ISSN 0233-7657. Біополімери і клітина. 2003. Т. 19. № 3

Дослідження модифікуючого впливу лектинів на токсичність і мутагенність іонів Ni(II) в культурі *Bacillus subtilis*

І. С. Карпова, Н. В. Корецька

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Порівнювали чутливість rec^+ та rec^- штамів B. subtilis до токсичної дії іонів Ni(II) після попередньої обробки клітин розчинами лектинів рослинного (ConA, LAA, PHA, STA, WGA, SNA, VAA), тваринного (HPA) та мікробного (екзолектин B. subtilis) походження. Для шести лектинів, які різняться за структурою, фізико-хімічними властивостями та вуглеводною специфічністю, показано здатність до повного або часткового захисту клітин від ушкоджуючого впливу Ni(II) в ряду ConA = STA > PHA-P = LAA > PHA-L > SNA. Протекторний ефект проявлявся лише у rec^+ штаму. Три лектини захисної дії не виявили. Тестування антимутагенної дії препаратів PHA-P та PHA-L за зниженням частоти trp^+ реверсій показало наявність ефекту при попередній обробці та при післядії лектину і відсутність його при одночасному внесенні лектину та $NiCl_2$ в бактеріальну культуру. Висловлено припущення, що при здійсненні протекторної та антимутагенної дії лектинів активується репаративна система клітини.

Вступ. В умовах сучасної екологічної ситуації першочерговим завданням генетики є захист геному, що передбачає досконалне розуміння закономірностей і механізмів впливу на мутаційний процес та на можливість керувати цим процесом. Адаптація організму людини до зростаючого забруднення довкілля токсичними речовинами обумовлена генетично, але вона не може повністю забезпечити знешкодження шкідливих факторів. Актуальність проблеми антимутагенезу також посилюється спільністю рис механізмів мутагенезу і канцерогенезу. В разі дефектності генів, які відповідають за рівень детоксикації та репарації, чутливість до мутагенів та ризик канцерогенезу значно підвищуються. Згідно з фундаментальними уявленнями, мутація є багатостадійним процесом, де пошкодженню ДНК протистоїть робота еволюційно закріпленої системи репарації [1, 2], на ефективність якої можуть впливати речовини-антимутагени. Серед речовин з протекторними і антимутагенними властивостями перевага надається препаратам природного походження, особливо таким, які діють безпосередньо на рівні репарації ДНК, — репарогенам. Перспективними в цьому відношенні можуть бути лектини — білки, які зв'язують вуглеводи та мають широкий спектр біологічної дії. Останнім часом ці речовини привертають увагу фармакологів як потенційні антивірусні, антибактеріальні та протипухлинні препарати [3, 4]. Лектини відомі як мітогенні фактори, що здатні активізувати процеси транскрипції та реплікації ДНК [5]. Проте їхній генетичний вплив досі практично не досліджений. В літературі є лише окремі повідомлення про антимутагенну дію лектину квасолі звичайної (PHA) [6] та бузини чорної (SNA) [7].

Мета нашої роботи полягала в створенні тест-системи з урахуванням генетично обумовленої здатності до репарації для оцінки протекторних та антимутагенних властивостей лектинів як нових засобів захисту геному.

Модельним мутагеном були іони Ni(II), які є шкідливим фактором виробництва з канцерогенним ефектом [8]. Розчинні і нерозчинні сполуки нікелю ($NiCl_2$, $NiSO_4$, Ni_3S_2, NiS) діють на рівні ДНК, індукуючи одноніткові розриви, а також зшивки ДНК—ДНК та ДНК—білок. При дослідженнях *in*

© І. С. КАРПОВА, Н. В. КОРЕЦЬКА, 2003

vitro виявлено декілька центрів зв'язування Ni(II) з ДНК. Зокрема, високою спорідненістю до Ni(II) відзначаються фосфатні групи ДНК. Можливість застосування прокаріотичних об'єктів для вивчення механізмів генотоксичної та мутагенної дії Ni(II) досліджена мало. В окремих роботах використання цих об'єктів було успішним [9]. У той же час існує думка щодо їхньої недостатньої чутливості до дії Ni(II) [10].

Матеріали і методи. Методичною основою роботи була різна чутливість rec^+ та rec^- штамів *B. subtilis* до токсичних і мутагенних впливів [9, 11]. Іони Ni(II) використано нами у вигляді добре розчинної у воді солі $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ («Реахім», Україна) в діапазоні концентрацій від 0,1 до 1,0 М.

Об'єктом дослідження слугували два ізогенних мутанти *B. subtilis*, зареєстровані в Міжнародній колекції (Колумбус, США) та одержані з лабораторії професора А. А. Прозорова (РАН, Москва): SB25 (hisH2 trpC2) і штам recP з мутацією *rec149*, яка впливає на процес рекомбінації [12].

Бактерії культивували на рідких та агаризованих середовищах згідно з [13, 14]. В усіх експериментах готували стандартизовану суспензію клітин: паспортизовану культуру вирощували на поверхні 3 %-го скошеного агаризованого середовища на основі триптози («Difco», США), змивали буфером Спіцайзена та стандартизували за показниками нефелометра (КФК-2), розводячи до титру $1 \cdot 10^8$.

Як потенційні протектори використано препарати лектинів вітчизняного виробництва («ЛЕКТИНОТЕСТ», Україна), які належали до трьох найпоширеніших класів рослинних лектинів — лектини бобових (лектин дощу золотого — LAA, лектин конвалії мечовидної — ConA, лектин квасолі звичайної — PHA); лектини з доменом, який зв'язує хітин (лектин зародків пшениці — WGA та картоплі — STA); лектини — інгібітори білкового синтезу (SNA — лектини кори бузини чорної, VAA — лектин омели білої). Використано також лектин тваринного походження (HPA — лектин слимака виноградного) та власний екзолектин *B. subtilis*, люб'язно наданий одним із авторів роботи [15] д-ром Коваленко. Крім сумарного препарату PHA-P, який містить п'ять ізоформ, утворених поєднаннями двох типів субодиниць, дослідили окремо PHA-E і PHA-L (складаються відповідно з чотирьох α-субодиниць і чотирьох β-субодиниць).

Протекторну дію лектинів щодо токсичного впливу іонів Ni(II) тестували за методом дифузії в агарі згідно з [9]. Співвідношення компонентів агаризованого середовища підібрали з урахуванням максимального прояву ефекту Ni(II), воно склало: агар — 1,5 %, амінопептид (С.-Петербург, Росія) — 25 %, NaCl — 0,038 М і $MgSO_4$ — 0,1 %.

Солі були вітчизняного виробництва марки осч.

Розчини лектинів у 0,15 М NaCl з концентрацією 200 мкг/мл готували в день експерименту, змішували зі стандартизованою суспензією клітин у співвідношенні 1:1 за об'ємом та інкубували протягом 30 хв при температурі 37 °С. Аліквоти суспензії по 100 мкл висівали на поверхню агаризованого середовища об'ємом 30 мл в чашках Петрі з діаметром 95 мм. Показником чутливості до токсичної дії Ni(II) слугував діаметр зони пригнічення росту, яка виникала в місці нанесення 10 мкл щойно приготовленого розчину Ni(II) на поверхню агару. Зона охоплювала ділянку повної відсутності росту, що свідчило про летальну дію Ni(II) та затриманого росту у присутності металу. Відносну чутливість до дії Ni(II) визначали як відношення діаметра зони пригнічення росту в досліді (+ лектин) по відношенню до контролю (без лектину). Мірою протекторної дії була різниця між діаметрами зон пригнічення росту культури, обробленої та необробленої лектином, у процентах.

Мутагенну-антимутагенну дію тестували за виникненням реверсій від ауксотрофності до прототрофності. Використовували напівтверде (1 %) мінімальне середовище Спіцайзена з додаванням необхідної амінокислоти в кінцевій концентрації 50 мкг/мл. Виживання визначали титруванням оброблених клітин з посівом на повноцінне середовище такого складу: агар (1,5 %), амінопептид, розведений буфером Спіцайзена у співвідношенні 1:3 з додаванням $MgSO_4$ (0,1 %) та глюкози (0,5 %).

Хід експерименту представлено на схемі. Експеримент передбачав реєстрацію спонтанного рівня мутагенезу (варіант 1), впливу на цей процес лектину та Ni(II) окремо (варіанти 2 та 3), а також комбіновану дію цих компонентів: сумісна дія розчину лектину та Ni(II), які з'єднували в епендорфі та активно перемішували на струшувачі (10 с) безпосередньо перед внесенням стандартизованої суспензії клітин (варіант 4); послідовна обробка полягала у внесенні лектину перед Ni(II) (варіант 5) або додаванні лектину після дії Ni(II) (варіант 6).

У зв'язку з необхідністю послідовної дії компонентів весь дослід проводили в два етапи. На першому етапі в усі варіанти досліду додавали стандартизовану суспензію клітин, змішували на струшувачі та інкубували впродовж 15 хв за температури 37 °С. Після цього вносили другий компонент (варіант 5, 6) та відповідний йому об'єм

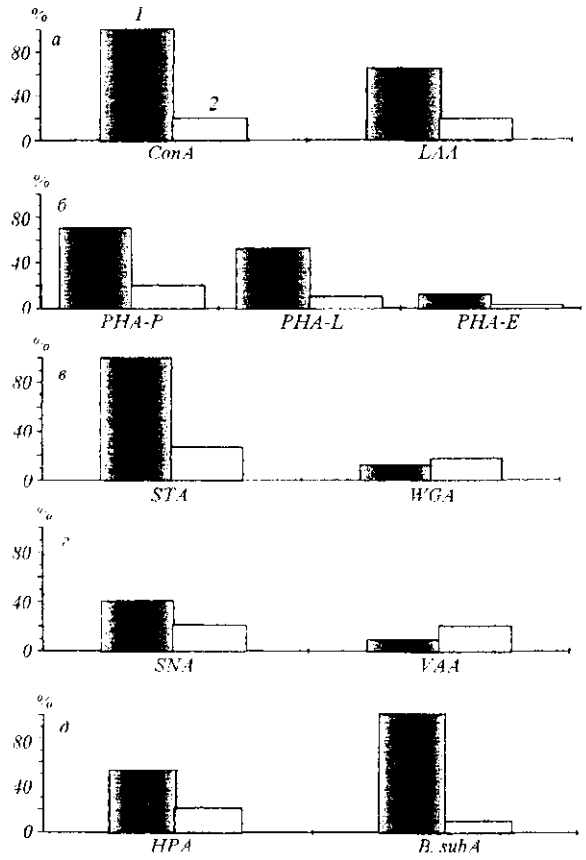
Схема дослідження впливу лектину на мутаційний процес у тест-системі B. subtilis

Розчин	1	2	3	4	5	6
	Контроль (без лектину і Ni(II))	Обробка лектином	Обробка Ni(II)	Сумісна обробка лектином і Ni(II)	Послідовна обробка	
					I — лектином	I — Ni(II)
					II — Ni(II)	II — лектином
	⇓					
	Етап I — змішування компонентів та інкубація протягом 15 хв (37 °C)					
	⇓					
ФГА, мкл	—	40	—	40 (5 хв)	40	—
$NiCl_2$, мкл	—	—	40	40 (5 хв)	—	40
0,15 M NaCl, мкл	400	360	360	320	360	360
Суспензія клітин, $1 \cdot 10^8$, мкл	400	400	400	400	400	400
	⇓					
	Етап II — внесення другого компонента послідовної обробки та відповідного контролю. Змішування та інкубація протягом 15 хв (37 °C)					
	⇓					
ФГА, мкл	—	—	—	—	—	40
$NiCl_2$, мкл	—	—	—	—	40	—
0,15 M NaCl, мкл	40	40	40	40	—	—

розчинника (варіанти 1—4), додатково змішували компоненти та інкубували ще 15 хв. В разі послідовної обробки перший компонент діяв протягом 30 хв, а другий — лише 15 хв. Загальний термін інкубації був обмежений тривалістю клітинного циклу бактерії, який триває 30—40 хв. Таким чином, усі варіанти експерименту здійснені в однакових умовах і відмінності між ними можна було трактувати лише як прояв активності діючих компонентів та результат їхньої взаємодії. Вплив реагентів припиняли розведенням культури мінімальним буфером Спіцайзена та висівали паралельно на селективне середовище для вияву ревертантів, кількість яких підраховували через 48—72 год. Загальну кількість життєздатних клітин визначали прямим підрахунком колоній на повноцінному середовищі після 18—20 год росту при температурі 37 °C. Достовірність результатів оцінювали за критерієм Ст'юдента в електронній версії.

Результати і обговорення. При дослідженні генотоксичного ефекту іонів Ni(II) на культуру *B. subtilis* виявилося, що у великій мірі він залежить від компонентів культурального середовища, особливо від вмісту глюкози, яка могла мати самостійний протекторний вплив. Тому дослідження протекторної дії дев'яти рослинних лектинів, одного тваринного та одного бактеріального препаратів проводили за методом дифузії в агарі на повноцінному середовищі без додавання глюкози. На рисунку одержані результати згруповані згідно зі структурними особливостями лектинів. Усі лектини бобових дуже подібні і мають центр, який зв'язує метали. Найефективнішим протектором серед них виявився манозо/глюкозоспецифічний ConA. Цей лектин, у структурі якого відсутній вуглеводний компонент, мав здатність повністю знімати токсичний ефект Ni(II). Дещо меншу (60—70 %), але вірогідну протекторну активність виявили фукозоспецифічний LAA та PHA-P, що має специфічність до олігосахаридів. Підтвердилося зроблене раніше спостереження стосовно різної протекторної дії сумарного препарату та окремих ізоформ лектину квасолі звичайної [16]: PHA-P > PHA-L > PHA-E. Отже, за винятком PHA-E, препарати лектинів бобових виявили вірогідний протекторний ефект. Чутливим до такої протекторної дії виявився лише rec^+ штам з непошкодженою системою рекомбінації/репарації. У випадку recP мутанта незначні відхилення від контролю були невірогідними.

Два досліджених нами лектини, які зв'язують хітин, — STA та WGA — мали однакову вуглеводну специфічність до N-ацетил-D-галактозаміну, що не вплинуло на їхню здатність протидіяти токсичному впливу Ni(II). Так, лектин картоплі (STA) виявився сильним протектором, який подібно до ConA повністю знімав ефект важкого металу у rec^+



Протекторний вплив лектинів щодо токсичної дії іонів Ni(II) (500 мМ) (по осі ординат — зменшення зони пригнічення росту культури в досліді (з лектином) по відношенню до контролю (без лектину)): *1* — штам SB25 (rec^+); *2* — штам recP (rec^-) (*а* — лектини бобових; *б* — ізоформи PHA; *в* — лектини, які зв'язують хітин; *г* — лектини — інгібітори білкового синтезу (RIP-2); *д* — лектини нерослинного походження)

штаму. В аналогічних умовах лектин зародків пшениці (WGA) не виявив протекторного впливу. За структурою ці лектини є гомодимерами з молекулярною масою субодиниць 50 та 36 кДа без вираженого центра, який зв'язує метал. Проте серед усіх інших досліджених лектинів STA вирізняється значним вмістом вуглеводів (до 50 %) у складі молекули, що може позначитися на його протекторних властивостях. Обидва досліджених нами лектини — інгібітори білкового синтезу (RIP-2) з різною вуглеводною специфічністю за стуктурою належать до хімеролектинів, де одна субодиниця є власне лектином, а інша має ферментативну активність [4].

Сіалоспецифічний лектин кори бузини чорної (SNA) виявив вірогідну протекторну дію щодо Ni(II) на rec^+ штамі, якої зовсім не мав лектин омели білої (VAA), специфічний до N-ацетил-D-галактозаміну. Цікаво, що тільки представники даного класу виявили тенденцію до захисту rec^- культури, проте ефект не перевищував 20 %.

Отже, з дев'яти тестованих нами препаратів рослинного походження шість мали протекторну дію відносно Ni(II) в ряду ConA = STA> PHA-P = = LAA > PHA-L > SNA, а три препарати такої активності не мали. Протекторними властивостями володів також препарат тваринного походження, одержаний з гомогенату тканин слимака виноградного (HPA). Він має структуру гексамера з молекулярною масою субодиниці 79 кДа і специфічний до N-ацетил-D-галактозаміну. HPA діяв аналогічно рослинним лектинам на rec^+ штам, зменшуючи зону пригнічення росту за присутності Ni(II) на 50 %.

Ефективним протектором виявився також сіалоспецифічний екзолектин *B. subtilis*, який на генетичному рівні повністю нейтралізував шкідливу дію важкого металу. В межах проведеного дослідження більшість лектинів виявили протекторні властивості незалежно від джерела (бактерія, рослина, тварина), вуглеводної специфічності, молекулярної маси (30—474 кДа) та четвертинної структури. Так, лектин *B. subtilis* є мономером, STA — гомодимером, ConA, PHA-L та PHA-E — гомотетрамерами, LAA та SNA — гетеротетрамерами, PHA-P — сумарним препаратом і HPA — гомогексамером. Загальною рисою лектинів-протекторів була залежність їхньої дії від генотипу мутанта (rec^+), а саме — неушкодженого стану системи репарації/рекомбінації. Треба також відмітити, що ці лектини, особливо лектини бобових, є ефективними мітогенами. Лектини, які не проявили протекторної дії, були представниками різних класів рослинних лектинів та мали різну вуглеводну специфічність. Можливо, невипадково, що даним лектинам у стандартних умовах не притаманна мітогенна активність. WGA є відомим антимітогеном і може зупиняти бласттрансформацію, спричинену іншими лектинами [5]. Для VAA показано участь в активації апоптозу — процесу, протилежному мітозу [17].

Другу частину даної роботи присвячено дослідженню здатності лектинів впливати на індукований Ni(II) мутаційний процес за тестом реверсій від ауксотрофності до прототрофності (схема). З двох розглянутих ауксотрофних маркерів — *hisH2* і *trpC2* — перший відзначався високим спонтанним рівнем ревертування, який суттєво не змінювався при індукованому мутагенезі, що можна

Модифікуюча дія лектину квасолі звичайної (PHA) на ревертабельність культури B. subtilis SB25 rec⁻, обробленої іонами Ni(II)

№ варіанта	Виживання на повноцінному середовищі		Число trp^+ ревертантів на чашку	
	Абсолютне число колоній $\cdot 10^6$	Відсоток до контролю	Абсолютне число	Кратність до контролю
	Експеримент 1			
1. Контроль (без лектину і Ni(II))	170,00±8,50	—	0,50±0,50	—
2. Обробка лектином (PHA-P)	255,00±12,75*	150,00	4,00±3,00	8,0
3. Обробка Ni(II)	106,00±0,05*	62,35	18,00±1,00*	36,0
5. Послідовна обробка: I — PHA-P, II — Ni(II)	128,50±12,34*	75,59	1,00±0,05**	2,0
	Експеримент 2			
1. Контроль (без лектину і Ni(II))	115,33±8,99	—	1,00±0,05	—
2. Обробка лектином (PHA-P)	135,67±4,70*	117,64	3,50±0,50*	3,5
3. Обробка Ni(II)	126,00±3,52	109,25	18,50±3,50*	18,5
4. Сумісна обробка PHA-P та Ni(II)	162,33±13,48*	140,75	25,00±0,50*	25,0
5. Послідовна обробка: I — PHA-P, II — Ni(II)	108,33±3,67	93,93	2,00±2,00**	2,0
6. Послідовна обробка: I — Ni(II), II — PHA-P	140,67±3,53*	121,97	3,00±2,00**	3,0
	Експеримент 3			
1. Контроль (без лектину і Ni(II))	119,50±9,48	—	4,25±3,04*	—
2. Обробка лектином (PHA-P)	119,67±12,50	100,14	20,00±8,50	4,7
3. Обробка Ni(II)	142,67±22,54	119,39	22,00±0,71*	5,2
4. Сумісна обробка PHA-P та Ni(II)	111,00±4,95	92,89	16,80±1,19*	4,0
5. Послідовна обробка: I — PHA-P, II — Ni(II)	109,67±12,36	91,77	8,25±3,33**	1,9
6. Послідовна обробка: I — Ni(II), II — Ni(II)	120,00±3,00	100,42	9,75±1,89**	2,3
	Експеримент 4			
1. Контроль (без лектину і Ni(II))	68,80±1,00	—	0,50±0,50	—
2. Обробка лектином (PHA-L)	67,50±1,50	98,11	1,00±0,50	2,0
3. Обробка Ni(II)	73,00±8,65	108,15	20,00±4,31*	40,0
4. Сумісна обробка PHA-L та Ni(II)	66,50±3,50	91,10	27,50±13,50*	55,0
5. Послідовна обробка: I — PHA-L, II — Ni(II)	60,50±2,50	90,98	2,50±0,50*, **	5,0
6. Послідовна обробка: I — Ni(II), II — PHA-L	76,50±6,50	126,45	3,50±0,50*, **	7,0
	Експеримент 5			
1. Контроль (без лектину і Ni(II))	78,22±5,00	—	1,00±0,50	—
2. Обробка лектином (PHA-L)	86,50±2,50	110,59	2,00±0,50*	2,0
3. Обробка Ni(II)	88,00±6,00	112,50	4,00±0,82*	4,0
4. Сумісна обробка PHA-L та Ni(II)	64,00±8,00	81,82	5,67±1,86*	5,7
5. Послідовна обробка: I — PHA-L, II — Ni(II)	68,00±5,00	86,93	1,50±0,67**	1,5
6. Послідовна обробка: I — Ni(II), II — PHA-L	77,50±2,50	99,08	5,00±0,50*	5,0

*Достовірні відхилення від контролю за критерієм Ст'юдента ($p > 0,95$); **достовірні відхилення від варіанта № 3 (обробка Ni(II)).

пояснити природою первинної точкової мутації [18]. Тому для дослідження мутагенної дії Ni(II) було обрано маркер *trpC2* (таблиця). Дію лектинів досліджували на прикладі класичних мітогенів — фітогемаглютиніну (PHA-P), який в попередній роботі дещо підвищував рівень спонтанного мутагенезу у rec$^+$ штаму *B. subtilis* та його лейкоцитарної ізоформи (PHA-L). Rec$^-$ штам виявив слабку чутливість до дії ізолектинів квасолі [11].

З даних таблиці видно, що характер модифікуючої дії лектинів залежав від виду препарату та варіанту обробки нікель—лектин. Вірогідне підвищення спонтанного рівня реверсій після обробки PHA-P могло супроводжуватися збільшенням загальної кількості життєздатних клітин, що не спостерігалося за дії препарату PHA-L. Чітко виражений мутагенний ефект Ni(II) мав місце в усіх дослідах, але характеризувався значною варіабельністю. Одночасне додавання лектину та Ni(II) не зменшувало мутагенної дії останнього. Деяке абсолютне збільшення кількості ревертантів у цьому варіанті досліду було невірогідним. Отже, наявність центра, який зв'язує метали, та інші структурні особливості молекули PHA не можуть бути прямою перешкодою на шляху здійснення мутагенного впливу іонів металу.

Інша картина спостерігалася при попередній обробці культури препаратами лектинів. В усіх дослідах мало місце явне зниження виходу ревертантів майже до спонтанного рівня. Аналогічне явище відмічали також, коли лектин додавали після Ni(II). Хоча в цьому випадку вплив лектину виражений слабше і вихід ревертантів абсолютно перевищує спонтанний рівень. Антимутагенна дія ізолектину PHA-L при сумісному додаванні та при попередній обробці нагадувала таку при PHA-P, а в разі післядії була менш ефективною. PHA є першим лектином, для якого встановлено явище виведення лімфоцитів із стану спокою, — мітогенна активність.

Відомо, що мітоген діє опосередковано через індукцію синтезу клітинних білків — ростових факторів та рецепторів для них. Для ізолектинів бобових показано певну функціональну автономію, коли комбінація різних субодиниць могла в залежності від умов підсилювати або послаблювати мітогенну активність [5, 19]. Феноменологію антимутагенезу вивчають давно [1, 2, 5, 6], але його тонкі біохімічні механізми досліджено недостатньо. Вважають, що основні напрямки знешкодження мутагенних факторів — це пряме зв'язування та інактивація, включення в процес метаболізму з утворенням нетоксичних похідних, а також стимуляція репаративних систем клітини. Останній є найзагальнішим та досить активним процесом, що вимагає синтезу білків *de novo*.

Аналізуючи отримані результати, можна припустити, що PHA має здатність до активації поділу бактеріальних клітин. Це супроводжується помилками реплікації (підвищення рівня спонтанного мутагенезу) і пов'язаної з ними індукції репаративних систем, що робить клітини підготовленими до наступного додавання мутагену і пояснює відсутність антимутагенного ефекту при одночасному внесенні лектину та Ni(II). Важче пояснити антимутагенну післядію PHA. В цьому випадку сигналом до активації репаративної системи можуть бути одноланцюгові розриви ДНК, спричинені дією Ni(II), і зупинка реплікації. Додавання лектину призводить до ефективної забудови пошкоджених ділянок матриці та відновлення реплікації.

Грунтуючись на одержаних результатах, можна зробити припущення, що протекторна та антимутагенна дія лектинів по відношенню до Ni(II) опосередковується системою репарації/рекомбінації. При цьому ріст культури відновлюється (метод дифузії в агарі), а частота мутацій знижується. Таке припущення узгоджується з фундаментальними уявленнями про мутацію як багатостадійний процес, який починається контактом з мутагеном і підлягає репарації, доки не закріпиться при реплікації.

Висновки. Розроблено тест-систему для оцінки протекторної та антимутагенної дії лектинів як потенційних засобів захисту геному.

Встановлено факт протекторної дії шести препаратів лектинів рослинного походження в ряду ConA = STA > PHA-P = LAA > PHA-L > SNA, одного тваринного та одного бактеріального лектину щодо токсичного впливу іонів Ni(II).

Встановлено, що для реалізації протекторного впливу лектинів необхідне посередництво системи репарації/рекомбінації, доказом чого є знижена чутливість rec$^-$ мутанта *B. subtilis* до такої дії.

Три лектини, два з яких не мають мітогенної активності (PHA-E та VAA), а один є відомим антимітогеном (WGA), не проявили протекторного ефекту.

Виявлено модифікуючий вплив PHA на мутаційний процес, індукований іонами Ni(II), який залежав від порядку внесення лектину і мутагену: повний антимутагенний ефект при попередній обробці; частковий ефект при післядії лектину; відсутність ефекту при одночасній обробці.

Сукупність одержаних результатів дозволяє припустити, що протекторна і антимутагенна дія лектинів грунтується на непрямому механізмі за участі репаративних процесів.

I. S. Karpova, N. V. Koretskaya

Study on modifying action of lectins on the toxic and mutagenic effects of Ni(II) ions in *Bacillus subtilis* culture

Summary

The sensitivity of B. subtilis rec⁺ and rec⁻ strains to the toxic action of Ni(II) ions after pretreatment of cells with lectins of plant (ConA, LAA, PHA, STA, WGA, SNA, VAA), animal (HPA) and bacterial (exolectin of B. subtilis) origin has been compared. Six lectins of different structure, physical/chemical properties and carbohydrate specificity demonstrated their ability to defense the cell partially or completely from the toxic action of Ni(II) in order ConA = STA > PHA-P = LAA > PHA-L > SNA. Only rec⁺ strain was sensitive to such protection. Three lectins did not show any protective effect. The untimutagenic effect of PHA-P and PHA-L preparations, being tested by the number of trp⁺ revertants, was found after pretreatment or postincubation with lectins but it was absent when lectin and $NiCl_2$ were added to bacterial culture simultaneously. It is suggested that the protective and untimutagenic effects of lectins are realized via activation of the cell reparation system..

И. С. Карпова, Н. В. Корецкая

Исследование модифицирующего влияния лектинов на токсичность и мутагенность ионов Ni(II) в культуре *Bacillus subtilis*

Резюме

Сравнивали чувствительность rec⁺ и rec⁻ штаммов B. subtilis к токсическому действию ионов Ni(II) после предобработки клеток растворами лектинов растительного (ConA, LAA, PHA, STA, WGA, SNA, VAA), животного (HPA) и микробного (экзолектин B. subtilis) происхождения. Для шести лектинов, различных по структуре, физико-химическим свойствам и углеводной специфичности, показана способность к полной или частичной защите клеток от повреждающего воздействия Ni(II) в ряду ConA = STA > PHA-P = LAA > PHA-L > SNA. Протекторный эффект проявлялся только у rec+ штамма. Три лектина защитными свойствами не обладали. Тестирование антимутагенного действия препаратов PHA-P и PHA-L по снижению частоты trp⁺ реверсий показало наличие эффекта при предобработке и последействии лектина и его отсутствие при одновременном внесении лектина и $NiCl_2$ в бактериальную культуру. Предполагается, что при осуществлении протекторного и антимутагенного действия лектинов происходит активация репаративной системы клетки.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Лукаш Л. Л.* Мутагенез і антимутагенез — протилежно спрямовані процеси, що визначають рівень генетичної мінливості та стабільності // Биополимеры и клетка.—1998.—**14**, № 6.—С. 500—511.
2. *Дурнев А. Д., Середнин С. Б.* Фармакологические проблемы поиска и применения антимутагенов // Вестн. РАМН.—1993.—№ 1.—С. 19—25.
3. *Луцик А. Д., Детюк Е. С., Луцик М. Д.* Лектины в гистохимии.—Львів: Вища школа, 1989.—144 с.
4. *Van Damme J. M., Peumans W. J., Pustai A., Bardocz S.* Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications.— Chichester etc.: John Wiley and Sons, 1998.—452 p.
5. *Borrebaeck C. A. K., Carlsson R.* Lectins as mitogens // Advances in lectin research / Ed. H. Franz.—Berlin: VEB Volk and Gesundheit, 1989.—Vol. 2.—P. 10—27.
6. *Лалчев С.* Цитогенетическая оценка антимутагенной активности препарата PHA *in vivo* // Соврем. медицина.—1987.—**38**, № 12.—С. 14—16.
7. *Лукаш Л. Л., Карпова И. С., Мирошниченко О. С., Тихонова Т. Н., Лыло В. В., Манько В. Г., Сухорада Е. М., Голынская Е. Л.* Влияние лектина соцветий *Sambucus nigra* на спонтанный и индуцированный алкилирующим агентом мутагенез в соматических клетках млекопитающих // Цитология и генетика.—1997.—**31**, № 5.—С. 52—60.
8. *Максимчук Т. П., Бабенко Г. А.* Особенности генотоксического и канцерогенного действия металлов // Эксперим. онкология.—1999.—**12**, № 4.—С. 3—9.
9. *Kada T., Sadaie Y., Sakamoto Y.* Handbook of mutagenicity test procedures // Ed. B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols, C. Ramel.—Amsterdam; New York; Oxford: Elsevier, 1984.—P. 13—31.
10. *Мацевич Л. Л., Лукаш Л. А.* Генетическая активность тяжелых металлов в эукариотических клетках // Біополімери і клітина.—2001.—**17**, № 1.—С. 5—11.
11. *Карпова И. С., Корецкая Н. В., Тихонова Т. Н., Пидпала О. В., Лукаш Л. Л.* Влияние изолектинов *Phaseolus vulgaris* на спонтанный мутагенез у rec⁺ и rec⁻ мутантов *Bacillus subtilis* // Біополімери і клітина.—2001.—**17**, № 5.—С. 406—409.
12. *Полуэктова Е. У., Прозоров А. А.* Изучение свойств мутанта rec149 *Bacillus subtilis* с повышенной частотой индукции дефектного фага // Генетика.—1981.—**17**, № 9.—С. 1588—1593.
13. *Прозоров А. А.* Трансформация у бактерий.—М.: Наука, 1988.—256 с.
14. *Башкиров В. И., Хасанов Ф. К., Лакомова Н. М.* Незаконная рекомбинация и амплификация у *Bacillus subtilis* // Молекулярн. механизмы генет. процессов.—М.: Наука, 1990.—С. 237—243.
15. *Подгорский В. С., Коваленко Э. А., Симоненко И. А.* Лектины бактерий.—Киев: Наук. думка, 1992.—202 с.
16. *Корецька Н. В., Кочубей Т. О., Карпова І. С.* Дослідження зв'язку між структурою та біологічною активністю ізолектинів квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris*) з використанням різних тест-систем // Вісн. Київ. нац. ун-ту. Сер. Біологія.—2002.—Вип. 36.—С. 40—43.
17. *Bussing A., Schetzel M.* Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. Extracts from different host trees, correlata with their content of toxic mistletoe lectins // Anticancer Res.—1999.—**19**, N 1.—P. 23—28.
18. *Drake J. W.* A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—**88**.—P. 7160—7164.
19. *Лахтин В. М.* Молекулярная организация лектинов // Молекуляр. биология.—1994.—**28**, № 2.—С. 245—272.

УДК 575.224.42, 577.11.112
Надійшла до редакції 18.07.01