

TARTU ÜLIKOOLI
TOIMETISED

УЧЕННЫЕ ЗАПИСКИ ТАРТУСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS

869

ИЗУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ
ЛЕКТИНОВ

Том I

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ
ХИМИЯ И БИОХИМИЯ ЛЕКТИНОВ

Труды по химии

TARTU ÜLIKOOLI TOIMETISED
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ ТАРТУСКОГО УНИВЕРСИТЕТА
ACTA ET COMMENTATIONES UNIVERSITATIS TARTUENSIS
Alustatud 1893.a, VIHK 869 ВЫПУСК Основаны в 1893.г.

ИЗУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКТИНОВ

Том I

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ
ХИМИЯ И БИОХИМИЯ ЛЕКТИНОВ

Труды по химии



TARTU 1989

Редакционная коллегия:

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

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.869 - С.

Arh.
Tartu Ülikooli
Raamatukogu
10265



Петер Герман Стильмарк 1887



Рудольф Коберт 1852–1922

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ

СТОЛЕТИЕ ОТКРЫТИЯ ЛЕКТИНОВ В ТАРТУСКОМ УНИВЕРСИТЕТЕ

Т. Илометс

Тартуский государственный университет

Сто лет назад, 3(15) марта 1888 г., в четверг, в 12 часов в актовом зале Тартуского университета началась торжественная защита докторской диссертации по медицине. Свою работу "Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von Ricinus comm. L., und einigen anderen Euphorbiaceen" представил 28-летний Петер Германн Штильмарк (1860-1923). Диссертация была выполнена при Фармакологическом институте университета под руководством международно известного фармакологотоксиколога профессора Рудольфа Коберта. Официальными оппонентами были профессор гинекологии Гейнрих Макс Рунге, гигиенист и бактериолог профессор Бернгард Кёрбер и профессор Р. Коберт / 23, 24; 7, s. 9213, 9214/.

Это событие в истории науки считают днем рождения новой отрасли - лектинологии /15; 18; 9; 10; 16; 5/.

Итак, история лектинов берет свое начало в Тарту. Явилось ли это случайным или закономерным результатом совпадения многих обстоятельств, условий, предпосылок? Пытаемся найти ответ.

Новая эпоха развития многих наук в Тартуском университете относится в 40-ым годам прошлого столетия и связана с началом плодотворной деятельности Карла Шмидта, Фридриха Биддера и Рудольфа Бухгейма /4; 14; 20/. В этот период при исследовании проблем на вооружение берутся точные химические методы. Количественный химический анализ достигает такого уровня, при котором становится возможным его применение для исследования протекающих в организме процессов и для определения веществ.

Карл Шмидт (1820-1894, работал в университете с 1846 по

Zur feierlichen
DOCTOR-PROMOTION

des Herrn

Hermann Stillmark,

welche

Donnerstag den 3. März 1888, Mittags 12 Uhr,
im grossen Hörsaale der Kaiserlichen Universität
stattfinden wird,

laden ergebenst ein

Decan u. Mitglieder
der medicinischen Facultät.

Dorpat,
den 29. Februar 1888.

Druck von Schnakenburg

Пригласительная карточка на защиту докторской
диссертаций

1892 годы, с 1852 г. — профессор химии). Окончил медицинское и химическое отделения. Учился у выдающихся химиков того времени (Х.Розе, Д.Либига, Ф.Вёлера и физиолога Р.Вагнера). До 1852 г. работал в области физиологической химии; став профессором, сменил тематику.

Фридрих Биддер (1810—1894, в университете с 1843 по 1859 годы). Вместе с К.Шмидтом заложил основы тартуского направления в изучении физиологии пищеварения и обмена веществ. Общеизвестно их классическое исследование пищеварительных соков и обмена веществ, опубликованное в 1852 г. Преемником Ф.Биддера стал Александр Шмидт (1831—1894, в университете с 1862 по 1894 годы), воспитанник Тартуского университета, основатель ферментативной теории свертывания крови, выдающийся гематолог. Совершенствовался в 1858—1862 гг. в Берлине у знаменитого Гоппе-Зейлера в области физиологической химии и физиологии крови, в 1866—1867 гг. — в Лейпциге в лаборатории основоположника современной экспериментальной физиологии Карла Лудвига. В 1865 г. опубликовал монографию "Nämatologische Studien", в 1895 г. — "Weitere Beiträge zur Blutlehre". А.Шмидт имел тесные связи с Тартуским ветеринарным институтом, где с 1865 по 1867 г. занимал должность адъюнкта.

Рудольф Бухгейм (1820—1879, в университете с 1847 по 1867 гг.). В 1847 г. приехал в Тарту, в том же году основал первую в мире лабораторию экспериментальной фармакологии, а в 1860 г. — Институт экспериментальной фармакологии. В своей лаборатории он заложил основы точных количественных методов в этой науке и применил химически чистые вещества. В 1867 г. он отбыл в Гиссен. Преемником Бухгейма стал его ученик, получивший образование в Тарту.

Освальд Шмидеберг (1838—1920). Одной из его наиболее выдающихся работ тартуского периода является вышедшее в 1888 г. исследование химии и фармакологии мускарина. В 1872 г. он перешел на место директора вновь основанного Фармакологического института в Страсбурге.

В 1864 г. в Тарту на должность директора фармацевтического института прибыл Йоган Георг Драгендорф (1836—1898, в университете с 1864 по 1894 гг.), воспитанник Ростокского и

Ueber
Ricin, ein giftiges Ferment

aus den Samen von *Ricinus comm. L.* und einigen
anderen Euphorbiaceen.



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades

eines

Doctors der Medicin

verfasst und mit Bewilligung

Einer Hochverordneten Medicinischen Facultät der Kaiserlichen Universität
zu Dorpat

zur öffentlichen Vertheidigung bestimmt

von

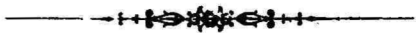
Hermann Stillmark,

Rechts.



Ordentliche Opponenten:

Prof. Dr. B. Körber. — Prof. Dr. M. Runge. — Prof. Dr. R. Nebert.



Dorpat.

Schnakenburg's Buchdruckerei.

1888.

Титульный лист докторской
диссертаций П.Г. Стальмарка

Гейдельбергского университетов. Выдающийся фармацевт, фармаколог, токсиколог, пользующийся международной известностью, великолепный химик-органик и химик-аналитик, ученик Р.Бунзена. Общеизвестны и переведены на многие языки его монографии: в 1868 г. - о выделении и анализе ядов (токсинов) и в 1882 г. - руководство по качественному и количественному анализу растений.

К третьей четверти прошлого века химия, фармация, фармакология и физиология в Тартуском университете приобрели международную известность. Тартуская наука того периода вообще характеризовалась интенсивным развитием областей соприкосновения разных отраслей наук и выдающимися результатами в этих "пограничных" областях науки. Открывалась возможность успешно решать проблемы, требующие сотрудничества ученых, представляющих разные отрасли науки.

Рудольф Коберт (1852-1922, в университете с 1886 по 1897 гг.) в 1886 г. избран директором Тартуского фармакологического института, продолжатель традиций своих предшественников Р.Бухгейма, О.Шмидеберга, Рудольфа Бема (1844-1926, в университете с 1872 по 1881 гг.) и Ганса Мейера (1853-1939, в университете с 1882 по 1885 гг.). Р.Коберт окончил Галльский университет и с 1880 по 1885 гг. работал в Страсбурге ассистентом О.Ш.Мидеберга. Будучи токсикологом широкого профиля, он привез из Страсбурга свою тематику исследования, которая содержала также одну давнюю проблему Р.Бухгейма, восходившую к его Тартускому периоду и разрабатывавшуюся в начале 80-х годов в Страсбурге у О.Шмидеберга. Это - давно интересовавшая фармакологов и токсикологов проблема ядовитости касторового и кротонового масел. Точнее, природа содержащегося в семенах и масле ядовитого компонента. Под руководством Р.Бухгейма 2 марта 1857 защитил докторскую диссертацию Георг Фридрих Крих "Experimenta quaedam pharmacologica ...". /19/. В том же году Р.Бухгейм опубликовал по этой работе расширенную статью на немецком языке /6/. Эту же проблему он рассматривает и в одной из статей 1870 года. Проблема касторового и кротонового масел возникает в институте О.Шмидеберга в начале 80-х годов, когда ядовитое начало ридина пытаются выделить уроженец Петербурга Бубнов и Т.Диксон

из Австралии /13; 2/. В это же время там работал и Коберт, который, приехав в Тарту, сразу приступает к исследованию кротонowego масла. В 1886 г. под его руководством завершена докторская диссертация Эрнста фон Гиршгейта "Ueber die Wirkung des Crotonöls" /13/, на основе которой с дополнениями Коберта в 1890 г. вышла подробная статья в изданиях института.

Генри Боуер, очевидно, первым получил из водного раствора семян клещевины после осаждения алкоголем осадок, явно содержащий рицин.

Р.Ф. Тузон в статье 1864 г. сообщает, что из выпаренного водного раствора измельченных семян клещевины под воздействием алкоголя отделяется осадок, который он назвал "рицинином".

Эмиль Вернер в статье 1870 г. критикует результаты Тузона, так как его методика не дает активного продукта. Вернер модифицирует методику, вымачивая холодной водой из измельченных семян клещевины вещество, которое оседает под воздействием алкоголя. Он также установил, что при нагревании активный компонент разлагается. Несмотря на меры предосторожности, рицинин Вернера все же оказывается инактивным. В настоящее время это объясняют тем, что в опытах он неоднократно применял одних и тех же собак, в результате чего у них выработался иммунитет к действующему компоненту. Таким образом, Вернер выделил настоящую фракцию рицина, но не сумел доказать ее токсичность. Исследованию белковых соединений семян клещевины посвящены работы Т. Риттгаузена, опубликованные в 1879 г. Он экстрагировал порошок, полученный из измельченных и просеянных семян клещевины, абсолютным алкоголем и эфиром и в полученной сухой "кристаллоидной муке" растворял водой и соляными растворами белковые соединения. По принципу фракционирующего осаждения ему удалось изолировать по крайней мере две белковые фракции равного состава. Он исследовал проблему как химик, оставляя фармакологический аспект в стороне. В 1883 г. Бубнов в институте О.Шмидеберга экстрагировал слабой кислотой обезжиренные семена клещевины и из полученного раствора при нейтрализации щелочью получил осадок, оказавшийся активным (токсичным). После преждевре-



П.Г. Стильмарк студент. Он учился на медицинском факультете Тартуского университета в 1880-1887

менной смерти Бубнова, над проблемой там же продолжил работать Томас Диксон. Он получил активный продукт, "который однако еще содержит белковое вещество". Бубнов выяснил, что действие касторового масла (токсичность) не зависит от рициновой кислоты. Диксон находит, что поскольку это вещество при кипячении водой, а в особенности под воздействием щелочи, инактивируется, оно должно быть типа ангидрида, вроде эуфорбина, который при переходе в гидратную форму теряет активность. Диксон пришел к выводу, что активный токсичный компонент имеет не белковый, а гликозидный характер. Исследования Т.Диксона, касающиеся активного компонента касторового масла, изданы в 1887 г. О.Шмидеберг подытоживает их во II томе своей работы "Arzneimittellehre", вышедшей в 1888 году /21/.

Таким образом, к 1887 г. проблема рицина все еще была неясна и нуждалась в дальнейших исследованиях. О работах Диксона Коберт узнал лишь после опубликования диссертации Р.Штильмарка. Статья, отправленная Диксоном Коберту, затерялась на почте, и Коберт позднее ознакомился с результатами по реферату /24; 9; 10/.

II августа 1886 г. П.Г. Штильмарк подает совету медфака заявление на сдачу "examen rigorosum pro gradu doctoris medicinae". В examen rigorosum - строгий экзамен - входило 20 разных испытаний и две письменные работы по специальности. Штильмарк выдержал экзамены в промежутке 13 апр. - 18 мая 1887 г. и приступил к докторской диссертации /7, с. 24350-24351/. Работал ли Штильмарк уже раньше у Коберта или поступил к нему после экзамена - пока не установлено. Можно предположить, что изучение ядовитого компонента семян клещевины Коберт наметил уже по прибытии в Тарту и задал эту тему Штильмарку не позднее мая 1887 г. Коберт и Штильмарк обращают основное внимание на наличие в семенах клещевины белковых веществ. Поэтому, как отмечал Штильмарк, существенное значение для них имели упомянутые выше работы Риттгаузена /24/. При экстрагировании белковых веществ Штильмарк руководствуется методикой Сидни Мартина (1885), которая применялась для выделения растительных альбуминов. Штильмарк экстрагирует измельченные семена клещевины 10 %-ным раствором



П.Г. Стильмарк с супругой Элизабет Клиней,
с которой вступил в брак в 1888 году

поваренной соли и осаждает белковое вещество сульфатом. Раствор остужают, отделяют кристаллы, а остаток подвергают диализу. Получается достаточно чистый продукт, который Штильмарк назовет рицином /23, 24/. Для разработки методики выделения токсичного компонента Штильмарк, по собственному признанию, пользовался фармакологическим изолированием. Химические операции комбинируются с опытами на животных и кровью. Штильмарк отмечал, что для изучения рицина он первый применил кровь, считая это гуманной методикой исследования. Как возникла идея пользоваться кровью – не совсем ясно. Тартуский ветеринарный институт был основным поставщиком крови для исследований Александра Шмидта, он же мог оказать услуги и Р.Коберту. Применение крови при исследовании свойств рицина может быть связано с влиянием обширных исследований крови А.Шмидта. Известно, что в 1886 г. Виллиам Гейденшильд под руководством последнего защитил докторскую диссертацию, в которой изучалось воздействие на кровь различных змеиных, бактериальных и плесневых ядов /II/. Научные взаимосвязи и влияния А.Шмидта и Р.Коберта пока мало исследованы.

П.Г. Штильмарк утверждает, что наиболее интересным и важным свойством рицина является его осаждающее воздействие на красные шарики крови. Совместно с Кобертом изучается влияние рицина на кровь кролика, коровы, лошади, козы, овцы, собаки, голубя, курицы и человека. Решающие опыты Р.Коберт проводит лично, результаты публикуются в докторской диссертации. Штильмарк выделил рицин из десяти разных сортов клещевины и аналогичные ядовитые белковые токсины – также из семян кротона (*Croton Tiglium*) и из семян *Curcas Jatropha* /24; 22/.

После опубликования результатов исследования рицина в марте 1888 г., а возможно, что уже одновременно с исследованием рицина Коберт приступает к изучению абрина. Варден и Ваделл, исследовавшие в Индии под руководством Роберта Коха токсичность *Abrus precatorius*, выделили в 1884 г. из его семян, корней и ствола путем экстрагирования водой не растворяющийся в алкоголе белковый токсин. В том же году к аналогичному результату пришли Брллантс и Веннеман в Бельгии /12/.

Свое первое сообщение об абрине Р.Коберт сделал в сем-

Der giftige Eiweisskörper Abrin und seine Wirkung auf das Blut.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doctors der Medicin

verfasst und mit Bewilligung

Einer Hochverordneten medicinischen Facultät der Kaiserl.
Universität zu Dorpat

zur öffentlichen Vertheidigung bestimmt

von

Heinrich Hellin.

Ordentliche Opponenten:

Prof. Dr. W. Koch. — Prof. Dr. R. Kobert. — Prof. Dr. R. Thoma.

Dorpat.

Druck von H. Laakmann's Buch- und Steindruckerei.

1891.

Титульный лист докторской диссертаций
Гейнриха Хеллина

тябре 1889 г. /17/, а в августе 1890 г. под его руководством работу над докторской диссертацией начинает Гейнрих Геллин (1865- ?), который в качестве материала для исследования пользуется абрином собственного изготовления, а также фирмы Мерка.

Г.Геллин защищает докторскую диссертацию "Die giftige Eiweisskörper Abrin und seine Wirkung auf das Blut" 24 мая (н. ст. 5 июня) 1891 г. /12, 7, s. 9213-9214/. Благодаря энергичной организационной деятельности Р.Коберта, фирма Мерка внедрила производство ригина и абрина нужного качества в необходимых количествах на основе разработанной Штильмарком методики /7; 9/. С препаратами фирмы Мерк проводит свои классические иммунологические исследования Пауль Эрлих. Статья о ригине выходит 6 августа 1891 г. и об абрине - 29 октября 1891 г. Этими исследованиями /8, s. 976-979; 1218-1219/ П.Эрлих доказал различие ригина и абрина, которое химическими определениями установить не смогли. Пауль Эрлих высоко оценивает проведенные в Тартуском фармакологическом институте работы по изучению ригина и абрина, где впервые оказалось возможным исследовать воздействие на организм чистых белковых токсинов.

С отъездом Р.Коберта из Тарту в 1897 г. в изучении лектинов наступает перерыв. Проблема ригина вновь встает на повестку дня в 1906 г., когда директор фармакологического института Давид Медитонович Лавров (1865-1929, в университете с 1902 по 1918 гг.) дает своему ассистенту Василию Николаевичу Воронцову (1877- ?) /7, s. 5332; s. 342/ задание определить устойчивость ригина в семенах при хранении. Семена времен Бухгейма после 30-летнего хранения исследовал П.Г. Штильмарк, теперь предстояло выяснить, что произошло с ними спустя 50 лет. Работа на эту тему вышла в 1907 г /1/. Другое исследование о химической природе ригина опубликовано в 1909 году /2/. В докторской диссертации "Материалы к вопросу о защитительной роли печени в животном организме", которую Воронцов защитил 9 декабря 1910 г., одна глава посвящена влиянию ригина /3/. Эти работы и завершают исследование ригина в Тартуском университете.

Автор считает приятной обязанностью выразить глубокую благодарность госпоже Барбаре Каллис (урожд. Стильмарк) за передачу в дар Научной библиотеке Тартуского госуниверситета фотографии П.Г.Штильмарка.

Л и т е р а т у р а

1. Воронцов В.Н. К вопросу о получении рицина из старых и свежих семян клещевины: Протокол Общ. Естествоисп. при Имп. Дрьевск. унив., 1907. - С. 146-208.

2. Воронцов В.Н. К вопросу о химической природе рицина: Протокол Общ. Естествоисп. при Имп. Дрьевск. унив., 1909. - С. 42-208.

3. Воронцов В.Н. Материалы к вопросу о защитительной роли печени в животном организме: Дис. - Дрьев, 1910.

4. История Тартуского университета 1632-1982. - Таллин, 1982.

5. Линевиц Л.И. Лектины и углевод-белковое узнавание на разных уровнях организации живого // Усп. биол. химии. - 1979. - Т. 20. - С. 71-94.

6. Buchheim R. Ueber die pharmakologische Gruppe des Crotonöls // Arch. pat. Anat. u. Physiol. u. klin. Med.Bd., 1857. - 12: Neue Folge, Bd. 2. - S. 1-26.

7. ENSV RAKA, f. 402, n. 2, s. 342; 5332; 9213-9214; 24350-24351.

8. Ehrlich P. Experimentelle Untersuchungen über Immunität // I Ueber Ricin. Deutsch. Med Wochenschr. - 1891. - Nr. 32. - S. 976-979; Nr. 44. - S. 1218-1219.

9. Franz H. Hundred Years of Ricin // Lectins. - 1988. - Vol. 6. - Sigma 7-13.

10. Franz H. The Ricin Story. Advances in Lectin Research. - Berlin, 1988. - P. 10-25.

11. Heidenschild W. Untersuchungen über die Wirkung des Giftes der Brillen- und der Klapper-Schlange: Diss.-Dorpat, 1886.

12. Hellin H. Eiweisskörper Abrin und seine Wirkung auf das Blut: Diss. - Dorpat, 1891.

13. Hirschheydt E. Ueber die Wirkung des Crotonöls: Diss.

- Dorpat, 1886.

14. Holmstedt B., Liljestrand G. Readings in Pharmacology. Pergamon Press, 1962.

15. Ilomets T., Toomik P. 1988 - sada aastat lektiivide avastamisest Tartu Ülikoolis // Tartu Riiklik Ülikool / Toimetised nr. 10. - 1985.

16. Ilomets T., Stillmark P.H., Hellin H. and Tartu University. Interlec 10. Abstracts - Prague Charles University, 1988. - 5.

17. Kobert R. Ueber *Abrus precatorius* L. 200. Sitzung am 7. September 1889. Sitzungsber. d. Naturforsch. Gesellsch. Univ. - Dorpat, 1891. - Bd. 9. - S. 114-117.

18. Kocourek J. Historical Background // The Lectins. - 1987. - Vol. 5. - P. 1-32.

19. Krich G.F. *Experimenta quaedam pharmacologica de oleis ricini, crotonis et Euphorbia lathyridis.* Diss. Dorpati Livonorum, 1857.

20. Käbin I. Die medizinische Forschung und Lehre an der Universität Dorpat/Tartu 1802-1940. Lüneburg, 1986.

21. Schmiedeberg O. Grundriss der Arzneimittellehre. 2. Aufl. Leipzig, 1888. - S. 174.

22. Siegel A. Ueber die Giftstoffe zweier Euphorbiaceen: Diss. - Dorpat, 1893.

23. Stillmark P.H. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus comm.* // L., und einigen anderen Euphorbiaceen, 1888.

24. Stillmark P.H. Über Ricin // Arch. Pharm. Inst. Dorpat. - Stuttgart, 1889. - S. 59-151.

ФУНКЦИИ ЭНДОГЕННЫХ ЛЕКТИНОВ

Н.П. Королев, Э.И. Вискребенцева
Московский государственный университет
Институт физиологии растений АН СССР, г. Москва

Лектины, первый представитель которых был открыт Штильмарком в 1887 г. в ходе его работы в университете г. Дерпта (Тарту), являются перспективными объектами исследований в настоящее время. Структура и свойства лектинов подробно рассмотрены в ряде публикаций /1-3, 52/. Лектины универсально распространены в живых организмах - от вирусов до высших животных. Классификация лектинов по углеводной специфичности хорошо известна /см. 2, 3, 52/. Однако она носит формальный характер, поскольку в одну группу могут попасть различающиеся по структуре и функциям белки. Более обоснованной кажется классификация смешанного характера - не по формальной строгости, а по удобству пользования /143/.

Классификация лектинов по /143/ (упрощена):

- I. По углеводной специфичности
 1. реагирующие с кислыми сахарами,
 2. реагирующие с нейтральными сахарами.
- II. По топохимической рекогниции углеводов
 1. реактивные только к концевым остаткам,
 2. реактивные также к концевым ди- -тетрасахарам
 3. реактивные также к олигосахаридам внутренних областей цепей.
- III. По функциональной активности
 1. грубые лектины (агглютинирующие, неагглютинирующие, фрагменты полных лектинов, проформы лектинов),
 2. митогенные лектины,
 3. токсические лектины,
 4. мембранные лектины (детализируются по организму, органам и клеткам частных организмов).

Легко видеть, что и в этой классификации один и тот же лектин может быть отнесен к различным группам. Оптимальная классификация могла бы быть построена по "абсолютным" свойствам - на основе данных о первичной структуре лектинов или, хотя бы, их иммунохимической гомологии. Очевидно, что такая классификация в настоящее время невозможна, так как известна первичная структура только малой части лектинов. Уже имеющиеся данные позволяют, однако, наметить некоторые группы лектинов со сходной структурой.

ТИПЫ ЛЕКТИНОВ

Можно выделить ряд обособленных по структуре и функциям групп лектинов. Рассмотрим только некоторые из них.

Лектины бобовых могут иметь в зависимости от источника различную специфичность. Однако, они иммунохимически перекрестно реактивны, даже если различаются по специфичности. Это показано, например, /59, 46/. В последнее время для исследования гомологии лектинов бобовых широко используется методика секвенирования нуклеиновых кислот соответствующих генов /24, 67, 72, 147/. Полученные данные подтверждают предположение о происхождении лектинов бобовых от общего предкового гена /50, 51/. Аналогичные данные дает исследование гибридизации ДНК соответствующих генов /76/.

Определена первичная структура ряда лектинов бобовых трибы *Viciae* /33, 50, 51, 62, 67, 115/, включая несколько лектинов из р. *Lathyrus* /116, 123, 125, 133, 152, 153/; среди исследованных лектинов обнаружена высокая степень гомологии. Во всех случаях лектины бобовых представлены тетрамерами, содержащими две легкие альфа-цепи с молекулярной массой около 6 кД и две тяжелые бета-цепи с молекулярной массой около 20 кД. Для лектина V. *Tetrasperma* характерна, однако, структура тетрамера из идентичных цепей с молекулярной массой 18,7 кД /83/. Иммунохимическая перекрестная реактивность лектинов бобовых показана в ряде работ /83, 124/; первичная структура легких цепей и тяжелых цепей /51, 115, 131, 133, 152 и 50, 67, 126, 153/ также проявляет гомологию. Для ряда лектинов бобовых сходна вторичная структура /4/. Все эти данные предполагают не только происхождение от общего

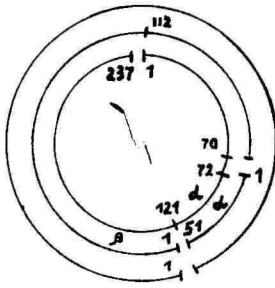
гена, но и одинаковый характер процессинга насцентного продукта. Действительно, согласно /28/, биосинтез различных лектинов бобовых начинается с синтеза в эндоплазматическом ретикулуле проформы, затем посттрансляционно удаляется гидрофобная сигнальная последовательность и концевой гликозилированный гликопептид. В трибе *Viciae* дополнительно происходит посттрансляционный гидролиз эндопептидазой по связи Asp-X /66/.

Например, при синтезе конканавалина А (Кон А) сначала синтезируется гликозилированный про-Кон А, а синтез зрелой формы Кон А включает удаление N-сопряженных олигоманнозных (высокоманнозных) олигосахаридов /18, 24, 65/ и гидролиз нескольких пептидных связей с последующим транспептидированием /65/. Общая схема "расправления" бобовых со своим предковым геном, продуцирующим полуфабрикат, представлена на рисунке I /из II7/. В некоторых случаях с предковым геном наблюдается бережное обращение. Так, у *Lathyrus sphaericus* и *L. nisolia* не происходит гидролиза полуфабриката эндопептидазой /II7/. В результате лектины этих растений представлены димером двух идентичных цепей с молекулярной массой 27-28 кД. Причины такого бережного обращения неясны. Либо у этих растений просто отсутствует соответствующая эндопептидаза, либо для функционирования этих лектинов не требуется N-гликозилирования по разорванной связи. Действительно, как видно из рисунка I, по месту гидролиза полипептидной цепи предкового продукта у многих бобовых происходит N-гликозилирование.

Приведенные данные сами по себе предполагают важную функцию лектинов в клетках бобовых. Действительно, иначе трудно понять консерватизм в эволюции предкового гена и сложно и тонко отрегулированный механизм формирования зрелых форм лектинов.

Отметим еще, что синтез зрелой формы лектинов бобовых приурочен к определенным стадиям развития семян. Так, синтез Кон А активно начинается только на 80-й день созревания семян *Canavalia gladiata*, тогда как синтез основного белка семян этих растений начинается уже на 30-й день созревания семян /I5I/. Подробно исследован синтез зрелой формы Кон А. Он включает выщепление короткого полипептида и включение его

1



2

двухцепные

- 180 * 1
 L.o. T-Y-P-N-E-T-S-Y
 *↑
 L.c. T-Y-P-N-V-T-S-Y
 *↑
 L.ap. T-Y-S-N-V-T-S-Y
 *↑
 L.ar. T-Y-P-N-A-T-S-Y
 *↑
 V.f. L-Y-P-N-L-T-G-Y
 ↑

одноцепные

- 188 193
 L.s. T-Y-P-N-S-R-D-Y
 179 184
 L.n. T-Y-P-N-S-V-S-Y

3

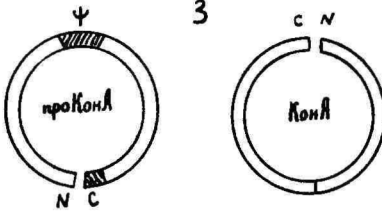


рис. 1

Рис. 1. Гомология первичной структуры лектинов бобовых.

1 - внутренняя линия - первичная структура Кон А, средняя линия - первичная структура альфа- и бета-цепей фабина, наружная линия - первичная структура лектина арахиса (воспроизведено по (1)),
2 - Сравнение последовательности вблизи аспарагинового остатка, являющегося центром гидролиза эндопептидазой предшественников двух- и одноцепных лектинов. Стрелка - пептидная связь, чувствительная к гидролизу аспарагин-эндопептидазой, звездочка - возможный центр гликозирования (по (117)). Сокращения:

L.o. - *Lathyrus ochrus*

L.c. - *L. cicera*

L.ap. - *L. aphaca*

L.ar. - *L. articulatus*

V.f. - *Vicia faba*

L.s. - *L. sphaericus*

L.N. - *L. nisolia*

3-Процессинг про-Кон А в Кон А. N- и C-амино- и карбоксиконцевые участки полипептидной цепи. Заштрихованный участок вблизи C-конца удаляется при процессинге. Ψ - высокоманнозный полисахарид. Согласно: Faye L., Chrispeels M.J. *Planta*. - 1987.-Vol. 170. - N 2.- P. 217-224.

(посттрансляционно) в структуру другого полипептида - рисунок I /18, 24, 29, 65/. В созревающих семенах *S. ensiformis* Кон А существует как в форме гликозилированного предшественника, так и в зрелой форме /18, 29, 65, 89/; то же и для семян *S. gladiata* /151/. Гликозилированный предшественник Кон А не имеет лектиновой активности /18, 24, 65/. Аналогично происходит процессинг про-фабина - лектина из *Vicia faba* /63/.

Оксипролин-богатые гликопротеиды (ОБГ) являются характерными компонентами экстраклеточного матрикса как у животных, так и у растений /85, 142/. Клеточные стенки высших растений содержат в своей структуре близкородственную группу ОБГ, которая обозначается как "экстенсин" /80/; их характерным свойством является накопление при инфицировании /45, 85/, что сближает их с матриксными лектинами (см. ниже). ОБГ включены также в процессы рекогниции клеток растений /6/ и их ответы на взаимодействие со стимулами /17, 25/. Достаточно хорошо охарактеризован экстенсин из клеток моркови /31/, определена его первичная структура. При исследовании экстенсинов из клеток растений затруднительным является их выделение, поскольку они обычно перекрестно-сшиты в клеточной стенке /107, 142/. Однако одноклеточные водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* содержат клеточный компонент, практически не отличимый от ОБГ клеточных стенок растений /119/. Этот гликопротеид может являться удобной моделью для исследования свойств экстенсинов клеток растений. ОБГ присутствует в мембранах двух жгутиков этой микроводоросли и участвует в специфичности типа спаривания при половом процессе /5, 96/. Агглютинация гамет противоположного типа спаривания происходит при участии этого полоспецифичного ОБГ /57/. Этот ОБГ-агглютинин облегчает и сортировку партнеров, которые могут сливаться только через локальный участок клеточной стенки в пространстве между двумя жгутиками /57/; после агглютинации происходит скольжение партнеров вдоль контактирующих жгутиков до соприкосновения способными к слиянию участками клеточной стенки. Агглютинин картофеля также является ОБГ и подобен экстенсину (обзор ранних работ см. в I). По данным электронной микроскопии, ОБГ клеток растений и хламидомонады

имеют палочкообразную структуру /20, 53, 118, 135/.

Исследование методом кругового дихроизма ОБГ хламидомонады, а также экстенсина высших растений, указывает /73/ на присутствие в их структуре полипролиновой спирали типа II. В модельных исследованиях на бислоях показано, что полипролиновая спираль может формировать трансмембранные ионные каналы /129/.

Можно предположить, что ОБГ - специфический класс лектинов, потенциально способных формировать ионные каналы в мембранах, что, в зависимости от связывания с ними лигандов, может индуцировать в клетках специфические ответы.

Многие ткани позвоночных содержат зависимые от стадии развития лектины, специфичные к бета-галактозиду /II, I2/ - галаптины. Галаптин плаценты человека /70/ иммунохимически перекрестно реактивен с другими галаптинами, включая галаптины печени и легких человека /83а/. По молекулярной массе галаптин из плаценты человека близок /69/ к галаптинам куриного эмбриона (кожи) с молекулярной массой 14 кД или кишечника взрослых кур /16, 103/. Частичная первичная структура галаптина плаценты обнаруживает сильную гомологию /69/ с галаптином кур, первичная структура которого известна /68, 104/. Близкое соответствие обнаруживается также в аминокислотном составе галаптина плаценты человека, селезенки телки, легких крыс и новорожденных мышей /69/. Иммунохимическая перекрестная реактивность показана также для галаптинов из тканей крупного рогатого скота, человека, обезьяны, свиньи и клеток гепатомы человека /21, 27, 134/. В ходе эволюции галаптины проявляют консерватизм структуры /27, 104, см. также обзор II/.

Галаптины склонны к ассоциации. При выделении и анализе в диссоциирующих условиях и в присутствии тиолсодержащих соединений галаптины проявляют гетерогенность субъединиц по молекулярной массе и наличие изоформ. Так, галаптин из легких крыс имеет молекулярную массу субъединиц 15,5, 18 и 29 кД /26/, галаптин из селезенки человека, крыс, свиньи, телки, барашка от 14,2 до 32 кД /7/, из селезенки крыс и мышей от 8,4 до 34 кД /7/. Множественность галаптинов известна также для легких крыс /26/, мышечных фибробластов 3Т3 /121/.

причем во многих случаях множественность форм галаптинов зависит от стадии развития органа, из которого они выделяются /11/. При использовании моноклональных антител к галаптинам из сердца крупного рогатого скота в лимфоцитах человека обнаружены реактивные белки, причем их уровень и относительное содержание меняется при митогенстимулированной трансформации лимфоцитов /22/. Эти данные, а также зависимость уровня галаптинов в других объектах от стадии развития организма или органа - печень крыс /27, 134/, эритробласты костного мозга /60, 61/, легкие млекопитающих /30, 102а/ - предполагают, что галаптены могут участвовать в процессах дифференцировки и морфогенеза /15, 113/, регуляции роста клеток, клеточной адгезии и метастазировании /88, 92, 112/. По крайней мере, для мышинного эмбриона регистрируется /95/ зависимое от стадии развития изменение уровня и характера мембранных лактозаминогликанов, так что роль галаптинов в клетках следует рассматривать в неотрывной связи с состоянием системы их эндогенных рецепторов.

Неожиданно было обнаружено митогенное действие галаптинов куриного эмбриона для мышинных лимфоцитов /10/ и В-клеток мышей /87/. Поразительно, что галаптин из электрического органа электрического угря при введении кроликам с миастений оказывает профилактическое и лечебное действие /86/; этот галаптин является митогеном для лимфоцитов кролика. Лектин, подобный галаптинам, был выделен из личинок мясной мухи *Sarcophaga peregrina*; при действии на мышинные макрофагоподобные клетки этот лектин индуцирует фактор некроза опухолей /75/, а также стимулирует синтез интерферона моноцитами человека /138/. По-видимому, к галаптинам следует отнести также и лектин из гемолимфы жука *Allomyrina dichotoma*, поскольку он галактозидспецифичен и зависит от стадии развития /146/. Этот лектин является митогеном для Т-лимфоцитов человека /81/. Одна из его форм "allo-A" активирует Т-лимфоциты, стимулирует продукцию ими интерлейкина-2, активирующего натуральные киллеры, и таким образом, перспективен для "естественной" падающей химиотерапии. Удивительно, насколько велико невнимание к лечебному применению лектинов в нашей стране; казалось бы, указанные свойства лектинов должны привлечь

внимание медиков. Пока что последний лектин выпускается для химиотерапевтического применения фирмой Cosmo Bio Co., Ltd, I-I (адрес: Shibaura 1-chome, Minato-ku, Tokyo, Tel. 03-798-3882 /41/.

Лектины клиренса специализированы на удалении из циркуляции гликоконъюгатов и клеток с измененной в сравнении с нормой структурой углеводных цепей. Их можно разделить на группу мембраносвязанных и растворимых лектинов, близких по структуре. Первый мембранный лектин клиренса - рецептор асиалогликопротеидов - был выделен из печени крыс в 1974 г. /74/. Затем мембранные лектины клиренса были выделены из печени птиц /77/, купфферовских клеток печени /136/, гепатоцитов /91, 93, 94, 141/, макрофагов /58/ различных животных. Лектин из печени цыплят /35/ содержит 3 домена: N-концевой из 23 остатков - гидрофильный, следующий домен из 25 остатков - гидрофобный, последующие 159 остатков содержат гидрофильные и гидрофобные аминокислоты. N-концевой остаток этого лектина часто ацетилирован /49/ и фосфорилирован по остатку серина в положении 7 /37/. По остатку Arg67 к этому лектину прикреплена углеводная компонента.

Отметим, что аналогично организованы рецепторы фактора роста эпидермиса и инсулина, которые содержат экстрамембранные лигандсвязывающие домены и цитоплазматический домен, являющийся субстратом для тирозинкиназы /40, 144, 145/. Однако эти рецепторы, в сравнении с лектином из клеток печени цыплят, организованы в мембране в реверсированном положении, т.е., N-конец обращен к наружной поверхности клеток.

В сыворотке человека присутствует группа лектинов со специфичностью к остаткам маннозы или N-ацетилглюкозамина, которые также участвуют в процессах клиренса /139/; лектины сыворотки специфичны также к фукозе (редкий случай у лектинов животных). В данном случае мы видим пример "экспансии" лектинов клиренса. Став сывороточными белками, они, возможно, стали выполнять функции ростовых факторов /23/, участвовать в примитивном иммунном ответе /36/, либо связывать и инактивировать освобождающиеся в циркуляции гликопротеидные лизосомные ферменты. Два из этих белков идентифицированы как природные (неимунные) IgG /137/, один - как секретируемый

гепатоцитами лектин с очень широкой специфичностью: манноза/ N-ацетилглюкозамин/фукоза /78, 137/. В сыворотке содержатся еще два иных маннозоспецифичных лектина /140/, один из которых идентичен маннозоспецифичному лектину клеток печени человека /147a/, а другой присутствует также и в различных органах человека - сердце, селезенке и др. /140/.

Возможно, что функции этих лектинов в сыворотке - остаток примитивной иммунной системы. По мере эволюционного развития эти лектины могли быть включены в "современную" систему иммунитета. Так, маннозоспецифичный лектин из печени крыс проявляет высокую степень гомологии с компонентом комплемента C1q /36/, а уровень одного из специфичных к маннозе лектинов сыворотки повышается при инфицировании человека вирусом Эпштейна-Барра /140/.

Отметим, что общий мотив организации маннозоспецифичных лектинов клиренса широко используется и для иных белков - обращает на себя внимание наличие коллаген-подобного домена, что характерно также для ацетилхолинэстеразы /122/, белка комплемента C1q /114/ и апопротеида легочного сурфактанта /13/.

Лектины-токсины. Ряд лектинов является токсинами и способен в модельных системах формировать в биологических каналах. Общий механизм токсичности для клеток рицина известен с 1970 г. /105/. В-цепь галактозо-специфично связывается с клетками и обеспечивает вход в клетки А-цепи, исходно связанной с В-цепью дисульфидными связями. Хотя с рицина началась лектинология, но только через 100 лет после его открытия в 1987 г. был выяснен механизм его цитотоксичности - удаление аденинового основания 4324 из 28 S РНК рибосом клеток-мишеней /42, 44/. Абрин (второй описанный Штильмарком лектин) и модецин также выщепляют аденин-4324 /42/; антивирусный белок лаконоса также содержит токсичную А-субъединицу /42/. Последние лектины не содержат углеводспецифичной В-цепи, и поэтому активны только в бесклеточных системах. Цепь В рицина связывается с галактозилными детерминантами на поверхности клеток и формирует канал, через который проходит цепь А (для этого требуется восстановление дисульфидных связей) /42/. Ряд других токсических лектинов / токсины А и В Clostridium difficile (рецепторами является Gal α 1-3Gal β 1-

4G1cNAs/84/), эндотоксин *Bacillus thuringiensis* /9, 10, 38, 39, 47, 109/ - рецептором является N-ацетилгалактозамин /82/ (этот лектин инсектициден для насекомых порядка *Lepidoptera*), также способны формировать в мембранах ионные каналы. Ряд других токсинов, среди которых присутствуют и лектины - дифтерийный токсин, токсин ботулизма и столбняка, лектин омелы /88a, 128a/, а также колицины /71, 97, 106/ содержат структурно близкие мотивы и способны формировать в мембранах каналы, а активность колицина E2 блокируется бета-Д-галактозидами /14/.

Таким образом структурные черты бактериальных токсинов и ряда лектинов оказываются консервативными в ходе эволюции.

Матриксные лектины. К лектинам с матриксной функцией можно отнести группу лектинов, разнородных по природе, которые при определенных биологических процессах формируют плотно упакованную сетку молекул лектин+рецепторы, выполняющую роль цемента или "молекулярного клея".

Типичным примером является лектин из кортикальных гранул яйцеклеток шпорцевой лягушки. Этот лектин с галактозильной специфичностью и молекулярной массой выше 500 кД содержится в кортикальных гранулах яйцеклеток /100/. При оплодотворении происходит освобождение содержимого кортикальных гранул /55, 149/ и их взаимодействие с вителлиновой оболочкой яйцеклеток. Если вителлиновая оболочка легко проницаема для сперматозоидов, то после оплодотворения формируется "оболочка оплодотворения", не проницаемая для сперматозоидов /56/, ультраструктурно отличающаяся от вителлиновой оболочки наличием аморфного слоя, называемого слоем оплодотворения, который расположен между вителлиновой и жемчужной оболочками /55/. Согласно полученным данным /99, 150/, формирование слоя оплодотворения обусловлено взаимодействием лектина кортикальных гранул с рецепторами. Физиологический смысл этого процесса - предупреждение полиспермии. F-слой - слой оплодотворения, может быть реконструирован в модельной системе. Для этого достаточно смешать лектин из кортикальных гранул с его природным рецептором из жемчужной оболочки в присутствии вителлиновой оболочки /98/. Если же обработать неоплодотворенные яйцеклетки лектином кортикальных гранул, то они

становятся непроницаемыми для сперматозоидов /150/. Лектины яйцеклеток с подобными функциями обнаружены и у др. амфибий /99, 120, 127, 128, 150/. Ясно, что амфибии – удобный объект для таких исследований, так как у них яйцеклетки легко доступны, а оплодотворение наружное. Отметим, что лектин кортикальных гранул шпорцевой лягушки сходен по некоторым свойствам с лектином клиренса – рецептором асиалогликопротеидов /100/.

Другой пример матричного лектина – это лектин из стратум корнеатум кожи человека, формирующий, возможно, матрицу, от которой происходит отшелушивание клеток эпидермиса; он представлен одной полипептидной цепью с молекулярной массой 40 кД и высоко специфичен к аминоксахарам /19/.

Возможно, что флoзные лектины растений, склонные к перекрестному сшиванию через дисульфидные связи также функционируют как матричные белки при ранениях растительной ткани.

В итоге мы можем выделить две четко охарактеризованные функции лектинов в различных клетках и организмах:

1) Матричная функция. Лектины выступают как основа для формирования опосредованного углевод-белковой рекогницией матрикса, служащего для формирования зон клеточных контактов (фибронектин, хондронектин) или специфической конденсированной или даже полимеризующейся структуры (экстенсин, лектины оплодотворения),

2) лектины могут выступать как регуляторы в системе лиганд-рецепторного взаимодействия. В зависимости от природы клеток частный лектин может являться рецептором (лектины клиренса) или лигандом – взаимодействие лектинов экстраклеточной локализации с мембранными гликоконъюгатами.

Отметим, что мы не рассматриваем здесь участие лектинов в процессах симбиоза, взаимодействия паразит-хозяин, процессах морфогенеза и дифференцировки и др. процессах (обзор ранних работ см. в 1, 2, 3, 52/. Мы обращаем внимание лишь на основные мотивы функционирования лектинов в живых клетках.

Наибольший интерес представляет вопрос о том, каким образом лектины осуществляют регуляторные функции в системе лиганд-рецепторного взаимодействия.

До настоящего времени механизмы таких функций эндогенных лектинов исследовались мало. Полагалось, что достаточно констатировать факт блокирования определенных функций гаптенами или экзогенными лектинами, чтобы сделать определенные предположения о роли лектинов в исследуемых процессах. Ясно, что на современном уровне анализа регуляторных систем клеток этого недостаточно. Ясно также, что современный подход к исследованию функций эндогенных лектинов требует четкого знания организации регуляторных систем клеток и применения для их исследования адекватных методов.

Ниже мы обратим внимание на основной механизм в регуляции функций клеток, основанный на существовании в клеточных мембранах ансамбля ионных каналов, и рассмотрим перспективные направления исследования функций эндогенных лектинов в рамках этого механизма.

Лектины как эндогенные регуляторы. Одним из основных механизмов ответов клеток на регулирующие сигналы внутри- или экстраклеточного происхождения является изменение свойств мембранных ионных каналов. В настоящее время эти каналы успешно исследуются методом пэтч-клампа. Особенности структуры ионных каналов в их молекулярной организации в мембранах обуславливает широкий репертуар для возможностей изменения их функционирования. Перечислим те параметры ионных каналов, которые могут быть зарегистрированы методом пэтч-клампа и по которым может осуществляться регуляция: I) потенциал-зависимость (имеется в виду, что большинство перечисленных ниже параметров может зависеть от мембранного потенциала), 2) ионная селективность, 3) блокирование ионами и антагонистами, 4) стимулирование ионами и агонистами, 5) проводимость одиночных каналов для различных ионов, 6) распределение по временам жизни открытого состояния, 7) распределение по временам жизни закрытого состояния, 8) организация в пачки, 9) множественность уровней проводимости, закрытых или заблокированных состояния и кинетика перехода между ними, 10) кластерная организация каналов - регулирование большого количества каналов синхронизирующим единым сигналом, II) изменение указанных свойств каналов при их модификации метаболизацией системами клетки - фосфорилировании/дефосфорилирова-

нии и др., I2) зависимость указанных свойств каналов от их ближайшего липидного окружения в бислоях.

Изменение указанных свойств каналов в ответ на стимул реализуется двумя основными путями. Каналы могут быть непосредственно связаны с рецептором сигнала (типичный пример – канал рецептора ацетилхолина); каналы сопрягаются с рецептором соответствующего сигнала при участии системы вторых мессенджеров. Для второго типа каналов характерно изменение свойств при изменении уровня в цитоплазме второго мессенджера, модулируемого в ответ на связывание лигандов со специфическими клеточными рецепторами.

Можно выделить следующие основные типы мессенджеров:

I) ионы Ca, 2) циклические нуклеотиды, 3) диацилглицериды (мембранный мессенджер), 4) инозитолтрифосфат. Генерация этих мессенджеров при связывании лигандов с рецепторами зачастую взаимосвязана – так инозитолтрифосфат вызывает освобождение Ca из эндоплазматического ретикулума. Мессенджеры могут влиять на свойства каналов непосредственно, либо через специфические структуры, а также при участии зависимых от мессенджеров ферментов (рис. 2).

Прямое влияние мессенджеров. Типичный пример – это влияние Ca на свойства определенного типа K-каналов – "кальцийзависимых K-каналов". Эти каналы необычайно широко распространены в различных клетках и активируются при связывании Ca с кальмодулинподобными центрами самих каналов.

Непрямое влияние мессенджеров. Влияние циклических нуклеотидов осуществляется через систему протеинкиназ, чувствительных к циклическим нуклеотидам. Причем реализация сигнала о связывании лигандов с рецептором, приводящая к изменению уровня циклических нуклеотидов в клетках, обычно происходит при участии семейства специфических белков – трансдуцинов или G-белков, способных модулировать ферменты обмена циклических нуклеотидов (фосфодиэстеразу и циклазу). Однако G-белки могут быть сопряжены с каналами и непосредственно (см. I2Ia).

Диацилглицериды, образующиеся в мембранах при активации сопряженной с рецептором фосфолипазы C, могут действовать на каналы непосредственно (за счет изменения ближайшего липид-

ного окружения), или опосредованно - через систему протеинкиназы С (стимулируя ее связывание из цитоплазмы с мембранами), либо через систему цитоплазматического Са (вследствие образования в результате действия диацилглицеридфосфатазы фосфатидовой кислоты, образующей с Са ионофорный комплекс, переносящий Са внутрь клеток).

Инозитолтрифосфат, образующийся при связывании с рецепторами специфических лигандов, эффективно освобождает Са из внутриклеточных депо, прежде всего, из эндоплазматического ретикулума.

Мы можем умозрительно предположить, что эндогенные лектины могут влиять на функционирование ионных каналов различными механизмами: 1) непосредственно связываясь с рецепторами эндогенных лигандов, 2) влияя на сопряжение фонда вторых мессенджеров с каналами, либо непосредственно влияя на свойства каналов, 3) независимо от специфических лигандов меняя фонд тем или иных вторых мессенджеров, 4) независимо от вышеуказанных механизмов модулировать "нормальный" ответ каналов на лигандрецепторное взаимодействие в результате изменения характера латерального в плоскости мембраны распределения специфических рецепторов и ионных каналов; их кластерирование может приводить к специфическому "клеточному" эффекту, заключающемуся в том, что генерация второго мессенджера в непосредственной близости от ионного канала может повышать эффективность действия мессенджера на канал.

К сожалению, на данное время невозможно привести экспериментальные данные о таком характере регулирующей активности эндогенных лектинов. В первую очередь это обусловлено тем, что представление о системе вторых мессенджеров и их роли в функционировании ионных каналов - достижение последних исследований. Затем большое значение имеет и тот факт, что исследования в области лектинологии до недавнего времени носили направленность поиска, выделения и охарактеризования новых лектинов. Их биологическая активность исследовалась, в основном, на экзогенных системах, а эндогенные функции лектинов исследовались, пожалуй, только на фибронектине.

Поэтому для иллюстрации высказанных положений привлечем данные по влиянию экзогенных лектинов на функционирование

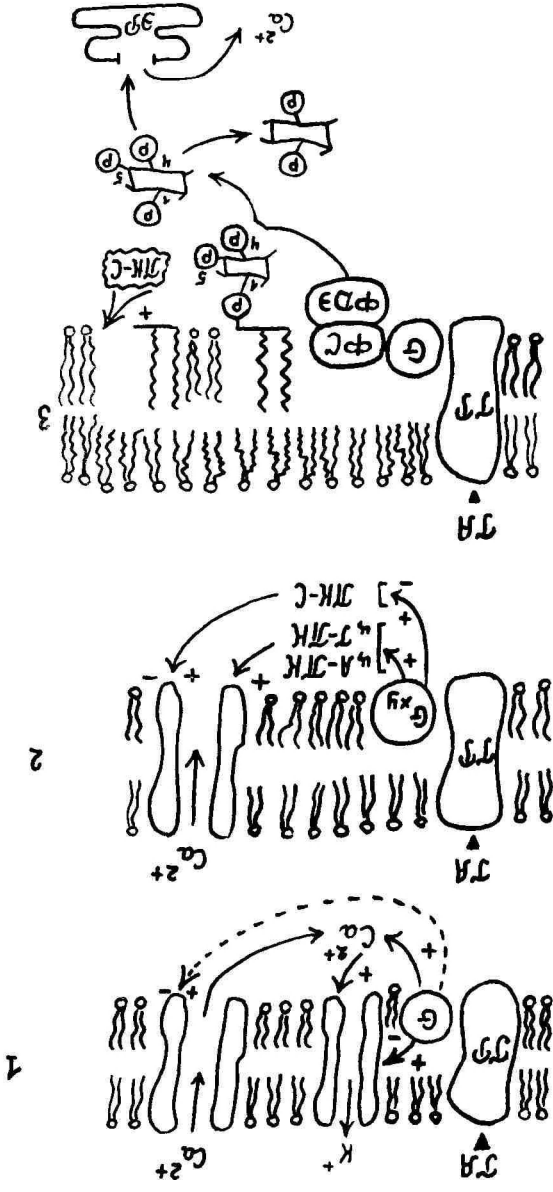


Рис. 2. Основные пути регуляции ионных каналов (в основном, по I4a и I2Ia).

При действии гормонального агониста (ГА) – гормона или нейрона–гормональный рецептор (ГР) при участии G-белков (трансдуцинов) происходят явления 1–3:

1 – в результате повышения цитосольной концентрации Ca активируются Ca-зависимые K-каналы, в результате чего происходит деполяризация клеток и стимулирование потенциалзависимых Ca-каналов, через которые Ca входит в клетки; возможно также прямое активирование или ингибирование G-белками различных каналов,

2 – в результате активации определенного типа G-белков (G_s или G_i) происходит активация или ингибирование циклаз цАМФ/гГМФ, что приводит к модуляции активности зависимых от них протеинкиназ (соответственно цА-ПК и цГ-ПК) или модуляция активности протеинкиназы C (ПК-C). Изменение активности этих протеинкиназ вызывает изменение уровня фосфорилирования канальных белков, что регулирует их активность,

3 – в результате активации фосфодиэстеразы (ФДЭ) мембранного фосфатидилинозитолтрифосфата или активации фосфолипазы C (ФС) происходит гидролиз фосфатидилинозитолтрифосфата до диацилглицеридов и инозитолтрифосфата. Последний мобилизует Ca из эндоплазматического ретикулума (ЭР), а диацилглицериды стимулируют включение цитосольной ПК-C в мембрану и стимулируют ее.

ионных каналов. Данные неполные и, по необходимости, чисто иллюстративные.

1. Инсулин-миметическая активность различных лектинов растений (Кон А, агглютинин из зародышей пшеницы, рицин I и II) и лектина горькой тыквы может быть обусловлена связыванием их непосредственно с рецептором инсулина на адипоцитах /22а, 32а, 32б, 33а, 61а, 76а, 92а, 132а). Вообще рецептор инсулина обнаруживается очень рано на эволюционном древе - он обнаружен уже на поверхности ряда бактерий и простых грибов /143/. Очевидно, рецептор инсулина и соответствующий лиганд - это пара консервативных в эволюции молекул, обеспечивающих пролиферативный ответ на клеточном уровне.

2. Кон А блокирует вызванную фоболовым эфиром транслокацию протеинкиназы С из цитоплазмы на внутреннюю поверхность плазматической мембраны клеток глиомы /108/. Кон А активирует Ca-каналы в нейтральных клетках РС12 /54/. При действии на моноциты человека /32/ или тимоциты крыс /8/ Кон А вызывает освобождение протеинкиназы С из мембраносвязанного состояния в цитосол.

3. При действии на клетки ряд лектинов повышает в них уровень Ca /130/, циклических нуклеотидов, стимулирует быстрый обмен фосфолипидов с генерацией инозитолтрифосфата, освобождающегося в цитоплазму и диацилглицеридов, накапливающихся в мембранах /101/.

4. Непосредственных данных о "клеточном" эффекте пока нет, но подавление кластерирования рецепторов митогенных лектинов (преобработкой мембран перекрестно-сшивающими реагентами или при использовании моновалентных лектинов, лишенных активности в кластерировании рецепторов без изменения углеводсвязывающей активности) снижает бластогенную активность многих митогенных лектинов. Согласно /48/ (см. рис.3), изменение характера активности мембранных лектинов, взаимодействующих со своими рецепторами латерально в мембране, может быть новым и чутко реагирующим на регуляторные сигналы механизмом изменения чувствительности рецепторов к агонистам и антагонистам в связи с модуляцией относительного распределения в плоскости мембраны рецепторов.

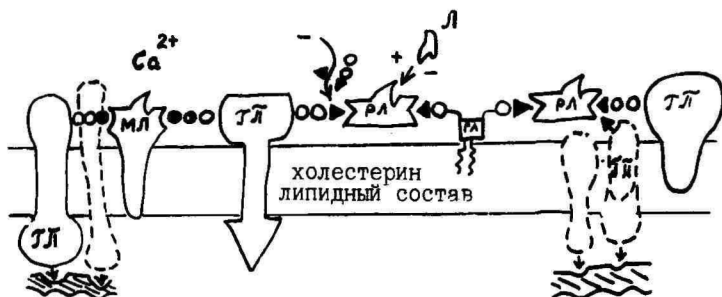


Рис. 3. Латеральные взаимодействия лектинов с мембранными конъюгатами (по /48/ с изменениями). Мембранные лектины (МЛ) или растворимые лектины (РЛ), взаимодействуя с мембранными гликопротеидами (ГП) или гликолипидами (ГЛ), индуцируют неоднородное распределение в плоскости мембраны мембранных гликоконъюгатов. Этот процесс может модулироваться ионами Ca , растворимыми гаптенами, заякоренными вблизи гликоконъюгата (заштрихованная сеть в нижней части рисунка), причем блокирование может осуществляться как гликоконъюгатами (правая часть рисунка), так и негликоконъюгатами (левая часть рисунка), плотно удерживаемыми вблизи мембранного рецептора путем заякоривания на цитоскелете. Лиганды (Л) гидрофобного связывающего центра лектинов могут модулировать лектин-рецепторные взаимодействия так же, как и липидный состав бислоев, прежде всего уровень холестерина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, мы рассмотрели некоторые хорошо изученные группы лектинов, две из основных функций лектинов – функцию "молекулярного клея" и компоненты лиганд-рецепторных взаимодействий, остановились на перспективе исследования последней функции лектинов.

Обращая внимание на достижения лектинологии, в целом можно отметить, что в настоящее время наиболее интенсивно развиваются три направления: 1) выделение и охарактеризование новых лектинов, 2) исследование структуры лектинов (от первичной до четвертичной), 3) использование лектинов как реагентов в исследовательской работе и биотехнологии (лектины как маркеры гликоконъюгатов, маркеры патологических изменений клеток, реагенты концентрирования, разделения и охарактеризования гликоконъюгатов, адресные молекулы для гибридных токсинов и модифицированных липосом). Эти направления исследований реализуются хорошо отработанными методами современной биохимии и биоорганической химии. По существу, для специалистов в этих областях лектины – всего лишь иной объект для приложения отработанных приемов, применения хорошо освоенной технологии на этих новых белках.

В этом можно видеть причины малого развития исследований по собственным функциям эндогенных лектинов. Складывается парадоксальная ситуация: любая живая клетка содержит не один, а много лектинов. Однако зачем они нужны в данной клетке, в данном организме, на данной стадии онтогенеза в организме, в большинстве случаев мы не знаем. Впечатление такое, что большинство исследователей предпочитает не возиться с этими вопросами, поскольку такая работа – это нелегкая работа. Прежде всего ее трудно связать непосредственно с решением какой-либо практической задачи, важной для народного хозяйства. Потому и планирование таких исследований затруднительно; в этой ситуации требование выхода научных исследований в практику становится зловещей догмой. Любой директор института решит, что гораздо выгоднее производить какой-либо лектин для продажи, чем разбираться в его функциях.

Относительно функций эндогенных лектинов в литературе имеется много предположений. Часто авторы стремятся доказать наличие у лектинов какой-то унитарной специфической функции. Нам кажется, что это можно рассматривать как следствие особенностей выделения лектинов и тестирования их активности. Действительно, со времен Штильмарка и выделение и проверка активности лектинов основаны на их углеводсвязывающей активности независимо от природы объекта. Это невольно порождает мечту о единой функции углеводсвязывающих белков. Между тем мы знаем целый ряд белков, разнородных по природе, но связывающих один и тот же лиганд. Например Са-связывающие белки (кальмодулин, парвальбумин, миозин и др.), связывающие нуклеотиды белки (ферменты обмена, транспортные белки, группа регуляторных белков и др.). Выделение и тестирование свойств этих белков непосредственно не основано на их лигандсвязывающей активности. Поэтому и не возникает мысли об единой функции этих белков. В различных клетках и внутриклеточных структурах указанные белки выполняют различные функции. Наверное такого же мнения нам надо придерживаться и относительно функции эндогенных лектинов.

В зависимости от природы лектина — его структуры, клеточной и субклеточной локализации, можно ожидать участия лектинов в различных процессах. В сущности, уже сейчас видно, что лектины (как единая группа белков с углеводсвязывающей активностью) при обращении внимания на их структуру разделяются на ряд обособленных групп с близкой структурой и функцией внутри каждой группы. Выше мы кратко рассмотрели только основные группы лектинов.

Можно предположить, что при дальнейшем исследовании функций лектинов необходимо четко увязывать принадлежность исследуемого лектина к определенной группе по структурному принципу (прежде всего, по первичной структуре) и характеру локализации в исследуемом объекте.

Авторы благодарны В.Д. Мильграму и В.И. Осипову за дружескую помощь в работе.

Л и т е р а т у р а

1. Королев Н.П. Функции лектинов в клетках: Итоги Науки и Техники // Общие проблемы физико-химической биологии. - М.: ВИНТИ, 1984, - Т. I. - С. 349.

2. Лахтин В.М. Лектины в исследовании белков и углеводов: Итоги Науки и Техники // Биотехнология. - М.: ВИНТИ, 1987. - Т. 2. - С. 289.

3. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Луцкий А.Д. Лектины. - Львов: Вища школа, 1981. - С. 154.

4. Рискулов Р.Р., Кузев С.В., Лобанов Ю.Д., Лубнин М.Ю., Мокульская Т.Д., Мокульский М.А. Докл. АН СССР, 1987, 292, № 2. - С. 486-490.

5. Adair W.S. // J. Cell Sci. - Suppl. 2. - 1985. - P. 233-260.

6. Albersheim P., Valent B.S., Darvill A.G., McNeil M., Hahan M.G., Robertson B.K., Aman P., Franzen C.E., Desjardins A.E., Ross L.M., Spellman M. // International Cell Biology (Schweiger H.G., ed.). - Springer, Berlin, Heidelberg, NY, 1980-1981. - P. 749-760.

7. Allen H.J., Cywinski M., Palmberg R., Dicioccio R.A. // Arch. Biochem. and Biophys. - 1987. - Vol. 256. - N 2. - P. 523-533.

8. Averdunk R., Gunther T. // FEBS Lett. - 1986. - Vol. 195. - P. 357-361.

9. De Barjac H. // C.r. Hebd. Seanc. Acad. Sci. - Paris, 1978. - Vol. D286. - P. 1625-1632.

10. De Barjac H., Dumanoir C.V., Frachon E., Ripouteau U. // Lab. de Lutte Biol. II. - Paris: Inst. Pasteur, 1985.

11. Barondes S.H. // Science, 1984. - Vol. 223. - P. 1259-1264.

12. Barondes S.H. // The Lectins (Lierner I.E., Sharon N., Goldstein I.J., eds.), AP., L., 1986. - P. 438-450.

13. Benson B., Hawgood S., Schilling J., Clements J., Damm D., Cordell B., White R.T. // Proc. Natl. Ac. Sci. USA. - 1985. - Vol. 82. - P. 6379-6383.

14. Verpu T., Yamamoto H., Arima K. // Antimicrob. Agents

- Chemother. - 1975. - Vol. 8. - P. 617-626.
- 14a. Berridge M.J. // Triangle. - 1985. - Vol. 24. - N 3-4. - P. 79-90.
15. Beyer E.C., Tokuyasu K.T., Barondes S.H. // J. Biol. Chem. - 1979. - Vol. 82. - P. 565-571.
16. Beyer E.C., Zweig S.E., Barondes S.H. // J. Biol. Chem. - 1980. - Vol. 255. - P. 4236-4239.
17. Bolwell G.P. // Biochem. J. - 1984. - Vol. 222. - P. 427-435.
18. Bowles D.J., Marcus S.E., Pappin D.J.C., Findley J. B.C., Eliopoulos E., Maycox P.R., Burgers J. // J. Cell Biol. - 1986. - Vol. 102. - P. 1284-1297.
19. Brysk M.M., Rajaraman S., Penn P., Chem S.J. // Differentiation. - 1986. - Vol. 32. - N 3. - P. 230-237.
20. Catt J.W., Hills J., Roberts K. // Planta. - 1978. - Vol. 138. - P. 91-98.
21. Carding S.R., Childs R.A., Thorpe R., Spitz M., Feizi T. // Biochem. J. - 1985. - Vol. 228. - P. 147-153.
22. Carding S., Thorpe S.J., Thorpe R., Feizi T. // Bioch. et Biophys. Acta. - 1985. - Vol. 127. - P. 680-686.
- 22a. Caro J.F., Amatsuda J.M. // Science. - 1980. - Vol. 210. - P. 1029-1031.
23. Caron M., Joubert R., Bladier D. // Trends Biochem. Soc. - 1986. - Vol. 11. - P. 319-322.
24. Carrington D.M., Auffret A., Hanke D.E. // Nature. - 1985. - Vol. 313. - P. 64-67.
25. Cassab G.I., Nicto-Sotelo J., Cooper J.B., van Holst G., Varner J.I. // Plant Physiol. - 1985. - Vol. 77. - P. 532-535.
26. Cerra F.F., Gitt M.A., Barondes S.H. // J. Biol. Chem. - 1985. - Vol. 260. - P. 10474-10477.
27. Childs R.A., Feizi T. // Biochem. J. - 1979. - Vol. 183. - P. 755-758.
28. Chrispeels M.J. // Phil. Trans. R. Soc. - London, 1984. - Vol. B304. - P. 309-322.
29. Chrispeels M.J., Hartl P.M., Sturm A., Faye L. // J. Biol. Chem. - 1986. - Vol. 261. - P. 10021-10024.
30. Clerch L.B., Whitney P.L., Massaro D. // Biochem. J.

- 1987. - Vol. 245. - P. 683-690.

31. Copper J.B., Chen J.A., Varner J.E. // Structure and biosynthesis of plant cell walls (Dugger W.M., Bartnick-Garcia S., eds) Amer. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD, US, 1984. - P. 75-88.

32. Costa-Casnellie M.R., Segel G.B., Lichtman M.A. // Bioch. Biophys. Res. Commun. - 1985. - Vol. 133. - P. 1135-1144.

32a. Cuatrecasas P. // J. Biol. Chem. - 1973. - Vol. 248. - P. 3528-3534.

32. Cuatrecasas P., Tell G.P.E. // Proc. Natl. Ac. Sci., USA. - 1973. - Vol. 70. - P. 485-489.

33. Cunningham B.A., Hemperly J.J., Hopp T.P., Edelman G.M. // Proc. Natl. Ac. Sci. USA. - 1979. - Vol. 76. - P. 3218-3222.

33a. Czech M.P., Lynn W.S. // Bioch. et Biophys. Acta. - 1973. - Vol. 197. - P. 368-377.

34. Dalle M., Delost P. // J. Endocrinol. - 1976. - Vol. 70. - P. 207-214.

35. Drickamer K. // J. Biol. Chem. - 1981. - Vol. 256. - P. 5827-5839.

36. Drickamer K., Dordal M.S., Reynolds L. // J. Biol. Chem. - 1986. - Vol. 261. - P. 6878-6887.

37. Drickamer K., Mamon J.F. // J. Biol. Chem. - 1982. - Vol. 257. - P. 15156-15161.

38. Ebersold H.R., Luthy P., Geiser P., Ettinger L. // *Experientia*. - 1978. - Vol. 34. - P. 1672.

39. Ebersold H.R., Luthy P., Huber H.E. // *Experientia*. - 1980. - Vol. 36. - P. 495.

40. Ebina Y., Ellis L., Jarnagin K., Edery M., Graf L., Clauser E., Ou J.H., Masiaz F., Kan Y.W., Goldfine I. D., Roth R.A., Rutter W.J. // *Cell*. - 1985. - Vol. 40. - P. 747-758.

41. Ed. note // *New Technol. Jap.* - 1986. - Vol. 14. - N 7. - P. 26-27.

42. Endo Y.J. // *Biol. Chem.* - 1987. - Vol. 262. - P. 5908-5912.

43. Endo Y., Nishitsusuji-Uwo J. // *J. Invertebr. Path.*

- 1980. - Vol. 36. - P. 90-103.
44. Endo Y., Tsurugi K. // *J. Biol. Chem.* - 1987.- Vol. 262. - P. 8128-8130.
45. Esquerre-Tugaye M.T., Lafitte C., Mazau D., Toppen A., Touze A. // *Plant Physiol.* - 1979. - Vol. 64. - P. 320-326.
46. Etzler M.E. // *Annu. Rev. Plant Physiol.* - 1985. - Vol. 36. - P. 209-234.
47. Fast P.G., Donaghue T.P. // *J. Invertebr. Path.* - 1971. - Vol. 18. - P. 135-138.
48. Feizi T., Childs R. A. // *Biochem. J.* - 1987.-Vol. 245. - N 1. - P. 1-11.
49. Finta C., Persson B., Jornvall H., von Hegne G. // *Eur. J. Biochem.* - 1986. - Vol. 154. - P. 193-196.
50. Foriers A., Lebrun E., van Rapenbusch R., Strosberg A.D. // *J. Biol. Chem.* - 1981. - Vol. 256. - P. 5550-5560.
51. Foriers A., de Neve R., Kanarek L., Strosberg A.D. // *Proc. Natl. Ac. Sci. USA.* - 1978. - Vol. 75. - P. 1136-1139.
52. Gold R., Balding P. // *Receptor Specific proteins: plant and animal lectins.* - Amsterdam: Exerpta Medica, 1975. - P. 521.
53. Goodenough U.W., Gebhart B., Mechan R.P., Heuser J.E. // *J. Cell Biol.* - 1986. - Vol. 103. - P. 405-417.
54. Greenberg D.A., Carpenter C.L., Messing R.O. // *J. Neurochem.* - 1987. - Vol. 48. - N 3. - P. 888-894.
55. Grey R.D., Wolf D.P., Hedrick J.L. // *Dev. Biol.* - 1974. - Vol. 36. - P. 44-61.
56. Grey R.D., Working P.K., Hedrick J.L. // *Dev. Biol.* - 1976. - Vol. 54. - P. 52-60.
57. Grief C., Shan P.J. // *Planta.* - 1987. - Vol. 171. - N 3. - P. 303-312.
58. Haltiwanger R.S., Hill R.L. // *J. Biol. Chem.*-1986. - Vol. 261. - P. 7440-7444.
59. Hankins C.N., Kindinger J.I., Shannon L.M. // *Plant Physiol.* - 1979. - Vol. 64. - P. 104-107.
60. Harrison F.L., Chesterton C.J. // *Nature.* - 1980.- Vol. 286. - P. 502-504.

61. Harrison F.L., Chesterton C.J. // FEBS Lett.-1980.
- Vol. 122. - P. 157-165.
- 61a. Hedo J.A., Harrison L.C., Roth J. // Biochemistry.
-1981. - Vol. 20. - P. 3385-3393.
62. Hemperly J.J., Hopp T.P., Becker J.W., Cunningham B.
A. // J. Biol. Chem. - 1979. - Vol. 254. - P. 6803-6810.
63. Hemperly J.J., Mostov K.E., Cunningham B.A. // J.
Biol. Chem. - 1982. - Vol. 257. - P. 7903-7910.
64. Henning S.J. // Am. J. Physiol. - 1978. - Vol.235.
- P. E451-E456.
65. Herman E.M., Shannon L.M., Chrispeels M.J. // Plan-
ta. - 1985. - Vol. 165. - P. 23-29.
66. Higgins T.J.V. // Annu. Rev Plant. Physiol.- 1984.
- Vol. 35. - P. 151-221.
67. Higgins T.J.V., Chandler P.M., Zurawski G., Button
S.C., Spencer D. // J. Biol. Chem. - 1983. - Vol. 258. - P.
9544-9549.
68. Hirabayashi J., Kawasaki H., Suzuki K., Kasai K.//
Biochem. J. - 1987. - Vol. 101. - P. 775-787.
69. Hirabayashi J., Kawasaki H., Suzuki K., Kasai K.-i.
// J. Biochem. - 1987. - Vol. 101. - N 4. - P. 987-995.
70. Hirabayashi J., Kasai K. // Bioch. Biophys. Res.
Commun. - 1984. - Vol. 122. - P. 938-944.
71. Hoch D.H., Romero-Miza M., Ehrlich B.E., Finkels-
tein A., Dasgupta B.R., Simpson L.L. // Proc. Natl.Ac. Sci.
USA; - 1985. - Vol. 82. - N 6. - P. 1692-1696.
72. Hoffman L.M., Yu M., Barker R.F. // Nucleic Acid
Res. - 1982. - Vol. 10. - P. 7819-7826.
73. Homer R.B., Roberts K. // Planta. - 1979.-Vol.146.
- P. 217-222.
74. Hudgin R.L., Pricer W.E.Jr., Ashwell G., Stockert
R.J., Morell A.G. // J. Biol. Chem. - 1974. - Vol. 249. -P.
5536-5543.
75. Itoh A., Iizuka K., Natori S. // FEBS Lett. -1984.
- Vol. 175. - P. 59-62.
76. Kaminski P.A., Buffard D., Strosberg A.D. // Plant
Sci. - 1986. - Vol. 46. - N 2. - P. 111-116.
- 76a. Katsen H.M., Vicario P.P., Mumford R.A., Gree B.G.

- // Biochemistry. - 1981. - Vol. 20. - P. 5800-5809.
77. Kawasaki T., Ashwell G. // J. Biol. Chem. - 1977.- Vol. 252. - P. 6536-6543.
78. Kawasaki N., Kawasaki T., Yamashida I. // J. Biochem. - 1983. - Vol. 94. - P. 937-947.
79. Keveko M., Hirabayashi J., Oda Y., Kasai K. // Lectins (Bøg-Hansen T.C., Ochoa J.L., eds.), Walter de Gruyter. - Berlin, NY. - 1986. - Vol. 6.
80. Kimmins W.C., Brown R.G. // Phytopathology. - 1975. - Vol. 65. - P. 1350-1351.
81. Kimura S., Umetsu K., Yamashita T., Suzuki T., Arai S., Sendo P. // Immunopharmacology. - 1987. - Vol. 13.-N 3. - P. 181-188.
82. Knowles B.H., Ellar D.J. // J. Cell Sci. - 1986. - Vol. 83. - P. 89-101.
83. Kochiba N. // Plant Cell Physiol. - 1986. - Vol.27. - N 4. - P. 661-669.
- 83a. Hirabayashi J., Oda Y., Kasai K. // Lectins (Bøg-Hansen T.C., Ochoa J.L., eds.). Walter de Gruyter. - Berlin, NY. - 1986. - Vol. 6.
84. Krivan H.C., Clark G.F., Smith D.F., Wilkins T.D.// Infection and Immunity. - 1986. - Vol. 53. - N 3. - P. 573-581.
85. Lamport D.T.A. //The Biochemistry of Plants (Preiss J., ed.). - AP, NY, 1980. - Vol. 3. - P. 501-541.
86. Levi G., Tarrab-Hazdai R., Teichberg V.I. // Eur. J. Immunol. - 1983. - Vol. 13. - P. 500-507.
87. Lipsick J.S., Beyer E.C., Barondes S.H., Kaplan N. O. // Bioch. Biophys. Res. Commun. - 1980. - Vol. 97. - P. 56-61.
88. Lotan R., Lotan D., Raz A. // Cancer Res. - 1985.- Vol. 45. - P. 4349-4353.
- 88a. Luther P. // Lektin und Toxin der Mistel. - Berlin: Akademie-Verlag, 1982. - P. 132.
89. Marcus S.E., Buryess J., Maycox P.R., Bowles D.J. // Biochem. J. - 1984. - Vol. 222. - P. 265-268.
90. Maxwell S., Whitney P.L., Massaro D. // Am. Rev. Respir. Dis. - 1984. - Vol. 129. - P. A130.

91. Maynard Y., Baenzinger J.U. // *J. Biol. Chem.*-1982.
- Vol. 257. - P. 3788-3794.
92. Meromsky L., Lotan R., Raz A. // *Cancer Res.* -1986.
- Vol. 46. - P. 5270-5275.
- 92a. Messina J.L., Hamlin J., Lerner J. // *Arch. Bioch. Biophys.* - 1987. - Vol. 254. - N 1. - P. 110-115.
93. Mizuno Y., Kozutsumi Y., Kawasaki T., Yamashina I. // *J. Biol. Chem.* - 1981. - Vol. 256. - P. 4247-4252.
94. Mori K., Kawasaki T., Yamashina I. // *Arch. Bioch. Biophys.* - 1983. - Vol. 222. - P. 542-552.
95. Muramatsu T., Gachelin G., Nicolas J.F., Condamine H., Jacob H., Jacob F. // *Proc. Natl. Ac. Sci. USA.* - 1978.
- Vol. 75. - P. 2315-2322.
96. Musgrave A., Wicot P.D., Brockman R., van den Ende H. // *Planta.* - 1983. - Vol. 158. - P. 82-89.
97. Neville D.M.Jr., Hudson T.H. // *Annu. Rev. Biochem.*
- 1986. - Vol. 59. - P. 195-224.
98. Nishihara T., Hedrick J.L. // *J. Cell Biol.* - 1977.
- Vol. 75. - P. 172a.
99. Nishihara T., Wyrick R.E., Hedrick J.L. // *Chem. Biol.* - 1975. - Vol. 12. - P. 718-722.
100. Nishihara T., Wyrick R.E., Working P.K., Chen Y.H., Hedrick J.L. // *Biochemistry.* - 1986. - Vol. 25. - N 20. - P. 6013-6020.
101. Nishizuka Y. // *Science.* - 1986. - Vol. 233. - P. 305-312.
102. Nitta K., Takayanagi G., Kawachi H. // *Chem. Pharm. Bull.* - 1984. - Vol. 32. - P. 2325-2332.
- 102a. Nowak T.P., Kobilier D., Roel L.E., Barondes S.H. // *J. Biol. Chem.* - 1977. - P. 6026-6030.
103. Oda Y., Kasai K. // *Bioch. et Biophys. Acta.* -1983.
- Vol. 761. - P. 237-245.
104. Ohyama Y., Hirabayashi J., Oda Y., Ohno S., Kawasaki H., Suzuki K., Kasai K. // *Bioch. Biophys. Res. Commun.*
- 1986. - Vol. 134. - P. 51-56.
105. Olsnes S., Pihls A. // *The molecular actions of toxins and viruses* (Cohen P., van Heyningen S., eds.), *Elsivier Biomed.* - NY, 1982. - P. 52-105.

106. Olsnes S., Sandvig K. // Endocytosis (Pastan I., Willingham M.C., eds.). - Plenum, NY, 1985. - P. 195-234.
107. O'Neill M.A., Selvendran R.R. // Biochem. J.-1980. - Vol. 187. - P. 53-63.
108. Patel J., Kassis S. // Bioch. Biophys. Res. Commun. - 1987. - Vol. 144. - N 3. - P. 1265-1272.
109. Percy J., Fast P.G. // J. Invertebr. Path. - 1983. - Vol. 41. - P. 86-98.
110. Pitts M.J., Yang D.C.H. // Biochem. J. - 1981. - Vol. 195. - P. 435-439.
111. Powell J.T., Whitney P.L. // Biochem. J. - 1980. - Vol. 188. - P. 1-8.
112. Raz A., Meromsky L., Lotan R. // Cancer Res.-1986. - Vol. 46. - P. 3667-3672.
113. Regan L.J., Dodd J., Barondes S.H., Jessel T.M. // Proc. Natl. Ac. Sci. USA. - 1986. - Vol. 83. - P. 2248-2252.
114. Reid K.B.M. // Biochem. Soc. Trans. - 1983. - Vol. 11. - P. 1-12.
115. Richardson C., Behnke W.D., Freisheim J.H., Blumenthal K.M. // Bioch. et Biophys. Acta. - 1978. - Vol. 537. - P. 310-319.
116. Richardson M., Rouge P., Sousa-Cavada B., Yarwood A. // FEBS Lett. - 1984. - Vol. 175. - P. 76-81.
117. Richardson M., Yarwood A., Rouge P. // FEBS Lett. - 1987. - Vol. 216. - N 1. - P. 145-150.
118. Roberts K. // Micron. - 1981. - Vol. 12. - P. 185-186.
119. Roberts K., Grif C., Hills G.J., Shaw P.J. // J. Cell Sci. - 1985. - Suppl. 2. - Vol. 2. - P. 105-127.
120. Robertson M.M., Barondes S.H. // J. Biol. Chem. - 1982. - Vol. 257. - P. 7250-7254.
121. Roff C.F., Wang J.L. // J. Biol. Chem. - 1983. - Vol. 258. - P. 10657-10663.
- 121a. Rosenthal W., Schultz G. // Trends Pharmacol. (TIPS). - 1987. - Vol. 81. - N 9. - P. 351-354.
122. Rosenberry T.L., Richardson J.M. // Biochemistry. - 1977. - Vol. 16. - P. 3550-3558.
123. Rouge P., Borrebaeck C.A.K., Richardson M., Yar-

- wood A. // *Lectin Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. - 1987. - Vol. 6.
124. Rouge P., Garcia M.L., Boisseau C., Causse H. // *Biochem. Syst. and Ecol.* - 1987. - Vol. 15. - N 3. - P. 345-353.
125. Rouge P., Richardson M., Chatelain C., Yarwood A., Sousa-Cavada B., Pere D. // *Lectin Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* (Bög-Hansen T.C., Driessche van E., eds.), W. de Gruyter, Berlin. - 1986. - Vol. 5. - P. 185-193.
126. Rouge P., Richardson M., Yarwood A., Ranfaing P., Sousa-Cavada B., Pere D. // *Colloque Lathyrus*. - 1986, 9-13 Sept. 1985, Pau, France.
127. Sakakibara F., Kawauchi H., Takayanagi G., Ise H. // *Cancer Res.* - 1979. - Vol. 39. - P. 1347-1352.
128. Sakakibara F., Takayanagi G., Kawauchi H., Watanaba K., Hakomori S. // *Bioch. et Biophys. Acta.* - 1976. - Vol. 444. - P. 386-395.
- 128a. Samtleben R., Kiefer M. // *Lectins*, W. de Gruyter Co. - Berlin, NY. - 1985. - Vol. 4. - P. 617-626.
129. De Santis P., Palleschi A., Savino M., Scipioni A. // *Biophys. Chem.* - 1985. - Vol. 21. - N 3-4. - P. 217-225.
130. Scully S.P., Segel G.B., Lichtman M.A. // *J. Clin. Inv.* - 1984. - Vol. 74. - P. 589-599.
131. Sletten K., Kolberg J. // *Hoppe-Zeyler's Z. Physiol. Chem.* - 1983. - Vol. 364. - P. 1047-1054.
132. Sletten K., Kolberg J., Michaelsen T.E. // *FEBS Lett.* - 1983. - Vol. 156. - P. 253-260.
- 132a. Smith J.D., Liu A.Y.C. // *Science*. - 1981. - Vol. 214. - P. 799-800.
133. Sousa-Cavada B., Richardson M., Yarwood A., Pere D., Rouge P. // *Phytochemistry*. - 1986. - Vol. 25. - P. 115-118.
134. Southan C., Aithen A., Childs R.A., Abbott W. M., Feizi T. // *FEBS Lett.* - 1987. - Vol. 214. - N 2. - P. 301-304.
135. Stafstrom J.P., Staehelin L.A. // *J. Cell Biol.* - 1984. - Vol. 99. - P. 244a.
136. Stahl P.D., Schlessinger P.H. // *Trends Biochem. Soc.* - 1980. - Vol. 5. - P. 194-196.

137. Summerfield J.A., Taylor M.E. // *Bioch. et Biophys. Acta.* - 1986. - Vol. 883. - P. 197-206.
138. Tamura M., Natory S. // *FEBS Lett.* - 1984. - Vol. 175. - P. 325-328.
139. Taylor M.E., Summerfield J.A. // *FEBS Lett.* - 1984. - Vol. 173. - P. 63-66.
140. Taylor M.E., Summerfield J.A. // *Bioch. et Biophys. Acta.* - 1987. - Vol. 915(P43). - N 1. - P. 60-67.
141. Townsend R., Stahl P. // *Biochem. J.* - 1981. - Vol. 194. - P. 209-214.
142. Trelstad R.J. (ed.) // *Role of extracellular matrix in development*; NY: Alan R. Liss, 1984. - P. 643-670.
143. Uhlenbruck G. // *Zbl. Bakt. Hyg.* - 1987. - Vol. A263. - N 4. - P. 497-508.
144. Ullrich A., Bell J.R., Chen E.Y., Herrera R., Petruzzelli L.M., Dull T.J., Gray A., Coussens L., Liao Y. C. Tsubokawa M., Mason A., Seeburg P.H., Grunfield C., Rosenc M., Ramachandran J. // *Nature.* - 1985. - Vol. 313. - P. 756-761.
145. Ullrich A., Coussens L., Hayflick J.S., Dull T.J., Gray A., Tam A.W., Lee J., Yarden Y., Libermann T.A., Schlessinger J., Seeburg P.H. // *Nature.* - 1984. - Vol. 309. - P. 4180-4185.
146. Umetsu K., Kosaka S., Suzuki T. // *J. Biochem.* - 1984. - Vol. 95. - P. 239-246.
147. Vodkin L.O., Rhoads P.R., Goldberg R. // *Cell.* - 1983. - Vol. 34. - P. 1023-1030.
- 147a. Wild J., Robinson D., Winchester B. // *Biochem. J.* - 1983. - Vol. 290. - P. 167-174.
148. Wassel N.M., Richardson E.C., Alving C.R. // *Bioch. Biophys. Res. Commun.* - 1985. - Vol. 130, - N 1. - P. 76-83.
149. Wolf D.P., Nishihara T., West D.M., Wyrick R. E., Hedrick J.L. // *Biochemistry.* - 1976. - Vol. 15. - P. 3671-3678.
150. Wyrick R.E., Nishihara T., Hedrick J.L. // *Proc. Natl. Ac. Sci. USA.* - 1974. - Vol. 71. - P. 2067-2071.
151. Yamauchi D., Minamikawa T. // *Plant Cell Physiol.* - 1987. - Vol. 28. - N 3. - P. 421-430.
152. Yarwood A., Richardson M., Souza-Cavada B., Pere D., Rouge P. // *Phytochemistry.* - 1986. - Vol. 25. - P. 2109 - 2112.

153. Yarwood A., Richardson M., Souva-Cavada B., Rouge P. // FEBS Lett. - 1985. - Vol. 184. - P. 104-109.

БИБЛИОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ЛЕКТИНАМ ПО МАТЕРИАЛАМ БД "БИОЛОГИЯ" ВИНТИ

Н.К. Клаан, Т.А. Проина

Всесоюзный институт научной и технической информации

Научно-техническая информация осуществляет взаимодействие между различными областями науки, позволяет избежать дублирования научных разработок, экономит интеллектуальные и физические силы исследователей, интенсифицирует внедрение научных разработок в практику. Государственная система научно-технической информации включает в число одного из важнейших звеньев службу баз данных на магнитных лентах /1-3/.

Магнитоленточная служба ВИНТИ была организована в 1976 году. За этот период БД ВИНТИ достигла уровня мировых баз-гигантов. Входной поток документов в настоящее время составляет около 1 млн. БД ВИНТИ включают информацию из основных видов опубликованной информации - периодические и продолжающиеся издания, книги, монографии, сборники, материалы конференций и симпозиумов, описания изобретений к авторским свидетельствам и патентам, депонированные рукописи.

БД ВИНТИ представляют собой машиночитаемый вариант его РЖ, выпускаемых в традиционной печатной форме. Информация на машиночитаемых носителях и автоматизированный поиск по заданной тематике предназначены, в основном, для обслуживания коллективных потребностей, а для индивидуальных пользователей более доступными пока являются традиционные формы изданий.

Использование БД ВИНТИ позволяет осуществлять следующие виды справочно-информационного обслуживания:

- распространение БД на магнитных лентах;
- обслуживание в режиме избирательного распространения информации (ИРИ);
- обслуживание в режиме ретроспективного поиска (РП);
- выдача микро- и макрокopies документов, отраженных в БД;

- подготовка на основе БД и распространение квазипермутационных указателей к РЖ.

Распространение БД на МЛ (тиражирование полной копии БД в режиме выборочного копирования) осуществляется на условиях договора на передачу научно-технической информации на МЛ, заключаемого с абонентом на основании "Порядка распространения информации на магнитных лентах в ГСНТИ", утвержденного ГКНТ СССР.

БД предоставляются в режиме теледоступа Централизованной системой БД по научно-технической информации (ЦСБД-НТИ), входящей в состав Информационной службы ВИНИГИ.

Автоматизированный поиск в БД, осуществляемый в большом массиве документов, наряду с нахождением документов с интересующими абонента данными, позволяет выявить круг авторов, организаций и фирм, занимающихся той или иной проблемой; оценить ход развития исследований в какой-либо области (оценить динамику числа публикаций); выявить новые направления исследований.

В связи со все увеличивающимся количеством публикаций по лектинам была предпринята попытка систематизировать этот поток информации. Поиск по ключевым словам в БД "Биология" (включающей 4 раздела и охватывающей, практически, всю область медико-биологических исследований) за 1987 год выявил 626 публикаций, из них 595 - в зарубежных и 31 - в советских изданиях.

Статьи, содержащие сведения о лектинах, опубликованы за рассмотренный период в 370 источниках - периодических изданиях, монографиях, материалах конференций. Максимальное количество - 18 статей - в Cancer Research, несколько меньше - 15 и 13 - в J. Immunology Histochemistry соответственно. В среднем в журналах встречается по 1-2 публикации по лектинам в год. В БД "Биология" информация об этих публикациях в 1987 г. проходила в следующих разделах:

- Общие проблемы биологии (123 документа);
- Морфология человека и животных. Антропология (109 документов);
- Цитология (59 документов);
- Иммунология. Аллергология (79 документов).

Условно по тематике публикации можно разделить на 3 раздела:

1) публикации, посвященные исследованию самих лектинов - их обнаружению в биологических объектах, локализации в нормальных и опухолевых клетках и тканях, биосинтезу, структуре, внутриклеточному транспорту. Таких работ оказалось 89 (14% от общего количества).

2) Публикации, посвященные исследованию функций лектинов в клетке - исследованию митогенов, медиаторов межклеточных взаимодействий, биорегуляторов. Таких работ выявлено 116 (18%).

3) Публикации, посвященные использованию лектинов в качестве инструмента исследования и применению их в медицине для диагностики различных заболеваний (онкологических, аутоиммунных, неврологических, экспресс-диагностики респираторных вирусных инфекций, микозов, заболеваний, вызванных простейшими), для лечения некоторых онкологических заболеваний (при помощи онкоспецифических токсических лектинов) или использованию лектинов как переносчиков противоопухолевых средств. Таких работ было 405 (68%).

Интересно отметить, что увеличилось число работ по обнаружению лектинов и лектиноподобных веществ в тканях животных. Таких работ в БД "Биология" за 1987 г. выявлено 17. Лектины обнаружены в различных опухолевых тканях (5 работ), а также в нормальных тканях, таких как мозг крысы, сперматозоиды свиньи, в тканях куриного эмбриона).

Можно заключить, что всестороннее изучение лектинов является перспективным направлением исследований. Следует ожидать увеличения потока работ по поиску и практическому применению новых лектинов.

Л и т е р а т у р а

1. Бондарь В.В. и др. // Подготовка и поиск информации по химии в автоматизированной информационной системе ВИНТИ // НТИ, серия I. - 1984. - № 2.

2. Каталог баз данных на магнитных лентах, распространяемых органами НТИ в ГСНТИ (изд. 2-е). - М.: ВИНТИ, 1983.

3. Михайлов А.И., Черный А.И., Гиляревский Р.С. Научные коммуникации и информатика. - М.: Наука, 1976 г.

ХИМИЯ И БИОХИМИЯ ЛЕКТИНОВ

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПОИСКА ЛЕКТИНОВ В РАСТЕНИЯХ

В.А. Антоноук

Львовский ордена Дружбы народов
государственный медицинский институт

Для решения ряда проблем современной биологии и медицины необходимы лектины с самыми разнообразными свойствами. Поэтому поиск лектинов и сегодня актуален. Большинство используемых лектинов получают из растений, что объясняется доступностью и относительной дешевизной растительных источников. Растения, по сравнению с другими живыми организмами, изучены лучше, хотя различные таксономические группы исследованы в разной степени – у многих растений обследованы лишь семена. Иммунохимическая специфичность обнаруженных и очищенных лектинов изучена далеко не в полной мере.

Стратегия и тактика поиска целиком вытекают из задач, которые исследователь ставит перед собой. Однако объекты исследования прежде всего должны быть перспективны в практическом применении. На наш взгляд, основными направлениями поиска сегодня могут быть следующие:

- поиск лектинов, избирательно агглютинирующих или реагирующих с клетками живых организмов;
- поиск лектинов со строгой специфичностью к определенным углеводным детерминантам;
- поиск лектинов, влияющих на метаболизм клетки.

Первое из направлений включает задачи поиска лектинов, специфичных к групповым антигенам крови человека и животных: избирательно агглютинирующие клетки крови, микроорганизмы, вирусы, простейшие, микроскопические грибы.

Группоспецифические лектины могут найти применение в качестве реагентов в изосерологии, судебной медицине, антропологии. На сегодняшний день в результате целенаправленного

поиска обнаружено довольно много лектинов со специфичностью к антигенам Н, А и N, несколько меньше — к В и М. На первый план выдвигается задача создания дешевого набора лектинов для определения антигенов системы АВО и MN_Sa, который мог бы широко использоваться в практике. Преимущества лектинов перед иммунными сыворотками в более высокой устойчивости лиофильно высушенных препаратов, четкости результатов агглютинации.

Продолжает оставаться актуальным поиск лектинов, селективно агглютинирующих лимфоциты и их отдельные субпопуляции, отдельные клетки крови. Такие лектины находят применение в клинической диагностике ряда заболеваний человека. К ним относятся, в частности, лектины сои и арахиса, реагирующие преимущественно с незрелыми клетками крови /17/, лектин горошка мохнатого (*Vicia villosa* L), избирательно реагирующий с цитотоксическими лимфоцитами /16/.

В диагностической микробиологии наиболее ценными в практическом плане являются работы, в которых исследуется возможность использования лектинов для дифференцирования патогенных и непатогенных бактерий, грибов и простейших, трудно отличимых морфологически. К сожалению, таких исследований пока немного, но они показывают перспективность исследований подобного типа /см. обзоры 9, 14/.

Второе направление включает поиск лектинов, специфичных к моносахаридам, и лектинов, селективно взаимодействующих со сложными углеводными структурами. В последнее время произошло смещение интересов поиска. Если раньше искали, в основном, лектины, специфические к моносахаридам, то теперь в центре внимания лектины со сложной олигосахаридной специфичностью. Именно с этими лектинами сопряжены надежды на очистку гликопротеидов сыворотки крови, нормальных или аномальных по углеводной части. После иммобилизации такие лектины могут найти применение в клинике для лечения заболеваний человека методом гемо- и лимфосорбции /5/.

Третье направление включает поиск лектинов с митогенными и антимитогенными свойствами; цитотоксическими (в том числе противоопухолевыми) лектинов; лектинов, стимулирующих продукцию интерферона /7/; обладающих гормономиметическими свойствами /8/.

Помимо вышеперечисленных имеется целый ряд перспективных направлений, которые также нуждаются в поиске, дальнейшей разработке и уточнении.

Выявление лектинов в растительных экстрактах удобнее всего проводить с помощью реакции агглютинации взвеси частиц или клеток, на поверхности которых находятся углеводы. В качестве таких частиц используются чаще всего эритроциты (нормальные или обработанные протеолитическими ферментами), а также лейкоциты, лимфоциты, клетки опухолей, микроорганизмов и простейших /10/, протопласты растений /13/, углеводсодержащие липосомы /4/.

Помимо реакции агглютинации для выявления лектинов используют реакцию преципитации между лектинами и рядом полисахаридов (например, декстран, гликоген, амилопектин, гуаран рожкового дерева) /15/, а также некоторыми синтетическими гликозидами. Например, Jerdup and Jeov I. /12/ для выявления лектинов применяли тригликозильные производные такие, как (p- β -гликозилоксифенилазо)-2,4,6-тригидроксibenзол (Ярив антиген), а Hořejší V. et al. /11/ предложили использовать O-гликозильные производные полиакриламида. По сравнению с реакцией агглютинации реакция преципитации является более избирательной, но и более трудоемкой, в связи с чем в поисковых работах по выявлению лектинов используется редко.

Важнейшим функциональным свойством лектинов является их углеводная специфичность, зная которую можно в значительной степени прогнозировать область практического применения лектина. Поэтому поиск новых сырьевых источников рекомендуем сочетать с изучением их специфичности к углеводам. Углеводную специфичность во многих случаях можно определять в неочищенных экстрактах из органов растений. Это значительно экономит время исследователя и позволяет уже на раннем этапе прогнозировать практическую ценность препарата. Имеющийся фактический материал показывает, что необходимо обследовать все части растения, обращая внимание и на фазу его вегетации. В ряде случаев различные органы растения содержат лектины, отличающиеся по углеводной специфичности. Такое явление мы обнаружили у бобовника анагиролистного, робинии ложноакациевой, саротамнуса веничного, ракитника русского, скар-

жи аптечной, птелеи трехлистной, вики тонколистной и ряда других /2/. Для изучения специфичности к углеводам можно использовать реакцию угнетения агглютинации простыми углеводами и гликопротеидами, а также реакцию угнетения преципитации. В качестве гаптенов рекомендуем использовать моносахариды, прежде всего те, которые лежат в основе классификации лектинов: D-глюкозу, D-маннозу, D-галактозу, N-ацетил-D-галактозамин, N-ацетил-D-глюкозамин, L-фукозу, L-галактозу, сиаловые кислоты, а также их α - и β аномеры. Используя помимо них сложные олигосахариды с известной структурой, можно более точно охарактеризовать углеводную специфичность лектинов.

Определение углеводной специфичности дает очень ценную информацию для выбора аффинного сорбента для очистки лектинов. Так, D-глюкозо(D-маннозо-)специфические лектины сорбируются на сефадексах, которые для них могут быть аффинными сорбентами; многие D-галактозоспецифические лектины могут быть очищены на сефарозе или частично гидролизованной сефарозе; для очистки N-ацетил-D-глюкозаминспецифических лектинов в качестве аффинного сорбента может быть использован хитин. Кроме того, во многих случаях аффинный сорбент можно синтезировать, используя в качестве лиганда соответствующие гаптены.

У всех изучаемых растений активность лектинов зависела от фазы вегетации, в связи с чем необходимо учитывать время сбора сырья. Нами обнаружено /1, 3/, что активность лектинов в коре древесных растений максимальна во время весеннего сокодвижения, развития листьев, роста соцветий, а также осенью во время созревания семян. В коре бузины черной и красной, ракитника русского, робинии ложноакациевой высокая активность лектинов в коре наблюдается зимой, во время фазы относительного спокойствия. По мере роста листьев активность лектинов в них снижается, а с началом полноценного функционирования снова возрастает, оставаясь постоянной на протяжении летнего периода, затем снижаясь осенью.

Нами при исследовании 401 образца органов, относящихся к 282 видам высших растений, лектины были обнаружены в различных органах 110 видов, относящихся более чем к 20 различным

семействам. В качестве тест-системы были использованы эритроциты человека трех групп, нативных и обработанных трипсином и папаином. Помимо бобовых, пасленовых, крестоцветных, амарантовых, в органах которых лектины обнаруживали и раньше, нами они были найдены в розоцветных, камнеломковых, кирказоновых, эфедровых, рутовых и ряде других семейств. Исследования показали, что вероятность нахождения лектинов наиболее высока в семенах и коре стеблей древесных растений. Эти органы могут быть сырьевыми источниками лектинов.

В соответствии с определенной углеводной специфичностью, экстракты растений, содержащие лектины, мы разделили на 5 групп: 1) L-фукозоспецифические; 2) D-маннозоспецифические; 3) D-галактозоспецифические; 4) "смешанной" специфичности; 5) не обладающие специфичностью к моно- и дисахаридам. Лектинов, специфических к сиаловым кислотам, в исследованных образцах растительного сырья обнаружено не было.

В количественном отношении преобладает подгруппа лектинов, не обладающих специфичностью к моно- и дисахаридам (37,5% всех обнаруженных лектинов), и подгруппа D-галактозоспецифических лектинов (32,8%). Далее идут экстракты, содержащие лектины со "смешанной" специфичностью (14,2%), D-маннозоспецифические лектины (11%) и L-фукозоспецифические лектины (4,5% всех проанализированных экстрактов). В экстрактах, содержащих лектины со "смешанной" специфичностью, вероятнее всего содержится несколько разных лектинов. Такое, как известно из литературы, встречается в растениях. Например, два различных лектина содержится в семенах горошка мышиного (*Vicia cracca* L.), дрока английского (*Ulex europaeus* L.) /6/. Эти экстракты требуют более тщательного изучения. Относительно низкий удельный вес D-маннозоспецифических лектинов объясняется использованием в качестве тест-системы эритроцитов человека, которые с ним реагируют слабо или вовсе не реагируют (например, человеческие эритроциты не агглютинируют лектин подснежника белоснежного, конканавалин А). По нашим наблюдениям, для обнаружения D-маннозоспецифических лектинов лучше использовать эритроциты кролика или лягушки.

Поиск новых сырьевых источников завершается выбором наи-

более перспективных для дальнейшего изучения и практического использования. Немаловажное значение в оценке перспективности сырьевого источника имеет доступность и сырьевая база, выход целевого продукта, стабильность полученных результатов. Для практического использования в большинстве случаев можно рекомендовать сырье с содержанием лектина не менее 50 мг/кг сырья, однако оценку выхода лектина из сырья на основании титра гемагглютинации в большинстве случаев сделать невозможно. К примеру, лектин из клубней картофеля обладает очень высокой гемагглютинирующей активностью, но его содержание в сырье значительно ниже, чем лектина сои или конских бобов, у которых удельная гемагглютинирующая активность невысокая.

В настоящее время на наличие лектинов обследовано огромное количество растений и может показаться: что возможности для поиска исчерпаны. В действительности это далеко не так. Об этом говорит и быстро возрастающее количество очищенных лектинов. Можно предположить, что рецептор-специфические белки (или гликопротеиды) неиммунной природы, называемые лектинами, присутствуют во всех без исключения растениях. Ненахождение лектинов в ряде сырьевых источников скорее всего связано с использованием неадекватной тест-системы. Поиск новых подходов и методик выявления лектинов является актуальной задачей, по мере решения которой будут найдены новые сырьевые источники, возможно с необычными, уникальными свойствами. Большой фактический материал также требует систематизации имеющихся данных и целенаправленного, системного подхода к поиску.

Л и т е р а т у р а

1. Антонюк В.А., Луцик М.Д., Ладная Л.Я. Сезонные изменения титра гемагглютинации и средства к углеводам экстрактов растений, содержащих фукозоспецифичные лектины // Физиология растений. - 1982. - Т. 29. - Вып. 6. - С. 1219-1224.
2. Антонюк В.А., Луцик М.Д., Ладная Л.Я. Фитолектины во флоре УССР и специфичность связывания ими углеводов // Растительные ресурсы. - 1983. - Т. 19. - № 2. - С. 151-159.

3. Антонович В.О., Луцик М.Д. Вплив фази вегетації рослин на активність лектинів, специфічних до вуглеводів групи D-галактози // Укр. бот. журн. - 1986. - Т. 43. - № 4. - С. 21-25.

4. Дворкин В.М., Видерштайн Г.Я. Изучение некоторых факторов, влияющих на взаимодействие углеводсодержащих липосом (RCAI) // Биохимия. - 1984. - Т. 49. - № II. - С. 1862-1867.

5. Лопухин Д.М., Молоденков Н.М. Гемосорбция. - М.: Медицина, 1985, 288 С.

6. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. - Львов: Выш. школа. - 1981. - 156 С.

7. Borecky L. Twenty years after discovery of interferon: the progress and the persistent problems // Acta biol. med. germ. - 1979. - Bd. 38. - N 5/6. - S. 709-731.

8. Czech M., Lynn W. Stimulation of glucose metabolism by lectins in isolated white fat cells // Biochem. biophys. acta. - 1973. - V. 297. - N 2. - P. 368-377.

9. Doyle R., Keller K. Lectins in diagnostic microbiology // Eur. j. microbiol. - 1984. - V. 3. - № 1. - P. 4-9.

10. Hill D.R., Hewlett E.L., Pearson R.D. Lectin binding by *Giardia lamblia* // Infect. and immun. - 1981. - V. 34. - N 3. - P. 733-738.

11. Hořejší V., Smolek P., Kocourek J. Studies on lectins XXXV. Water-soluble O-glycosyl polyacrylamide derivatives for specific precipitation of lectins // Biochem. biophys. acta. - 1978. - V. 538. - N 2. - P. 299-315.

12. Jermyn M.A., Jeov J.M. A class of lectins present in the tissues of seed plants. With an appendix by E.F.Woods // Aust. j. plant physiol. - 1975. - V. 2. - P. 501-531.

13. Larkin P.I. Plant protoplast agglutination by lectins // Plant physiol. - 1978. - V. 61. - N 4. - P. 626-629.

14. Pistole T.C. Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substances // Ann. rew. microbiol. - 1981. - V. 35. - P. 85-112.

15. Rathaur B.S., Khatzi G.S., Gupta K.C. et al. Blue guaran /A chromophore-labeled galactomannan/ as a reagent for lectins // Anal. biochem. - 1981. - V. 112. - P. 55-59.

16. Tollefsen S.E., Kornfeld R. Isolation and character-

rization of lectins from *Vicia villosa* // J. biol. chem., 1983. - V. 258. - N 8. - P. 5165-5171.

17. Sharon N., Reisner J. Lectin receptors as markers for lymphocyte subpopulation in mouse and man // Mol. mech. biol. recognition. - Amsterdam-N.Y. - 1979. - P. 95-106.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКТИНОВ

В.М. Лахтин

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

Различают новые и традиционные направления или аспекты получения и использования лектинов /3/.

Традиционные аспекты включают упрощение технологий получения лектинов, а также разработку безотходных технологий с получением набора продуктов; использование лектинов в качестве биоэффекторов (митогенов, трансформантов, иммуносупрессоров, фузогенов, флокулянтов и дефлокулянтов и т.д.) для получения клеточных продуцентов полезных веществ (интерферонов, лимфотоксинов, гликозидаз или трансфераз из устойчивых к лектинам линий клеток и т.д.); использование иммобилизованных лектинов в препаративных работах по очистке и разделению гликоконъюгатов (рецепторов, гормонов, факторов, ферментов, гликопептидов, гликолипидов и протеогликанов), полисахаридов, олигосахаридов и их производных, а также для получения биокатализаторов на основе ферментов или клеток.

Новые аспекты отражают развитие генно-инженерных и белково-инженерных исследований, а также исследований в области биосенсоров.

Генно-инженерные аспекты включают клонирование генов лектинов в кишечной палочке (лектины гороха, канавалии, клещевины, сои, фасоли и других растений; токсины: холерный, дифтерийный, шиго- и веротоксины, термолabileный из *E. coli* и другие; пилины *Bacteroides nodosus*, *E. coli* (type 1C, ty-

ре 1 Fim A, Par A, F7₂, K88, K99, F8 и другие), филаментный гемагглютинин *Bordetella pertussis*, нефимбриальный адгезин X-типа, рецепторы хемотаксиса из *E. coli* и другие; рецепторы асиалогликопротеинов и другие лектины млекопитающих), клетках табака (лектины сои и фасоли), клетках млекопитающих (лектины фасоли и другие).

Белковая инженерия включает гибридизацию токсических (рецепторных) субъединиц или пептидов лектинов с антителами (другими белками - эффекторами) для получения бифункциональных молекул (иммунотоксинов и других); использование лектинов в качестве носителей лекарств и других веществ (в сочетании с липосомами); модификацию углеводной и антигенной специфичности рецепторных лектинов, пилинов и других; разделение и использование доменов с различными функциями из состава молекул лектинов; синтез пептидов, соответствующих аминокислотной последовательности лектинов и обладающих антигенными свойствами, для получения искусственных бактериальных вакцин (в случае коклюша, холеры, прочих кишечных инфекций).

В основе развития биосенсоров лектинового типа лежит разработка высокочувствительных методов количественного микроанализа гликоконъюгатов и углеводов с участием лектинов: варианты *enzymelinked lectin assay*, *radio lectin immunological assay*, проточная цитофлуорометрия и другие. В настоящее время известны несколько вариантов биосенсоров глюкозы на основе конканавалина А (с использованием диссоциирующих пар флуоресцеинизотиоцианат-Кон А-декстран, Кон А-инсулин и других).

В результате скрининга большого числа сырьевых источников из более чем 400 видов организмов получено около 600 препаратов лектинов и агглютининов /3/. В таблице I представлены данные по наиболее изученным группам организмов.

Знание олигосахаридной, гликолипидной, гликопротеидной и антигенной специфичности лектинов расширяет возможности их использования в структурном анализе гликоконъюгатов, препаративной хроматографии, а также в виде биоэффекторов. Таким образом, разнообразие свойств лектинов оправдывает их поиск и извлечение из широкого ряда источников.

Таблица I
Выявленные лектины в сырьевых источниках

Организмы		Минимальное число лектинов*
группы	виды	
Бактерии	60	120
Грибы	43	50
Высшие растения	180	225
Морские беспозвоночные	50	70
Позвоночные	32	140

* лектины, различающиеся по специфичности, штаммовому источнику или локализации в организме (органе, ткани, клетках; внутри- и внеклеточные, связанные с мембранами или растворимые).

В настоящее время лектины широко используются в исследовании и очистке гликоконъюгатов, в том числе ферментов /3, 1/.

В таблице 2 представлены данные тестирования 225 ферментов, относящихся к пяти из шести классов Международной классификации, на средство к коммерческим лектинам, главным образом, иммобилизованных на агарозных матриксах. В целом же известны данные о применении для исследования ферментов 40 лектинов из разных видов организмов.

Иммобилизованные лектины все чаще включаются в схему очистки гликопротеидных ферментов (на начальных или конечных этапах) в сочетании с гидрофобной хроматографией, цветными агарозами, иммобилизованными сахарадами и хелатной хроматографией. Иногда снижение выхода фермента в процессе аффинной хроматографии на лектиновом сорбенте обусловлено разделением фермента на формы по средству к данному лектину. В таком случае комбинированная хроматография не нескольких различных лектиновых сорбентах (в том или ином порядке) позволяет очистить спектр изоферментов. Замена лектинового сорбента (по типу лектина) особенно часто целесообразна в случае различных патологических процессов, например, у млекопитающих,

Таблица 2

Взаимодействие ферментов с лектинами /I/, дополненные данные

Ферменты		Все лектины	Группы лектинов по углеводной специфичности*						
			α Man, α Glc	NeuNAc, GlcNAc	β Gal	α Fuc	GalNAc		
класс	группы		Кон А	ЛЧ, ЛГ	АЗП, кар- цино- ско- пин	ЛК-1, Лн абруса, Лн жука, ЛА	ЛЛ, ЛУЕ-1 Лн псевдо- монад	ЛС, ЛУ	ЛК-2, Э-ФГА
1	Оксидоредуктазы	26	26	4	2	5	1	0	0
2	Трансферазы	39	35	2	4	4	2	0	2
3	Гидролазы	153	148	22	33	11	7	9	3
	Эстеразы	40	40	7	8	3	2	0	1
	Гликозидазы	44	43	8	9	5	4	7	0
	Пептидил-гидролазы	52	48	5	10	3	1	1	2
	Прочие гидролазы	17	17	2	3	0	0	0	0
4	Лиазы	6	6	0	3	0	0	1	0
5	Лигазы	1	1	0	0	0	0	0	0

* обозначения лектинов и углеводов согласно /1, 2, 3/: конканавалин А (Кон А), агглютинин зародышей пшеницы (АЗП), лектины (Лн) чечевицы (ЛЧ), гороха (ЛГ), клеверины (ЛК), арахиса (ЛА), лотуса (ЛЛ), улекса европейского (ЛУЕ), сои (ЛС), улитки (ЛУ), эритроагглютинирующая форма фитогемагглютина (Э-ФГА) фасоли.

когда преобладают изоферменты с гипер- или гипогликозилированной углеводной частью (возрастание уровня изоферментов γ -глутамилтранспептидазы, щелочной фосфатазы или фукозилтрансферазы злокачественных опухолей человека к эритроагглютинирующей форме лектина фасоли, агглютинину зародышей пшеницы или лектину клещебины, соответственно).

В ряде случаев ферменты обладают очень высоким сродством к лектиновому сорбенту, в связи с чем десорбируются с трудом или совсем не элюируются в различных условиях. Это обстоятельство можно использовать для получения биокатализаторов, когда фермент своей углеводной частью (обычно достаточно удаленной от каталитического центра) направленно иммобилизуется на лектиновый сорбент. Ориентация фермента обычно закрепляется обработкой глутаровым альдегидом или другим конъюгирующим белковую пару агентом. В таблице 3 представлены примеры полученных таким образом биокатализаторов. Ряд из них прошел испытания в биореакторах и дал положительные результаты (в случае глюкозооксидазы, β -глюкозидазы, β -фруктофуранозидазы и других). Аналогичным образом, по-видимому, можно получать и клетки, иммобилизованные на лектиновом сорбенте, для использования в виде биокатализаторов /9/.

Помимо очистки ферментов и других гликоконъюгатов, иммобилизованные лектины часто применяются для выделения комплексов с гликоконъюгатами (а также хроматографии агентов на антиагент-лектин-сорбенте), вирионов, плазматических мембран, лизосом, субпопуляций клеток, а также тРНК /2/. Кроме того, иммобилизованные на лектинах опухолевые антигены используются для получения антител с рестриктивным распределением классов и подклассов иммуноглобулинов; комплекс эритропоэтина с лектин-сефарозой можно применять для стимуляции эритроидных колоний клеток, комплекс конканавалина А с эритроцитами - для стимуляции лейкоцитов, а конъюгированный с полиуретаном лектин фасоли - для имплантации животным с целью ускорения заживления ран.

Использование лектинов как носителей антибиотиков, ферментов и других молекул в виде искусственных бифункциональных конъюгированных комплексов наиболее широко тестировалось в случае конканавалина А /2/.

Таблица 3

Биокатализаторы на основе конканавалин А-сорбентов

Ферменты	Источники	Ссылки
Глюкозооксидаза	гриб <i>Aspergillus niger</i>	/8/
Пероксидаза	корни хрена <i>Armoracia lapathifolia</i>	/10/
Нуклеозид-дезоксирибозилтрансфераза	яд змеи <i>Bungarus fasciatus</i>	/4/
Холинэстераза	ткань млекопитающего	/5/
Кислая фосфатаза	семена арахиса	/11/
Фосфодиэстераза I	яд змеи <i>Crotalus adamanteus</i>	/12/
РНКаза В	поджелудочная железа быка	/11/
α -амилаза	гриб <i>Aspergillus niger</i>	/5/
Глюкоамилаза	гриб <i>Rhizopus sp.</i>	/8/
Эндо- β I,4-глюконаза	грибы <i>Trichoderma reesei</i> , <i>T. viride</i>	/15,7/
β -глюкозидаза	гриб <i>Aspergillus niger</i>	/14/
β -фруктофуранозидидаза	дрожжи <i>Kluveromyces fragilis</i> пекарские дрожжи	/6/ /8/
Целлобиогидролаза I	гриб <i>T. reesei</i>	/7/
NAD-гликогидролаза	яд змеи <i>B. fasciatus</i>	/4/
Карбоксипептидаза	пекарские дрожжи	/10,13/
Аденилат-циклаза	семенники крыс	/16/

В заключение следует отметить, что наиболее широко лектины используются как биоэффекторы. В связи с этим важна дальнейшая стандартизация коммерческих препаратов лектинов, а также изучение биологических свойств изолектинов.

Л и т е р а т у р а

1. Лахтин В.М. // Биотехнология. - 1985. - Т. I, № 5. - С. 11-27.
2. Лахтин В.М. // Биотехнология. - 1986. - Т. 2, № 6. - С. 66-79.
3. Лахтин В.М. Лектины в исследовании белков и углеводов

дов // Итоги науки и техники. Серия биотехнология. - Т.2. - М.: ВИНТИ, 1987. - 290 с.

4. Anderson B.M., Anderson C.D. // Anal. Biochem.-1984.- V. 140. - N 1. - P. 250-255.

5. Danielsson B., Mattiasson B., Mosbach K. // Proc. Ist Eur. Congr. Biotechnol., Interlaken, 1978. Preprint. Part 2.- Frankfurt, 1978. - P. 107-109.

6. Day D.F., Workman W.E. // Annals New York Acad. Sci., 1986. - V. 434. - P. 504-507.

7. Fadda M.B., Dessi M.R., Maurici R. et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1984. - V. 19. - N 5. - P.306-311.

8. Hussain Q., Iqbal J., Saleemuddin M. // Biotechnol. Bioengin. - 1985. - V. 27. - N 8. - P. 1102-1107.

9. Husain Q., Saleemuddin M. // Enzyme Microbiol. Technol. - 1986. - V. 8. - N 11. - P. 686-690.

10. Hsiao H.-Y., Royer G.P. // Arch. Biochem. Biophys. - 1979. - V. 198. - N 2. - P. 379-385.

11. Kamra A., Gupta M.N. // Anal. Biochem. - 1987. - V. 164. - N 2. - P. 405-410.

12. Sulkowski E., Laskowski M. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1974. - V. 57. - N 2. - P. 463-468.

13. Turkova J., Fusek M., Maksimov J.J., Alakhov Y.B. // Chromatogr. - 1986. - V. 376. - N 1. - P. 315-321.

14. Woodward J., Marquess H.J., Picker C.S. //Prep. Biochem. - 1986. - V. 16. - N 4. - P. 337-352.

15. Woodward J., Zachry G.S. // Enzyme Microbiol. Technol. - 1982. - V. 4. - N 4. - P. 245-248.

16. Zlatanov I.V., Dimitrov M.I. // Rep. Acad.Sci. Bulg.-1984. - V. 37. - N 10. - P. 1387-1390.

ЛЕКТИНЫ DATURE INNOXIA

Т.С. Юнусов, С.В. Левитская

Институт химии растительных веществ АН УзССР, Ташкент

В СССР работы по выявлению новых растительных лектинов впервые начаты М.И. Потаповым /3/ и продолжены М.Д. Луциком /2/. Мы заняты поиском лектинсодержащих растений флоры Сред-

ней Азии. Большое разнообразие флоры открывает широкие возможности для поиска лектинов в различных вегетативных органах растений и сравнения их содержания и свойств в зависимости от периода вегетации и места произрастания. Наследственная способность синтезировать в семенах лектины с определенной специфичностью присуща ряду растений одного и того же рода /4/, поэтому для поиска брали семена и другие органы растений семейств, в некоторых видах которых ранее уже были обнаружены лектины.

На содержание гемагглютининов проверяли 150 видов растений семейства Cruciferae, Leguminosae, Labiatae и один род - Datura семейства Solanaceae. Исследовали экстракты или частично очищенные фракции с помощью реакции агглютинации эритроцитов различных групп крови человека. Результаты приведены в таблице I.

Таблица I

Источник лектина				Тип эритроцитов
семейство	род	вид	орган растения	
1	2	3	4	5
Cruciferae	Goldbachia	verrucosa	Семена	0, A, B
"	Stubendorffia	lipskyi	"	0, A, B
"	"	orientalis	"	0, A, B
"	Grambe	kotschvana	"	0, A, B
Leguminosae	Lotus	frondosus	"	0
"	Lathyrus	latifolius	"	0, A, B
"	"	mulkak	"	0, A, B
Leguminosae	vicia	tenuifolia	Семена	0, A
"	"	narbonensis	"	0, A, B
"	Caragana	turkestanica	"	0, A
"	Meristotropis	triphylla	"	T - A
"	Oxytropis	trichocalycina	"	T-A, T-0, T-B
"	Thermopsis	lanceolata	"	T - 0
"	Halimodendron	halodendron	"	T - 0
"	Sophora	Alopecuroides	"	0, A, B
"	"	"	Листья	0, A, B

Продолжение табл. I

I	2	3	4	5
Labiatae	<i>Eremanthus</i>	<i>moluccelloides</i>	Семена	0, A, B
"	"	<i>kaufmanniana</i>	"	0, A, B
"	<i>Salvia</i>	<i>macrosiphon</i>	"	т-0, т-А, т-В
"	<i>Origanum</i>	<i>tythanthum</i>	"	т-0, т-А, т-В
"	<i>Dracocephalum</i>	<i>nodulosum</i>	"	т-0, т-А, т-В
"	<i>Scutellaria</i>	<i>adenostegia</i>	"	т-0, т-А, т-В
Solanaceae	<i>Datura</i>	<i>arborea</i>	"	0, A, B
"	"	<i>innoxia</i>	"	0, A, B
"	"	<i>metel</i>	"	0, A, B
"	"	<i>stramonium</i>	Корни	0

Гемагглютинины нами найдены в 23 новых видах. В 12 случаях получили экстракты с высоким титром агглютинации. Иммунохимическая активность восьми видов выявлялась на трипсинизированных эритроцитах.

Углеводсвязывающую специфичность лектинов изучали по ингибированию реакции гемагглютинации с помощью следующих сахаров: L-фукозы, D-галактозы, N-ацетил- D -галактозамина, D -галактуроновой кислоты, лактозы, D-глюкозы, D-маннозы, метил- - D -глюко- и маннопиранозидов, N-ацетил- D -глюкозамина, мальтозы, и-инозина, ксилозы, рамнозы, фруктозы, арабинозы. Для четырех видов растений семейства Leguminosae углеводная специфичность найдена. Экстракты семян *Lathyrus latifolius*, *Lathyrus mulkak* и *Vicia tenuifolia* ингибировались D-глюкозой, D-маннозой и их метил- - D-пиранозидами. В меньшей степени они ингибировались фруктозой. Экстракт семян *Caragana turkestanica* специфичен к N-ацетил- D -галактозамину. Лектин с подобной специфичностью из коры *Caragana arborescens* описан в /1/.

Мы выявили высокоспецифические анти-0-лектины в семенах *Lotus frondosus* и корнях *Datura stramonium*. В нашем случае в отличие от описанного в работе /2/ экстракт семян *Datura stramonium* не проявлял иммунохимической специфичности по системе A, B, O. Экстракты семян *Lotus frondosus*, *Datura stramonium* показали анти-0-активность на трипсинизированных эритроцитах. Трипсинизированные эритроциты группы A агглютинировались экстрактом семян *Meristotropis triphylla* семейства Leguminosae.

Помимо приведенных в таблице, экстракты семян *Lathyrus silvestris* и *Sophora japonica*, произрастающих на территории Средней Азии, обладали гемагглютинирующей активностью. По свойствам - иммунохимической специфичности, титру гемагглютинации и сродству к углеводам - полученные экстракты не отличались от экстрактов растений, известных в других районах произрастания [1, 8]. В других среднеазиатских видах растений рода *Sophora* лектины не обнаружены.

В семенах *Datura innoxia* агглютинирующая активность по отношению к эритроцитам человека групп А, В, 0 была определена W.C. Boyd, M. Reguera [6]. Экстракт семян этого растения не проявлял специфичности к традиционно используемым моно- и дисахаридам даже при концентрациях 0,6М. Выделение и очистку лектина мы проводили общепринятыми методами.

Лектин из муки семян экстрагировали 15 мМ фосфатным буфером с 0,9% NaCl pH 7,4 (ФБС). Результаты выделения двух форм лектина из 80 г семян приведены ниже (таблица 2).

Простой трехстадийный способ выделения позволил получить две формы лектина дурмана индийского I₁ и I₂, очищенного в 28 и 32,5 раза соответственно, составляющего 7% (I₁) и 3% (I₂) экстрагируемого белка. Общее содержание лектина в семенах - 0,5%.

Таблица 2

Показатели	Общий белок, мг	Выход, %	Гемагглютин. активность		Степень очистки
			общая титр	удельн. титр/мг	
Сырой экстракт	4000	100	256	0,064	I
Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄ , 45%					
Осадок	1157	30	888	0,768	I2
Супернатант	2843	-	-	-	-
Гель-хроматография					
I ₁	267,2	6,7	480	1,8	28
I ₂	115,2	2,9	240	2,08	32,5

С помощью гель-хроматографии на сефадексе Г-200 оценены молекулярные массы, а именно - 300000 для I_2 и 150000 для I_1 . Однако определенно судить о молекулярной массе нельзя, так как на результаты гель-хроматографии мог повлиять размер молекул (растворы лектинов I_1 и I_2 обладали большой вязкостью).

При ультрацентрифугировании разбавленных растворов белков (концентрация 0,5 мг/мл) определили коэффициент седиментации - 4,3 S (для обеих форм лектинов одинаковый) и рассчитали молекулярную массу - около 70 кДа (также одинаковая для обоих лектинов). Электрофорез лектинов (без восстановления - S - S - связей) в присутствии детергентов также показал величину молярной массы около 70 кДа.

I_1 и I_2 с одинаковым титром агглютинируют эритроциты человека разных групп крови, а также кролика и крысы, при минимальной концентрации 1 мкг/мл. При такой минимальной концентрации лектин дурмана индейского агглютинирует лейкоциты. Митогенной активностью не обладает. Ингибируется подобно лектинам других видов семейства Solanaceae производными хитина /5, 7/.

В составе I_1 определяли L-арабинозу, L-фукозу, D-ксилозу, D-маннозу, D-галактозу, D-глюкозу в соотношении 6:1:2:1:2:2 соответственно. Углеводы I_2 представлены L-арабинозой, D-ксилозой, D-маннозой, D-галактозой, D-глюкозой в соотношении 1:2:1:1:3 соответственно. N-концевые аминокислоты лектинов блокированы. В результате восьмичасового метанолиза в 1M HCl/MeOH_{абс} при комнатной температуре методом ТСХ дансилпроизводных в обоих случаях идентифицировали глутаминовую кислоту и глицин. Ниже приведен аминокислотный состав I_1 и I_2 из расчета моль/моль белка.

Как видно, в характере аминокислотного состава I_1 и I_2 много общего: низкое содержание ароматических аминокислот, высокое содержание Hu Pro , $1/2\text{Cys}$, Gly , Ser , Asp и Glu . Несмотря на это, наблюдаются определенные различия в соотношениях аминокислотных остатков I_1 и I_2 . Атомно-абсорбционным методом в составе обоих лектинов обнаружили цинк (0,04%). I_1 и I_2 подвергали изоэлектрофокусированию в пластинках 5%-

ного полиакриламидного геля с 1% амфолитов в градиенте 3,5-10,5 на приборе "Мультифор" (Швеция).

	I ₁	I ₂		I ₁	I ₂
Asp	14,7(15)	20,7(21)	Ile	1,9(2)	4,8(5)
Thr	12,1(12)	15,2(15)	Leu	3,3(3)	8,4(8)
Ser	25,3(25)	28,7(29)	Tyr	4,4(4)	5,9(6)
Glu	17,9(18)	25,2(25)	Phe	1,8(2)	4,3(4)
Pro	11,7(12)	32,3(32)	His	1,2(1)	2,4(2)
Gly	24,0(24)	29,1(29)	Lys*	3,4(3)	7,7(8)
Ala	8,1(8)	15,6(16)	Orn**	+	+
1/2 Cys	23,2(23)	23,3(23)	Arg	7,4(7)	10,9(11)
Val	3,0(3)	7,0(7)	Hu Pro	18,4(18)	64,4(64)
Met	1,3(1)	2,1(2)	Trp***	1,3(1)	2,3(2)

Примечание: * - определено без учета орнитина,
 ** - определено качественно по реакции с ванилином,
 *** - определено после 24-часового гидролиза в триметансульфоновой кислоте.

Оба лектина дали четкие зоны, соответствующие изоточкам I₁ - 3,9; I₂ - 6,0. I₁-I_{кислый}, I₂-I_{нейтральный}. Диск-электрофорез в 7,5%-ном полиакриламидном геле, pH 8,3, в присутствии ДС Na давал различные результаты для восстановленных меркаптоэтанолам и невосстановленных образцов. Невосстановленные лектины мигрировали широкой полосой, приблизительно с одинаковой подвижностью. После восстановления наблюдалось по три зоны, соответствующие молекулярным массам 27, 13, и 10 кДа для I₁ и 28, 13,5 и 11 кДа для I₂. Зоны, соответствующие белковым полосам 27 кДа для I₁ и 28 кДа для I₂, давали положительное окрашивание на углеводы. Спектры кругового дихроизма I₁ и I₂ схожи и имеют положительную полосу при 223 нм и отрицательную - при 204 нм.

Л и т е р а т у р а

1. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Антонович В.А., Луцкий А.Д. Методы поиска лектинов и определение их иммунохимической специфичности. - Львов, 1980.
2. Луцкий М.Д., Панасюк Е.Н., Луцкий А.Д. // Лектины. - Львов, 1981.
3. Потапов М.И. Судебно-медицинская экспертиза.- 1961. - № 3, 20.
4. Потапов М.И. Доклады АН СССР. - 1964. - 158, 6, 1437.
5. Allen A.K., Neuberger A. // Biochem.J. - 1973. - Vol. 135. - P. 307.
6. Boyd W.C., Requena M. // J. Immunology. - 1949. - Vol. 62. - P. 333.
7. Kilpatrick D.C., Yeoman M.M. // Biochem. J. - 1978. - Vol. 175. - P. 7751.
8. Timberlake S.W., Wonn R.B.C., Poletz R.D. // Prep. Biochem. - 1980. - Vol. 10. - N 2. - P. 178.

БАКТЕРИИ РОДА *Bacillus* - ПРОДУЦЕНТЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛЕКТИНОВ

Э.А. Коваленко, Е.И. Гетьман, В.А. Вьюницкая
Институт микробиологии и вирусологии
им. Д.К. Заболотного АН УССР, г. Киев

За последние 10 лет в лектинологии наметилась тенденция перехода от изучения лектинов животного и растительного происхождения к лектинам, продуцируемым микроорганизмами. Это связано с тем, что микроорганизмы быстро растут и идеально подходят для технологии интенсивного культивирования; компоненты питательной среды, как правило, недороги и доступны; имеется широкий выбор микроорганизмов, синтезирующих лектины; микробные лектины характеризуются высокой удельной ак-

тивностью и большим разнообразием по углеводной специфичности; продуценты лектинов могут быть улучшены генетическими приемами.

Среди микробных лектинов наименее изученными являются бактериальные лектины и, в частности, продуцируемые в среду лектины "свободного типа" или внеклеточные лектины. Преимущества их таковы: внеклеточные лектины проще выделить и очистить, нежели их связанные с клеткой аналоги; выход внеклеточных лектинов очень высок, поскольку не ограничен доступной биомассой. Сведения об этой группе лектинов весьма отрывочны и касаются лишь гемагглютининов (токсинов) патогенных и условнопатогенных бактерий: *Clostridium botulinum*, *E. coli* и *P. aeruginosa* /2/.

С постоянным расширением сферы применения лектинов потребность в этих препаратах неуклонно возрастает. И хотя применение растительных и животных лектинов преобладает, они постепенно вытесняются микробными эквивалентами. Поэтому изыскание новых нетрадиционных источников сырья и получение отечественных дешевых препаратов лектинов остается весьма актуальной задачей.

В качестве продуцентов лектинов нами были избраны широко распространенные в природе и занимающие особое место в мире микроорганизмов бактерии рода *Bacillus*. В последние годы появляется все больше публикаций, свидетельствующих о существенном участии этих микроорганизмов в микробиоценозе органов и полостей теплокровных и симбиотических сообществах в почве. Значительное количество бацилл обнаруживается в составе нормальной флоры желудочно-кишечного тракта, кожи, выделительной системы. Изолируемые из организма здоровых людей и животных аэробные спорообразующие бактерии, как правило, характеризуются высокой антагонистической и ферментативной активностью, способностью продуцировать внеклеточные аминокислоты, витамины, белки, адьювантные компоненты и другие физиологические активные вещества /1/.

До настоящего времени в доступной нам литературе не имеется данных о лектинпродуцирующей способности бактерий рода *Bacillus*. Логично предположить, что эти бактерии, известные как продуценты целого ряда внеклеточных биологически актив-

ных веществ, богаты и продуцентами внеклеточных лектинов. С целью подтверждения данного предположения нами было проведено обследование 260 штаммов бацилл (музей отдела антибиотиков ИМВ АН УССР), изолированных из различных экологических ниш и принадлежащих к различным видам этого рода микроорганизмов (таблицы I, 2).

Таблица I

Способность к биосинтезу внеклеточных лектинов, продуцируемых бактериями рода *Bacillus*, выделенными из различных экологических ниш

Источник выделения	Обследовано штаммов	Активность			
		гемагглютинирующая		гемолитическая	
		количество штаммов	титр ^{-I}	количество штаммов	титр ^{-I}
Организм человека:					
желудочно-кишечный тракт	20	12	8-32	3	2-4
кровь	5	3	8-32	-	-
Организм животных:					
лабораторных	16	-	-	-	-
сельскохозяйственных	65	19	2-256	10	2-4
Гусеницы тутового шелкопряда	5	2	16-32	2	16
Почва	39	6	8-256	1	2
Лечебные грязи	109	39	8-256	16	2
<i>B. cereus</i> (музейная культура)	1	1	32	-	-
Всего	260	82			

Определение гемагглютинирующей активности культуральной жидкости 24-часовых культур позволило обнаружить значительное количество штаммов-продуцентов внеклеточных лектинов среди бактерий, выделенных из различных источников (табли-

ца I). Наиболее интересны штаммы, изолированные из организма человека, т.к. более 50% исследуемых культур обладают способностью к синтезу внеклеточных лектинов. Заслуживают внимания также штаммы, выделенные от сельскохозяйственных животных, из почвы и лечебных грязей, 20-35% которых являются продуцентами этих биологически активных веществ. Ряд культур наряду с гемагглютинирующей обладают и гемолитической активностью (таблица I). Присутствие гемолизина в культуральной жидкости (ЖЖ) искажает реакцию гемагглютинации (рГА) и в дальнейшем затрудняет выделение лектинов. В большей степени были исследованы культуры видов *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. cereus*, которые значительно чаще выделялись из желудочно-кишечного тракта человека и животных (таблица 2).

Таблица 2

Видовая принадлежность бактерий рода *Bacillus* - продуцентов внеклеточных лектинов

В и д	Обследовано штаммов	Обнаружено продуцентов
<i>B. subtilis</i>	211	64
<i>B. licheniformis</i>	21	7
<i>B. cereus</i>	13	5
<i>B. firmus</i>	7	2
<i>B. pumilus</i>	3	1
<i>B. megaterium</i>	2	1
<i>B. coagulans</i>	2	1
<i>B. laterosporus</i>	1	1
Всего:	260	82

Из общего количества штаммов для исследований были отобраны культуры *B. subtilis* (штаммы: 605 ИМВ, 668 ИМВ и 685 ИМВ) и музейный штамм *B. cereus*, которые обладали наивысшей гемагглютинирующей активностью при отсутствии гемолитической.

Для выделения лектинов из культуральной жидкости продуцентов использовали методы, имеющие в белковой химии общее

значение: осаждение спиртом, экстрагирование ацетоном и высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в градиенте плотности от 50 до 80%. На всех этапах выделения препаратов контролировались гемагглютинирующая активность, белок и углеводная специфичность.

На рисунке представлены суммарные показатели только тех препаратов, которые характеризовались наивысшими критериями активности лектинов. Удельную лектиновую активность (ЛАуд) рассчитывали как титр⁻¹ рГА/мг белка в 1 мл КЖ и выражали в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ), степень очистки оценивали по удельной, выход - по общей лектиновой активности. Использование метода высаливания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 65% насыщении позволило получить препараты лектинов с наилучшими характеристиками: удельная лектиновая активность препаратов увеличивалась в 4-16 раз по сравнению с исходной активностью культуральной жидкости, при этом достигался 56-93% выход продукта, а степень очистки - в 5,3-14,5 раза. Применение других методов выделения дает возможность получить лишь отдельные препараты с достаточно высокими показателями активности.

Определение углеводной специфичности показало, что все препараты лектинов не проявляют сродства к простым моно-, ди- и трисахаридам (таблица 3). Обращает на себя внимание их постоянная специфичность к D-глюкозамину, D-галактозамину и фруктозо-1,6-бисфосфату. Выделенные из различных культур вида *B. subtilis* препараты отличаются между собой по степени сродства к отдельным углеводам, а также по специфичности к производным D-глюкозы (глюкуроновой, фосфоглюконовой и глюкозо-6-фосфорной кислотам). Музейная культура *B. cereus* обладает более узкой специфичностью.

Сравнивая углеводную специфичность полученных разными методами препаратов лектинов, установили, что наиболее полную их характеристику дает метод высаливания $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Таким образом, аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus* являются весьма перспективными продуцентами внеклеточных лектинов; лектинпродуцирующая способность значительно чаще выявляется у представителей видов бацилл, которые входят в состав микробиоценоза желудочно-кишечного тракта человека и животных, она обнаруживается также у организмов, выделенных из других экологических ниш (почвы, лечебных грязей

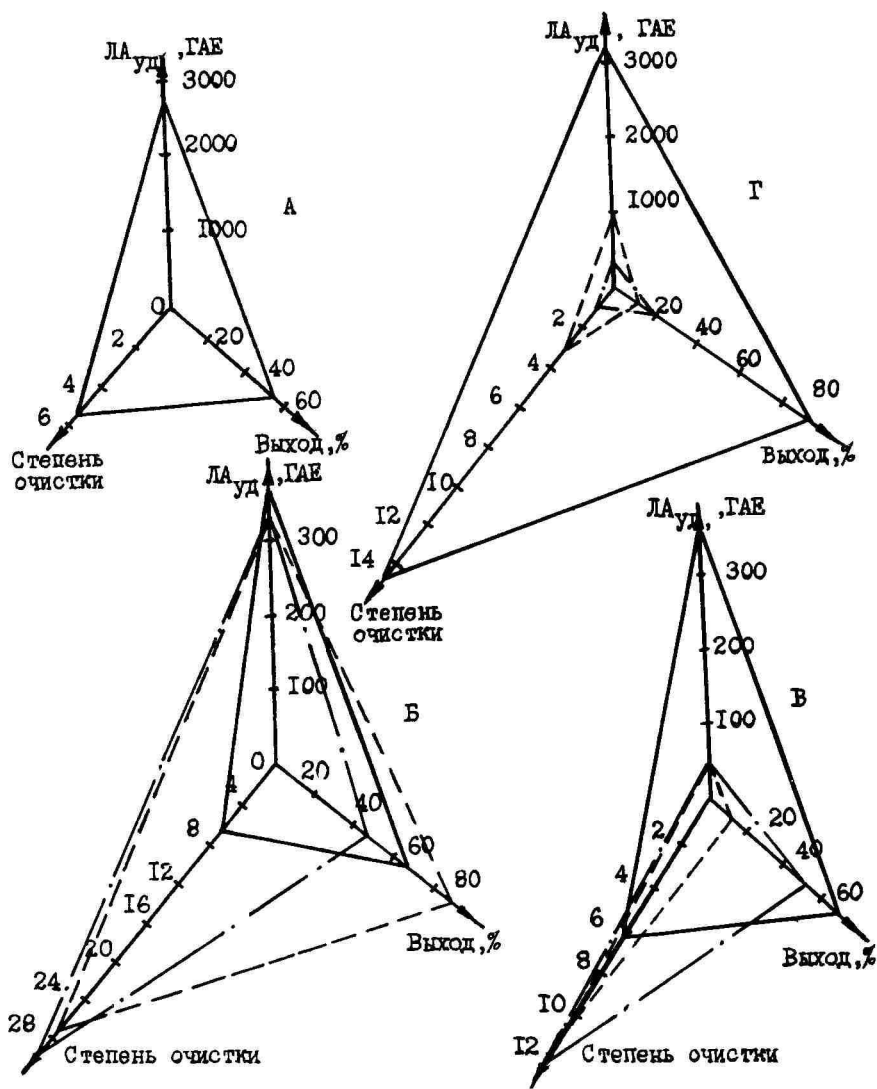


Рис. Сравнительная характеристика препаратов лектинов бактерий рода *Bacillus*, выделенных различными методами: - - - осадение спиртом, - - - экстрагирование ацетоном, — — — высаливание $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (остальные обозначения см. в тексте); штаммы *B. subtilis*: А - 605 ИМВ, В - 668 ИМВ, В - 685 ИМВ, Г - музейная культура *B. cereus*.

Таблица 3

Углеводная специфичность выделенных различными методами препаратов
лектинов бактерий рода *Bacillus*

Культура	Метод выде- ления	У г л е в о д ы, мМ								
		D-галак- тозамин	лакто- за	D-глю- козамин	глюко- роно- вая кислота	фосфо- глюко- новая кислота	глюко- зо-6- фосфор- ная кислота	сор- бит	целло- биоза	фрукто- зо-1,6- бифос- фат
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	II
78 605 ИМВ	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$									
	65%	150,0	-	75,0	-	75,0	37,5	-	150,0	15,0
	спирт 70%	9,37	-	75,0	-	75,0	150,0	-	-	7,5
668 ИМВ	ацетон 70%	75,0	-	9,37	3,75	3,75	-	-	-	1,87
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 65%	9,37	-	18,75	1,88	3,75	18,75	75,0	-	18,75
	спирт 70%	150,0	-	75,0	-	75,0	-	-	-	30,0
685 ИМВ	ацетон 50%	75,0	-	37,5	-	37,5	-	-	-	3,75
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 65%	9,37	75,0	1,17	0,94	37,5	18,75	18,75	-	1,17

Продолжение табл. 3

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	II
B. cereus	спирт 80%	75,0	-	18,75	7,5	-	-	-	-	3,75
	ацетон 50%	75,0	-	75,0	-	-	-	-	-	7,5
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 65%	150,0	-	18,75	37,5	-	-	-	-	7,5

и т.д.), что свидетельствует об определенных физиологических функциях лектинов бактерий рода *Bacillus* и что, в свою очередь, может являться предметом дальнейших исследований.

Л и т е р а т у р а

1. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии - продуценты биологически активных веществ. - Киев: Наукова думка, 1982. - 278 с.

2. Mirelman D. Microbial lectins and agglutinins // Wiley, N.Y., 1986. - 443 p.

ЛЕКТИНЫ И ИЗОБРЕТЕНИЯ. ВОПРОСЫ ИХ ПАТЕНТНОЙ ЗАЩИТЫ, ВЫЯВЛЕНИЯ И ОФОРМЛЕНИЯ

Т.А. Боровская, Н.В. Казачкова
Саратовский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского

Данная работа, представляющая собой результат исследований патентной документации по лектинной тематике, проводилась в соответствии с действующим в СССР ГОСТом 15.011-82 "Порядок проведения патентных исследований".

На начальном этапе сотрудников кафедры биохимии и биофизики Саратовского университета интересовала информация об изобретениях по растительным лектинам, в связи с чем предметом поиска явились способы выделения, очистки растительных экстрактов, разнообразные виды носителей, а также аппаратура для получения лектинов из растительного сырья. В регламент поиска были включены следующие рубрики международной классификации изобретений (МКИ):

- лекарственные препараты из растений,
- лекарственные препараты, содержащие белки, агглютинины, аллергены из пыльцы растений,
- получение протеинов, их разделение и очистка,
- протеины из растений, гликопротеины,

- иммобилизованные пептиды,
- недифференцированные животные или растительные клетки,
- исследование или анализ материалов путем разделения на составные части,
- обработка растительного материала.

В число выбранных стран поиска вошли высокоразвитые капиталистические страны (Великобритания, Франция, ФРГ, Швейцария, США, Япония) и социалистические страны (ГДР, ВНР, НРБ, ПНР, СССР, ЧССР), глубина поиска составила 10 лет.

Отбор патентов для исследования. После предварительного отбора патентов с использованием бюллетеней "Изобретения стран мира" целесообразно было приступить непосредственно к патентным исследованиям в фонде Всесоюзной патентно-технической библиотеки (г. Москва), являющимся самым полным фондом патентной документации в СССР. Следует отметить, что материалы в фонде библиотеки представлены на языках стран патентования, а это в значительной степени осложняет работу.

При поиске патентной информации нам пришлось учитывать тот факт, что в процессе изучения лектинов менялась терминология, открывались новые качества и свойства. Все это не могло не отразиться на размещении информации о лектинах в массиве изобретений. В связи с этим возникла необходимость углубить ретроспективу до времени появления первых патентов по лектинной тематике и несколько пересмотреть регламент поиска.

Естественно, что основное количество патентов данной тематики было обнаружено в классе МКИ "Удовлетворение жизненных потребностей" (А61К). Но разработчик, ведущий поиск патентной информации, не должен ограничиваться лишь этим классом, так как интересующие его патенты можно встретить и в разделах "Соединения неизвестного строения" (C07G), "Микроорганизмы или ферменты, их композиции" (C12N), "Пептиды, протеины" (C07K), "Избирательная адсорбция (хроматография)" (B01D), "Исследование или анализ материалов" (G01N), "Белковые составы для пищевых продуктов (A23J)".

В процессе работы были обнаружены патенты, в которых попутно с методикой получения лекарственных препаратов, содер-

жащих лектина, описывалась и технология выделения этих лектинов. Например, "Способ лечения анемии с использованием фитогемагглютина" (патент США № 3317386, фирма Burroughs Wellcome & Co.). Это заставило нас учитывать также патенты на применение лектинов.

Проведенная работа позволила выявить 84 патента и авторских свидетельства по лектинам растительного происхождения, среди которых: - "Приготовление токсичного рицина" (пат. США № 3060165),

- "Способ получения экстрактов ремнецветковых с определенным содержанием лектина, тормозящего рак" (пат. ГДР № 235418),
- "Цепочка рицина" (заявка Великобритании № 2034324),
- "Способ получения фитогемагглютина" (авт. св. Болгарии № I2008),
- "Фармацевтическое средство с антитуморной активностью, содержащее абрин" (заявка ФРГ № 25I8509),
- "Способ и устройство для отделения и очистки белков путем хроматографии" (заявка ФРГ № 28I787I) и др.

Анализ отобранных патентных документов показал, что источниками сырья для получения лектинов являются разнообразные растения: канавалия мечевидная, клещевина, семена фасоли, зерна (зародыши) пшеницы, арахис, горох, соя, соцветия (рыльца) растения Иван-чай, клубни картофеля, рыльца кукурузы, лотус и др.

Мы не ставили перед собой задачи рассмотрения всех особенностей технологии выделения лектинов. Нам казалось интересным проанализировать выявленные изобретения с учетом операций, проводимых на заключительных стадиях очистки. Как следует из патентов, на этапе тонкого фракционирования экстракта могут применяться ионообменная хроматография (пат. США № 3823129, з. Франции № 243979I), гель-фильтрация (пат. США № 4371515, з. Великобритании № I445544), аффинная хроматография (з. Франции № I522600, авт. св. СССР № I65III). При этом в качестве носителей использовались целлюлоза, агароза, сефадекс, декстран, полисахариды, овомукоид, полимерные носители.

Проведенный поиск показал, что одной из самых распрост-

раненных областей применения лектинов является их использование в качестве составных частей противоопухолевых лекарственных препаратов. Наряду с этим лектины широко применяются в биохимических исследованиях, при создании вакцин, диагностике и лечении целого ряда заболеваний. Например, нами был найден патент на применение конканавалина А для лечения зубов (заявка Великобритании № I433598).

На этом этапе уже можно было бы закончить работу по анализу уровня разработок технологий получения лектинов растительного происхождения. Однако мы сочли необходимым ознакомиться с запатентованными способами выделения лектинов иного (не растительного) происхождения с целью возможного комбинирования элементов и режимов получения лектинов из различного сырья и создания на этой базе новых технологий. При этом по тематике регламент патентного поиска был в значительной степени расширен, в него вошло более 80-ти рубрик МКИ.

Сейчас, когда эта работа приближается к завершению, Саратовский университет располагает информацией и патентным фондом по лектинной тематике, содержащим 172 охранных документа. Как уже было отмечено, непосредственно к лектинам растительного происхождения относятся 84 патента и авторских свидетельства. Остальные патенты получены на лектины животного происхождения, лектины из бактерий и микроорганизмов, носители для выделения лектинов, устройства и способы первоначальной очистки белковых экстрактов, способы определения лектинов.

Количественный анализ отобранных документов показал, что за период с начала 60-х годов по настоящее время наибольшее количество изобретений было заявлено в Японии (43 заявки), США (35 патентов), Франции (31 заявка), ФРГ (15 заявок). Среди стран-заявителей были выявлены Австралия, Великобритания, Израиль, Нидерланды, Швеция, Швейцария и социалистические страны - СССР, НРБ, ГДР, ЧССР. Таким образом, представленные данные наглядно демонстрируют тот факт, что лидирующее положение в области патентования изобретений по лектинной тематике занимают Япония, США, Франция.

Защита новых технологий в виде "ноу-хау". Патентные исследования позволили нам выявить целый ряд зарубежных фирм, патентующих изобретения по этой тематике. Однако, в процессе работы не было обнаружено ни одного патента ведущих фирм, поставляющих лектины на международный рынок: "Serva" (ФРГ), "Sigma" (США), "Fluka" (Швейцария), "Pharmacia" (Швеция) и др.

В связи с этим специально был проведен фирменный поиск, направленный на обнаружение патентов данных фирм, но он не дал положительных результатов. Видимо, это можно объяснить тем, что с учетом высокой стоимости продукта раскрытие технологии его получения при патентовании представляет большой риск для фирмы-заявителя.

В последнее время наблюдается повышение роли "ноу-хау" и снижение роли патентов на некоторые достижения, т.е. сейчас становится важным не столько само изобретение, сколько пути его реализации.

В отличие от изобретения, которое патентуется, "ноу-хау" не регистрируется и не публикуется, причем, сейчас прослеживаются тенденции включения "ноу-хау" в состав договоров о продажах патентных лицензий, а также заключения комплексных договоров, включающих наряду с "ноу-хау" техническую помощь при проведении экспериментальных и испытательных работ, предоставление советов и консультаций, выполнение инженерных работ и др. В лицензионных соглашениях "ноу-хау" часто означает все технические знания, незапатентованные изобретения, секреты производства, технологию, процессы и методы, формулы, практический опыт, накопленный в результате научных исследований и в процессе производства продукта /2/.

Таким образом, с одной стороны, патент является очень выгодной формой защиты изобретений, т.к. наличие охранных документов взвинчивает цену на новый продукт при его продаже, гарантируя мировую новизну, полезность, неординарность технологии. С другой стороны, фирмы часто предпочитают держать в секрете результаты своей деятельности с целью предотвращения недобросовестного использования изобретений и копирования технологий без покупки патента /1/.

Выявление и оформление заявок на изобретения. Для улучшения качества заявок на изобретения и повышения уровня оформления новых советских изобретений мы приводим некоторые практические рекомендации.

В процессе оформления прав разработчиков новых технологий получения лектинов акцент делается, в основном, на наличие новых операций или изменение последовательности выполнения действий, новые режимы. Под режимными отличиями для данной тематики понимаются степень кислотности, время проведения операции, температура процесса и т.д. Все это позволит надежно и без особых сложностей защищать новые технологии, поскольку перечисленные группы признаков являются основными. Разумеется, в заявке на изобретение должно быть достаточное количество примеров на все предложенные отступления от известных технологий, включая и примеры, иллюстрирующие отсутствие положительного эффекта при выходе за рамки предлагаемых изобретателем рекомендаций, т.е. нецелесообразность осуществления этих технологий в "запредельных" режимах.

Поскольку для разработчиков очень важной задачей является нахождение все новых видов сырья, дешевых и позволяющих увеличивать выход целевого продукта, многие заявки на изобретение преследуют именно эту цель, но ограничиваться в формуле изобретения только указанием нового вида сырья для получения лектина совершенно недостаточно, ибо воспроизвести этот способ без указания режимов и других особенностей практически невозможно.

Заявки на советские изобретения, как правило, содержат все группы признаков - новые операции, обновленную последовательность их проведения, измененные режимы, различные виды сырья и т.д.

В заключение хотелось подчеркнуть, что получение чистых препаратов лектинов, детальное изучение их свойств и возможного широкого применения в биологии и медицине, изыскание новых источников сырья, разработка аппаратуры для осуществления данных исследований продолжают оставаться важнейшей задачей.

Л и т е р а т у р а

1. Баев А.А. Индустрия ДНК: перспективы, фирмы, патенты // Вестник АН СССР. - 1980. - № II. - С. 74.
2. Штумпф Г. Договор о передаче ноу-хау. - М.: Прогресс, 1976 (пер. с нем.).

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ УГЛЕВОДНОГО КОМПЛЕКСА ЛЕКТИНА ИЗ ГОРОХА (*Pisum Sativum*)

Ю.Д. Лобсанов, С.В. Кузев, Р.Р. Рискулов,
В.З. Плетнев, М.А. Мокульский
Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

Объектом нашего изучения является белок лектин из семян гороха. Лектинами называют большой класс углеводсвязывающих белков неиммунного происхождения, агглютинирующих клетки и/или преципитирующих гликоконъюгаты. По определению из этого класса исключаются такие углеводсвязывающие белки, как углеводспецифические ферменты, транспортные белки, гормоны и токсины, содержащие только один углеводсвязывающий центр на молекулу и, следовательно, неспособные осуществлять агглютинацию или преципитацию, для чего необходима по меньшей мере бивалентность.

Лектины обнаружены на всех уровнях развития живой материи - от бактерий и вирусов до человека, что свидетельствует о важной роли этих белков в процессах жизнедеятельности. Природа в виде лектинов предоставила исследователям целый класс белков, обладающих широчайшим диапазоном углеводной специфичности. Существующей классификацией лектины разделяются на несколько групп по моносахаридной специфичности /1/. В пределах каждой группы лектины отличаются по величинам констант связывания различных производных моносахаридов и олигосахаридов. Поэтому лектины являются уникальным объектом изучения молекулярных основ белок-углеводного взаимодействия.

Лектин из семян гороха принадлежит к группе маннозо- и глюкозоспецифических Са, Мп-содержащих лектинов. К этой группе относятся также конканавалин А, лектины из чечевицы и конских бобов (фавин) и ряд других. Для названных белков определена аминокислотная последовательность. Все они являются более или менее близкими гомологами.

Для конканавалина А была обнаружена круговая гомология /4/ по отношению к последовательностям других лектинов названной группы. Этот факт пытались объяснить с позиций модификаций на уровне гена, однако выяснилось, что модификации носят посттрансляционный характер, т.е. находятся на уровне белка. Конканавалин А синтезируется как гликопротеиновый предшественник, который затем подвергается посттрансляционному процессингу с удалением небольшого пептида с олигоманнозидом и сшиванием N- и C-концов /3/. Этот тип модификации встречается впервые у эукариотов (рис. 1). Поскольку предшественник конканавалина А не имеет лектиновой активности /3/ и приобретает ее после удаления гликозилированной части, можно предположить, что олигоманнозид каким-то образом блокирует углеводсвязывающий центр конканавалина А.

Прослеживается также гомология первичных последовательностей глюкозо- и маннозоспецифических лектинов с галактозоспецифическими лектинами (например, из лимской фасоли).

Возникает вопрос, является ли углеводная тонкая специфичность следствием небольших вариаций в организации углеводсвязывающего центра в разных лектинах или различия носят более фундаментальный характер.

Ответ на эти вопросы, конечно, может дать только локализация, установление структурной организации и сравнение углеводсвязывающих центров разных лектинов.

Трехмерная структура лектина из гороха определена нами с разрешением 3 Å /2/. По топологии укладки полипептидной цепи структура лектина гороха очень близка к структуре конканавалина А. Отличия касаются лишь некоторых петель (рисунок 2).

На рисунке большим кружком изображено предположительное место связывания углевода исходя из гомологии структуры лектина гороха со структурой конканавалина А, где место связы-

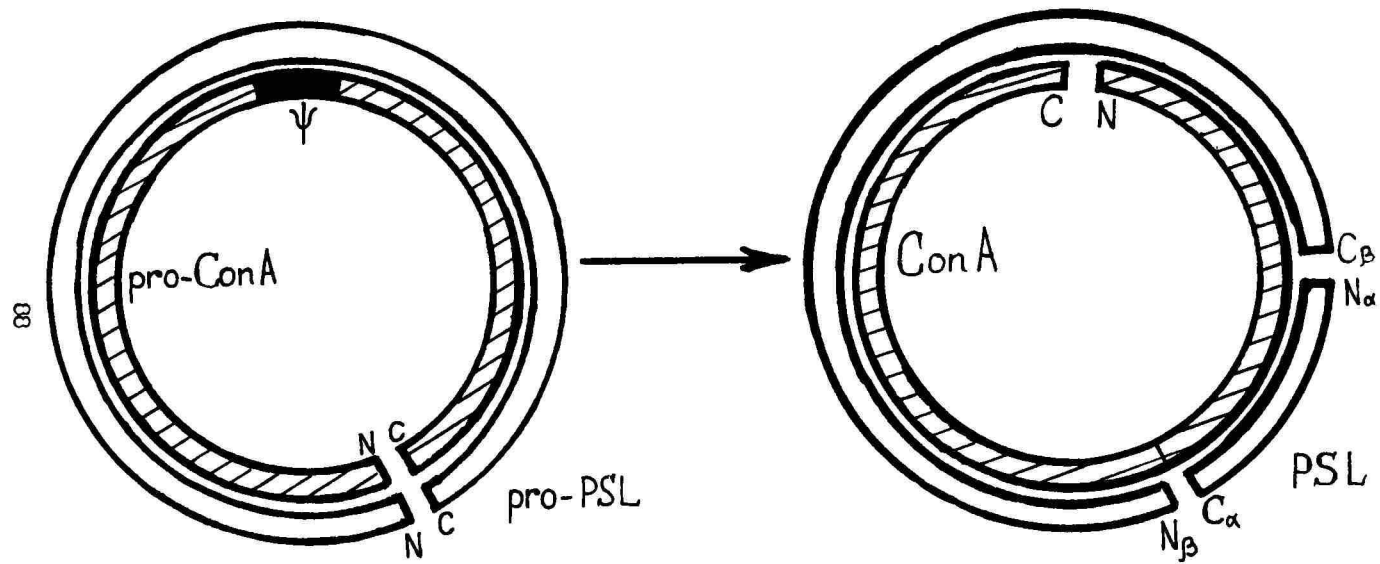


Рис. I.

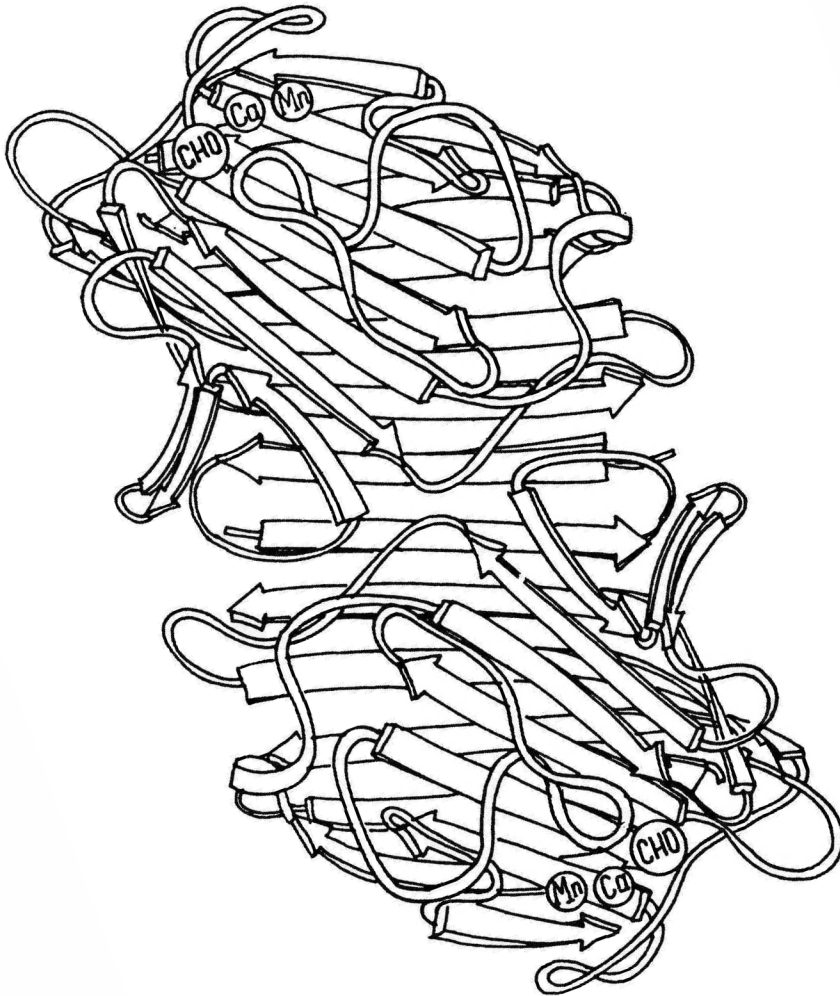


Рис. 2.

89

вания углевода локализовано по картам электронной плотности комплекса конканавалина А с метил-маннозидом при разрешении 6 Å. Невысокое качество кристаллов не позволило получить карты более высокого разрешения, и детальная картина связывания углевода белком не была установлена /5/.

Для исследования взаимодействия лектин-углевод методом рентгеноструктурного анализа встала задача получения хороших кристаллов комплекса лектин гороха - углевод. Для получения комплекса брали следующий глюкозид: бензил-2-ацетидамо-2,3-дидезокси-3-йод- α -D-глюкопиранозид. Структурная химическая формула изображена в предположении конформации кресла (рисунок 3). Пробовался также аналогичный глюкозид с йодом, присоединенным к атому С-6 глюкозы. Однако присоединения не произошло. Процесс получения кристаллов комплекса заключался в обычном вымачивании кристаллов нативного лектина в растворе, содержащем глюкозид в концентрации 1 мМ. Контроль за присоединением осуществлялся рентгеновским методом.

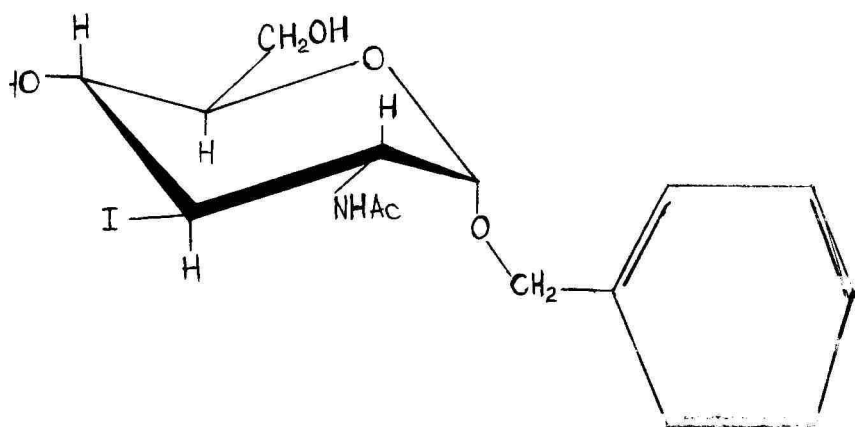


Рис. 3. Бензил-2-ацетидамо-2,3-дидезокси-3-
- - -глюкопиранозид.

Было получено два набора дифракционных данных: первый - на многоканальном дифрактометре "APUS" в нашей лаборатории с разрешением 2,4 Å, второй - через несколько месяцев одним из соавторов данной работы на синхротроне в Дарсбери (Великобритания) с разрешением 2 Å. R-факторы по симметричным рефлексам для обоих наборов в сфере разрешения 3 Å составили 3%, а R-факторы сравнения, вычисленные по модулям структурных факторов нативного белка и набора комплекса, составили 12%. Использование 3 Å - областей обоих наборов привело к совпадающим структурным результатам. На карте электронной плотности, полученной разностным синтезом Фурье, где в качестве коэффициентов выступает разность соответствующих структурных факторов нативного белка и комплекса, проявился один четкий высокий пик, интерпретированный как место нахождения углеводного йода. На рисунке 4 кружочком слева обозначено месторасположение углеводного йода, таким образом, локализовано положение углеводсвязывающего центра в молекуле лектина. Он примерно совпадает с предполагаемым ранее районом связывания.

Расстояния между атомом углеводного йода и атомами Са и Мп равны, соответственно ~7 Å и 11 Å. Расстояние йод-марганец оказалось несколько меньше оцененного по модели расстояния 13-15 Å между центром глюкопиранозного кольца и атомом Мп в соответствующем комплексе конканавалина А, в связи с чем возникла мысль, что атом С-3 глюкозы с присоединенным йодом находится со стороны кольца, ближе к атомам Са и Мп. Синтез Фурье с фазами нативного белка и коэффициентами - структурными факторами комплекса, вычисленный до разрешения 3 Å, подтвердил это. Атом йода при атоме С-3 глюкозы занимает ближнее к атомам Са и Мп положение, а плоскость глюкопиранозного кольца располагается перпендикулярно плоскости рисунка. В явном соседстве с углеводом находятся боковые группы фенилаланина PHE123 и тирозина TYR100.

Анализ показывает, что область связывания углевода в молекуле лектина представляет собой неглубокий карман на поверхности белковой глобулы, ограниченный аминокислотными петлями с номерами остатков: 78-81, 98-102, 123-128, 215-218.

Известно, что лектины этой группы обладают наибольшим

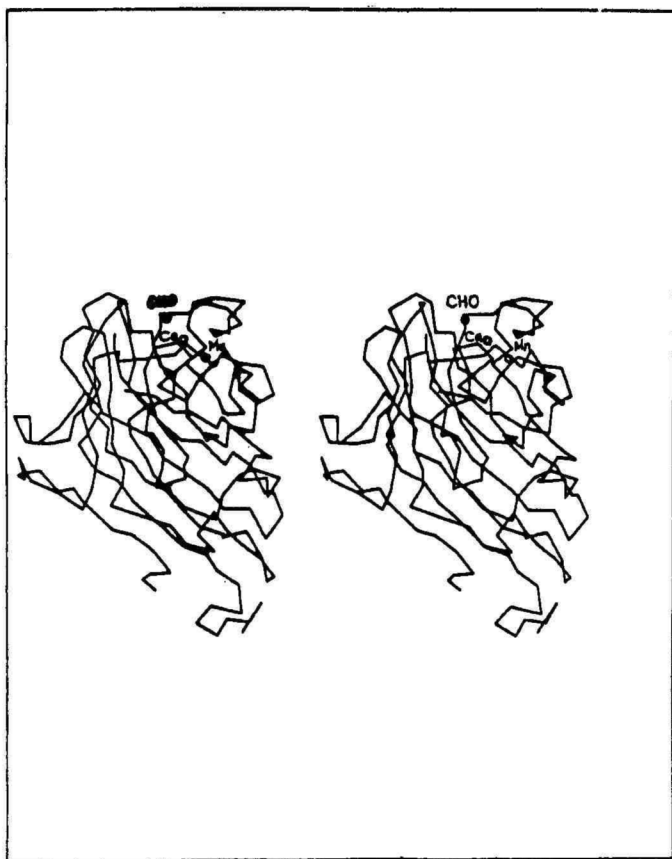


Рис. 4.

средством к разветвленным, т.н. биантенным олигосахаридам, общим структурным звеном которых является трисахарид Man_6 $[\text{Man}_3] \text{Man}$. При обнаруженной ориентации глюкопиранозного цикла его атом C-3 "смотрит" в сторону желобка между петлями I23-I28 и 98-I02, а атом C-6 "смотрит" в сторону желобка между петлями 78-81 и 215-218, с одной стороны, и петлей I23-I28, с другой (рис. 2). Таким образом, можно предположить, что связывание двух ветвей биантенных олигосахаридов

происходит на этих двух желобках. Здесь можно вспомнить, что вырезанный в ходе процессинга предшественника конканавалина А пептид с олигоманнозидом блокировал лектиновую активность предшественника. Теперь видно, что структурно это возможно, ибо глико-часть предшественника конканавалина А находится в непосредственной близости от желобка между петлями I23-I28 и 98-I02.

Более подробный анализ связывания углевода лектином гороха следует ждать после уточнения структуры с повышением разрешения, что даст возможность построить атомную модель взаимодействия углевода с молекулой лектина гороха.

В заключение приводим сопоставление аминокислотных последовательностей в области углеводсвязывающих центров конканавалина А, лектина гороха, фавина и лектина из лимской фасоли (рис. 5). По-видимому, необходимо обратить внимание

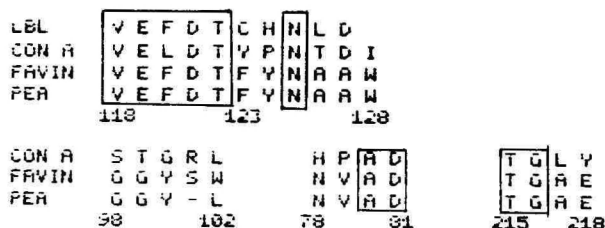


Рис. 5.

на важную роль для специфичности остатков, гомологичных фенилаланину I23 в молекуле лектина гороха. В конканавалине А ему соответствует остаток тирозина, а в молекуле лектина из лимской фасоли - цистеин, играющий важную роль в процессе взаимодействия с углеводом /6/.

Л и т е р а т у р а

И. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Луцки А.Д. Лектины - Львов: Вища школа, 1981.

2. Рискулов Р.Р., Кузев С.В., Лобсанов Ю.Д., Лубнин М.Д., Мокульская Т.Д., Мокульский М.А. // Доклады АН СССР. - 1987. - Т. 292, № 2. - С. 486-490.

3. Chrispeels M.J., Haztl P.M., Sturm A., Faye L. // J. Biol. Chem. - 1986. - V. 261. - N 22. - P. 10021-10024.

4. Cunningham B.A., Hemperly J.J., Hopp T.P., Edelman E.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979. - V. 76. - N 7. - P. 3218-3222.

5. Hardman K.D., Ainsworth C.F. // Biochemistry. - 1976. V. 15. - N 5. - P. 1120-1128.

6. Roberts D.D., Goldstein I.J. // J. Biol. Chem. - 1984. - V. 259. - N 2. - P. 909-914.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ АССОЦИАЦИИ ЛЕКТИНОВ. АФФИННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ МЕТОД

Т.В. Евстифеева, А.Д. Михайлов
Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР,
г. Москва

Одной из наиболее важных характеристик, отражающих взаимодействие лектина с углеводом, является константа ассоциации. Вместе с тем, судя по результатам поиска на базе данных ВНИИТИ за 1984-1988 гг., сведения о константах ассоциации лектинов в научной литературе отсутствуют, нет их и в каталогах крупнейших химических фирм, что может свидетельствовать об отсутствии надежного и точного метода ее определения (в противоположность этому, ни одно моноклональное антитело не поступает на рынок без количественной характеристики его сродства к антигену).

Целью настоящей работы была разработка относительно простого и универсального метода, позволяющего достаточно точно определять константу взаимодействия лектин-углевод.

Суть метода заключается в том, что хроматографическая колонка заполняется агарозным гелем с иммобилизованным на нем через спейсерную группировку моносахаридом (в нашем случае - d -манноза, иммобилизованная на эпоксиактивированной

агарозе по методике, описанной в буклете фирмы Pharmacia). Исследуемый лектин мечится йодом-125 (мы для этого использовали йодогеновый метод) и пропускается через колонку; при этом молекулы лектина, не потерявшие сродства к моносахариду в процессе мечения, задерживаются на сорбенте. Далее колонка промывается буферным раствором для удаления несвязавшейся метки. Элюирование ведется моносахаридом (в нашем случае d -маннозой) в линейном восходящем градиенте концентраций. Элюирующий моносахарид содержит молекулы, меченные углеродом-14. С выхода колонки собираются фракции, радиоактивность которых измеряется сначала на гамма-счетчике, а затем в присутствии сцинтилляционной жидкости на бетта-счетчике (регистрируются импульсы с диапазоном энергии 350-650 эВ). Полученные данные, отражающие содержание во фракциях лектина и моносахарида, используются для расчета констант.

Для обработки результатов нами разработана компьютерная программа. Она написана на языке BASIC для ПЭВМ ЕС-1840 и функционирует под управлением операционной системы M 86, содержит минимальный спектр операторов и легко переносима на другие версии языка BASIC.

При работе программы выполняются следующие операции:

I. Вычисление константы для каждого шага элюирования.

Если i-номер фракции: $i = 1, \dots, n$, где n - общее количество фракций в опыте, K_i - значение константы на шаге элюирования с номером i, то K_i вычисляется по формуле:

$$K_i = \frac{(ML)_i}{(M)_i(L)_i}, \text{ где}$$

$(ML)_i$ - количество комплексов лектин-моносахарид на i-ом шаге;

$(M)_i (L)_i$ - количества свободных веществ (моносахарида и лектина соответственно).

Величину количества комплексов находим по формуле:

$$(ML)_i = (ML)_{i-1} - (L)_i, \quad \text{где}$$

$(ML)_{i-1}$ - количества комплексов на шаге с номером i - 1.

На нулевом шаге ($i - I = 0$) количество комплексов (МЛ) о пропорционально активности колонки до начала элюирования (при расчете по этим формулам вручную необходимо привести в соответствие размерности всех величин).

2. Вычисление константы аффинности для данного вещества.

При обработке статистических материалов, в частности результатов экспериментальных наблюдений, большое значение имеют средние величины. Среднее число является самым простым и поэтому весьма распространенным средством обобщения. Применение средней величины позволяет охарактеризовать определенный признак в целом одним числом. Таким образом, при помощи средних выявляется основная закономерность, влияющая на процесс развития явления в целом. Константу аффинности для данного вещества получаем по формуле:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^n K_i}{n}, \quad \text{где}$$

K_i - константа аффинности на i -ом шаге элюирования,
 n - число элюций.

3. Расчет ошибок.

Так как в процессе измерения используются счетчики радиоактивности, которые измеряют дискретные значения, то его погрешностью можно пренебречь. Вычисляем ошибку среднего:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (K_i - K)^2}{n(n-1)}}, \quad \text{где}$$

n - число фракций,

K_i - значение константы на i -ом шаге элюирования.

Доверительным интервалом для K будет $K - \sigma$, $K + \sigma$.

4. Исключение резко выделяющихся наблюдений.

Статистические процедуры выявления резко выделяющихся наблюдений основаны на предположении однородности данных.

При этом выбросы рассматриваются как наблюдения, нетипично далеко удаляющиеся от центра распределения. К настоящему времени предложено много аналитических процедур для идентификации выбросов и оценки значимости их отклонения. Одна из трудностей состоит в том, что выборка наблюдений должна соответствовать нормальному закону.

Мы в нашей работе воспользовались критерием Анскомба. В двух сериях опытов по критериям Анскомба аномальными оказались значения трех первых наблюдений. Это можно объяснить тем, что в начале элюирования мы имеем дело с невысоким численным значением радиоактивности образца. А так как радиоактивный распад — статический процесс, то чем меньше значение радиоактивности, тем больше возможный разброс.

Разработанная программа запрашивает следующие данные: название лектина, сродство к моносахариду, молекулярную массу лектина, количество фракций, активность колонки до начала элюирования, удельную активность меченного лектина, удельную активность элюирующего моносахарида, парные значения активностей лектина и моносахарида во фракциях. В процессе ввода данных программой предусмотрена их корректировка. Результаты вычисления выводятся на печать, строится график значений констант на каждом шаге элюирования и значение константы для исследуемого вещества.

РАСПЕЧАТКА ПРОГРАММЫ

```
10      KEY OFF
20  SIS  Очистка экрана
30  DIM  E[1..30] Массив значений активностей элюированного
      лектина
40  DIM  L[1..30] Массив количеств лектина (моль)
50  DIM  ELM[1..30] Массив значений элюата
60  DIM  M[1..30] Массив количеств моносахарида (моль)
70  DIM  ML[1..30] Массив активностей колонки
80  DIM  K[1..30] Массив констант
90  DIM  T[1..30] Массив точек на графике
100 PRINT "Программа для определения константы ассоциации
      лектинов"
```

```

110 PRINT "===== "
120 PRINT : PRINT "Введите значение и нажмите клавишу 'ввод' "
130 PRINT : INPUT "Название лектина"; LEKTIN
140 PRINT : INPUT "Сродство к моносахариду"; SRMON
150 PRINT : INPUT "Молекулярная масса мономера лектина (Даль-
тон)"; MOLM
160 PRINT : INPUT "Количество элюций"; KOLEI%
170 PRINT : INPUT "Есть ошибки (Д/Н)"; DN
180 IF DN = "Д" OR DN = "д" THEN 130
190 IF DN = "Н" OR DN = "н" THEN 200 ELSE 170
200 PRINT : INPUT "Активность колонки до начала элюирования
(CPM)"; ACTCOL
210 PRINT : INPUT "Удельная активность меченого лектина
(CPM/мг)"; ACTЛЕК
220 PRINT : INPUT "Удельная активность элюирующего моносаха-
рида (CPM/ммоль)"; АСТМ
ON
230 PRINT: INPUT "Есть ошибки (Д/Н)";DN
240 IF DN = "Д" OR DN = "д" THEN 200
250 IF DN = "Н" OR DN = "н" THEN 260 ELSE 230
260 GOSUB :PRINT "Введите соответствующие значения активностей
(CPM) "
270 PRINT "Элюированного лектина при значениях элюата"
280 FOR I% = 1 TO KOLEI%
290 PRINT I%; : INPUT; " "; ELLEK (I%):INPUT " "; ELM(I%)
300 PRINT :INPUT"Есть ошибки (Д/Н)";DN
310 IF DN = "Д" OR DN = "д" THEN 290
320 IF DN = "Н" OR DN = "н" THEN 330 ELSE 300
330 NEXT
340 ----- Размерность -----
350 FOR I% = 1 TO KOLEI%
360 L (I%) = ELLEK (I%) / ACTЛЕК / MOLM*.001
370 M (I%) = ELM (I%) / АСТМОН*.001
380 NEXT
390 ML (0) = ACTCOL / ACTЛЕК / MOLM*.001
400 ----- Вычисление и печать констант -----
410 LPRINT "N Моносахарид (моль) константа (I/моль)": LPRINT

```

```

420 FOR I% = 1 TO KOLEI%
430 ML(I%) = ML(I% - 1) - L(I%)
440 (I%) = ML(I%) / M(I%) / L(I%)
450 'PRINT I% " " M(I%) " " K(I%)
460 NEXT
470 ----- Среднее -----
480 KSUM = 0
490 FOR I% = 1 TO KOLEI%
500 KSUM = KSUM + K(I%)
510 NEXT
520 KSRI = KSUM / KOLEI%
530 ----- Среднее без 1-х двух наблюдений -----
540 KSUM = 0
550 FOR I% = 3 TO KOLEI%
560 KSUM = KSUM + K(I%)
570 NEXT
580 KSR2 = KSUM / (KOLEI%-2)
590 ----- Ошибка -----
600 SUM = 0
610 FOR I% = 1 TO KOLEI%
620 SUM = SUM + (K(I%) - KSRI)^2
630 NEXT
640 SUM = SQR (SUM)
650 QSIGMA1 = SUM / SQR (KOLEI% - 1) / SQR (KOLEI%)
660 ----- Ошибка среднего с выбросами -----
670 SUM = 0
680 FOR I% = 1 TO KOLEI%
690 SUM = SUM + (K(I%) - KSR2)^2
700 NEXT
710 SUM = SQR (SUM)
720 QSIGMA2 = SUM / SQR (KOLEI% - 3) / SQR (KOLEI% - 2)
730 ----- Печать результатов -----
740 LPRINT
750 LPRINT "Если результаты соответствуют односайтному
    взаимодействию, то"
760 LPRINT : LPRINT "Лектин "ЛЕКТИН " имеет константу срод-
    ства к "SRMON

```

```

770 LPRINT : LPRINT"Без выбросов: K ="KSRI"+-"QSIGMA 1
780 LPRINT "Исключены первые два наблюдения: K = "KSR2" +-"
    QSIGMA2
790 ----- График -----
800 LPRINT : LPRINT
810 LPRINT "Распределение значений констант": LPRINT" ----
    -----"
820 LPRINT "KI - значение без выбросов"
830 LPRINT "K2 - с выбросами": LPRINT : LPRINT
840 MS = 78/K(I) ----- Масштаб -----
850 Ki = INT (KSRI*MS) : K2 = INT (KSR2*MS)
860 LPRINT SPC (K2 - 1) "K2"SPC (K1 - K2 - 1)"K1
870 LPRINT SPC (K2 - 1) "!" SPC (K1 - K2 - 1)"!"
880 LPRINT "+" STRING (77,164) ">"
890 FOR I% = 1 TO KOLEI%
900 T(I%) = INT (K(I%)*MS)
910 LPRINT CHR (165); : LPRINT SPC (T(I%) - 2)"*"
920 NEXT
930 LPRINT "v"
940 END

```

Л и т е р а т у р а

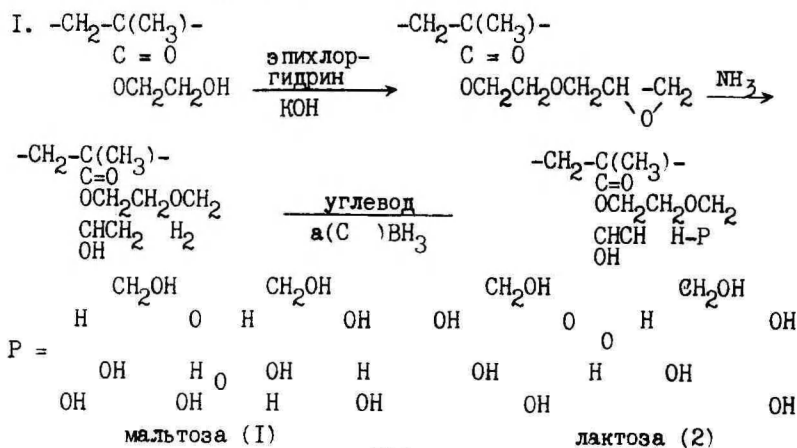
1. Айвазян С.А., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. Основы моделирования и первичная обработка данных. - М.: Мысль, 1983.
2. Боярский А.Я. Статистические методы в экспериментальных медицинских исследованиях. - М.: Медицина, 1985.
3. Кудрин А.И., Пономарева Г.Т. Применение математики в экспериментальной и клинической медицине. - М.: Медицина, 1967.
4. Sevelever D., Bruera M.R., Gatti C. A. Measurement of antigen - antibody binding constants by elution of affinity chromatography columns with continuous concentration gradients of dissociating agents // Immunol. Invest. - 1986. - V. 15. - N 6. - P. 497-503.

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКТИНОВ
НА СОРБЕНТАХ НА ОСНОВЕ СФЕРОНА**

Б.Б. Березин, В.М. Лахтин, Р.Г. Геворкян
В.А. Даванков, И.А. Ямсков
Институт элементоорганических соединений АН СССР
г. Москва

В СССР в настоящее время лектины производятся в ограниченном ассортименте и малом количестве, поэтому получение сорбентов для хроматографической очистки практически важных лектинов - задача актуальная. В качестве матрицы был выбран макропористый сшитый β -оксиэтилметакрилатный гель "Сферон" (ЧССР), отличающийся механической прочностью, химической стойкостью, устойчивостью к действию микроорганизмов.

Нами синтезирован ряд гликозилсферононов, позволяющих получать лектины пяти классов по углеводной специфичности: 1) α -манноза/ α -глюкозоспецифические (иммобилизованная мальтоза); 2) галактозоспецифические (иммобилизованная лактоза); 3) N-ацетилгалактозаминспецифические (иммобилизованный N-ацетил-D-галактозамин); 4) N-ацетилглюкозаминспецифические (иммобилизованные N-ацетил-D-глюкозамин и хитотриоза); 5) L-фукозоспецифические (иммобилизованная фукоза). Синтез осуществляли по следующим схемам (I, II и III):



Полученный сорбент с частично деацелированной хитотриозой (7) предназначался для выделения N-ацетилглюкозаминспецифических лектинов.

Некоторые характеристики синтезированных сорбентов приведены в таблице I.

Таблица I
Характеристика гликозилсферонов

Гликозилсферон	Содержание азота, ммоль/г	Содержание углеводов, ммоль/г	Емкость по лектинам, мг/г
Мальтомил-СФ(1)	1,5	1,5	40 (Con A) 36 (PSA)
Лактомил-СФ(2)	1,5	1,1	40 (PNA) 16 (SBA) 27 (RCA)
N-ацетил-D-галактозамин-СФ(3)	0,9	-	16 (SBA) 1,0 (PNA)
N-ацетил-D-глюкозамин-СФ(4)	0,9	-	43 (WGA)
L-фукозил-СФ(5)		0,7	-
Хитоолигосахарид-СФ(7)	9,9	-	50 (WGA)

Сорбент (7) с хитотриозой включен в схему очистки лектина зародышей пшеницы. Лектин очищали по следующей схеме: зародыши пшеницы (отходы производства) - обезжиривание гексаном - измельчение и экстракция 0,5M муравьиной кислотой - осаждение сульфатом аммония (40% насыщения) - аффинная хроматография на гликозилсфероне - гель-фильтрация на сефадексе G-75 - лиофильное высушивание препарата лектина. Лектин зародышей пшеницы, гомогенный по данным электрофореза в ПААГ, получили с выходом 160 мг/кг зародышей.

Аналогично аффинный сорбент на основе лактозы (2) был использован для получения гомогенного лектина клещевины по следующей схеме: семена клещевины - удаление кожуры - измельчение и экстракция 0,1M соляной кислоты - осаждение

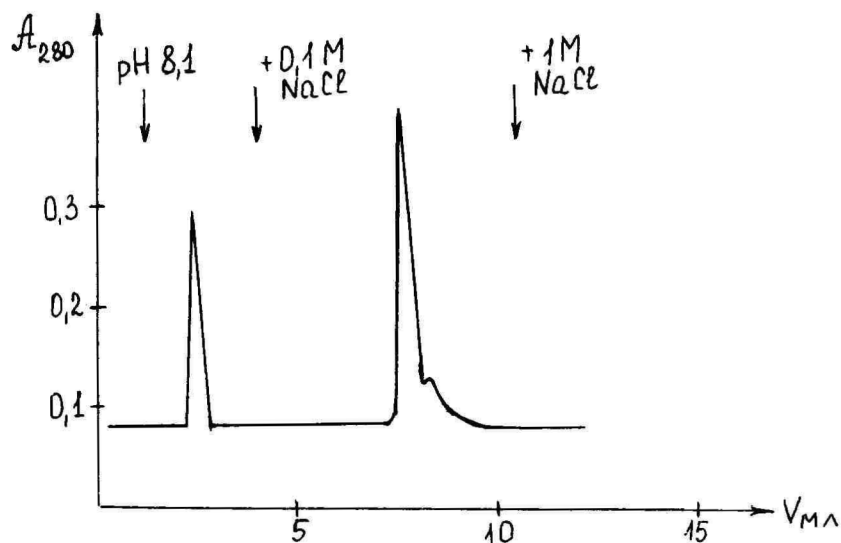


Рис. 1. Хроматография лектина пшеницы на сорбенте (8) в медной форме

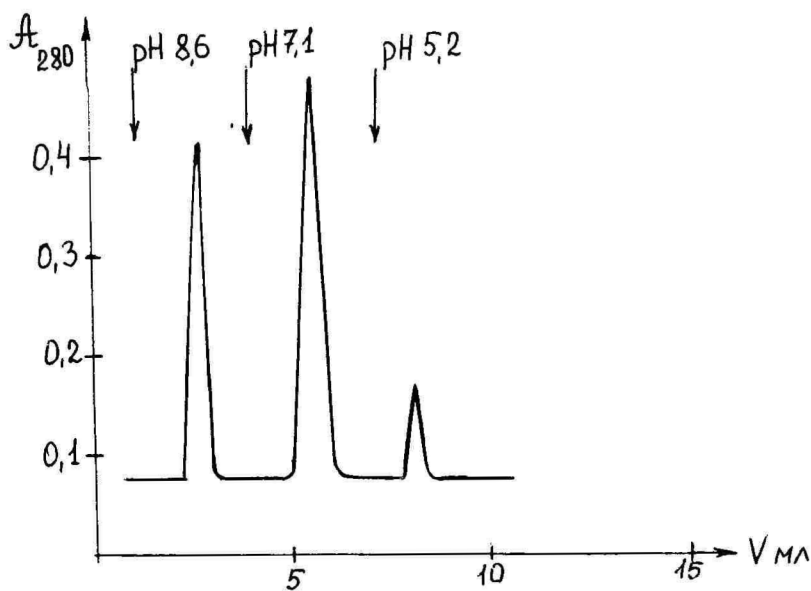


Рис. 2. Хроматография лектина пшеницы на сорбенте (9) в медной форме

сульфатом аммония (70% насыщения) – аффинная хроматография на гликозилсфероне – гель-фильтрация на сефадексе G-150 – лиофильное высушивание препарата лектина. Выход лектина кле-щевины составил 70 мг/г белка (после осаждения сульфатом ам-мония). Характеристики полученных лектинов приведены в таб-лице 2.

Таблица 2

Характеристика лектинов

Лектин	Молеку- лярный вес (кД)	Субъеди- ниц, (кД)	A ₁ % 280	Титр лектиновой актив- ности (мкг/мл)	
				Эц кролика	Эц человека
WGA	36	2 x 18	15,0	I	10
RCA	120	2 x 29			
		2 x 31	11,7	0,3	4

Как известно, многие лектины существуют в виде несколь-ких изоформ. Так, лектин из зародышей пшеницы содержит три изолектина. Изолектины неразличимы по способности агглютини-ровать эритроциты человека, имеют сходные молекулярные массы и изоэлектрические точки. Для разделения лектина из зароды-шей пшеницы на изоформы мы использовали метод лигандообмен-ной хроматографии. В качестве сорбента применяли сферон, мо-дифицированный группировками триэтилететрамина (8) и имино-диуксусной кислотой (9), заряженными ионами меди (2+). На рисунках 1 и 2 приведены кривые ступенчатой элюции изолекти-нов. Очевидно, что в данном случае использование сорбента с иминодиацетатными группировками более эффективно и приводит к полному разделению всех трех изоформ.

Таким образом получены сорбенты, которые могут быть с успехом использованы для очистки практически важных лекти-нов; показана возможность разделения лектинов на изоформы методом лигандообменной хроматографии.

НОВЫЙ N-АЦЕТИЛ-D-ГАЛАКТОЗАМИНСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЛЕКТИН
ЩИРИЦЫ ХВОСТАТОЙ (*AMARANTHUS CAUDATUS* L.)

А.В. Гайда, В.А. Антонюк
Львовский НИИ гематологии и переливания крови,
Львовский ордена Дружбы народов
государственный медицинский институт

Первое упоминание о наличии лектинов в семенах щирицы хвостатой (*Amaranthus caudatus* L.) имеется в работе Boyd W., Requena R. /6/, однако этот лектин до сих пор не был получен в чистом виде. Нами было обнаружено, что экстракт из семян этого растения агглютинирует нативные эритроциты человека в высоком титре, но в то же время не агглютинирует эритроциты человека, обработанные папаином /3/. С подобным фактом мы встретились впервые при исследовании большого числа высших растений. Как правило, лектины значительно лучше агглютинируют эритроциты, обработанные протеолитическими ферментами, чем нативные.

Целью настоящей работы явилась разработка методики получения лектина из семян растений, изучение его физико-химических и иммунохимических свойств и возможностей практического использования для очистки гликопротеидов сыворотки крови.

Материалы и методы исследования

Щирица хвостатая - однолетнее, быстро растущее, мощное ветвистое растение высотой 90-150 см. Родина - тропическая Африка и Азия. В СССР широко культивируется на Украине, Северном Кавказе, в республиках Средней Азии, реже в Прибалтике как декоративное растение /1/, в степных районах Украины иногда встречается в диком виде /4/.

Сырьем для получения лектина являлись семена, полученные из растений, выращенных на кафедре фармакогнозии Львовского мединститута. Семена мелкие, круглые, блестящие, почти черного цвета. Масса 1000 семян - 0,65 г. Из одного растения можно получить до 100 г семян.

Очистка лектина. Семена измельчали на электрической мясорубке до частиц с диаметром меньше 0,25 мм. Измельченные семена экстрагировали 2 часа 0,9% раствором натрия хлорида при непрерывном перемешивании. Полученный экстракт отжимали через плотную ткань и центрифугировали при 3000 г в течение 10 мин. Лектин из надосадочной жидкости очищали с помощью аффинной хроматографии.

Гель для аффинной хроматографии получали из сваренных вкрутую куриных яиц отделением белка от желтка и размалыванием белка до частиц 0,1-0,25 мм в диаметре. Полученный гель можно хранить в холодильнике при 4°C в присутствии 0,03% раствора мертиолата на протяжении трех месяцев, использовать многократно. Как было обнаружено ранее, лектин не может быть очищен на сефарозе и частично подвергнутой гидролизу сефарозе. Из гликопротеидов куриного яйца лектин сильно взаимодействует с овомуцином, но не с другими яичными гликопротеидами. В частности, он не может быть очищен на овогеле, предложенном М.Д. Дудиком /2/.

Аффинной колонки объемом 300 мл (полученной из 8 куриных яиц) достаточно для сорбции лектина из 200 г семян. Экстракт семян пропускали медленно, со скоростью не более 100 мл в час. После пропускания экстракта колонку промывали 0,05 М ацетатным буферным раствором с 0,2 М хлорида натрия, pH 6,0-6,5. Снятие лектина с колонки проводили 0,3 М боратным буфером, pH 8,8-9,2. Фракции, содержащие лектин, объединяли и белок высаливали сульфатом аммония при 80% насыщения соли. Образовавшийся осадок после удаления избытка соли на воронке Бюхнера растворяли в 0,1 М фосфатном буферном растворе с 0,5 М хлорида натрия (pH 6,5), далее очищали на сефадексе G-75. Очищенный лектин рекомендуем хранить под сульфатом аммония, так как после лиофильной сушки наблюдается частичная потеря растворимости. Выход лектина - 250-300 мг из 1 кг семян, что составляет 75-90% от теоретически возможного.

Аналитические методы. Анализ белка на всех стадиях очистки проводили по методу /8/. Активность лектина оценивали по титру гемагглютинации эритроцитов человека группы А(II). Специфичность к углеводам определяли с помощью реакции угнетения гемагглютинации гаптенами /3/. Частоту полученных пре-

паратов оценивали по данным диск-электрофореза в ПААГ в кислой (рН 4,3) и щелочной (рН 8,6) буферных системах. Количественное определение углеводов в лектине проводили на основе реакции с фенол-серной кислотой /7/. Изoeлектрическую точку определяли по методу минимума коагулоустойчивости /5/. Определение аминокислотного состава осуществляли на приборе "Bioscal BC-200".

Получение иммобилизованных препаратов конканавалина А и лектина семян щирцы хвостатой. 2 г носителя для активации белков "Диасорб А" (диаметр частиц 0,1-0,25 мкм, диаметр пор 50 нм, кооператив "Діагностикум") промывали 3 раза по 10 мл 0,1 М боратным буферным раствором, рН 8,0, декантировали и добавили в раствор 30 мг конканавалина А в 30 мл исходного буферного раствора или 100 мг лектина щирцы хвостатой в 70 мл того же буферного раствора. Иммобилизацию проводили в течение 24 ч при 20°C, после чего сорбенты промывали исходным буферным раствором, а затем буферным раствором, содержащим 1 М хлорида натрия. Включение лектинов (по разности количества белка до и после иммобилизации) составило 12 и 40 мг/г сорбента соответственно.

Проведение хроматографии на иммобилизованных лектинах. Полученные сорбенты переносили в стеклянные колонки (1,0 x 7,0 см) и промывали 0,1 М фосфатным буферным раствором с 0,15 М NaCl, рН 7,6. На каждую колонку наносили по 2 мл нормальной сыворотки крови человека, диализованной против уравнивающего буферного раствора или по 3 мл (18 мг белка) концентрата IgG кролика, или по 15 мл фракции II + III по Кону донорской плазмы человека (12,5 г фракции в 100 мл 0,1 М трис-HCl, 0,15 М NaCl, 5% ПЭГ 4800, рН 8,0). Колонки промывали исходным буферным раствором, затем 0,1 М глицин-HCl, рН 2,5. Собирали фракции по 3 мл, в которых определяли концентрацию белка. Полученные белки анализировали методом электрофореза в градиентном (5-10%) полиакриламидном геле в системе Лэммли. Фибринолитическую активность полученных фракций определяли после активации стрептокиназой по гидролизу азофирина (кооператив "Діагностикум").

Результаты и обсуждение

Лектин, полученный путем лиофильной сушки, представляет собой белый аморфный порошок, хорошо растворимый в водно-солевых растворах. По данным диск-электрофореза в ПААГ, в кислой (рН 4,3) и щелочной (рН 8,6) буферных системах полученный продукт гомогенен. При электрофорезе в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия обнаруживаются зоны с молекулярной массой 25 и 10 кД. Определение молекулярной массы гелехроматографией на сефадексе G-100 дало значение 68 ± 1 кД. Очевидно, молекула лектина – тетрамер, состоящий из двух типов субъединиц. В аминокислотном составе много аспарагиновой и глутаминовой кислот, лизина и лейцина (таблица I).

Таблица I

Аминокислотный состав лектина семян шрицы хвостатой

Аминокислота	Остатков на I молекулу	В % к общему
Лизин	64	9,4
Гистидин	13	2,0
Аргинин	17	2,5
Цистеин	8-10	1,3
Аспарагиновая кислота	128	19,0
Треонин	40	6,0
Серин	50	7,0
Глутаминовая кислота	68	10,0
Пролин	13	2,0
Глицин	40	6,0
Аланин	31	4,6
Валин	52	7,6
Метионин	4	0,6
Изолейцин	30	4,4
Лейцин	58	8,0
Тирозин	32	4,7
Фенилаланин	34	5,0

Полученный продукт - гликопротеид, содержащий в своем составе 2,0±0,5% углеводов, ИЭТ лежит в пределах рН 7,2-7,4. Лектин выдерживает нагревание до 65°C, денатурирует при осаждении ацетоном. 1%-ный раствор лектина агглютинирует эритроциты человека А(II) группы в титре 1:4084, крысы, мыши и лягушки соответственно 1:1024, 1:512, 1:4. Углеводная специфичность представлена в таблице 2.

Таблица 2

Углеводная специфичность лектина семян щиряцы хвостатой

Углевод или гликозид	Минимальная концентрация углевода, угнетающая активность 4 агглютинирующих ед. лектина
N -ацетил- D-галактозамин	12,5
D -лактоза	100
Мономицин	50
Неомицин	100

Лектин не взаимодействовал в концентрации 100 мМ и ниже со следующими углеводами: α- и β-метил- D-галактопиранозиды, 4-нитрофенил-β- D-галактопиранозид, рафиноза, L- и D-рибоза, мелибиоза, D-галактоза, L-фукоза, N-ацетил- D-глюкозамин, D-манноза, D-глюкоза, а также с тиреоглобулином в 0,5% концентрации, хондроитинсульфатом в 1,6%, галактоманнаном из пажитника сеного в 0,5% концентрации.

В то же время данные хроматографии на иммобилизованных лектинах показывают, что лектин щиряцы хвостатой и конканавалин А обладают примерно одинаковой связывающей способностью, причем сорбируют из различных фракций донорской крови практически одни и те же белки (рис. I). Так, из сыворотки крови извлекаются белки, соответствующие по молекулярной массе плазминогену (90 кД) и высокомолекулярные белки с молекулярной массой 150 кД; из концентрата IgG - иммуноглобулиновая фракция и белки, соответствующие плазминогену (90 кД); из экстракта фракции II + III по Кону - высокомолекулярные белки (молекулярная масса 150 кД, вероятно, липопротеиды) и белки, соответствующие по молекулярной массе плазминогену.

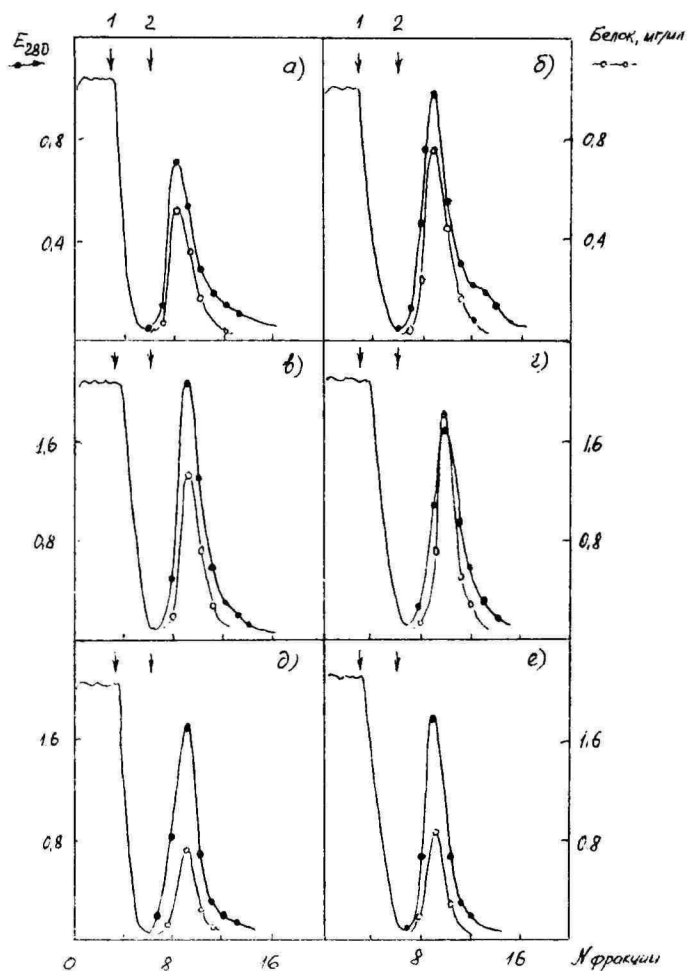


Рис. 1. Хроматография различных фракций донорской крови на конканавалин А- (а, в и д) и лектин церицы-силохроме (б, г. и е). Наносили сыяротку человека (а и б), экстракт фракций II + III по Кону (в и г) и концентрат иммуноглобулинов кролика (д и е). Стрелками указана смена элюирующего буферного раствора: № I - исходный буферный раствор, 2 - 0,1 М глицин-НСI, рН 2,5.

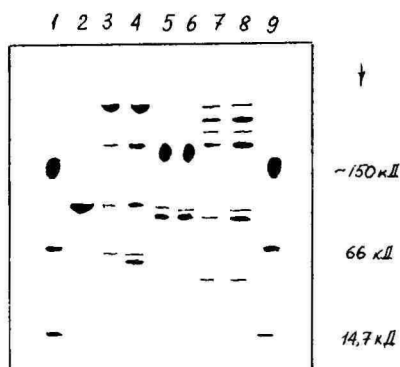


Рис. 2. Анализ чистоты полученных белковых фракций электрофорезом в полиакриламидном геле (градиент концентрации 5-10%). В лунки наносили: 1,9 - смесь маркерных белков (IgG, бычий сывороточный альбумин, лизоцим); 2 - плазминоген человека; 3,5 и 7 - фракции, полученные при хроматографии сыворотки, концентрата иммуноглобулинов кролика и экстракта фракции П-Ш по Кону на конканавалин-А-силохроме; 4,6 и 8 - аналогичные фракции, полученные на лектин ширицы-силохроме. Стрелкой указано направление электрофореза.

Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что конканавалин А и лектин ширицы хвостатой обладают довольно выраженной схожестью при взаимодействии со сложными углеводными структурами. Вероятно, центр связывания углеводов лектина ширицы хвостатой комплементарен к более сложному углеводу, чем N-ацетил-D-галактозамин. Лектин может быть полезен при извлечении и очистке некоторых белков плазмы крови, в частности, IgG и плазминогена. Действительно, во фракциях белков, полученных при хроматографии экстракта фракции П + Ш по Кону, обнаруживается (после активации стрептокина-

зой) фибринолитическая активность, соответствующая очистке плазминогена в 22,5-30 раз.

Л и т е р а т у р а

1. Головкин Б.Н., Китаева Л.А., Немченко Э.П. Декоративные растения СССР. - М.: Мысль, 1986. - 320 с.

2. Луцик М.Д. Новый аффинный сорбент для очистки лектинов и его применение для очистки агглютинаина из зародышей пшеницы // Укр. биохим. журн. - 1984. - Т. 56, № 4. - С.432-436.

3. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Антонюк В.А. и др. Методы исследования углеводной специфичности лектинов: Методические рекомендации. - Львов, 1983. - 20 с.

4. Определитель высших растений Украины/Доброчаева Д.Н., Котов М.И., Прокудин Ю.Н. и др. - Киев: Наукова думка, 1987. - 548 с.

5. Савронь Е.С., Воронянский В.И., Киселевич Г.И. и др. Практикум по биохимии животных. - М.: Высшая школа, 1967. - 240 с.

6. Boyd W., Requera R. Hemagglutinating substances in various plants // J. Immunol. - 1949. - Vol. 62. - P. 333-339.

7. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton I.K. et al. Colorimetric method for demonstration of sugar and related substances // Anal. Chem. - 1956. - Vol. 28. - P. 350-356.

8. Read S.M., Northcote D.H. Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein // Anal. Biochem. - 1981. - Vol. 116. - P. 53-64.

ПРЕПАРАТИВНОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОЛЕКТИНОВ ИЗ ЗАРОДЫШЕЙ ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ВЭЖХ)

В.Е. Пискарев, В.М. Лахтин

Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского АН СССР,
Институт биохимии им. А.Н. Баха АН СССР, Москва

В настоящее время резко возросло число публикаций, посвященных различным аспектам исследования лектинов /1/. Рас-

тет список коммерчески доступных лектинов. Однако изолектины с различной специфичностью и неодинаковым биологическим действием пока еще малодоступны.

Агглютинин из зародышей пшеницы (АЗП) может быть получен из отходов мукомольного производства с большим выходом (более 0,5 г/кг сырья при использовании иммобилизованных белков куриного яйца /1, 4/. Аффинно очищенный АЗП представляет собой смесь изолектинов /9, 10/, различающихся между собой по физико-химическим свойствам, аминокислотной последовательности и другим признакам /5, 11/. Целью данной работы было создание препаративного метода получения изолектинов из ряда аффинно очищенных препаратов АЗП с помощью ВЭЖХ.

Материалы и методы

Использовали аффинно очищенные препараты АЗП производства Chemapol (ЧССР) и Pharmacia (Швеция). Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке Mono S HR 5/5 в системе FPLC (Pharmacia), а препаративную ВЭЖХ - на хроматографе Waters (США) с колонкой Protein PAK SP-SPW (150 мм x 21,5 мм) (Тоyo Soda, Япония). Белок определяли по оптической плотности изолектинов при 280 нм ($A_{1\%}^{1\text{см}}$): 17,0 (АЗП-1), 16,0 (АЗП-2) и 15,0 (АЗП-3) /7/.

Геммагглютинацию фиксированных глутаровым альдегидом эритроцитов, а также ее ингибирование углеводами, проводили, как /3/. Использовали N-ацетил-D-глюкозамин (Fluka, Швейцария) и хитобиозу, полученную из гидролизата хитина.

Углеводы определяли методом Дюбуа и соавт. /6/.

Электрофорез проводили по методу Лэммли /8/. Препараты изолектинов предварительно кипятили 5 мин в 2,5% додецилсульфате и 5% меркаптоэтаноле.

Результаты

В работе использовали сорбенты с сульфопропильными группами. В аналитическом варианте при нанесении 0,15 мг АЗП на колонку Mono S HR5/5 (объемом 1 мл сорбента) разделение изолектинов достигалось за 30 мин (рис. 1).

В препаративном варианте на колонку TSK-5PW (150 x 21,5 мм) наносили 100-800 мг препарата АЗП (рис. 2). Во всех слу-

чаях достигалось полное разделение изолектинов.

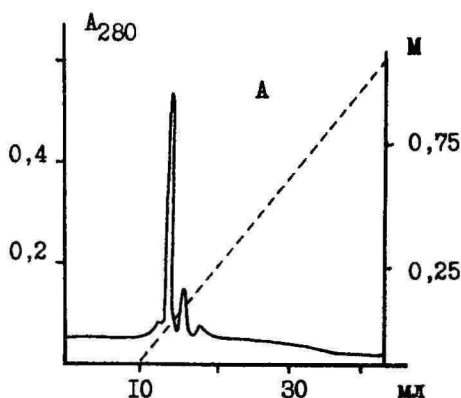


Рис. 1. Аналитическая ВЭЖ агглютинаина из зародышей пшеницы (Сhemapol, ЧССР) на колонке Mono S HR 5/5. Образец: 0,2 мл АЗП (0,7 мг/мл) в 20 мМ ацетатном буфере pH 3,5. Элюцию проводили градиентом 0-1 М NaCl в том же буфере. Регистрация A_{280} .

Соотношение изолектинов в препаратах АЗП представлено в таблице I. Некоторое варьирование относительного содержания изолектинов, по-видимому, объясняется зависимостью от сырьевого источника лектинов /9, 10/.

Таблица I

Содержание изолектинов в препаратах АЗП, %

Препараты АЗП	АЗП-1	АЗП-2	АЗП-3
Pharmacia (Швеция)	48,1	36,2	15,7
Сhemapol (ЧССР)	46,5	35,0	18,5
	45,9	36,1	18,0
	47,5	37,1	15,4
	37,4	39,3	23,3
препарат Луцика /3/	33,4	35,7	30,9

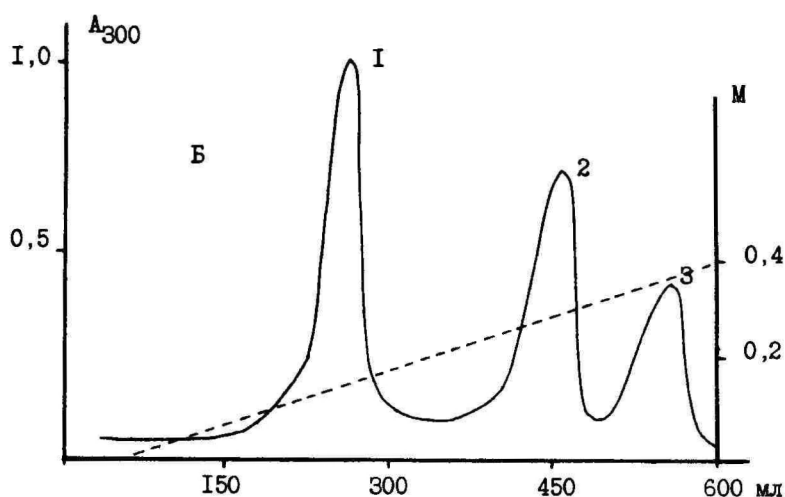


Рис. 2. Препаративная ВЭЖХ агглютинина из зародышей пшеницы (Chemapol, ЧССР) на колонке Protein Pak SP-5PW (Тоуо Сода, Япония). Образец: 800 мг АЗП в 2 мл 20 мМ ацетатного буфера рН 4,0. Элюция градиентом 0-0,4 М NaCl в том же буфере, скорость элюции 5 мл/мин. Детекция белка при 300 нм.

Очищенные изолектины были гомогенными по данным электрофореза, не содержали углеводов и были сходными по способности агглютинировать различные эритроциты (таблица 2). Изолектины, однако, различались по данным ингибирования агглютинации эритроцитов углеводами (таблица 3).

Таблица 2

Гемагглютинирующая активность изолектинов пшеницы (титр, мкг/мл)

Тип эритроцитов	АЗП-1	АЗП-2	АЗП-3
Н-группа крови человека	10	10	10
А-группа крови человека	8	8	8

Продолжение табл.2

Тип эритроцитов	АЗП-1	АЗП-2	АЗП-3
В-группа крови человека	6	6	6
Кровь морских свинок	12	12	12
Эритроциты кролика*	6	4	4
Эритроциты мышей*	2	1	1

Примечание: * трипсинизированные эритроциты.

Таблица 3

Ингибирование агглютинации трипсинизированных эритроцитов мыши углеводами (мМ). Изолектины использовали в количестве, соответствующем двум гемагглютинирующим единицам

У г л е в о д ы	АЗП-1	АЗП-2	АЗП-3
N-ацетил- D-глюкозамин	5	2	3
хитобиоза	0,16	0,04	0,02

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. - Т. 2. - М.: ВИНТИ, 1987. - 290 с.
2. Лахтин В.М., Мосолов В.В., Маслова Н.П. Авт. свид. № 1161111, 1985 // Булл. изобретений. - 1985.- № 22.- С. 34.
3. Лахтин В.М., Мосолов В.В. // Практические методы современной биохимии. - М.: Наука, 1988. - С. 102-108.
4. Луцик М.Д. // Укр. биохим. ж. - 1984. - Т. 56, № 4. - С. 432-436.
5. Allen A.K., Neuberger A., Sharon N. // Biochem. J.- 1973. - Vol. 131. - N 1. - P. 155-162.
6. Dubois M., Giller K.A., Hamilton J.K., Roberts P.A., Smith F. // Anal. Chem. - 1956. - Vol. 28. - P. 350-356.
7. Goldstein I.J., Poretz R.D. // Lectins: Properties ,

Functions, and Application in Biology and Medicine, Eds Lie-
ner I.E. et al. Acad. Press. Orlando et al. - 1986. - P. 35-
247.

8. Laemmli U.K. // Nature. - 1971. - Vol. 227. -N 5259.-
P. 680-685.

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

10. Rice R.H. // Biochem. Biophys. Acta. - 1976. - Vol.
444. - P. 175-180.

11. Wright C.S., Olafsdottir S. // J. Biol. Chem.- 1986.-
Vol. 261. - N 16. - P. 7191-7195.

ЛЕКТИНПРОДУЦИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ *BACILLUS MEMENTERICUS*

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

Ограниченное количество отечественных источников получе-
ния лектинов с разнообразной углеводной специфичностью вы-
звало необходимость поиска новых продуцентов лектинов, в том
числе и среди бактерий. Из известных к настоящему времени
лектинов, бактериальные наименее изучены /3/. В особенности
это касается так называемых лектинов "свободного типа" (или
внеклеточных), выделяющихся в среду в процессе жизнедеятель-
ности микроорганизмов, функциональная роль которых по-преж-
нему остается неизвестной.

Сведения о закономерностях биосинтеза бактериальных лек-
тинов весьма ограничены, а данные о физиологических особен-
ностях бактерий - продуцентов лектинов, в частности, пред-
ставителей широко распространенного в природе рода *Bacillus*,
отсутствуют.

Нами проведено исследование лектинпродуцирующей активнос-
ти, а именно: особенностей образования и характеристики
внеклеточных лектинов одного из представителей этого рода -
Bacillus mesentericus (subtilis), известного ранее в каче-

стве продуцента комплекса гидролитических ферментов /1/. Изучение динамики накопления лектинов *B. mesentericus* при росте культуры в периодическом режиме на средах с 0,1% мальтозой и 0,5% глюкозой позволило выявить наличие двух временных максимумов лектиновой активности в культуральной жидкости, не зависящих от температуры культивирования: в начале стационарной фазы роста I максимум - (14-18 ч) и в начале фазы отмирания культуры - II максимум (30-36 ч роста) /2/. При определении углеводной специфичности препаратов лектинов, полученных на ранних и поздних стадиях развития культуры (I и II максимумы лектиновой активности культуральной жидкости соответственно) с использованием для ингибиторного анализа 38 углеводов, было установлено, что активность обоих препаратов не ингибируется простыми моно-, ди-, и трисахаридами. Оба препарата специфичны к производным D-глюкозы и D-галактозы, а также к фруктозо-1,6-бисфосфату (таблица I).

Таблица I

Углеводная специфичность препаратов лектинов, полученных осаждением серноокислым аммонием культуральной жидкости *Bacillus mesentericus*

Среда культивирования	Возраст культуры, часы роста	Минимальная ингибирующая доза, ммоль			
		галактозамин	глюкозамин	глюкуроновая кислота	фруктозо-1,6-бисфосфат
I	2	3	4	5	6
Минеральная среда с 0,1% мальтозой	16-18 ч; I-й максимум лектиновой активности культуральной жидкости	18,75	2,34	3,75	0,07
	36-48 ч; II-й максимум лектиновой активности	150	75	-	18,75

Продолжение табл. I

I	2	3	4	5	6
Минеральная среда с 0,5% глюкозой	I-й максимум лектиновой активности	7,5	7,5	75	3,75
	30-32 ч; II-й максимум лектиновой активности культуральной жидкости	75	37,5	-	18,75

Примечание: "-" - отсутствие ингибирования.

При этом лектины, синтезируемые на ранних стадиях развития культуры, характеризуются более выраженной специфичностью, что отражается в более высокой степени угнетения реакции геммагглютинации углеводами.

Можно предположить, что широкая специфичность лектинов *V. mesentericus* к вышеуказанным углеводам обусловлена наличием нескольких лектинов, которые присутствуют в клетке и выделяются в среду как внеклеточные на ранних стадиях развития или на поздних стадиях в результате автолиза клеток.

Поскольку лектины являются углеводсвязывающими белками, резонно предположить наличие взаимосвязи между присутствием в среде определенного углевода, его концентрацией и лектин-продуцирующей активностью культуры, а также специфичностью синтезируемых лектинов. Нами было установлено, что из 10 исследованных углеводов - простых моно-, ди- и трисахаридов - только при росте культуры на средах с глюкозой, галактозой, арабинозой, ксилозой и рамнозой отмечался синтез лектинов (рН среды - 7,0). При этом замечена индивидуальная для каждого углевода зависимость удельной лектиновой активности от концентрации источника углерода (рис. I). Максимальная удельная лектиновая активность при росте на средах с 0,2% ксилозой и 0,2% галактозой составляла 42 и 29 титр⁻¹/мг белка в I мл культуральной жидкости соответственно, для достижения же уровня удельной лектиновой активности 42 титр⁻¹/мг

белка в 1 мл культуральной жидкости требовалась более высокая концентрация рамнозы в среде (1%).

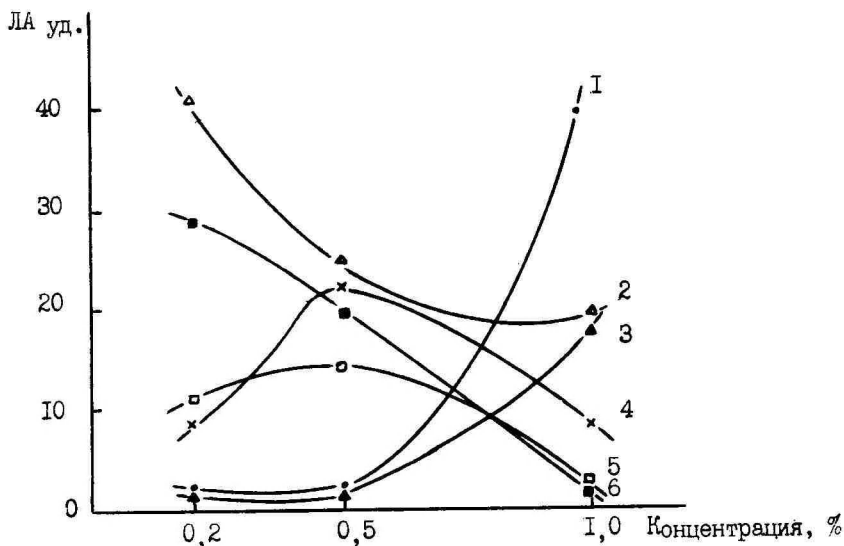


Рис. 1. Лектиновая активность культуральной жидкости *Bacillus mesentericus* при росте продуцента на средах, содержащих: 1 - рамнозу; 2 - ксилозу; 3 - арабинозу; 4 - глюкозу; 5 - мальтозу; 6 - галактозу.

Примечание: при росте продуцента на средах с сахарозой, лактозой, раффинозой, фруктозой и маннозой в исследуемых концентрациях лектиновая активность культуральной жидкости не обнаружена.

ЛА_{уд.} - удельная лектиновая активность - титр⁻¹/мг белка в 1 мл культуральной жидкости.

Сравнительный ингибиторный анализ препаратов лектинов, полученных осаждением сернокислым аммонием культуральной жидкости *B. mesentericus*, выращенной на средах с различными углеводами, показал, что качественный состав углеводов в

среде не оказывает влияния на специфичность синтезируемых культурой лектинов: для всех препаратов характерно высокое сродство к фруктозо-1,6-бифосфату (минимальная ингибирующая доза 0,29-9,37 мМоль) и в значительно меньшей степени - к Д-глюкозамину, Д-галактозамину и Д-глюкуроновой кислоте (минимальные ингибирующие дозы на уровне неспецифичности - 37,5-150 мМоль (таблица 2). Однако, мы предполагаем, что внесением различных источников углерода можно регулировать количественное соотношение продуцируемых бактериями лектинов.

Таблица 2

Углеводная специфичность препаратов лектинов, полученных при росте *Bacillus mesentericus* на средах с различными углеводами

У г л е в о д	Минимальная ингибирующая доза, мМоль			
	галактоз-амин	глюкоз-амин	глюкуро-новая кислота	фруктозо-1,6-би-фосфат
Мальтоза 0,1% (контр. среда)	150	75	-	18,75
Глюкоза, 0,5%	75	37,5	-	18,75
Галактоза, 0,2	75	37,5	37,5	4,69
Рамноза, 1%	-	150	75	9,37
Ксилоза, 0,2	-	-	-	0,29
Арабиноза, 1,0%	-	37,5	150	9,37

Примечание: Возраст культуры - 48 часов; "-" - отсутствие ингибирования.

Оптимизация содержащей глюкозу среды культивирования позволила получить дальнейшее повышение удельной лектиновой активности культуры, которое не уступает активности при росте продуцента на средах с 0,2% ксилозой и 1% рамнозой. Использование глюкозы в качестве компонента питательной среды способствует увеличению лектинпродуцирующей активности культуры, преимущественному накоплению лектинов в культуральной жидкости, что является весьма перспективным в производственных процессах получения бактериальных внеклеточных лектинов.

Л и т е р а т у р а

1. Бондарчук А.А., Ажицкий Г.Ю. Характеристика ферментативного комплекса *V. mesentericus* // Микробиол. журн. - 1981. - 43, № 6. - С. 687-690.

2. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.А. Влияние факторов внешней среды на биосинтез лектинов *Bacillus mesentericus* // Микробиол. журн. - 1988. - 50, № 2. - С. 12-16.

3. Mirelman D. Microbial lectins and agglutinins // Wiley, New York, 1986. - 443 p.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА ЛЕКТИНА ИЗ ГЕНЕРАТИВНЫХ ОРГАНОВ КОРОВЫ

Н.П. Галаган, В.И. Богомаз

НТК Институт химии поверхности АН УССР, г. Киев

Использование лектинов для создания различных эффективных средств, необходимых в биотехнологических процессах, связывается, в первую очередь, с разработкой методов их получения и очистки.

Основная часть работ по лектинам охватывает в качестве источника сырья главным образом растительный материал /2,4/. Значительно меньше исследований проведено с тканями животных /5/.

В последнее время появились сообщения о получении лектинов (агглютининов) из репродуктивных органов животных /6, 7, 9/. Было установлено, что они могут иметь разные терминальные углеводы в зависимости от физиологического состояния организма. Этот факт является определяющим в проявлении их свойств.

Благодаря исследованиям по получению агглютининов из маток крыс, и изучению их свойств было высказано предположе-

ние о роли этих веществ в процессах, происходящих на поверхности репродуктивных клеток в генеративных органах /6, 7/. Полученные разными авторами данные /I, 6, II/ дают основание предполагать, что такие лектины играют особую роль в процессах подготовки и активации гамет к оплодотворению. В связи с этим получение лектинов из репродуктивных органов продиктовано необходимостью создания препаратов, регулирующих активность репродуктивных клеток, что важно как для животноводства, так и для медицины.

СССР пока не производит коммерческих препаратов таких лектинов, поэтому разработка технологий их получения и очистки является очень актуальной задачей. В лабораторных условиях для очистки этих полимеров используют, как правило, аффинные сорбенты, которые являются предметом импорта, поэтому они недоступны и мало технологичны в условиях производства.

НГК Институт химии поверхности АН УССР располагает высокодисперсными неорганическими оксидами, в частности высокодисперсным кремнеземом, которые могут быть использованы в качестве средства для очистки различных смесей биомолекул.

Высокодисперсный кремнезем представляет собой обработанную в специальном термическом режиме двуокись кремния, с хорошими адсорбционными качествами по отношению к биополимерам и высокоразвитой поверхностью, способной к модификации различными функциональноактивными лигандами. Химически привитые к поверхности такого диоксида кремния органические, неорганические и металлокомплексные соединения позволяют получать модифицированные кремнеземы, обладающие селективными свойствами /3/. Физико-химические свойства кремнеземов, их технологичность и доступность явились основанием для их использования в очистке неочищенного препарата лектина.

С этой целью из матки коровы получали неочищенный препарат лектина. Ткань доставлялась в лабораторию в охлажденном состоянии. Экстракцию проводили после гомогенизации ткани в одном из перечисленных растворов. Для извлечения лектина использовали трис-НСI-буфер, дистиллированную воду, 0,14 М NaCl pH 7,6, 0,1 н. HCl с различными сроками и температурным режимом экстракции. Наиболее оптимальным вариантом является применение 0,1 н. HCl. Экстракт представляет собой неочищен-

ный препарат лектина и проявляет агглютинирующую способность по отношению к эритроцитам группы крови АВО. В нем определено содержание белка /10/, углеводов /8/ и углеводсодержащих полимеров, имеющих в качестве терминального участка N-ацетилнейраминовою кислоту (N-АНК). По концентрации N-АНК /12/ в гидролизате препарата определено их количество. Концентрация N-АНК-содержащих компонентов неочищенного препарата лектина составляет 41,6 мкг/мл, белка - 9 мг/мл. Титр агглютинации 2^{10} . При более низкой температуре обработки ткани можно повысить титр агглютинации на два порядка.

Для частичной очистки препарата лектина использовали высокодисперсные кремнеземы I и II, несущие на поверхности -ОН-группы.

В связи с этим изучена их адсорбционная способность по отношению к фракции белков, для чего были приготовлены серии растворов с постоянным содержанием диоксида кремния и переменным содержанием препарата по белку. После контакта неочищенного препарата лектина с высокодисперсным кремнеземом в течение двух часов при комнатной температуре в надосадочной жидкости определяли неадсорбированное на матрице количество белка и ее агглютинирующую способность.

Доказано, что в условиях эксперимента можно добиться практически полного связывания белков неочищенного препарата лектина. Установлено (рис.), что при этом адсорбционная способность кремнезема I выше по отношению к белкам, чем II.

Используя кремнезем в качестве средства для очистки полученного лектина, удалось добиться повышения агглютинирующей способности препарата. Для N-АНК-содержащих компонентов отмечена наибольшая эффективность связывания с кремнеземом II при контакте с ним препарата лектина в течение I часа при комнатной температуре.

Степень связывания кремнеземами I и II белков и N-АНК-содержащих компонентов неочищенного препарата лектина из матки крыс зависит от температуры проведения эксперимента и времени контакта носителя и исследуемого раствора.

Использованием высокодисперсных кремнеземов удалось добиться частичной очистки препарата. Критерием эффективности процесса служили изменение концентрации указанных выше веществ и агглютинирующая способность препарата.

С мг белка,
связанного кремнезёмом

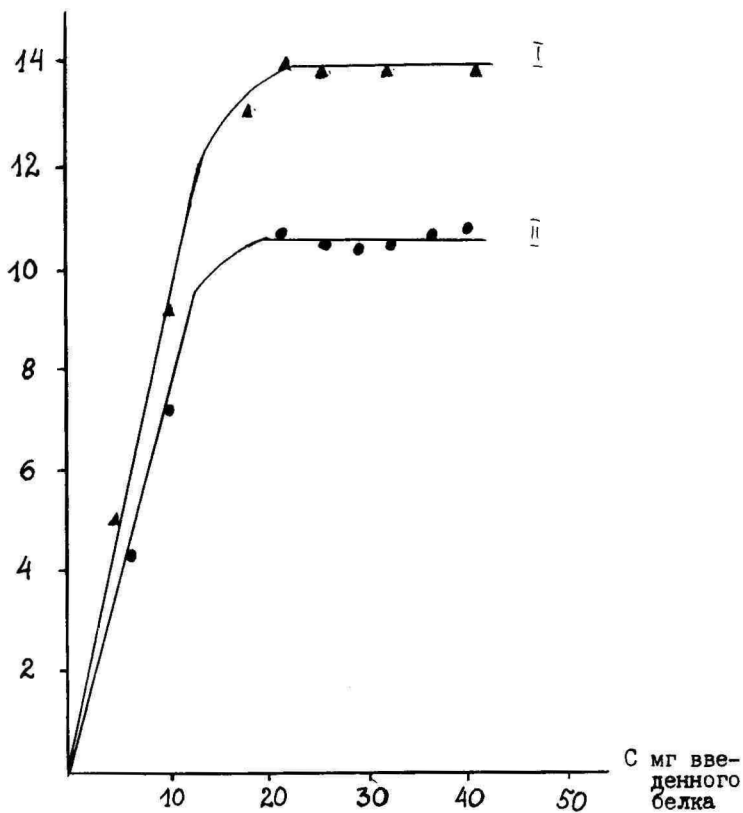


Рис. Адсорбционная способность высокодисперсных кремнезёмов I и II по отношению к белкам неочищенного препарата лектина, полученного из матки коровы.

Л и т е р а т у р а

1. Голинська С.Л. // Укр. ботан. ж. - 1983. - XI, № 2. - С. 11-20.
2. Лахтин В.М. // Итоги науки и техники. Биотехнология. - М.: ВНИИТИ. - 1987. - 2. - С. 1-288.
3. Лисичкин Г.В., Кудрявцев Г.В., Сердан А.А. и др. Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии. - М.: Химия, 1986. - 247 с.
4. Луцки М.Д., Панасюк Е.Н., Луцки А.Д. Лектины. - Львов: Вища школа (Изд-во при Львов. ун-те), 1981. - 156 с.
5. Barondes S.H. // Science, 1984. - Vol. 223. - N 4642. - P. 1259-1264.
6. Chowdhury M., Sarcar M., Mandal C. // Biochem. Biophys. Res. Comm. - 1985. - Vol. 130. - N 3. - P. 1301-1307.
7. Chowdhury M. // Biochem. Biophys. Res. Comm. - 1986. - Vol. 136. - N 1. - P. 116-121.
8. Dudois M., Gilles K.A., Hamilton Y.K., Rebers P.A.P., Smith F. // Analytical Chemistry. - 1956. - Vol. 28. - N 3. - P. 350-356.
9. Hirabayashi Y., Kasai K. // Biochem. Biophys. Res. Comm. - 1984. - Vol. 122, 12. - N 3. - P. 938-944.
10. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R. // J. Biol. Chem. - 1951. - Vol. 193. - N 1. - P. 265-275.
11. Metz C.B. Gamete surface components and their role in fertilization // Fertilization. New York: Acad. Press, 1967. - P. 369-384.
12. Schauer R. // Methods In Enzymology. Complex Carbohydrates. Part C. New York, London. - 1978. - Vol. L. - P. 64 - 89.

ФЕРМЕНТЫ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА С ЛЕКТИНОВЫМИ ДОМЕНАМИ СОРБЦИИ НА ПОЛИСАХАРИДАХ

В.М. Лахтин

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

Известно несколько определений лектинов /2/, однако определение J. Kocourek, V. Nočejší наиболее полно отражает суть лектинов как белков неиммуноглобулиновой природы, способных к специфическому узнаванию и обратимому связыванию с углеводной частью гликоконъюгатов без нарушения ковалентной структуры любых из узнаваемых гликозильных лигандов /8/. Согласно этому определению к лектинам относятся многие моновалентные углеводсвязывающие белки (например, ряд токсинов растений и бактерий), но не относятся ферменты углеводного обмена, которые изменяют ковалентную структуру углеводных субстратов.

В настоящем обзоре представлены литературные данные относительно некоторых ферментов углеводного обмена с доменами сорбции на полисахаридах, которые можно отнести к числу лектинов.

Присутствие или отсутствие доменов сорбции на нерастворимых полисахаридах является важным для понимания функционирования некоторых гликозидаз, в том числе их кооперативного действия /9/. В таблице представлены наиболее хорошо изученные гликозидазы с участками сорбции на полисахаридах.

На важность участков сорбции целлюлолитических ферментов в гидролизе целлюлозы было обращено внимание еще в начале 80-х годов /3, 7/. В настоящее время с помощью ограниченного протеолиза папаином удалось разделить функционально активные домены сорбции и гидролитические домены целлобиогидролазы I и эндоглюканазы I триходермы /14, 18/.

Известны некоторые общие свойства доменов сорбции целлюлаз и глюкоамилаз грибов, а также бактерий (*Clostridium thermocellum*, *Bacillus subtilis*) /9/. Так, домены сорбции занимают концевое положение в аминокислотной последовательности (в случае бактерий - C-концевое), составляя обычно ме-

Таблица

Гликозидазы с участками или доменами сорбции

Ферменты	Источники	Ссылки
α -амилазы	проростки и семена злаков	/5, 20, 21/
Глюкоамилазы	грибы <i>Aspergillus awamori</i> ,	/4/
	<i>A. niger</i> ,	/15/
	<i>Rhizopus niveus</i> , <i>Rhizopus</i> sp.	/16, 17, 22/
	дрожжи <i>Candida antarctica</i> ,	/12/
	<i>Saccharomyces fibuligera</i>	/19/
Эндо- β -1,4-глю- каназы	бактерии <i>Cellulomonas fimi</i>	/10/
	гриб <i>Trichoderma reesei</i>	/14/
Целлобиогидро- лазы	гриб <i>T. reesei</i>	/18/

нее 30% всей ее длины (в случае грибов - около 15%). По-видимому, у бактериальных целлолаз присутствуют повторы доменов сорбции или областей, богатых пролином и гидроксилсодержащими аминокислотами. Домены сорбции характеризуются высокой степенью гомологии (более 50%) среди гликозидаз видовой (возможно, родовой) принадлежности. Переходная область между гидролитическим и сорбционным доменами обычно богата остатками пролина, серина и треонина (последние две аминокислоты гликозилированы). Считают, что домены сорбции не только узнают полисахарид (микрористаллическую целлолозу, гранулы крахмала и т.д.), но и способствуют его разрыхлению. Кроме того, сорбция фермента на нерастворимом полисахариде может ингибироваться в присутствии определенных олигосахаридов или других растворимых полисахаридов, а также может зависеть от степени ветвления нерастворимого полисахарида и типа связей в его структуре.

Не исключено, что и хитиназы лизоцимы/растений тоже обладают доменами сорбции на хитине/стенках микрококка. Показано, что агглютинин из зародышей пшеницы и хитиназа фасоли обладают гомологичными последовательностями в пределах пер-

вых 40 аминокислотных остатков (домен сорбции хитиназы?) /II/. В то же время гидролитический домен располагается у хитиназ фасоли и ячменя, вероятно, в средней части молекулы /I3/. Кроме того, хитиназа/лизосим растения, в отличие от лизосима животных, расщепляет стенки микрококка через стадию агрегации /I/. Локализация же хитиназной и лизосимной активностей в одной молекуле очевидна для рода растений (но не бактерий) /6/.

Можно полагать, что домены сорбции на полисахаридах широко распространены и среди прочих ферментов углеводного обмена. Но главное заключается в том, что такие ферменты мы вправе относить к лектинам (би- и полифункциональным).

Л и т е р а т у р а

1. Лахтин В.М., Костанова Е.А. // Материалы всес. конф. "Современные проблемы биохимии, физ.-хим., биологии и биотехнологии" (Москва, 25-31 марта 1985). - Ч.1. - С. 4-12.

2. Лахтин В.М. Лектины в исследовании белков и углеводов // Итоги науки и техники. Серия биотехнология. - Т.2. - М.: ВИНТИ, 1987. - 290 с.

3. Рабинович М.Л., Нгуен Ван Вьет, Клесов А.А. // Биохимия. - 1982. - Т. 47, № 3. - С. 465-477.

4. Савельев А.Н., Сергеев В.Р., Голубев А.М., Фирсов Л.М. Препр. // Ленингр. ин-т ядерн. физ. - 1987, № 1306. - С.3-26.

5. Хакимжанов А.А., Фурсов О.В. // Физиол. и биох.культ. раст. - 1988. - Т. 20, № 2. - С. 157-162.

6. Boller T. // Cellular and Molecular Biology of Plant Stress. (Eds J.L.Key, T.Kosuge). Alan R. Liss. New York, 1985. - P. 247-262.

7. Klyosov A.A., Rabinovich M.L. // Enzyme Engineering: Future Directions. (Eds Wingard L.B., Berezin I.V., Klyosov A.A.) Plenum Press. New York; London, 1980. - P. 83-165.

8. Kocourek J., Hořejší V. // Nature. - 1981. - Vol.290. - N 5803. - P. 188.

9. Knowles J., Lehtovaara P., Teeri T. // Trends in Biotechnology. - 1987. - Vol. 5. - N 9. - P. 255-261.

10. Langsford M.L., Gilkes N.R., Singh B. et al. // FEBS Lett. - 1987. - Vol. 225. - N 1-2. - P. 163-167.
11. Lucas J., Henschen A., Lottspeich F. et al. // FEBS Lett. - 1985. - Vol. 193. - N 2. - P. 208-210.
12. de Mot R., Verachert H. // Eur. J. Biochem. - 1987. - Vol. 164. - N 3. - P. 643-654.
13. Roberts W.K., Selitrennikoff C.P. // J. Gen. Microbiol. - 1988. - Vol. 134. - N 1. - P. 169-176.
14. Stahlberg J., Johansson G., Pettersson G. // Eur. J. Biochem. - 1988. - Vol. 173. - N 1. - P. 179-183.
15. Svensson B., Clarke A.J., Svendsen I. // Carlsberg Res. Commun. - 1986. - Vol. 51. - N 1. - P. 61-73.
16. Takahashi T., Kato K., Ikegami Y., Irie M. // J. Biochem. - 1985. - Vol. 98. - N 3. - P. 663-671.
17. Tanaka Y., Ashikari T., Nakamura N. et al. // Agric. Biol. Chem. - 1986. - Vol. 50. - N 7. - P. 1737-1742.
18. Tomme P., van Tilbeurgh H., Pettersson G. et al. // Eur. J. Biochem. - 1988. - Vol. 170. - N 3. - P. 575-581.
19. Ueda S., Saha B.C. // Enzyme Microbiol. Technol. - 1983. - Vol. 5. - N 3. - P. 196-198.
20. Weselake R.J., Hill R.D. // Carbohydr. Res. - 1982. - Vol. 108. - N 2. - P. 153-161.
21. Weselake R.J., Hill R.D. // Cereal Chem. - 1984. - Vol. 60. - N 2. - P. 98-101.
22. Yoshizumi H., Ashikari T., Nakamura N. et al. // J. Jap. Soc. Starch Sci. - 1987. - Vol. 34. - N 2. - P. 148-154.

**ПОИСК ПРОМЫШЛЕННЫХ ИСТОЧНИКОВ РАСТИТЕЛЬНОГО
СЫРЬЯ, СОДЕРЖАЩЕГО ЛЕКТИНЫ**

Н.Г. Кашкарова, З.Ф. Коваленко, С.И. Дыхтярев, В.Т. Чернобай
Всесоюзный научно-исследовательский институт химии
и технологии лекарственных средств, г. Харьков

Важной задачей фармацевтической науки и практики в свете решений партии и правительства является поиск новых лекарст-

венных и диагностических средств, а также разработка научных основ технологии комплексного использования животного и растительного сырья.

В связи с этим представляет интерес создание группы диагностических препаратов на основе промышленных источников сырья, содержащего лектины. В литературе достаточно широко представлены данные о наличии лектинов в растениях /2, 4, 5/. Тем не менее вопросы сырьевой базы, позволяющие обеспечить масштабное производство препаратов лектинов для медицины практически не освещены. Нами проведен поиск в семенах 40 сортов арбуза вида *Citrullus vulgaris* семейства тыквенных и фасоли вида *Phaseolus vulgaris* семейства бобовых на наличие фитогемагглютенина. Для идентификации использовали реакцию агглютинации 2% суспензии эритроцитов крови человека с водным экстрактом каждого образца и последующим субъективным способом регистрации результатов. При наличии агглютинации образуется осадок эритроцитов, который не распадается, либо распадается на комки. Равномерное суспендирование взвеси свидетельствует об отсутствии агглютинации /2/. Агглютинацию оценивали по 5-балльной шкале.

Изучение семян столового арбуза вида *Citrullus vulgaris* показало полное отсутствие агглютинирующего действия.

Для анализа фасоли использовали наиболее распространенные сорта, районированные на территории Украинской ССР, и коллекционные образцы из некоторых зарубежных стран. По имеющимся данным, площади возделываемых сортов фасоли по СССР составляют более 57,2 тыс. га. /3/. Результаты, представленные в таблице показывают, что агглютинирующая активность большинства изученных отечественных образцов фасоли достаточно высока, с максимальной оценкой для красной индейской и Гайдаровской. Изменение гемагглютинирующей активности в семенах различных сортов фасоли совпадает с результатами других авторов /1/. Оценка образцов зарубежных сортов фасоли в основном соответствует отечественным.

Для дальнейших исследований представляет интерес разработка красных сортов фасоли, которые также обеспечены посевными площадями.

Таблица

Агглютинирующая активность экстрактов

Наименование сорта	Агглютинирующая актив- ность (по 5-балльной шкале)
I	3
<u>А р б у з:</u>	
Любимец Краснодара	0
Подарок Холодова	0
Хампширский карлик	0
Туман Днепропетровский	0
Пурпурный	0
Дружба	0
Луч	0
Стокса Киевский	0
Быковский-22	0
Кустовой король десертный	0
Мелитопольский-142	0
Белый длинный-107	0
Быковский-48	0
Быковский-199	0
Мелитопольский-143	0
Мелитопольский-60	0
Огонек	0
<u>Ф а с о л ь:</u>	
Харьковская-8 (СССР)	3
Харьковская-9 (СССР)	3
Харьковская-ШХ (СССР)	4
Красноградская-5 (СССР)	3
Красная индейская (СССР)	5
Коловая (СССР)	4
Кубанка (СССР)	4
Дружба (СССР)	4
Деликатес (СССР)	4
Днепровская (СССР)	4
Мухранула-4 (СССР)	4
Олтын (СССР)	4

Продолжение табл.

I	2
Гайдаровская (СССР)	5
Такноселен фурье (Венгрия)	3
Febenyi suror(Венгрия)	4
IO26 (Румыния)	4
Fortschritt (ГДР)	4
Lusia (ГДР)	4
Declivic (ГДР)	4
Romulus (ГДР)	4
Progress (Франция)	4
TL-180755 (США)	4
Refistaut Cherocee (США)	4

Л и т е р а т у р а

1. Бойд У.С. Введение в иммунохимическую специфичность. - М., И.-Л., 1963. - 186 с.

2. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. - Львов: Высшая школа, 1981. - 156 с.

3. Посевные площади во всех категориях хозяйств союзных республик (предварительные данные). - М., 1985. - С. 31.

4. Lee D.W., Tan Y.S., Zie W.T. // Planta medica.-1977.- Rd. 31. - N 1. - S. 83-93.

5. Martin T., Bronohill Y. // Vox. gong. - Vol. 11. - N 1.- P. 54-58.

БЕЛОК ЛРМ₄₀₋₈₀ С ЛЕКТИНОВОЙ И МИТОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Э.А. Рапава, Г.Я. Алексидзе, Т.А. Лежава,
Л.В. Кекенадзе, Н.А. Двалишвили, Н.Г. Алексидзе
Тбилисский государственный университет

Получение специфических белков с митогенной и гемагглютинирующей активностями является одной из актуальных задач

современной биохимии. В настоящее время они преимущественно закупаются за границей из-за отсутствия их отечественного производства. Мы предприняли поисковое исследование с целью изыскания новых источников белков лектиновой и митогенной активности. Особое внимание обратили на семена грузинских сортов фасоли, до последнего времени практически не изученных.

Лектины выделяли из семян *Phaseolus vulgaris* L. var. *oblongo ovatus* subvar. *ochroleucus* по описанной в литературе методике /3/. Титр лектина рассчитывали по минимальной концентрации белка, вызывающей агглютинацию эритроцитов /2/. Как выясняется, максимальное осаждение лектинов происходит при 40-80% насыщения сульфатом аммония (фракция ЛРМ₄₀₋₈₀), что позволяет повысить удельную активность лектина по сравнению с грубым экстрактом в 200 раз и составить 0,025 мкг/100 мкл.

Убедившись в относительной чистоте и биологической активности лектинового препарата, мы апробировали его способность бласттрансформации малых лимфоцитов периферической крови человека. По имеющимся в литературе данным, среди препаратов лектинов, полученных из разных сортов фасоли, имеются сильные митогены и полностью митогенонеактивные образцы /1/.

Установлено, что препарат ЛРМ₄₀₋₈₀ в концентрации 80-100 мкг/мл вызывает интенсивное деление лимфоцитов с наивысшим содержанием метафазных клеток. Хранение лектина в растворе при низкой температуре (-20°) в течение 4 месяцев не оказывает существенного влияния на митогенную активность.

С целью дальнейшей очистки лектина фракцию ЛРМ₄₀₋₈₀ наносили на колонку (40 x 1 см) с биогелем Р-200 в количестве 6,67 мг белка в объеме 200 мкл; фракции элюата собирали по 0,5 мл при скорости элюции 30 мл/ч.

Всего было получено 77 колоночных фракций (рис. 1). Из них максимальной агглютинирующей активностью характеризовалась фракция 19 (рис. 1)

Фракция 19, а также фракция ЛРМ₄₀₋₈₀, были подвержены электрофорезу в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в условиях линейного градиента концентрации

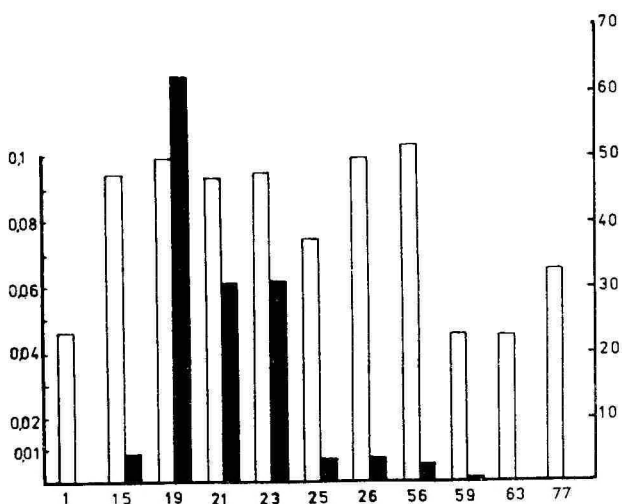


Рис. 1. Содержание белков (белые столбики) и гемагглютинирующая активность (черные столбики) разных колоночных белковых фракций ЛРМ₄₀₋₈₀ Биогель Р-200. По абсциссе - колоночные фракции (Ф). По ординате (справа) - коэффициент относительной гемагглютинации. Активность лектина выражена в условных единицах (0,1: минимальная концентрация белка, вызывающая агглютинацию). Слева - оптическая плотность - E₂₈₀.

геля (3-25%). Как видно из электрофореграммы (рис. 2), колоночная фракция I9 представлена всего лишь одной полосой (рис. 2, E), тогда как во фракции ЛРМ₄₀₋₈₀ полос было больше (рис. 2, A). После обработки фракции I9 трипсинизированными кроличьими эритроцитами и при последующем центрифугировании с целью удаления комплекса лектин-рецептор на электрофореграмме центрифугата не удается обнаружить лектиновой фракции в результате связывания ее с рецепторами эритроцитов

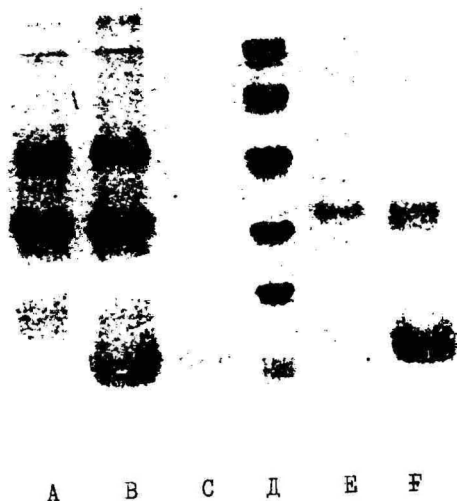


Рис. 2. Электрофорез в 3-25%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. А - фракция ЛРМ₄₀₋₈₀. В - фракция ЛРМ₄₀₋₈₀ в присутствии трипсинизированных кроличьих эритроцитов. С - трипсинизированные кроличьи эритроциты. Д - стандартные белки. Е - колоночная фракция Ф I9. F - колоночная фракция Ф I9 плюс эритроциты без предварительного центрифугирования. G - колоночная фракция Ф I9 плюс эритроциты после предварительного центрифугирования.

(рис. 2, С). Однако при электрофорезе смеси лектинов и эритроцитов без центрифугирования в среде электрофореза происходит распад на отдельные компоненты, вновь появляются белки эритроцитов и лектин (рис. 2, F). Из рисунка 2 видно также, что молекулярная масса лектина, мигрирующего в виде одной полосы, соответствует белку с ММ 33 кД.

Установлено, что фракция ЛРМ₄₀₋₈₀ характеризуется высокой агглютинирующей активностью (0,025 мкг/100 мкл) и в кон-

центрации 80-100 мкг/мл вызывает интенсивное деление лимфоцитов с наивысшим содержанием метафазных клеток. Хранение лектина в растворе при низкой температуре (-20°C) в течение 4 месяцев не оказывает существенного влияния на его митогенную активность. Лектин в диссоциирующем состоянии после гель-фильтрации на колонке с биогеом P-200 мигрирует в полиакриламидном геле в виде одной полосы и по подвижности соответствует белку с ММ 33 кД.

Л и т е р а т у р а

1. Королев Н.П. Функции лектинов в клетках // Итоги науки и техники. - 1984. - I.
2. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А. Д. Лектины. - Львов: Вища школа, 1981, 2.
3. Ochoa J.L., Kristiansen T. // FEBS LETTERS. - 1978. - Vol. 90. - N 1. - P. 145-148.

ЛЕКТИНОПОДОБНЫЕ БЕЛКИ И КОНКАВАЛИН А-СВЯЗЫВАЮЩИЕ РЕЦЕПТОРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДЕР И МИТОХОНДРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Р.Г. Ахалкаци, М.В. Балавадзе, Н.Г. Алексидзе
Тбилисский государственный университет

Ранее проведенными исследованиями в головном мозгу крыс было обнаружено наличие лектиноподобных белков и рецепторов, активно связывающих растительные лектины /1, 6, 7/. По данным авторов, количественное содержание как лектинов, так и конканавалин А-связывающих рецепторов заметно изменяется в период постнатального развития животных. Особое внимание обращалось на фракции белков P_1 (клеточные обломки и оболочки ядра) и P_2 (грубая митохондриальная фракция), приготовленных по методу (1) из мозга новорожденных, 3-, 7-, 15-16-дневного возраста и взрослых крыс. Установлено, что гемагглютинирующая активность фракций головного мозга крыс P_1 и P_2 , в зависимости от постнатального развития, изменяется волнообразно.

Наивысшая активность мозговой фракции P_1 обнаруживается сразу после рождения, с возрастом она уменьшается. Аналогичная закономерность была обнаружена и при проведении экспериментов с мозговыми фракциями P_2 . Поскольку опыты были проведены с неочищенными белковыми фракциями, а данные об изменении количественного содержания белков и синаптических гликопротеинов /6/ относятся к периоду постнатального развития, пока трудно объяснить наблюдаемый нами феномен. Более того, для оценки данного результата необходимо учесть методические вопросы, которые могут внести существенные изменения в расчете количественного содержания лектиноподобных белков и рецепторов. Это в частности касается получения гомогенных фракций мозга, обладающих лектиновой активностью, и их чувствительности к замораживанию и оттаиванию. По нашим данным, после однократного замораживания и оттаивания лектиновая активность фракции P_1 преимущественно падает, а лектиновая активность фракции P_2 , напротив, возрастает в 1,5–2 раза. Более вероятно, что этот факт объясняется изменением способности экстрагирования белковых фракций в зависимости от воздействия низкой температуры.

Лектиноподобный белок фракции P_1 головного мозга крыс отличается и умеренной термостабильностью. После 10-минутной экспозиции в кипящей водяной бане агглютинирующая активность трипсинизированных кроличьих эритроцитов резко падает. Галтены типа Д-галактоза, Л-мальтоза, N-ацетил-Д-глюкозамин, N-ацетил-Д-галактозамин, α -метил-Д-маннопиранозид и мио-инозитол практически не оказали достоверного влияния на агглютинирующую активность белковой фракции P_1 и P_2 . Следовательно, специфичность активного центра лектиноподобных белков P_1 и P_2 к углеводным остаткам остается открытой и требует дальнейшего обоснования.

В дальнейшей серии опытов мы предприняли исследование связывания конканавалина А с очищенными изолированными ядрами и митохондриями клеток головного мозга крыс из P_1 и P_2 фракций и способность их агглютинации. После очистки ядерную фракцию переносили в среду агглютинации (рН 7,4), приготовленную на 0,9% растворе хлористого натрия /2/. Ядра в количестве $1-8 \times 10^7$ /мл /5/ предварительно инкубировали с кон-

канавалином А отдельно или в присутствии разных гаптеннов (N-ацетил-Д-глюкозамин, α-метил-Д-маннопиранозид и Д-глюкоза) при комнатной температуре в течение 30 мин, готовили препарат и агглютинацию оценивали по методу /4/. Установлено, что конканавалин А вызывает агглютинацию изолированных ядер клеток головного мозга, что полностью ингибируется N-ацетил-Д-глюкозаминном (таблица) и сравнительно слабо α-метил-Д-маннопиранозидом при конечной концентрации гаптеннов 0,5 М. Аналогичная закономерность была обнаружена и при титрации гаптена. Оставшуюся часть ядерной суспензии центрифугировали. Супернатант, содержащий конканавалин А, использовали для агглютинации трипсинизированных кроличьих эритроцитов. С учетом титра конканавалина А, количества ячеек с агглютинацией и концентрации белка ядерной фракции мы рассчитывали степень тотально связанного конканавалина А с наружной мембраной ядер. В качестве контроля брали трипсинизированные эритроциты + конканавалин А и проводили титрацию в зависимости от концентрации конканавалина А.

Таблица
Влияние разных углеводов на гемагглютинацию
трипсинизированных кроличьих эритроцитов
конканавалином А

Лектин	Углеводы, 0,5 М	Агглютинирующая активность	
		ядра	митохондрии
Конканавалин А	-	+	+
То же	N-ацетил-Д-глюкозамин	-	+
То же	α-Д-метилманнозид	+	-
То же	Д-глюкоза	+	+
То же	Д-мальтоза	+	+
То же	Д-галактоза	+	+

Как видно из рисунка I (кривая I), связывание конканавалина А с трипсинизированными кроличьими эритроцитами носит сигмаидальный характер, что указывает на их кооперативное

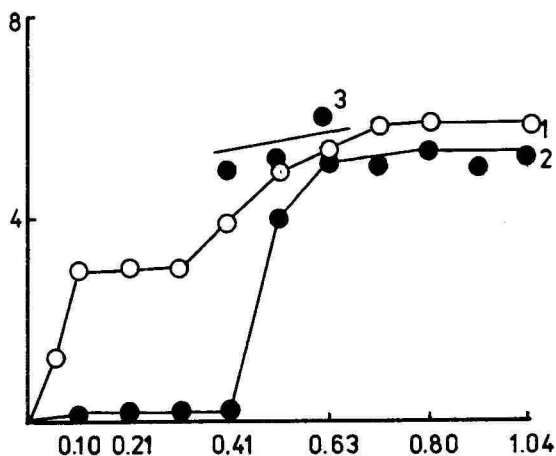


Рис. 1. Изменение степени связывания конканавалина А изолированными клеточными ядрами головного мозга крыс в зависимости от концентрации конканавалина А.

1. Контроль — конканавалин А + эритроциты.

2. Опыт — ядра + конканавалин А.

3. Контроль — ядра, обработанные термически.

По оси абсцисс — концентрация конканавалина А (мкг/150 мкг/1 мг белка ядер). По оси ординат — число ячеек с агглютинацией.

взаимоотношение. Кооперативность и сигмаидальный характер связывания WGA с изолированными ядрами лимфобластов наблюдали M. Jett, G.A. Jamieson /3/. При этом связывание происходит механизмами высокого и низкого сродства к N-ацетил-Д-глюкозамину гликопротеина наружной мембраны ядра. По нашим данным (рис. 1, кривая 2), после предварительной инкубации конканавалина А с изолированными ядрами клеток мозга крыс количество totally связанного конканавалина А составляет ~ 0,41 мкг конканавалина А на мг белка ядер, связывание

также носит сигмаидальный характер. После кипячения ядерной фракции на водяной бане способность ядер к связыванию с конканавалином А практически полностью теряется, и степень агглютинации, при сохранении титра на постоянном уровне, остается неизменной (рис. 1, кривая 3).

Аналогично конканавалин А вызывает агглютинацию и митохондрий, но гаптенем в данном случае является α -D-метилманнопиранозид (таблица). С другой стороны, в отличие от ядер, судя по кривой степени агглютинации эритроцитов конканавалином А, после его предварительной обработки митохондриями, количество тотально связанного конканавалина А при пересчете на 1 мг белка составляет 4 мкг лектина (рис. 2).

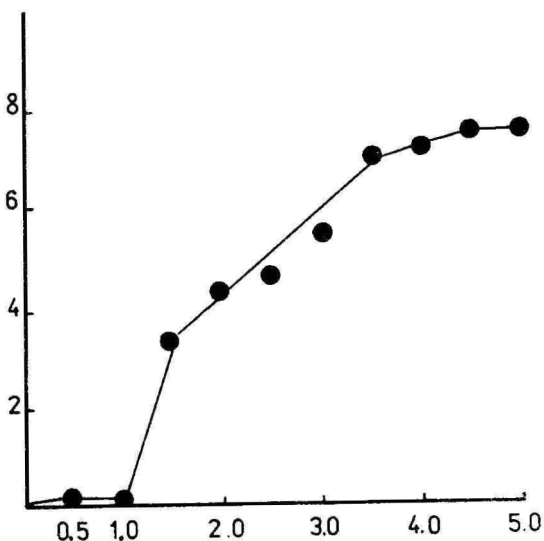


Рис. 2. Изменение степени связывания конканавалина А митохондриями головного мозга крыс в зависимости от концентрации конканавалина А. По оси абсцисс - концентрация конканавалина А (мкг/200 мкл/250 мкг белка митохондрий). По оси ординат - число ячеек с агглютинацией.

Можно предположить, что повышение связывания конканавалина А митохондриями обусловлено предварительной обработкой раствором трис-глицин-НСI (рН 3,2). Более вероятно, что эта процедура способствует активации поверхности митохондрий путем удаления белков, характеризующихся высоким сродством к олигосахаридам мембранных гликопротеинов. Эта закономерность подтверждается данными, представленными на рисунке 3. Предварительная термообработка митохондрий по сравнению с ядрами оказывает слабое влияние на степень связывания конканавалина А митохондриями.

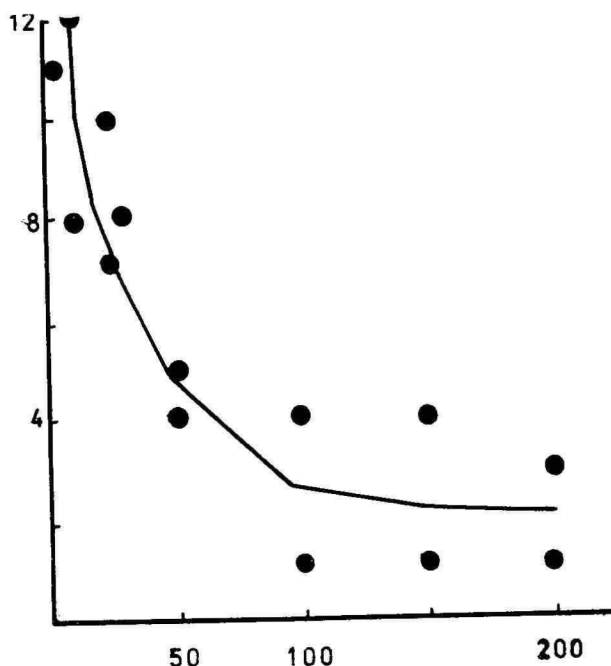


Рис. 3. Изменение гемагглютинирующей активности конканавалина А (25 мкг/500 мкл) после его предварительной инкубации с разным количеством митохондрий головного мозга крысы. По оси абсцисс — концентрация митохондрий. По оси ординат — число ячеек с агглютинацией.

Таким образом показано, что P_1 и P_2 фракции головного мозга проявляют лектиноподобную активность, которая в процессе постнатального развития меняется волнообразно и достигает своего максимума в период синаптогенеза (15-17-й день после рождения). Фракции P_1 и P_2 , соответственно ядра и митохондрии нервных клеток головного мозга, активно связываются с конканавалином А, что сопровождается их агрегацией. Существование конканавалин А-связывающего рецептора дает основание для проведения поисковых исследований по выявлению конканавалин А - подобных лектинов в головном мозге.

Л и т е р а т у р а

1. Ахалкаци Р.Г., Алексидзе Н.Г. Лектиноподобные белки головного мозга крыс: Сообщ. АН ГССР.- 1987. - 128.- С. 597-599.

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

3. Jett M., Jamieson G.A. // Biochemistry. - 1981.-Vol. 20. - P. 5221-5226.

4. McIntyre L.J., Quarles R.H., Brady R.O. // Biochem. J. - 1979. - Vol. 183. - P. 205-212.

5. Nicolson G., Lacorbriere M., Demonte P. // Exptl. Cell Res. - 1972. - Vol. 71. - P. 468-472.

6. Nihal S. De Silva, Gurd J.W., Schwartz Ch. // Brain Research. - 1979. - Vol. 165. - P. 283-293.

К ХАРАКТЕРИСТИКЕ НОВОГО ГАЛАКТОЗОСПЕЦИФИЧЕСКОГО ЛЕКТИНА
ИЗ МИДИИ ЯПОНСКОГО МОРЯ *Stenomytilus grayanus*

Ю.Н. Лоенко, В.Е. Глазкова, А.А. Артюков, В.В. Михайлов,
А.В. Курика, Р.Г. Оводова, Т.А. Рущкова
Тихоокеанский институт биоорганической химии
ДВО АН СССР, г. Владивосток

В ходе выполнения широкой исследовательской программы "Мировой океан" наше внимание обращено к лектинам морских гидробионтов. В настоящем сообщении мы рассмотрим лектин двусторчатого морского моллюска - мидии *S. grayanus*. Интерес именно к этому объекту обусловлен его биологической активностью при некоторых формах патологии.

Лектин выделяли из экстракта тканей или гемолимфы мидии с помощью аффинной хроматографии на агарозе, используя в качестве элюента кислый буфер. Фракцию, содержащую белок, подвергали очистке от низкомолекулярных примесей и лиофилизации. По данным SDS -электрофореза и гель-фильтрации на G-75, лектин является гомогенным субъединичным белком с молекулярной массой 18 кДа. В составе вещества 97% белка и 3% углеводов. Аминокислотный анализ показал наличие следующих аминокислот в соотношении: Асп:Тре:Сер:Глу:Про:Гли:Ала:Вал:Мет:Изолей:Лей:Тир:Фал:Лиз:Гис:Арг = 13,2:3,5:4,8:5,9:4,9:28,0:5,9:2,6:1,0:1,7:3,0:2,5:3,9:6,1:5,0:1,9.

Выделенный лектин стабилен в отношении pH среды, при воздействии на него реагентов с pH 2,0-II,0 не происходит необратимых конформационных изменений, вызывающих потерю геммагглютинирующей активности. Исследования показали, что лектин термостабилен, выдерживает нагревание при температуре 50°C в течение 1 часа, устойчив к действию ЭДТА. Обработка вещества проназой приводит к потере активности исследуемого гликопротеина.

Лектин способен агглютинировать эритроциты человека (O, A, B, AB), барана, курицы, морской свинки, а также клетки опухоли Эрлиха, саркомы 37 и I210. Лектин галактозоспецифичен, поскольку вызванная им агглютинация клеток отменяется

D-галактозой и галактозосодержащими углеводами (N-ацетил- D - галактозамин, лактоза, раффиноза). В отношении клеток опухоли Эрлиха установлен его титр, который соответствует I мкг/мл суспензии, содержащий $5 \cdot 10^6$ клеток.

В опытах *in vitro* исследуемый гликопротеин вызывает агглютинацию клеток в системе: мышинные макрофаги - эритроциты человека или клетки опухоли Эрлиха. Отмытые от лектина макрофаги способны связывать не обработанные лектином как клетки опухоли Эрлиха, так и эритроциты человека, образуя при этом ассоциаты в форме розеток. Добавление галактозы диссоциирует розетки на одиночные клетки.

Методом двойной иммунодиффузии в агаре обнаружено, что лектин относится к преципитинам - веществам, реагирующим с гликоконъюгатами (таблица I).

Таблица I

Иммунобиологические свойства лектина	Степень преципитации
Преципитация гликопротеинов в ряде биологических жидкостей:	
сыворотка человека	+
сыворотка быка	+
сыворотка кролика	\pm
сыворотка эмбриональная теленка	\pm
амниотическая жидкость человека	++++
Преципитация отдельных гликопротеинов человека:	
раково-эмбриональный антиген (РЭА)	+++ (125 мкг/мл)
α -кислый гликопротеин (орозомукоид)	++ (500 мкг/мл)
трофобластический β _I -гликопротеин (ТБГ)	-
α -фетопротеин	-

Нами показано, что выделенный из мидии лектин способен агглютинировать ряд микроорганизмов, ассоциированных с этим моллюском (I), например, *Photobacterium SPP.*, *Flavobacterium*

SPP., *Pseudomonas* SPP., а также *Streptomyces* SP.. Вполне вероятно, данный феномен отражает вспомогательную роль лектина в регуляции фагоцитами макроорганизма количественного и качественного состава популяций микросимбиоценоза.

Полученные нами данные позволяют отнести выделенный из мидии *S. grauaia* белок к лектинам животного происхождения. По-видимому, обнаруженные свойства исследуемого лектина могут представить интерес не только в плане изучения его как биологически активного агента, но и как биорегулятора в системе животный организм - микросимбиоценоз.

Л и т е р а т у р а

И. Михайлов В.В., Кочкин А.В., Иванова Е.П. // Микробиология. - 1988. - Т. 57, вып. I. - С. 158-159.

ЛЕКТИН-ПОДОБНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ ХРУСТАЛИКА С УГЛЕВОДАМИ

А.Г. Швачко, В.Е. Формазюк, В.А. Антонюк,
В.И. Сергиенко, Н.Н. Качина

Научно-исследовательский институт физико-химической
медицины Министерства здравоохранения РСФСР, Москва

Сахарный диабет сопровождается нарушением обмена углеводов и очень часто приводит к потере прозрачности хрусталика - к катаракте /3/. Одним из пусковых механизмов катарактогенеза может быть нарушение функции кристаллинов, которые являются основным компонентом цитоплазмы клеток, формирующих волокна хрусталика и обеспечивающих его прозрачность /2/. Взаимодействие белков хрусталика с различными углеводами не изучено, хотя такие данные помогли бы поиску путей профилактики и лечения катаракты. В данном случае исследовано взаимодействие водорастворимых белков хрусталика, большая часть которых представлена кристаллинами, с различными углеводами *in vitro*. Об этом судили по параметрам спектров флуоресценции триптофанилов исследуемых белков. В работе использовали:

Д-галактопиранозид, Д-лактозу, Д-раффинозу, Д-глюкопиранозид, 2-ацетиамидо-2-дезоксиглюко- и галактопиранозиды, а также антибиотики - аминогликозиды. Обнаружено, что с водорастворимыми белками хрусталика взаимодействуют производные Д-галактопиранозиды, которые по степени родства можно расположить следующим образом:



Однако Д-глюкопиранозид и 2-ацетиамидо-2-дезоксиглюкопиранозид с кристаллинами не взаимодействуют. Наибольшее сродство к водорастворимым белкам среди аминогликозидных антибиотиков имел гентамицин. Аналогичное снижение квантового выхода и изменение параметров спектров белковой флуоресценции наблюдали при связывании различных лектинов со специфическими углеводами.

Изучено взаимодействие суммарной фракции кристаллинов со специфическими аффинными сорбентами. В частности, нами использован сорбент, ранее зарекомендовавший себя при анализе ряда лектинов растительного происхождения /1/. Он представляет собой денатурированный, а затем полимеризованный яичный гликопротеид - овоальбумин. Сорбент в виде гранул применяли для набивки колонки размером 15 x 1,2 см. Выход белков в элюате колонки регистрировали фотометрически при 280 нм. Гомогенат из двух хрусталиков крысы общим весом 60 мг получали путем центрифугирования при 16000 г в течение 20 минут. Гомогенизацию проводили в 2 мл 0,05 М фосфатного буфера, рН 7,4. Полученный супернатант, содержащий суммарную фракцию кристаллинов, наслаивали на колонку в количестве 1 мл. Смыв специфически связанных белков с аффинного сорбента осуществляли 10%-ным раствором уксусной кислоты в 0,05 М фосфатном буфере с конечной рН 1,73. Дальнейшую элюцию белка с колонки проводили тем же фосфатным буфером. Профиль градиента рН на выходе с колонки представлен на рисунке 1. Основная масса белка смывается при рН 3-4; согласно данным нескольких опытов, количество сорбируемых белков составило от 6 до 70% в зависимости от количества используемого в колонке сорбента.

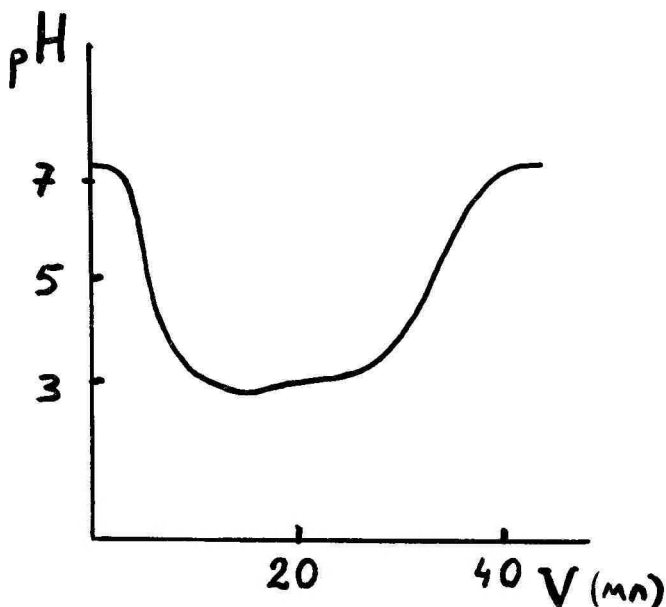


Рис. 1. Градиент pH, создаваемый в колонке с овоальбумином. Обозначения: V - объем элюирующей жидкости.

Элюцию специфически связанных кристаллинов также проводили в 0,5 мМ CaCl_2 в том же фосфатном буфере (рис. 2). Фракции свободно прошедших и затем смываемых кальцием белков собирали в диализные мешки и концентрировали в кристаллической сахарозе. В последующем проводили их разделение на колонке с сефадексом G-150 ("Sigma" США). Это позволило разделить кристаллины на 4 группы: α , β_1 , β_2 , γ (4).

Сопоставление полученных данных с разделением суммарной фракции кристаллинов показывает, что в свободно проходящей через колонку фракции находятся только α -кристаллины, а в обладающей сродством к сорбенту - β - и γ -кристаллины (рис. 3). Изменения соотношения и уширения пиков β и γ -кристаллинов в этой фракции, по-видимому, обусловлено активацией ионами

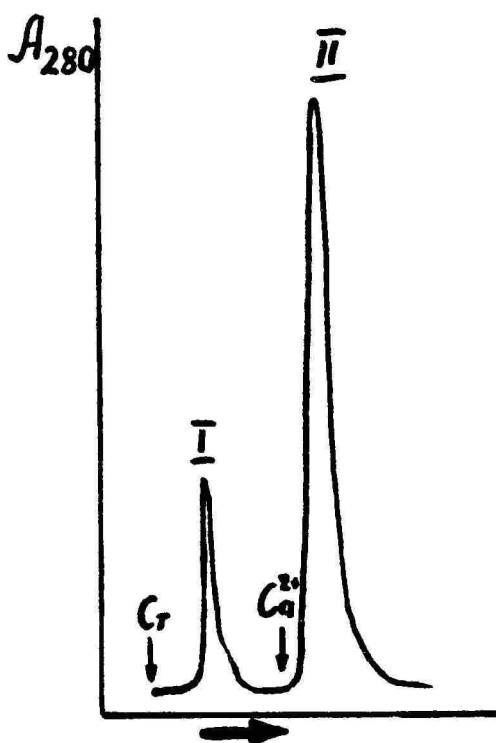


Рис. 2. Прохождение белков гомогената хрусталика крысы через колонку с аффинным сорбентом из овоальбумина.

Обозначения: СТ - момент нанесения белкового гомогената,

I - белок, свободно прошедший через колонку,

II - белок, смывающийся с колонки,
 Ca^{2+} - момент нанесения хлорида кальция, жирная стрелка обозначает направление элюции.

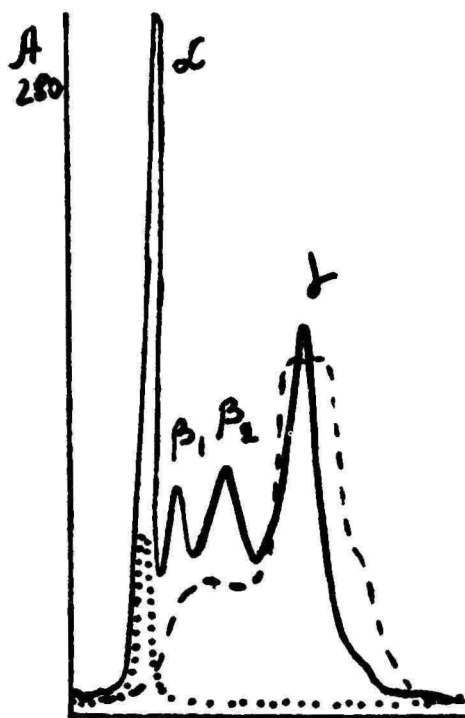


Рис. 3. Разделение кристаллинов хрусталика крысы на сефадексе G-150.

Обозначения:— разделение суммарной фракции кристаллинов,
 - - - - - фракция I,
 - фракция II, полученная после разделения на аффинном сорбенте (рис. 2),
 α , β_1 , β_2 , δ - классы кристаллинов.

кальция протеаз хрусталика, что приводит к изменению молекулярного веса кристаллинов.

Делается предположение, что кристаллины млекопитающих обладают лектин-подобными свойствами, а нарушение их взаимодействия может быть одним из пусковых механизмов катаракты.

Л и т е р а т у р а

1. Bloemendal H. Molecular and cellular biology of the eye lens // Wiley and Sons New York, 1981.

2. Bloemendal H. Lens proteins // CRC Critical Reviews Biochemistry. - 1982. - P.I-38.

3. Rink H., Hockwin O. Epidemiologie der senilen Katarakt // Biochemie des Auges, Ed. O. Hockwin, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart. - 1985. - S. 283-289.

ЛЕКТИН КАЛАНХОЭ

В.Ф. Лапчик, Т.В. Юрчишина

Ботанический сад им. акад. А.В. Фомина Киевского государственного университета им. Т.Г. Шевченко

В условиях ботанических садов имеется уникальная возможность исследования на содержание лектинов не только представителей отечественной флоры, но и большого количества интродуцированных растений мировой флоры.

Объектами настоящего исследования явились представители рода каланхоэ. Так как ранее было установлено /1/, что лектины каланхоэ не специфичны к какой-либо группе крови человека системы АВО, в опытах была использована кровь II(A) группы.

Реакцию эритроагглютинации осуществляли в планшетах для иммунологических реакций по методике /2/. Углеводную специфичность и митогенную активность определяли по методикам /3, 4/. На эритроагглютинирующую активность был исследован сок 60-ти видов рода каланхоэ. В таблице I представлена

Таблица I

Титр эритроагглютинирующей активности сока
растений рода каланхоэ

Р а с т е н и я	Титр эритроагглю- тинации
<i>K. rhombopilosa</i> Mann et Boit	I:2048
<i>K. blossfeldiana</i> v. Poelln	I:1024
<i>K. campanulata</i> (Bak.) Baill.	I:1024
<i>K. crenata</i> (Andrews) Haw.	I:1024
<i>K. longiflora</i> schltr.	I:1024
<i>K. mocambicana</i> Res. et Sobrino	I:1024
<i>K. obtusa</i> Engl.	I:1024
<i>K. pubescens</i> Bak.	I:1024
<i>K. beauverdii</i> Hamet	I:512
<i>K. beharensis</i> Drake et Castillo	I:512
<i>K. citrina</i> Schweinf.	I:512
<i>K. lugardii</i> Bullock.	I:512
<i>K. marmorata</i> Bak.	I:512
<i>K. millotii</i> Hamet et Perr.	I:512
<i>K. orgyalis</i> Bak.	I:512
<i>K. rolandi-Bonapartei</i> Hamet et Perr.	I:512
<i>K. schweinfurthii</i> Penzig	I:512
<i>K. trichantha</i> Bak.	I:512
<i>K. tubiflora</i> (Harvej) Hamet	I:512
<i>K. uniflora</i> (Stapf) Hamet	I:512
<i>K. faustii</i> Font j Quer	I:512
<i>K. globulifera</i> Perr.	I:256
<i>K. longiflora</i> v. <i>coccinea</i> Marnier	I:256
<i>K. peltata</i> (Bak.) Baill	I:256
<i>K. peteri</i> Werd.	I:256
<i>K. pumila</i> Bak.	I:256
<i>K. quartiana</i> A. Rich.	I:256
<i>K. somaliensis</i> Hook	I:256
<i>K. daigremontiana</i> Hamet et Perr.	I:128
<i>K. x kewensis</i> Hort.	I:128
<i>K. manginii</i> Hamet et Perr.	I:128
<i>K. fedtschenkoi</i> Hamet et Perr.	I:128

группа видов, для которых титр эритроагглютинации был не ниже I:128. Самый высокий титр эритроагглютинации (I:1024, I:2048) отмечен у *K. rhombopilosa*, *K. blossfeldiana*, *K. campaulata*, *K. crenata*, *K. longiflora*, *K. macambicana*, *K. obtusa*, *K. pubescens*. Эти виды заслуживают внимания как возможные источники сырья для получения лектина.

Объектом более детального исследования был избран вид *K. blossfeldiana*, широко распространенный в декоративном садоводстве и цветоводстве.

С использованием дробного осаждения этиловых спиртов и аффинной хроматографии на овогеле /5/ был выделен лектин *K. blossfeldiana*. Изучено ингибирующее действие углеводов на эритроагглютинирующую активность лектина, выделенного из *K. blossfeldiana*. В опыте были использованы следующие углеводы: Γ -фруктоза, Д-фруктоза, Д-манноза, сахароза, Д-глюкоза, N-ацетил-Д-глюкозамин, Д-ксилоза, лактоза, Д-галактоза, N-ацетил-Д-галактозамин, L-арабиноза, Γ -рамноза, i-инозит, Д-галактозамин. Ни один из использованных углеводов не оказал ингибирующего действия на гемагглютинирующую активность лектина *K. blossfeldiana*.

Результаты исследования эритроагглютинирующей, бласттрансформирующей и митогенной активностей лектина *K. blossfeldiana* приведены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Титр эритроагглютинирующей активности лектина
K. blossfeldiana

Концентрация лектина, μ /мл	Агглютинирующая активность
20	I:2048
40	I:2048
80	I:1024

Как видно из таблицы 2, для концентрации лектина 20–80 μ /мл титр агглютинации находился в пределах I:1024–I:2048 при полной агглютинации эритроцитов.

По данным таблицы 3, наиболее высокая бласттрансформирующая и митогенная активность отмечена для концентрации лектина 40 μ /мл культуральной среды. Концентрация 100 μ /мл оказывала ингибирующее действие на рост и деление клеток.

Таблица 3

Бласттрансформирующая и митогенная активность лектина
K. blossfeldiana

Концентрация лектина, μ /мл культур. среды	Бластов, %	Митозов, шт. на стекло
Контроль	0,002-0,004	0-1
5	0,1-0,4	15-25
10	4-5	24-38
20	35-50	60-85
40	50-60	110-140
80	3-5	40-41
100	Ингибирование роста клеток	

Указанный способ выделения и очистки лектина *K. blossfeldiana* может быть использован для получения лектинов из других видов каланхоэ, в частности, из *K. pinnata*, уже используемого фармпромышленностью для получения медицинских препаратов.

На предприятиях зеленого строительства вегетативная масса растений каланхоэ Блоссфельда после их отцветания и утраты декоративности в значительной степени идет в отходы, которые могут быть использованы в качестве источника сырья для получения лектина.

Л и т е р а т у р а

1. Лапчик В.Ф., Багрий Л.В. // Охрана, изучение и обогащение растительного мира. - Киев: Вища школа, 1983. - Вып. 10. - С. 96-99.

2. Луцик М.Д. и др. Методы поиска лектинов (фитогемагглютининов) и определение их иммунологической специфичности (Методические рекомендации для биохимиков и иммунологов). - Львов, 1980. - 20 с.

3. Луцик М.Д. и др. Методы исследований углеводной специфичности лектинов: Методические рекомендации. - Львов, 1983. - 22 с.

4. Проблемы медицинской генетики. - М.: Медицина, 1970. - С. 299-300.

5. Луцик М.Д. // Укр. биохим. ж. - 1984. - Т. 56, № 4. - С. 432-436.

ЛЕКТИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ СЕМЯН СОРГО

О.А. Иосипенко, Г.И. Стадник

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

К кормовым злакам, возделываемым в нашей стране, относятся различные виды рода *Sorghum* (сорго) - полиморфного рода с богатым видовым разнообразием. Имеются единичные работы по изучению лектиновой активности семян сорго /2,4/. Изучение лектинов семян сорго расширит наши представления о возможных формах лектинов семейства злаков, выявит либо их сходство, связанное с общностью происхождения, либо различие, возникающее в процессе эволюции.

Нами изучена лектиновая активность 37 сортов культурных и некоторых дикорастущих видов сорго, предоставленных нам Поволжским филиалом Всесоюзного НИИ сорговых культур (Саратов). Экстракцию семян проводили забуференным физиологическим раствором при pH 7,5 и разведении 1:5. Гемагглютинирующую активность и углеводную специфичность определяли стандартными методами /1/. Были определены коэффициенты корреляции активности с некоторыми показателями семян сорго (пигментация, объем и масса). Гемагглютинирующая активность изученных сортов, которые мы разделили на три группы - силосное

(сахарное), зерновое и травянистое, представлена в таблице I. Гемагглютинирующая активность обнаружена у 20 представителей сорго с широким титром агглютинации от 2 до 2048.

Таблица I
Гемагглютинирующая активность семян сорго

Сорта зернового сорго	РГА
Волжское 2	0
Волжское 3	0
Майло 10	0
Кубанское 126	I:128
Кубанское 165	0
Гаолян 147	I:2
Кафрское темно-красное	I:2048
Гаолян К-1043	I:64
Кафрское красное	0
Днепропетровское	0
Низкорослое	0
Заря 106	0
Белозерное	I:8
Хазине 5	0
Хазине 9	I:2
Хазине 13	0
Кармен 481	I:2048
Зерноградское 5	0
Мечта	0
<u>Сорта силосного (сахарного сорго)</u>	
Кинельское 3	I:16
Саратовское развесистое	I:64
Саратовское силосное	I:256
Ранний янтарь 161	I:32
Янтарь красный	I:128
Янтарь 576	I:4
Одесское раннее	0
Одесское 67	0
Камышинское 7	I:2

Продолжение табл. I

Сорта травянистого сорго	РГА
Суданка камышинская	I:2
Суданка II43	I:128
<i>S. halepense</i>	I:32
<i>S. alatum</i>	0
Сорго-просовый гибрид	0
Сардан	0
Саркин	I:4
Солар улучшенный	I:8
Суданка джурунская	0

При изучении распределения гемагглютинирующей активности по частям зерновки семени семи сортов сорго были препаративно разделены на зародыш и эндосперм (таблица 2). Гемагглютинирующая активность была обнаружена только в эндосперме сорго и отсутствовала в зародышах. Лектины других представителей семейства злаковых (пшеницы, ржи, риса и др.) локализируются в сухих семенах и зародышах и отсутствуют в эндосперме /6/, или же выявляют гораздо большие показатели гемагглютинирующей активности в зародышах, нежели в эндосперме (кукуруза) /3, 5/.

Факт нахождения лектинов сорго в эндосперме, возможно, свидетельствует о древности рода *Sorghum* и связанной с этим способностью синтезировать лектины вместе с запасными белками, так как гены, кодирующие синтез лектинов и запасных белков злаков, локализируются на тех же плечах первой хромосомы /5/.

Определение углеводной специфичности экстрактов семян сорго, проявивших лектиновую активность, проводили раститрованными растворами углеводов (200 мМ – 12,5 мМ) в забуференном физиологическом растворе при pH 7,5 (таблица 3).

Специфичность лектинов из трех сортов определялась с рядом простых сахаров, все в конечной концентрации 200 мМ. Из 12 сахаров ингибировали гемагглютинирующую активность: D-галактоза, L-фукоза, N-ацетил-D-глюкозамин, D-глюкоза (в

Таблица 2

Агглютинирующая активность зародышей и эндосперма семян сорго

Сорта сорго	РГА зародышей	РГА эндосперма
Саратовское силосное	0	I:256
Саратовское развесистое	0	I:64
Белозерное	0	I:8
Суданка камышинская	0	I:2
Суданка II43	0	I:128
<i>S. halepense</i>	0	I:64
<i>S. alatum</i>	0	0

Таблица 3

Ингибирование гемагглютинирующей активности семян сорго различными углеводами

160

Углеводы	Ингибирование активности			Min угнетающая концентрация, мМ		
	Белозерное	Саратовское силосное	Саратовское развесистое	Белозерное	Саратовское силосное	Саратовское развесистое
L-фукоза	±	±	+	200	200	25,0
D-галактоза	±	+	+	200	200	12,5
N-ацетил-D-галактозамин	-	-	-	-	-	-
D-лактоза	±	-	-	200	-	-
D-глюкоза	-	+	+	-	200	25,0
N-ацетил-D-глюкозамин	-	+	+	-	200	12,5
Раффиноза	-	-	-	-	-	-
D-манноза	-	-	-	-	-	-
Мальтоза	-	-	-	-	-	-
D-целлобиоза	-	-	-	-	-	-
Инозит	-	-	-	-	-	-
D-рамноза	-	-	-	-	-	-

порядке уменьшения степени ингибирования). Ингибирование реакции агглютинации лектина сорго в присутствии N-ацетил-D-глюкозамина и D-мальтозы отмечено в работе J.N.Neucere/4/. Возможно, такая гетерогенность углеводной специфичности объясняется присутствием в экстрактах семян различных сортов сорго нескольких лектинов, обладающих различной углеводной специфичностью.

В процессе работы выявлена зависимость гемагглютинирующей активности от центра и интенсивности окраски семян сорго (от белого до темно-коричневого). Темно-коричневые семена обладали повышенной гемагглютинирующей активностью по сравнению с желтыми, красными и белыми семенами, коэффициент корреляции, равный +0,59, достоверен при 1% уровне зависимости.

Достоверная связь между агглютинирующей активностью и объемом и массой семян сорго не обнаружена ($r = -0,22$).

Таким образом, в отличие от других злаков, лектиновая активность семян сорго локализована в эндосперме, она значительно различается по сортам и коррелирует с интенсивностью и цветом окраски покровных чешуек семян. Лектины семян сорго гетерогенны по углеводной специфичности.

Л и т е р а т у р а

1. Методы исследования углеводной специфичности лектинов: Методические рекомендации. - Львов: Изд-во Львов. мед. ин-та, 1983.-21 с.
2. Садчикова О.А., Котусов В.В. // Физиология и биохимия культурных растений. - 1985. - Т. 17, № 6. - С. 567-571.
3. Miller R. C., Bowles D.J. // Planta. - 1983.-Vol.157.-N.2. - P. 138-142.
4. Neucere J.N. // J. Agric. Food Chem. - 1982. -Vol.30.-P. 603-604.
5. Payne P.J., Law C.N., Mudd E.E. // Theor. Appl.Genet. - 1980. - Vol. 58. - P. 113-120.
6. Peumans E.C., Stinissen H.M., Carlier A.R.//Planta. - 1982. - Vol. 154. - P. 562-567.

ПОЛИМОРФИЗМ ЛЕКТИНА ПШЕНИЦЫ

Н.Ю. Селиванов, Г.И. Стадник, В.В. Игнатов
Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов АН СССР, г. Саратов

Лектин зародышей пшеницы (АЗП) - один из первых детально охарактеризованных лектинов. В отличие от других злаковых лектинов (рожь, ячмень) АЗП имеет изоформы, наличие которых связано с полиплоидной природой культурных сортов /3, 4/.

Разделение и исследование свойств отдельных изоформ представляет важную задачу, так как отдельные изоформы могут обладать существенным преимуществом по различным видам биологической активности по сравнению с суммарным препаратом АЗП.

Задачей нашей работы было изучение гетерогенности АЗП в зависимости от видовых и сортовых особенностей пшениц. Материалом исследования служили сорта мягкой яровой пшеницы Саратовская 29 и Саратовская 46 (*Tr. aestivum*, 6n), твердой пшеницы Саратовская 4I (*Tr. durum*, 4n) и культурная однозернянка (*Tr. monosocum*, 2n) из коллекции ВИР.

Препараты АЗП выделяли с помощью аффинной хроматографии на колонке с N-ацетил-D-глюкозамин - Toyopearl HW65; разделение на изоформы проводили на установке высокоэффективной жидкостной хроматографии FPLC (LKB, Швеция) на колонке "Моно S"; молекулярную массу изолектинов определяли методом гель-фильтрации на колонке с Toyopearl HW 50 F; основные физико-химические показатели изоформ - изоэлектрическую точку, электрофоретическую подвижность и т.д. - традиционными методами.

Определение изолектинного состава различных сортов и видов пшениц показало его зависимость от плоидности, геномной формулы и сортовых особенностей.

АЗП диплоидной культурной однозернянки, являющейся носителем генома А, представлен одной изоформой I. АЗП твердой пшеницы Саратовская 4I, содержащей геном А и В, представлен изоформами I и 3. Геном Д, несущий хлебопекарные свойства,

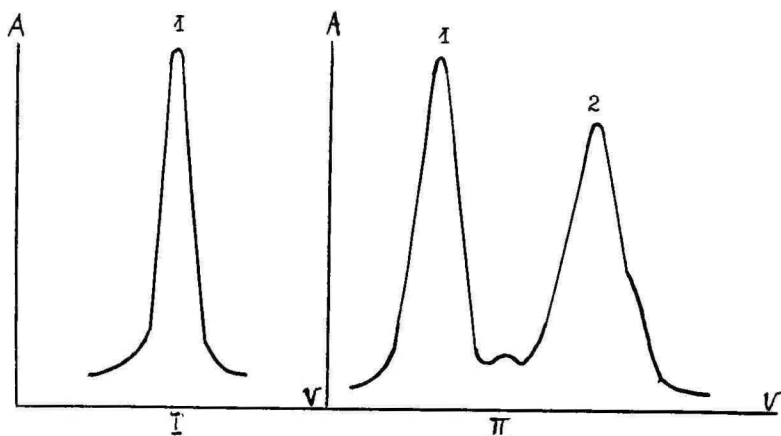


Рис. 1. Изоэлектрический состав АЗП: I - *Triticum molossicum*; II - Саратовская 4I; I - изоформа I; 2 - изоформа 3.

появился у гексаплоидных пшениц значительно позже /1/. АЗП мягких яровых пшениц представлен изоформами I, 2, 3.

Для каждого сорта мягких яровых пшениц характерно свое соотношение изоформ I, 2, 3 (%): для Саратовской 29 - 26:46:28, для Саратовской 46 - 17:36:49. У большинства гексаплоидных пшениц в значительном количестве содержится изоформа 2, что связано, по-видимому, с хозяйственной деятельностью человека, ведущего в процессе эволюции отбор по хлебопекарным свойствам, и вызванного этим увеличением геномной дозы изолектина 2. Типичным представителем таких пшениц является сорт Саратовская 29.

Изолектины незначительно отличались друг от друга по некоторым физико-химическим показателям: изоэлектрическая точка изоформ I, 3 равнялась 8,4, а изоформы 2 - 8,7; изоформы имели разную электрофоретическую подвижность в ПААГ (кислый форец в присутствии 6M мочевины). При определении молекулярной массы изолектинов было выявлено наличие дополнительных

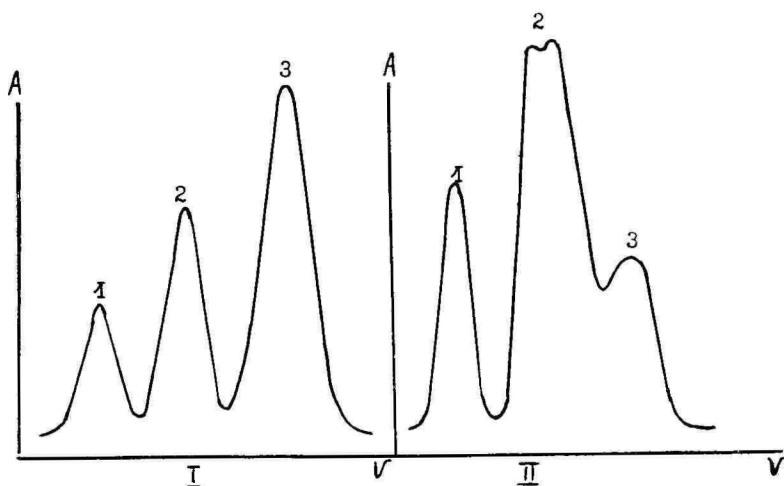


Рис. 2. Изолектинный состав АЗП мягких яровых пшениц
 I - Саратовская 46; II - Саратовская 29;
 I - изоформа I; 2 - изоформа 2; 3 - изоформа 3.

плеч или пиков разной величины.

Препараты изоформ содержали полипептидные цепи двух размеров: с м.м. 21-23 кД и 15-18 кД. Соотношение их зависело от видовых и сортовых особенностей. АЗП синтезируется как белок с м.м. 23 кД в эндоплазматическом ретикулуме, а затем превращается в белок с м.м. 18 кД, который находят в вакуолях и белковоподобных телах [2, 5].

Обе выявленные формы изолектинов не различались по геммагглютинирующей активности и, следовательно, уменьшение м.м. не затрагивает активные центры изоформ. Возможно, полипептид с м.м. 3-5 кД является сигнальным и служит, как это показано на запасных белках семян пшеницы [1], для транспортировки полипептидной цепи лектина от места первичного синтеза к месту дальнейшей локализации.

Обращает на себя внимание тот факт, что профили элюции

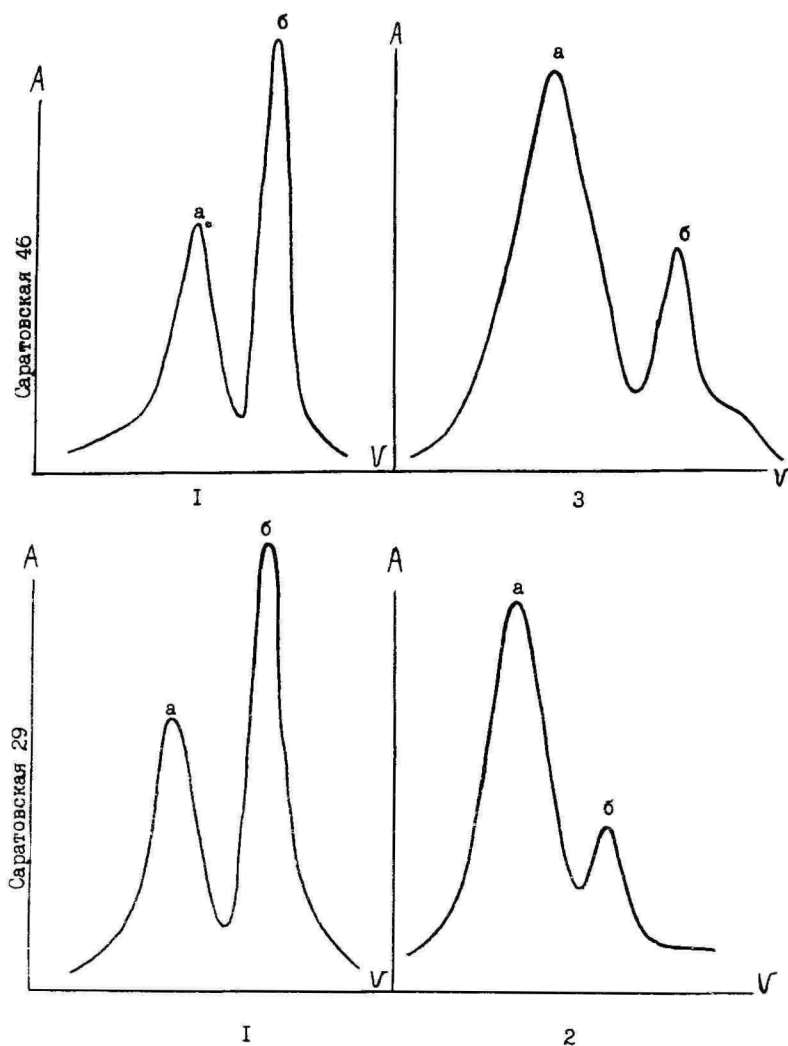


Рис. 3. Гель-фильтрация изоформ АЗП: I - изоформа I;
 2 - изоформа 2; 3 - изоформа 3;
 а - форма с м.м. 21-23 кД;
 б - форма с м.м. 15-18 кД.

изоформ разных пшениц, кодирующихся одним и тем же геномом, сходны между собой. Можно предположить, что уровень процессинга изолектинов генетически детерминирован.

Таким образом, гетерогенность АЗП представлена не только изоформным составом, зависящим от пloidности и сортовых особенностей, но и двумя формами отдельных изолектинов, соотношение которых также зависит от генетических факторов.

Л и т е р а т у р а

1. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. - М.: Наука, 1985. - 272 с.
2. Mishkind M.L., Palevitz B.A., Raikhel N.W. // Science-1983. - Vol. 220. - P. 1290-1292.
3. Peumans W.J., Stinissen H.M., Carlier A.R. // Planta-1982. - Vol. 154. - P. 562-567.
4. Rice R.H. // Biochim. Biophys. Acta. - 1976. - Vol. 444. - P. 175-180.
5. Stinissen H.M., Peumans W.J. // Physiol. Plantz. - 1985. - Vol. 180. - N 2. - P. 85-106.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЛЕКТИНОВ КЛЕЩЕВИНЫ

Д.А. Хашимов, Д.А. Рахимов, Х.Г. Алимов, П.Х. Юлдашев
Институт химии растительных веществ АН Узбекской ССР,
г. Ташкент

Характерным свойством лектинов является их взаимодействие как со свободными моно- и олигосахаридами, так и с остатками углеводов, входящих в состав гликопротеинов, гликолипидов и других углеводсодержащих биополимеров /1/.

Молекулы лектинов имеют сложную четвертичную структуру и содержат не менее двух центров связывания углеводов. Для выявления их в объектах обычно используют реакцию агглютинации суспензии эритроцитов как нативных, так и обработанных ферментами, а также лейкоциты, лимфоциты, опухолевые клетки,

Источники выделения и состав полисахаридов

Источник	Тип полисахаридов	[α] _D	MM	Соотношение моносахаридов							Основной тип связи	Преципитаты
				Rha	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal	Fru		
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Eremurus regelii</i> Regel	Глюкоманнан	-31,2 (с 0,5 H ₂ O)	110000	-	-	-	2	I	-	-	β -I → 4	++ (осадок)
<i>E. lactiflorus</i>	Глюкоманнан	-21,7 (с 0,7)	80000	-	-	-	2,7	I	-	-	β -I → 4	++
<i>E. olgae</i>	Галактоарабан	-	-	-	I	-	-	-	I	-	-	++
<i>E. regelii</i>	Пектин ^ж	+180 (с 0,2)	79000	19,6	3,3	I	-	-	-	5,4	α -I → 4	++
<i>Malus domestica</i>	Пектин ^ж			9,2	I	-	-	-	-	I	α -I → 4	+
<i>Ungernia vee-denskyi</i>	Маннан	-37	10000	-	-	I	79	2	-	-	β -I → 4	++
<i>U. ferganica</i>	Маннан	-34	95000	-	I	-	90	I	-	-	β -I → 4	++
<i>Detilium rad-deona</i>	Глюкан			-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Allochrita gypsophilades</i>	Глюкогалактан	+180 (I,0)	2000	-	-	-	-	I	5	-	α 6 → I β 2 → I	- -
<i>Polygonatum severzovii</i>	Глюкофруктан		21000	-	-	-	-	I	-	II	β 2 → I β 6 → 2	- -

Продолжение табл.

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>Gossipium</i>	Олигосахарид		500	-	-	-	-	I	I	I	β -6 \rightarrow 2	-
<i>Hirsutum</i> L.	"-										β -2 \rightarrow I	-
<i>Inula grantus</i>	Инулин		5000	-	-	-	-	-	-	-	β -2 \rightarrow I	-
<i>Jucca glori- osa</i>	Фруктан	-38 (с I,0)	2500	-	-	-	-	I	-	I4	β -2 \rightarrow I β -6 \rightarrow 2	-

* - Содержит < 50% галактоуроновой кислоты.

микроорганизмы, дрожжи и искусственные частицы /2/.

Титр агглютинации в зависимости от условий реакции существенно отличается, определенные трудности возникают также из-за происхождения эритроцитов и их предварительной обработки. В связи с этим поиск методов выявления лектинов имеет важное значение.

Мы исследовали влияние 14 индивидуальных полисахаридов, выделенных из растений, на лектины клещевины. Источники выделения и состав полисахаридов приведены в таблице.

Водорастворимые белки получали из обезжиренных охлажденным петролейным эфиром семян клещевины *Ricinus communis* L. экстрагированием водой в соотношении 1:10 в течение 1 часа. Надосадочную жидкость получали центрифугированием при 15.000 об/мин в течение 15 минут. Для проведения реакции преципитации 0,5 мл экстракт инкубировали в пробирках с 0,5 мл растворами полисахаридов, содержащим $1 \cdot 10^{-3}$ - 10^{-6} М в течение 30 минут при комнатной температуре. Анализ результатов учитывали визуально по образованию осадка. Для сравнения пользовались методом обнаружения лектина с помощью эритроцитов крови кролика по методу /3/.

Результаты преципитации указывают, что полисахариды β - 1 \rightarrow 4 - связанные - глюкоманнан, маннаны и галактоарабаны - дали положительные реакции с экстрактом клещевины в виде нерастворимого осадка в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ М, что указывает на взаимодействие лектина с этими полисахаридами.

Таким образом, для выявления лектинов клещевины можно использовать глюкоманнан, галактоарабан и нативноацетилированные маннаны.

Л и т е р а т у р а

1. Линевиц Л.И. Успехи биологической химии. - 1979. - 20. - С. 71.
2. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. - Львов: Виша школа, 1981. - 156 с.
3. Методы поиска лектинов (фитогемагглютининов) и определение их иммунохимической специфичности. Львов. - 1980.

ЛЕКТИНЫ ЗЕРНА И ПРОРОСТКОВ СОРТОПОПУЛЯЦИЙ КУКУРУЗЫ

В.И. Рыбак, Е.А. Лепехин, А.И. Яловой

Всесоюзный научно-исследовательский институт кукурузы

Взаимодействие лектинов с углеводами в растительном организме свидетельствует о их важной роли начиная с момента прорастания семян и в течение всего вегетационного периода развития.

Предпринятыми ранее исследованиями лектинов кукурузы выявлено, что они обнаруживаются в листьях, анатомических частях проростков, в выделениях интактных корней, стеле проростка и рыльцах кукурузы /3, 6, 7, 9, 12/. Попытки обнаружения лектинов в покоящемся зерне кукурузы не всегда приводили к успеху /1, 8, 11/.

При изменении условий экстракции из муки покоящегося зерна кукурузы было обнаружено, что агглютинирующая активность присутствовала во всех исследованных сортообразцах /4/. Было установлено, что основная углеводная специфичность обнаруженных лектинов проявляется по отношению к лактозе и галактозе и в меньшей степени к другим углеводам. В покоящемся зерне кукурузы активность лектинов локализована только в зародыше и его частях /4, 5/.

Целью настоящей работы было проведение скрининга сортообразцов кукурузы (линий, гибридов и сортов), относящихся к разным сельскохозяйственным группам, изучение в них активности и гетерогенности лектинов.

Материалы и методы

Экстрагирование и определение активности лектинов из зерна кукурузы полной спелости проводили, как описано ранее /4, 5/. Проростки зерна кукурузы получали согласно /2/.

Очистку препаратов лектинов для определения физико-химических свойств проводили посредством отделения балластных белков, выпадающих в осадок при последовательном доведении pH экстракта до значений 9,0 и 4,0 и осаждения лектина суль-

фатом аммония при 50% насыщения. Осадок перерастворяли в минимальном объеме ЗФР и обессоливали на колонке с Акрилексом Р-10. Определение молекулярных масс лектинов проводили методом гель-хроматографии на сефадексе Г-200.

Определение констант ассоциации лектинов проводили с 4-метилумбеллиферил- β -D-галактопиранозидом посредством равновесного диализа белка против раствора углевода с концентрацией 10 мг/л в течение 4 часов. Концентрацию углевода определяли спектрофотометрически, используя значение коэффициента молярной экстинкции, равное $1,36 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1} / 10/$.

Результаты и обсуждение

В таблице I представлены результаты скрининга 193 сортообразцов кукурузы - инбредных линий, сортов и гибридов различного происхождения, относящихся к разным сельскохозяйственным группам кукурузы - рисовой, сахарной, зубовидной, кремнистой и кремнисто-зубовидной. Экстракты всех сортообразцов кукурузы обнаруживали активность лектинов, уровень которой был от 2 ЕА до 1024 ЕА. Групповой изменчивости титра активности лектинов в зависимости от принадлежности к самоопыленным линиям, гибридам или сортам обнаружено не было. Не выявлено зависимости активности лектинов от принадлежности сортообразца к той или иной ботанической группе кукурузы. Максимальной активностью (1024 ЕА) лектинов чаще обладали образцы кукурузы, относящиеся к самоопыленным линиям.

Таблица I

Результаты скрининга кукурузы на присутствие в экстрактах активности лектинов

Сортообразцы	Количество сортообразцов	Активность лектинов, ЕА	
Самоопыленные линии	141	1024	2
Гибриды	46	512	2
Сорта	6	128	4
Проростки линий	25	5,12*	0,26*

* - на 1 мг сухого вещества.

В экстрактах из проростков (от I до 7 дней проращивания) было установлено, что активность лектинов и в этом случае присуща всем исследованным сортообразцам вне зависимости от их генетического происхождения.

Изучение влияния простых сахаров (D-лактозы, D-галактозы, L-арабинозы, 2-дезоксид-рибозы, L-рамнозы, D-маннозы, D-глюкозы, метил- α -D-глюкозы, D-фруктозы, D, L-сахарозы, D-ксилозы, D-мальтозы и D-маннита) указывает на существенные различия между линиями и гибридами по агглютинирующей активности и по способности лектинов взаимодействовать с углеводами. В частности, лектины зерна линии F 522 не взаимодействовали ни с одним из тестированных углеводов; таким же свойством обладал гибрид P 502 x F 522, лектин из которого реагировал только с D-лактозой.

Учитывая первоначальные данные /4, 5/, что лектины зерна способны снижать активность в присутствии лактозы, был проведен скрининг на 169 образцах (130 линиях, 34 гибридах и 5 сортах) по связыванию лактозы. II линий (около 10%) и I сорт содержали лектины, не снижающие своей активности в присутствии 0,1 M лактозы. Гибриды, в том числе и те, которые имели в качестве одной из родительских форм линию или сорт с "лактозорезистентными" лектинами, снижали свою активность в присутствии лактозы.

На "лактозочувствительных" сортообразцах показано, что минимальные концентрации лактозы, необходимые для полного подавления активности в экстракте с титром 1/8, для разных сортообразцов оказались различными. Они изменялись от 100 до 1,6 мМ, т.е. более чем в 60 раз. Те же величины, определенные для лектинов четырехдневных проростков, изменялись от 160 до 10 мМ.

Таким образом, у представителей одного биологического вида *Zea mays* могут существовать лектины, значительно различающиеся между собой константами ассоциации с углеводами.

Существующая гетерогенность лектинов подтверждена и физико-химическими исследованиями на инбредных линиях (таблица 2).

Проведенные исследования подтвердили вывод о том, что лектины содержатся во всех исследованных сортообразцах куку-

Таблица 2

Физико-химические свойства лектинов самоопыляемых
линий кукурузы

Линия	Молекулярная масса лектина, кДа	Константа ас- социации, M^{-1}	Титр агглютиниру- ющей активности, мг белка/мл
IS 185	440,0	$8,75 \cdot 10^4$	10,25
Oh 43a	176,6	$1,40 \cdot 10^5$	5,86
P 165	206,8	$3,75 \cdot 10^5$	9,91

рузы, и уровень их активности для различных сортообразцов варьирует в широких пределах. Не обнаружена групповая специфичность лектинов ни в зависимости от принадлежности сортообразцов к той или иной ботанической группе, ни от принадлежности их к сортам, гибридам или линиям.

Различия в агглютинирующей активности лектинов в сортообразцах кукурузы, а также их различия в углеводной специфичности /II/ и физико-химических свойствах свидетельствуют о том, что у представителей одного биологического вида могут существовать лектины, существенно различающиеся по гетерогенности и по константам ассоциации с углеводами.

Л и т е р а т у р а

1. Гольнская Е.А. // Молек. биол. - 1979. - Вып. 23. - С. 34-45.
2. Лепехин Е.А., Яловой А.И., Рыбак В.И. // Физиол. раст. - 1986. - 33, № 2. - С. 390-394.
3. Марков Е.Д. // Изв. СО АН СССР. - 1980. - № 15(3). - С. 85-89.
4. Рыбак В.И., Лепехин Е.А., Яловой А.И. // Бюлл. ВНИИ кукурузы. - 1985. - № 1(64). - С. 7-12.
5. Рыбак В.И., Лепехин Е.А., Яловой А.И. // Физиол. и биохим. культ. раст. - 1985. - 17, № 1. - С. 66-70.
6. Adams C.A., Rinne R. W. // New Phytol. - 1981. - Vol. 89. - N 1. - P. 1-14.
7. Bowles D.J., Kausz H. // Plant Sci. Lett. - 1976. -

Vol. 4. - N 6. - P. 411-418.

8. Boyd W.C., Requera R.M. // J. Immunol. - 1949. - Vol. 9. - N 3. - P. 333-339.

9. Gietl C., Zigler H. // Naturwissenschaften. - 1979. - N. 3. - P. 161-162.

10. Khan J.M., Mazumber T., Pain D., Caur N., Surolia A. // Eur. J. Biochem. - 1981. - Vol. 113. - N 3. - P. 471-476.

11. Roy S., Bhalla V. // Austral. J. Exp. Biol. and Med. Sci. - 1981. - Vol. 59. - N 2. - P. 195-201.

12. Tigelman - van Krugten V. A. H., Antony v. Leevenhock J. // Microbiol. Serol. - 1956. - Vol. 22. - P. 289-303.

ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКИЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТИ

Н.П. Королев, Г.Я. Алексидзе, Э.И. Вискребенцева,
Р.А. Гуськова, И.И. Иванов, В.И. Осипов,
В.А. Свинтицких, Г.В. Сумаруков, Г.Е. Федоров
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Москва

Для определения активности лектинов применяются различные методы (турбидиметрии и радиоизотопные), основанные на их способности агглютинировать клетки или преципитировать гликоконъюгаты. В последнее время получили развитие методы иммуоферментного анализа, в которых пара лектин-лиганд замещает пару антиген-антитело. Во всех случаях, как и при традиционном методе микротитрования по Такачи, предусматриваются выделение клеток и их отмывка, проведение целого ряда биохимических операций, что для лабораторий, непосредственно не работающих с клетками, затруднительно. Поэтому мы предлагаем метод, требующий для работы только наличия полярографического кислородного электрода.

Принцип определения лектиновой активности основан на способности лектинов, "посаженных" на селективные фильтры,

связывать рецепторные к лектину (конканавалину А) углеводные остатки глюкозооксидазы, активность которой можно определить, измеряя скорость поглощения кислорода полярографически в ходе окисления глюкозы.

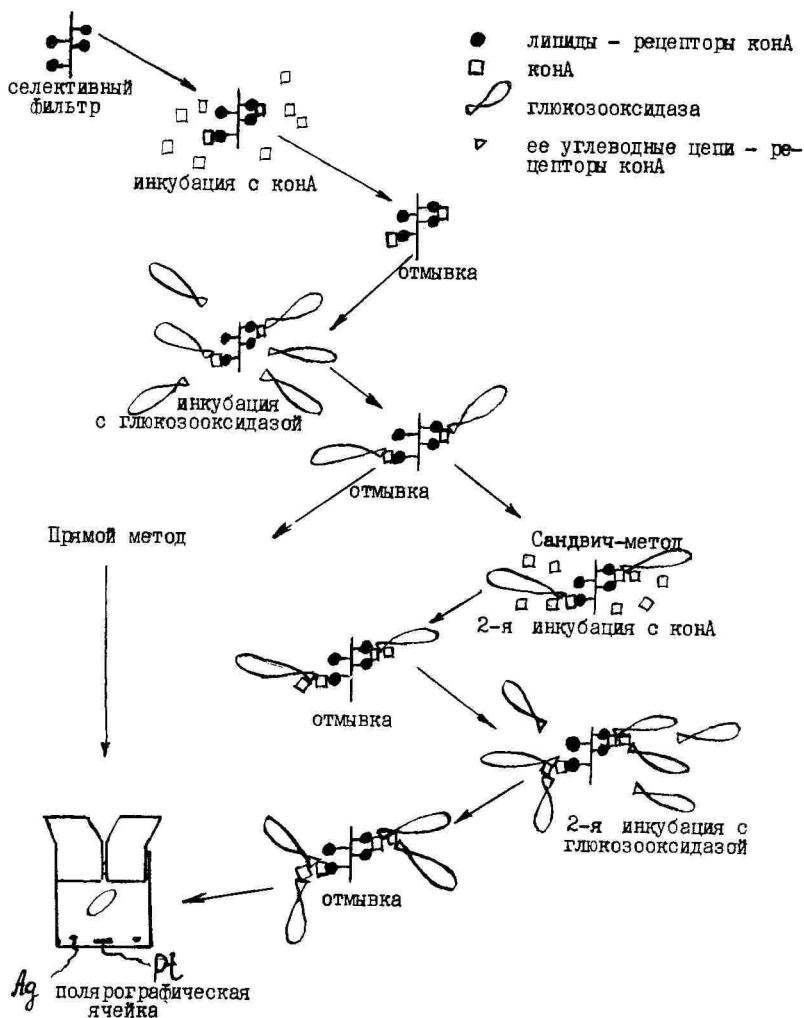
Связывающие конканавалин А (кoнА) фильтры получали на основе нитроцеллюлозных фильтров Сынпор (ЧССР) по следующей методике: экстрагированные из теней эритроцитов человека по методу Фолча липиды в концентрации 3 мг/мл разбавляли вдвое ацетоном; к 1 мл такой смеси добавляли 40 мг фильтров. После полного растворения фильтров их выливали на чашку Петри, а растворитель отгоняли при слабом разрежении, создаваемом водоструйным насосом. Получаемая толщина прозрачных фильтров составляла не более 10 мкм. Из фильтров прессовали кружки диаметром 12 мм и хранили их в холодильнике при температуре 4-10°C при слабом разрежении в эксикаторе в течение года. Применяли два способа инкубации фильтров с кoнА (рис.).

Прямой способ: 1) инкубация в растворе с кoнА от 30 мин до двух часов при комнатной температуре; 2) три отмывки по два раза в растворе, на котором был приготовлен кoнА: 10 мМ Na-фосфатный буфер pH 7,4; 0,5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина; 150 мМ NaCl; 3) инкубация 30 мин в растворе того же состава + 2 мг/мл глюкозооксидазы (Олайн); 4) три отмывки по 7 раз в растворителе.

Последующее использование сандвич-метода основано на димерной субъединичной структуре глюкозооксидазы и высоком (до 18%) содержании в ней углеводов, в том числе рецепторов кoнА - Д-маннозы и глюкозамина /4/.

Сандвич-способ: аналогичные предыдущему способу 4 операции, затем 5) инкубация в течение 30 с в растворе с кoнА; 6) три отмывки по два раза в растворителе указанного выше состава; 7) инкубация в течение 10 мин в растворе глюкозооксидазы (2 мг/мл) в растворителе того же состава; 8) три отмывки по 7 раз в растворителе того же состава. Основная работа на этой стадии свелась к оптимизации процедур инкубации и отмывки.

Определение активности глюкозооксидазы проводили на Na-фосфатном буфере при pH 5,5 (оптимум pH нашего препарата), содержащем 150 мМ NaCl. Реакцию начинали после прописывания



Схематическое изображение принципа определения лектинной активности полярографическим методом

контрольного поглощения кислорода в ячейке, обусловленного электродным процессом, добавлением 20 мкл 2 М раствора глюкозы в дистиллированной воде. Поглощение кислорода регистрировали с помощью электрода, описанного в /1/, и полярографа LP -7е, сигнал с которого, помимо базового самописца, подавали на самописец КСП-4 (1 с, 1 мВ) при обычном использовании компенсации. Измерения проводили при температуре 20°C в термостатируемой ячейке.

Поскольку контрольное поглощение кислорода в ячейке является ее константой, поглощение кислорода в опыте выражали как отношение тангенсов углов наклона записи поглощения кислорода в опыте ($tg \beta$) к контролю ($tg \alpha$). В контроле записывали поглощение кислорода от фильтров, прошедших всю процедуру операций при прямом методе, однако без добавления на стадии I конА. При сэндвич-методе такой вариант также был, в сущности, контролем. При расчете контрольного поглощения кислорода в ячейке пренебрегали зависимостью концентрации кислорода в растворе от атмосферного давления, считая, что при 20°C концентрация кислорода в растворе составляет 259 мкМ (для 0,9% раствора NaCl в воде /2/). Остаточный ток в ячейке составлял 9% от номинального значения при полном насыщении раствора кислородом. Поглощение кислорода, обусловленное электродным процессом, составляло 0,78 нмоля O_2 в минуту (объем ячейки - 1 мл). Эти данные можно легко пересчитать в поглощение кислорода в нмолях/мин, умножив значения $tg \beta / tg \alpha$ на 76,696.

Графики зависимости $tg \beta / tg \alpha$ от концентрации конА и зависимости $tg \beta / tg \alpha$ от логарифма концентрации конА представлена на рисунках 2 и 3 соответственно. Первая зависимость линейна в области малых концентраций конА, коэффициент линейной корреляции составляет 0,96. При высоких концентрациях конА возможно открепление его от фильтров в присутствии глюкозооксидазы, и, таким образом, снижение скорости измеряемого поглощения кислорода. Вторая зависимость в полулогарифмических координатах линейна с коэффициентом корреляции 0,94. Отклонение от линейности при самой высокой концентрации конА может быть вызвано аналогичной причиной. При сравнении этих двух методов ясно видна более высокая чувствительность (при-

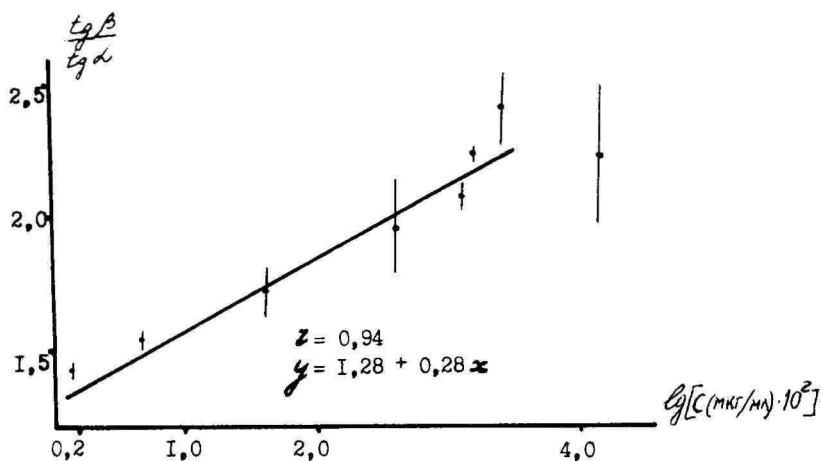


Рис. 2.

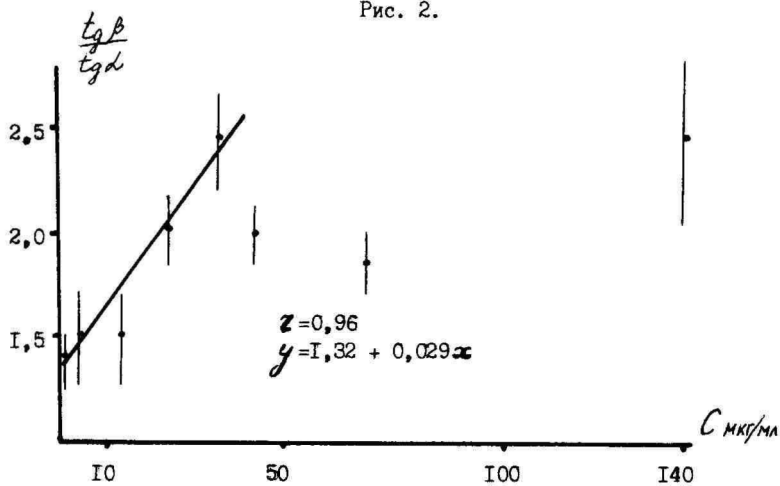


Рис. 3.

мерно на порядок) сандвич-метода. Отметим, что введение сандвич-стадии в фермент-сопряженном иммунохимическом анализе также повышает чувствительность примерно на порядок /3/. Нижний предел определяемой концентрации конА примерно на порядок ниже нижнего предела при микротитровании по Такачи (около 100 нг/мл).

На всех приведенных графиках в качестве разброса указано значение дисперсии (± 6).

Л и т е р а т у р а

1. К.Ф. Шольц, Д.Н. Островский. Методы современной биохимии, - М.: Наука, 1975. - С. 52.

2. Green E.J., Carriit D.E. // J. Marine Res. - 1967. - Vol. 25. - P. 140.

3. Parstmann B., Parstmann T., Seifert R., Meisel H., Nügel E. // Clinica Chimica Acta. - 1982. - Vol. 122. - P. 1.

4. Zukin R.S., Hollis D.P. // J. Biol. Chem. - 1965. - Vol. 240. - N 5. - P. 2209.

ЛЕКТИНЫ БАКТЕРИЙ РОДА AZOSPIRILLUM

Ю.В. Итальянская, В.Е. Никитина,

Е.Г. Пономарева, С.А. Аленькина

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

Бактерии рода азоспирилл известны как свободноживущие почвенные азотфиксирующие бактерии, способные к образованию ассоциаций с корнями злаковых растений, в том числе таких ценных сельскохозяйственных культур, как пшеница, ячмень, просо, рис. Рядом исследователей установлено, что инокуляция азоспириллами в ряде случаев оказывает существенное положительное влияние на рост, развитие и, в конечном счете, на урожайность этих культур /6/. Однако молекулярные основы ассоциативных взаимоотношений бактериальных и растительных клеток остаются невыясненными. Существовавшая на протяжении

ряда лет гипотеза об участии растительных лектинов в специфическом межклеточном узнавании в системе "бактерия - растение" не нашла однозначного подтверждения из-за противоречивости экспериментальных данных. Возможная роль бактериальных лектинов в процессах образования эффективных симбиотических систем почвенных бактерий с высшими растениями совершенно не изучена.

Целью настоящей работы явилось обнаружение и изучение гемагглютининов (лектинов) почвенных азотфиксирующих бактерий рода азоспирилл.

В предварительных исследованиях было обнаружено, что клетки *Azospirillum brasilense* Sp7 обладают способностью избирательно агглютинировать нативные человеческие эритроциты 0 (I) группы крови. В дальнейшем с клеточной поверхности бактерий был выделен гемагглютинин (лектин), специфичный к L-фукозе, который представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 36000Д. Участие белкового фрагмента молекулы в специфическом связывании углеводов подтверждено ингибирующим действием протеаз (в частности трипсина) на гемагглютинирующую активность (ГА) лектина.

Характерными свойствами фукозоспецифичного лектина азоспирилл является термоустойчивость (прогревания его до 80°C не сопровождается сколько-нибудь значительной потерей ГА), а также склонность к агрегации вплоть до образования нерастворимых частиц. При этом подавляется специфическое связывание фукозосодержащих углеводов. Предполагается, что сшивка молекул лектина в агрегатах происходит по углеводсвязывающим сайтам.

Аминокислотный состав фукозоспецифичного лектина отличается преобладанием кислых аминокислот и низким содержанием цистеина. Особый интерес представляет выявление аминокислот, входящих в сайты связывания углеводов. Отмечено большое сходство лектина азоспирилл и фукозоспецифичного лектина стрептомицетов, выделенного в Японии, в содержании таких аминокислот, как гистидин, аргинин, цистеин, что позволило предположить участие, по крайней мере некоторых из них, в специфическом связывании L-фукозы /2/. Кроме того, потеря лектином гемагглютинирующей активности под действием трипси-

на также косвенно указывает на роль аргинина в функционировании углеводспецифичных сайтов, поскольку известно, что этот фермент гидролизует молекулы белков по месту связей, в которых участвуют карбоксильные группы аргинина или лизина.

Эксперименты по выявлению влияния гидрофильных аминокислот на агглютинацию эритроцитов под действием фукозоспецифичного лектина *A. brasiliense* Sp7 показали, что гемагглютинирующая активность ингибируется аргинином, а также гистидином, цистеином (таблица).

Таблица

Ингибирующее влияние гидрофильных аминокислот на ГА фукозоспецифичного лектина

Аминокислоты	Минимальная ингибирующая концентрация (в М)
L-аргинин солянокислый	$6,5 \times 10^{-4}$
DL- α -аланин	-
L-гистидин солянокислый	$1,25 \times 10^{-3}$
DL-лизин солянокислый	-
L-аспарагин	-
DL-треонин	-
DL-серин	-
L-цистеин солянокислый	$1,25 \times 10^{-3}$

Эти данные могут быть объяснены конкурированием свободных аминокислот с соответствующими аминокислотными остатками углеводсвязывающих сайтов молекулы лектина за углеводные рецепторы /1/.

Интересно отметить, что аргинин играет уникальную роль в процессах взаимодействия в самых различных системах. Он участвует в связывании с субстратом ферментов гликолиза /5/; доказана его функция в качестве контактного участка в гаптенсвязывающих сайтах протеина 315 миеломы /3/; наконец, аргинин участвует во взаимодействиях олигонуклеотидов с аргининсодержащими пептидами /4/.

Ингибирование ГА фукозоспецифичного лектина низкими концентрациями аргинина свидетельствует о том, что эта аминокислота

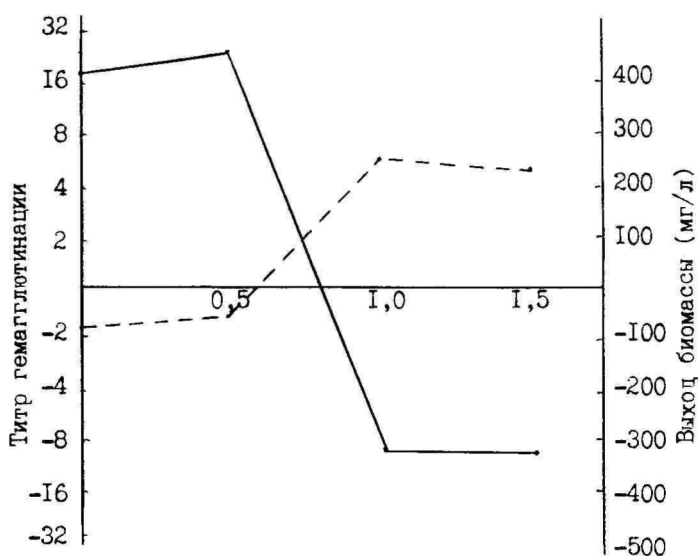


Рис. 1. Влияние пептона на геагглютинирующую активность.

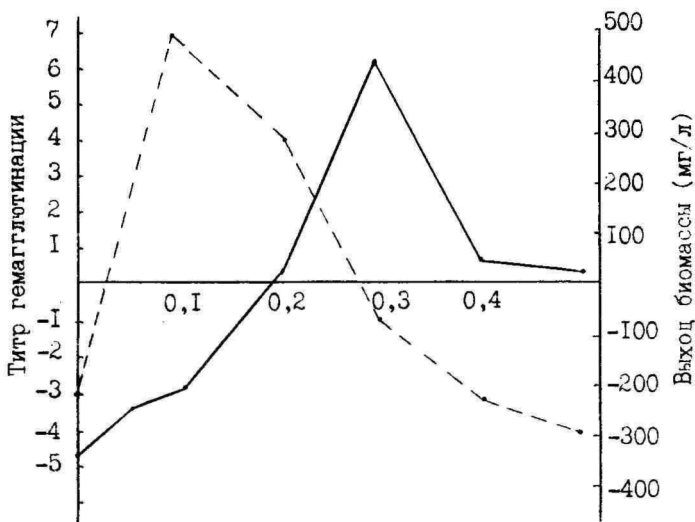


Рис. 2. Влияние $M O_4$ на геагглютинирующую активность и выход биомассы.

Примечание: "—" титр геагглютинации

"- - -" выход биомассы.

кислота может функционировать в качестве контактного участка между бактериями и эритроцитами в процессе агглютинации.

На поверхности клеток другого типового штамма азоспирилл *A. lipoferum* 59В обнаружен лектин, специфичный к L-арабинозе, маннозе, глюкуроновой кислоте. По ряду свойств (термоустойчивость, склонность к агрегации, потеря гемагглютинирующей активности под действием протеаз) лектин этого штамма азоспирилл сходен с фукозоспецифичным.

С помощью математических методов планирования эксперимента проведено изучение влияния различных факторов среды культивирования на лектиновую активность обоих типовых штаммов азоспирилл. Показано, что наиболее существенное влияние на гемагглютинирующую активность клеток азоспирилл оказывают соли магния и кальция, источники азота и углерода, температура и pH среды. Анализ полученных данных позволяет сделать основной вывод: стимулирование лектинообразования бактериальными клетками происходит в условиях, неблагоприятных для роста культуры, и, напротив, использование для выращивания бактерий богатых питательных сред с оптимальными значениями температуры и pH приводит к элиминации лектиновой активности (рис. 1, 2).

Дальнейшее изучение физико-химических и биологических свойств лектинов почвенных бактерий будет способствовать не только более полному пониманию молекулярных основ взаимоотношений бактериальных и растительных клеток в симбиотических азотфиксирующих системах, но и выяснению возможности практического применения препаратов этих биологически активных соединений.

Л и т е р а т у р а

1. Дворкин В.М. // Бюлл. Эксп. биол. и мед. - 1985. - № 10. - С. 420-422.
2. Kameyama T., Oishi K. Тампакусичу какусан косо. - 1983. - Т. 28. - Р. 132-145.
3. Klostergaard J., Krasz A. et al. // *Immunochemistry*. - 1977. - Vol. 14. - P. 107-110.

4. Porschke D. // Eur. J. Biochem. - 1978. - Vol. 86. - P. 291-299.

5. Riordan J., McElvany K., Borders C. // Science.-1977.- Vol. 195. - P. 884-886.

6. Tarrand J., Krieg N., Döbereiner J. // Canad. J. Microbiol. - 1978. - Vol. 24. - N 8. - P. 967-980.

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА АЛАНИНОВОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ
РИЦИНА-Т И ВЫДЕЛЕНИЕ ДВУХ ФОРМ АГГЛУТИНИНА
ИЗ СЕМЯН СРЕДНЕАЗИАТСКОЙ КЛЕЩЕВИНЫ

Д.А. Хашимов, Х.Г. Алимов, П.Х. Юлдашев
Институт химии растительных веществ
АН Узбекской ССР, Ташкент

Ricinus communis L. - клещевина обыкновенная - широко распространенная масличная культура. Семена содержат около 50% масла и 18% белка.

Первое токсичное вещество, вызывающее гемагглютинацию - рицин, было обнаружено в 1888 году Н. Stilmark в водном экстракте семян клещевины /15/. Затем гемагглютинирующая активность была обнаружена в экстрактах многих растений: выделили абрин, кротин, робин и др. фитогемагглютинины /4, 6, II/. Природа рицина, абрина и других подобных токсичных веществ оставалась до конца прошлого столетия совершенно не известной.

В 1905 г. Т.В. Osborn, Л.В. Mendel /14/ впервые охарактеризовали рицин как вещество белкового характера. Полученный препарат наряду с сильным токсическим действием (0,5 мкг/кг для кролика), обладал высокими гемагглютинирующими и протеолитическими активностями. Не исключалось также, что токсическое действие рицина обусловлено присутствием небольшого пептида или низкомолекулярного соединения. Однако ни адсорбция на некоторых носителях, ни очистка с использованием солей тяжелых металлов, а также частичный гидролиз, не приводили к выделению низкомолекулярного активного компонента /9/.

Б. Kabat et al./10/ выделили рицин В-I, однородный по

данном электрофореза и ультрацентрифугирования. Препарат был токсичным в количестве 0,4 мкг/кг и обладал гемагглютинирующей способностью.

Гораздо позже М. Kunitz, M.R. McDonald /8/ удалось получить рицин в кристаллической форме. Хотя полученный кристаллический рицин был гомогенен, кривые растворимости указывали на наличие более чем одного белкового компонента. Авторы предположили, что гемагглютинирующая активность обусловлена одним белком, а токсичность - другим.

E. Le Breton, Y.Moule выделили аморфный рицин, названный рицином Т. Хотя этот рицин не кристаллизовался в условиях М. Kunitz, но проявлял аналогичную токсичность и сильную протеолитическую активность /12/.

Значительные успехи в области рицина достигнуты благодаря работам группы японских исследователей во главе с M.Funatsu, которые довели очистку рицина и агглютинина до физиологической гомогенности. Были выделены рицин Д /5/, рицин Е /13/ и рицин-варианты /7/, отличающиеся между собой по молекулярному весу, изоэлектрической точке и по токсичности. Установлена первичная структура двух рицинов Д и Е /1, 2/, которые состоят из двух субъединиц - изолейциновой (А) и аланиновой (В). Токсичность обусловлена А-цепью, В-цепь функционирует в качестве носителя токсичной субъединицы, действие которой проявляется после специфического взаимодействия с рецепторами мембран чувствительных клеток. Во всех изоформах рицина токсичные субъединицы идентичны, различия наблюдаются в первичной структуре В-субъединиц.

В данной работе сообщается о выделении новой разновидности рицина и двух форм агглютининов из семян среднеазиатской клещевины и установлении первичной структуры аланиновой цепи рицина Т.

Рицин Т и агглютинины А₁ и А₂ выделены и очищены до гомогенного состояния из обезжиренной муки семян клещевины экстрагированием водой с последующими гель-фильтрацией на сефадексе Г-75, ионообменной хроматографией на ДЭАЭ- и КМ-целлюлозах (рис. 1, 2, 3, 4).

Гомогенность полученных белков оценивали диск-электрофорезом, ультрацентрифугированием и изоэлектрофокусированием

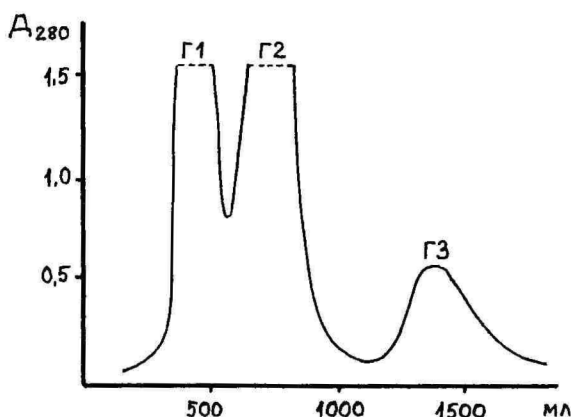


Рис. 1. Гельхроматография сырого рикцина на сефадексе Г-75. Колонка 4 x 100 см; скорость 32 мл/ч.

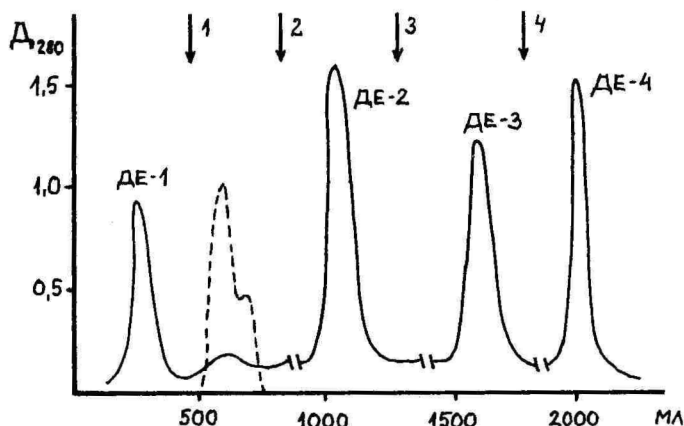


Рис. 2. Хроматография фракций Г-2 на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюент - 0,005 М трис-НСI буфер рН 8,5, содержащий 0,01 (1), 0,015 (2), 0,025 (3), 0,04 (4) и 0,2 М NaCl.
 ДЕ-1 - риксин Е (М.в. 64000, рН-8,8);
 ДЕ-2 - риксин Т (М.в. 58000, рН-7,1);
 ДЕ-3 - агглютинин А₁ (М.в. 98000, рН-6,2, титр- I:256);
 ДЕ-4 - агглютинин А₂ (М.в. 120000, рН-5,9, титр- I:1048);
 - - - - - Риксин Д (М.в. 60000, рН-7,34).

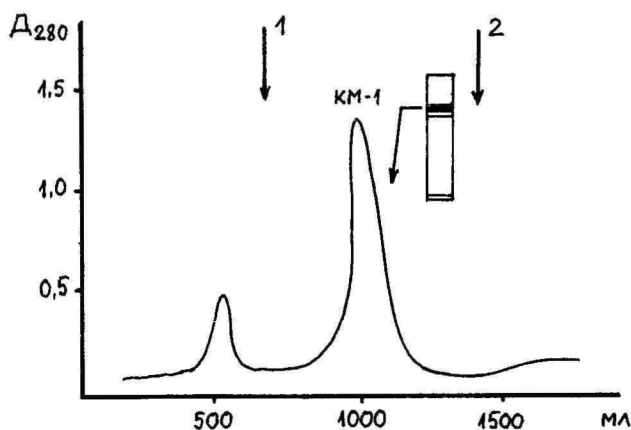


Рис. 3. Хроматография фракции ДЕ-2 на колонке с КМ-целлюлозой. Элюент - 0,005 М фосфатный буфер рН 6,5, содержащий 0,01 (1), 0,02 (2) М NaCl. Колонка 2,5 x 30 см., скорость - 20 мл/ч.

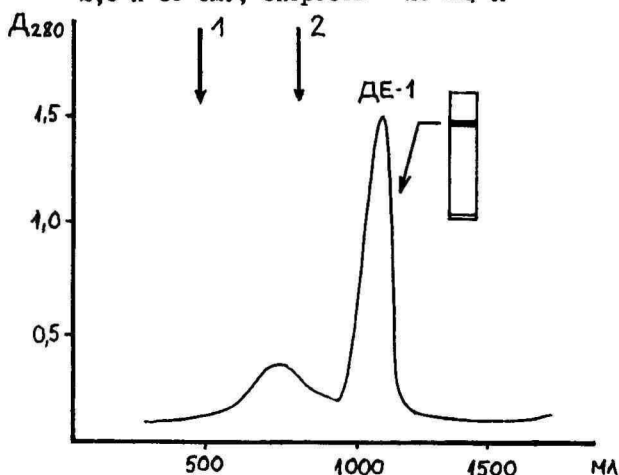


Рис. 4. Хроматография фракций КМ-1 на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой. Элюент - 0,005 М трис-НСI буфер рН 8,5, содержащий 0,015 (1), 0,025 М NaCl. Колонка 2,5 x 30 см., скорость 20 мл/ч.

на амфוליновых носителях. Результаты представлены в таблице I.

Таблица I

Физические константы изотоксинов семян клеверины

Изотоксины	Молекулярный вес	Изоэлектрическая точка	Кэфф. седм.
Рицин Т	58000	7,0-7,1	4,60 s
Рицин Е	64000	8,8	4,45 s
Рицин Д	60000	7,34	4,64 s
Рицин-вариант	57000	7,25	4,60 s
Рицин	65000	-	-
Рицин (фр-я Д)	65000	7,1	-
Рицин (фр-я О)	67000	-	-

Определены мол. вес агглютинаина А-1 и А-2 - 125 и 98 кДа, изоэлектрическая точка 6,8 и 5,9, содержание углеводов 14,5 и 4,5%, а также гемагглютинирующая активность I:256 и I:1048 соответственно.

Для изучения четвертичной структуры рицин Т восстанавливали 2-меркаптоэтанолом в присутствии 8 М мочевины с последующим карбоксиметилированием. Субъединицы разделяли на ДЭАЭ-целлюлозе при pH 7,0. Гомогенность оценивали определением N-концевых аминокислот. Молекулярный вес субъединиц определяли электрофорезом в ПААГ в присутствии ДДС-на, который дал значение 30 кДа для изолейциновой и 28 кДа - аланиновой субъединиц. Амфолин-электрофорез в интервале pH 3-10 показал значение pH 7,5 для изолейциновой и 4,5 - для аланиновой субъединиц. Аминокислотный состав, N- и C-концевые аминокислоты представлены в таблице 2.

Для установления первичной структуры были проведены триптический, бромциановый, химотриптический и частично кислотный гидролизы.

Пептиды разделяли методом ионообменной хроматографии на колонке Аминекс- Q - I50S и электрофорезом на бумаге. Чистоту пептидов оценивали определением N-концевых аминокислот.

Таблица 2

Аминокислотный состав рибина Т, Д, Е и рибин-варианта

Аминокислота	Рибин Т	Рибин Д	Рибин Е	Рибин-вариант
Asp	62	59	63	59
Thr	36	35	39	36
Ser	39	37	33	39
Glu	49	46	45	46
Pro	25	26	28	26
Gly	35	36	39	36
Ala	38	37	41	37
1/2Cys	10	12	9	12
Val	29	29	35	29
Met	6	6	7	6
Ile	36	35	39	34
Leu	44	42	49	44
Tyr	20	20	21	21
Phe	19	18	18	18
Lys	9	9	12	9
His	6	6	7	6
Arg	32	32	37	34
Trp	8	9	8	8
Сумма остатков N-концевые аминокислоты	495	493	522	500
C-концевые аминокислоты	Ile/Ala	Ile/Ala	Ile/Ala	Ile/Ala
	Phe/Ser	Phe/Phe	Phe/Phe	Phe/Ser

Аминокислотную последовательность пептидов определяли как прямым методом Р. Эдман, так и в сочетании с дансилированием /3/.

На основании полученных данных установлена первичная структура аланиновой субъединицы рибина Т (рис. 5).

В результате определения аминокислотной последовательности аланиновой субъединицы рибина Т и сравнения с аминокислотной последовательностью В-цепи рибина Д и Е нами обнару-

10

Ala-Asp-Val-Cys-Met-Asn-Pro-Ile-Pro-Glu-Arg-Ile-Val-Gly-Arg-Asp-
 Gly-Leu-Cys-Val-Asn-Val-Arg-Asp-Gly-Arg-Ala-Asp-Pro-Gly-Asn-Phe-
 Leu-Glu-Ile-Trp-His-Cys-Lys-Ser-Gln-Thr-Asp-Ala-Asp-Asn-Ile-Thr-
 Leu-Arg-Asp-Asn-Ser-Leu-Arg-Ser-Asp-Gly-Lys-Cys-Val-Thr-Thr-Tyr-
 Leu-Tyr-Pro-Ser-Gly-Val-Tyr-Val-Met-Ile-Tyr-Asn-Cys-Asn-Thr-Ala-
 Thr-Ser-Ala-Gln-Arg-Glu-Ile-Trp-Asx-Asx-Gly-Thr-Ile-Leu-Glx-Arg-
 Thr-Ser-Leu-Val-Leu-Ala-Asp-Thr-Gly-Asn-Ser-Gly-Thr-Thr-Leu-Thr-
 Val-Gln-Thr-Asn-Ile-Tyr-Ala-Pro-Ser-Gln-Gly-Trp-Leu-Phe-Thr-Asx-
 Asx-Thr-Gln-Pro-Trp-Val-Ser-Thr-Ile-Val-Gly-Leu-Tyr-Gly-Leu-Cys-
 Leu-Glu-Ala-Asn-Ser-Gly-Glu-Val-Val-Ile-Gln-Asp-Ser-Cys-Ser-Gln-
 Lys-Ala-Glu-Gln-Gln-Trp-Ala-Leu-Tyr-Gly-Asp-Gly-Ser-Ile-Lys-Trp-
 Glu-Glu-Asn-Arg-Asp-Asn-Cys-Leu-Thr-Ser-Asp-Ser-Asn-Ile-Arg-Gly-
 Thr-Val-Val-Lys-Ile-Leu-Ser-Cys-Gly-Pro-Ala-Thr-Ser-Gly-Gln-Arg-
 Trp-Met-Phe-Lys-Asn-Ser-Gly-Thr-Ile-Leu-Asp-Tyr-Asn-Asp-Leu-Val-
 Leu-Asp-Val-Arg-Ala-Ser-Asn-Pro-Ser-Leu-Lys-Glu-Ile-Leu-Tyr-Pro-
 Val-Trp-Gly-Asn-Pro-Asx-Glu-Ile-Pro-Leu-His-Leu-Phe-Leu-Gly-Ser.

Рис. 5. Первичная структура аланиновой субъединицы
 рещина Т.

жены отличия в молекуле В-цепи в положениях: 8, 9, 20, 29, 30, 36, 42, 57, 68, 86, 88, 99, 100, 103, 127, 140, 160, 164, 177, 183, 193, 211, 221, 230, 251 и 254 и последовательности аминокислотных остатков на участках 28-30, 33-36, 46-49, 56-57, 99-101, 160-162, 182-185 и 254-256.

Таким образом, в результате изучения аминокислотного состава и первичной структуры выделенных фрагментов нами обнаружены отличия и сходства в молекуле В-цепи рещина Т, рещина Д и рещина Е. Найденные в структуре рещина Т отличия объясняются тем, что множественность форм обуславливается различием в аминокислотной последовательности отдельных полипептидных участков только в В-цепи, приводящих к изменениям изоэлектрической точки, молекулярного веса, аминокислотного

состава, что вызывает конформационные перестройки молекулы токсина. Следовательно, различия в структуре изотоксинов являются продуктами деятельности различных генов.

Л и т е р а т у р а

1. Araki T., Funatsu G. // *FEBS Lett.* - 1985. -Vol.191.- N 1. - P. 121.
2. Araki T., Funatsu G. // *Biochem. Biophys. Acta.*-1987.- Vol. 911. - N 2. - P. 191.
3. Edman P. // *Arch. Biochem.* - 1949. - Vol.22.-P. 475 - 476.
4. Elistand M. Über giftige Efwuisse weiche Blutkorperchen verleben// *Habil Sehr. Uppsala*, 1897.
5. Funatsu M., Funatsu G., Ishiguro M., Nanno S. and Hara K. // *Proc. Japan Acad.* - 1971. - Vol. 47. - P. 713.
6. Hellin H. Der giftige Einweisskorper. Abrin und seine Wirkung auf Blut. *Diss Dorpat*, 1891.
7. Ishiguro M., Tomi M., Funatsu G., Funatsu M. // *Toxicon.* - 1976. - Vol. 14. - N 3. - P. 157-165.
8. Kabat E., Heidelberger M. and Bezer A. // *J. Biol. Chem.* - 1947. - Vol. 168. - P. 629.
9. Karrer P., Smirnoff A.P., Ehrensperger H.,Van Sloofter J. and Keller M. // *Z. Physiol. Chem.* - 1924. - Vol. 135. - P. 129.
10. Kunitz M., McDonald M.R. // *J. Gen. Physiol.* - 1948.- Vol. 32. - P. 25-31.
11. Lau C. Über vegetabilische Blutagglutinine.*Diss. Rostock*, 1901.
12. Le Breton E. and Moule Y. // *Compt. Rend.* - 1947.-Vol. 225. - P. 152.
13. Mise T., Funatsu G., Ishiguro M., Funatsu M. // *Agr. Biol. Chem.* - 1977. - Vol. 41. - N 10. - P. 2041.
14. Osborn T.B., Mendel L.B., Harris I.F. // *Am. J. Physiol.* - 1905. - Vol. 14. - P. 259.
15. Stillmark H. Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* und einigen anderen *Euphorbiaceen*. *Inaug. Diss. Dorpat*, 1888.

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО КОНКАНАВАЛИНА А ДЛЯ
РАЗДЕЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУ-
ЛЯРНЫХ РАЗНОВИДНОСТЕЙ ГОРМОНСВЯЗЫВАЮЩИХ
ГЛИКОПРОТЕИНОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

О.В. Свиридов, М.Н. Ермоленко,
И.И. Вашкевич, Г.В. Аввакумов

Институт биоорганической химии АН БССР, Минск

Молекулярные свойства двух важнейших гормонсвязывающих гликопротеинов крови человека – кортикостероидсвязывающего и тироксинсвязывающего глобулинов (КСГ и ТСГ соответственно) – изучены достаточно подробно. Однако структурные и физиологические аспекты микрогетерогенности их углеводных компонентов оставались неясными. Оба гликопротеина содержат двух- и трехантенные олигосахаридные цепи N-ацетиллактозаминного типа, что открывает принципиальную возможность применения аффинной хроматографии на иммобилизованном конканавалине А (Кон А) для поиска молекулярных вариантов этих гликопротеинов, различающихся по содержанию цепей с одним и двумя разветвлениями. Известно, что олигосахариды указанного типа связываются Кон А лишь в том случае, если оба α -маннозильных остатка не замещены или замещены только при $C_{(2)}$. Под этим углом зрения мы сравнили чистые КСГ и ТСГ, выделенные из нормальной крови доноров и ретроплацентарной крови человека.

Как видно на рисунке I, в отличие от гликопротеинов нормальной крови, полностью удерживающихся на Кон А-сефарозе, препараты КСГ и ТСГ ретроплацентарной крови содержат заметное количество (до 10%) молекулярных вариантов, не взаимодействующих с данным лектином. Сравнительное исследование показало, что основные физико-химические и иммунохимические свойства этих молекулярных вариантов не отличаются от свойств соответствующих гликопротеинов нормальной крови доноров, что свидетельствует об идентичности их полипептидных цепей. Различия в картинах изоэлектрофокусирования и моноса-

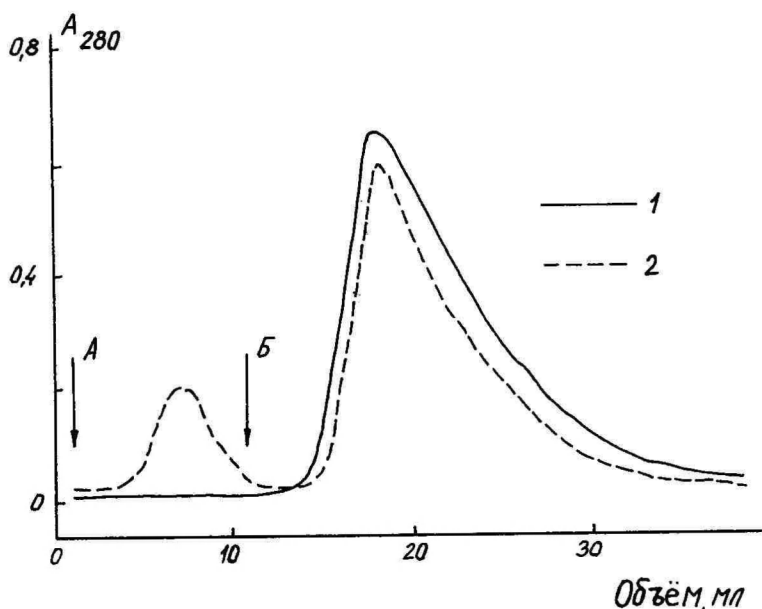


Рис. 1. Аффинная хроматография на Кон А-сефарозе препаратов КСГ, выделенных из нормальной крови доноров (1) и ретроплацентарной крови (2). А - стартовый буфер; Б - буфер, содержащий метил- α -D-глюкопиранозид.

харидных составах (таблица I) указали на то, что строение углеводных компонентов обнаруженных молекулярных вариантов отличается от строения углеводных компонентов гликопротеинов нормальной крови. Метилирование целых гликопротеинов (таблица I) подтвердило, что не взаимодействующие с Кон А молекулярные варианты КСГ и ТСГ содержат только трехантенные олигосахаридные цепи.

Было найдено, что обнаруженные молекулярные варианты отличаются от гликопротеинов нормальной крови и по некоторым

Таблица I

Моносахаридный состав и данные метилирования молекулярных вариантов КСГ и ТСГ, взаимодействующих (+) и не взаимодействующих (-) с Кон А

Моносахарид, метилованные производные	КСГ		ТСГ	
	-	+	-	+
Fuc	1,2	1,2	0	0
Man	15,0	15,0	11,8	11,7
3,4,6-три-О-Me	5,1	8,0	4,0	6,7
3,6-ди-О-Me	5,1	2,0	4,0	0,9
2,4-ди-О-Me	4,9	4,9	4,1	3,9
Gal	14,7	12,1	12,1	8,8
2,3,4,6-тетра-О-ME	3,2	1,0	1,9	1,3
2,4,6-три-О-Me	5,7	2,6	3,4	1,0
2,3,4-три-О-Me	5,6	8,4	6,7	6,8
GlcNAc	24,3	22,1	19,5	16,5
3,6-ди-О-Me	22,1	21,0	19,4	16,3
3-О-Me	0,9	0,9	0	0
NeuAc	12,7	10,7	11,1	8,3

биохимическим свойствам. Так, не взаимодействующий с Кон А молекулярный вариант ТСГ более устойчив к биодegradации *in vivo*, чем ТСГ нормальной крови: времена полувыведения из кровообращения крысы 14,8±1,4 и 10,4±0,5 ч соответственно ($p < 0,05$). Аналогичный молекулярный вариант КСГ в комплексе с кортизолом связывался с плазматическими мембранами клеток печени и плаценты человека иначе, чем комплекс кортизол-КСГ нормальной крови.

С целью выяснения взаимосвязи между наличием не взаимодействующих с Кон А молекулярных вариантов КСГ и ТСГ и физиологическим состоянием организма человека мы разработали метод количественного определения этих вариантов в биологических жидкостях, который включает микроколоночную хроматографию проб на Кон А-сефарозе и последующий радиоиммунологический анализ (рисунок 2). Измерение концентраций молекуляр-

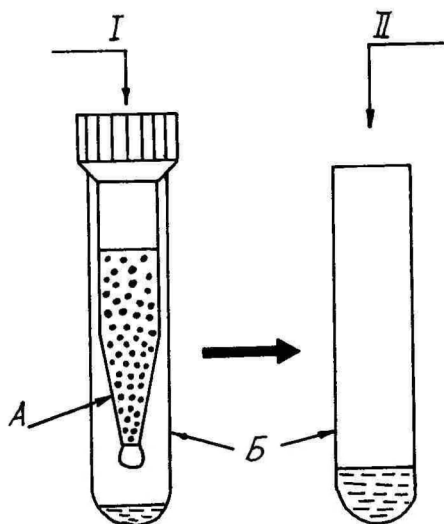


Рис. 2. Схема количественного определения не взаимодействующей с Кон А молекулярной разновидности ТСГ. I - Фракционирование образца сыворотки: сыворотка (0,02 мл), инкубация 15-20 мин, буфер (0,4 мл). II - Радиоиммунологический анализ: ^{125}I -ТСГ (0,1 мл), инкубация 3 ч, ПЭГ-6000 (1 мл), центрифугирование, радиометрия осадков. А - микроколонка с 0,2-0,3 мл Кон А-сефарозы; Б - аналитическая пробирка.

ных разновидностей КСГ и ТСГ в пробах сыворотки венозной крови (около 500) в динамике нормальной беременности показало, что в крови отдельных женщин они появляются на 6-10 неделе беременности, к V-VI месяцам присутствуют во всех пробах, уровни их равномерно возрастают вплоть до родов. На основании этих данных, а также результатов определения содержания не взаимодействующих с Кон А молекулярных разновидностей КСГ и ТСГ в биологических жидкостях при различных состояниях организма человека (таблица 2), они были отнесены к

Таблица 2

Содержание не взаимодействующих с Кон А молекулярных вариантов КСГ и ТСГ в биологических жидкостях организма человека

Биологическая жидкость	n	КСГ (-)		ТСГ (-)	
		мг/л	доля от общего КСГ, %	мг/л	доля от общего ТСГ, %
Сыворотка крови:					
нормальная мужчин	25	0	0	0	0
нормальная женщин	26	0	0	0	0
в родах, венозная	8	7,3	11,2	3,8	8,8
в родах, ретроплацентарная	8	7,2	10,8	3,4	8,9
после родов (5-й день), венозная	8	5,6	8,9	2,6	6,8
пуповинная	8	0	0	0	0
Амниотическая жидкость	30	-	-	0,19	10,6
Экстракт плаценты	3	0	0	0	0

классу белков, связанных с беременностью. Их физиологическая роль может состоять в направленном транспорте низкомолекулярных гормонов к тканям, развивающимся при беременности; систематическое исследование содержания молекулярных разновидностей КСГ и ТСГ, связанных с беременностью, в различных биологических жидкостях организма человека поможет лучше понять механизмы функционирования эндокринной и репродуктивной систем, а также метаболизма гликопротеинов.

ЛЕКТИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ И ПРОЦЕСС ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ В IN VITRO КУЛЬТУРАХ ПШЕНИЦЫ

В.В. Ильчуков, С.В. Семенов, Н.Б. Калинина
Институт биохимии и физиологии растений и
микроорганизмов АН СССР, г. Саратов

За прошедшие 100 лет достигнут значительный прогресс в исследовании иммунологии, биохимии, клеточной биологии лектинов. Сравнительно малоизученной, однако, остается область физиологических функций данного класса растительных соединений. На основании сведений о локализации и динамике лектинов в органах и тканях растений лектинам придают существенное значение в регуляции ряда биологических процессов, в том числе деления, дифференциации клеток, морфогенеза растений /1, 3, 9/.

Удобной системой для изучения роли и функций лектинов в растениях являются *in vitro* культуры, в которых можно экспериментально моделировать ряд процессов, в частности, деление и дифференциацию клеток и тканей.

В данной работе определялась лектиновая активность в каллусных культурах пшеницы в ходе дифференциации и морфогенеза.

Каллусные культуры пшеницы *Triticum dicoccum* var. *rufum* получали из зрелых зародышей и поддерживали на среде МС, содержащей 2 мг/л 2,4-Д /11/. Пересадку (пассирование) культур осуществляли каждые 4-5 недель. Для регенерации растений каллус пересаживали на среду МС с половинной концентрацией солей, содержащую 1 мг/л НКК и 2 мг/л кинетина. Для определения лектиновой активности навеску ткани каллуса растирали и заливали 0,05 М НС1 в соотношении 1:10. Через 1 час гомогенат центрифугировали 10 мин при 13000 об/мин. Супернатант использовали для определения лектиновой активности по стандартной методике /2/ с трипсинированными эритроцитами кролика.

В таблицах приведены усредненные титры реакции гемагглю-

тинации (титр РГА) 4-10 повторностей.

Формирование каллусной ткани пшеницы частью клеток зрелого зародыша сопровождается незначительным по сравнению с исходным эксплантатом снижением лектиновой активности, которая в ходе культивирования поддерживается на относительно стабильном уровне (таблица I).

Таблица I
Лектиновая активность каллусной ткани пшеницы
T. dicossum, var. *rufum* в ходе культивирования

Объект	Возраст	Титр РГА/эксплантат
Зародыш	24 часа после замачивания	205
Каллусная ткань:		
0-пассаж	I месяц	I62
6-пассаж	8 месяцев	I46
I2-пассаж	I4 месяцев	I54
I6-пассаж	I8 месяцев	I38

Тем самым, возобновление клеточных делений в зародыше в ходе процесса дедифференциации и формирования каллусной ткани характеризуется уменьшением лектиновой активности. Подобная закономерность наблюдается и при изучении динамики лектиновой активности в формирующихся /10/ и прорастающих зерновках злаков /6/.

В ходе культивирования лектиновая активность в каллусных тканях сохраняется на достаточно значимом уровне. По-видимому, это обусловлено тем, что в тканях лишь у части клеток сохраняется способность к делению. Основная же масса клеток дифференцируется. Формой и размерами эти клетки похожи на клетки корневого чехлика /12/. Более явно взаимосвязь дифференциации и уровня лектиновой активности проявляется в ходе вторичной дифференциации и морфогенеза в каллусных культурах.

При культивировании тканей злаков может формироваться каллусная ткань двух типов: а) гомогенный, неспособный к

регенерации растений и б) гетерогенный, способный к регенерации растений. Последний тип каллуса характеризуется наличием на поверхности морфологических новообразований, получивших название зон вторичной дифференциации (зоны ВД), которые чаще всего похожи на стеблевые примордии растений /II/.

Полученные нами результаты показывают, что гетерогенная каллусная ткань обладает повышенным, по сравнению с гомогенной, уровнем лектиновой активности. Причем лектиновая активность практически полностью локализуется в зонах ВД (таблица 2). При пересадке гетерогенной каллусной ткани на среду для регенерации в зонах ВД начинает формироваться растение-регенерант. Однако данный процесс не сопровождается, как можно было ожидать, увеличением лектиновой активности. Напротив, по мере развития растения титр РГА снижается (таблица 2).

Таблица 2

Лектиновая активность в каллусных тканях пшеницы
T. dicoccum, var. *rufum* в ходе дифференциации

Объект	Возраст	Титр РГА/г сырого веса
Гомогенный каллус	13 месяцев	304
Гетерогенный каллус	13 месяцев	383
зоны ВД		1124
остальная часть		264
	Пересадка на среду для реге- нерации	
Гетерогенный каллус	4 дня	972
Зеленеющие листово- добные структуры	2 недели	618
Адвентивный проросток	4 недели	416

В литературе имеется ряд предположений о возможном регуляторном механизме действия лектинов на процесс дифференциации в клетках растений: через метаболизм фитогормонов, транспорт сахаров, ионов и др. /I, 3, 7, 8, 9/.

Однако нам представляется более вероятным, что роль лектинов в регуляции этих процессов относительна и заключается в их участии в межклеточных взаимодействиях /5/. Известно, что последние имеют определяющее значение в дифференциации клеток и морфогенезе растений /4/. Кроме того, полученные нами данные позволяют предположить, что высокий уровень лектиновой активности характерен для клеток лишь на начальных стадиях дифференциации.

Таким образом, уровень лектиновой активности в каллусных культурах пшеницы определяется физиологическим состоянием клеток и, прежде всего, степенью их дифференциации.

Л и т е р а т у р а

1. Королев Н.П. Функции лектинов в клетке. - М.: Наука, 1984. - 315 с.
2. Луцки М.Д., Панасюк Е.Е., Луцки А.Д. Лектины. - Львов: Виша школа, 1981. - 156 с.
3. Марков Е.Д., Хавкин Э.Е. // Физиол. раст. - 1983. - Т. 30. - Вып. 5. - С. 852-867.
4. Синют Э. Морфогенез растений. - М.: Наука, 1963. - 603 с.
5. Anderson M.A., Rosslyn D.H., Clarke A.E. // N.Y., Alan R. Liss, inc. - 1983. - P. 99-116.
6. Mishkind M.L., Raikhel N.V., Palevitz B.A.//N.Y., Alan R. Liss, inc. - 1983. - P. 163-176.
7. Morris P.C., Maddock E.E., Jones M.J.K., Bowles D.J.// Planta, 1985. - Vol. 166. - N 3. - P. 407-413.
8. Morris P.C., Maddock E.E., Jones M.J.K., Bowles D.J.// Plant Cell Rep. - 1986. - Vol. 5. - N 6. - P. 460.
9. Peumans W.J., Stinisen H.M. // N.Y., Alan R. Liss, inc. - 1983. - P. 99-116.
10. Quatrano R.S., Hopkins R., Raikhel N. // N.Y., Alan R. Liss, inc. - 1983. - P. 117-130.
11. Vasil I.K. // N.Y., Academic Press. - 1985. - Vol.1.- P. 612.

ЛЕКТИНЫ МОРСКИХ ВОДОРОСЛЕЙ: СОДЕРЖАНИЕ, ВЫДЕЛЕНИЕ В
ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ. ВЛИЯНИЕ НА СОПУТСТВУЮЩИЕ ВИДЫ

Ю.С. Чурилов

Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского
АН УССР, г. Севастополь

Исследования содержания лектинов в морских водорослях различных таксономических групп проводилось достаточно широко. При этом использовались различные методические подходы, что затрудняло сопоставление полученных данных. В перечне исследованных видов практически нет водорослей из внутренних акваторий СССР, в частности из Черного моря.

При проведении скрининга черноморских видов в качестве агглютинирующего агента использовали нативные эритроциты человека II группы. Для получения сопоставимых данных агглютинационный эффект выражался в пересчете на лектин ФГА ("Wellcome" Англия).

Установлено наличие лектинов по меньшей мере в 8 видах водорослей, встречающихся в Черном море. Наиболее значительные количества лектинов содержат *Ulva rigida* (ульва) - $6,1 \pm 0,9$ мкг·г⁻¹, *Cystoseira barbata* (цистозира) - $13,6 \pm 8,4$ мкг·г⁻¹, *Ceramium rubrum* (церамиум) - $10,3 \pm 2,3$ мкг·г⁻¹. Указанные величины получены в период интенсивного роста водорослей (июнь - август), данные представлены в расчете на сырую биомассу. Активное начало преимущественно заложено в растущих участках водорослей - периферии ульвы, концах ветвей цистозиры и церамиума.

Удельное содержание лектинов в клетках планктонных водорослей следующее: *Thalassiosira parva* - 13 ± 6 мкг·г⁻¹, *Gymnodinium Kowalewskii* - 300 ± 40 мкг·г⁻¹, *Dunaliella tertiolecta* - 50 ± 13 мкг·г⁻¹, *Platimonas viridis* - 180 ± 11 мкг·г⁻¹, *Porphyridium cruetum* - 560 ± 43 мкг·г⁻¹. Данные получены с ис-

пользованием накопительных культур, находящихся в середине экспоненциальной фазы роста.

Упоминание об агглютинирующей активности выделений отдельных видов водорослей в отношении половых клеток имеется в некоторых работах.

Нами показано, что выделения упомянутых выше видов способны агглютинировать эритроциты человека II группы. Установлены средние удельные скорости выделения лектинов макроводорослями (при $T = 20^{\circ}\text{C}$ и освещенности 10 тыс. лк): ульва - $0,7 \pm 0,1 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1} \text{ час}^{-1}$, цистозира - $1,2 \pm 0,2 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1} \text{ час}^{-1}$, церамиум - $1,1 \pm 0,2 \text{ мкг} \cdot \text{г}^{-1} \text{ час}^{-1}$.

Лектины преимущественно выделяются растущими участками макрофитов - периферией ульвы, концами ветвей церамиума и цистозиры. На процесс выделения лектинов влияют освещенность и температура. Содержание лектинов в темновых выделениях ульвы составляет 50% от световых, цистозиры - 67%, церамиума - 29%. Повышение температуры воды на 10°C в диапазоне $10-30^{\circ}\text{C}$ вызывает увеличение количества лектинов в выделениях макрофитов в 2-3 раза.

Установлено содержание лектинов в культуральных средах микроводорослей: *T. parva* - $(1,0 \pm 0,4) \cdot 10^{-4} \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (плотность $10^5 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$), *G. Kowalewski* - $(3,9 \pm 1,5) \cdot 10^{-4} \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (плотность $3,5 \cdot 10^4 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$), *P. viridis* - $(2,1 \pm 0,8) \cdot 10^{-4} \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (плотность $10^5 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$), *P. cruetum* - $(4,2 \pm 1,6) \cdot 10^{-4} \text{ мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (плотность $10^5 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$), что составляет 3,1, 8, 5,8 и 5,4% сырой биомассы соответственно.

Рассмотрено влияние лектинов макрофитов на ряд модельных объектов: мембраны эритроцитов, клетки сопутствующих микроводорослей и бактерий, креветки, мидии. В случае микрообъектов исследованы концентрации $10^2 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$, в случае животных - $10 \text{ мкг} \cdot \text{л}^{-1}$. Показано, что при обработке лектинами нативных эритроцитов происходит изменение устойчивости их мембран к действию кислот на 120-140%, механической прочности - на 20-80%, проницаемости - на 40-50%.

В эксперименте использовали метод химических эритрограмм, предложенный В.И. Сарбашем (1981).

Лектины макрофитов в указанных концентрациях способствуют образованию крупных (до 1,5 мм) агрегатов микроводорослей

и бактерий. Клетки микроводорослей агрегируют в течение 15-20 минут, бактерии - 40-90 минут.

Установлено, что лектины макрофитов нарушают функционирование системы дыхания креветок *Palaemon adspersus* путем угнетения сердечной и двигательной активности, а также потребления кислорода. Отмечено явление угнетения фильтрационной работы мидий *Mytilus galloprovincialis* .

В случае указанных животных действие лектинов, по-видимому, следует рассматривать как токсическое. Токсичность лектинов падает в ряду церамиум - цистозира - ульва.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ ДИССОЦИАЦИИ КОМПЛЕКСА ЛЕКТИН ВИНОГРАДНОЙ УЛИТКИ-УГЛЕВОД МЕТОДОМ ФРОНТАЛЬНОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

М.Утт, Р.Кольяк, Т.Пюсса

Тартуский государственный университет

Аффинная хроматография основывается на специфических взаимодействиях между биомолекулами и лигандами. Одним из методов количественного исследования этих взаимодействий является фронтальный хроматографический анализ. Этим методом можно определить константы диссоциации комплекса белок-лиганд:

в изократических условиях, варьируя концентрацию белка, в присутствии растворенных лигандов-ингибиторов.

В данной работе исследовали задерживание лектина альбуминовых желез виноградной улитки *Helix pomatia* выделенного и очищенного в нашей лаборатории методом аффинной хроматографии, в присутствии и отсутствии N-ацетилгалактопиранозида (GalNAc), N-ацетилглюкопиранозида (GlcNAc) и раффинозы. В качестве иммобилизованного лиганда использовали GalNAc, пришитый на дивинилсульфоактивированный 4%-ный гранулированный гель агарозы отечественного производства (колхоз им. М.Хярма Тартуского района ЭССР).

При хроматографии в изократических условиях константу диссоциации можно определить с помощью уравнения:

$$1 / A_0 (V - V_0) = K_d / V_t \cdot 1 / A_0 + 1 / V_t \quad ;$$

- где A_0 - начальная концентрация лектина А;
 V_t - общее количество иммобилизованного лиганда;
 V_0 - объем появления лектина А в элюате при отсутствии интеракции лектин-сахарид (раствор лектина насыщен лигандом);
 V - объем появления лектина в элюате;
 K_d - константа диссоциации комплекса лектин-сахарид при условии равновесия (центры связывания независимы и связывают только одну молекулу иммобилизованного лиганда в единице времени);
 V_1 - объем появления лектина А в элюате в присутствии растворенного сахараида;
 I_0 - начальная концентрация растворенного сахараида;
 V_m - объем появления лектина А в элюате при отсутствии специфического сахараида.

В координатах I/A_0 и $I/A_0 (V - V_0)$ получается прямая, пересекающая ось ординат в точке I/V_t и ось абсцисс в точке $-I/K_d/I/$ (см. рис. 1).

При хроматографии в присутствии растворенного лиганда последний также вступает во взаимодействие с лектином, объем появления которого в элюате уменьшается по сравнению с объемом элюирования, полученным при помощи первого метода. Используя уравнение $V_1 = V_0 + K_1 (V_m - V_1/I_0)$ в координатах $(V_m - V_1)/I_0$ и V_1 , получаем прямую, тангенс наклона которой равняется константе диссоциации K_1 комплекса лектин-растворенный сахараид /3/ (см. рис. 2-4).

Все хроматографические опыты были поставлены при температуре 4°C с использованием колонки объемом 4,5 мл, скорость элюирования - 4,9 мл/ч. Растворы лактина и сахараидов были приготовлены в 0,14 М солевом фосфатном буфере при pH 7,4. Появление лектина в элюате определяли путем изменения оптической плотности раствора при длине волны 280 нм.

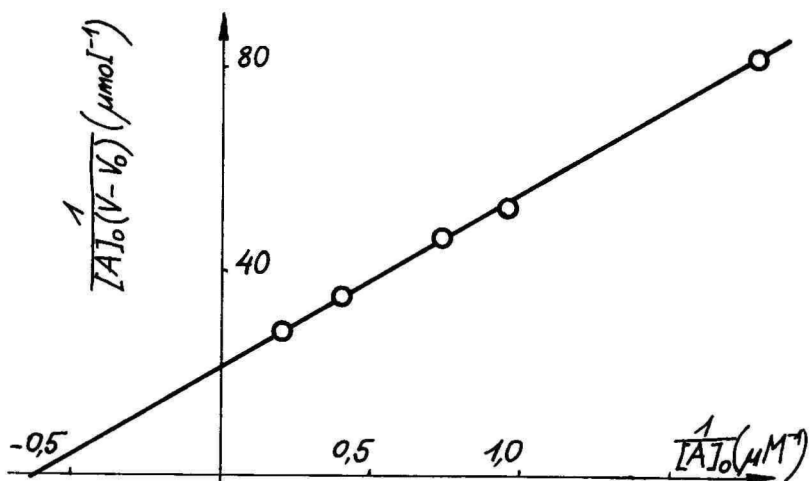


Рис. 1. Фронтальный аффинный анализ в изократических условиях, интервал концентрации лектина $/A/_{0} = 0,56-4,75$ мкМ.

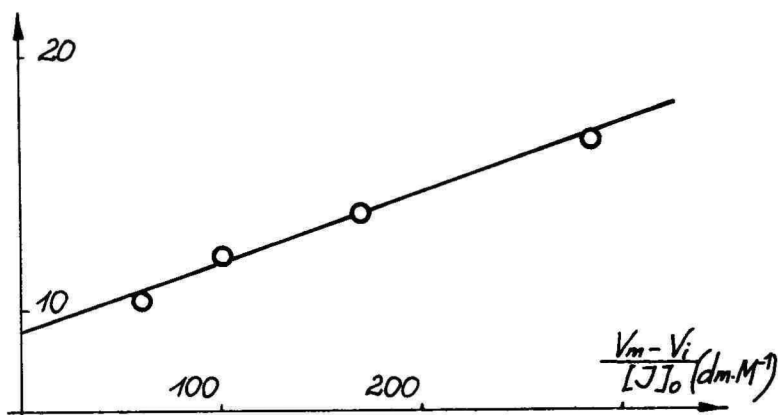


Рис. 2. Фронтальный аффинный анализ в присутствии растворенного GalNAc $/I/_{0} = 0,02-0,2$ мМ

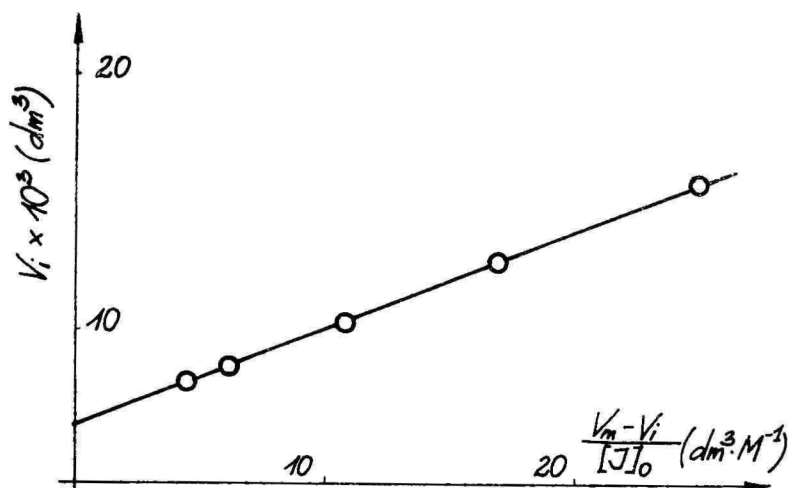


Рис. 3. Фронтальный аффинный анализ в присутствии растворенного GlcNAc $/I/_0 = 0,2-3,0$ мм.

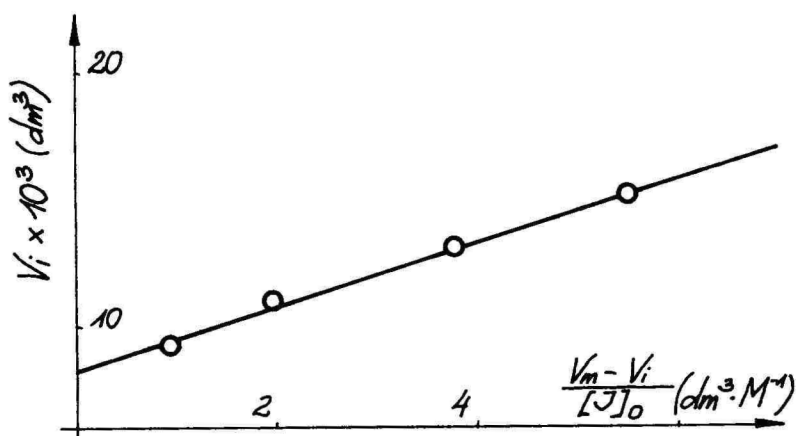


Рис. 4. Фронтальный аффинный анализ в присутствии растворенной раффинозы $/I/_0 = 1,0-12$ мм.

Таблица

Константы диссоциации комплекса лектин улитки *Helix pomatia* - сахарады

Сахарид		Конст. диссоциации K_d (M)		Услов. эксперим.		Метод определения и ссылка
иммоб.	раствор.	наст. раб.	литерат.	$t^{\circ}C$	pH	
GalNAc	-	9,66	10^{-6}	4°	7,4	
GalNAc	GalNAc	3,0	10^{-5}	4°	7,4	
GalNAc	GlcNAc	3,9	10^{-4}	4°	7,4	
GalNAc	раффиноза	1,3	10^{-3}	4°	7,4	
GlcNAc	GalNAc		8,3 10^{-5}	?	4,5	Аффин. электрофорез /2/
GlcNAc	GlcNAc		1,2 10^{-3}	?	4,5	Аффин. электрофорез /2/
GlcNAc	-		8,3 10^{-6}	?	4,5	Аффин. электрофорез /2/
-	GlcNAc		1,0 10^{-3}	25°	7,0	Круг. дихроизм /3/
-	раффиноза		2,9 10^{-3}	25°	7,0	Круг. дихроизм /3/
-	GalNAc		4,03 10^{-5}	5°	7,0	Круг. дихроизм /3/
-	GalNAc		1,75 10^{-4}	25°	7,0	Круг. дихроизм /3/
-	GalNAc		1,40 10^{-4}	25°	7,0	Собст. флуоресц. /3/
-	GalNAc		4,4 10^{-4}	25°	7,3	Равнов. диализ /4/
-	GlcNAc		2,5 10^{-3}	25°	7,3	Равнов. диализ /4/

При анализе в изократических условиях варьировали концентрацию лектина A_0 в пределах 0,56–4,75 мкМ. При хроматографии в присутствии растворенных лигандов во всех трех экспериментах использовали одну и ту же концентрацию лектина 1,25 мкМ и варьировали концентрацию сахаридов (см. рис.2–4).

Результаты

Полученные нами константы диссоциации K_d приведены в таблице с соответствующими константами из литературы. Как видно, имеется довольно большой разброс значений констант, полученных разными авторами с помощью разных методов, причем литературные данные, к сожалению, относятся к разным условиям эксперимента, ввиду чего приведенные константы трудно сравнимы друг с другом. Тем не менее надо отметить, что полученная нами константа K_d для GalNAc близка к литературной, полученной приблизительно в тех же условиях методом кругового дихроизма. Для более полной характеристики активного центра лектина виноградной улитки требуется дополнительный эксперимент.

Л и т е р а т у р а

1. Hammarström S. // Ann. N.Y. Acad. Sci. - 1974. - Vol. 234. - P. 183–197.
2. Hořejší V., et al. // Biochem. Biophys. Acta. - 1977. - Vol. 499. - P. 290–300.
3. Kasai K., Oda Y. // J. Chrom. - 1986. - Vol. 376. - P. 38–47.
4. Yoshii T., Ishiyama I. // Biochem. Biophys. Acta. - 1983. - Vol. 742. - P. 235–242.

СО Д Е Р Ж А Н И Е

	Стр.
Илометс Т. Столетие открытия лектинов в Тартуском университете	5
Королев Н.П., Выхребенцева Э.И. Функции эндогенных лектинов	19
Клаан Н.К., Пронина Т.А. Библиометрическое исследование публикаций по лектинам по материалам БД "Биология" ВИНТИ	50
Антонюк В.А. Некоторые аспекты поиска лектинов в растениях	53
Лахтин В.М. Биотехнологические аспекты получения и применения лектинов	60
Днусов Т.С., Левитская С.В. Лектины <i>dateure innoxia</i> ..	66
Коваленко Э.А., Гетьман Е.И., Вьюницкая В.А. Бактерии рода <i>Bacillus</i> - продуценты внеклеточных лектинов	72
Боровская Т.А., Казачкова Н.В. Лектины и изобретения. Вопросы их патентной защиты, выявления и оформления	80
Лобсанов Ю.Д., Кузев С.В., Рискулов Р.Р., Плетнев В.З., Мокульский М.А. Рентгеноструктурные исследования углеводного комплекса лектина из гороха (<i>Pisum Sativum</i>)....	86
Евстифеева Т.В., Михайлов А.Д. Определение константы ассоциации лектинов. Аффинно-хроматографический метод	94
Березин Б.Б., Лахтин В.М., Геворкян Р.Г., Даванков В.А., Ямсков И.А. Хроматографические методы получения лектинов на сорбентах на основе сферона	101
Гайда А.В., Антонюк В.А. Новый N-ацетил-D-галактозаминспецифический лектин шириты хвостатой (<i>amaranthus caudatus L.</i>) ...	106
Пискарев В.Е., Лахтин В.М. Препаративное получение изолектинов из зародышей пшеницы с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)	113
Симоненко И.А., Коваленко Э.А., Подгорский В.С. Лектинпродуцирующая способность <i>basillus mesentericus</i>	118

	Стр.
Галаган Н.П., Богомаз В.И. Получение препарата лектина из генеративных органов коровы ...	123
Лахтин В.М. Ферменты углеводного обмена с лектиновыми доменами сорбции на полисахаридах	128
Кашкарова Н.Г., Коваленко З.Ф., Дихтярев С.И., Чернобай В.Т. Поиск промышленных источников растительного сырья, содержащего лектины ...	131
Рапава Э.А., Алексидзе Г.Я., Лежава Т.А., Кекенадзе Л.В., Двалишвили Н.А., Алексидзе Н.Г. Белок ДРМ ₄₀₋₈₀ с лектиновой и митогенной активностью	134
Ахалкаци Р.Г., Балавадзе М.В., Алексидзе Н.Г. Лектиноподобные белки и конканавалин А-связывающие рецепторы изолированных ядер и митохондрий головного мозга крыс	138
Доенко Д.Н., Глазкова В.Е., Артюков А.А., Михайлов В.В., Курика А.В., Оводова Р.Г., Ручкова Т.А. К характеристике нового галактозоспецифического лектина из мидии японского моря <i>Crenomytilus grayanus</i>	145
Швачко А.Г., Формазюк В.Е., Антонюк В.А., Сергиенко В.И., Качина Н.Н. Лектин-подобное взаимодействие водорастворимых белков хрусталика с углеводами	147
Лапчик В.Ф., Орчишина Т.В. Лектин каланхоэ	152
Иосипенко О.А., Стадник Г.И. Лектиновая активность семян сорго	155
Селиванов Н.Ю., Стадник Г.И., Игнатов В.В. Полиморфизм лектина пшеницы	161
Хашимов Д.А., Рахимов Д.А., Алимов Х.Г., Олдашев П.Х. Использование растительных полисахаридов для обнаружения лектинов клещевины	165
Рыбак В.И., Лепехин Е.А., Яловой А.И. Лектины зерна и проростков сортопопуляций кукурузы ..	169
Королев Н.П., Алексидзе Г.Я., Выскребенцева Э.И., Гуськова Р.А., Иванов И.И., Осипов В.И., Свинтицких В.А., Сумаруков Г.В., Федоров Г.Е. Полярографический количественный метод определения лектиновой активности	173
Итальянская Ю.В., Никитина В.Е., Пономарева Е.Г., Аленькина С.А. Лектины бактерий рода <i>azospirillum</i>	178
Хашимов Д.А., Алимов Х.Г., Олдашев П.Х. Первичная структура аланиновой субъединицы ризина-Т и выделение двух форм агглютина из семян среднеазиатской клещевины	183

Свиридов О.В., Аввакумов Г.В.	Ермоленко М.Н., Вашкевич И.И., Применение иммобилизованного конканавалина А для разделения и количественного определения молекулярных разновидностей гормонсвязывающих гликопротеинов крови человека	191
Ильчуков В.В.,	Семенов С.В., Калинина Н.Б. Лектиновая активность и процесс дифференциации в <i>in vitro</i> культурах пшеницы	196
Чурилов Д.С.	Лектины морских водорослей: содержание, выделение в окружающую среду. Влияние на сопутствующие виды	200
Утт М., Кольяк Р., Посса Т.	Определение константы диссоциации комплекса лектин виноградной улитки-углевод методом фронтальной аффинной хроматографии ...	202

Ученые записки Тартуского университета.
Выпуск 869.
ИЗУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКТИНОВ.
Том I. Общие вопросы. Химия и биохимия лектинов.
На русском языке.
Тартуский университет.
ЭССР, 202400, г.Тарту, ул.Оликооли, 18.
Ответственные редакторы К. Кизанд, Р. Уйбо.
Корректор И. Кингс.
Подписано к печати 18.09.1989.
МВ 01612.
Формат 60х90/16.
Бумага писчая.
Машинопись. Ротапринт.
Учетно-издательских листов 11687. Печатных листов 13,25.
Тираж 700.
Заказ № 675.
Цена 2 руб. 40 коп.
Типография ТУ, ЭССР, 202400, г.Тарту, ул.Тийги, 78.