ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი

მარიამ ქობლიანიძე

ქამა სოკოს *(Agaricus bisporus)* ნაყოფსხეულის ლექტინების ზოგიერთი ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა in vitro სისტემაში

სამაგისტრო ნაშრომი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი,ბიოლოგიის
დეპარტამენტი

ხელმძღვანელები:

ასოცირებული პროფესორი
ელენე დავითაშვილი, ბიოლ.მეცნ.დოქტ

თბილისი. 2019 წელი

ს ა რ ჩ ე ვ ი

ანოტაცია..... 4

თავი I

ლიტერატურული მიმოხილვა

I.1. ბაზიდიომიცეტების ზოგადი

დახასიათება.....5

I.2. ბაზიდიალური სოკოები – ლექტინების პროდუცენტები 5

I.3. სოკოს ლექტინების როლი აპოპტოზში 6

I.4. *Agaricus bisporus* (ABL) აგარიკუსის ლექტინების დახასიათება, თვისებები.....8

კვლევის მიზანი 13

თავი II

ექსპერიმენტული ნაწილი

II.1. კვლევის ობიექტი 15

II.2. კვლევის მეთოდები.....15

II.2.1. ბაზიდიომიცეტების ბიომასიდან ლექტინური აქტივობის მქონე ცილების ექსტრაქცია.....16

II.2.2. ჰემაგლუტინაციური აქტივობის განსაზღვრა.....16

II.2.3. ლექტინების ნახშირწყლებისადმი სპეციფიკურობის დადგენა 18

II 2.4. ქამა სოკოს ნაყოფსხეულის ქუდისა და ფეხის ექსტრაქტებიდან N-აცეტილგლუკოზამინ- და ლაქტოზა-სპეციფიკური ლექტინების გამოყოფა და გასუფთავება აფინური ქრომატოგრაფიით.....19

II 2.6.ცილის განსაზღვრის მეთოდი.....19

II.2.7. ღვიძლის ქსოვილის უჯრედების სუსპენზიის მიღება.....20

II.2.8. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა *მთთ* მეთოდით.....20

II 2.9. აზოტის ჟანგის განსაზღვრა გრისის მეთოდით.....21

თავი III

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

III.1.. *Agaricus bisporus-ს* ნაყოფსხეულის ბიომასიდან ლექტინური აქტივობის ცილების გამოყოფა და დახასიათება.....22

III.2. *Agaricus bisporus-ს* ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან აფინური ქრომატოგრაფიით გამოყოფილი ლექტინების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა *ინ ვიტრო* სისტემაში.....24

III.2.1. *Agaricus bisporus-ს* ნაყოფსხეულიდან გამოყოფილი ლექტინების გავლენა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე 25

III.2. 2. *Agaricus bisporus-ს* ნაყოფსხეულიდან გამოყოფილი ლექტინების გავლენა აზოტის ჟანგის სინთეზის ინდუქციაზე.....27

III.2.3. *Agaricus bisporus-ს* ნაყოფსხეულიდან გამოყოფილი ლექტინების უჯრედშიდა სასიგნალო სისტემის ზოგიერთი კომპონენტის სინთეზის ინდუქციაზე.....28

დასკვნები 32

გამოყენებული ლიტერატურა 33

ანოტაცია

მარიამ ქობლიანიძეს სამაგისტრო ნაშრომი "**ქამა სოკოს (*Agaricus bisporus)* ნაყოფსხეულის ლექტინების ზოგიერთი ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა in vitro სისტემაში**" განეკუთვნება ბაზიდიომიცეტების კლასის სამკურნალო და ამავე დროს ფართოდ გამოყენებული საკვები სოკოს სათბურის პირობებში *ქართულ ტორფზე* კულტივირებული *Agaricus bisporus-ს* ნაყოფსხეულიდან გამოყოფილი ლექტინების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლას მოდელურ ცდებში ინ ვიტრო სისტემაში.

ჩატარებული კვლევის შედეგად ნაჩვენებია, რომ *კულტივირებული ქამა სოკოს Agaricus bisporus-ის ნაყოფსხეულიდან გამოყოფილი ლექტინები მთელი რიგი ბიოქიმიური მახასიათებლებით განსხვავდება ცნობილი კომერციული Agaricus bisporus-ის ABA/AAL აგლუტინინისგან.*

ბიოლოგიური თვისებების შესწავლისას გამოვლინდა ლექტინების შემაკავებელი ეფექტი უჯრედების სიცოცლისუნარიანობაზე, ასევე მიტოქონდრიების ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ფერმენტების აქტივაციის ფაქტორის **AKT**-*ის* - (პროტეინკინაზა B) *სინთეზზე. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ აღნიშნული ლექტინები სავარაუდოდ აპოპტოზში უნდა მონაწილეობდნენ.*

Annotation

The master work of Mariam Koblianidze " Studying some biological capacities of *Agaricus bisporus* lectins *in vitro* system" belongs to studying biological properties of commonly used edible mushroom Lectins. Which were extracted from *Agaricus bisporus* cultivated in condition of warm-house on Georgian peat in model assays *in vitro* system.

According the experiments, the lectins extracted from *Agaricus bisporus* cultivated in condition of warm-house on Georgian peat have many different biochemical characteristics in comparision with well-known commercial *Agaricus bisporus* ABA/AAL agglutinin.

It was demonstrated that lectins have retarding effects on cell viability and AKT (proteinkinase B) activating factor of energetic metabolism enzymes of midocontria while studying biological effects. There is a consideration that these lectins ostensibly take part in apoptosis.

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თავი I

თავი 1. ლიტერატურის მიმოხილვა

I.1. ბაზიდიალური სოკოები-ლექტინების პროდუცენტები

უმაღლესი ბაზიდიალური სოკოები წარმოადგენენ ფიზიოლოგიურად მნიშვნელოვან ეუკარიოტულ ორგანიზმების ჯგუფს. ბოლო დრტოს საგრძნობლად გაიზარდა მეცნიერთა ინტერესი უმაღლესი ბაზიდიალური სოკოების (*Basidiomycetes*) მიმართ, როგორც სხვადასხვა მნიშვნელოვანი ბიოლოგიურატ აქტიური ნაერთების პროდუცენტები. ბაზიდიომიცეტებს, უპირატესად თეთრი ლპობის სოკოებს, გააჩნიათ უნიკალური ლიგნოცელულაზური ფერმენტული სისტემები, რაც განაპირობებს მათ ფართო გამოყენებას ინდუსტრიაში.. კერძოდ, ქსენობიოტიკებით დაბინძურებული ნიადაგებისა და აგროინდუსტრიული, ჩამდინარე წყლების ბიორემედიაციაში.ფარმაცევტული ნაერთების ტრანსფორმაციაში, ქაღალდის წარმოებასა და ქსოვილების საღებავების გაუფერულებაში, ფერმენტებისა და დიეტური დანამატების წარმოებაში, ფარმაკოლოგიური ნივთიერებების (პოლისაქარიდების, ანტიოქსიდანტების და ლექტინების) წარმოებაში.

უკანასკნელ წლებში სოკოდან ექსტრაგირებულ იქნა მნიშვნელოვანი თვისებების მქონე მრავალი ნივთერება: ქოლესტერინის დონის დამწევი, ანტიდიაბეტური, იმუნომოდულატორული საშუალებები, ახალი ფარმაცევტული პროდუქტები: პოლისაქარიდების, ანტიოქსიდანტების და ლექტინების ჩათვლით.

ბოლო ათეულ წლებში განსაკუთრებული ყურადღება მიიბყრო ბაზიდიომიცეტების ლექტინებმა ბიოლოგიური სტრუქტურებისა და პროცესების გამოსაკვლევად.ყურადსაღებია მათი პრაქტიკული გამოყენება კლინიკურ მედიცინაში ანტისიმსივნური, იმუნომოდულატორული, მიტოგენური და სხვა მრავალი თვისებების გამო.

I.2. სოკოს ლექტინების როლი აპოპტოზში

ლექტინები ცილოვანი მოლეკულებია, რომლებიც სპეციფიკურად უკავშირდებიან გლიკოკონიუგატების ნახშირწყლოვან კომპონენტებს,

როგორც ცნობილია, მცენარეული ლექტინები ცხოველურ სისტემაში ავლენენ მთელ რიგ განსხვავებულ ბიოლოგიურ ფუნქციებს. მათი ბიოლოგიური აქტივობა ცხოველურ სისტემაში ვლინდება უჯრედების აგლუტინაციაში, მიტოზის გამოწვევაში, ტოქსიკურობაში, უჯრედების ზრდის დათრგუნვაში. ლექტინები აფერხებენ სასიცოცხლო გზებს, მაგ. ანგიოგენეზს, ცილების სინთეზს.

დღესდღეობით დაგროვდა ინფორმაცია იმის შესახებ, რომ მთელი რიგი მცენარეული ლექტინებისა ცხოველურ სისტემაში იწვევენ აპოპტოზს, უჯრედების პროგრამირებულ სიკვდილს, რაც განპირობებულია მათი ციტოტოქსიკურობის თვისებით [Zh. Shi et al., 2017].

ზოგადად, სოკოს ლექტინების ბიოლოგიური როლი ვლინდება სამარაგო ფუნქციაში, ზრდაში, მორფოგენეზში, მოლეკულურ შეცნობაში, დაცვით ფუნქციაში, უჯრედების მომწიფებაში [Ng, T.B, 2004; Guillot, J. 1997]. დღევანდელ დღეს 60-დე სოკოს ლექტინია იდენტიფიცირებული, რომლებიც ავლენენ ანტისიმსივნურ, მიტოგენურ, ანტი-HIV-1-რე უკუ-ტრანსკრიპტაზულს [Li YR, 2008] და იმუნოგამაძლიერებელ აქტივობას [Zhang W. et al.,2014] .

უკანასკნელი ორი ათეული წლის განმავლობაში ლექტინების ნახშირწყლოვან კომპონენტებთან დაკავშირების სპეციფიკურობის გათვალისწინებით, მკვლევარების მიერ გამოვლენილია ლექტინები, რომლებიც შეიცნობენ სხვაობას სიმსივნურსა და არასიმსივნურ უჯრედებს შორის, მეტასტაზირებასთან ასოცირებულ გლიკოზილირების ხარისხს. ლექტინი-გლიკანის ურთიერთქმედება გადამწყვეტ ფუნქციას ასრულებს სხვადასხვა ფიზიოლოგიური და პათოლოგიური პროცესის განვითარებაში, მათ შორის იმუნური პასუხისა და სიმსივნეს განვითარებაში. ლექტინ-გლიკანის შეცნობის სისტემა ინიცირებს როგორც აპოპტოზს, ასევე აუტოფაგიას, რაც საფუძვლად უდევს სიმსივნური უჯრედების პროგრამირებულ სიკვდილს. აღნიშნულიდან გამომდინარე, ლექტინებს გააჩნიათ ანტისიმსივნური მოქმედება, ვინაიდან შეუძლიათ აპოპტოზის, აუტოფაგიის ინდუქცია და სიმსივნური ზრდის ინჰიბირება.

შესაბამისად, დაფუძვნდა ახალი მიმართულება, რომელიც ისახავს უჯრედების პროგრამირებული სიკვდილის სტრატეგიის უკეთესად დასახვას მცენარეული ლექტინების როგორც ანტი-სიმსივნური აგენტების კლინიკაში გამოყენებით. ფუნდამენტური კვლევებით დადგენილია, რომ მცენარეული ლექტინების მიკრომატრიცული რეაგენტების სახით სიმსივნეს უჯრედების დიაგნოსტიკაში, მკურნალობაში და პროგნოზირებაში გამოყენებას

წინ უსწრებდა მთელი რიგი მონაცემებისა მათი ანტი-სიმსივნური აქტივობისა სხვადასხვა სიმსივნურ უჯრედებთან მიმართებაში. [Liu B,ეტ ალ,2010; Coulibaly FS,2017].

დადგენილია, რომ მცენარეულ ლექტინებს შესწევთ უნარი გამოიწვიონ უჯრედების სიკვდილი სამი მთავარი მექანიზმით: 1. რიბოსომების პირდაპირი ინაქტივაციით, 2. ენდოციტოზზე დამოკიდებული მიტოქონდრიების დისფუნქციით და/ან 3. ნახშირწყალ-შემცველ რეცეპტორებთან დაკავშირების გზით. კონკრეტული მექანიზმები რჩება ბუნდოვანი.

მაგალითად, ონკოლოგიურ პრაქტიკაში (სიმსივნეს ალტერნატიულ თერაპიაში) ფითრის ლექტინი გამოიყენება (კუჭის სიმსივნე, მე-4 ფაზაში, ფილტვის, მე-2 ფაზაში). ეს ლექტინი ამცირებს გვერდით მოვლენებს რადიოთერაპიასა და ქიმიოთერაპიაში.

გამოყენებული ფითრის ლექტინი (*Mistletoe*, MLs) და რიცინის ჯგუფის ლექტინები სიმსივნურ უჯრედებში ავლენენ აპოპტოზის გამომწვევ აქტივობას რიბოსომების პირდაპირი ინაქტივაციით. ფითრის ლექტინი ისევე როგორც რიცინი, შედგება ორი ჯაჭვისაგან, ჯაჭვი A(MlsA, 3 დამოუკიდებელი დომენისაგან შედგება)- და B-ჯაჭვისაგან, რომელიც უზრუნველყოფს A-ჯაჭვის ტრანსპორტს ციტოპლაზმაში გარე მემბრანაზე ნახშირწყალ-შემცველ რეცეპტორთან დაკავშირების შედეგად. შესაბამისად A-ჯაჭვი აინჰიბირებს ცილის სინთეზს ენდოპლაზმურ რეტიკულუმზე რიბოსომას 28S სუბერთეულის ინაქტივაციით, ბლოკავს ტრანსლაციას [ ]. B ჯაჭვს კი გააჩნია იმუნომოდულატორული მოქმედება, ვინაიდან აძლიერებს ციტოკინების სეკრეციას და ნატურალური კილერების მოქმედებას. MLs -ს ლექტინებს ყოფენ სამ ჯგუფად. ML-I, ML-II, ML-III. ყველაზე კარგად შესწავლილია ML-I-ჯგუფი ანტისიმსივნური და იმუნომოდულატორული მოქმედების გამო. MLs ლექტინები აინდუცირებენ სიმსივნური უჯრედების კვდომას აპოპტოზის საფუძველძე. ზოგიერთი ლექტინი, მაგ. კონკანავალინი A დამოკიდებულია ენდოციტოზზე და შერჩევითად ლოკალიზდება მიტოქონდრიაზე და ინიცირებს უჯრედების აუტოფაგურ სიკვდილს. ენდოციტოზი ხორციელდება ცილა კლათრინის ჩართვით უჯრედული მემბრანის გლიკოპროტეინის მანოზას ნაშთთან დაკავშირების შედეგად. ინტერნალიზებული მცენარეული ლექტინები მნიშვნელოვნად ამცირებენ მიტოქონდრიის პოტენციალს, რასაც ციტოქრომ c-ს გამონთავისუფლება და აპოპტოზის ჩართვა მოყვება. მიტოქონდრიული ტრანსმემბრანული პოტენციალის შემცირება განაპირობებს აუტოფაგის პროცესის ჩართვას სხვადასხვა ცილების აქტივაციით (Bcl2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3-BNIP3 ან Beclin-1) [ ].

იმის გათვალისწინებით, რომ ლექტინები მაღალი სპეციფიურობით და სელექტიურობით უკავშირდებიან გლიკანურ სტრუქტურებს მათ გააჩნიათ პოტენციალი გამოყენებულ იქნან სიმსივნის დიაგნოსტიკაში. ოსპიდან გამოყოფილი მცენარეული ლექტინი **LCA,** რომელიც სპეციფიურად უკავშირდება α1-6 ფუკოზას გამოიყენება ჰეპატოცელულარული კარცინომის დიაგნოსტიკაში. დიაგნოსტიკა ეფუძვნება აღნიშნული ლექტინის სპეციფიურ თვისობას α-ფეტოპროტეინი-L3-სადმი [Pervin M. et al, 2015]. ეს უკანასკნელი წარმოადგენს ავთვისებიანი სიმსივნის AFP-გლიკოპროტეინის სპეციფიკურ იზოფორმას. შემუშავებულია ჰეპატოცელულარული კარცინომას დიაგნოსტიკის მიზნით შრატში α-ფეტოპროტეინი-L3-ს კონცენტრაციის განსაზღვრის კომერციული კლინიკური კომპლექტი. აღნიშნული ტესტ-სისტემა გახდა ღირებული კლინიკური ალტერნატივა სხვა უფრო ძვირად ღირებული და მაღალი სირთულის ტექნოლოგიებისა, როგორიცაა CT-სკანერი და MRI-იმიჯინგი. LCA/AFP-L3 ურთიერთკავშირი გამოიყენება სათესლეების კიბოს დიაგნოსტიკასა და მონიტორინგისთვის. ლექტინები ასევე აქტიურად გამოიყენება საკვერცხის კიბოს დიაგნოსტიკაში- ონკომარკერი CA-125 და ცილა HE4 არიან FDA-ს მიერ აღიარებული გლიკოპროტეინული ბუნების ონკომარკერები საკვერცხის კიბოს დიაგნოსტიკაში. *Amaranthus caudatus* აგლუტინინი (ACA), *Artocarpus integrifolia* აგლუტინინი (AIA), *Arachis hypogea* აგლუტინინი (AHA), *Vicia villosa* ლექტინი (VVL), *Griffonia simplicifolia* აგლუტინინი I (GSA I) და *Ulex europaeus აგლუტინინი* I (UEA I) არიან ის ლექტინები, რომლებიც შეიცნობენ CA125 აბერანტულ სტრუქტურას. *Pinellia ternata* lectin (PTL) რომელიც ბოლო დროს გამოყვეს სოკოდან სპეციფიურად უკავშირდებაα1-6 fucose-ს ნაშთებს. და შესაძლებელია პოტენციურად გამოყენებულ იქნას საკვერცხის, ძუძუს და პანკრეასის კიბოს დიაგნოსტიკაში. *Aleuria aurantia* ლექტინი (AAL) სპეციფიურად შეიცნობს რა α1-6, α1-3 and α1-4 fucose-ს ნაშთებს, წარმატებით გამოიყენეს პანკრეასის კიბოს დიფერენციალურ დიაგნოსტიკაში. AAL ებმის ფუკოზილირებულ ჰაპტოგლობინის β ჯაჭვს . თირეოგლობულინი- Tg არის FDA-ს მიერ აღიარებული გლიკოპროტეინული ბუნების ბიომარკერი ფარისებრი ჯირკვლის კიბოს დიაგნოსტიკაში. *Wisteria floribunda* აგლუტინინი (WFA) უკავშირდება თირეოგლობულინის სხვადასხვა იზოფორმებს.

I.3. *Agaricus* გვარის ლექტინები დახასიათება, *Agaricus bisporus* (ABL) აგარიკუსის ლექტინის ბიოლოგიური თვისებები

Agaricus blazei Murill- პირობითად გამოიყენება, როგორც ჯანსაღი საკვები კიბოს პრევენციისათვის. *Agaricus blazei* Murrill-დან გამოყოფილ ექსტრაქტს გააჩნია იმუნომოდულატორული, ანტიკარცინოგენული და ანტიმუტაგენური მოქმედება. *Agaricus bisporus* ლექტინი *და Agaricus polytricha* პროტეინი მდგრადი იმუნოსტიმულატორები არიან ჯანსაღი კვებისა და ფარმაცევტული უტილიზაციის თვალსაზრისით. (Chang et al. 2007). In vitro *A. bisporus* -ექსტრაქტს შეუძლია დათრგუნოს ფერმენტ არომატაზას აქტივობა და მოახდინოს ძუძუს კიბოს უჯრედების პროლიფერაციის პრევენცია. *A. blazei*-თხევადი ფრაქციამ მოახდინა პროსტატის კიბოს ზრდის ინჰიბირება. ორივე: ანდროგენ დამოკიდებულ და დამოუკიდებელ შემთხვევაში. *A. blazei-ს* თხევადმა ფრაქციამ განაპირობა ლაქტატ დეჰიდროგენაზას „გაჟონვა" უჯრედების 3 ხაზში. მაშინ როცა კასპაზა 3 ის აქტივობა და დნმ-ს ფრაგმენტაცია გაძლიერებული იყო ანდროგენ დამოუკიდებელ PC3 უჯრედების უმრავლესობაში. ცილების ექსპრესია აპოპტოზთან დაკავშირებული მოლეკულებისა გაიზარდა *A. blazei*-ს თხევადი ექსტრაქტის მოქმედებით PC3 უჯრედებზე. ორალურმა საკვებმა დანამატებმა *A. blazei*-ს თხევად ექსტრაქტთან კომბინაციაში (β-გლუკანის მაღალი ფარდობით) მნიშვნელოვნად დათრგუნა სიმსივნის ზრდა გვერდითი ეფექტების გარეშე იმუნოდეფიციტის მქონე თაგვებში PC3 სიმსივნური ქსენოტრანსოლანტანტით. (Yu et al. 2009).Akiyama et al. (2011) - შეისწავლა აგარიტინის ეფექტები ჰიდრაზინის წარმოებული *A. blazei* Murrill- ის ექსტრაქტში ადამიანის მონოციტური ლიმფომის უჯრედებზე. (U937) აგარიტინმა გამოიწვია დნმ-ს ფრაგმენტაცია, ანნექსინ V -ს ექსპრესია და ციტოქრომ C –ს გამოთავისუფლება. აგარიტინით მკურნალობისას თანდათანობით იზრდება კასპაზების 3,8,9 აქტივობები. ეს შედეგები ცხადყოფს, რომ აგარიტინი აინდუცირებს აპოპტოზს U937 უჯრედებში. *Agaricus blazei-ს* იყენებენ, როგორც ადიუვანტს ქიმიოთერაპიაში. და მისგან იღებენ მრავალფეროვან ანტილეიკემიურ ნაერთებს. *A. bisporus-ს* ექსტრაქტის in vivo გავლენით თაგვებში DU145 და PC3 პროსტატის კიბოს ზომა და სიმსივნური უჯრედების პროლიფერაცია მცირდებოდა [Adams et al. 2008]. სიმსივნური უჯრედების შესწავლისას მნიშვნელოვანი ცვლილებები გამოვლინდა გენთა ექსპრესიაში ცხოველების საკონტროლო ჯგუფებთან შედარებით.

A. bisporus-ს ლექტინის დახასიათება და ბიოლოგიური თვისებები.

ადრეულ წლებში *Agaricus bisporus*-დან ანიონ-ცვლადი- და აფინური ქრომატოგრაფიით მუცინ-სეფაროზა 4B-ზე გამოყოფილი იყო 4 ლექტინი (ABA-I) [Sueyoshi

S, et al.1985]. მათი იზოელექტრული წერტილი შეესაბამება pI 6.70), II (pI 5.98), III (pI 5.69) და IV (pI 5.53, ხოლო ელექტროფორეზულად დეტერგენტის თანაობისას გამოვლენილია ერთი ზოლი მოლეკულური მასით 16 000 Da. ოთხივე ლექტინი მონოსაქარიდებიდან ავლენდა სპეციფიკურობას მხოლოდ მეთილ N-აცეტილ-ალფა-გალაქტოზამინისადმი. მოგვიანებით დადგენილ იქნა, რომ *Agaricus bisporus* ლექტინი (ABL) აქტინოფორინის მსგავს სტრუქტურას ავლენს, β-სენდვიჩი შედგება ორი β-ბოჭკოსაგან, რომელიც წარმოდგენილია 4- და 6-β-ძაფით შესაბამისად, ძაფები დაკავშირებული არიან სპირალი-მარყუჟი-სპირალი კიდურათი [Carrizo M.E., 2005].

გელ-ქრომატოგრაფიით დადგენილ იქნა, რომ თეთრი ქამა სოკოდან გამოყოფილი *Agaricus bisporus* აგლუტინინი-ლექტინის (ABA/ABL) მოლეკულური მასა 58,500 დალ-ს შეადგენს და ტეტრამერს წარმოადგენს, იზოელექტრული წერტილი მერყეობს pH 5.0 და pH 6.0. ABA წარმოადგენს ერთნაირი ნახშირწყალ-სპეციფიკურობის მქონე ორი ფიტოჰემაგლუტინინის ნარევს (PHA-A და PHA-B). თითოეულ მონომერს 2 განსხვავებული ნახშირწყალ-დამაკავშირებელი უბნები გააჩნია, ერთი გალაქტოზა-β-1,3-N-აცეტილგალაქტოზამინისა და მეორე გალაქტოზა-β-1,3-N-აცეტილგლუკოზამინის. *Agaricus bisporus* (ABL) გამოყოფილი ლექტინი განეკუთვნება Thomsen-Friedenreich-ანტიგენთან (T-დისაქარიდი) დამაკავშირებელი ცილების ჯგუფს, ლექტინი მაღალი თვისობით უკავშირდება TF-ანტიგენს. TF-ანტიგენი სპეციფიკურად ვლინდება ნეოპლასტიკურ ქსოვილებში [Diego F Gauto, ეტ ალ, 2011], ექსპრესირდება ავთვისებიანი და წინამორბედ მსხვილი ნაწლავის ეპითელიუმზე [Burton K, Prasad]. ABL ლექტინის სხვა T-დისაქარიდ-სპეციფიკურ ლექტინებთან შედარებით -AOL (*Arthrobotrys oligospora* lectin), ჯაკალინი და peanut agglutinin (Sastry *et al.* , 1986 ; Gupta *et al.* , 1992 ; Rosen *et al.* , 1996 ; Sharma *et al.* , 1996) მნიშვნელოვანი განსხვავება იყო გამოვლენილი, კერძოდ, აღნიშნული ჯაკალინი და peanut agglutinin ლექტინები ABL-საგან განსხვავებით, მნიშვნელოვნად უკავშირდებიან T-დისაქარიდის შემადგენელ მონოსაქარიდებს [Irazoqui F.J. ეტ ალ,1999], ABL-ლექტინი კი არ იკავშირებს მონოსაქარიდებს. Thomsen-Friedenreich-ანტიგენი შედგება Galβ1-3GalNAc, Ser/Thr-თან დაკავშირებული ცილებისაგან. ლექტინი ტეტრამერული სტრუქტურისაა და თითოეული მონომერი შეიცავს ორ ნახშირწყალ-დამაკავშირებელ დომენს. ეს სპეციფიკური ნახშირწყლები განსხვავდებიან მხოლოდ ჰიდროქსილის კონფიგურაციით, მსგავსად N-აცეტილ-d-გალაქტოზამინისა (GalNAc) და N-აცეტილ-d-გლუკოზამინისა (GlcNAc) [Albert

M Wu, 2010]. ABL ლექტინი ავლენს არასპეციფიკურ სისხლის ჯგუფის შეცნობას და აგლუტინირებას მსგავსად PHA-A და PHA-B ლექტინებისა, რომლებიც იწვევენ ერითროციტების აგლუტინაციას განურჩევლად სისხლის ჯგუფის ტიპისა. ლექტინის მემბრანის ზედაპირის გლიკოპროტეინებთან დაკაშირებისას ინტერნალიზდება კლათრინით შეფუთული ვეზილკულის სახით და აინჰიბირებს ბირთვში ლოკალიზებული სიგნალ-დამოკიდებული ცილების იმპორტს.

როგორც ცნობილია, სიმსივნური უჯრედის ზედაპირი განსხვავდება ნორმალური უჯრედისაგან გლიკოკონიუგატების შემადგენლობით. ლექტინები ავლენენ ანტიპროლიფერაციულ თვისებას გლიკოკონიუგატებთან დაკავშირებით ან იმუნომოდულატორული ეფექტის საშუალებით. *Agaricus bisporus* -ის ლექტინი (Galβ1,3GalNAc-თან დამაკავშირებელი ლექტინი) აინჰიბირებს სწორი ნაწლავისა და მკერდის კიბოს სიმსივნური უჯრედების ზრდას [Yu L.,1993]. *Agaricus bisporus* -ის ლექტინი სუპრესორულ ეფექტს ავლენს T და B ლიმფოციტების აქტივაციაზე [Greene W და სხვ. 1981].

ჩინელი მეცნიერების მიერ მოზრდილი C57BL/6J ხაზის თაგვების პანკრეასის β-უჯრედების რეგენერაციაზე შესწავლილი იყო ქამა სოკოდან გამოყოფილი ლექტინის თერაპიული ეფექტი [Yi Wang et al, 2012]. *Agaricus bisporus*-ის ლექტინი (ABL, 10 მგ/კგ) იწვევდა β-უჯრედების პროლიფერაციას. ნაჩვენები უყო, რომ ოპერაციის შემდგომ ლექტინის ხსნარის შეყვანის შედეგად (ლექტინით მკურნალობის შედეგად), სისხლში მნიშვნელოვნად კლებულობდა გლუკოზის კონცენტრაცია, რეგულირდებოდა ციკლინ D1, 2 და Cdk4 გენების ექსპრესია, ასევე იზრდებოდა პანკრეასული PDX-1 და ცილა Ngn3 (ნეიროგენინი 3), ინსულინის, GLUT-1 (გლუკოზას ტრანსპორტიორის) და გლუკოკინაზას ექსპრესია. მონაცემების საფუძველზე უჯრედის დაყოფის ციკლის ცილების რეგულირებით, გამოთქმულია მოსაზრება აღნიშნული ლექტინების დიაბეტის თერაპიაში გამოყენების შესაძლებლობაზე.

Agaricus bisporus (ABL) ლექტინის ეფექტი შედარებული იყო არაქისის ლექტინის (*Peanut agglutinin* (PNA) ეფექტთან კერატინოციტებზე. ორივე ლექტინი სპეციფიკურად უკავშირდება დისაქარიდს გალაქტოზილ- β-1,3-*N*-აცეტილ გლუკოზამინ α-. ეს დისაქარიდი ექსპრესირდება კერატინოციტებში პოლიმორფულ მემბრანულ გლიკოპროტეინზე CD44-ზე O-დაკავშირებული ჯაჭვით. PNA მიტოგენურ ეფექტს ავლენს მსხვილი ნაწლავის ეპითელურ უჯრედებზე, ხოლო ABL შექცევადად აკავებს ნაწლავის უჯრედების სიმსივნური ხაზის უჯრედების პროლიფერაციას ციტოტოქსიკური ეფექტის გარეშე. ამ მოვლენას თერაპევტული

პოტენციალი აქვს ფსორიაზის მკურნალობაში, სადაც გაზრდილია პროლიფერაცია [Parslew et al, 1999; Rolland D et al, 2010].

აგარიკუსის აგლუტინინი ძირითადად უკავშირდება GalNAcalpha1-> ნახშირწყლების კომპლექსს და ავლენს პოლივალენტური ტიპის დაკავშირების ფორმას. ლექტინის სუსტ ლიგანდებს განეკუთვნება გალაქტოზა და აცეტილგლუკოზამინი (GlcNAc). გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ბუნებრივ გლიკანებში აგარიკუსის ლექტინის დაკავშირებაში მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ Galbeta1 -> 3 / 4GlcNAcbeta1 -> ნაშთები [Wu A M et al, 2010]. ერთი და იგივე დომენზე ოთხი განსხვავებული გლიკოტიპია განთავსებული (Gαβ1-3GalNAcα1-, GalNAcα1- Ser / Thr и Gαβ1-3 / 4GlcNAcβ1-), რაც ერთ დომენზე სამი შეცნობის სისტემას წარმოქმნის. ეს შესაძლებელს ხდის ლექტინი მჭიდროდ დაუკავშირდეს გადაგვარებული უჯრედების ზედაპირს.

აღსანიშნავია, რომ ამ სოკოს ექტსრაქტებიც კი ავლენენ ანტისიმსივნურ სამკურნალო თვისებებს [Adams L S. 2008]. ნაჩვებები იყო, რომ მისი მთავარი კომპონენტი კონიუგირებული ლინოლეინის მჟავა აინჰიბირებდა პროსტატას სიმსივნეს ხაზის DU145 და PC3 უჯრედების პროლიფერაციას დოზა-დამოკიდებულად ინ ვიტრო ცდებში.

Agaricus bisporus - სოკოს ყველა ნაწილი მრავლად შეიცავს სამკურნალო თვისების მქონე პოლისაქარიდებს: β-გლუკანი, β-გლუკოპროტეინი, ჰეტერო β-გლუკოპროტეინი, ჰეტეროგლუკომანოპროტეინი და სხვ. მათი ანტისიმსივნური ქმედება დაკავშირებულია პოლისაქარიდებით იმუნური უჯრედების - მაკროფაგების, T-ლიმფოციტების, ქილერების აქტივაციასთან. მაკროფაგები და მონოციტები თავის მხრივ, გამოიმუშავებენ ინტერლეიკინ 1-ს და სიმსივნეს ნეკროზის ფაქტორს. პოლისაქარიდები ასევე აძლიერებენ ინტერფერონის და ინტერლეიკინ-2-ის გამომუშავებას.

Agaricus bisporus - სოკო ასევე შეიცავს დიდი რაოდენობით სტერინების წარმომადგენელს ერგოსტერინს (C28H44O), რომელიც ვიტამინი D2-ის წინამორბედია. გამოვლენილ იქნა ერგოსტერინისა და ნატრიუმის პიროგლუტამატის ანტისიმსივნური ეფექტი. მეცნიერთა აზრით ეფექტი განპირობებულია სიმსივნეს სისხლძარღვოვანი სისტემის ბლოკირებით. ეს ნაერთები იმუნურ უჯრედებს სიმსივნური კვანძის ცენტრალურ უბანში შეღწევადობას ხელს უწყობენ.

კვლევის მიზანი

როგორც ცნობილია, სიმსივნური უჯრედის ზედაპირი განსხვავდება ნორმალური უჯრედისაგან გლიკოკონიუგატების შემადგენლობით. სიმსივნურ უჯრედებს ახასიათებთ გლიკოკონიუგატების სეკრეცია, რომელთა გლიკანების სტრუქტურა არის შეცვლილი (აბერანტული). ლექტინებს, როგორც ნახშირწყალ-დამაკავშირებელ ცილებს აქვთ უნარი აღმოაჩინონ ასეთი აბერაციები. ლექტინები უჯავშირდებიან სიმსივნური უჯრედის მემბრანას ან რეცეპტორს და რთავენ ციტოტოქსიურ რეაქციას, აპოპტოზსს და აინჰიბირებენ სიმსივნის ზრდას. ლექტინების ასეთი თვისება სახავს მათ შესაძლო გამოყენებას სიმსივნის დიაგნოსტიკასა და ანტისიმსივნურ თერაპიაში.

ამ თვალთახედვით, ბოლო დროს დიდი ყურადღება მიიქცია სოკოს ლექტინებმა მათი მაღალი ანტისიმსივნური, ანტიპროლიფერაციული და იმუნომოდულატორული პოტენციალის გამო.

სოკოს ლექტინების აქტივობა მნიშვნელოვნად განპირობებულია ლექტინი-ნახშირწყალი ურთიერთქმედებით, რაც უჯრედის ფიზიოლოგიის მრავალ ასპექტში ვლინდება. სოკოს სხვადასხვა სახეობებში დიდი რაოდენობით სინთეზირდება ლექტინები როგორც სამარაგო ცილები, სოკოს ლექტინები მონაწილეობენ ზრდაში, მორფოგენეზში, მოლეკულურ შეცნობაში, დაცვით სისტემაში, უჯრედების ურთიერთქმედებაში, უჯრედულ ადჰეზიაში, პათოგენეზში, მნიშვნელოვნ როლს ასრულებენ სოკოსა და სხვა ორგანიზმს შორის (მიკორიზა და ხავსები, ლიქენები) სიმბიოზში და სხვა. სოკოს ლექტინები გამოიყენება მრავალ ბიოლოგიურ მეცნიერებაში, მათ შორის ტაქსონომიურ სწავლაში, ემბრიოლოგიაში, ბაქტერიოლოგიაში, მემბრანული გლიკოკონიუგატების კვლევაში, სიმსივნის კვლევაში, მუტანტური და სიმსივნური უჯრედების მემბრანული და შრატის გლიკოკონიუგატების დახასიათებაში.

დაგროვილი ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, ძირითადად გამოყოფენ მცენარეთა 12 გვარს, რომლებიც შეიცავენ ანტი-სოკოსი, ანტი-ვირუსულ და ანტი-ნეოპლაზიური აქტივობის მქონე ლექტინებს. ეს არის *Amaranthin, Agaricus bisporus* აგლუტინინი*, Cyanovirin, Chitinase-related* აგლუტინინი*, Euonymus europeus აგლუტინინი, Galanthus nivalis* აგლუტინინი*, (GNA), Jacalins, Lysin motif, Hevein, Legume* ლექტინი*, Nictaba* და *Ricun-B* გვარის შესაბამისად.

აღნიშნული სახეობებიდან ჩვენი ყურადღება მიიბყრო *Agaricus*-ის გვარმა (კლასი Basidiomycetes, Agariaceae, შამპინიონები) შამპინიონი თეთრი (*Agaricus bisporus*). ამ სოკოს

სხვადასხვა სახეობებიდან გამოყოფილი ლექტინები გამოირჩევა თავისი ანტიკანცეროგენული და იმუნური სისტემის მასტიმულირებელი ქმედებით. *Agaricus bisporus*-დან (ABL) გამოყოფილი ლექტინი განეკუთვნება Thomsen-Friedenreich-ანტიგენთან დამაკავშირებელი ცილების ჯგუფს (ანტიგენი ცილების Ser/Thr-თან დაკავშირებულ Galβ1-3GalNAc-ნაშთს წარმოადგენს).

ჩვენს მიერ სტუდენტური გრანტის ფარგლებში (N2363/10-02, 14.02.2018 წ - ქამა სოკოს (*Agaricus bisporus)* ნაყოფსხეულიდან ლექტინების გამოყოფა და ბიოქიმიური დახასიათება) ჩატარებული ცდებით ნაჩვენები იყო, რომ საწარმოო პირობებში ქართულ ტორფზე კულტივირებული *Agaricus bisporus*-ის ნაყოფსხეულის ქუდის და ფეხის ბიომასაში ცნობილი კომერციული აგარიკუსის (ABA აგლუტინინი, ABL) ლექტინთან შედარებით სინთეზირდება განსხვავებული ნახშირწყალ-სპეციფიკურობის მქონე ლექტინები (მონოსაქარიდები NacGlu, NAcGal, Fru , Inos, Ryb, მეთილ-αD-გლუკოზიდი, , მეთილ-αD-მანოზა-პირანოზა და Lac). განსხვავება გამოვლენილი იყო ასევე ნაყოფსხეულის ქუდისა და ფეხის ლექტინების აქტივობებს შორის და რიგ ბიოლოგიურ თვისებებში. კერძოდ, ჩვენს მიერ შესწავლილი ლექტინები ჩვეულებრივ პირობებში არ იწვევდნენ ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროცესის ინდუცირებას, მაგრამ ამ პროცესის რკინის იონებით ინდუცირების ფონზე ავლენენ სინერგისტულ - პროოქსიდანტურ თვისებას, გარდა *Agaricus bisporus*-ის ქუდის ლაქტოზა-სპეციფიკური ლექტინისა.

გამომდინარე იქიდან, რომ *Agaricus bisporus* -ის ლექტინი ავლენს ანტისიმსივნურ აქტივობას, რაც გამოვლენილი იყო სწორი ნაწლავისა და მკერდის კიბოს სიმსივნური უჯრედების ზრდის ინჰიბირებაში, უკავშირდება ნეოპლასტიკურ ქსოვილებში სპეციფიკურად გამოვლენილ T-ანტიგენს, სუპრესორულ ეფექტს ავლენს T და B ლიმფოციტების აქტივაციაზე, ნაჩვენებია პანკრეასის β-უჯრედების რეგენერაცია, ბუნებრივია, რომ ჩვენთვის ინტერესს წარმოადგენდა თუ როგორი ბიოლოგიური თვისებები შეიძლება გამოავლინონ ასეთ პირობებში კულტივირებული სოკოდან გამოყოფილ ლექტინებმა, ავლენენ თუ არა აღნიშნული ლექტინები ცნობილი აგარიკუსის ლექტინის მსგავსად ანტისიმსივნურ აქტივობას, რა დამოკიდებულაბას ავლენენ აპოპტოზისადმი.

აქედან გამომდინარე, ჩვენ კვლევის საწყისი ეტაპის მიზანია შეგვესწავლა

საწარმოო პირობებში ქართულ ტორფზე კულტივირებული *Agaricus bisporus*-ის ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი ლაქტოზა/გალაქტოზა- და აცეტილ-გლუკოზამინ-სპეციფიკური ლექტინების გავლენა

- უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე
- და ზოგიერთი აპოპტოზთან დაკავშირებული სასიგნალო მოლეკულის სინთეზის ინდუქციაზე მოდელურ ცდებში ინ ვიტრო სისტემაში.

ექსპერიმენტული ნაწილი

II.1 კვლევის ობიექტი და მეთოდები

<u>კვლევის ობიექტს</u> წარმოადგენდა შპს „თეთრი ქუდი"-ის მიერ წარმოებული ქართულ ტორფზე (დმანისის რ-ნი) კულტივირებული ქამა სოკოს ***Agaricus bisporus***-ის ნაყოფსხეული.

II.2. კვლევის მეთოდები

II.2.1. ლექტინური აქტივობის მქონე ცილების გამოვლენა

ლექტინური აქტივობის მქონე ცილების გამოვლენას ვაწარმოებდით სოკოს ვეგეტატური ორგანოებიდან - ნაყოფსხეულიდან და ფეხიდან. მასას ვაჰომოგენიზირებდით საექსტრაქციო ბუფერში (40 mM KH_2PO_4, 0.15 M NaCl, 0.5 mM PMSF, fenilmeTilsulfonil fluoridi, პროტეაზების ინჰიბიტორი, pH 7.4), ჰომოგენატს ვამუშავებდით ულტრაბგერით 30 წუთის განმავლობაში (30 ჰერცი, AS2060B Ultrasisonic Cleaner, Autoscience), კვლავ ვაჰომოგენიზირებდით და ვაცენტრიფუგებდით 12,000 ბრუნი 20 წუთი. ვიღებდით სუპერნატანტს და ვახდენდით გამომარილებას ამონიუმის სულფატით 0-80% გაჯერების პირობებში, ნარევს ვინახავდით მთელი ღამის განმავლობაში 4^0C-ზე. მეორე დღეს პრეციპიტატს ვაცენტრიფუგებდით 12,000 ბრუნი 20 წუთი, ნალექს ვხსნიდით აგლუტინაციის ბუფერში. (PBS, 40 mM KH_2 PO_4, 0.15 M NaCl, pH 7.4) და ვდგავდით

დიალიზზე PBS-ის მიმართ მთელი ღამით, შემდეგ ხსნარს კვლავ ვაცენტრიფუგებდით 12,000 ბრუნი 20 წუთი. ზედა ხსნარს ვიკვლევდით ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე. აღსანიშნავია,რომ ლექტინური აქტივობის გამოვლენას ვახდენდითცდის ყველა ეტაპზე: I სუპერნატანტის გამომარილებამდე და გამომარილების შემდეგ.ასევე შესაბამისად ვადგენდით ცილის რაოდენობას.

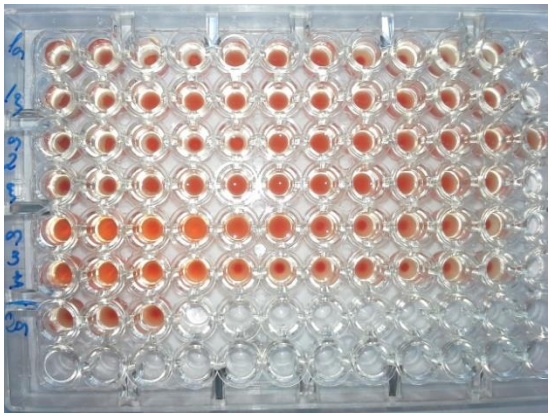
II.2.2. ჰემაგლუტინაციური აქტივობის განსაზღვრა

ლექტინური აქტივობის გამოვლენას ვაწარმოებდით ფართოდ გავრცელებული მეთოდით U–ს მაგვარი ბუდეების მქონე პლანშეტების მეშვეობით [Луцик, 1981; Луцик, 1983]. მეთოდის პრინციპი მდგომარეობს შემდეგში: ლექტინის თანმიმდევრულ განზავებათა სერიას ვუმატებდით ბოცვრის ტრიფსინიზირებული ერითროციტების 2% -იან სუსპენზიას, ინკუბაციას ვახდენდით 1 სთ-ის განმავლობში ოთახის ტემპერატურაზე და შემდეგ ვიზუალურად ვადგენდით ერითროციტების აგლუტინაციას. აღნიშნული მეთოდი მოიცავს ორ ეტაპს: ტრიპსინიზირებული ერითროციტების 2%–იანი სუსპენზიის მომზადებასა და უშუალოდ ჰემაგლუტინაციური რეაქციის ჩატარებას.

ბოცვრის ტრიპსინიზირებული ერითროციტების 2% სუსპენზიის მომზადება: ბოცვრის სისხლის ერითროციტების ტრიპსინიზაციას ვახდენდით ლუცეკის ნაშრომში წარმოდგენილი მეთოდის მიხედვით. ბოცვრის ყურის ვენიდან აღებული სისხლი გადაგვქონდა 3,8% NaCl-ის ციტრატის ხსნარში შეფარდებით 1 : 9, სწრაფად ვურევდით და ვაცენტრიფუგირებდით 2000 g /10 წთ. ერითროციტების ნალექს 3-ჯერ ვრეცხავდით 0,9% NaCl-ის ხსნარის ათმაგ მოცულობაში. ყოველი გადარეცხვისას სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 2000 g /10წთ, შემდეგ ვადგენდით ჰემატოკრიტს და ვაწარმოებდით ტრიპსინიზაციას. ერითროციტების ნალექის ყოველ 1 მლ-ს ემატებოდა 25 მლ 0.9% NaCl-ზე დამზადებული K+- ის ფოსფატის ბუფერი pH 7,4, რომელიც შეიცავდა 1,8 მგ/მლ ტრიპსინს. ნარევს ვაინკუბირებდით 37^{0}C წყლის აბაზანაზე 1-სთ-ის განმავლობაში. შემდეგ ერითროციტებს 3-ჯერ ვრეცხავდით აგლუტინაციის ბუფერის ათმაგ მოცულობაში და ვაცენტრიფუგირებდით 2000 g /10 წთ. ჰემატოკრიტის დადგენის შემდეგ ვამზადებდით 2%-იან სუსპენზიას აგლუტინაციის ბუფერზე (pH 7,4), რომელსაც ვტოვებდით 4^0 C ტემპერატურაზე.

ჰემაგლუტინაციურ რეაქციას ვავლენდით სატიტრაციო პლანშეტებზე U-მაგვარი ბუდეებით [Nოწაკ, ეტ ალლ., 1977], ამისთვის ვამზადებდით ექსტრაქტის თანმიმდევრულ ორჯერად განზავებათა სერიას. მწკრივში 1-12 ბუდემდე, მეორე ბუდიდან შეგვქონდა 50 მკლ. აგლუტინაციის ბუფერი (40 მმოლი KH_2PO_4, რომელიც დამზადებულია 0,9%NaCl-ის ხსნარზე, pH 7,4). შემდეგ პირველ ბუდეში შეგვქონდა საკვლევი ხსნარი 100 მკლ-ის ოდენობით და ვტიტრავდით სპეციალური 50 მკლ-იანი ტიტრატორით. თითოეულ ბუდეში პიპეტ ვატრიალებდითენ 20-ჯერ, მიიღებოდა საკვლევი ხსნარის განზავებათა სერია 2, 4, 8, 16. . და ა.შ. ყოველ ბუდეში ტიტრაციის შემდეგ ვამატებდით 50 მკლ (თუ საბოლოო მოცულობა 150 მკლ) ან 100 მკლ (თუ საბოლოო მოცულობა 200 მკლ) აგლუტინაციის ბუფერს და ბოლოს ვამატებდით 50 მკლ ტრიფსინიზირებული ერითროციტების 2%-იან სუსპენზიას. ვაყოვნებდით 1 საათი ოთახის ტემპერატურაზე. აგლუტინაციის უქონლობისას ერითრიციტები მკაფიოდ გამოკვეთილი წერტილის სახით ილექებოდნენ პლანშეტის ბუდის ფსკერზე, ხოლო აგლუტინირებული ერითროციტები თანაბარ შრედ ავსებდნენ ბუდის ფსკერს (სურ.*2.*). ლექტინის ტიტრი შეესაბამებოდა ლექტინის განზავებას საბოლოო ბუდეში, სადაც ჯერ კიდევ შეიმჩნეოდა აგლუტინაციის მკაფიო სურათი. Lექტინის სპეციფიკური აქტივობის განსაზღვრას ვახდენდით ცილის იმ მინიმალური კონცენტრაციის მიხედვით, რომელიც გვაძლევდა მკაფიოდ გამომჟღავნებულ აგლუტინაციას.

ჰემაგლუტინაციის ერთეულად (HA U) მიღებული იყო ჰემაგლუტინაციის ტიტრი, რომელიც შეესაბამებოდა იმ განზავებას, რომელიც ჯერ კიდევ გვაძლევდა აგლუტინაციას. სპეციფიკურ აქტივობას გამოვხატავდით ჰემაგლუტინაციის ერთეულის რაოდენობით 1 მგ ცილაზე (SA= HA U/ 1 მგ ცილაზე).



სურ.*2.* სოკოს ლექტინების ჰემაგლუტინაციის გამოსახულება.

II.2.3. ლექტინების ნახშირწყლებისადმი სპეციფიკურობის დადგენა

სოკოს ექსტრაქტების ლექტინური აქტივობის მქონე ცილების ნახშირწყალ-სპეციფიკურობა შესწავლილ იქნა ჰაპტენ-ინჰიბიტორული ტექნიკის გამოყენებით აგლუტინაციის არეში. ცდებში გამოყენებული იყო საქარიდები: 1. მეთილ-α-D-გლუკოზიდი (MethGLc), 2. მეთილ-α-D-მანოზა-პირანოზა (**MethMan-piranose**), 3.გლუკოზა (**Glu**), 4. გალაქტოზა (**Gal**), 5. ლაქტოზა (**Lac**), 6. არაბინოზა (**Ara**), 7. მანოზა (**Man**), 8. ფრუქტოზა (**Fruc**), 9. რაფინოზა (**Raf)**, 10. მალტოზა (**Malt**), 11. ქსილოზა (**Xyl**), 12. N-აცეტილ-გლუკოზამინი (N- **N-AcGlu**), 13. რიბოზა (**Ryb)**, 14. ინოზიტი (**Inos**), 15. L-ფუკოზა (**Fuc**).

ნახშირწყალ-სპეციფიკურობის შესწავლა მიმდინარეობდა ორ ეტაპად: 1) დგინდება სპეციფიკური ნახშირწყალი, ხოლო 2) ეტაპზე დგინდება სპეციფიკური ნახშირწყალის ის მინიმალური კონცენტრაცია, რომელიც აინჰიბირებს ლექტინის ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას.

1 ეტაპი: სატიტრაციო პლანშეტზე (U-ს მაგვარი ფოფოებით) იტიტრება საკვლევი ლექტინის ხსნარი და თიოთოეულ ფოსოში ემატება შესაბამისი ნახშირწყალი (50 მკლ, 0.3 მოლ), ლექტინის ხსნარი იტიტრება იმდენჯერ, რამდენიც საკვლევი ნახშირწყალია, ვაინკუბირებთ ოთახის ტემპერატურაზე 40-45 წუთის განმავლობაში. შემდეგ ნარევს ვუმატებდით 50 მკლ 2-%-იანი ერითროციტების სუსპენზიას და კვლავ ვაინკუბირებდით ოთახის ტემპერატურაზე 60 წთ-ის განმავლობაში. შემდეგ ვაკვირდებოდით აგლუტინაციის გამოვლენას. მიღებულ ეფექტს ვადარებთ კონტროლს, სადაც გატიტრულია მხოლოდ საკვლევი ლექტინის ხსნარი. ის ნახშირწყალი, რომელიც უკარგავს ლექტინს აქტივობას, აგლუტინაციის სურათის არ არსებობა მიუთითებს, რომ მოცემული ნახშირწყალი წარმოადგენს სპეციფიკურ ჰაპტენს საკვლევი ლექტინისათვის [Луцик, 1981].

2 ეტაპზე დგინდება ექსპერიმენტულად გამოვლენილი სპეციფიკური ნახშირწყალის ის მინიმალური კონცენტრაცია, რომელიც ჯერ კიდევ აკავებს ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას. ნახშირწყალის რაც უფრო დაბალი კონცენტრაცია აკავებს ჰემაგლუტინაციურ აქტივობას, ლექტინი მით უფრო მაღალი სპეციფიკურობისაა

მოცემული ნახშირწყალისადმი. ამ მონაცემის დადგენის მიზნით იტირება სპეციფიკური შაქარი და ემატება ყველა ფოსოში საკვლევი ლექტინის განზავებული ხსნარი (50 მკლ), ვახდენთ ინკუბაციას ოთახის ტემპერატურაზე და შემდეგ ვამატებთ 50 მკლ 2-%-იანი ერითროციტების სუსპენზიას და კვლავ ვაინკუბირებდთ ოთახის ტემპერატურაზე 60 წთ-ის განმავლობაში. იმ ფოსოში, სადაც ლექტინის სპეციფიკური შაქრის კონცენტრაცია მაღალია, ლექტინური აქტივობა არ ვლინდება, ხოლო როდესაც კლებულობს შაქრის კონცენტრაცია, შემდგომ უკვე ვლინდება ლექტინის აგლუტინაცია. შაქრის ის კონცენტრაცია, რომელიც მოცემულია აგლუტინაციის მქონე წინა ფოსომდე (დგინდება ტიტრაციით) ითვლება მინიმალურ კონცენტრაციად, რომელიც აკავებს ლექტინის ჰემაგლუტინაციას.

II 2.4. ქამა სოკოს ნაყოფსხეულის ქუდისა და ფეხის ექსტრაქტებიდან N-აცეტილგლუკოზამინ- და ლაქტოზა-სპეციფიკური ლექტინების გამოყოფა და გასუფთავება აფინური ქრომატოგრაფიით

ქამა სოკოს ქუდის და ფეხის ცილოვანი ექსტრაქტი dagvqonda agarozaზე იმობილიზებულ **N-აცეტილგლუკოზამინ (NAcGlc)-** და **N-აცეტილგალაქტოზამინ** - იმობილიზირებულ აფინურ სორბენტებზე (''Sigma''). აფინურ svetze dakavSirebuli leqtinis elucias vawarmoebdiT მორიგეობით შესაბამისი სპეციფიკური შაქრის 0.2 მოლ ხსნარით და 0,2 მოლ გლიცინ-HCl-ის ბუფერით (PH 3,2), შემდეგ კი სააგლუნიტაციო ბუფერით სვეტიდან ლექტინის სრულ ჩამოხსნამდე. ელუციის სიჩქარე - 0,6 მლ /1 წთ. დეტექტირდება - 280 ნმ ტალღაზე. ელუირებული ლექტინის პრეპარატს ვაკონცენტრირებდით (AmiconUltra-15 Centrifugal Filter 10 kDa, UFC901008) და ვაკეთებდით დიალიზს PBS ცენტრიფუგირების პირობებში (5000g, 20 min). ვზომავდით ცილის რაოდენობას და ვამოწმებდით ჰემაგლუტინაციურ აქტივობაზე.

II 2.5.ცილის განსაზღვრის მეთოდი

სოკოს ძირითად ექსტრაქტებში (შეფერილ ხსნარში) ცილის რაოდენობას ვსაზღვრავდით ბრედფორდის მეთოდით (10 მკლ ცილის ხსნარს ემატება 500 მკლ ბრედფორდის რეაქტივი, ვაყოვნებდით 5 წუთი და ვზომავდით 595 ნმ ტალღაზე.
აფინური და გელ-ქრომატოგრაფიით მიღებულ ფრაქციებში ცილას ვსაზღვრავდით ლოურის მეთოდით. ცილის კონცენტრაციაზე ვმსჯელობდით Sefervis intensivobით, რომელსაც ვზომავდით სპექტროფოტომეტრზე Multiskan 60 Microplate Reader ("Thermo Scientific", USA) 750 nm talRis sigrZeze.

II.2.6.ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების სუსპენზიის მიღება

ღვიძლის უჯრედებს ვიღებდით ღვიძლის ქსოვილის ტრიპსინოლიზით მეინის და ჯენკინსის მეთოდით [1983]. ღვიძლის ქსოვილის განსაზღვრულ რაოდენობას ვაქუცმაცებდით და ვუკეთებდით ჰომოგენიზაციას 0,25%-იანი ტრიპსინის ხსნარში, დამზადებულს საექსტრაქციო ბუფერზე (136 მმოლი NNaCl, 5,36 მმოლი KKCl, 4,16 მმოლი $NaHCO_3N$, 5 მმოლი ED EDTA და 1 მმოლი M $MgCl_2$), ვახდენდით პიპეტირებას და ჰომოგენატს ვაყოვნებდით 30წთ. რეაქციას ვაჩერებდით 1%-იანი ხარის შრატის ალბუმინის დამატებით. 10 წთ-ის შემდეგ ვახდენდით პიპეტირებას და სუსპენზიას ვფილტრავდით ფილტრზე (80 მკმ), ვაზავებდით საექსტრაქციო ბუფერით და ვახდენდით გადარეცხვას ცენტრიფუგირებით 3000 g 10 წთ. გადარეცხილი უჯრედების ნალექს ვხსნიდით საექსტრაქციო ბუფერში, უჯრედებს ვამოწმებდით მიკროსკოპში და ვითვლიდით გორიაევის კამერაში. ცდაში შეგვქონდა 2,5_4,0X10^6 უჯრედი.

II.2.7. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შესწავლა *მთთ*-ის მეთოდით

ლექტინების გავლენას უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე ვიკვლევდით ***მთთ***-ის მეთოდით მოდელურ ცდებში ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედებზე და ადამიანის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტებზე.

მეთოდის პრინციპი: ყვითელი ფერის ნაერთი ***მთთ***-ი [MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. **ნად⁺ და ნადფ-რედუქტაზებით** აღდგება მოიისფრო

ფერის უხსნად ნაერთად - ფორმაზანად, რომლის ინტენსივობის მიხედვით მსჯელობენ უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე.

სოკოს ნაყოფსხეულის ლექტინების ხსნარი (5მკგ) შეგვქონდა უჯრედების სისპენზიაში (საქონლის ღვიძლის უჯრედები და ლიმფოციტები) და ვაინკუბირებდით 1 საათი. ეპენდორფებს ვაცენტრიფუგირებდით 10 000 ბრ/წ 10 წ, ნალექს ვამატებდით მთთ-ის ხნარს (500 მკლ, 250 მკგ), კვლავ ვაინკუბირებდით 45 წ 37^0-ზე. ინკუბაციის შემდეგ ეპენდორგებს ვაცენტრიფუგირებდით 10000 ბრ/წ 10 წ და ნალექს, რომელიც შეიცავდა უხსნად ფორმაზანს ვხსნიდით დიმეთილსულფოქსიდის ხსნარში (800 მკლ). თითოეულ ეპენდორფი მუშავდება სანჯღრეველაზე და შემდგომ ეპენდორფები კვლავ ცენტრიფუგირდება 10000 ბრ/წ 5 წ და ზედახსნარი გადაგვაქვს პლანშეტზე. წარმოქმნილი ფორმაზანის შეფერილობას ვზომავდით სპექტროფოტომეტრიულად 570 ნმ ტალღაზე (Multiscan GO, Thermo Fischer Scientific, Finland).

II.2.8. აზოტის ჟანგის რაოდენობის განსაზღვრის მეთოდი (გრისის მეთოდი)

NO-ის შემცველობას ჰიპოკამპის უჯრედებში განსაზღვრული იყო მირანდასა და სხვ. მეთოდი [60]. ამისათვის ჰიპოკამპის ჰომოგენატის ყოველ 100 µl ემატებოდა თანაბარი რაოდენობის 0.3 M-ის NaOH. მიღებულ ნარევს ვანჯღრევდით ოთახის ტემპერატურაზე 5 წთ-ის განმავლობაში. ნარევს ემატებოდა 100 µl 5%-იანი ZnSO4 და კვლავ ვანჯღრევდით 5 წთ-ის განმავლობაში. ამ დროის გასვლის შემდგომ მიღებული ნარევი ცენტრიფუგირდებოდა 3000ბრ.წთ-ის სიჩქარეზე 15 წთ-ის განმავლობაში. ყოველ 100 µl სუპერნატანტს ემატებოდა 200 µl გრისის რეაქტივი. გრისის რეაქტივი მზადდება ცდის წინ და შეიცავს 0.5 M HCl-ზე დამზადებულ VCl3-სა და 0.1%-იან სულფამიდამიდს. საკონტროლო სინჯარა შეიცავდა ყველა რეაქტივს, თუმცა ჰომოგენატის მაგივრად სარეაქციო არეში შეტანილი იყო 100 µl დისტილირებული წყალი. მიღებული ნარევი ყოვნდებოდა 30წთ 37°C-ზე და შეფერილი ხსნარი იზომებოდა 540ნმ ტალღის სიგრძეზე სპექტროფოტომეტრულად (Multiscan GO, Thermo Fischer Scientific, Finland). მიღებული მონაცემები ითვლებოდა $NaNO_2$-ის სტანდარტულ მრუდზე.

II.2.9 ვესტერნ-ბლოტინგის მეთოდი

მეთოდი მოიცავს ორ ეტაპს:

1. SDS-პოლიაკრილამიდ გელ-ელექტროფორეზი. მიღებული ცილების ფრაქციების ანალიზი ხდებოდა ელექტროფორეზის ხელსაწყოს საშუალებით. სინჯებს ვუმატებდით იგივე მოცულობის ელექტროფორეზის სინჯის ბუფერს (20% გლიცეროლი, 10% 2-მერკაპტოეთანოლი, 6% ნატრიუმის დოდეცილსულფატი, 0,02-0,04 % ბრომფენილ ლურჯი 250 mM Tris-HCl pH 6.7) და ვადუღებდით 5 წუთის განმავლობაში. ელექტროფორეზს ვუშვებდით 7.5-12% აკრილამიდ/ბისაკრილამიდის გელზე ცილების სრულ დაყოფამდე.

2. მიღებული ცილოვანი ფრაქციების ტრანსფერი ნიტროცელულოზის მემბრანაზე და ანტისხეულებით მონიშვნა.

მემბრანა მუშავდებოდა სპეციფიკური ანტისხეულების საშუალებით და გამჟღავნება ხორციელდებოდა რედგენის ფირებზე.

თავი III

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

III.1. *Agaricus bisporus)* ნაყოფსხეულიდან გამოყოფილი ლექტინების აქტივობის დამოკიდებულება ზოგიერთ ფიზიკურ პარამეტრზე

სტუდენტური გრანტის ფარგლებში (N2363/10-02, 14.02.2018 წ - ქამა სოკოს (*Agaricus bisporus)* ნაყოფსხეულიდან ლექტინების გამოყოფა და ბიოქიმიური დახასიათება) ჩატარებული ცდებით ნაჩვენები იყო, რომ საწარმოო პირობებში ქართულ ტორფზე კულტივირებული *Agaricus bisporus*-ის ნაყოფსხეულის ქუდის და ფეხის ბიომასაში სინთეზირდება განსხვავებული ნახშირწყალ-სპეციფიკურობის მქონე ლექტინები ცნობილი კომერციული აგარიკუსის (ABA აგლუტინინი, ABL) ლექტინთან შედარებით. ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან ჩვენს მიერ გამოყოფილი იყო

გალაქტოზა/ლაქტოზა- და **N**-აცეტილგლუკოზამინ-სპეციფიკური (**NAcGlu)** ლექტინები, რომლებიც განსხვავებულ ლექტინურ აქტივობას ავლენდნენ. განსხვავება გამოვლენილი იყო ასევე ნაყოფსხეულის ქუდისა და ფეხის ლექტინების აქტივობების დამოკიდებულებაში ზოგიერთ პარამეტრზე და ასევე მათ რიგ ბიოლოგიურ თვისებებში.

ჩვენს მიერ შესწავლლი იყო ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი გალაქტოზა/ლაქტოზა- და NAcGlu-სპეციფიკური ლექტინების აქტივობის დამოკიდებულება ტემპერატურისადმი (ცხრ.1) და წყალბადის იონის კონცენტრაციისადმი (ცხრ.2).

ცხრილი 1

Agaricus bisporus-ის ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი ლაქტოზა/გალაქტოზა და -სპეციფიკური ლექტინების ჰემაგლუტინაციური აქტივობის დამოკიდებულება ტემპერატურაზე

ტემპერატურა, ^{0} C	**ტესტირებული ლექტინები**			
	ქუდი-ლაქტოზა/ გალაქტოზა-სპეც	ქუდი- NAcGlu	ფეხი-ლაქტოზა/ გალაქტოზა-სპეც	ფეხი - NAcGlu
30	1 558	70 423	581	27 174
40	1 558	70 423	581	20 174
50	390	70 423	581	20 174
60	---	70 423	145	6 803
70	---	8 803	145	854
80		---	145	---
90		---	-----	----

შედეგების ანალიზი ცხადყოფს, რომ ნაყოფსხეულის თავიდან გამოყოფილი NAcGlu -სპეციფიკური და ფეხის ლაქტოზა-გალაქტოზა- და NAcGlu-სპეციფიკური ლექტინები ტემპერატურისადმი მდგრადობას ავლენენ 30-70^0 ინტერვალში, ხოლო შედარებით არამდგრადია ქუდიდან გამოყოფილი ლაქტოზა-გალაქტოზა-სპეციფიკური ლექტინი, რომლის აქტივობა მკვეთრად ეცემა უკვე 40^0 -ის ზემოთ.

ცხრილი 2

***Agaricus bisporus*-ის ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი ლაქტოზა/გალაქტოზა და *NAcGlu* -სპეციფიკური ლექტინების ჰემაგლუტინაციური აქტივობის დამოკიდებულება pH-ზე**

pH	ტესტირებული ლექტინები			
	ქუდი-ლაქტოზა/ გალაქტოზა-სპეც	ქუდი- NAcGlu	ფეხი-ლაქტოზა/ გალაქტოზა-სპეც	ფეხი - NAcGlu
3.2	0	0	0	8 547
4.5	975	15 385	727	16 949
5.0	1 953	15 385	727	16 949
6.0	1 953	30 487	1429	16 949
7.4	1 953	15 385	1429	16 949
8.1	1 953	15 385	727	68 493
9.1	1 953	15 385	0	68 493
10.05	975	15 385	0	68 493

თუმცა, აღნიშნული ლექტინი (ქუდიდან გამოყოფილი ლაქტოზა-გალაქტოზა-სპეციფიკური ლექტინი) მდგრადობას ავლენს **pH-ის** მიმართ, კერძოდ აქტივობა შენარჩუნებულია **pH-ის** ინტერვალში 5,0-დან - 9.1-დე (ცხრ. 2). სოკოს ფეხიდან გამოყოფილი ლაქტოზა/ალაქტოზა-სპეციფიკური ლექტინი აქტიურია **pH**-ის უფრო ვიწრო ინტერვალში - 6,0-7,4-დე. **pH**-სადმი განსაკუთრებული მდგრადობით გამოირჩევა ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი **NAcGlu** -სპეციფიკური ლექტინები.

ქამა სოკოდან გამოყოფილი ლექტინების ზოგიერთი ბიოქიმიური პარამეტრის კვლევის შედეგი ცხადყოფს, რომ სოკოს ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი ერთნაირი სპეციფიკურობის მქონე ლექტინები განსხვავებულ დამოკიდებულებას ავლენენ როგორც ტემპერატურისადმი, ასევე წყალბად იონთა კონცენტრაციისადმი (**pH**).

III.2. *Agaricus bisporus-ს* ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან აფინური ქრომატოგრაფიით გამოყოფილი ლექტინების ბიოლოგიური თვისებების შესწავლა *ინ ვიტრო* სისტემაში

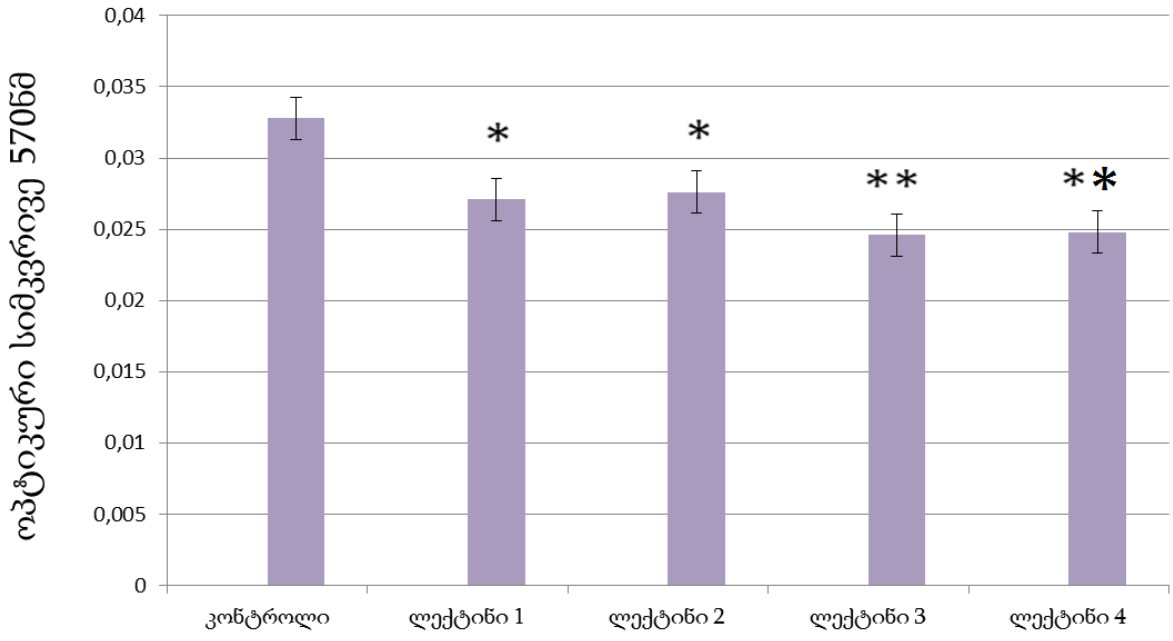
III.2.1. *Agaricus bisporus-ს* ქამა სოკოს ნაყოფსხეულის ლექტინების გავლენა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე

როგორც ცნობილია, სიმსივნური უჯრედის ზედაპირი განსხვავდება ნორმალური უჯრედისაგან გლიკოკონიუგატების შემადგენლობით. ლექტინები ავლენენ

ანტიპროლიფერაციულ თვისებას გლიკოკონიუგატებთან დაკავშირებით ან იმუნომოდულატორული ეფექტის საშუალებით. ნაჩვენებია, რომ *Agaricus bisporus*-ის ლექტინი (Galβ1,3GalNAc-თან დამაკავშირებელი ლექტინი) აინჰიბირებს სწორი ნაწლავისა და მკერდის კიბოს სიმსივნური უჯრედების ზრდას [Yu L.,1993], ლექტინი ასევე სუპრესორულ ეფექტს ავლენს T და B ლიმფოციტების აქტივაციაზე [Greene W და სხვ. 1981], მოზრდილი C57BL/6J ხაზის თაგვების პანკრეასის β-უჯრედების რეგენერაციაზე.

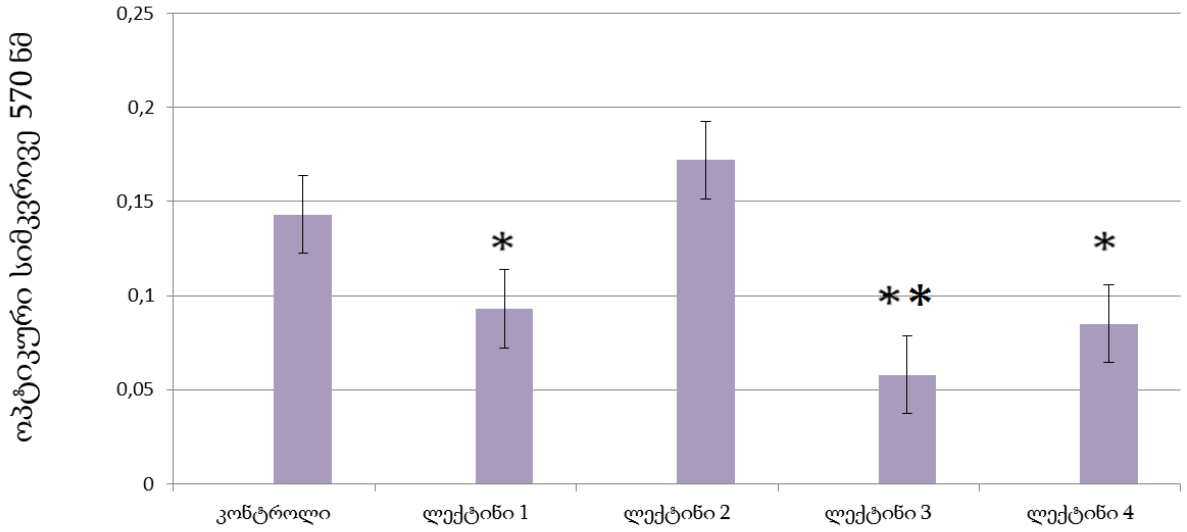
აღნიშნულიდან გამომდინარე ჩვენ მიზნად დავისახეთ შეგვესწავლა ქამა სოკოს ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი გალაქტოზა/ლაქტოზა- (Lac/Gal) და N-აცეტილგლუკოზამინ-სპეციფიკური (NAcGlu) ლექტინების გავლენა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე მოდელურ ცდებში ინ ვიტრო სისტემაში. კერძოდ, ვირთაგვას ღვიძლის ქსოვილის უჯრედებზე (სურ. 1) და ადამიანის პერიფერიული სისხლის ჯანმრთელ ლიმფოციტებზე (სურ. 2). უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ვაფასებდით MTT-მეთოდით.

სურ. 1. *Agaricus bisporus* ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი გალაქტოზა/ლაქტოზა- (Lac/Gal) და N-აცეტილგლუკოზამინ-სპეციფიკური (NAcGlu) ლექტინების გავლენა ვირთაგვას ღვიძლის ქსოვილის უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე *ინ ვიტრო* სისტემაში.



მიღებული შედეგების ანალიზი ცხადყოფს (სურ. 1), რომ ყველა ტესტირებული ლექტინური ფრაქციის ღვიძლის უჯრედებთან ინკუბირებისას სარწმუნოდ მცირდება უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა. განსაკუთრებით აღსანიშნავია სოკოს ფეხის ლექტინების ეფექტი, ორივე სპეციფიკურობის ლექტინი 25%-ით თრგუნავს ღვიძლის უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას.

სურ. 2. *Agaricus bisporus* ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი გალაქტოზა/ლაქტოზა- (Lac/Gal) და N-აცეტილგლუკოზამინ-სპეციფიკური (NAcGlu) ლექტინების გავლენა ადამიანის პერიფერიული სისხლის ჯანმრთელი ლიმფოციტების სიცოცხლისუნარიანობაზე *ინ ვიტრო* სისტემაში.



სოკოს ლექტინები ასევე გავლენას ახდენენ ლიმფოციტების სიცოცხლიუნარიანობაზე გარდა ქუდიდან გამოყოფილი NAcGlu -სპეციფიკური ლექტინისა. აღსანიშნავია, რომ ნაყოფსხეულის ფეხიდან გამოყოფილი ლაქტოზა/გალაქტოზა და NAcGlu-სპეციფიკური ლექტინების გავლენით სიცოცხლისუნარიანობა სარწმუნოდ მცირდება 60% და 40% შესაბამისად.

III.2. 2. *Agaricus bisporus-ს* ნაყოფსხეულიდან გამოყოფილი ლექტინების გავლენა აზოტის ჟანგის სინთეზის ინდუქციაზე

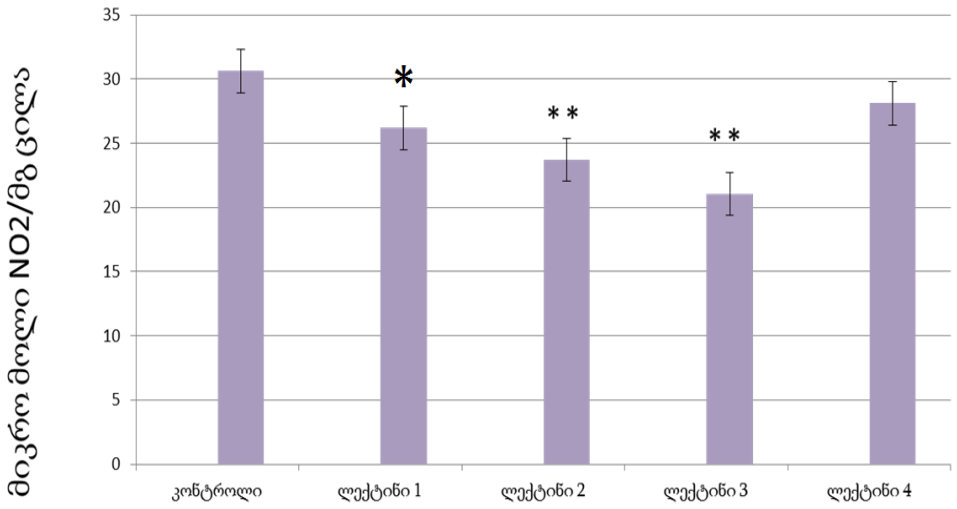
ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია, რომ [Ngai, P.H., 2003; Chang, H.-H.; 2007] აგარიკუსის ცნობილი კომერციული ლექტინი ABL მაკროფაგებზე ზემოქმედებისას NO-ს სინთეზის ინდუქციას იწვევს. უკანასკნელ ოცწლეულში ბიოლოგიაში ყველაზე სწრაფად მზარდი სფერო NO-ს ეფექტების გამოკვლევა აღმოჩნდა. ამ აირის მარტივ მოლეკულას მთელი რიგი ბიოლოგიური პროცესების რეგულაციის უნარი აღმოაჩნდა. ზოგადად, აზოტის ჟანგის ეფექტებია რეგულატორული, დაცვითი მოქმედების და დამაზიანებელი ზემოქმედება.

ღვიძლის უჯრედებში, კერძოდ კუპფერის უჯრედებში ექსპრესირდება NO-ს მასინთეზირებელი ფერმენტი cNOS, ხოლო ბაქტერიული ლიპოპოლისაქარიდების, ციტოკინების და სხვა სტიმულების შედეგად ჰეპატოციტებში, კუპფერის და stellate უჯრედებში iNOS-ს ფორმა სინთეზირდება. წარმოქმნილი აზოტის ჟანგი იცავს უჯრედებს ტოქსიკური ნაერთების ზემოქმედებისაგან [Muriel P, 2000]. NO-ს დაბალი კონცენტრაციებისას (<10-6 M) ვლინდება ციტო- და ნეიროპროტექტორული ქმედება, მისი არატოქსიკური დონე ანტიაპოპტოზურ აქტივობას ავლენს, უჯრედშიდა ცისტეინური პროტეაზების (კასპაზა-3,-8) და სხვა პროაპოპტოზური ცილების უშუალო ნიტროზილირების გზით. მისი მაღალი კონცენტრაციები კი აპოპტოზს ინდუცირებენ.

ღვიძლის ჰეპატოტოქსიკური დამჟანგველებით დაზიანებისას NO ანტიოქსიდანტის როლს ასრულებს, უზრუნველყოფს აღდგენილი გლუტათიონის უჯრედული მარაგის შენარჩუნებას, ანელებს გლუკოზის დაშლის პროცესს ფერმენტ გლიცერალდეჰიდფოსფატდეჰიდროგენაზას ინჰიბირებით

აღნიშნულის გათვალისწინებით ჩვენ შევისწავლეთ გამოყოფილი ლექტინური ფრაქციების გავლენა NO-ს სინთეზის ინდუქციაზე ღვიძლის ქსოვილის უჯრედებში. ვირთაგვას ღვიძლის ქსოვილის უჯრედებს 1 საათის განმავლობაში ვაინკუბირებდით ლექტინურ ფრაქციებთან. NO-ს კონცენტრაციას გამოვსახავდით მკმოლ/მგ ცილა.

კვლევის შედეგად (სურ. 3) დადგენილ იქნა, რომ ქუდიდან გამოყოფილი NAcGlu- ($p<0,05$) და ფეხიდან გამოყოფილი Lac,gal-სპეციფიკური ლექტინების ფრაქცია ($p<0,01$) სარწმუნოდ ამცირებენ NO -ს სინთეზის ინდუქციას ($F_{4,32}=5,871$).



სურ.

სურ. 3. *Agaricus bisporus* ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი გალაქტოზა/ლაქტოზა- (Lac/Gal) და N-აცეტილგლუკოზამინ-სპეციფიკური (NAcGlu) ლექტინების გავლენა NO-ს სინთეზის ინდუქციაზე ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედებში *ინ ვიტრო* სისტემაში.

III.2.3. *Agaricus bisporus-ს* ნაყოფსხეულიდან გამოყოფილი ლექტინების გავლენა უჯრედშიდა სასიგნალო სისტემის ზოგიერთი კომპონენტის სინთეზის ინდუქციაზე

როგორც ცნობილია, მთელი რიგი მცენარეული ლექტინებისა აპოპტოზის ჩამრთველის ფუნქციას ავლენენ, სავარაუდოდ სიმსივნურ უჯრედებში [ ]. ასეთი თვისების მქონე ლექტინები განსხვავებული მექანიზმით ზემოქმდებენ უჯრედის მეტაბოლიზმზე [ ].

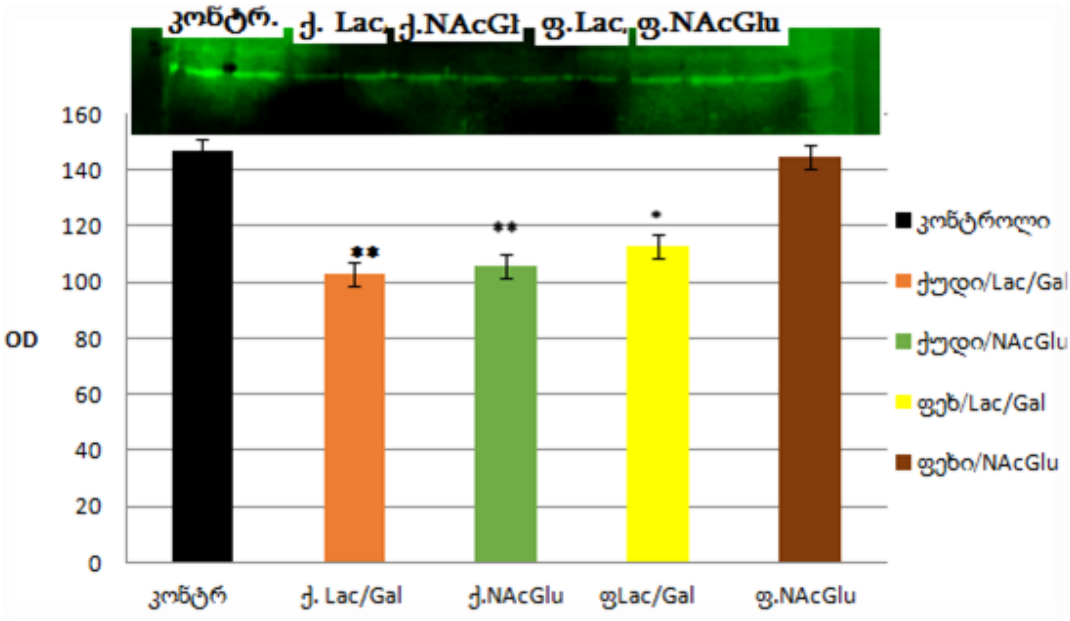
ჩვენი ყურადღება შევაჩერეთ ფოსფატიდილინოზიტოლ 3-კინაზა/პროტეინკინაზა B/ (**PI3K/AKT/mTOR pathway)** უჯრედშიდა სასიგნალო გზაზე, რომელიც მიტოქონდრიების ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ფერმენტების აქტივაციის გზას წარმოადგენს და

მნიშვნელოვან როლს ასრულებს უჯრედული ციკლის რეგულაციაში. აქტივირებული ფოსფატიდილინოზიტოლ3-კინაზა (ფოსფორილირებული) ააქტივებს პროტეინკინაზა B-ს (**AKT),** რომელიც პლაზმურ მემბრანაზეა ლოკალიზებული. მისი აქტივაცია შემდგომი მომდევნო უჯრედშიდა ცილების ფოსფორილირების გზით დაკავშირებულია რიგ მნიშვნელოვან პროცესებთან - უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობასთან, ზრდასთან, უჯრედების მიგრაციასთან, ანგიოგენეზთან, აპოპტოზთან, გლუკოზას მეტაბოლიზმის რეგულაციასთან.

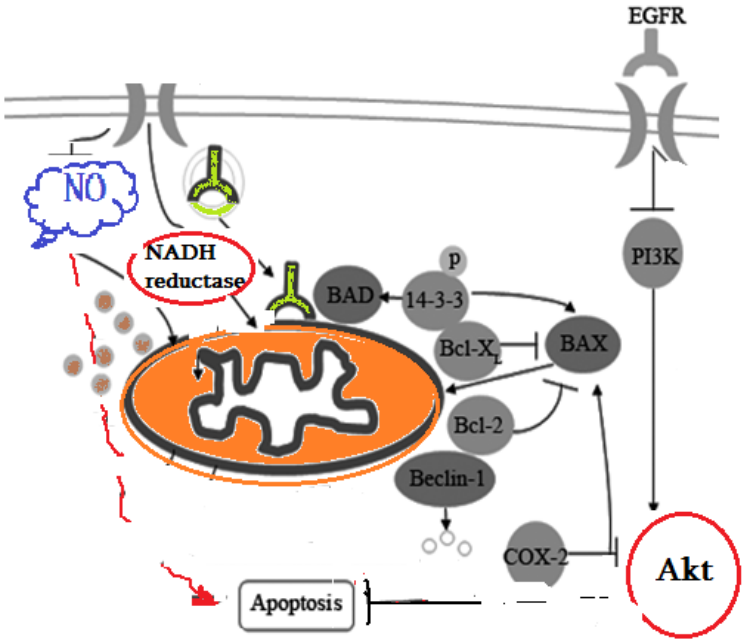
აღნიშნულიდან გამოდინარე კვლევის შემდგომ ეტაპზე ჩვენ შევისწავლეთ *Agaricus bisporus-ს* ნაყოფსხეულიდან გამოყოფილი ლექტინების გავლენა მიტოქონდრიების ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ფერმენტების აქტივაციაში მონაწილე ფაქტორების, კერძოდ AKT-ს სინთეზის ინდუქციაზე.

სოკოს ლექტინების გავლენას AKT-ს სინთეზის ინდუქციაზე ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედებთან ინკუბაციის პირობებში ვიკვლევდით. AKT-ს დონის ცვლილებას იმუნობლოტინგით ვაფასებდით AKT -ს ანტისხეულების გამოყენებით. ფაქტორის რაოდენობრივ ცვლილებას გამოვსახავდით ოპტიკური სიმკვრივეს პირობით ერთეულებში, დაანგარიშებული ელექტროფორეზზე დატანილი ნიმუშის 1 მკგ ცილაზე.

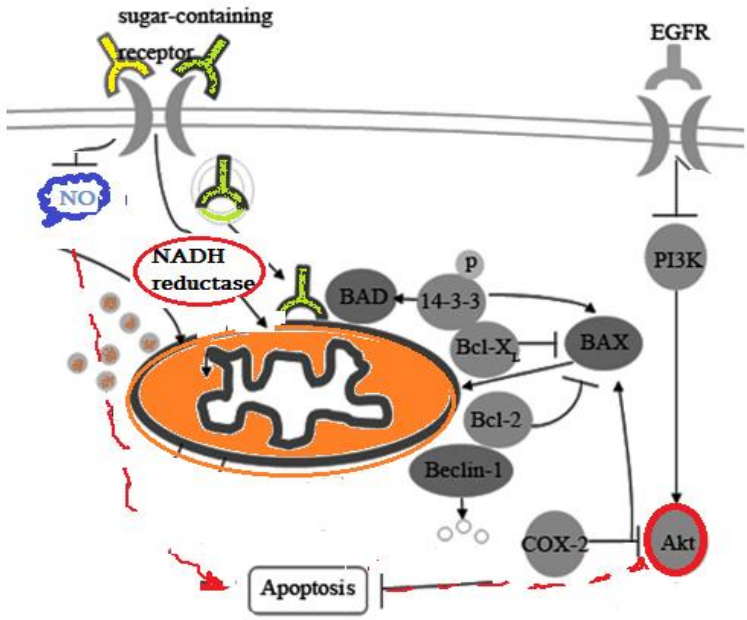
სურ. 4. *Agaricus bisporus* ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი გალაქტოზა/ლაქტოზა- (Lac/Gal) და N-აცეტილგლუკოზამინ-სპეციფიკური (NAcGlu) ლექტინების გავლენა AKT-ს სინთეზის ინდუქციაზე იმუნობლოტინგით *ინ ვიტრო* სისტემაში AKT-ს ანტისხეულების გამოყენებით. AKT-ს რაოდენობას ვადგენდით კომპიუტერული პროგრამით, გამოვსახავდით ოპტიკური სიმკვრივის მაჩვენებლით.



კვლევის შედეგად მიღებული მონაცემების ანალიზით (სურ.4) დგინდება, რომ ლექტინური ფრაქციები არაერთგვაროვნად ზემოქმედებენ AKT-ს სინთეზის ინდუქციაზე. ნაჩვენებია, რომ ქუდის ორივე სპეციფიკურობის ლექტინური ფრაქცია და ფეხიდან გამოყოფილი Lac/Gal-სპეციფიკური ლექტინები სარწმუნოდ ამცირებს AKT-ს რაოდენობას კონტროლთან შედარებით. მიტოქონდრიული ენერგეტიკული ფონის დაქვეითება, სავარაუდოდ უბიძგებს აპოპტოზის ჩართვას.



A



B

სურ. 5. ქამა სოკოს ნაყოფსხეულის ქუდისა და ფეხის ლექტინების ეფექტი (**B**) უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე, აზოტის ჟანგის სინთეზისა და მიტოქონდრიების ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ფერმენტების აქტივაციის ფაქტორის სინთეზის ინდუქციაზე კონტროლთან შედარებით (**A**).

ამრიგად, ჩატარებული კვლევის შედეგად მიღებული მონაცემების ანალიზით დგინდება:

1. *ქართულ ტორფზე კულტივირებული ქამა სოკოს Agaricus bisporus-ის ნაყოფსხეულიდან გამოყოფილი ლექტინები მთელი რიგი ბიოქიმიური მახასიათებლებით განსხვავდება ცნობილი კომერციული Agaricus bisporus-ის ABA/AAL აგლუტინინისგან*

2. *ქამა სოკოს ნაყოფსხეულის ქუდიდან და ფეხიდან გამოყოფილი ლექტინები თრგუნავენ უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობას ვირთაგვას ღვიძლისა და ადამიანის პერიფერიული სისხლის ჯანმრთელი ლიმფოციტების მაგალითზე ინ ვიტრო სისტემაში*

3. *ქამა სოკოს ნაყოფსხეულის ლექტინები როგორც ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები ღვიძლის ქსოვილის უჯრედებთან დაკავშირების შედეგად Agaricus bisporus-ის ABA/AAL აგლუტინინისგან განსხვავებით არ ინდუცირებენ აზოტის ჟანგის სინთეზსს*

4. *ქამა სოკოს ნაყოფსხეულის ლექტინები თრგუნავენ მიტოქონდრიების ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ფერმენტების აქტივაციის ფაქტორის* **AKT**-*ის* -(პროტეინკინაზა B) *სინთეზის ინდუქციას ღვიძლის უჯრედების მაგალითზე*

დასკვნა

ქართულ ტორფზე კულტივირებული ქამა სოკოს *Agaricus bisporus*-ის ნაყოფსხეულიდან გამოყოფილი ლექტინები უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის დათთრგუნვის ფონზე აინჰიბირებენ აზოტის ჟანგისა და მიტოქონდრიების ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ფერმენტების აქტივაციის ფაქტორის სინთეზს, რაც მიანიშნებს მათ ჩართულობაზე აპოპტოზის პროცესში.

ლიტერატურა

Chang, H.-H.; Chien, P.-J.; Tong, M.-H.; Sheu, F. Mushroom immunomodulatory proteins possess potential thermal/freezing resistance, acid/alkali tolerance and dehydration stability. *Food Chem.* **2007**, *105*, 597–605. [Google Scholar] [CrossRef]

Coulibaly FS, Youan BBC. Current status of lectin-based cancer diagnosis and therapy. *AIMS Molecular Science*, **4**, 1–27 (2017).

Davitashvili E., Kapanadze E., Kachlishvili E., Khardziani T., Elisashvili V. Evaluation of higher basidiomycetes mushroom lectin activity in submerhed and solid-state fermentation of agro-industrial residues. Inten.J. of Medic.Mushrooms. 2008, 10(2):171-179.

Diaz, E.M.; Vicente-Manzanares, M.; Sacristan, M.; Vicente, C.; Legaz, M.E. Fungal lectin of Peltigera canina induces chemotropism of compatible nostoc cells by constriction-relaxation pulses of cyanobiont cytoskeleton. Plant Signal. Behav. 2011, 6, 1525–1536.

Greene W., Fleisher T., Waldmann T. Suppression of human T and B lymphocyte activation by *Agaricus bisporus* lectin. I. Suggestive evidence for a surface "suppressor" receptor in human lymphocytes. J. Immunol.1981;126:580–586.

Guillamon E, Garcia-Lafuente A, Lozano M, D'Arrigo, Rastagno MA, Villares A, Martinez JA. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. Fitoterapia. 2010, 81,715-723.

Guillot, J.; Konska, G. Lectins in higher fungi. Biochem. Syst. Ecol. 1997, 25, 203–230.

Irazoqui FJ., Vides Miguel A., Nores Gustavo A.. Structural requirements of carbohydrates to bind *Agaricus bisporus* lectin. *Glycobiology*,1999, Volume 9, Issue 1, 1 January Pages 59–64, https://doi.org/10.1093/glycob/9.1.59

Khan F, Khan M.Isl. "Fungal Lectins: Current Molecular and biochemical perspectives". International Journal of Biological Chemistry. 2011 5(1): 1-20. Academic Journals Inc. ISSN 1819-144X / DOI: 10.3923/ijbc.2011.1.20].

Konska Grazyna. Lectins of Higher Fungi (Macromycetes)—Their Occurrence, Physiological Role, and Biological Activity. International Journal of Medicinal Mushrooms. 2006, Volume8 Is.1 19-30 pages . *DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v8.i1*

Li, Y.R.; Liu, Q.H.; Wang, H.X.; Ng, T.B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and hiv-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom Pleurotus citrinopileatus. Biochim. Biophys. Acta 2008, 1780, 51–57.

Liu B, Bian HJ, Bao JK. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Lett.*, **287**, 1–12 (2010).

McNaughton L., Puttagunda L., Martinez–Cuesta M.A.et al. PNAS, 2002, 99, (26), p.17161- 17166.

Mikiashvili N.A., Elisashvili V.I., Wasser S.P., Nevo E. *Intern. J. Med. Mushr.*, 2006, 8.

Mikiashvili. N., Elisashvili V., Wasser S., Nevo E. Comparative study of lectin activity of higher Basidiomycetes. Intern.J. of Medic.Mushrooms. 2006, 8(Is.1):1-8.

Ng, T.B. Peptides and proteins from fungi. Peptides 2004, 25, 1055–1073.

Ngai, P.H.; Wang, H.X.; Ng, T.B. Purification and characterization of a ubiquitin-like peptide with macrophage stimulating, antiproliferative and ribonuclease activities from the mushroom Agrocybe cylindracea. *Peptides* **2003**, *24*, 639–645. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed]

PARSLEW[1], JONES[1], RHODES[2]and SHARPE[1]. The antiproliferative effect of lectin from the edible mushroom (*Agaricus bisporus*) on human keratinocytes: preliminary studies on its use in psoriasis. British Journal of Dermatology. Volume 140, Issue 1, pages 56–60, January 1999

Singh SS, Wang H,Chan YS, Pan W, Dan X,Yin CM, Akkouh O, Ng TB. Lectins from edible mushrooms. Molecules. 2015, 20, 446-469.

Varrot, A.; Basheer, S.M.; Imberty, A. Fungal lectins: Structure, function and potential applications. Curr. Opin. Struct. Biol. 2013, 23, 678–685.

Wasser SP; Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: A modern perspective. CRITICAL REVIEWS IN IMMUNOLOGY . 1999, 19 (1): 65-96

Wu A M, Liu J-H , Gong Y-P , Li Chia-Chen , Chang . Multiple recognition systems adopting four different glycotopes at the same domain for the Agaricus bisporus agglutinin-glycan interactions. FEBS Lett 2010 Aug 17;584(16):3561-6.

Yi Wang, Yuande Liu, Hailian Wang, Chunyang Li, Ping Qi, Jinku Bao. Agaricus bisporus lectins mediates islet β-cell proliferation through regulation of cell cycle proteins. Exp Biol Med (Maywood) 2012 Mar 5;237(3):287-96. Epub 2012 Mar 5.

[Yu Koyama, Yuko Katsuno, Noriyuki Miyoshi, Sumio Hayakawa, Takashi Mita, Haruniko Muto, Satoko Isemura, Yutaka Aoyagi, Mamoru Isemura. Apoptosis induction by lectin isolated from the mushroom Boletopsis leucomelas in U937 cells. Biosci.Biote hnol.Biochem. 2002,66 (4), 784-789.]

Yu, L.; Fernig, D.G.; Smith, J.A.; Milton, J.D.; Rhodes, J.M. Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 4627–4632. [Google Scholar] [PubMed]

Zhang W., Tian G , Geng X , Zhao Y, Ng TB, Zhao L, Wang H. Isolation and Characterization of a Novel Lectin from the Edible Mushroom Stropharia rugosoannulata. Molecules, 2014, 19, 19880-19891.

Zhang, G.; Sun, J.; Wang, H.; Ng, T.B. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a Russula mushroom. Phytomedicine 2010, 17, 775–781.

Zheng **Shi**,Wen-wen **Li**, Yong **Tang**,Li-jia **Cheng**. A novel molecular Model of Plant Lectin-induced programmed cell death in cancer. Biological ad Pharmaceutical Bulletin. 2017, v.40, issue 10, 1625-1629.