						
E. coli 6306	н	-	13,3	-68,9 [*]	-33,3 [*]	-49,1 [*]	-14,3	-39,3 [*]	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
E. coli 6290	н	-	10,7	-71,4 [*]	-3,7	-35,7 [*]	4,3	-28,7 [*]	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
II группа																							
L. acidophilus L2	с	+	83,9 [*]	41,9 [*]	35,5 [*]	33,9 [*]	10,8	-14,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
L. acidophilus L3	с	+	55,7 [*]	22,9 [*]	32,8 [*]	-8,2	-1,6	-6,6	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
L. acidophilus L5	с	-	107,4 [*]	45,9 [*]	57,3 [*]	19,7	21,3 [*]	-6,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
L. acidophilus L6	с	+	91,8 [*]	46,2 [*]	3,8	-10,3	9,7	-37,3 [*]	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
L. acidophilus L7	с	-	52,2 [*]	10,9	56,5 [*]	73,9 [*]	32,6 [*]	10,9	+	-	-	+	+	+	+	+	+						
L. salivarius L10	с	+++	88,9 [*]	18,5	29,6 [*]	100,0 [*]	92,6 [*]	48,1 [*]	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
L. brevis L8	н	+	52,0 [*]	-16,0	108,0 [*]	20,0 [*]	56,0 [*]	-20,0 [*]	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
E. coli 6332	с	-	40,2 [*]	23,1 [*]	14,6	0,9	35,2 [*]	10,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
E. coli 6305	с	-	26,0 [*]	1,0	4,4	14,8	57,1 [*]	84,6 [*]	+	+	+	+	+	+	+	+	+						

Примечание: ч - штамм изолирован от человека, п - от поросят, к - от крыс. с - средняя степень, н - низкая степень адгезивности. СПА - средний показатель адгезивности. ГА - гематтглотинация. I - предобработка лектином микробов, II - предобработка эритроцитов, III - прямое влияние РНА. * - значимое изменение адгезивности (р < 0,05).

принципиально другой механизм прикрепления, а роль лектина сводится к связыванию поверхностных структур клеток, в определенной степени препятствующих осуществлению цитадгезии. Поэтому после воздействия лектина арахиса как бы раскрываются ответственные за адгезию структуры. Если это так, то в ряде случаев по этой причине результаты цитадгезии *in vitro* могут значительно отличаться от таковых *in vivo*.

В ы в о д н. 1. Лектин арахиса PNA оказывает выраженное влияние на цитадгезию лактобацилл и кишечных палочек. 2. Указанный лектин в некоторой степени изменяет гем-агглютинирующую активность некоторых штаммов лактобацилл. 3. Влияние PNA на цитадгезию зависит от концентрации лектина, но не зависит от происхождения, а у лактобацилл и от степени адгезивности штамма. 4. По характеру изменения цитадгезии под действием лектина арахиса у изученных штаммов лактобацилл и кишечных палочек выявляются по крайней мере два отличных друг от друга механизма соединения адгезинов с рецепторами, один из которых специфичен механизму связывания лектина арахиса.

Л и т е р а т у р а:

1. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П. и др. // *Э. микробиол.* - 1982. - № 9. - С. 75-78.
2. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П. и др. // *Лаб. дело.* - 1986. - № 4. - С. 210-212.
3. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция бимолекул. - М., 1985.
4. Banwell J.G., Howard R., Cooper D. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1985. - Vol. 50. - P. 68-80.
5. Beachey E.H. // *J. Infect. Dis.* - 1981.-Vol. 143.- P. 325-345.
6. Beuth J., Ko H.L., Uhlenbruck G. et al. // *Eur. J. Clin. Microbiol.* - 1987. - Vol. 6. - P. 591-593.
7. Edhdad I., Sharon N. // *Biol. Cell.* - 1984. - Vol. 51. - P. 259-266.
8. Fuller R., Brooker B.E. // *Am. J. Clin. Nutr.*-1974. - Vol. 27. - P. 1305-1312.
9. Hamada S., Gill K., Slade H.D. // *Infect. Immun.* -

- 1977. - Vol. 18. - P. 708-716.
10. Holm S.E., Bergholm A.-M., Wagner B. et al. // *J. Med. Microbiol.* - 1985. - Vol. 19. - P. 317-323.
11. Ko H.L., Beuth J., Sölter J. et al. // *Infection.* - 1987. - Vol. 15. - P. 237-240.
12. Motlova J., Wagner M., Jelinkova J. // *J. Med. Microbiol.* - 1986. - Vol. 22. - P. 101-105.
13. Rogemond V., Guinet R.M. // *Infect. Immun.* - 1986.- Vol. 53. - P. 99-102.
14. Sandin R.L., Rogers A.L., Patterson R.J. et al. // *Infect. Immun.* - 1982. - Vol. 35. - P. 79-85.
15. Savage D.C. // *Nahrung.* - 1987. - Bd. 31. - S. 383-395.
16. Wagner M., Bergholm A.M., Wagner B. et al. // *Bacteria and the Host.* - Prague, 1986. - P. 279-281.
17. Wagner M., Wagner B., Günther E. // *Proc. VIIIth Internat. Symp. on Streptococci and Strept. Dis.* - *Reedbooks*, 1982. - P. 70-71.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

	Стр.
Льбимова Н.В., Салькова Е.Г. Фитолектины во взаимоотношениях растений и патогенных микроорганизмов	3
Луцки М.Д., Кусень С.И. Лектины в исследовании структуры углеводных цепей гликопротеинов	10
Косенко Л.В., Ковалевская Т.М. Значение лектин-углеводных взаимосвязей в формировании бактериально-растительных симбиотических систем	17
Никитина В.Е., Итальянская Д.В., Карпунина Л.В., Кураксина С.К., Пономарева Е.Г., Федорова Л.С., Позднякова Л.И. Изучение биологической роли гемоглютининов (лектинов) почвенных азотфиксирующих бактерий	25
Лупашин В.В., Циоменко А.Б., Кулаев И.С. Действие конканавалина А на секрецию ферментов у клеток дрожжей <i>saccharomyces cerevisiae</i>	31
Линевич Л.И. Роль лектинов в формировании живых систем разных уровней организации	39
Кравцов Г.М., Граевская Е.Э., Дулин Н.О., Гончаренко Е.Н., Кудряшов Д.Б. Механизм действия конканавалина А на тучные клетки	43
Саенко Е.Л., Басевич В.В. Лектиноподобный характер взаимодействия церулоплазмينا человека со специфическим эритроцитарным рецептором	48
Дрченко О.В., Ветрова Е.П., Хомутовский О.А., Луцки М.Д., Передерей О.Ф. Ультраструктурное распределение лектиновых рецепторов на поверхности лимфоидных клеток	52
Рябинина И.Д., Мирошниченко И.В., Ярилин А.А. Роль мембранных рецепторов для лектинов в преодолении гематогимического барьера предшественниками Т-лимфоцитов	56
Льбимова Н.В., Шувалова Е.П., Лахтин В.М., Давлетшина М.Л. Роль лектина во взаимодействии плазмалеммы клеток клубней картофеля с клеточно-поверхностными метаболитами возбудителя фитофтороза	62
Варбанец Л.Д. Взаимодействие лектина из картофеля	

	Стр.
с гликополимерами <i>cornuеbacterium se-</i> <i>pedonicum pseudomonas solanacearum</i>	73
Громова В.В.-О. Взаимоотношения в системе возбу- дитель фитофтороза-картофель на уровне лектинов	76
Ямалеев А.М., Ямалеева А.А., Петрова З.В. Иммунохи- мический анализ лектинов пшеницы	81
Галкин М.А. Влияние агглютинаина зародышей пшеницы (АЗП) на некоторые физиологические па- раметры ассоциативного азотфиксирую- щего микроорганизма <i>azospirillum bra-</i> <i>sileense</i>	85
Крапивина Л.И. Исследование содержания изоформ лек- тина пшеницы в беккроссных линиях сорта Саратовская 29 и моносомных ли- ниях сорта Саратовская 46	91
Зайцева Ф.Б., Петров В.М., Липкин В.М. Использова- ние агглютинаина из зародышей пшеницы (АЗП) для выделения аденилатциклазы (АЦ) из коры головного мозга быка	94
Гольнская Е.Л., Корвацкая Е.В. Лектины генеративных органов и их роль в распознавании при взаимодействии пыльцы и пестика	97
Ильченко К.В. Лектин пыльцы табака: секреторное вы- деление в процессе роста пыльцевых трубок и его регуляция	102
Жесткова И.М., Молотковский Ю.Г. Влияние лектина из семян сои на структуру и энерготранс- формирующие реакции хлоропластов	108
Косенко Л.В., Пацева М.А., Лахтин В.М. Использова- ние конканавалина А для изучения поли- сахаридов клубеньковых бактерий го- роха	113
Кругова Е.Д., Маличенко С.М., Стадник М.В., Назаренко Н.И., Старченков Е.П. Исследование лекти- нов люпина с целью выяснения их учас- тия в системе бобовые растения - клу- беньковые бактерии	118
Подгорский В.С., Коваленко Э.А. Физиологические ас- пекты регуляции биосинтеза лектинов бактерий рода <i>bacillus</i>	122
Жулин И.Б., Щеголев С.Ю. Принципы количественной оценки агглютинации клеток под дей- ствием лектинов на основе метода спект- ротурбидиметрии	126
Самородов В.Н., Поспелов С.В. Лектины как регуляторы завязывания плодов и эмбриогенеза у груши при разных формах опыления	132

	Стр.
Сахаров И.Д., Лахтин В.М. Применение иммобилизованных лектинов для выделения и изучения изоферментов щелочной фосфатазы тлеяня	134
Скибо Г.Г., Коваль Л.М., Луцки М.Д., Кононенко Н.И. Меченые лектины в изучении поверхности развивающихся нервных клеток	139
Гордеева Л.В., Богданов А.А. (мл.). Лектины, иммобилизованные на поверхности липосом. Различия в связывании нормальными и трансформированными клетками	142
Граевская Е.Э., Кравцов Г.М., Ломакин Н.Н., Гончаренко Е.Н. Взаимосвязь транспорта ионов кальция и высвобождения гистамина из тучных клеток при действии конканавалина А ..	147
Павлова И.Н. Могут ли ферменты, превращающие углеводные субстраты, быть лектинами?	151
Купцова Е.С., Пронина Н.А., Семенов Е.Е. Скрининг различных видов одноклеточных водорослей на содержание лектинов и их внутриклеточная локализация	154
Комарова Э.Н., Алексидзе Г.Я., Вискребенцева Э.И., Милева Э.Л. Влияние фотопериодической индукции на изменение лектиновой активности в стеблевых апексах растений при переходе к цветению	159
Глузман Д.Ф., Склярченко Л.М., Луцки М.Д. Лектины как гистохимические реагенты в изучении злокачественно трансформированных клеток лимфоидной ткани	165
Михайлов А.Д. Иммобилизованные лектины в определении активности гликозилтрансфераз	170
Сморodin Е.П., Куртенков О.А. Пониженное сродство альфа-2-макроглобулина плазмы крови к фитогемагглютнину при раке желудка ...	172
Никонова М.Ф., Михна М.Г., Ярилин А.А. Изменение экспрессии рецептора к агглютнину арахиса и пролиферативного ответа на ФГА у тимоцитов под действием препаратов тимусных гормонов	178
Луцки А.Д., Детюк Е.С. Селективное выявление клеточных клонов методами лектиновой гистохимии	184
Евтушенко А.И. Антивирусные свойства лектинов каланхоэ	189
Гулая Н.М., Гаврилюк Е.С., Луцки М.Д., Передерей С.Ф. Обнаружение инсулиновых рецепторов в дифференцированных и недифференцированных клетках нейробластомы С13001В ..	192

	Стр.
Хомутовский О.А., Передерей О.Ф. Количественные сдвиги лектиновых рецепторов на поверхности дифференцирующихся клеток нейробластомы CI300	195
Асташкин Е.И., Сурип А.М., Гуковская А.С., Николаева И.С., Лазарев А.В. Лектиноподобное действие холерного токсина	199
Итальянская Д.В., Никитина В.Е., Панина Н.П., Кураксина С.К. Митогенная и мутагенная активность фукозоспецифичного лектина азоспирилл	205
Петруша Н.А. Противоопухолевое и стимулирующее гемопоз. Действие лектинов из кукурузных рылец	208
Гольнская Е.Л., Погорелая Н.Ф., Макаренко В.И. Лектины как возможное фармакологически активное начало у некоторых лекарственных растений	212
Осьмак А.А., Сокирко Л.Р. Гольнская Е.Л., Макаренко В.И., Лектины лекарственных растений в иммунодиагностике и прогнозировании	217
Грудень М.А. Применение иммобилизованных лектинов для выделения и очистки растворимых гликопротеинов из мозга животных	222
Болдырева М.Н., Алексеев Л.П., Феденко Е.С. Регулирующие свойства мононуклеаров у больных atopическим дерматитом	226
Брилис В.И., Микельсаар М.Э., Касесалу Р.Х., Тюри Э.И., Утт М.М., Ленцнер А.А. Влияние лектина <i>arachis hypogaeae</i> (PNA) на цитадгезию и гемагглютинацию лактобацилл и кишечных палочек	230