Дослідження гемолітичної та антимікробної дії лектинів отруйних грибів *Amanita virosa* Secr. та *Mycena pura* /Fr./ Kumm.

В. О Антонюк[1, 2], О. О. Немченко[2], І. В. Тимчук[2], В. В. Данилейченко[2], Р. С. Стойка[1]

[1]Інститут біології клітини НАН України
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, Україна, 79005

[2]Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького
Вул. Пекарська, 69, Львів, Україна, 79010

antonyuk@meduniv.lviv.ua

Мета. *Дослідити гемолітичну та антимікробну дії двох нових лектинів, одержаних з плодових тіл отруйних грибів-базидіоміцетів A. virosa Secr. та M. pura /Fr./ Kumm.* ***Методи***. *Гемолітичну дію лектинів вивчали на еритроцитах людини і тварин. Експерименти з осмотичного захисту еритроцитів виконано за присутності поліетиленгліколю різної молекулярної маси (в діапазоні від 400 до 4000 Да). Антимікробну активність лектинів аналізували, визначаючи зону затримки росту культури різних видів мікроорганізмів на чашках Петрі в агаризованому середовищі.* ***Результати***. *Обидва лектини гемолізують еритроцити кроля, людини, щура та собаки і не гемолізують еритроцити корови й барана у концентрації 1 мг/мл. Найчутливішими до гемолітичної дії лектинів виявилися еритроцити кроля, гемолізуюча здатність лектину A. virosa є вищою. Гемолізу не спостерігалося за присутності поліетиленгліколю з молекулярною масою понад 1350 Да. Досліджено дію лектинів на 10 видах мікроорганізмів. Лектини пригнічують ріст переважно грампозитивних мікроорганізмів і протею. Для більшості випробуваних мікроорганізмів антимікробна дія лектину M. pura є сильнішою, ніж лектину A. virosa Secr.* ***Висновки***. *Знайдено два нових гемолітичних лектини в плодових тілах грибів-базидіоміцетів. Вони формують у мембранах еритроцитів іоно-проникні пори, гідродинамічний діаметр яких є меншим за 2,3 нм, але більшим за 1,6 нм. Зазначені лектини виявляють також антимікробну активність і за сукупністю цих ознак нагадують цитолітичні лектини нижчих безхребетних.*

Ключові слова: Amanita virosa, Mycena pura, лектини, гемолітична дія, антимікробна дія.

Вступ. У попередній роботі нами досліджено вуглеводну специфічність лектину міцени чистої *M. pura* /Fr./ Kumm. (скорочена назва – MPFA, від *Mycena pura* fungus agglutinin) та можливість його використання у гістохімічних дослідженнях [1]. У цій роботі встановлено, що згаданий лектин слабко взаємодіє з моно- і дисахаридами, значно краще – з глікопротеїнами, серед яких спорідненість до лужної фосфатази виявилася найвищою. Однак, як це показано на прикладі гістологічних зрізів нирки щура та тонкої кишки плода теляти, чутливість рецепторів для зв'язування лектину MPFA у тканинах ссавців не обмежуються лужною фосфатазою і, ймовірно, вона поширюється і на інші глікокон'югати складної будови [1]. Окрім високої спорідненості до лужної фосфатази, лектин міцени має здатність гемолізувати деякі види еритроцитів. Останнє свідчить про те, що даний лектин можна

віднести до рідкісної групи біфункціональних гемолітичних лектинів, які, крім доменів зв'язування вуглеводів, містять домени з цитолітичною активністю. Такі лектини знайдено у деяких безхребетних і лише в двох видів вищих грибів – *Laetiporus sulphureus* Bull. ex Fr. [2] і *Amanita phalloides* (Fr.) Secr. [3], але не виявлено в рослинах. Нами визначено також гемолітичні лектини у спорідненого до *A. phalloides* виду – мухомора смердючого (*A. virosa* Secr.) та у міцени чистої (*M. pura* /Fr./ Kumm.) – більш віддаленого виду, що належить до роду трихоломових (*Tricholomataceae*).

Мета даної роботи полягала у дослідженні дії лектинів з двох отруйних грибів (*A. virosa* Secr. і *M. pura* /Fr./ Kumm.) на еритроцити ссавців та деякі про- й еукаріотні мікрорганізми.

Матеріали і методи. *Визначення гемаглютинуючої активності та вуглеводної специфічності лектинів*. Гемаглютинуючу активність лектинів оцінювали наступним чином. До серії послідовних розведень лектину в мікропробірках додавали рівний об'єм 2 %-ї суспензії еритроцитів у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) і після 10-хв інкубації за кімнатної температури та центрифугування мікропробірок протягом 30 с при 500 *g* результат аглютинації спостерігали неозброєним оком. Вуглеводну специфічність лектинів визначали за допомогою реакції пригнічення гемаглютинації вуглеводами та глікопротеїнами. Методом ступінчастого розведення вуглеводу в мікропробірках встановлювали його мінімальну концентрацію, яка повністю інгібує активність лектину з титром 1:4. Для характеристики вуглеводної специфічності лектину використано вуглеводи і глікопротеїни, перелік і якісні характеристики яких наведено в попередніх роботах [1, 3, 4]. Детальніше методику визначення вуглеводної специфічності описано раніше [9].

Визначення гемолітичної активності здійснювали на еритроцитах людини, щура й кроля, як у роботі [3]. Для цього готували базовий розчин очищеного лектину (1 мг/мл). Далі в кожну з 10 мікропробірок вносили по 0,05 мл ЗФР, до першої пробірки додавали базовий розчин досліджуваного лектину і робили серію його дворазових розведень. Таким чином, концентрація лектину в 1-й пробірці становила 0,5 мг/мл, у другій – 0,25 мг/мл, у третій – 0,125 мг/мл і т. д. Потім до кожної пробірки додавали по 0,05 мл 2 %-ї суспензії еритроцитів досліджуваних видів тварин і людини та визначали найменший час, за який неозброєним оком спостерігався повний гемоліз еритроцитів у відповідній пробірці. Будували графік залежності часу повного гемолізу від концентрації лектину. Одержані значення мінімальної концентрації лектинів *A. virosa* і *M. pura*, що викликала гемоліз еритроцитів різних видів тварин і людини, представлено в табл. 2.

Експерименти щодо осмотичного захисту виконано за присутності еритроцитів кроля, які виявилися найчутливішими до гемолізу лектинами. Детально методику постановки реакції описано раніше [3]. Для цього використовували розчини поліетиленгліколю (ПЕГ) різної молекулярної маси (ПЕГ-400, 600, 1350, 1500, 3000 і 4000).

Дослідження антимікробної дії. На чашки Петрі суцільним газоном засівали завись добової культури таких мікроорганізмів: *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Proteus vulgaris, Corynebacterium xerosis, Streptococcus faecalis.* Завись цих мікроорганізмів готували за стандартом мутності 5 ОД. Кожну чашку поділено на вісім секторів і в центр кожного сектора внесено в лунку 50 мкг розчинів різних лектинів. Проведено п'ять серій дослідів.

Крім гемолітичних лектинів грибів мухомора смердючого *(A. virosa* Secr.) та міцени чистої (*M. pura* /Fr./ Kumm.), досліджено лектини з різних джерел та з іншою вуглеводною специфічністю (НВК «Лектинотест», Україна): конканавалін А, лектин виноградного слимака, лектин кори бузини чорної, лектин зародків пшениці, лектин ікри окуня, лектин гороху. Для порівняння інгібуючої дії використано диски із широковживаними антибіотиками – гентаміцином та ністатином. Усі посіви витримували в термостаті за температури 37 °С протягом 24 год.

Результати і обговорення. Одержання гемолітичних лектинів з плодових тіл грибів *A. virosa* та *M. pura* описано раніше [4]. Скорочено методика отримання цих лектинів включає наступні стадії.

Таблиця 1

Мінімальна концентрація моно- та дисахаридів, які пригнічують гемаглютинуючу активність лектинів Amanita virosa і Mycena pura

Вуглевод	Мінімальна концентрація вуглеводу, що пригнічує активність 4 ОД лектину, мМ	
	Лектин *M. pura*	Лектин *A. virosa*
D-глюкоза	100	–
D-Маноза	50	–
α-Метил-D-манопіранозид	25	–
Гентіобіоза (Glcβ1,6Glc)	100	–
Тураноза (Glcβ1,3Fru)	100	–
Глюкозо-6-фосфат дикалієва сіль	100	–

П р и м і т к а. Обидва лектини не взаємодіють з D-галактозою, L-фукозою, N-ацетил-D-галактопіранозидом, N-ацетил-D-глюкопіранозидом, α-метил-D-глюкопіранозидом, мелібіозою (DGalα1,6DGlc), мальтозою (DGlcα1,4DGlc), трегалозою (DGlcβ1,1DGlc), сахарозою (DGlcβ1,2DFru) у концентрації 100 мМ, які через це не включені до таблиці.

Зібрані в горах Карпатах (Львівська обл.) плодові тіла грибів подрібнювали на м'ясорубці, витискали сік, освітляли його центрифугуванням, білки осаджували сульфатом амонію (90 % насичення) і очищували в обох випадках аналогічно (із застосуванням іонообмінної хроматографії на DEAE-Toyopearl та афінної хроматографії на овомуцині [5]). З 1 кг свіжих плодових тіл *M. pura* одержано 9 мг очищеного лектину, а з *A. virosa* – біля 10 мг.

За даними диск-електрофорезу в 10 %-му ПААГ у лужній буферній системі (pH 8,6) обидва препарати лектинів мали чистоту понад 95 % [1, 4].

Лектини плодових тіл *A. virosa* і *M. pura* відрізняються за вуглеводною специфічністю. Зокрема, лектин *M. pura* слабко взаємодіє з вуглеводами групи D-манози (D-глюкоза, D-маноза, α-метил-D-манопіранозид, гентіобіоза) (табл. 1), тоді як лектин *A. virosa* з моносахаридами не взаємодіє. Є відмінності у зв'язуванні лектинів з деякими глікопротеїнами та полісахаридами (табл. 2)

Аналіз результатів, наведених у табл. 1, свідчить, що центри зв'язування вуглеводів в обох лектинів значно комплементарніші до олігосахаридних структур, ніж до моносахаридів.

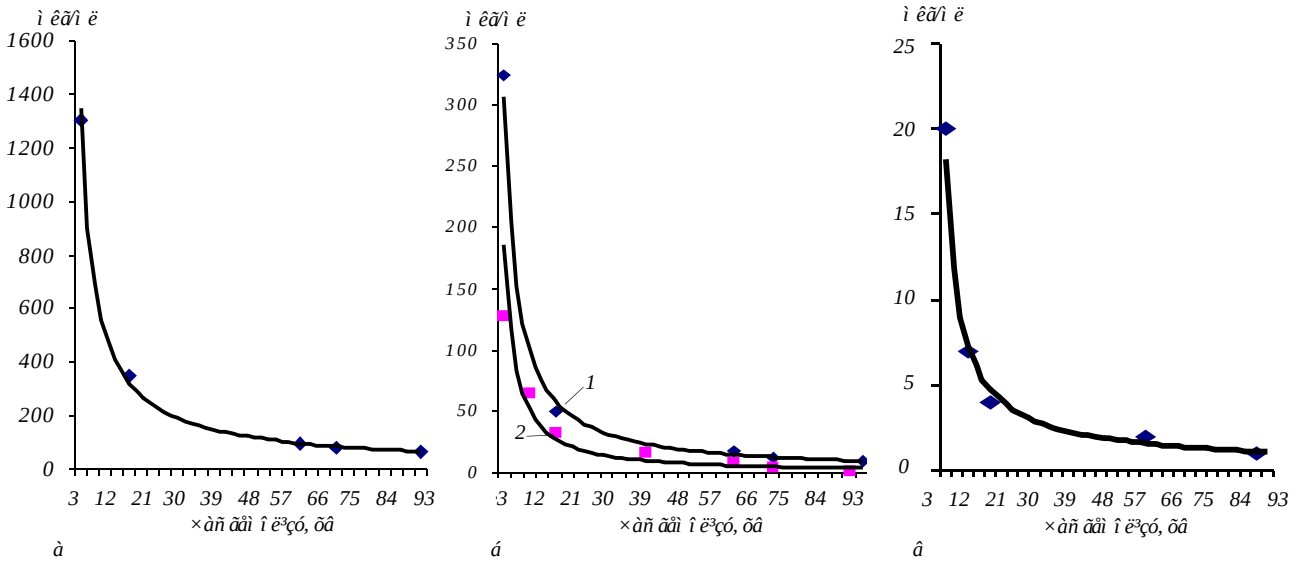
Таблиця 2

Взаємодія лектинів Mycena pura та Amanita virosa з полісахаридами та глікопротеїнами (за даними [1, 4] з доповненнями за результатами даної роботи)

Глікопротеїн або полісахарид	Мінімальна концентрація глікопротеїну або полісахариду, що пригнічує аглютинацію 4 ОД лектинів, %	
	Лектин *M. pura*	Лектин *A. virosa*
Трансферин	0,25	0,25
Тиреоглобулін бика	0,125	0,125
Лужна фосфатаза з кишечника теляти	0,002	0,125
Овомукоїд	0,06	0,125
Асіалоовомукоїд	0,015	0,25
Підщелепний муцин вівці	0,125	0,03
Підщелепний муцин бика	1	0,25
Підщелепний муцин бика десіалізований	0,5	0,25
Імуноглобулін G людини	–	0,08
α_2-Макроглобулін	1	0,03
Групоспецифічна речовина H, 1 %	0,125	0,03
Групоспецифічна речовина A, 1 %	0,125	0,03
Групоспецифічна речовина B, 1 %	0,25	0,06
Яєчний альбумін	0,125	–
Глікоген печінки свині, 1 %	0,5	–
Дріжджовий манан, 1 %	–	–
Крохмаль 1 %	1	–

П р и м і т к а. Риска означає відсутність взаємодії за концентрації лектинів 1 %.

Одержані препарати лектинів *A. virosa* і *M. pura* гемолізували еритроцити низки тварин і людини. Результати дослідження гемолізуючих і гемаглютинуючих властивостей зазначених лектинів наведено в табл. 2. Отримані результати вказують на те, що при додаванні до 2 %-ї суспензії еритроцитів барана, корови і коня лектину міцени в концентрації 1 мг/мл гемолізу не спостерігається. У той же час еритроцити собаки, кроля, людини і щура гемолізуються з різною інтенсивністю. Графік залежності швидкості гемолізу еритроцитів залежно від трива-



Швидкість гемолізу еритроцитів різних видів тварин і людини залежно від тривалості дії лектину *A. virosa*: *а* – собака; *б* – людина (*1*) і щур (*2*); *в* – кріль (по осі ординат – концентрація, яка спричиняє 100 %-й гемоліз). Графіки залежності швидкості гемолізу цих же еритроцитів залежно від тривалості дії лектину *Mycena pura* є аналогічними до *A. virosa* та відрізняються лише числовими значеннями і тому на рисунку не представлені

Таблиця 3
Мінімальна концентрація лектинів Amanita virosa і Mycena pura, яка викликає гемоліз і гемаглютинацію еритроцитів різних видів тварин і людини

Джерело еритроцитів	Мінімальна концентрація, мкг/мл			
	Лектин *M. pura*		Лектин *A. virosa*	
	Гемаглю-тинація	Гемоліз	Гемаглю-тинація	Гемоліз
Корова	125	> 1000	> 1300	> 1000
Баран	16	> 1000	900	> 1000
Кінь	8	> 1000	> 1300	600
Собака	8	250	40	60
Щур	2	12	600	1,5
Кріль	0,06	4	0,02	0,1
Людина, I (O)	4	30	80	7,5
Людина, II (A)	1	20	80	3,8
Людина, III (B)	2	30	40	7,5

лості дії лектинів *A. virosa* та *M. pura* представлено на рисунку.

Наведені результати засвідчують, що еритроцити кроля є найчутливішими до гемолізуючого впливу лектину, менш чутливими є еритроцити щура і найменш чутливими – еритроцити людини, собаки і коня. Графік також ілюструє, що для кожного виду еритроцитів існує порогова концентрація лектину, нижче якої гемолізу не спостерігається. Для еритроцитів коня вона близька до 600, собаки – 60, людини – 3,8–7,5, еритроцитів щура – ~1,5, а кроля – до 0,1 мкг/мл (табл. 3). Лектин міцени чистої гемолізує еритроцити собаки у концентрації, приблизно у 4 рази вищій, можливо, тому у концентрації лектину 1 мг/мл еритроцити коня не гемолізуються. У той же час, хоча еритроцити кроля були найчутливішими до гемолізуючої дії обох лектинів, різниця в чутливості до лектинів *A. virosa* та *M. pura* виявилася 40-разовою. Отже, гемолізуюча активність цих лектинів для різних еритроцитів може суттєво відрізнятися.

Гемаглютинуюча та гемолізуюча активності – дві дії, які виключають одна одну. Гемаглютинація можлива лише за присутності високомолекулярних речовин, що її не пригнічують. Найзручнішою речовиною такого типу є ПЕГ. Він може мати різну молекулярну масу, що дозволяє обчислювати розмір молекул.

Найменша концентрація ПЕГ, яка захищає еритроцити від гемолізу, для обох лектинів становить приблизно 4 %. Така концентрація була одна-

Таблиця 4

Діаметр зони затримки росту різних видів мікроорганізмів під впливом лектинів Amanita virosa і Mycena pura (у лунці – 50 мкг лектину) та деяких антибіотиків

Мікроорганізм	Діаметр зони затримки росту, мм		
	Лектин *M. pura*, 50 мкл	Лектин *A. virosa*, 50 мкл	Гентаміцин, 10 мкг
E. coli	–	–	24
P. aeruginosa	–	–	31
C. albicans	9	–	25 Ністатин, 80 ОД
K. pneumoniae	20	14	7
S. epidermidis	25	18	35
S. aureus	28	17	26
B. subtilis	23	11	30
P. vulgaris	21	13	26
C. xerosis	33	22	36
Str. faecalis	22	24	32

Примітка. Риска означає, що зона затримки росту відсутня.

ковою для ПЕГ-1350, ПЕГ-1500, ПЕГ-3000 і ПЕГ-4000. За присутності зазначених ПЕГ гемолізу не спостерігається протягом двогодинної інкубації.

ПЕГ з молекулярною масою 600 і 400 не захищає еритроцити від гемолізу обома лектинами навіть при 12 %-й концентрації останніх. Це свідчить про те, що розмір пор, які формують досліджувані лектини в мембранах еритроцитів кроля, є більшим за гідродинамічний діаметр ПЕГ-600, але меншим за такий ПЕГ-1350. Згідно з дослідженнями [6], гідродинамічний діаметр ПЕГ-600 становить 1,6 нм, а ПЕГ-1350 – 2,3 нм. Отже, обидва лектини формують у мембранах еритроцитів іоно-проникні пори, діаметр яких є меншим за 2,3 нм, але більшим за 1,6 нм. Такі самі результати одержано нами раніше при вивченні гемолітичного лектину з плодових тіл *A. phalloides* [3].

За присутності ПЕГ-1500–ПЕГ-4000 можна спостерігати за аглютинацією еритроцитів обома лектинами. Результати цих досліджень представлено в табл. 3. При цьому не виявлено кореляції між ступенем гемолізу та аглютинацією еритроцитів. Наприклад, еритроцити людини аглютинуються при вищій концентрації лектинів, ніж еритроцити собаки, однак еритроцити собаки були значно стійкішими до гемолізу обома лектинами; еритроцити щура гемолізуються лектином *A. virosa* при нижчій концентрації, ніж еритроцити людини, але вони мають вищу аглютинуючу активність.

Можна припустити, що гемаглютинуюча і гемолізуюча активності лектинів *A. virosa* та *M. pura* є функцією різних (незалежних) доменів у молекулі лектину.

При дослідженні антимікробної активності лектинів виявлено, що лише гемолітичні лектини міцени чистої та мухомора смердючого пригнічують ріст мікроорганізмів.

Лектин міцени чистої інгібує переважно ріст грампозитивних мікроорганізмів та протею (грамнегативна мікрофлора). Зокрема, зона затримки росту для *C. xerosis* становить 33 мм, для *S. aureus* – 28 мм, а для *B. subtilis* – 23 мм. Досліджуваний лектин слабко діє на *C. albicans* і не пригнічує росту *E. coli* та *P. aeruginosa*.

Лектин *A. virosa* також інгібує ріст переважно грампозитивних мікроорганізмів *C. xerosis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *B. subtilis* і не виявляє бактеріостатичної дії щодо *E. coli* та *P. aeruginosa* (грамнегативна мікрофлора). Зони затримки росту були трохи меншими, ніж для лектину міцени чистої (крім *Str. faecalis*) (табл. 4).

Антимікробну активність лектинів порівнювали з ефектом відомих антибіотиків, один із яких (гентаміцин) є інгібітором синтезу білків, а інший (ністатин) – порушує цілісність клітинних мембран. Ці дані також представлені в табл. 4.

Різну дію гемолітичних лектинів грибів на грампозитивні та грамнегативні мікроорганізми можна пояснити відмінностями у будові їхньої клітинної стінки. У грампозитивних бактерій, на які лектини діють бактеріостатично, стінка є товстішою і майже не містить ліпідів, тоді як у грамнегативних мікроорганізмів вона тонша і вміщує більшу кількість гліколіпідів [7]. Отже, дія лектинів скоріше залежить не від товщини клітинної стінки, а від наявності в ній специфічних вуглеводів.

Японські вчені [8] досліджували вплив CEL-III – гемолітичного Gal/GalNAc специфічного лектину морського огірка (*Cucumaria echinata*) на

штучні ліпідні мембрани, які відрізняються за хімічним складом. Утворення пор у ліпосомах спостерігали за наявності в мембранах гліколіпідів, які містять залишки лактози (але не глюкози, з якою CEL-III не взаємодіє). Автори роботи припустили, що витікання внутрішнього вмісту ліпосом залежить від специфічного зв'язування CEL-III з ланцюгами вуглеводів на поверхні ліпосом. Можливо, подібний механізм впливу має місце і в разі дії досліджуваних лектинів на мікроорганізми й еритроцити різних видів тварин.

Цитолітичні лектини на сьогодні знайдено головним чином у нижчих безхребетних з примітивною імунною системою. Розпізнавання і лізування чужорідних клітин у них повинно відбуватися без антитіл імуноглобулінової природи, де вони відсутні. Це лізування має бути селективним і не пошкоджувати власні клітини організму. На відміну від хребетних, у яких цитоліз опосередкований системою комплементу і включає комплекс із серії активованих протеаз, ефекторних і регуляторних білків, лізування чужорідних клітин, у першу чергу мікроорганізмів, у безхребетних, очевидно, здійснюється, зокрема, за сприяння цитолітичних лектинів. Останніх не знайдено у рослин і до нашого дослідження вони були описані лише у двох видів грибів. Виявлення подібного типу лектинів ще у двох видів вищих грибів свідчить про можливу близькість деяких груп лектинів грибів до лектинів нижчих безхребетних. З іншого боку, цей факт може бути додатковим аргументом на користь того, що підцарство справжніх грибів відділилося від загального еволюційного стовбура дещо пізніше, ніж підцарство рослин.

Висновки. 1. Виявлено два нових гемолітичних лектини у плодових тілах грибів класу базидіоміцетів: у мухоморі смердючому *A. virosa* Secr. (родина *Amanitaceae*, порядок *Agaricales*) та міцені чистій *M. pura* /Fr./ Kumm. (родина *Tricholomataceae*, порядок *Tricholomatales*).

2. Обидва лектини в концентрації 1 мг/мл гемолізують еритроцити кроля, людини, щура і собаки і не гемолізують еритроцити корови й барана. Еритроцити кроля в обох випадках були найчутливішими до гемолітичної дії лектинів: мінімальна гемолізуюча концентрація для лектину *A. virosa* становить 0,1 мкг/мл, для *M. pura* – 4 мкг/мл. Гемолізуюча дія лектину *A. virosa* на випробувані еритроцити є вищою за таку дію лектину *M. pura*.

3. Високомолекулярні речовини глобулярної природи, гідродинамічний діаметр молекул яких більший за 2,3 нм (наприклад ПЕГ-1350), здатні захищати еритроцити від гемолізу. Це дозволило дослідити вуглеводну специфічність і гемаглютинуючу активність лектинів *A. virosa* та *M. pura* за допомогою реакції пригнічення гемаглютинації вуглеводами та глікопротеїнами.

4. Вивчено дію досліджених лектинів на 10 видах мікроорганізмів. Встановлено, що лектини *A. virosa* та *M. pura* переважно пригнічують ріст грампозитивних мікроорганізмів і протею. Для більшості випробуваних мікроорганізмів антимікробна активність лектину *M. pura* була вищою за активність лектину *A. virosa*.

5. За сукупністю досліджених властивостей (реакція гемаглютинації, гемоліз та антимікробна дія) лектини грибів-базидіоміцетів *A. virosa* та *M. pura* подібні до цитолітичних лектинів нижчих безхребетних тварин.

V. O. Antonyuk, O. O. Nemchenko, I. V. Tymchuk, V. V. Danileuchenko, R. S. Stoika

Studies of hemolytical and antimicrobical action of *Amanita virosa* Secr. and *Mycena pura* /Fr./ Kumm. poisonous mushrooms lectins

Summary

***Aim**. To study hemolytical and antimicrobical action of two new lectins, obtained from fruit bodies of poisonous basidial mushrooms of A. virosa Secr. and M. pura /Fr./ Kumm. **Methods**. Research on hemolytical action of lectins was conducted on the erythrocytes of human and animals. The experiments on osmotic protection of erythrocytes were performed in the presence of polyethylenglycols of different molecular mass (in a range from 400 to 4000 Da). Antimicrobical activity of lectins was studied by determination of area delay of growth of culture of different types of microorganisms on the Petri dish in an agaric media. **Results**. Both lectins hemolyse the erythrocytes of rabbit, human, rat and dog and do not hemolyse the erythrocytes of cow and ship in concentration of 1 mg/ml. The rabbit erythrocytes are most sensitive to hemolytical action of lectins, while hemolytic ability of A. virosa lectin is higher. Hemolysis was not observed in the presence of PEG of molecular mass over 1,350 Da. Action of lectins on 10 types of microorganisms was investigated. Lectins inhibited mainly growth of grammpositive microorganisms and protey. For most tested microorganisms antimicrobial action of Mycena lectin is stronger comparing with A. virosa lectin. **Conclusions**. Two new hemolytical lectins are found in the fruit bodies of mushrooms-basidiomycetes. The lectin formed ion-permeable pores in membrane of erythrocytes with the hydrodynamic diameter smaller than 2.3 nm and larger than 1.6 nm.*

These lectins displays also antimicrobial activity and by the sum of these features are similar to the cytolytic lectins of lower invertebrates.

Keywords: Amanita virosa, Mycena pura, lectins, hemolytical action, antimicrobial action.

В. А Антонюк, О. А. Немченко, И. В. Тымчук, В. В. Данилейченко, Р. С. Стойка

Исследование гемолитического и антимикробного действия лектинов ядовитых грибов *Amanita virosa* Secr. и *Mycena pura* /Fr./ Kumm.

Резюме

***Цель**. Исследовать гемолитическое и антимикробное действие двух новых лектинов, выделенных из плодовых тел ядовитых грибов-базидиомицетов A. virosa Secr. и M. pura /Fr./ Kumm. **Методы**.Гемолитическое действие лектинов исследовали на эритроцитах человека и животных. Эксперименты по осмотической защите эритроцитов выполнены в присутствии полиэтиленгликолей различной молекулярной массы (в диапазоне 400–4000 Да). Антимикробную активность лектинов анализировали, определяя зону задержки роста культуры разных видов микроорганизмов на чашках Петри в агаризованной среде. **Результаты**. Оба лектина гемолизируют эритроциты кролика, человека, крысы и собаки и не гемолизируют эритроциты коровы и барана в концентрации 1 мг/мл. Эритроциты кролика оказались самыми чувствительными к гемолитическому действию лектинов, при этом гемолизирующая способность лектина A. virosa выше. В присутствии полиэтиленгликоля с молекулярной массой выше 1350 Да гемолиз не наблюдался. Изучено действие лектинов на 10 видов микроорганизмов. Лектины преимущественно подавляют рост граммположительных микроорганизмов и протея. Для большинства исследованных микроорганизмов антимикробная активность лектина мицены выше, чем лектина A. virosa. **Выводы**. Найдены два новых гемолитических лектина в плодовых телах грибов-базидиомицетов. Они формируют ионо-проникающие поры, гидродинамический диаметр которых меньше 2,3 нм, но больше 1,6 нм. Указанные лектины обнаруживают также антимикробную активность и по совокупности этих признаков напоминают цитолитические лектины низших беспозвоночных.*

Ключевые слова: Amanita virosa, Mycena pura, лектины, гемолитическое действие, антимикробное действие.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Antonyuk V. O., Yastchenko A. M., Antonyuk R. V., Ambarova N. O.* Carbohydrate specificity of lectin, purified from the fruiting bodies of *Mycena pura* /Fr./ Kumm. (MRFA) and its uses in histochemical investigation // Biopolym. cell.–2009.–**25**, N 6.–P. 466–475.
2. *Tateno H., Goldstein I. J.* Molecular cloning, expression, and characterization of novel hemolytic lectins from the mushroom *Laetiporus sulphureus*, which show homology to bacterial toxins // J. Biol. Chem.–2003.–**278**, N 42.–P. 40455–40463.
3. *Antonyuk V. O.* Study of carbohydrate specificity of hemolytic lectin from death-cap mushroom (*Amanita phalloides* (Vaill. Fr.) Secr.) // Biopolym. cell.–2005.–**21**, N 4.– P. 319–325.
4. *Antonyuk V. A., Klyuchivskaya O. Yu., Stoika R. S.* Bifunctional hemolytic lectins from basidial mushrooms: studies hemolytic and toxic properties // Practical Phytotherapy (Moscow).–2009.–N 1.–P. 17–19.
5. *Pat.* (Author's sertificate) No 1554961. Method for obtaining of affinity sorbent for purification of lectin / V. A. Antonyuk // Bull. Izobret. USSR.–1990.–N 13. (In Russian).
6. *Scherrer R., Gerhardt P.* Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast // J. Bacteriol.–1971.–**107**, N 3.–P. 718–735.
7. *Kauzer F. H., Bienz K. A., Eskert J., Zinkernagel R. M.* Medical microbiology.–Stuttgart-New York: Thieme, 2005.–698 p.
8. *Kouriki-Nagamoto H., Hatakeyama T., Jelokhani-Niaraki M., Kondo M., Ehata T., Yamasaki N.* Molecular mechanism for pore-formation in lipid membranes by the hemolytic lectin CEL-III from marine invertebrate *Cucumaria echinata* // Biosci. Biotechnol. Biochem.–1999.–**63**, N 7.–P. 1279–1284.
9. *Lutsyk M. D., Panasjuk E. N., Antonyuk V. A., Lutsyk A. D., Ladnaya L. Ya.* Method for investigation carbohydrate specificity of lectins (Method. recommendation).–Lviv, 1983.–20 p.

УДК 547.963.1:543.9
Надійшла до редакції 10.06.09