



Национальная Академия Наук Украины
Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного
г. Киев, Украина

Лектины сапрофитных микроорганизмов

Подгорский В.С.

Красноярск
12-15 июня 2012 г.

Развитие исследований лектинов

1888-1954 растительные белки, которые склеивают эритроциты – фитогемаглютинины

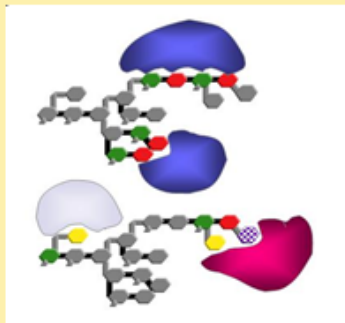
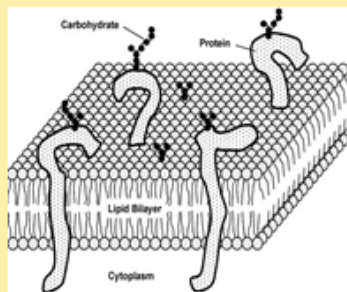
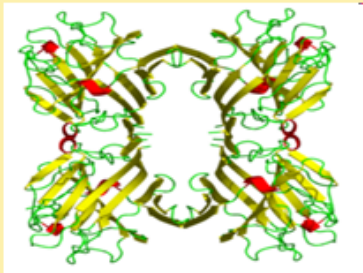
1908 по настоящее время исследование лектинов патогенных микроорганизмов

1954-1980 тотально распространенные в природе лектины от вирусов до человека

1980-2012 акцент на изучение лектинов животных и человека, выполняющих важные физиологические функции

1985 по настоящее время лектины сапрофитных микроорганизмов (**ИМВ НАНУ**)

Основные фундаментальные направления исследования лектинов

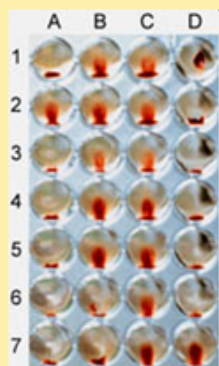


- Классификация, структура, расшифровка гликокода
- Защитная роль и участие в стрессовом ответе
- Взаимодействие с компонентами внутренней и внешней среды
- Механизмы действия

Действие лектинов

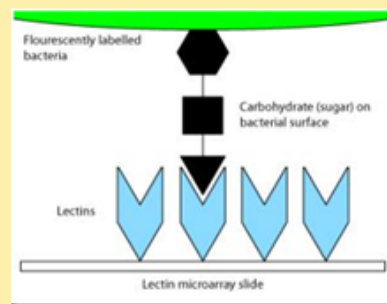
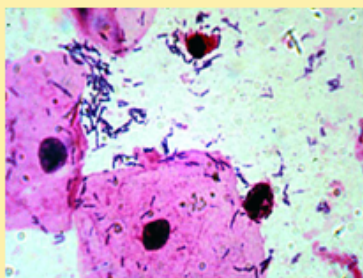
Прямое

Агглютинация



Преципитация

Адгезия



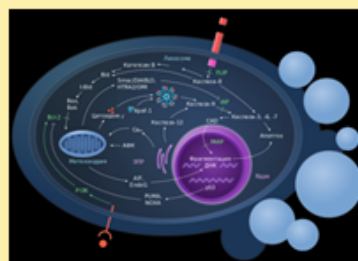
Опосредованное

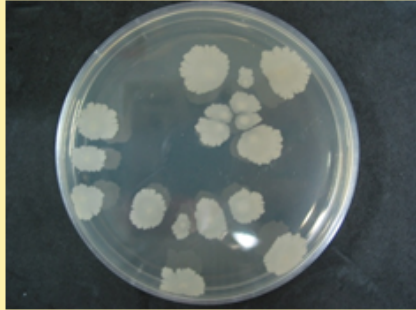
Сигнальные сети

Митогенная стимуляция

Апоптоз

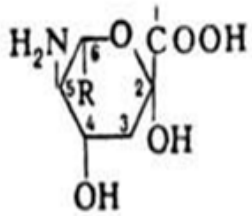
Транскрипция





Свойства внеклеточных лектинов сапрофитных штаммов бактерий рода *Bacillus*

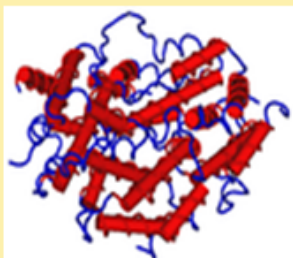
- Термостабильные, металлонеинзависимые гликопротеины с молекулярной массой 40-50 кДа, устойчивые к действию рН, детергентов и длительному хранению
- Высокая гемагглютинирующая активность:
8192-65536 гемагглютинирующих единиц
- Редкая углеводная специфичность:
сиаловые кислоты и сиалосодержащие гликоконъюгаты



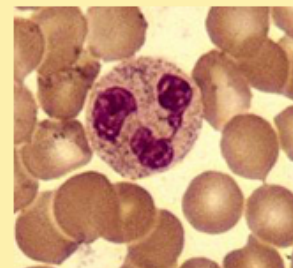
**Внеклеточные лектины
бацилл узнают определенные
сиалосодержащие
олигосахаридные структуры**

**Степень их сродства к ингибиторам
уменьшается в следующем порядке :**

**N-гликолилнейраминовая кислота →
α-изомер O-ацетилированной формы
N-ацетилнейраминовой кислоты →
Neu5Acα2-6 →
Neu5Acα2-3 →
Neu5Acα2-8 – остатки кислоты**



Интерферониндицирующее действие лектинов сапрофитных бактерий



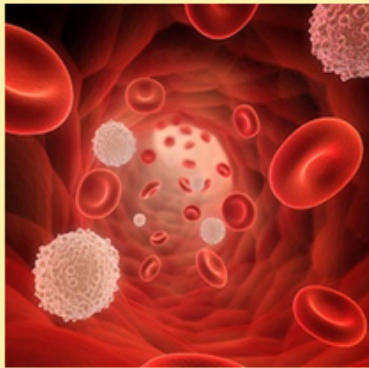
Сиалоспецифичные лектины *бацилл* являются индукторами синтеза природного гамма-интерферона, сравнимыми по своей активности с коммерческими препаратами растительных лектинов

Отсутствие токсических и аллергических эффектов позволяет рекомендовать их для широкого применения в медицине и ветеринарии

Разработана технология получения лектина сапрофитного штамма *бацилл* для индукции синтеза человеческого и животного гамма-интерферона

В 2000 г. в Канаду продана «Лицензия на технологию получения интерферона для лечения и профилактики заболеваний сельскохозяйственных животных (крупного рогатого скота, свиней и других)» с использованием внеклеточного сиалоспецифичного лектина сапрофитного штамма *бацилл*





Иммуномодулирующее влияние лектинов сапрофитных бактерий

Лектины бацилл имеют выраженный и дифференцированный иммуномодулирующий эффект на отдельные уровни иммуногенеза от изменения функционального состояния полипотентной стволовой клетки костного мозга до активации специфических реакций Т- и В-лимфоцитов и их кооперативного взаимодействия в иммунном ответе

Эти свойства представляют интерес с точки зрения управляемой иммунодепрессии и иммуностимуляции

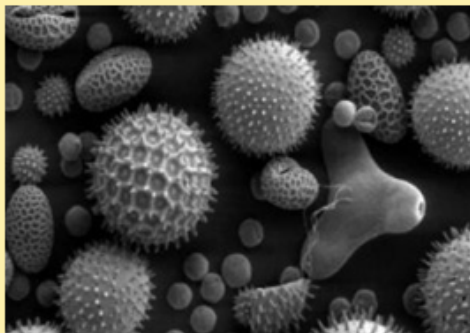


Противоопухолевая активность лектинов сапрофитных бактерий

Лектины бацилл обладают селективным воздействием на опухоли различного генеза

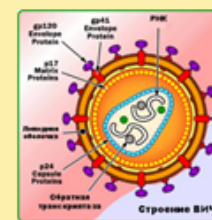
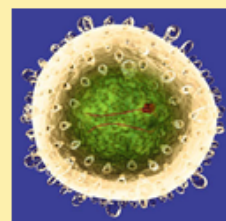
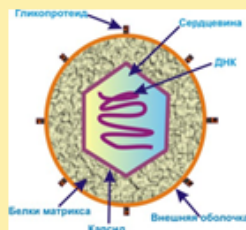
Для большинства лектинов характерно торможение роста опухолей (Карциномы Уокера, Лимфосаркомы Плисса, Саркомы 45, Саркомы 180 и Аденокарциномы молочной железы), которое равно или превышает критерий значимости (50%). В отдельных случаях отмечена стимуляция роста некоторых опухолей до 15,0 %

Такие неоднозначные результаты можно объяснить количественными и качественными различиями в структуре сиалосодержащих рецепторов клеточной поверхности при злокачественной трансформации, что является индивидуальной характеристикой каждого типа опухоли



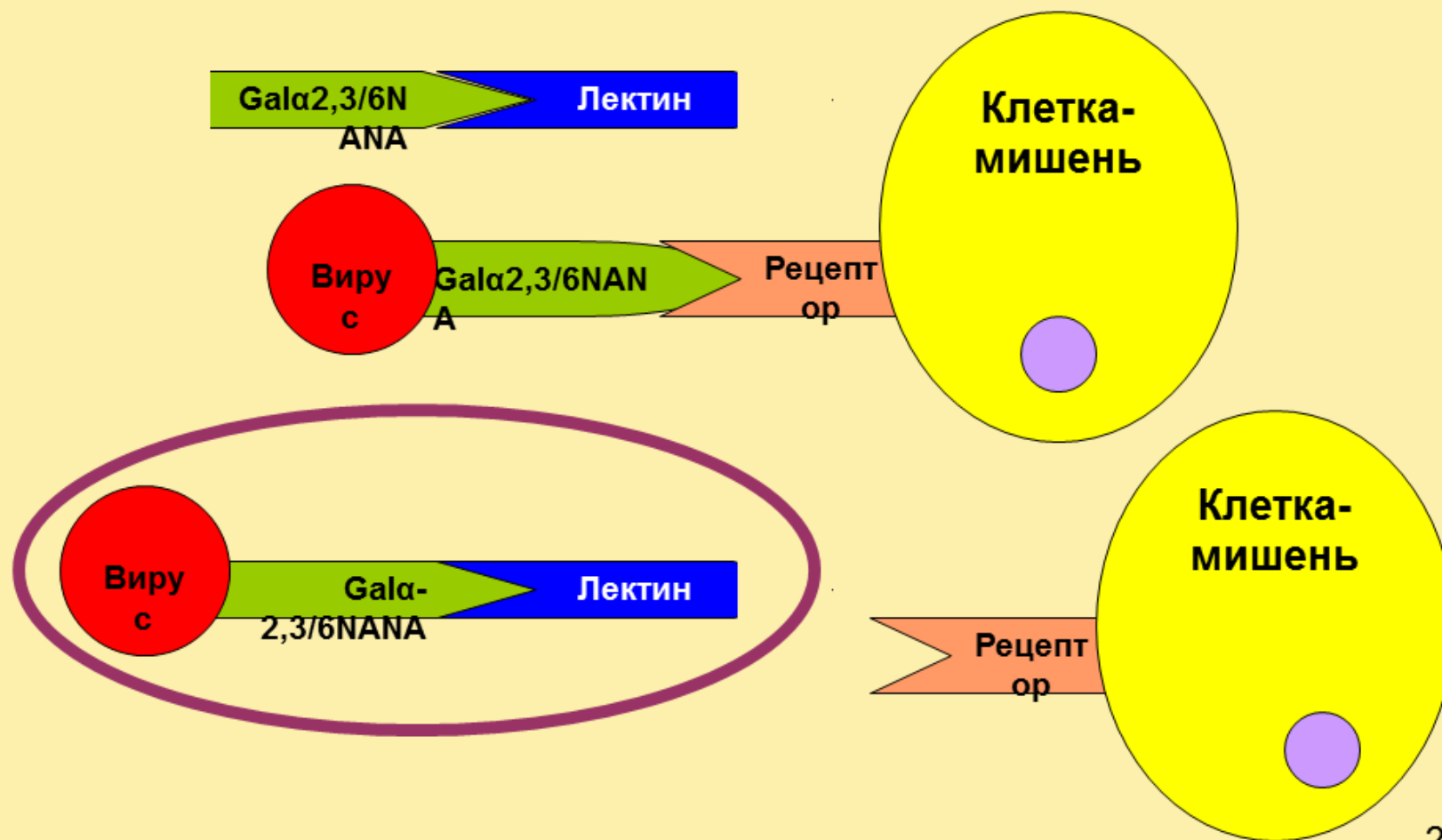
Антивирусная активность внеклеточного лектина штамма *Bacillus subtilis* IMB B-7014

Бактериальный лектин является активным ингибитором адсорбции и репродукции вирусов гриппа, герпеса 1 и 2 типов, гепатита С и ВИЧ



Лектин препятствует возникновению и развитию инфекционного процесса, не проявляет токсических свойств, не имеет мутагенных и пролиферативных активностей, не вызывает привыкания к нему вирусов и имеет принципиально новый механизм действия

Схема механизма antiviralного действия лектина штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7014





На основе активной субстанции внеклеточного лектина сапрофитного штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7014 создана **лекарственная форма: препарат ЛЕКТИВИР** (таблетки, покрытые кишечнорастворимой капсулой, 12,5 мг)

Доклинические испытания препарата **ЛЕКТИВИР** подтвердили его эффективность при заболеваниях гриппом, герпесом, гепатитом С и ВИЧ/СПИД

При клинической апробации продемонстрирована высокая эффективность препарата при лечении поражений нервной системы и кожных покровов герпесвирусной этиологии различной степени тяжести, более выраженная при монотерапии

Субстанция и препарат **ЛЕКТИВИР** для профилактики и лечения инфекций, вызванных вирусами герпеса, зарегистрированы МЗ Украины в 2006 г.

ЛЕКТИВИР рекомендуется также для использования при профилактике и лечении заболеваний гриппом, гепатитом С и ВИЧ/СПИД

ГИПОТЕЗА

Молекула внеклеточного лектина
штамма *Bacillus subtilis* ИМВ

В-7014 построена из двух
субъединиц:

А – 25 кДа и В – 10 кДа

Теоретически субъединицы могут
образовывать пять изоформ:

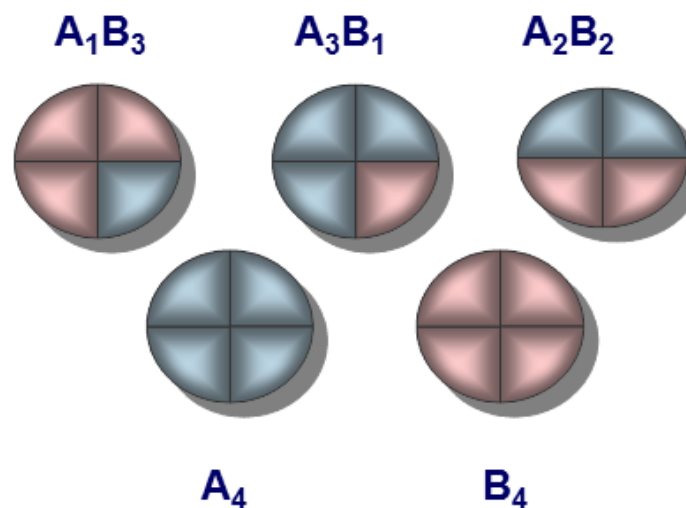
A_4 – 100 кДа

B_4 – 40 кДа

A_1B_3 – 55 кДа

A_2B_2 – 70 кДа

A_3B_1 – 85 кДа





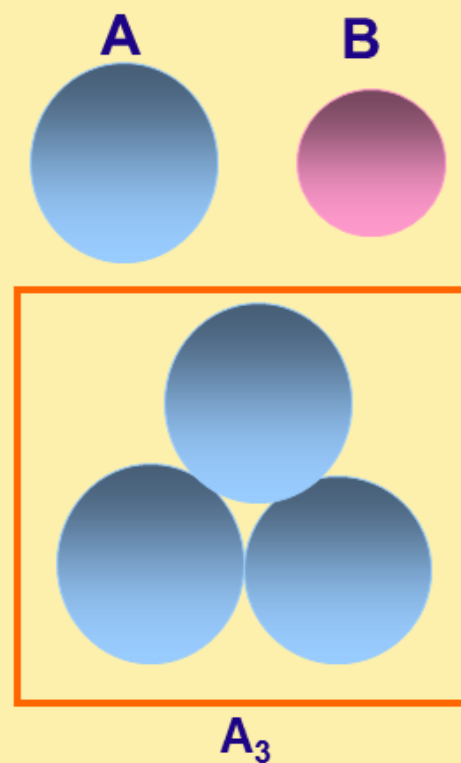
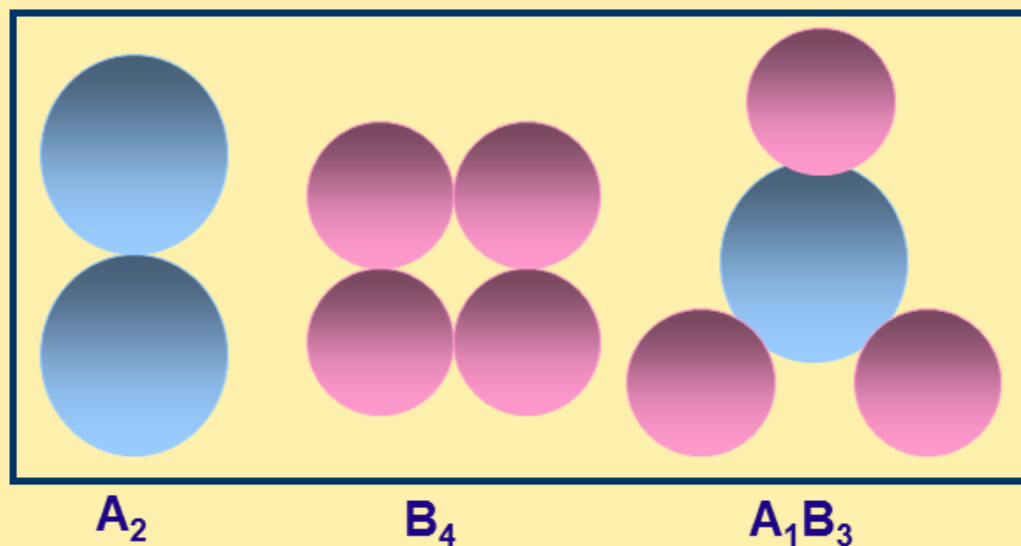
Характеристика изоформ лектина штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7014

Свойства		Изоформа		
		Кислая	Промежуточная	Щелочная
Структура		гомодимер А2	гомотетрамер В4	гетеротетрамер А1В3
Молекулярная масса		50 кДа	40 кДа	55 кДа
Заряд		(–)	(±)	(+)
рН		2,5 – 3,0	6,0 – 6,5	8,5 – 9,0
Макси- мальная ГАА	кроль	реакция отсутствует	16 ГАЕ	1024 ГАЕ
	баран	512 ГАЕ	реакция отсутствует	реакция отсутствует
Углеводная специфичность		муцин	Н-ацетилнейрами- новая кислота	сиалолактоза

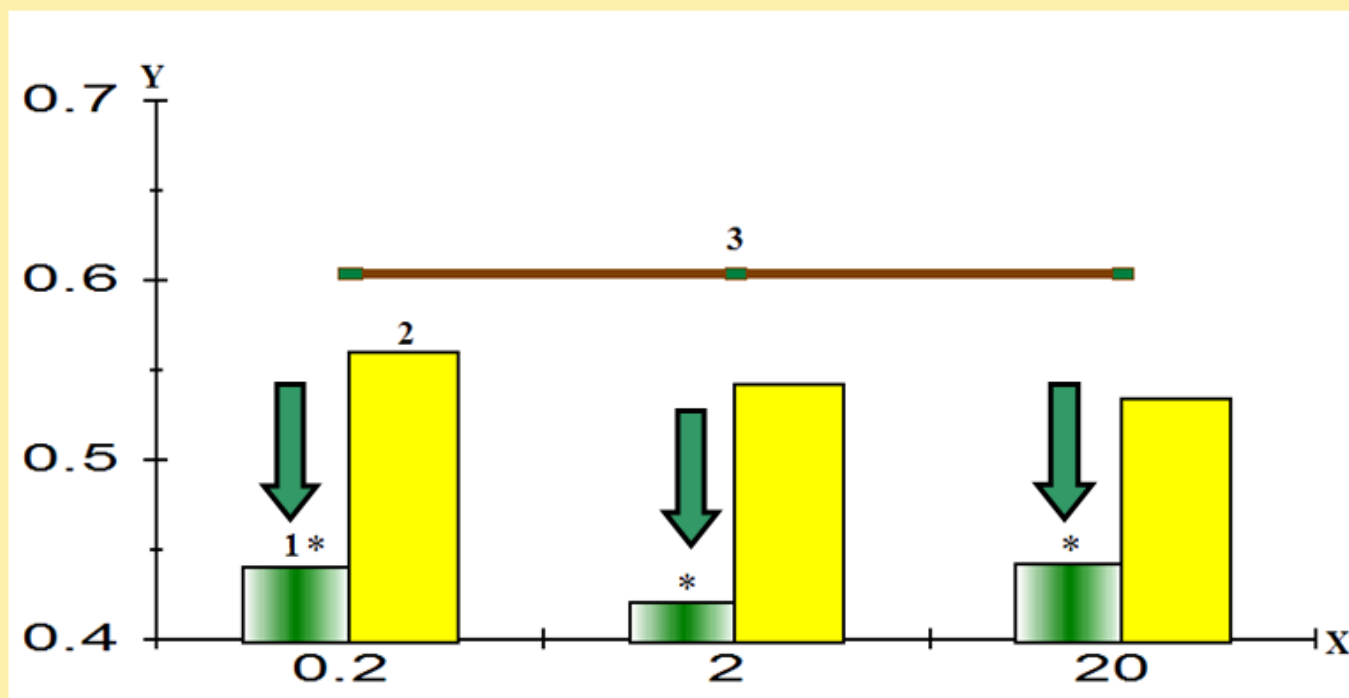
Бациллярный лектин, также как и лектины растительного и животного происхождения представлен изоформами с разными физико-химическими и биологическими свойствами

При получении субстанции лектина выявлено три изоформы лектина; при изменении условий культивирования штамма обнаружена его четвертая изоформа

Молекула лектина построена из двух субъединиц: А – 25 кДа и В – 10 кДа



Изоформа A_2 проявляет выраженный цитостатический эффект на раковые клетки HeLa



1 – изоформа A_2 , 2 – изоформа A_1B_3 , 3 – контроль;

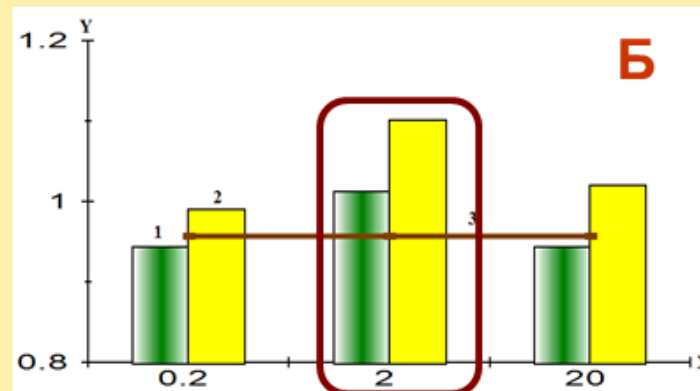
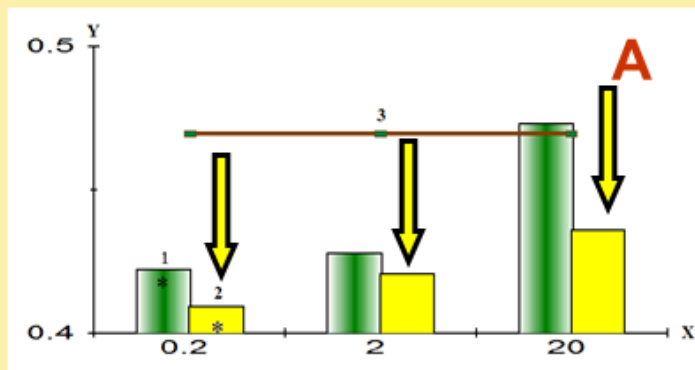
X – концентрация препарата, мкг/мл; Y – абсорбция, 570 nm

* – достовірні відхилення від контролю ($p < 0,05$)

Изоформа A_1B_3 оказывает цитостатическое действие на

А – нормальные клетки (первичные фибробласты мыши) и

В – стимулирует пролиферацию клеток китайского хомячка

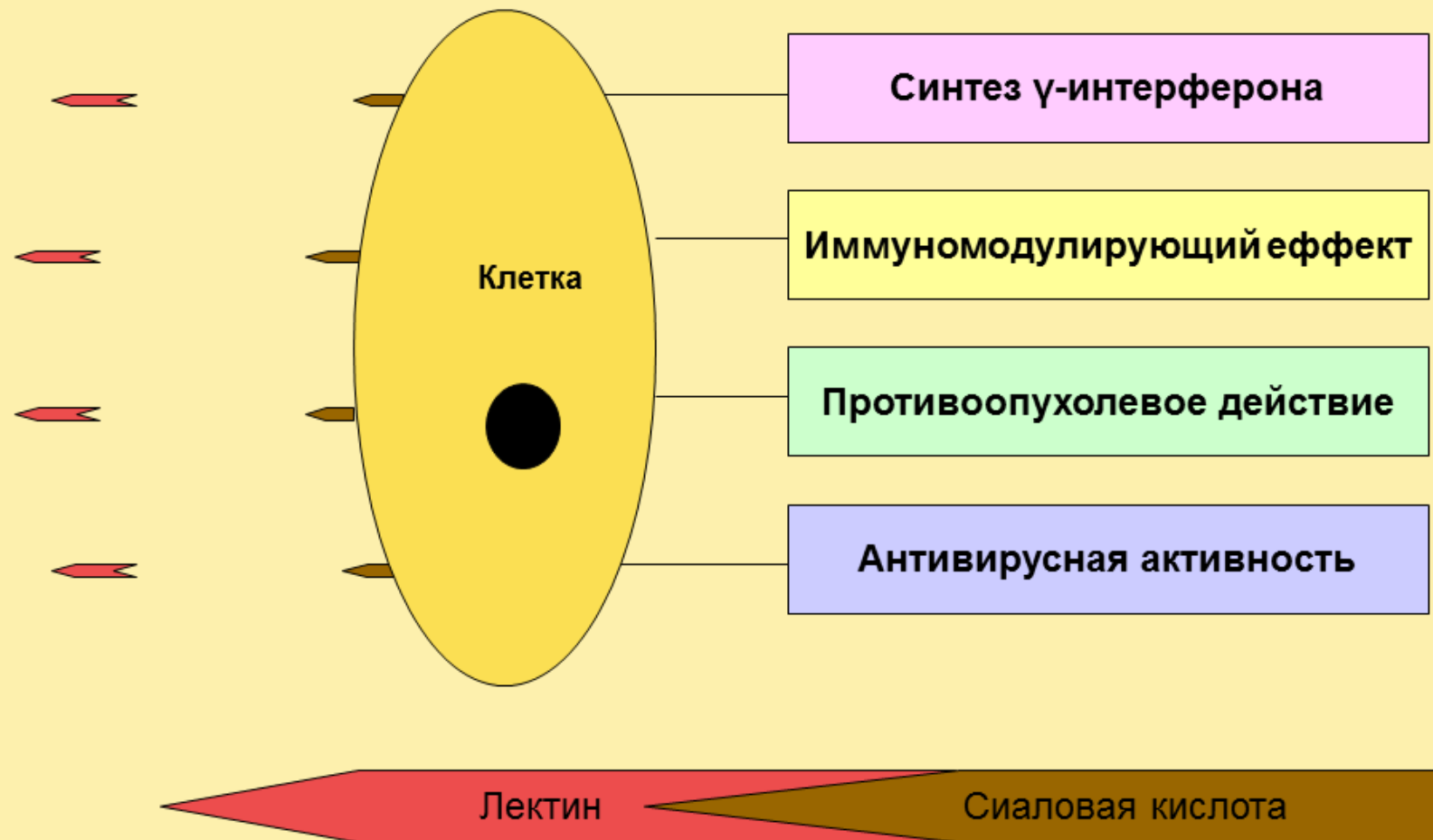


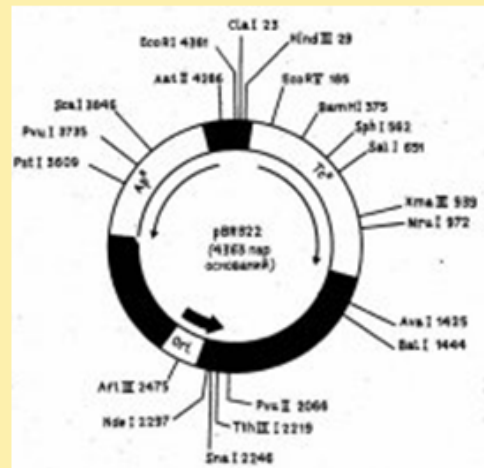
1 – изоформа A_2 , 2 – изоформа A_1B_3 , 3 – контроль;

X – концентрация препарата, мкг/мл; Y – абсорбция, 570 nm

* – достоверные отклонения от
контроля ($p < 0,05$)

Медико-биологические свойства внеклеточных лектинов сапрофитных штаммов бактерий рода *Bacillus*

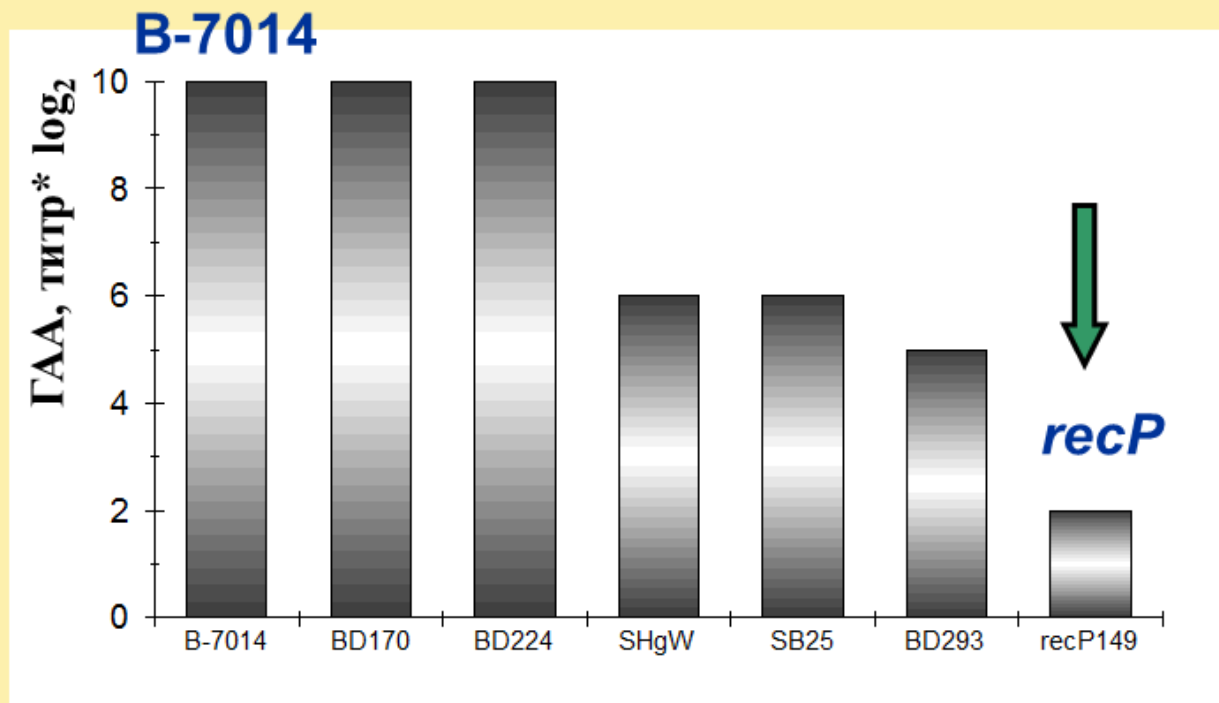




Геном *Bacillus subtilis* полностью секвенирован (1997 г.) и содержит более 5,5 тысяч последовательностей, кодирующих белки. Однако, гены лектинов бацилл не установлены

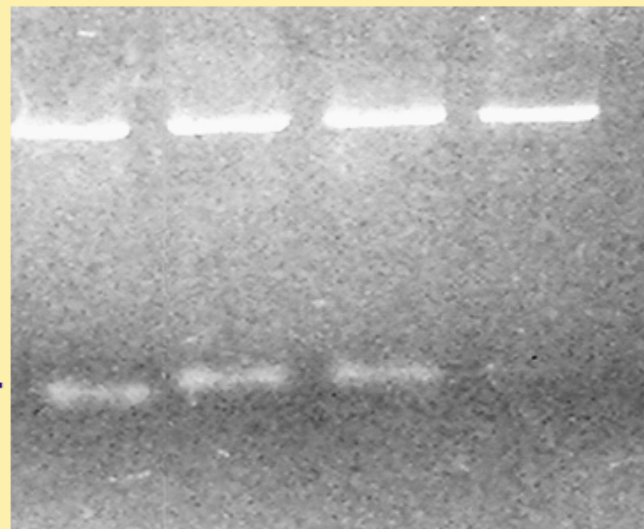
С использованием репарационно-дефектных мутантов выявлено влияние функционального состояния генов репаративной системы клетки этих бактерий на способность синтезировать лектины

Лектиновая активность бацилл непосредственно зависит от продукта гена *recP*, который относится к системе пострепликативной репарации и рекомбинации



ДНК матрица

РНК транскрипт



К 1 2 3

Изоформы:

1 – кислая

2 –промежуточная

3 – щелочная

К – контроль без
лектина

Изучение продуктов транскрипции *in vitro* в системе РНК-полимеразы фага Т7 выявило отличия изоформ лектина *Bacillus subtilis* ИМВ В-7014 и показало, что одной из мишеней является процесс ДНК-зависимого синтеза РНК

Проведенные многоплановые исследования лектинов сапрофитных бактерий соответствуют концепции о причастности углеводсвязывающих белков - лектинов к активации широкого спектра защитных реакций на уровне клетки и организма

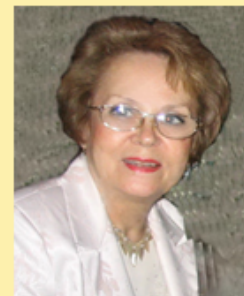


Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины



В.С. ПОДГОРСКИЙ
академик НАН Украины, д.б.н., профессор,
директор института

Э.А. КОВАЛЕНКО
д.б.н., с.н.с.



ГП «Институт эпидемиологии и инфекционных заболеваний им. Л.В. Громашевского» АМН Украины



С.Л. РЫБАЛКО
д.м.н., профессор,
зав. лабораторией контроля
качества иммуно-биологических
препаратов

Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины



Н.И. ШАРЫКИНА
д.м.н., профессор,
зав. отделом онкофармакологии



Благодарю за внимание!