

## Вивчення вуглеводної специфічності гемолітичного лектину блідої поганки (*Amanita phalloides* (Vaill. Fr.) Secr)

В. О. АНТОНЮК

Інститут біології клітини НАН України  
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, Україна

E. mail: antonyuk @meduniv.lviv.ua

Описано очищення та деякі фізико-хімічні властивості гемолітичного лектину фалолізину *A. phalloides* (Vaill. Fr.) Secr. Згідно з даними електрофорезу в поліакриламідному гелі у присутності *DS-Na*, фалолізін складається з поліпептидів молекулярною масою (м. м.) близько 18 кДа. М. м. цього лектину, визначена гель-фільтрацією на *Toyopearl HW-55*, склала 35 кДа. Фалолізін є термолабільним, прогрівання протягом 30 хв при температурі 65 °С повністю позбавляє його гемолітичних і гемаглютинуючих властивостей. Ці активності не залежать від присутності іонів кальцію. Чутливість еритроцитів різних видів до гемолітичної дії фалолізину зменшується в ряду: кріль > щур > людина. Експерименти з осмотичного захисту виконано на еритроцитах кроля. При інкубації еритроцитів з фалолізином у присутності поліетиленгліколю (ПЕГ) різної м. м. швидкість лізису пригнічувалася в міру збільшення розміру молекули ПЕГ. Одержані результати свідчать про те, що фалолізін у мембранах еритроцитів формує іоно-проникні пори, функціональний діаметр яких є меншим за 2,3 нм (але більшим від 1,6 нм). У той же час присутність ПЕГ не впливає на його гемаглютинуючу активність, що дозволяє вивчати вуглеводну специфічність цього лектину блідої поганки. Вивчення вуглеводної специфічності фалолізину виявило, що він найкраще взаємодіє з *D*-галактозою і її  $\beta$ -похідними. Встановлено, що фалолізін не надає явної переваги при взаємодії з глікопротеїнами *O*-гліканного типу над такими *N*-гліканного типу.

Ключові слова: *Amanita phalloides*, фалолізін, гемоліз, осмотичний захист, вуглеводна специфічність

Вступ. Бліда поганка (*A. phalloides* (Vaill. Fr.) Secr) — смертельно отруйний гриб, який містить декілька типів отруйних речовин. Основними токсичними речовинами блідої поганки є циклічні гептапептиди — фало- і аматоксини. Ці дві групи пептидів мають подібну будову і різняться лише бічними ланцюгами. Вони надходять з кров'ю до печінки, внаслідок чого відбуваються збільшення її розміру та відтік іонів калію і лізосомних ферментів з наступним руйнуванням клітин. Інтосикація стає смертельною, коли на половину маси

печінки припадає 20—30 нг пептидів [1]. Крім того, в плодових тілах гриба знайдено токсичні білки — фалолізін [2], який є гемолітичним лектином [3], і нелектинові білки, яким також притаманна токсичність стосовно живих клітин [4]. Нелектинові білки, очевидно, відіграють значно меншу роль в отруєнні грибами, оскільки є термолабільними і мають нижчу токсичність.

Фалолізін — один з небагатьох токсичних лектинів, який володіє як гемаглютинуючою, так і гемолітичною активністю. До таких лектинів належить лектин морського огірка *Cucumaria echinata*

[5], лектин ціломічної рідини каліфорнійського компостного черв'яка *Eisenia fetida* [6] та плодкових тіл гриба сірчано-жовтого трутовика *Laetiporus sulphureus* [7]. Ці лектини утворюють у біомембранах пори і спричинюють витікання внутрішнього вмісту клітини назовні. Механізм пороутворення і вуглеводну специфічність, з якою у лектину *S. echinata* тісно пов'язана гемолітична активність [8], добре вивчено лише в останнього, у той же час лектин блідої поганки (фалолізін) не є охарактеризованим з точки зору його вуглеводної специфічності. Основна причина цього полягає у гемолізі еритроцитів, аглютинацію яких найчастіше використовують для виявлення лектинів, а пригнічення реакції гемаглютинації — для характеристики вуглеводної специфічності. Раніше нами остаточно було встановлено лектинову природу фалолізіну [3], а згодом повідомлено, що в присутності овомуцину і глікофорину А гемолітична активність зникає, але з нею зникає і гемаглютинуюча здатність [4].

Метою даної роботи був пошук умов, за яких було б можливим вивчення вуглеводної специфічності фалолізіну.

**Матеріали і методи.** Плодові тіла *A. pholloides* збирали в Сколівському районі Львівської області і висушували в сушильному шкафу при температурі 45 °С або використовували свіжими.

Очищення лектину здійснювали за методом, розробленим раніше [3, 4], з невеликими змінами, що не торкаються суті методу. Для цього із свіжо-зібраних грибів на сильному пресі видавлювали сік. До нього додавали тиосечовину до кінцевої концентрації 0,1 %. Величину рН спочатку доводили до 4,0 (утворений осад видаляли), а потім до 8,0 (осад, який знову утворився, видаляли центрифугуванням). Далі значення рН знижували до 6,5—7,0 і видалений осад наносили на колонку з афінним гелем [9]. Колонку промивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР). Промивали до тих пір, поки в надосадовій рідині величина  $E_{280}$  знижувалася до значень  $< 0,1$ . Лектин знімали 2 %-м розчином оцтової кислоти. Фракції, які містили білок, об'єднували і висолювали діалізом проти насиченого розчину сульфату амонію. Остаточне доочищення лектину здійснювали іонообмінною хроматографією на ДЕАЕ-целюлозі. Для цього осад, одержаний на попередній стадії, концентрували, підсушували на папері і розчиняли у воді. Після діалізу проти 0,07 М фосфатного буферного розчину його наносили на колонку з ДЕАЕ-целю-

лозою. Лектин проходив через колонку без затримки, тоді як баластні речовини залишалися сорбованими на колонці. Фракції, які містили фалолізін, після діалізу проти дистильованої води ліофільно висушували.

Мінімальну м. м. поліпептидних ланцюгів лектину визначали за допомогою електрофорезу в градієнті концентрації (10—15 %) поліакриламідного гелю (ПААГ) з 0,1 % DS-Na [10]. Як стандарт використовували ячний лізоцим (м. м. 14,3 кДа); лектин насіння сочевиці (5,7+17,5 кДа); аглютинін зародків пшениці (21,6 кДа); лектин виноградного слимака (26 кДа); еритроаглютинін насіння квасолі звичайної (32 кДа); альбумін сироватки крові (69 кДа).

М. м. лектину блідої поганки визначали за допомогою гелі-хроматографії на колонці з Тоуорепарл HW-55 (1,5 x 39 см), елюцію проводили 0,1 М ацетатним буферним розчином, рН 6,4, з 0,5 М NaCl, швидкість елюції 0,3 мл/хв.

Гемолітичну здатність одержаного препарату вивчали на еритроцитах людини, щура і кроля. Для цього готували базовий розчин очищеного фалолізіну: 1 мг препарату розчиняли в 10 мл ЗФР. Далі в 10 мікропробірок вносили по 0,05 мл ЗФР, а в першу пробірку додавали базовий розчин фалолізіну і робили серію його дворазових розведень. Таким чином, у 1-й пробірці було 0,5 мг/мл, у другій — 0,25 мг/мл, у третій — 0,125 мг/мл і т. д. Потім в кожен пробірку вносили по 0,05 мл 2 %-ї суспензії еритроцитів досліджуваних видів тварин і людини і відмічали найменший час, за який незброєним оком спостерігався повний гемоліз еритроцитів у кожній пробірці. Будували графік залежності часу повного гемолізу від концентрації фалолізіну.

Експерименти з осмотичного захисту виконано у присутності еритроцитів кроля. Для цього готували 12 %-ї розчини поліетиленгліколю (ПЕГ) різної м. м. (ПЕГ-400, -600, -1350, -1500, -3000 і -4000), а також 1 М (18 %) розчини D-манози, D-галактози та D-глюкози у ЗФР, рН 7,2. В мікропробірках, які містили по 0,05 мл розчинів цих речовин, додавали рівний об'єм розчину фалолізіну в концентрації 0,125 мг/мл і 2 %-ву суспензію кролячих еритроцитів. У контролі замість розчинів хімічних речовин додавали ЗФР. Суміш збовтували і спостерігали за гемолізом. Речовини, у присутності яких гемолізу не спостерігалось за проміжок часу, в 2 рази більший за контроль,

відбирали для подальших досліджень. Їх використовували для визначення мінімальної концентрації, яка пригнічує гемоліз. Для цього робили серію дворазових розведень цих речовин, як описано вище, і додавали рівний об'єм розчину фалолізину і 2 %-ї суспензії еритроцитів. Визначали найменшу концентрацію, яка забезпечувала повний захист від гемолізу порівняно з часом, за який у контролі спостерігався 100 %-й гемоліз.

Вуглеводну специфічність лектину визначали за методом, описаним раніше, з тією різницею, що ЗФР (рН 7,2) містив 6 %-й розчин ПЕГ-1500.

Для характеристики вуглеводної специфічності лектину використано D-глюкозу, D-фруктозу, D-галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу (РФ), рафінозу («Fluka», Швейцарія),  $\alpha$ - і  $\beta$ -метил-D-галактозида, L-рамнозу, целобіозу, 2-ацетамідо-D-галактопіранозид і 2-ацетамідо-D-глюкопіранозид («Chemapol», Чехія), D-манозу, L-рибозу (виробництва Братиславського хімічного інституту, Словачія), мелібіозу,  $\alpha$ -метил-D-манозид, феніл- $\alpha$ -2-ацетамідо-D-глюкопіранозид, 4-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюко- та галактопіранозиди («Serva», Німеччина), L-фукозу («Koch Light», Великобританія). 4-Нітрофеніл- $\alpha$ -L-фукопіранозид та 4-нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид одержували за методом, описаним в [11]. N,N'-діацетилхітобіозу надано д-ром Піскар'євим (Інститут хімії харчових речовин, РФ).

Для визначення взаємодії з глікопротеїнами та полісахаридами використовували глікоген печінки свині, овомукоїд та тричі перекристалізований овальбумін («Biolog», Латвія), інулін [12] і дріжджовий манан [13]. Групоспецифічні речовини Н, А і В одержано з кістозної рідини, взятої після операцій на яєчниках у пацієнок з відповідними групами крові. Їх очищували за методом, описаним раніше [14]. Фетуїн, трансферин, орозомукоїд люб'язно надані нам М. Д. Луциком.

Результати і обговорення. З 300 г свіжозібраного гриба одержано 17 мг ліофільно висушеного лектину. Він являв собою білий аморфний порошок, добре розчинний у водно-сольових розчинах при рН 3—9. Лектин не є термостабільним: прогрівання при температурі 65 °С протягом 30 хв повністю позбавляє його гемолітичної і гемаглютинуючої активностей. При діалізі проти 1 %-го розчину динатрієвої солі ЕДТА протягом 8 год лектин не втрачав вищезгаданих активностей. Це свідчить про те, що для їхнього прояву іони кальцію не є необхідними.

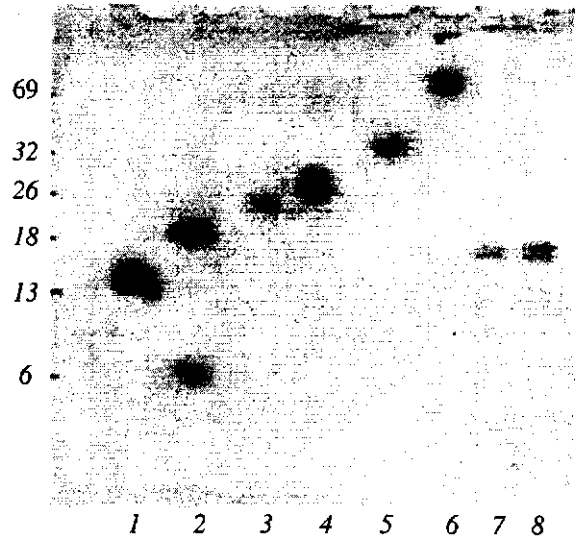


Рис. 1. Електрофореграма очищеного препарату фалолізину (10—15 %-й ПААГ, рН 8,9, з 0,1 % DS-Na): 1 — яєчний лізоцим (14,3 кДа); 2 — лектин насіння сочевиці (5,7 + 17,5 кДа); 3 — аглютинін зародків пшениці (21,6 кДа); 4 — лектин виноградного слимака (26 кДа); 5 — еритроаглютинін насіння квасолі звичайної (32 кДа); 6 — альбумін сироватки крові (69 кДа); 7, 8 — фалолізини за відсутності і в присутності  $\beta$ -меркаптоетанолу відповідно

У присутності  $\beta$ -меркаптоетанолу та DS-Na при електрофорезі в ПААГ очищеного фалолізину виявлено зону з м. м. 17—18 кДа. За відсутності  $\beta$ -меркаптоетанолу спостерігається така ж сама картина (рис. 1). Визначення м. м., здійснене гель-хроматографією на колонці з Toyopearl HW-55, дало значення 35 кДа (рис. 2). Це підтверджує той факт, що лектин складається з двох поліпептидних ланцюгів однакової або дуже близької м. м.

Одержаний препарат гемолізує еритроцити кроля, людини і щура з різною інтенсивністю. Графік залежності часу гемолізу від концентрації фалолізину представлено на рис. 3. Ці результати засвідчують, що еритроцити кролика є найчутливішими до гемолізуючого впливу фалолізину, далі йдуть еритроцити щура і, накінець, еритроцити людини. Графік також ілюструє, що для кожного виду еритроцитів існує порогова концентрація фалолізину, нижче якої гемолізу не спостерігається. Для еритроцитів людини вона становить близько 50, еритроцитів щура — 12, а кролика — 1 мкг/мл.

Якщо гідродинамічний діаметр захисної речовини є більшим за пору в мембрані, сформовану лектином, можна сподіватися на захист від лізису, індукованого лектином, за рахунок урівноваження осмотичного тиску, що виникає у внутрішньо-

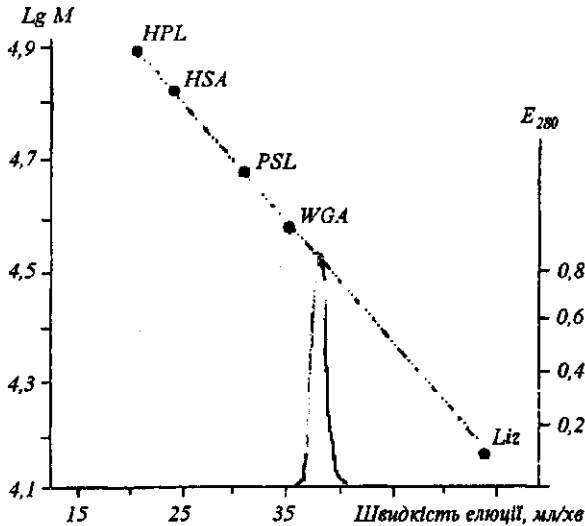


Рис. 2. Визначення молекулярної маси лектину білої поганки за допомогою гелі-хроматографії. Колонка з Тоуореагі HW-55 (1,5 × 39 см), елюція: 0,1 М ацетатний буферний розчин, рН 6,4, 0,5 М NaCl, швидкість 0,3 мл/хв. На колонку наносили 5 мг лектину в 1 мл буферного розчину. Скорочення: HPL — лектин виноградного слимака (74 кДа); HSA — сироватковий альбумін (69 кДа); PSL — лектин насіння гороху (49 кДа); WGA — лектин зародків пшениці (42 кДа); Liz — яєчний лізоцим (14,3 кДа)

клітинному середовищі. Коли еритроцити інкубували з нативним лектином у присутності нейтральних цукрів і ПЕГ різної м. м., посилення пригнічення лізису спостерігалось при збільшенні розміру молекули ПЕГ. Індукований фалолізином гемоліз повністю пригнічувався ПЕГ-1350 і не пригнічувався за присутності ПЕГ-400 і -600. Це свідчить про те, що розмір пор, які робить фалолізін у мембранах еритроцитів кроля, є більшим за гідродинамічний діаметр ПЕГ-600, але меншим за такий ПЕГ-1350.

Згідно з дослідженням [15], гідродинамічний діаметр ПЕГ-600 становить 1,6 нм, а ПЕГ-1350 — 2,3 нм. Отже, фалолізін у мембранах еритроцитів формує іоно-проникні пори, функціональний діаметр яких < 2,3 нм, але > 1,6 нм. Цей розмір менший за пори, які утворює гемолітичний лектин з гриба *L. sulphureus* (Bull. ex Fr.) (3,8 нм) [7], але більший за розмір пор, які утворює  $\beta$ -токсин з *Clostridium perfringens* (1,6 нм) [15].

Коли в подальшому еритроцити були відмиті від ПЕГ і знову піддані обробці розчином фалолізіну, лізис спостерігався. Найменша концентрація ПЕГ, яка забезпечувала повний захист еритроцитів від гемолізу, становила ~ 2%. Ця концентрація була однаковою для ПЕГ-1350, -1500, -3000

і -4000. У присутності зазначених ПЕГ гемолізу не відмічено навіть після 3-год інкубації.

Цінною знахідкою є те, що за присутності ПЕГ-1500 можна спостерігати за аглютинацією фалолізином еритроцитів. Він найкраще аглютинуює еритроцити кроля (мінімальна гемаглютинуюча концентрація становить 0,5 мкг/мл) і гірше — еритроцити людини (16 мкг/мл).

Наявність ПЕГ-1350, -1500, -3000 і -4000 у розчинах не впливала на титр гемаглютинації і на взаємодію з вуглеводами. Слід відмітити, що в неочищених екстрактах білої поганки гемаглютинацію еритроцитів кроля можна спостерігати за умови зменшення часу інкубації до 1—2 хв та проведення центрифугування (500 g, 30 с), оскільки гемоліз проходить дещо повільніше. Однак такий режим не дозволяє визначати вуглеводну специфічність фалолізіну. Присутність ПЕГ-1500 у кінцевій концентрації 2% повністю усуває гемоліз і дозволяє досліджувати вуглеводну специфічність лектину.

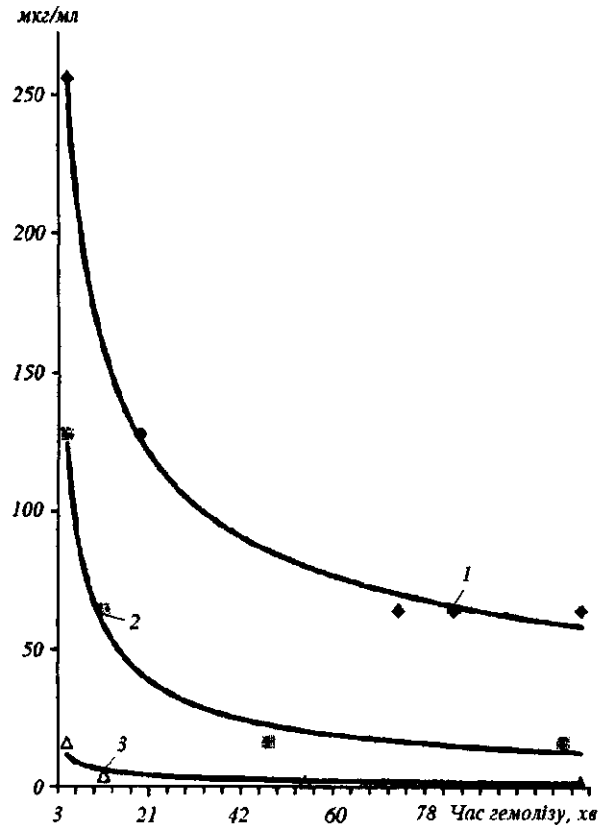


Рис. 3. Швидкість гемолізу еритроцитів людини (1), щура (2) і кроля (3) під впливом фалолізіну (по осі ординат — концентрація, за якої відбувається 100%-й гемоліз)

## Взаємодія лектину (фалолізину) блідої поганки з вуглеводами та глікопротеїнами

Вуглевод або глікопротеїн	Мінімальна концентрація вуглеводу, що пригнічує активність 4 од. фалолізину, мМ	Відносна інгібіторна сила
D-галактоза	0,78	1
N-ацетил-D-галактозамін	6,25	0,125
N-ацетил-D-глюкозамін	25	0,03
Лактоза (Gal $\beta$ 1, 4Glc)	0,39	2
$\alpha$ -метил-D-галактопіранозид	25	0,03
$\beta$ -метил-D-галактопіранозид	0,39	2
L-рамноза	12,5	0,06
Мелібіоза (Gal $\alpha$ 1, 6Glc)	3,12	0,25
Рафіноза (Gal $\alpha$ 1, 6Glc $\beta$ 1, 2DFrucf)	3,12	0,25
Гентіобіоза (Glc $\beta$ 1, 6Glc)	100	0,0078
Трегалоза (Glc $\beta$ 1, 1Glc)	100	0,0078
Мальтоза (Glc $\alpha$ 1, 4Glc)	50	0,0156
N,N'-діацетилхітобіоза	-(25)	< 0,03
$\alpha$ -Феніл-N-ацетил-D-глюкозамін	40	0,0195
4-Нітрофеніл- $\alpha$ -D-манозопіранозид	-(40)	0,0195
4-Нітрофеніл- $\beta$ -D-глюкопіранозид	5	0,156
4-Нітрофеніл- $\beta$ -D-галактопіранозид	0,3	2,6
Трансферин, 1 %	—	—
Муцин підщелепної залози бика, 1 %	—	—
Асіаломуцин підщелепної залози бика, 0,25 %	—	—
Фетуїн, 0,5 %	—	—
$\alpha$ 2-Макроглобулін, 0,125 %	—	—
$\alpha$ -Глікопротеїн, 0,5 %	—	—
Муцин підщелепної залози вівці, 1 %	—	—
Імуноглобулін G, 0,25 %	—	—
Ячний альбумін, 1,0 %	—	—
Овомукоїд, 0,06 %	—	—
Асіалоовомукоїд, 0,015 %	—	—
Групоспецифічні речовини	—	—
В 0,06, %	—	—
А 0,03, %	—	—
Н 0,03, %	—	—

Примітка. Відносну інгібіторну силу D-галактози прийнято за 1. Фалолізін не взаємодіє з D-глюкозою, D-манозою, L-фукурою, L- і D-рибозою,  $\beta$ -метил-D-ксилозопіранозидом,  $\alpha$ -метил-D-манозопіранозидом, D-фруктозою, сахарозою, целобіозою (Glc $\beta$ 1, 4Glc) в концентрації 100 мМ.

Результати вивчення взаємодії фалолізину з вуглеводами представлено в таблиці. Серед моносахаридів кращим інгібітором активності є D-галактоза. D-маноза, D-глюкоза і L-фукоза з лектином не взаємодіють. N-ацетил-D-галактозамін і N-ацетил-D-глюкозамін є слабшими інгібіторами лектину, ніж D-галактоза.

$\beta$ -Похідні D-галактози мають перевагу над  $\alpha$ -похідними.  $\beta$ -Метил-D-галактопіранозид у 2 рази, а 4-нітрофеніл- $\beta$ -D-галактопіранозид у 2,6 разу сильніші інгібітори за D-галактозу. Серед дисахаридів лактоза (Gal $\beta$ 1, 4Glc) — у 2 рази сильніший інгібітор, ніж D-галактоза. Похідні галактози, зв'язані  $\alpha$ -зв'язком, є слабшими інгібіторами. Наприк-

лад, мелібіоза (Gal $\alpha$ 1, 6Glc) і рафіноза (Gal $\alpha$ 1, 6Glc $\beta$ 1, 2DFrucf) мають у 4 рази слабші властивості інгібітора, ніж лактоза. Лектин також взаємодіє з дисахаридами глюкози (мальтоза, гентіобіоза, трегалоза), однак їхня активність складає лише 1—2 % інгібіторної сили D-галактози.

Серед глікопротеїнів фалолізін найкраще взаємодіє з овомукоїдом і його асіалопохідним та групоспецифічними речовинами крові. Фетуїн,  $\alpha$ -2-макроглобулін,  $\alpha$ -глікопротеїн, імуноглобулін G, муцин підщелепної залози бика слабо пригнічували активність фалолізіну. Таким чином, на відміну від лектинів близьких видів *A. muscaria* та *A. rubescens* [4] фалолізін не надає явної переваги у взаємодії з глікопротеїнами O-гліканного типу над такими N-гліканного типу.

Поки що не цілком зрозумілими є функції гемолітичних лектинів у живих організмах та перспективи їхнього практичного застосування. Однак неоднакова чутливість еритроцитів різних видів до гемолітичного впливу зазначених лектинів дозволяє припустити селективну чутливість інших клітин. На підтвердження цього припущення існують дані про вищу токсичність фалолізіну стосовно лейкозних клітин лінії L1210 мишей, ніж до нормальних клітин [4].

**Висновки.** Проведені дослідження свідчать про те, що фалолізін у присутності захисних макромолекул, гідродинамічний діаметр яких більший за 2,3 нм, не проявляє гемолітичних властивостей. Двовідсоткові розчини ПЕГ, м. м. яких більша за 1350 Да, пригнічують гемоліз, але не аглютинацію фалолізіном еритроцитів, що дозволяє вивчати його вуглеводну специфічність. Проведене за цих умов вивчення вуглеводної специфічності фалолізіну виявило, що він найкраще взаємодіє з D-галактозою і її  $\beta$ -похідними. Визначено, що фалолізін при взаємодії з глікопротеїнами не надає явної переваги сполукам O-гліканного типу над такими N-гліканного типу.

V. O. Antonyuk

Study on carbohydrate specificity of hemolytic lectin from death-cap mushroom (*Amanita phalloides* (Vaill. Fr.) Secr)

#### Summary

*Purification and some physical and chemical properties of a hemolytic lectin from death-cap mushroom (A. phalloides (Vaill. Fr.) Secr) are described. According to the SDS-PAGE data, the polypeptide chain of phallolysin consists of one component with molecular weight of approximately 18 kDa. The molecular weight of the lectin as determined by gel filtration on Toyopearl HW-55 is*

*35 kDa. Phallolysin is thermolabile, the heating during 30 min at 65 °C removes completely its hemolytic and hemagglutinating activity. Phallolysin is not Ca<sup>2+</sup>-dependent lectin. The sensitivity of erythrocyte of different species to the hemolysis decreases in the following sequence: rabbit > rat > man. Osmotic protection experiments were performed using rabbit erythrocytes. When the erythrocytes were incubated together with phallolysin in the presence of polyethylene glycols of different molecular weight, the lysis was inhibited increasingly as the size of the molecules increased. The obtained results indicate that phallolysin forms ion-permeable pores with a functional diameter smaller than 2.3 nm (but bigger than 1.6 nm) in the cell membranes of rabbit erythrocytes. At the same time the presence of polyethylene glycols does not influence the hemagglutinating activity that allows to study carbohydrate specificity of the death-cap mushroom lectin. The lectin interaction with D-galactose and its  $\beta$ -derivatives is the strongest as revealed by study on carbohydrate specificity of phallolysin. The data on the phallolysin interaction with glycoproteins do not show any preference towards either N- or O-glycan type.*

*Key words: Amanita phalloides, phallolysin, hemolysis, osmotic protection, carbohydrate specificity.*

В. А. Антонюк

Изучение углеводной специфичности гемолитического лектина бледной поганки (*Amanita phalloides* (Vaill. Fr.) Secr)

#### Резюме

*Описаны очистка и некоторые физико-химические свойства гемолитического лектина фаллолизина A. phalloides (Vaill. Fr.) Secr. Согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии DS-Na фаллолизин состоит из полипептидов с молекулярными массами (м. м.) около 18 кДа. М. м. этого лектина, определенная геле-фильтрацией на Toyopearl HW-55, составила 35 кДа. Фаллолизин термолабилен, прогревание в течение 30 мин при температуре 65 °C полностью лишает его гемолитических и гемагглютинирующих свойств. Эти активности не зависят от присутствия ионов кальция. Чувствительность эритроцитов к гемолитическому действию фаллолизина уменьшается в ряду: кролик > крыса > человек. Эксперименты по осмотической защите выполнены на эритроцитах кролика. При инкубации эритроцитов с фаллолизином в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ) разной м. м. скорость лизиса уменьшалась по мере увеличения размера молекулы ПЭГ. Полученные результаты указывают на то, что фаллолизин в мембранах эритроцитов формирует ионопроницающие поры, функциональный диаметр которых меньше 2,3 нм (но больше 1,6 нм). В то же время присутствие ПЭГ не влияет на его гемагглютинирующую активность и позволяет изучать углеводную специфичность этого лектина бледной поганки. Изучение углеводной специфичности фаллолизина выявило, что он лучше всего взаимодействует с D-галактозой и ее  $\beta$ -производными. Установлено, что фаллолизин при взаимодействии с гликопротеинами не отдает явного предпочтения O-гликанам по сравнению с N-гликанами.*

*Ключевые слова: Amanita phalloides, фаллолизин, гемолиз, осмотическая защита, углеводная специфичность.*

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вассер С. П. Флора грибов Украины. Аманитальные грибы.—Киев: Наук. думка, 1992.—168 с.
2. Seeger R. Demonstration and isolation of phallolysin hemolytic toxin from *Amanita phalloides* // Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.—1975.—287.—P. 277—287.
3. Lutsik-Kordovsky M. D., Antonyuk V. A., Stasyk T. V.,

- Yakymovych M. Ya, Yakymovych L. A., Hellman U., Soushelriytsky S., Stoika R. S., Lutsik A. D.* Hemagglutinating lectin from fruit bodies of *Amanita phalloides*: isolation, properties and biological activity: Abstr.—Portsmouth: Univ. press, 1999.—P. 77.
4. *Lutsik-Kordovsky M. D., Stasyk T. V., Stoika R. S.* Analysis of cytotoxicity of lectins and non-lectin proteins from *Amanita mushrooms* // Эксперим. онкология.—2001.—23, № 1.—С. 43—45.
  5. *Hatakeyama T., Kohzaki H., Nagatomo H., Yamasaki N.* Purification and characterization of four Ca<sup>2+</sup>-dependent lectins from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* // J. Biochem.—1994.—116.—P. 209—214.
  6. *Roch P., Canicatti C., Valembois P.* Interaction between earthworm hemolysins and sheep red blood cell membranes // Biochim. et Biophys. Acta.—1989.—2.—P. 193—198.
  7. *Tateno H., Goldstein J. 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.—P. 40455—40463.
  8. *Kouriki-Nagatomo H., Hatakeyama Тю, Jelokhani-Niaraki M., Kondo M., Ehara 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.—P. 1279—1284.
  9. А. с. СССР № 1554961. Способ получения аффинного сорбента для очистки лектинов / В. А. Антоноук // Б. И.—1990.—№ 13.
  10. *Маурер Г.* Диск-электрофорез.—М.: Мир, 1971.—102 с.
  11. *Kabat E. A., Mayer M. M.* Experimental Immunochimistry.—Illinois: Charles Thomas Publ., 1964.—690 p.
  12. *Лазурьевский Г. В., Терентьева И. В., Шамшурич А. А.* Практические работы по химии природных соединений.—М.: Высш. школа, 1966.—336 с.
  13. *Методы химии углеводов* / Под ред. Н. К. Кочеткова.—М.: Мир, 1967.—512 с.
  14. *Луцкич А. Д., Детюк Е. С., Луцкич М. Д.* Лектины в гистохимии.—Львов: Изд-во Львов. ун-та, 1989.—144 с.
  15. *Scherrer R., Gerhardt P.* Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast // J. Bacteriol. 1971.—107.—P. 718—735.
  16. *Nagahama M., Hayashi S., Morimitsu S., Sakurai J.* Biological activities and pore formation of *Clostridium perfringens* beta toxin in HL 60 cells // J. Biol. Chem.—2003.—278.—P. 36934—36941.

УДК 547.963.1:543.9  
Надійшла до редакції 25.11.04