

Для сопоставления данных электроальгологического тестирования проб воды с величинами ПДК воспользуемся соотношением [8]:

$$\eta = \frac{C_{Ni}}{ПДК_{Ni}} + \frac{C_{Cu}}{ПДК_{Cu}} + \frac{C_{Zn}}{ПДК_{Zn}} + \frac{C_F}{ПДК_F},$$

где C – концентрация соответствующего элемента.

Из сравнения полученных результатов видно (см. рис.1, табл.1), что проба, имеющая больший показатель, вызывает и больший биоэлектрический эффект. Эта закономерность просматривалась практически во всех пробах воды.

Таким образом, даже такое простое сопоставление данных электрофизиологического тестирования с показателями ПДК показывает возможность использования развиваемого нами подхода для интегральной оценки качества воды. Более того, если в процессе дальнейшего тестирования образцов воды тех же контрольных станций соответствующие точки окажутся в других квадрантах или сильно изменятся величины сдвигов регистрируемых параметров, то вполне вероятно появление количественных или качественных изменений в компонентном составе контролируемых природных вод.

Еще раз следует подчеркнуть особенности разрабатываемого нами приема: экспрессность (время развития реакции на действие эффектора составляет 20–30 мин); высокая чувствительность (сдвиги регистрируемых параметров в ряде случаев отмечались при концентрациях поллютантов в пробах воды ниже значений ПДК), что позволяет обнаружить изменения на ранних этапах появления поллютантов в среде; простота экспериментальной процедуры; возможность автоматизации сбора и обработки результатов биотестирования (регистрируется электрический сигнал).

В заключение отметим, что более корректную трактовку результатов биологического тестирования качества вод в терминах ПДК можно провести с использованием процедуры канонической корреляции. Однако в этом случае требуется большое количество материала для обучающей выборки.

1. Баренбойм Г.М., Маленков А.Г. Биологически активные вещества. Новые принципы поиска. М., 1986.
2. Крайнюкова А.Н. // Методы биотестирования вод. Черноголовка. 1988. С.4.
3. Губский Ю.И., Долго-Сабуров Б.Б., Храпак В.В. Химические катастрофы и экология. Киев, 1993.
4. Воробьев Л.Н., Курелла Г.А. // Биофизика. 1965. Т.10. С.788.
5. Юрин В.М., Плакс А.В., Кудряшов А.П. // Методы биотестирования вод. Черноголовка. 1988. С.33.
6. Юрын У.М. // Весці АН БССР. Сер. біял. навук. 1979. №6. С.108.
7. Ён жа // Там жа. 1989. №1. С.24.
8. Черкинский С.Н. Санитарные условия спуска сточных вод в водоемы. М., 1962.

Поступила в редакцию 29.05.96.

УДК 577.334/37

А.В.ТИМОШЕНКО

ГЛИКОБИОЛОГИЯ И БИМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКТИНОВ*

The review is devoted to the substantiation of the concept about using of carbohydrate-binding proteins (lectins) as stimulators of cellular functions in biomedical research. The general information on lectins, their physiological role, biological activity of herbal and endogenous lectins, and the application of lectins for study of disease-associated disfunctions of blood cells including cancer-dependent alterations are discussed.

Введение

Гликобиология – новое направление в молекулярной и клеточной биологии, предметом изучения которого является роль углеводспецифических взаимодействий в функционировании живых систем. В настоящее время стало ясно, что кроме общеизвестной функции источников энергии углеводы участвуют в процессах обмена и переноса биологической информации [1]. Белок-углеводные взаимодействия дополняют такие классические типы процессов молекулярного узнавания, как взаимодействия белок–белок, белок–нуклеиновая кислота, фермент–субстрат. В отличие от белков и нуклеиновых кислот, которые

* Доклад на 2 съезде Белорусского общества фитобиологов и биофизиков, 25–27 июня 1996 г.

по своей структуре являются линейными гетерополимерами, углеводные цепи являются, как правило, сильно разветвленными вследствие многовариантности гликозидных связей между углеродными атомами моносахаридных субъединиц [2]. Строение реальных углеводных детерминант, участвующих в обеспечении важных биологических функций, имеет в некоторых случаях универсальное строение и подробно рассматривается в ряде обзорных работ [3,4].

Биологическая информация, которая содержится в структуре углеводных цепей, декодируется посредством углеводсвязывающих белков, обеспечивающих реализацию адекватного биологического ответа. Различают несколько групп углеводсвязывающих белков, которые могут быть ферментами (гликозидазы и гликозилтрансферазы) [5], иммуноглобулинами (антитела против углеводных детерминант) [6] и лектинами [7]. В отличие от ферментов и иммуноглобулинов, которые представляют известные классы биологически активных веществ, под лектинами понимают специфические белки неиммунной и неферментативной природы, обладающие свойством обратимо и избирательно связывать углеводы и углеводные компоненты гликоконъюгатов различной природы. Несмотря на то, что лектины обнаружены в различных живых системах от простейших до человека, их биологическая роль остается пока не выясненной. Тем не менее эти вещества получили широкое применение в биомедицине в качестве, прежде всего, гистохимических маркеров для изучения экспрессии гликолигандов на поверхности клеток и в биологических жидкостях [4,8], а также митогенных стимуляторов [9]. Следует отметить, что как митогенные так и немитогенные лектины являются стимуляторами различных аспектов клеточного метаболизма, причем ряд изменений происходит в первые минуты после связывания лектинов с углеводсодержащими рецепторными структурами плазматической мембраны. Изучение стимулирующего действия лектинов на клетки имеет не только теоретическое, но и практическое биомедицинское значение, поскольку, во-первых, известны иммуномодулирующие лектины с антиопухолевыми и антивирусными свойствами [10,11] и, во-вторых, при ряде патологий содержание эндогенных лектинов в организме может существенно изменяться [12]. Подобно таким модификаторам биологического ответа клеток, как гормоны и цитокины, лектины могут запускать процессы трансмембранной биосигнализации в клетках [13]. Лектины выступают при этом в качестве нового типа активирующих агентов с заданными гликобиохимическими свойствами; результат действия которых на клетки зависит, по крайней мере, от двух факторов: а) экспрессии лектинсвязывающих гликолигандов на поверхности клеток и б) функциональной активности клеток и их метаболического статуса. Цель настоящего обзора состоит в обосновании новой концепции о биомедицинском применении лектинов в качестве селективных стимуляторов процессов биосигнализации в клетках и в качестве гликобиологических и биохимических маркеров клеточных патологий.

1. Общие сведения о лектинах и их физиологической роли в организме

История изучения лектинов составляет более 100 лет, когда немецким ученым Штильмарком в 1888 году впервые были описаны гемагглютинирующие свойства токсина из клещевины обыкновенной, известного сегодня как *Ricinus communis* агглютинин – RCA. Наиболее существенные достижения последних лет связаны с идентификацией различных типов эндогенных лектинов и углеводсвязывающих белков в тканях, биологических жидкостях и на поверхности клеток человека и животных [14–16] и с использованием растительных лектинов, в частности галактозоспецифичного лектина омелы белой (*Viscum album* агглютинин – VAA) в онкологии [10].

Основным свойством лектинов является их специфическое обратимое взаимодействие с гликолигандами различной природы, включая рецепторные структуры плазматической мембраны клеток. В качестве гликолигандов лектинов могут выступать свободные углеводы, олиго- и полисахариды, углеводные компоненты гликопротеинов, протеогликанов и гликолипидов, а также углеводы, иммобилизованные на различных носителях. Одна из самых простых классификаций лектинов основана на их способности к специфическому связыванию основных моносахаридов (гексоз): D-глюкозы и D-маннозы, D-галактозы, L-фруктозы, N-ацетилглюкозамина, N-ацетилгалактозамина и N-ацетилнейрамино-

вой кислоты. Она основана на том, что лектины проявляют критическую чувствительность к положению группы OH при атомах С-3 и С-4 в пиранозном цикле, в отличие от положения группы OH при С-2 [7]. Рассматривая моноуглеводную специфичность лектинов, следует помнить о значительных ограничениях такой классификации при анализе экспрессии углеводов в составе мембранных и других структур. В ряде случаев лектины с номинально одинаковой углеводной специфичностью проявляют существенно разную активность в исследуемых системах. Например, галактозоспецифичные лектины VAA и RCA, относящиеся к классу родственных токсических лектинов со сходной субъединичной структурой, принципиально отличаются по их способности индуцировать агрегацию липосом из общих липидов тромбоцитов человека [17]. В то время как RCA, а также лектин сои (soybean agglutinin – SBA) вызывали обратимую лактозой агрегацию липосом, VAA и его углевод-связывающая В-субъединица были неактивны. Молекулярной причиной таких различий может быть то, что VAA, в отличие от RCA, проявляет более высокую селективность к β -D-Gal-(1→2)- β -D-Gal дисахариду [18], а гликолигандной структурой в составе использованных липосом могли быть ганглиозиды с терминальным дисахаридом β -D-Gal→GlcNAc [19].

Таким образом, различие в сродстве лектинов к углеводным лигандам различной степени сложности может быть одним из важных элементов системы гликобиологического контроля клеточных функций. Данное обстоятельство имеет особое значение для эндогенных лектинов, которые, как правило, проявляют повышенное сродство к природным гликолигандам, имеющим сложную структуру, например антигенам групп крови или деасилированным олигосахаридам с терминальными остатками галактозы. Современная классификация эндогенных лектинов* учитывает их субъединичную структуру, строение углеводсвязывающего домена и зависимость аффинитета лектинов к углеводам от присутствия различных кофакторов (рис. 1). В частности, к лектинам С-типа относят лектины, углеводсвязывающая активность которых зависит от присутствия ионов Ca^{2+} , а лектины S-типа объединяют галактозидсвязывающие белки (галектины), которые проявляют лектиновую активность в присутствии тиолов [15,20].

ЭНДОГЕННЫЕ ЛЕКТИНЫ

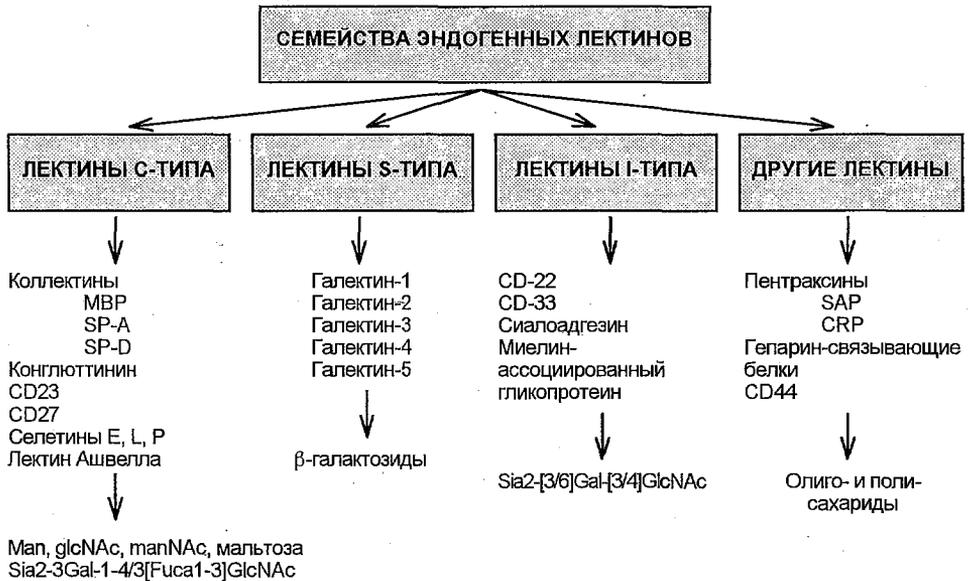


Рис.1. Современная классификация эндогенных лектинов человека и животных. Сокращения: MBP – mannose-binding protein, SP – surfactant protein, SAP – serum amyloid P component, CRP – C-reactive protein

Физиологическая роль лектинов как стимуляторов клеточных функций состоит в том, что в результате связывания с гликолигандными рецепторами плазматической мембраны они способны запускать различные пути в активации

* Составлена на основании данных обзорных работ [12,15,20,77].

ции клеток, которые могут быть альтернативны известным механизмам. В качестве примеров можно привести данные о регуляторной роли лектинов в таких процессах, как адгезия и миграция лейкоцитов [21], активация комплемента [22], апоптоз [23], лектинофагоцитоз [24] и метастазирование [25]. Несмотря на то, что многие аспекты функциональной активности лектинов в организме остаются неясными, их патофизиологическое значение выявляется на примере некоторых заболеваний, сопровождающихся резким снижением или возрастанием уровня углеводсвязывающих белков в составе биологических жидкостей [12]. Так как в норме уровень эндогенных лектинов в крови, как правило, низок и увеличивается при патологии, обоснованным представляется анализ их возможного стимулирующего действия на иммунокомпетентные клетки, которые эффективно связывают лектины на своей поверхности. В рамках данного подхода логичным является сравнение биологической активности лектинов растительной природы, инъекции которых используются в паллиативной терапии рака [26] с активностью эндогенных лектинов, поскольку очевидно, что эти соединения могут участвовать в сходных реакциях гликобиологической регуляции в организме в качестве эффекторных молекул.

2. Лектины с фармакологической активностью и стимуляция клеток

Общее количество лектинов, доступных в высокоочищенном виде, составляет, согласно каталогу фирмы Sigma за 1996 г., более 70 наименований. Однако известно лишь несколько лектинов, которые рассматриваются в качестве потенциальных фармакологических препаратов. В последние годы таким перспективным объектом биомедицинских исследований является галактозоспецифичный лектин из омелы белой VAA. Лектин омелы, по-видимому, является единственным растительным лектином, который используется в клинической практике как иммуномодулятор [27]. Предполагается, что именно этот лектин является ключевым компонентом лекарственных экстрактов омелы (Iscador, Helixor, Isorel, Vysorel, Iscucin, Abnoba-Viscum, Plenosol, Eurixor), рекомендованных в странах Западной Европы для паллиативной терапии опухолевых заболеваний [28]. Терапевтическое применение препаратов омелы, однако, до сих пор является предметом дискуссий из-за недостаточности сведений о биологической активности их компонентов, а также амбивалентности их действия на организм [29,30]. Поэтому актуальной проблемой является изучение механизмов взаимодействия очищенных препаратов VAA с клетками иммунной системы.

Лектин омелы белой относится к семейству растительных токсинов, которое включает также лектин из клещевины обыкновенной, открытый Штильмарком. Лектин омелы состоит из двух субъединиц, соединенных дисульфидными связями [27]. В-субъединица обладает лектиновой активностью и имеет молекулярную массу 34-36 кДа. А-субъединица, состоящая из двух полипептидных цепей с близкой молекулярной массой около 29 кДа, обладает токсической активностью и ингибирует синтез белка вследствие своей РНК N-гликозидазной активности и связывания с рибосомой 28S [31].

Лектин омелы обладает сильной агрегационной активностью и при концентрациях 1-5 мкг/мл вызывает эффективную агрегацию клеток крови: нейтрофилов, лимфоцитов, тромбоцитов и в меньшей степени эритроцитов [32]. Высокий уровень экспрессии рецепторов для лектина омелы наблюдается не только на поверхности клеток иммунной системы (лимфоциты и нейтрофилы человека, тимоциты крыс), но и на поверхности опухолевых клеток (рак легких), причем в цитологических препаратах различных субъектов эффективность связывания лектина достигает 70 % и выше [33]. С точки зрения биомедицинского применения лектина омелы, который является высокотоксическим веществом, особое значение имеет сопоставление биологической активности целого лектина и его субъединиц. С использованием в качестве модельной системы тимоцитов крыс нами было установлено, что В-субъединица и целый лектин обладали агрегирующей активностью, а также индуцировали такие реакции, связанные с процессами биосигнализации в этих клетках, как увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме и усиление менадионзависимой генерации H_2O_2 [34]. Перечисленные реакции клеток развивались в течение нескольких минут после добавления лектина. Биохимически чистая А-субъединица не вызывала агрегации клеток и изменения внутриклеточного Ca^{2+} . Более того, она

оказывала ингибирующее действие на генерацию H_2O_2 тимоцитами. Аналогичный характер имело действие лектина и его субъединиц на генерацию супероксидного анион-радикала нейтрофилами человека [35], а также агрегацию нейтрофилов и генерацию ими H_2O_2 [32]. Во всех случаях наблюдаемые эффекты были дозозависимыми и блокировались в присутствии гаптенного углевода – лактозы, что подтверждает лектиновую природу VAA-индуцированных реакций. Следует отметить, что, согласно данным других исследователей, сходное действие VAA и его B-субъединица оказывали *in vivo* также на секрецию α -фактора некроза опухолей, интерлейкинов 1 и 6 мононуклеарными клетками человека [36], а также увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме лимфоцитов человека [37]. Существенно, что подобные эксперименты *in vivo* с животными, а именно внутривенные инъекции оптимальных доз (0,25–1,0 мг/кг веса) VAA или его углеводсвязывающей субъединицы, давали увеличение таких иммунологических параметров у кроликов, как цитотоксическая активность NK-клеток и количество больших гранулярных лимфоцитов [38]. Эти данные свидетельствуют о том, что углеводсвязывающая B-субъединица лектина омелы обладает широким спектром активности целого лектина, соответствующего его иммуномодулирующему действию на клетки. Данный вывод имеет принципиальное значение для биомедицинского применения лектина, поскольку позволяет разработать стратегию по использованию нетоксической B-субъединицы взамен целого лектина. Отметим, что токсическая A-субъединица лектина омелы имеет другую, “нелектиновую” область своего применения в качестве действующего компонента иммунотоксинов [39].

Возвращаясь к активности целого лектина, следует отметить, что важным свойством лектина омелы является его активирующее действие на нейтрофилы, которые играют ключевую роль в антибактериальной и антиопухолевой защите организма. В присутствии цитохалазина В этот лектин индуцирует дегрануляцию нейтрофилов, сопровождающуюся высвобождением из клеток таких ферментов, как миелопероксидаза, эластаза и лизоцим [40]. Эта реакция является следствием сложной цепочки процессов трансмембранной биосигнализации в фагоцитах в ответ на действие растворимых стимулов [41]. Кроме того, VAA активирует НАДФН-оксидазную систему фагоцитов, функция которой заключается в генерации токсических супероксидного анион-радикала и H_2O_2 [42]. При этом VAA может быть использован в качестве индикатора гипертермического повреждения НАДФН-оксидазной системы нейтрофилов, а именно термочувствительного цитоплазматического белка p67-phox [43]. Нами установлено, что прогревания суспензии нейтрофилов в течение 5 мин при $46^\circ C$ было достаточно для полного блокирования генерации H_2O_2 , тогда как скорость агрегации нейтрофилов при этом изменялась не столь критическим образом [32], что подтверждает биохимическую природу данного эффекта. Можно предположить, что аналогичную природу имеет механизм ингибирующего действия на нейтрофилы УФ-излучения [44]. Таким образом, с использованием лектина омелы можно выявить самые незначительные изменения в функциональной активности нейтрофилов, связанных с дефектами фагоцитарной системы. Другие растительные лектины (агглютинины *Triticum vulgare* – WGA и *Phaseolus vulgaris* – PHA) с отличной от VAA углеводной специфичностью также были эффективными индикаторами повреждения нейтрофилов под действием гипертермии и УФ-облучения [44], что не исключает возможности использования различных типов этих веществ в качестве стимуляторов клеточной активности.

Перспективным для терапевтического применения лектином является галактоспецифичный лектин jacalin из семян хлебного дерева (*Artocarpus heterophylla*). Он проявляет высокое сродство к дисахариду $Gal\beta(1\rightarrow3)GalNAc$ и, кроме того, связывается с антигеном CD4 на поверхности лимфоидных клеток за счет белок-белкового взаимодействия [45]. На примере этого вещества мы сталкиваемся с ситуацией, когда лектины могут содержать другой тип мест связывания для неуглеводных лигандов [46,47], что значительно расширяет спектр их биологической активности. Имеется ряд доказательств, что посредством CD4 происходит активация T-лимфоцитов, поскольку jacalin избирательно индуцирует пролиферацию CD4+ клеток [48] и вызывает увеличение в таких клетках уровня внутриклеточного кальция [49]. Ключевым моментом является то, что jacalin *in vitro* полностью ингибирует инфекцию лимфоидных клеток и

моноцитов вирусом СПИДа [11]. С учетом того, что *jalalin* стимулирует синтез интерлейкинов 6 и 2 [48], можно рассчитывать на перспективность его применения в качестве иммуномодулятора при лечении различных форм иммунодефицитных состояний. В то же время очевидно, что на современной стадии исследований клиническое применение растительных лектинов (*VAA* и *jalalin*) не может быть однозначным вследствие недостаточности знаний о механизмах их действия *in vivo*. Способность лектинов влиять на активность иммунокомпетентных клеток может иметь даже отрицательные эффекты для организма, так как некоторые лектин-индуцированные медиаторы, например цитокины, могут способствовать опухолевому росту [28].

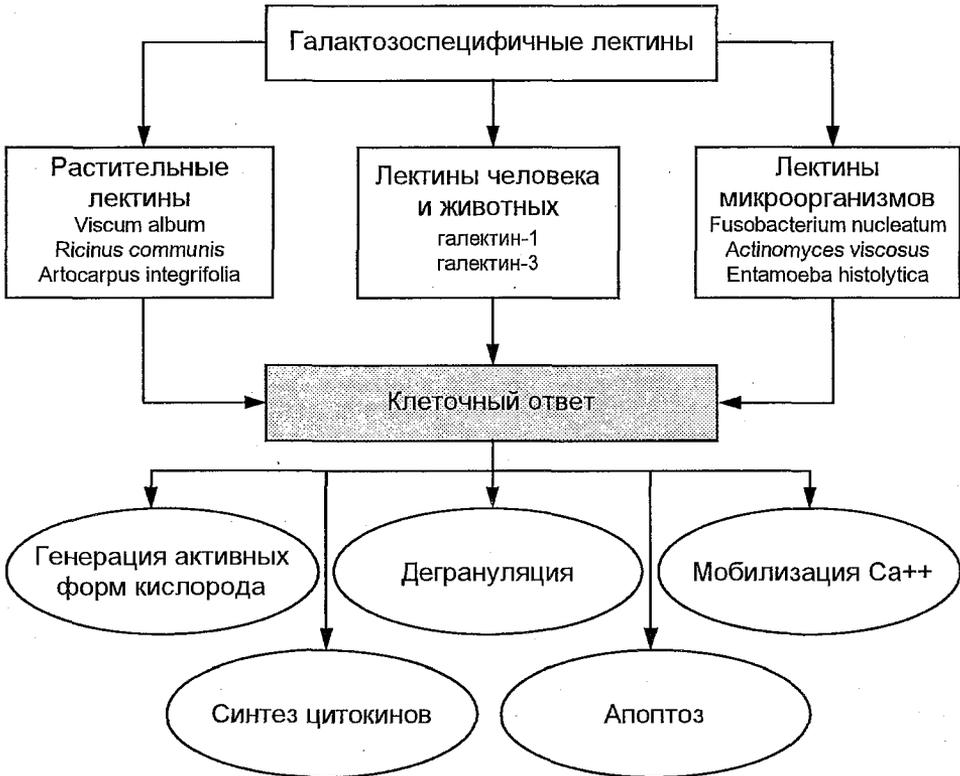


Рис.2. Общие пути биосигнализации в клетках, которые активируются под действием галактозидспецифичных лектинов различного происхождения

Представляет интерес определение биологической активности тех эндогенных лектинов, которые могли бы участвовать в регуляции рассмотренных клеточных функций *in vivo* и действия которых могут моделировать растительные лектины. Обоснованным представляется прежде всего анализ биологической активности эндогенных белков, родственных по углеводной специфичности лектину омелы, включая галектины, которые избирательно экспрессируются на поверхности опухолевых клеток [50]. Важным свойством галектинов является их стимулирующее действие на лимфоциты и нейтрофилы периферической крови человека. В частности показано, что галактин-1 вызывает апоптоз Т-лимфоцитов [51], а галактин-3 индуцирует генерацию супероксидного анион-радикала нейтрофилами в присутствии цитохалазина В [52]. Используя набор высокоочищенных эндогенных лектинов с известными биохимическими свойствами, а также галактозидспецифичные субфракции сывороточного иммуноглобулина G [53,54], мы изучили их влияние на три различных клеточных реакции, а именно: изменение внутриклеточного Ca^{2+} , генерацию H_2O_2 и дегрануляцию нейтрофилов. Оказалось, что димерный галактин из печени цыплят с молекулярной массой 16 кДа (CL-16) вызывал генерацию H_2O_2 нейтрофилами человека и мобилизацию внутриклеточного Ca^{2+} в тимоцитах крыс [55]. Мономерные галактины из сердца быка и из кишечника цыплят были менее активны или не активны. Субфракции иммуноглобулинов сыворотки крови, специфичные к α - и β -изомерам

галактозы, оказывали только стимулирующее действие на генерацию H_2O_2 нейтрофилами. Аналогичное по характеру действие эндогенные лектины оказывали на дегрануляцию нейтрофилов, а именно высвобождение миелопероксидазы, эластазы и лизоцима из клеток [40]. В результате данных исследований был обнаружен эндогенный лектин (димерный галектин из печени цыплят CL-16), который обладал спектром биологического действия лектина омелы, хотя имел более низкую удельную активность. Другими словами, имеется значительная аналогия в молекулярно-мембранных механизмах действия растительного лектина омелы и эндогенных лектинов с родственной углеводной специфичностью на клетки крови. Более того, галактозоспецифичные лектины ряда микроорганизмов (*Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces viscosus*, *Entamoeba histolytica*) также оказывают выраженное стимулирующее действие на клетки крови человека [56–58]. Рассмотренные данные позволяют сделать вывод о том, что галактозидспецифические лектины различного происхождения активируют общие пути биосигнализации в клетках, которые схематично представлены на рис.2. Этот вывод может быть положен в основу использования лектинов в качестве стимуляторов клеточного ответа для анализа нарушений функциональной активности клеток при патологии.

3. Биомедицинское применение лектинов в качестве стимуляторов клеточного ответа

Диагностическое использование лектинов в качестве стимуляторов специфических функций и реакций клеток пока ограничено, несмотря на то, что эти вещества эффективно взаимодействуют с клетками крови, согласно данным гистохимических исследований. Перспективным направлением является применение лектинов для изучения метаболической активности лейкоцитов, так как анализ функциональной активности этих клеток является общепринятым методом в клинической диагностике [59]. Традиционно для активации лейкоцитов используют хемотаксические пептиды, форболовые эфиры, опсонизированный зимозан, активированные белки системы комплемента. Использование этих соединений показало, что при хроническом гранулематозе нейтрофилы теряют способность генерировать активные формы кислорода [60]. Кроме того, эта функция снижается у больных при раке легких [61], раке печени [62], хронической нейтрофильной лейкемии [63], раке головы и шеи с неблагоприятным прогнозом [64], а также под действием противоопухолевых лекарств [65]. Механизмы активирующего действия стимуляторов различной природы на клетки существенно различаются, что делает обособанным применение лектинов в качестве нового типа стимуляторов фагоцитов [42]. По этой причине при патологии характер ответа нейтрофилов на действие лектинов может не совпадать с ответом на действие стимуляторов другой природы. Так, у пациентов, получающих кортикостероидную терапию, генерация супероксида нейтрофилами снижалась в ответ на *n*-формил-метионин-лейцин-фенилаланин и форбол-миристат-ацетат, в то время как ответ на маннозоспецифический лектин *Canavalia ensiformis* (Con A) не изменялся [66].

В результате выполненных нами исследований установлено, что характер изменений окислительного метаболизма нейтрофилов, стимулированных лектинами, зависит от гистологического типа опухоли, природы лектинов, индивидуальной чувствительности пациентов. Так, при немелкоклеточном раке легких наблюдается снижение генерации супероксидного анион-радикала нейтрофилами в ответ на Con A, кроме того, снижается величина этого ответа на Con A и VAA в условиях хемотерапии у пациентов с раком легких и раком толстой кишки [67]. Относительно слабый ответ клеток на галектин-1 был полностью подавлен у пациентов с первичным раком легких, а ответ на WGA, специфичного к *N*-ацетилглюкозамину и сиаловым кислотам, статистически не изменялся в изученных группах больных. Интересно, что у пациентов с раком молочной железы ответ нейтрофилов на все 4 изученных лектина (VAA, Con A, WGA и галектин-1) не отличался от контроля. Измерение другого параметра нейтрофилов, а именно генерации H_2O_2 , позволило выявить ряд селективных нарушений функциональной активности этих клеток при ЛОР-патологиях. В частности, у пациентов с раком гортани наблюдается снижение скорости генерации H_2O_2 нейтрофилами в ответ на действие VAA, в то время как ответ клеток на действие лектинов

WGA и STA при склероме и раке гортани не отличался от нормы [68]. Хотя при обоих типах патологии скорость лектин-индуцированной агрегации клеток не отличалась статистически от нормального уровня, скорость агрегации лимфоцитов под действием лектина омелы у пациентов с раком гортани и склеромой была ниже, чем скорость агрегации нейтрофилов, тогда как в норме эти показатели статистически не различались. Следовательно, при данных патологиях удельный вклад различных типов иммуннокомпетентных клеток в регуляции галактозоспецифичных реакций существенно изменяется.

При раке легких и ЛОР-заболеваниях мы обнаружили также значительные изменения в дегрануляции нейтрофилов – другой важной патофизиологической реакции этих клеток. Оказалось, что при мелкоклеточном раке легких Con A-индуцированное высвобождение эластазы из нейтрофилов было выше, чем у контрольной группы доноров, а высвобождение лизоцима существенно различалось в группах пациентов с мелкоклеточной и немелкоклеточной карциномой [40]. Лектининдуцированное высвобождение миелопероксидазы было статистически одинаковым во всех исследованных группах пациентов с легочными заболеваниями. Интересно, что величина VAA-индуцированной дегрануляции клеток при раке легких не отличалась от контрольных значений. В группе пациентов с ЛОР-заболеваниями (склерома, хронический ларингит, рак гортани) значительное подавление высвобождения лизоцима из нейтрофилов в ответ на действие PNA, Con A, PSA и SNA (*Sambucus nigra* агглютинин), в сравнении с контролем, наблюдалось только при склероме [69]. Рассмотренные данные свидетельствуют о том, что тип патологии существенно влияет на лектининдуцированную реактивность нейтрофилов в реакциях "дыхательного взрыва" и дегрануляции, причем изменения этих характеристик клеток не зависят в общем случае друг от друга. Следует отметить, что во всех изученных группах пациентов, даже в контроле, наблюдается значительный межиндивидуальный разброс измеряемых лектиновых параметров. Этот факт, по-видимому, имеет определяющее значение при разработке схем клинического применения лектинов с иммуномодулирующими свойствами, поскольку индивидуальная восприимчивость пациентов может быть использована в качестве критерия успешного проведения данного типа терапии.

Перспектива применения лектин-индуцированных реакций для разработки методов дифференциальной диагностики не только рака, но и неонкологических заболеваний, а также контроля состояния иммунной системы больных в ходе лечения подтверждается данными других исследователей. В работе [70] рассматривалась лектининдуцированная агглютинация лимфоцитов у пациентов с инсулинзависимой и инсулиннезависимой формами диабета. Из трех использованных лектинов (ConA, PNA, SBA) только SBA позволял дифференцировать инсулинзависимую форму диабета, при которой лимфоциты обладали повышенной агглютинабельностью в сравнении с контролем. Интересно, что у пациентов с инсулинзависимой формой диабета Con A-индуцированный хемилюминесцентный ответ изолированных нейтрофилов не отличался от ответа в контрольной группе, тогда как в цельной крови величина этой реакции была значительно выше, чем в контроле, что свидетельствовало о наличии праймирующих циркулирующих агентов в крови больных [71]. Следует отметить, в результате хемотерапии с применением циклоспорина А в течение 3 месяцев лектинзависимая реакция в цельной крови возвращалась к нормальному уровню. При раке легкого наблюдали снижение пролиферативного ответа Т-лимфоцитов на PNA, причем этот эффект авторы связывают с присутствием адгезирующих клеток (моноцитов) в общей клеточной популяции [72]. Интересно, что индометацин частично восстанавливал ответ клеток на PNA, что указывает на участие простагландинов в данной реакции. Показано, что у больных с атопичным дерматитом наблюдается существенное снижение скорости превращения инозитола в инозитол-1-фосфат мононуклеарными лейкоцитами в ответ на Con A [73], что свидетельствует о важной роли вторичных мессенджеров в патофизиологии атопичных состояний. Подавление процессов кэппинга рецепторов Con A на поверхности нейтрофилов выявлены у пациентов с нарушенной адгезивной функцией нейтрофилов (*leukocyte adhesion deficiency* – LAD), которые не экспрессируют на своей поверхности лейкоадгезины CD11/CD18 [74]. В то время как в контроле кэппинг конканавалиновых рецепторов наблюдался у 52 % нейтрофилов, только 10 % нейтрофилов у пациентов с LAD проявляли эту активность.

У больных с хронической миелоидной лейкемией наблюдается ингибирование эндоцитоза Соп А гранулоцитами, тогда как нормальные гранулоциты поглощали этот лектин в течение 5 мин при 37°C [75].

В заключение отметим, что лектининдуцированные реакции нейтрофилов применимы для изучения фармакологической активности антибиотиков, антиопухолевых препаратов и других лекарственных соединений. Так, показано, что генерация супероксидного радикала нейтрофилами под действием Соп А снижается в присутствии эритромицина, рокситромицина и триметоприма [76]. Очевидно, что при ингибировании активности фагоцитов будет снижаться и антибактериальная функция этих клеток, что необходимо учитывать при разработке схем лечения пациентов.

Совокупность рассмотренных данных позволяет заключить, что растительные лектины с фармакологической активностью и эндогенные лектины активируют углеводспецифические пути биосигнализации в клетках крови и выступают в качестве регуляторов функциональной активности нейтрофилов и лимфоцитов. Важное биомедицинское значение имеет сходство в биологической активности галактозоспецифичного лектина омелы, обладающего иммуномодулирующей и антиопухолевой активностью, и эндогенных галектинов, физиологическая роль которых в организме остается малоизученной. Попытки использования очищенных препаратов VAA для лечения опухолей [10,26,28] имеют, таким образом, рациональное обоснование, хотя и требуют более глубоких и детальных исследований в будущем из-за амбивалентности действия лектинзависимых медиаторов на клетки. В этой связи важное значение приобретает изучение механизмов патогенеза заболеваний, в основе которых лежат дефекты гликобиологических функций клеток. В зависимости от типа патологии селективные нарушения функциональной активности клеток (генерация активных форм кислорода, дегрануляция, агрегация) могут быть выявлены непосредственно с помощью лектинов в качестве биохимических маркеров и специфических стимуляторов иммунокомпетентных клеток. В связи с этим представляется обоснованным использование лектинов не только в качестве исследовательских средств, но и для разработки новых методов лектиновой диагностики как рака, так и неонкологических заболеваний на основе определения функционального ответа клеток на действие лектинов.

1. Laine R. A. // *Glycosciences: Status and Perspectives*. Weinheim; London; New York. 1997. P.1.
2. Хьюз Р. Гликопротеины. М., 1985. С.140.
3. Kobata A. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V.209. P.483.
4. Лахтин В. М. // *Биохимия*. 1995. Т.60. С.187.
5. Ichikawa Y., Look G. C., Wong C.-H. // *Anal. Biochem.* 1992. V.202. P.215.
6. Feizi T., Childs R. A. // *Biochem. J.* 1987. V.245. P.1.
7. Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д. Лектины. Львов, 1981. С.156.
8. Луцик А. Д., Детюк Е. С., Луцик М. Д. Лектины в гистохимии. Львов, 1989. С.144.
9. Borrebaeck C. A. K., Carlsson R. // *Adv. Lectin Res.* 1989. V.2. P.10.
10. Gabius H.-J., Gabius S., Joshi S. S. et al. // *Planta Med.* 1994. V.60. P.2.
11. Favero J., Corbeau P., Nicolas M. et al. // *Eur. J. Immunol.* 1993. V.23. P.179.
12. Тимошенко А. В. // *Мед. новости (Минск)*. 1997. №4. С.16.
13. Villalobo A., Horcajadas J. A., André S., Gabius H.-J. // In: *Glycosciences: Status and Perspectives*. Chapman & Hall. Weinheim; London; New York. 1997. P.485.
14. Gabius H.-J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. V.1071. P.1.
15. Drickamer K., Taylor M. E. // *Annu. Rev. Cell Biol.* 1993. V.9. P.237.
16. Gearing A. J. H., Newman W. // *Immunol. Today.* 1993. V.14. P.506.
17. Samal A. B., Gabius H.-J., Timoshenko A. V. // *Anticancer Res.* 1995. V.15. P.361.
18. Lee R. T., Gabius H.-J., Lee Y. C. // *Carbohydr. Res.* 1994. V.254. P.269.
19. Carlsson K.-A. // *Trends Pharmacol. Sci.* 1991. V.12. P.265.
20. Barondes S. H., Cooper D. N. W., Gitt M. A., Leffler H. // *J. Biol. Chem.* 1994. V.269. P.20807.
21. Mackay C., Imhof B. A. // *Immunol. Today.* 1993. V.14. P.99.
22. Holmskov U., Malhotra R., Sim R. B., Jensenius J. C. // *Ibid.* 1994. V.15. P.67.
23. Savill J., Fadok V., Henson P., Haslett C. // *Ibid.* 1993. V.14. P.131.
24. Sharon N. // *FEBS Lett.* 1987. V.217. P.145.
25. Raz A., Lotan R. // *Cancer Metast. Rev.* 1987. V.6. P.433.
26. Beuth J., Ko H. L., Gabius H.-J. et al. // *Clin. Invest.* 1992. V.70. P.658.
27. Gabius S., Joshi S. S., Kayser K., Gabius H.-J. // *Int. J. Oncol.* 1992. V.1. P.705.
28. Gabius H.-J., Gabius S. // *Dtsch. Arztebl.* 1994. V.91. P.A2320.
29. Hauser S. P. // *Therapiewoche.* 1993. V.43. P.76.
30. Gabius H.-J., Gabius S. // *Onkologie.* 1996. V.19. P.74.
31. Endo Y., Tsurugi K., Franz H. // *FEBS Lett.* 1988. V.231. P.378.

32. Timoshenko A.V., Cherenkevich S.N., Gabius H.-J. // Biomed. Pharmacother. 1995. V.49. P.153.
33. Timoshenko A.V., Kayser K., Kaltner H. et al. // Lung Cancer. 1996. V.14. P.75.
34. Timoshenko A.V., Gabius H.-J. // Planta Med. 1995. V.61. P.130.
35. Timoshenko A.V., Gabius H.-J. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1993. V.374. P.237.
36. Hajto T., Hostanska K., Frei K. et al. // Cancer Res. 1990. V.50. P.3322.
37. Büssig A., Suzart K., Bergmann J. et al. // Cancer Lett. 1996. V.99. P.59.
38. Hajto T., Hostanska K., Gabius H.-J. // Cancer Res. 1989. V.49. P.4803.
39. Тоневицкий А.Г., Агапов И.И., Фисенко А.П. // Биотехнология. 1995. №11. С.5.
40. Timoshenko A.V., Kayser K., Drings P. et al. // Res. Exp. Med. 1995. V.195. P.153.
41. Boxer L.A., Smolen J.E. // Hematol. Oncol. Clin. North Am. 1988. V.2. P.101.
42. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. // Биополимеры и клетка. 1994. Т.10. С.58.
43. Erickson R.W., Malawista S.E., Garrett M.C. et al. // J. Clin. Invest. 1992. V.89. P.1587.
44. Тимошенко А.В., Черенкевич С.Н. // Гематол. Трансфузиол. 1995. Т.40. С.32.
45. Lafont V., Dornand J., Covassin L. et al. // J. Leukoc. Biol. 1996. V.59. P.691.
46. Barondes S.H. // Trends Biochem. Sci. 1988. V.13. P.480.
47. Gabius H.-J. // Int. J. Biochem. 1994. V.26. P.469.
48. Blasco E., Barra A., Nicolas M. et al. // Eur. J. Immunol. 1995. V.25. P.2010.
49. Lafont V., Dornand J., d'Angeas A.D. et al. // J. Leukoc. Biol. 1994. V.56. P.521.
50. Xu X.-C., El-Naggar A.K., Lotan R. // Am. J. Pathol. 1995. V.147. P.815.
51. Perillo N.L., Pace K.E., Seilhamer J.J., Baum L.G. // Nature. 1995. V.378. P.736.
52. Yamaoka A., Kuwabara I., Frigeri L.G., Liu F.-T. // J. Immunol. 1995. V.154. P.3479.
53. Schneller M., André S., Cihak J. et al. // Cell. Immunol. 1995. V.166. P.35.
54. Dong X., Amselgruber W.M., Kaltner H. et al. // Eur. J. Cell. Biol. 1995. V.8. P.96.
55. Timoshenko A.V., André S., Kaltner H. et al. // Br. J. Haematol. 1996. V.93. Suppl.2. P.99.
56. Sandberg A.L., Mudrick L.L., Cisar J.O. et al. // Infect. Immun. 1988. V.56. P.267.
57. Mangan D.F., Novak M.J., Vora S.A. et al. // Ibid. 1989. V.57. P.3601.
58. Shain D.C., Satata R.A., Ravdin J.I. // Ibid. 1992. V.60. P.2143.
59. Дуглас С.Д., Куи П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике. М., 1983. С.112.
60. Segal A.W. // J. Clin. Invest. 1989. V.83. P.1785.
61. Hara N., Ichinose Y., Asoh H. et al. // Cancer. 1992. V.69. P.1682.
62. Itoh K., Nakao A., Kishimoto W. et al. // Gastroenterol. Jpn. 1993. V.28. P.541.
63. Kaplan S.S., Berkow R.L., Joyce R.A. et al. // Acta Haematol. 1992. V.87. P.16.
64. Kaffenberger W., Clasen B.P., van Beuningen D. // Clin. Immunol. Immunopathol. 1992. V.64. P.57.
65. Hara N., Ichinose Y., Motohiro A. et al. // Cancer. 1990. V.66. P.684.
66. Fukushima K., Ando M., Ito K. et al. // J. Clin. Lab. Immunol. 1990. V.33. P.117.
67. Timoshenko A.V., Kayser K., Drings P. et al. // Anticancer Res. 1993. V.13. P.1789.
68. Тимошенко А.В., Тимошенко А.П., Шляга И.Д. и др. // Здравоохранение. 1996. №2. С.10.
69. Тимошенко А.В., Горудко И.Е., Тимошенко А.П. // Тез. докл. IV съезда оториноларингологов Республики Беларусь. Мн., 1996. С.124.
70. Mukherjee N., Biswas T.K., Mitra S. et al. // J. Assoc. Physicians. India. 1991. V.39. P.172.
71. Descamps-Latscha B., Nguyen A.T., Feutren G. // J. Autoimmun. 1990. V.3. P.201.
72. Farinas M.C., Rodriguez-Valverde V., Zarrabeitia M.T. et al. // Cancer. 1991. V.68. P.1279.
73. Coulson I.H., Hurt G.R., Holden C.A. // Br. J. Dermatol. 1991. V.124. P.124.
74. Kindzelskii A.L., Xue W., Todd R.F. et al. // Blood. 1994. V.83. P.1650.
75. Zingde S.M., Anklesaria P.N., Advani S.H. et al. // Blut. 1987. V.55. P.81.
76. Hand W.L., Hand D.L., King-Thompson N.L. // Antimicrob. Agents Chemother. 1990. V.34. P.863.
77. Powell L.D., Varki A. // J. Biol. Chem. 1995. V.270. P.14243.

Поступила в редакцию 22.11.96

УДК 577.152.314.14

А.М.КУЛЬБА, А.А.ЭЛЬГАММУДИ

ОБНАРУЖЕНИЕ РЕСТРИЦИРУЮЩИХ ЭНДОНУКЛЕАЗ У БАКТЕРИЙ РОДА AEROMONAS

Fifty two bacterial strains of the genus *Aeromonas* isolated from natural sources were screened for the presence of site-specific endonucleases. It was determined that 3 strains produced type II restriction endonucleases.

Рестрицирующие эндонуклеазы широко используются в различного рода генно-инженерных экспериментах для анализа первичной структуры ДНК, в других молекулярно-биологических и молекулярно-генетических исследовани-