

Карпова І. С., Корецька Н. В.

ДІАГНОСТИЧНІ МОЖЛИВОСТІ ЛЕКТИНІВ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН ПРИ ОБСТЕЖЕННІ ОСІБ, ЯКІ ПОСТРАЖДАЛИ ВНАСЛІДОК АВАРІЇ НА ЧАЕС

Лектини відомі як біологічно активні білки, котрі здатні специфічно розпізнавати рецептори, розташовані на клітинній мембрані представників усіх типів живих організмів. З метою дослідження віддалених ефектів радіації було застосовано лектинотест з комп'ютерною обробкою результатів, який базувався на реакції гемаглютинації з набором лектинів, виділених з 24 видів лікарських рослин. Зразки крові брали від осіб чоловічої статі, які зазнали впливу радіації протягом 1986р. і були віднесені до різних груп спостереження у період 1990—1996 рр. залежно від характеру та дози опромінення. Контрольна група складалася з неопромінених донорів. Встановлено статистично вірогідні відмінності в інтенсивності реакції лектинів з еритроцитами для всіх груп спостереження. Знайдено взаємозв'язок між показниками інтенсивності реакції рецептор — лектин з деякими параметрами ендокринного статусу пацієнтів.

Лектини належать до поширених у природі білків, котрі нековалентно зв'язують вуглеводи та глікокон'югати, не змінюючи їх структури. Завдяки полівалентності лектини мають унікальну властивість склеювати (аглютинувати) клітини, особливо еритроцити тварин та людини, зовнішня мембрана яких містить мільйони рецепторів - вуглеводів, протеогліканів, глікопротеїнів та гліколіпідів. Останнім часом спостерігається помітний прогрес у дослідженні лектинів організму людини. Вони відіграють важливу роль у таких процесах, як міжклітинне розпізнавання та адгезія, регуляція активності різних ланок імунної відповіді (зокрема, міграції лейкоцитів, секреції цитокинів), беруть участь у реакціях кліренсу, гемостазу, апоптозу тощо. Лектини задіяні у процесах запліднення та ембріогенезу, взаємодіють з рецепторами гормонів, мають противірусні та антибактеріальні властивості [1-7]. Методом рентгенструктурного аналізу встановлено, що ряд лектинів тваринного походження має значну топологічну подібність до поширених лектинів рослин та мікроорганізмів. Це свідчить про універсальність вуглевод-білкових взаємодій у біологічних системах.

Крім ендогенних лектинів, до організму надходять екзогенні лектини з харчових продуктів. Рослинні лектини здатні проходити гастроентерологічний бар'єр та накопичуватися у лімфатичних вузлах, селезінці та кістковому мозку. Завдяки широкому спектру біологічної активності щодо тваринних клітин лектини рослинного походження використовуються у гістохімічних, імунологічних та генетичних дослідженнях. Вони також є інструментом порівняльного аналізу структури клітинної поверхні в нормі та

при розвитку захворювання, зокрема онкопатології [4; 6; 7].

В Україні праці Є. Л. Голинської та співавторів започаткували новий напрям у дослідженні лектинів - «Лектини лікарських рослин (ЛР) як діагностичні та фармакологічно активні речовини» [8; 9]. Було обстежено понад 300 видів ЛР, серед яких близько 100 видів містили лектини, активні відносно еритроцитів людини системи АВ0. На моделі мембрани еритроцита було розроблено оригінальний лектинотест, що дає змогу порівнювати профіль рецепторів хворих із донорською нормою [10]. Для теоретичного обґрунтування такої лектинодіагностики було висловлено припущення, що особлива насиченість мембрани еритроцита рецепторами для різних екзогенних лектинів не випадкова. Вона може відображати участь цих рецепторів у фізіологічних процесах, котрі регулюються власними ендогенними лектинами, які мають подібну структуру та вуглеводну специфічність [11].

Мета цієї праці полягала: 1) у використанні реакцій з лектинами ЛР як нових діагностичних критеріїв для виявлення особливостей поверхні еритроцитарних мембран у осіб, які зазнали впливу різних доз опромінення у зв'язку з аварією на ЧАЕС; 2) шляхом зіставлення з показниками клінічних тестів розробити маркерні реакції рецептор - лектин для радіаційно зумовлених захворювань.

Матеріали та методи

Застосований лектинотест є набором з лектинів 24 видів ЛР, кожному з яких під час дослідження було присвоєно кодівий номер. Із сухої сировини лектини екстрагували розчином

0,15M NaCl, частково очищували етанольним фракціонуванням, ліофілізували та зберігали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [1]. Перед проведенням тестування препарати розчиняли у 0,15M NaCl. Концентрацію білка визначали спектрофотометрично та готували вихідний розчин (2 мг/мл). Проводили серію послідовних двократних розведень препарату в імунологічних планшетах, де в кожну лунку попередньо вносили 50 мкл фізрозчину у фосфатному буфері при pH 7,4. Потім додавали 50 мкл 2-процентної суспензії тричі відмитих еритроцитів та інкубували при температурі $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 60 хв. Реакцію гемаглютинації (РГА) реєстрували візуально, враховуючи титр (мінімальне розведення, при якому відбувається аглютинація) та форму осаду. Результати обчислювали в цілих числах - умовних балах (у. б.) згідно з [10; 12]. Такий підхід надає можливість представити реакцію з кожним лектином окремо, а також сумарно з усім набором із 24 препаратів як кількісні дискретно варіюючі ознаки. З метою порівняльної кількісної оцінки результатів лектинотесту було впроваджено два показники: індекс індивідуальної РГА (N) з окремим лектином та інтегральний індекс РГА - IN, котрий є сумою значень N для всіх 24 лектинів набору [13]. За результатами обстеження пацієнта будували графік - лектинограму, яка відображає інтенсивність реакції рецептор - лектин з кожним із 24 індивідуальних лектинів, і порівнювали з усередненою лектинограмою здорових осіб, де позиції розташовано за рангом від більших значень до менших, що варіюють у межах довірчого інтервалу ($M \pm 1.96\text{ t}$). Таким чином, індивідуальна лектинограма є відображенням профілю еритроцитарних рецепторів пацієнта. Окремо для кожної групи спостереження будували усереднену лектинограму з метою виявлення спрямованих змін реакції рецептор - лектин. Для пошуку маркерів реакції рецептор - лектин, які б характеризували вплив радіаційного фактора, було створено комп'ютерну базу даних, котра дає змогу зіставляти інтенсивність гемаглютинації з лабораторними показниками гематологічного, імунологічного, гормонального статусу, активності антиоксидантної системи та клінічними діагнозами (понад 40 параметрів). Систематизацію, статистичний аналіз і графічне зображення закономірностей варіювання досліджуваної ознаки в контролі та групах опромінених осіб проводили із застосуванням комп'ютерної програми Quattro Pro для Windows.

Результати та їх обговорення

За період 1990-1996 рр. лектинотест регулярно застосовували при обстеженні ліквідаторів,

які підлягали моніторингу в Науковому центрі радіаційної медицини АМН України. Залежно від характеру і дози опромінення, що визначалася шляхом фізичної або біологічної дозиметрії, контингент пацієнтів було розподілено на групи (табл. 1). Контрольна група охоплювала донорів, котрі не зазнали впливу радіаційного опромінення (група 1). Група 2 була досить однорідною і складалася з 74 молодих осіб чоловічої статі, які зазнали хронічного опромінення протягом 1986 р., у дозах, що не перевищували 0,5 Гр. Скарги пацієнтів відповідали стану, котрий називають вегето-судинною дистонією, при цьому вони не мали супутніх захворювань. Для груп 3-6 була характерною гетерогенність за такими показниками, як вік і стан здоров'я на момент аварії. Ці групи склалися з осіб, які зазнали вищих доз опромінення. Групу 3 утворювали професіонали із хронічними дозами, які було накопичено за різний період участі у рятувальних роботах. До групи 4 належали особи, котрі зазнали впливу гострого опромінення і перенесли субклінічну форму гострої променевої хвороби (ГПХ). Групи 5 і 6 утворювали особи з розвитком клінічної форми ГПХ. Біологічно встановлені дози у пацієнтів групи 5 були нижчими, а групи 6 - вищими за 2 Гр. Як видно з даних табл. 1, за інтенсивністю реакції з визначеним набором лектинів (інтегральний показник аглютинації IN) усі групи опромінених осіб вірогідно відрізнялися від контрольної групи. Вірогідними також були відхилення середніх значень IN для груп 3-6, пацієнти яких зазнали високих доз опромінення порівняно з пацієнтами, котрі накопичили малі дози (група 2). Проте в межах кожної групи не спостерігалось кореляції між показником IN ліквідатора і дозою. Розподіл осіб відповідно до значень IN у межах кожної групи спостереження, порівняно з контролем (група 1) виявив спрямовані відхилення від моноmodalного в бік біmodalного (групи 2 і 3) і навіть тримodalного розподілу (див. рис. 1). Така картина свідчить про формування дискретних підгруп опромінених осіб за рахунок збільшення частки представників, у яких інтенсивність реакції еритроцитів з лектинами підвищується. Гетерогенність зазначеного розподілу особливо вирізняла групу пацієнтів, котрі отримали високі дози гострого опромінення та хворіли на ГПХ (групи 5, 6). Виявлені групові відмінності в реакції з набором лектинів залежно від характеру (хронічне, гостре) та дози опромінення (малі, високі) дають змогу припустити, що в опроміненіх осіб відбуваються спрямовані структурно-функціональні зміни рецепторів еритроцитарної мембрани. Такий висновок ілюструє зіставлення типових індивідуальних лектинограм ліквіда-

Таблиця 1. Характеристики осіб, які зазнали впливу радіації внаслідок аварії на ЧАЕС

Групи	1	2	3	4	5	6
п	26	74	23	20	11	17
Вік, років на 1986 р.	21,7 ± 0,6	31,0 ± 0,8	39,6 ± 2,4	36,6 ± 1,5	37,7 ± 3,5	39,6 ± 2,3
Опромінення:						
гостре	-	-	-	+	+	+
хронічне	-	+	+	-	-	-
Доза, сГр:						
за даними радіометрії	-	16,0 ± 11,1	84,7 ± 12,2	56,4 ± 8,3		
за цитогенетичним методом					85,5 ± 19,9	270 ± 33,3
	Донори		Пацієнти			
Діагноз		Вегето- судинна дистонія	Різні діагнози	ГПХ I	ГПХ II	ГПХ III
	Професії					
ЗМОП *	+	-	-	-	-	-
Дорожна міліція		+	-	-	-	-
Працівники атомної станції			+	+	+	+
Пожежники			-	+	+	+
Будівельники			+	+	+	+
Військова охорона			+	+	+	+
	Інтегральний індекс реакції гемоглобінації (IN)					
	215,6 ± 4,1	240,3 ± 3,8	259,0 ± 6,8	283,1 ± 8,7	274,6 ± 13,8	280,0 ± 10,3

* загін міліції особливого призначення.

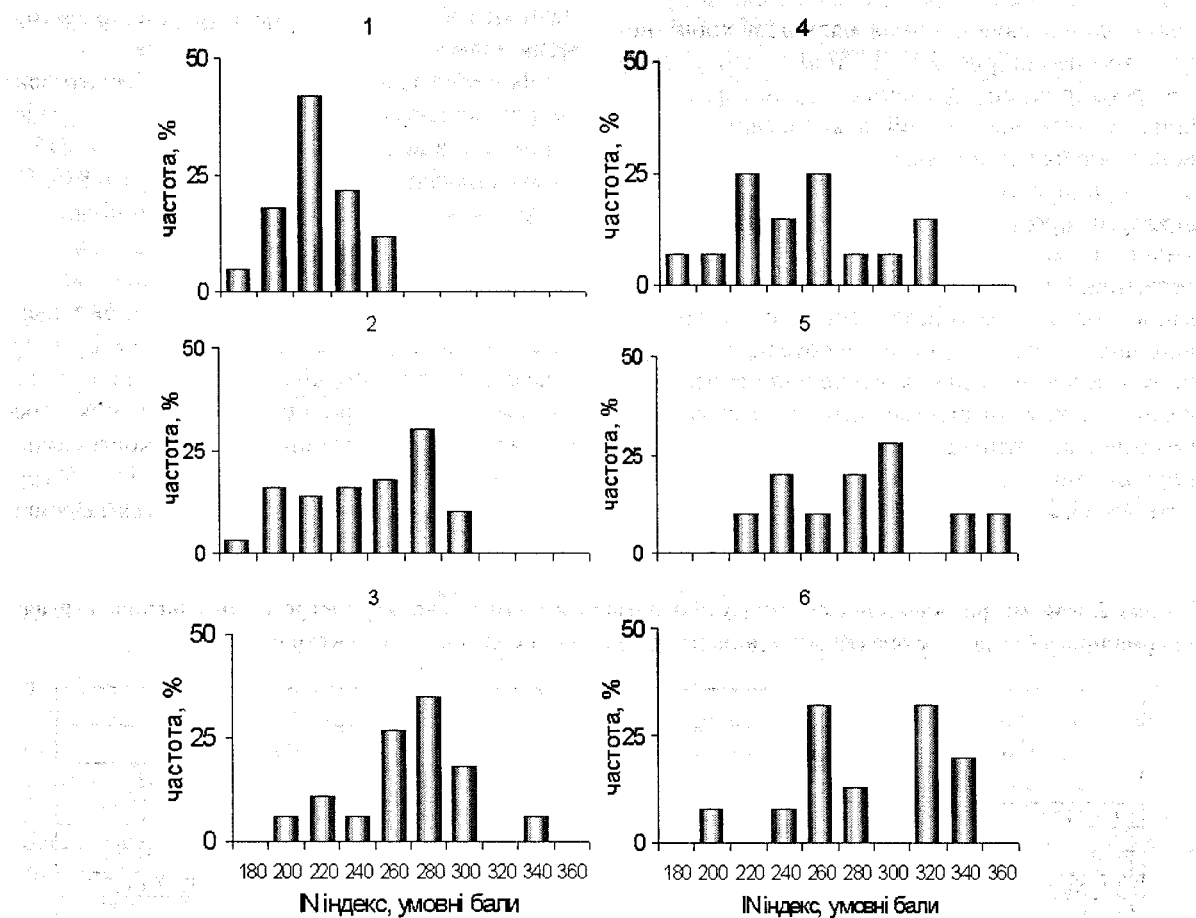


Рис. 1. Розподіл пацієнтів, які входять до груп спостереження (1-6), відповідно до значень інтегрального індекса реакції гемоглобінації з лектинами 24 видів лікарських рослин

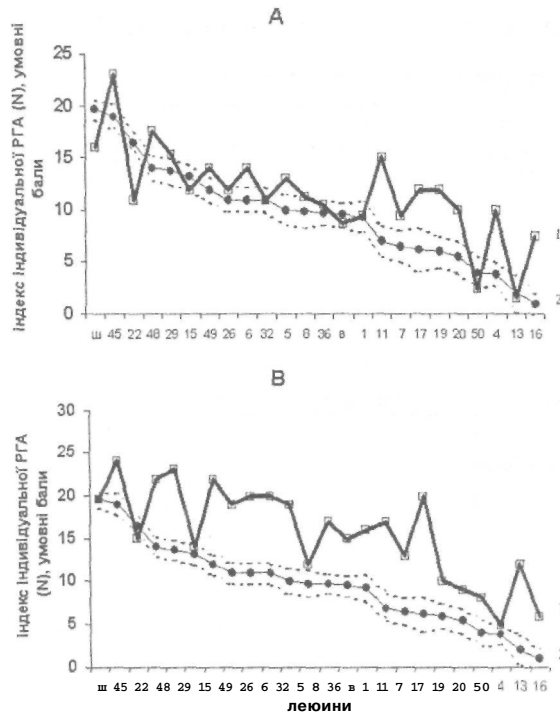


Рис. 2. Індивідуальна лектинограма пацієнта, який отримав: А - малу дозу хронічного опромінення (0,5 сГр) і В - велику дозу гострого опромінення (2,1 сГр). 1 - пацієнт, 2 - лектинограма групи неопроміненого контролю в межах довірчого інтервалу

торів, один з яких отримав малу дозу хронічного опромінення (рис. 2А), а інший - велику дозу гострого (рис. 2В). Як видно з даних (рис. 2А), близько третини позицій лектинотесту значно відхиляється від норми, третина перебуває в межах коридора статистичної норми, а решта має вірогідні, проте незначні відхилення. Водночас згідно з лектинограмою еритроцити ліквідатора, який хворів на ГПХ, значно активніше взаємодіють з лектинами. Лише одна позиція відповідає нормі і ще три перебувають на межі норми. Якщо показники інтенсивності реакції з кожним лектином підсумувати, то інтегральний показник аглютинації (IN) значно перевищить нормальний рівень. Отже, лектинограма може бути відображенням як загальної спрямованості

змін стану рецепторів еритроцитарної мембрани, так і індивідуального профілю рецепторів.

У подальшій роботі за результатами клінічних обстежень ліквідаторів (близько 40 параметрів) було створено комп'ютерну базу даних, яка надавала можливість проводити зіставлення результатів лектинотесту з кожним параметром за наведеною нижче схемою. Залежно від інтенсивності реакції з кожним лектином набору формували дві підгрупи пацієнтів. Особи, які за інтенсивністю гемаглютинації не перевищували донорську норму, утворювали підгрупу А. Ліквідаторів, які мали вищу за норму інтенсивність даної реакції, було віднесено до підгрупи В. У межах кожної підгрупи проводили статистичний аналіз певного параметра і вірогідність відмінностей оцінювали за критерієм Стюдента. За результатами аналізу виявилось, що зміни інтенсивності реакції з рядом лектинів тісно пов'язані зі змінами показників імунного та ендокринного статусу. Приклад пошуку маркерних реакцій з лектинами наведено в таблиці 2 для основних показників тиреоїдного статусу - загального (Т4) і вільного (FT4) тироксину, трийодтироніну (Т3) татироксинзв'язуючого глобуліну (ТЗГ), який синтезується клітинами печінки і надходить до кровотоку, а також гормону надниркових залоз - кортизолу.

Як видно з даних таблиці 2, у осіб, еритроцити яких характеризуються високою інтенсивністю реакції з лектином кукурудзи звичайної (*Zea mays*), вірогідно знижений рівень Т4, Т4/ТЗГ, Т3. Це дає підстави для припущення, що підвищення інтенсивності реакції із зазначеним лектином може бути показником субклінічного та клінічного гіпотиреозу. На користь такого припущення свідчить встановлений нами раніше факт, що у кожного третього ліквідатора, котрий зазнав впливу малих доз хронічного опромінення, спостерігалось різке зростання інтенсивності реакції з лектином *Zea mays* (кодовий № 16) [13]. У групах з більшим дозовим навантаженням хроніч-

Таблиця 2. Параметри ендокринного статусу ліквідаторів, які зазнали впливу гострого опромінення, в групах з нормальною (А) та високою (В) інтенсивністю реакції з індивідуальними лектинами (N)

Параметри	Лектини			
	1. <i>Zea mays</i>		2. <i>Rubus caesius</i>	
	A1	B1	A2	B2
Т4, нМ/л	91,5 ± 4,9	60,2 ± 9,5*	87,2 ± 6,1	84,7 ± 7,0
ТЗГ ^а , г%	16,3 ± 0,6	15,4 ± 0,6	16,2 ± 0,5	16,3 ± 0,7
Т4/ТЗГ	5,9 ± 0,3	3,9 ± 0,6*	4,8 ± 0,4	6,7 ± 0,3*
FT4, М/л	13,0 ± 0,4	12,7 ± 0,5	12,9 ± 0,4	12,9 ± 0,5
Т3, нг/мл	1,55 ± 0,08	1,26 ± 0,08*	1,34 ± 0,07	1,65 ± 0,09*
Кортизол, мМ/л	478,4 ± 22,0	433,1 ± 38,4	435,2 ± 20,3	526,2 ± 27,7*

* P > 0,95; ^аТироксинзв'язуючий глобулін.

ного або гострого опромінення частота осіб з підвищеною інтенсивністю цієї реакції досягала 50% [14].

Для іншого лектину - ожини сизої (*Rubus caesius*) виявлено прямий взаємозв'язок високої інтенсивності гемаглютинації з підвищеним рівнем кортизолу - гормону стресу. Таким чином, за допомогою реакцій з лектинами можна зафіксувати конкретні зміни внутрішнього середовища опроміненого організму, в першу чергу зміни гормонального рівня, які спостерігаються у віддаленому періоді.

Отже, отримані результати демонструють діагностичні можливості як сумарної реакції з набором різних лектинів, так і окремої маркерної реакції рецептор - лектин для виявлення спрямованих змін поверхні еритроцитарних мембран у осіб, які зазнали впливу різних доз опромінення у зв'язку з аварією на ЧАЕС [15]. Пошуки в цьому напрямку дозволять використовувати реакції з лектинами як критерій оцінки фізіологічного статусу організму та закласти основи чутливого методу рецепторної діагностики не тільки радіаційно обумовлених, а й поширених захворювань.

1. Луцки М. Д., Панасюк Е. Н., Луцки А. Д. Лектины. - Львів: Вища школа, 1981. - 150 с.
2. Луцки А. Д., Детюк Е. С., Луцки М. Д. Лектины в гистохимии. - Львів: Вища школа, 1989. - 144 с.
3. Подгорский В. С., Коваленко Э. А., Симоненко И. А. Лектины бактерий. - К.: Наук. думка, 1992. - 202 с.
4. Тимошенко А. В. Гликобиология и биомедицинское применение лектинов // Вестник БГУ. Сер. 2: Химия. Биология. География. - 1997. - № 2. - С. 38-47.
5. VanDamme J. M., Pentam W. J., Pustai A., Bardocz S. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications - Chichester etc.: John Wiley and Sons, 1998. - 451 p.
6. Lis H., Sharon N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition // Chem. Revs. - 1998. - V. 98. - № 2. - P. 637-674.
7. Gabius H.-J. Animal lectins // Eur. J. Biochem. - 1997. - V. 243. - № 1. - P. 543-576.
8. Глузман Д. Ф., Бовин Н. В., Абраменко И. В., Скляренко Л. М. Эндогенные лектины клеток иммунной системы и лимфоидных новообразований // Эксперим. онкология. - 1992. - Т. 14. - № 2. - С. 13-22.
9. Осьмак А. А., Гольнская Е. Л., Макаренко В. И., Сокирко Л. Р. Лектины лекарственных растений в иммунодиагностике и прогнозировании // Изучение и применение лектинов. Т. 2. Лектины в биологии и медицине. - Тарту: Уч. зап. Тарт. ун-та. - Вып. 870. - 1989. - С. 217-221.
10. Голинська Є. Л. Спосіб діагностики новоутворень. Патент України на винахід № 3060 (UA 3060 CI G 01 Nα 33/53), публікація від 26.12.1994. Бюл. № 5-1.
11. Гольнская Е. Л., Погорелая Н. Ф., Макаренко В. И. Лектины как возможное фармакологически активное начало у некоторых лекарственных растений // Изучение и применение лектинов. Т. 2. Лектины в биологии и медицине. - Тарту: Уч. зап. Тарт. ун-та. - Вып. 870, 1989. - С. 212-217.
12. Golynskaya E. L., Karpova I. S., Koretskaya N. V., Tykhonova T. N., Mykhailovskaya E. V., Khalyavka I. G., Ovsjannikova L. M. Investigation of interaction between lectins and peripheral blood red cells of patients which have been subjected to various doses of irradiation in connection with Chernobyl accident // Eur. J of Cell Biol. - 1997. - V. 74, Suppl. 46. - P. 15. (17th International Lectin Meeting. - Wurzburg/Germany).
13. Луцки М. Д., Панасюк Е. Н., Антоноук В. А., Луцки А. Д., Ладная Л. Я. Методы исследования углеводной специфичности лектинов: Методические рекомендации. - Львов, 1983. - 22 с.
14. Карпова И. С., Гольнская Е. Л., Корецкая Н. В., Тихонова Т. Н., Пидпала О. В., Михайловская Э. В. Диагностические возможности лектинов лекарственных растений при обследовании лиц, подвергшихся воздействию малых доз радиации в связи с аварией на Чернобыльской АЭС // Доклады Академии наук Украины. - 1994. - № 1. - С. 110-113.
15. Карпова И. С., Корецкая Н. В. Влияние характера и дозы облучения на активность реакции рецептор - лектин у ликвидаторов аварии на ЧАЭС // Биополимеры и клетина. - 2003. - Т. 19. - № 2. - С. 3-9.

I. Karpova, N. Koretskaya

DIAGNOSTIC PROPERTIES OF LECTINS FROM MEDICINAL PLANTS IN INVESTIGATION OF PERSONS SUFFERED FROM CHERNOBYL ACCIDENT

Lectins are known as biologically active proteins which can specifically recognize receptors exposed on cellular membranes in all types of living organisms. To investigate the late radiation effects in man the lectin test using panel of 24 lectins isolated from medicinal plants in reaction of haemagglutination with data processing have been used. Blood specimens were taken from men exposed during 1986 and being monitored from 1990 to 1996 who were attributed to different groups depending on character and dose of exposition, nonexposed donors served as the control. Statistically significant differences between all groups under study in intensity of lectin-red cell reactions have been demonstrated. Correlations have been found with some parameters of endocrine status.