УДК 615.322:633.15

ВИЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ ЛЕКТИНІВ У СИРОВИНІ КУКУРУДЗИ ЗВИЧАЙНОЇ ТА ВИВЧЕННЯ ЛЕКТИНОВОЇ АКТИВНОСТІ

Карпюк У.В.[1], Кисличенко В.С.[2]
[1]Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ
[2]Національний фармацевтичний університет, Харків

Лектини (від лат. *legere*— збирати) — білки, що виявляють здатність високо специфічно зв'язувати залишки вуглеводів на поверхні клітин, викликаючи їх аглютинацію. За своєю природою лектини здатні до оборотного зв'язування з вуглеводною частиною клітинних структур. Лектини були вперше відкриті понад 100 років тому назад. Спочатку лектини були відкриті та досліджені як рослинні білки. Перший лектин був виділений з екстракту насіння рицини та отримав назву рицин. Зараз відомо, що лектини присутні у більшості живих організмів. Вони були знайдені також в організмах бактерій, тварин, в тому числі й в організмі людини.

Багато лектинвмісних рослин є звичайною складовою харчування людини та сільськогосподарських тварин. Багато років відомо, що лектини зустрічаються у рослинах родини бобових таких як соя, боби, квасоля, чечевиця, горошок, арахіс тощо. Всі ці рослини є основним компонентами харчування людей багатьох країн.

Лектини підрозділяються на дві великі групи: ендолектини, тобто власні лектини організму, та екзолектини – ті, що потрапляють в будь-який організм ззовні. Функції лектинів в природі досить різноманітті і до кінця не вивчені, але всі базуються на їх здатності розпізнавати та зв'язувати вуглеводні частини глюкокон'югатів як у розчинах так і у клітинах.

Оскільки значну кількість відомих лектинів було виділено з насіння рослин, припускають їх безпосередню участь у проростанні насіння. Крім того, однією функцією лектинів рослин, як і у тварин, вважається їх зв'язування на поверхні клітин паразитів. Тобто вони допомагають рослинам боротися з патогенними бактеріями, грибами та вірусами й регулюють відносини з симбіотичними бактеріями [1-3].

Лектини виконують багато різноманітних фізіологічних функцій від регуляції клітинної адгезії до синтезу глікопротеїнів та контролю рівня білку в крові людини. Вони впливають на процеси активації лімфоцитів в процесі імунної відповіді [3,4]. Лектини також виявляють вибіркову мітогенну активність по відношенню до різних клітин крові людини. Частина лектинів має яскраво виражену здатність до аглютинації еритроцитів певної групи крові, до того ж діють вони дуже вибірково [4].

Таким чином, лектини, з одного боку, є структурними елементами клітини, приймають участь як у регуляції метаболічних процесів, так і у захисті від деяких агентів зовнішнього середовища. З іншого боку, екзолектини можуть виступати самі в якості таких агентів по відношенню до даного організму. Лектини нерідко приймають участь у клітинному розпізнаванні. Наприклад, деякі патогенні мікроорганізми використовують лектини для прикріплення до клітин ураженого організму.

В організмі людини важливу роль відіграють лектини кліренсу. Це велика група ендогенних лектинів, що мають різну вуглеводну специфічність. Вони здатні уловлювати певні фрагменти вуглеводних структур, які підлягають подальшому розщепленню. Частіше такі лектини працюють в печінці та являють собою своєрідний фільтр для вловлювання та утилізації непотрібних та шкідливих для організму структур. Деякі лектини, знайдені на поверхні клітин печінки ссавців та специфічно розпізнають залишки галактози. Вважається, що вони відповідають за видалення глюкопротеїдів з крові, що містять в своєму складі залишки галактози [3-7].

Очищенні лектини важливі у клінічних дослідженнях оскільки використовуються при клінічних дослідженнях крові. Деякі гліколіпіди та глікопротеїди індивідуальних еритроцитів можуть бути виявлені за допомогою лектинів. Наприклад, лектин з Dolichos biflorus використовується для визначення клітин, які належать до А101 групи крові; лектини Ulex europaeus використовується для ідентифікації антигену Н у крові; лектин з Vinca graminea - антигену N; лектин з банана інгібує вірус імунодефіциту людини in vitro [3,5-7].

Враховуюче все вище зазначене, встановлення наявності лектинів та визначення їх аглютинуючої активності є акуальною проблемою фітохімічних досліджень. У якості сировини нами було обрано корені, стебла, листя, волоті та стовпчики з приймочками кукурудзи звичайної.

Матеріали та методи

Наявність лектинів у сировині характеризує аглютинуюча активність. Визначали лектиноподібну активність в сировині методом біологічного тестування – ратусеритроаглютинації [8]. В основу методу закладено принцип аглютинації, опосередкованої лектинами, а саме утворення агрегатів шляхом не ковалентного зворотнього зв'язування активного центру субодиниць білка лектину з комплементарними вуглеводами – рецепторами на мембранах еритроцитів щурів.

А. Приготування лектиновмісного екстракту (ЛЕ). Наважку подрібненої рослинної сировини (1г) переносили у фарфорову ступку, заливали 10 мл фізіологічного розчину натрію хлористого (0,9%), розтирали протягом 5 хв до гомогенного стану, фільтрували через двошаровий марлевий фільтр та центрифугували 15 хв на центрифузі ОПН-3 при

3000 об/хв. Лектинову активність тестували у надосадовій рідині (супернатанті) лектинвмісного екстракту.

Б. Приготування суспензії еритроцитів. Еритроцитарну масу отримували з цитратного розчину крові щурів (одну частину крові брали на дев'ять частин охолодженого 3,8%-ного розчину тризаміщеного натрію лимоннокислого). Суміш центрифугували у поліетиленових конічних пробірках на центрифузі ОПН-3 при 1500 об/хв протягом 5 хв. Далі цитратний супернатант видаляли і чотирикратно повторювали за тих же умов процедуру відмивання еритроцитів, до осаду яких щоразу додавали охолоджений фізіологічний розчин. Про повне відмивання свідчив безбарвний прозорий супернатант.

В. Реакція гемаглютинації з довільним осадженням еритроцитів (РГА). Для постановки РГА готували робочу суспензію еритроцитів: 0,1мл еритроцитарної маси дозатором вносили у пробірку з 5мл фізіологічного розчину і обережно збовтували.

РГА проводили в імунологічному планшеті з U-подібними лунками. В кожну з 8-ми лунок вертикального ряду вносили по 0,05мл (50мкл) забуферного сольового розчину, який містить в 1л води 8,0г натрію хлориду, 0,2г калію хлориду та 1,0г двозаміщеного натрію фосфату, pH розчину доводили до 7,4 за допомогою 1 н кислоти хлористоводневої.

З метою врахування можливих артефактів, пов'язаних як із недостатнім вилученням цитратної плазми крові, так і з гемолізом еритроцитів, ставили пробу на спонтанне осідання відмитих еритроцитів, тобто в тест-систему не вводили ЛЕ, а лише подвійний об'єм фізрозчину (0,1мл) та 0,05 мл 2%-ної суспензії еритроцитів щура (окремий вертикальний ряд лунок).

Далі готували серію послідовних двократних розведень ЛЕ: 0,05мл ЛЕ вносили лише в першу лунку вищезгаданого вертикального ряду, перемішували дозатором, відбирали 0,05мл, які вносили у нижню лунку №2, перемішували та відбирали 0,05мл, які вносили в наступну нижню лунку №3 і т.д., закінчуючи на лунці №8, з якої порцію 0,05мл видаляли. Далі в кожну лунку вносили збоку обережно по 0,05мл 2%-ної суспензії еритроцитів і залишали на 60-90хв. при температурі 25^0С. Тестування лектиноподібних речовин рослинного екстракту проводили у трикратній аналітичній повторності.

Інтенсивність реакції аглютинації еритроцитів (ІРГА) оцінювали за титром або сумою умовних балів по окремих лунках. За наявності значної аглютинації еритроцити вистилають всю поверхню дна лунки. Про відсутність аглютинації еритроцитів свідчить чітка пляма в центрі дна луни. Титр досліджуваних лектиноподібних речовин визначався максимальним розведенням ЛЕ, який дає аглютинацію [8].

Для доказу протеїнової природи аглютинуючих субстанцій екстрактів проводилось їх тестування на наявність білка за методом Бредфорд [9,10]. Методика Бредфорд ґрунтується на тому, що утворюється забарвлений у синій колір комплекс барвника Кумасі яскраво-блакитного G-250 з білком.

За одиницю активності лектинів (АЛ) приймали мінімальну кількість лектинів, яка викликає аглютинацію еритроцитів. Обчислення проводились за формулою 1[11]:

$$АЛ(од/мгбілка) = \frac{титр}{концентрація \cdot білка(мг/мл)} \times об'єм \cdot проби \quad (1)$$

Результати та обговорення

У досліджуваних екстрактах з коренів, приймачок, волоті, листя та стебла кукурудзи звичайної за допомогою тесту ратусеритроаглютинації виявлено, що ІРГА коренів відповідає титру – 128 та сумі умовних балів 15,5; ІРГА волоті – 128 та сумі умовних балів 14,6; ІРГА листя відповідає титру – 128 та сумі умовних балів 15; ІРГА приймачок – 256 та сумі умовних балів 26, ІРГА стебел – 64 та сумі умовних балів 13,75.

Вміст білку в екстрактах з коренів кукурудзи склав – 1,03±0,09 мг/мл, стовпчиків з приймочками – 12,05±0,31 мг/мл, волоті – 2,45±0,12 мг/мл, листя – 10,39±0,31 мг/мл, стебла – 3,29±0,16 мг/мл.

Було визначено, що лектинова активність коренів кукурудзи – 6,21±0,11 од/мг білка; волоті – 2,61±0,17 од/мг білка; листя – 0,62 ±0,05 од/мг білка; приймачок – 1,06±0,08 од/мг білка; стебел – 0,97±0,09 од/мг білка.

Висновки

1. Встановлено наявність лектинів в усіх досліджуваних зразках сировини кукурудзи звичайної: коренях, стеблах, волоті, листі та стовпчиках з приймочками.
2. Визначено вміст білку в екстрактах досліджуваної сировини. Найбільший вміст білку мають стовпчиків з приймочками – 12,05±0,31 мг/мл та листя кукурудзи 10,39±0,31 мг/мл; найменший - корені кукурудзи - 1,03±0,09 мг/мл.
3. Проведено визначення лектинової активності сировини кукурудзи. Лектинова активність листя, стебел та приймачок кукурудзи є найбільшою - 0,62±0,05 од/мг білка, 0,97±0,09 од/мг білка та 1,06±0,08 од/мг білка відповідно. Лектини коренів та волоті мають меншу лектинову активність: 6,21±0,11 од/мг білка та 2,61±0,17 од/мг білка відповідно.

References

1. Antonuk, V. O. Lectins and their raw sources [Text] / V. O. Antonuk. – Lviv: PP «Kvart», 2005. – 554 p.

2. Babosha, A. V. Lectins and a problem of phytopathogens of host-plant recognition [Text] / A. V. Babosha // Journal of General Biology. – 2008. – Vol.69, № 5. – P. 379–396.
3. Sharon, N. Lectins [Text] / N. Sharon, H. Lis. – 2-nd ed. - Springer, 2007. – 454 p.
4. Gurkin, V. A. Heart and vessels health: selection of biological active admixtures at blood group [Text] / V. A. Gurkin, G. N. Dokuchaeva. – SPb. : Publishing House «Neva», 2004. – 320 p.
5. Carlson, N. R. Physiology of Behavior [Text] / N.R. Carlson. – 9th ed. – Boston: Pearson Education,Inc., 2007. – 144 p.
6. Komath, S. S. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research [Text] / S. S. Komath, M. Kavitha, M. J. Swamy // Organic and Biomolecular Chemistry. – 2006. – Vol.4, № 6 – P. 973–988.
7. Ni, Y. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system [Text] / Y. Ni, I. Tizard // Vet. Immunol and Immunopathol. – 1996. - №55. - P. 205–223.
8. Pogorila, N. F. New method of plant lectins test [Text] / N. F. Pogorila, L. M. Surzhuk, Z.O. Pogorila // Ukrainian Botanical Journal. – 2002. – Vol.59, № 2. – P. 217-220.
9. State pharmacopeia USSR. Issue 1. General methods of analysis [Text] / MH USSR. – 11 ed., add. – M.: Medicine, 1987. – 336 p.
10. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [Text] / M.M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
11. Rozhnova, N. A. The action of arachidonic acid and virus infection to phytohemagglutination activity with induce stability formation in tobacco [Text] / N. A. Rozhnova, G. A. Gerashenkov, A. V. Babosha // Plant Physiology. – 2003. – Vol. 50, № 5. – P. 738–743.

УДК 615.322:633.15

ВИЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ ЛЕКТИНІВ У СИРОВИНІ КУКУРУДЗИ ЗВИЧАЙНОЇ ТА ВИВЧЕННЯ ЛЕКТИНОВОЇ АКТИВНОСТІ

Карпюк У.В., Кисличенко В.С.

Встановлено наявність лектинів в досліджуваних зразках сировини кукурудзи звичайної: коренях, стеблах, волоті, листі та стовпчиках з приймочками. Лектиноподібну активність в сировині визначали методом біологічного тестування ратусеритроаглютигації, в основу якого закладено принцип утворення агрегатів лектинами з еритроцитами щурів. За одиницю активності лектинів приймали мінімальну кількість лектинів, яка викликає аглютинацію еритроцитів. Для доказу протеїнової природи екстрактів, що викликають аглютинації, проводили їх тестування на наявність білка методом Бредфорд. Було визначено, що лектинова активність коренів кукурудзи – 6,21±0,11 од/мг білка; волоті – 2,61±0,17 од/мг білка; листя – 0,62 ±0,05 од/мг білка; приймачок – 1,06±0,08 од/мг білка; стебел – 0,97±0,09 од/мг білка. Активність лектинів листя, стебел та приймачок кукурудзи є найбільшою.

Ключові слова: кукурудза звичайна, лектини, лектинова активність

УДК 615.322:633.15

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ЛЕКТИНОВ В СЫРЬЕ КУКУРУЗЫ ОБЫКНОВЕННОЙ И ИЗУЧЕНИЕ ЛЕКТИНОВОЙ АКТИВНОСТИ

Карпюк У.В., Кисличенко В.С.

Определено наличие лектинов в исследуемых образцах сырья кукурузы обыкновенной: корнях, стеблях, метелках, листьях и столбиках с рыльцами, путем определения лектиновой активности. Лектиноподобную активность в сырье определяли методом биологического тестирования ратусеритроаглютинации, в основе которого лежит принцип образования агрегатов лектинами с эритроцитами крыс. За единицу активности принимали минимальное количество лектинов, которое вызывает агглютинацию эритроцитов. Для доказательства протеиновой природы экстрактов, которые вызывают агглютинацию, проводили их тестирование на наличие белка методом Бредфорд. Было определено, что лектиновая активность корней кукурузы – 6,21±0,11 од/мг белка; метелок – 2,61±0,17 од/мг белка; листьев – 0,62 ±0,05 од/мг белка; столбиков – 1,06±0,08 од/мг белка; стеблей – 0,97±0,09 од/мг белка. Установлено, что лектиновая активность листьев, стеблей и столбиков была наибольшей.

Ключевые слова: кукуруза обыкновенная, лектины, лектиновая активность

UDK 615.322:633.15

IDENTIFICATION OF LECTINS OF ZEA MAYS RAW MATERIAL AND THE STUDY OF LECTIN ACTIVITY

Karpiuk U.V., Kyslychenko V.S.

The aime of the study was to identify lectins in the Zea mays raw material: roots, stems, heads, leaves and corn silk and study their activity. Lectins activity has been studied using the biological method of ratuserytroagglutination. This method is based on formation of aggregates of lectins and rats erythrocytes. The activity unit was the floor amount of lectins that agglutinate erythrocytes. The protein nature of extracts that agglutinate has been determined using Bradford method. The lectins activity of Zea mays roots was 6,21±0,11 unit/mg of protein; of heads – 2,61±0,17 unit/mg of protein; of leaves – 0,62 ±0,05 unit/mg of protein; of corn silk – 1,06±0,08 unit/mg of protein; of stems – 0,97±0,09 unit/mg of protein. The greatest lectins activity was in leaves, stems and corn silk.

Key words: Zea mays, lectins, lectin activity