

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
MEDICINOS AKADEMIJA

Gabrielė Balčiūnaitė

**LEKTINŲ, IŠSKIRTŲ IŠ *ECHINACEA*
PURPUREA (L.) MOENCH ŠAKNŲ, KIEKIO,
KOKYBĖS BEI POVEIKIO PELIŲ
IMUNINĖS SISTEMOS REAKCIJOMS
TYRIMAS**

Daktaro disertacija
Medicinos ir sveikatos mokslai,
farmacija (M 003)

Kaunas, 2019

Disertacija rengta 2014–2019 metais Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Medicinos akademijos Farmacijos fakulteto, Farmakognozijos katedroje.

Mokslinė vadovė

prof. dr. Nijolė Savickienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003).

Konsultantas

dr. Gintautas Žvirblis (Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centras, Biotechnologijos institutas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Disertacija ginama Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Farmacijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkė

prof. dr. Vilma Petrikaitė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003).

Nariai:

prof. dr. Ramunė Morkūnienė (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003);

prof. dr. Andriejus Ževžikovas (Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, Medicinos akademija, medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003);

doc. dr. Rasa Žūkienė (Vytauto Didžiojo universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

dr. Jānis Kūka (Latvijos organinės sintezės institutas (Latvija), medicinos ir sveikatos mokslai, farmacija – M 003)

Disertacija ginama viešame Farmacijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2019 m. birželio 28 d. 12 val. Lietuvos sveikatos mokslų universiteto „Santakos“ slėnio Naujausių farmacijos ir sveikatos technologijų centro 202 auditorijoje.

Disertacijos gynimo vietos adresas: Sukilėlių pr. 13, LT-50162, Kaunas, Lietuva.

LITHUANIAN UNIVERSITY OF HEALTH SCIENCES
MEDICAL ACADEMY

Gabrielė Balčiūnaitė

**QUALITATIVE – QUANTITATIVE
ANALYSIS AND IMMUNE RESPONSE
INVESTIGATION IN MICE OF LECTINS
EXTRACTED FROM *ECHINACEA
PURPUREA* (L.) MOENCH ROOTS**

Doctoral Dissertation
Medical and Health Sciences,
Pharmacy (M 003)

Kaunas, 2019

Dissertation has been prepared at the Medical Academy of Lithuanian University of Health Sciences, Department of Pharmacognosy of Faculty of Pharmacy, during the period of 2014–2019.

Scientific Supervisor:

Prof. Dr. Nijole Savickiene (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003).

Consultant:

Dr. Gintautas Žvirblis (Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biotechnology, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Dissertation is defended at the Pharmacy Research Council of Lithuanian University of Health Sciences:

Chairperson

Prof. Dr. Vilma Petrikaitė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003).

Members:

Prof. Dr. Ramunė Morkūnienė (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003);

Prof. Dr. Andriejus Ževžikovas (Lithuanian University of Health Sciences, Medical Academy, Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003);

Assoc. Prof. Dr. Rasa Žūkienė (Vytautas Magnus University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004);

Dr. Jānis Kūka (Latvian Institute of Organic Synthesis (Latvia), Medical and Health Sciences, Pharmacy – M 003)

Dissertation will be defended at the open session of the Pharmacy Research Council of Lithuanian University of Health Sciences on the 28th of June, 2019, at 12 a. m. in the 202 auditorium of “Santaka” valley Center for the Advanced Pharmaceutical and Health Technologies.

Address: Sukilėlių pr. 13, LT-50162, Kaunas, Lithuania.

TURINYS

SANTRUMPOS.....	8
ĮVADAS.....	9
1. LITERATŪROS APŽVALGA	14
1.1. Augalų lektinų apibūdinimas, struktūra ir klasifikacija	14
1.1.1. Augalų lektinų baltyminės dalies struktūra	14
1.1.2. Augalų lektinų glikozilinimas	15
1.1.3. Augalų lektinų klasifikacija.....	16
1.2. Augalų lektinų biologinis aktyvumas	18
1.3. Lektinų išskyrimas iš vaistinės augalinės žaliavos, gryninimas, kokybinė ir kiekinė analizė.....	27
1.3.1. Lektinų išskyrimas ir gryninimas iš vaistinės augalinės žaliavos	27
1.3.2. Kokybinė lektinų analizė.....	30
1.3.3. Kiekinė lektinų analizė.....	35
1.4. <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench vaistinės augalinės žaliavos – šaknų, fitocheminė sudėtis ir vartojimas medicinoje	38
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI.....	40
2.1. Tyrimo objektas	40
2.2. Reagentai ir medžiagos	40
2.2.1. Reagentai	40
2.2.2. Buferinių tirpalų sudėtis	41
2.2.3. Laboratorinė įranga	42
2.3. Tyrimo metodai ir metodika	43
2.3.1. <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench vaistinės augalinės žaliavos paruošimas ir laikymas	43
2.3.2. Baltymų išskyrimas iš <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench šaknų ir lektinų gryninimas.....	43
2.3.3. Iš <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench šviežių šaknų žaliavos išskirtų baltymų ir lektinų kokybinė analizė.....	46

2.3.4. Iš <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench šviežių šaknų žaliavos išskirtų baltymų ir lektinų kiekinė analizė.....	50
2.3.5. Biologinio aktyvumo tyrimo <i>in vivo</i> modelis.....	51
2.3.6. <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench šaknų tinktūros gamyba ir analizė	51
2.3.7. Eksperimentinių Balb/c linijos pelių kraujo mėginių analizė	53
2.3.8. Eksperimentinių Balb/c linijos pelių blužnies imunohistocheminis tyrimas	54
2.3.9. Statistinės analizės metodai.....	56
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	57
3.1. Iš šviežių <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench šaknų žaliavos išskirtų baltymų kokybinis tyrimas.....	57
3.1.1. Hemagliutinacinio aktyvumo nustatymo rezultatai.....	57
3.1.2. Hemagliutinacijos inhibicijos angliavandeniais tyrimo rezultatai.....	59
3.1.3. Lektinų kokybinės analizės (vaizdinimo) imunocheminės analizės metodu rezultatai	60
3.1.4. Lektinų kokybinės analizės masių spektrometrijos metodu rezultatai.....	62
3.2. Baltymų, išskirtų iš <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench šaknų, kiekinio nustatymo rezultatai	68
3.2.1. Baltymų kiekio nustatymo spektrofotometriniu Bradford metodu rezultatai.....	68
3.2.2. Hemagliutinacinio titro nustatymo rezultatai	70
3.2.3. Identifikuoto lektino, turinčio LysM domeną, peptido kiekinio nustatymo rezultatai.....	71
3.3. Lektinų biologinio aktyvumo pelių imuniniam atsakui tyrimas <i>in vivo</i>	72
3.3.1. Palyginamosios <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench šaknų tinktūros gamyba, ekstraktinių medžiagų kiekio ir kavos rūgšties darinių analizė.....	72
3.3.2. Eksperimentinių Balb/C linijos pelių kraujo mėginių analizės rezultatai.....	75

3.3.3. Eksperimentinių Balb/c linijos pelių blužnies imunohistocheminio tyrimo rezultatai	78
IŠVADOS	81
LITERATŪROS SĄRAŠAS	82
STRAIPSNIŲ, KURIUOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS	100
MOKSLINIŲ KONFERENCIJŲ, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS ...	100
STRAIPSNIŲ KOPIJOS, KURIOSE SKELBIAMI SVARBIAUSI TYRIMŲ REZULTATAI	102
SUMMARY	113
PRIEDAI	130
CURRICULUM VITAE	131
PADĖKA	132

SANTRUMPOS

APS	angliavandenius prijungiančios sritys
BLAST	sekų palyginimo programa (angl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BSA	jaučių serumo albuminas (angl. <i>Bull Serum Albumin</i>)
Con A	konkanavalinas A
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
ESI-MS	elektropurkštuvinės jonizacijos masių spektrometrija
F ₀₋₆₀	baltymų frakcija, išsūdyta amonio sulfatu nuo 0 iki 60 proc.
F ₆₀₋₈₀	baltymų frakcija, išsūdyta amonio sulfatu nuo 60 iki 80 proc.
F ₈₀₋₁₀₀	baltymų frakcija, išsūdyta amonio sulfatu nuo 80 iki 100 proc.
Fuc	fukozė
GlcNAc	galaktozės-N-acetilgliukozaminas
GPI	glikozilfosfatidilinozitolis
HA	hemagliutinacinis aktyvumas
HeLa	žmogaus gimdos kaklelio vėžio ląstelių linija
HU	hemagliutinacinio aktyvumo vienetai
MALDI-TOF	matrica pagrįsta lazerinės desorbcijos/jonizacijos su lėkio trukmės detekcija masių spektrometrija (angl. <i>Matrix Assisted Lasser Deionisation Time of Flight</i>)
Man	manozė
MSK	minimali slopinanti koncentracija
m/v	masės dalis tūryje (proc.)
MWCO	molekulinių masių perskyrimo riba (angl. <i>Molecular Weight Cut Off</i>)
NDS-PAGE	natrio dodecilsulfato poliakrilamido gelio elektroforezė (angl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PALS	periarterinė limfoidinė makštis (angl. <i>Periarteriolar Lymphoid Sheaths</i>)
PHA	daržinės pupelės (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) agliutinas
PVDF	polivinilideno fluoridas
PVPP	polivinilpolipirolidonas
ROS	aktyviosios deguonies formos (angl. <i>Reactive oxygen species</i>)
SIM	selektyvus jonų monitoringas
TBS	tris (hidroksimetil) aminometano fiziologinis buferis
Tween	polietilenglikolio sorbitano monolauratas
v/v	tūrio dalis tūryje (proc.)
WGA	paprastųjų kviečių daigų (<i>Triticum aestivum</i> L.) agliutinas (angl. <i>Wheat germ agglutinin</i>)
Xyl	ksilozė

IVADAS

Augalų fitocheminės sudėties analizė yra viena iš perspektyvių tyrimų sričių, skirtų naujų augalinių molekulių atradimui. Dažniausiai tyrinėjamos augalinės kilmės veikliosios medžiagos – antriniai augalų metabolitai, pvz., alkaloidai, saponinai, flavonoidai, taninai, antrachinonai ir kiti.

Išsamiai ištirti ir rausvažiedės ežiulės (*Echinacea purpurea* (L.) Moench vaistinės augalinės žaliavos antriniai metabolitai. Šio vaistinio augalo žaliavos preparatai yra vieni iš plačiausiai vartojamų Jungtinėse Amerikos Valstijose ir Europoje [13]. *Echinacea* Moench genties augalai yra Šiaurės Amerikos floros endeminės rūšys. Rausvažiedės ežiulės yra introdukuotos ir kultivuojamos Lietuvoje [165]. *Echinacea purpurea* (L.) Moench vaistinėje augalinėje žaliavoje – šaknyse, kaupiami polisacharidai, kavos rūgšties dariniai, lipofiliniai alkilamidai, eterinio aliejaus įvairūs komponentai [38, 131, 137, 145]. Europos farmakopėja reglamentuoja rausvažiedžių ežiulių vaistinės augalinės žaliavos – džiovintų šaknų, kokybei keliamus reikalavimus. Vienas iš jų – žaliavos fitocheminėje sudėtyje esančių kavos rūgšties junginių kiekis turi būti ne mažesnis nei 0,5 proc. [53]. Kavos rūgšties junginiai turi poveikį *Echinacea purpurea* (L.) Moench žaliavos imunomoduliacinėms savybėms. Tai įrodyta tyrimais *in vitro* bei *in vivo*. Rausvažiedžių ežiulių preparatai moduliuoja imuninį atsaką veikdami citokinų, imunoglobulinų sintezę imuninėse ląstelėse [53, 56, 72, 199, 214]. Atliktų tyrimų metu buvo pastebėtas rausvažiedžių ežiulių etanolinės tinktūros hemagliutinacinis aktyvumas [93]. Šis poveikis yra būdingas glikoproteinams lektinams, tačiau nebuvo atlikti išsamesni rausvažiedžių ežiulių vaistinės augalinės žaliavos lektinų tyrimai. Taip pat nėra duomenų apie *Echinacea purpurea* (L.) Moench lektinų išskyrimą, kiekinę ir kokybinę sudėtį bei poveikį imuniniam atsakui.

Lektinai – specifiskai ir grįžtamai angliavandenius prijungiantys neimuninės kilmės glikoproteinai, paplitę visuose gyvuosiuose organizmuose. Šių cheminių junginių specifiskumas angliavandeniams nulemia jų biologinį aktyvumą: hemagliutinacinį [176], priešbakterinį [64], priešgrybelinį [85], priešvirusinį [197], insekticidinį [207], citotoksinį [204] ir imunomoduliacinį [190], antiproliferacinį [215] ir kt. poveikius. Lektinai kaupiami įvairiose augalų dalyse, tokiose kaip lapai, žiedai, stiebai, tačiau didesni kiekiai jų aptinkami šaknyse ir sėklose [172].

Lektinų specifiskumas angliavandeniams nulemia jų atrankų poveikį ląstelėms – taikinius. Tai sudaro prielaidas biologinio poveikio pritaikymui terapiniais tikslais. Tyrimais *in vitro* ir *in vivo* [9, 16, 37] įrodytas galaktozei ir chitinui specifiskų paprastojo amalo (*Viscum album* L.) lektinų priešvėžinis aktyvumas. Atliekami tyrimai su įvairiomis gyvūnų rūšimis ir žmonėmis

vertinant lektinų antiseptinį poveikį [134]. Vaistiniai preparatai, kurių sudėtyje yra lektinų, jau yra vartojami medicinos praktikoje. Europos patentų biure užregistruotas daržinių pupelių lektinų preparatas, skatinantis medikamentais pažeistų gleivinių ląstelių regeneraciją [161]. Kitas užregistruotas patentas preparatui, kurio sudėtyje yra valgomųjų lęšių lektinas. Šis preparatas yra skirtas chemoterapijos sukeltų nepageidaujamų poveikių (pykinimo, vėmimo, silpnumo jausmo, sąnarių skausmo ir kt.) mažinimui [87].

Augalų lektinai yra perspektyvūs junginiai, todėl rausvažiedžių ežiuolių vaistinėje augalinėje žaliavoje esančių glikoproteinų tyrimai gali būti svarbūs naujų *Echinacea purpurea* (L.) Moench žaliavos (šaknų) farmakologinių poveikių išaiškinimui.

Darbo tikslas – rausvažiedžių ežiuolių (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) lektinų kiekinės –kokybinės sudėties nustatymas bei jų poveikio pelių imuninės sistemos reakcijoms *in vivo* ištyrimas.

Uždaviniai:

1. Išskirti ir kiekiškai įvertinti baltymus šviežioje *Echinacea purpurea* (L.) Moench vaistinėje žaliavoje – šaknyse.
2. Išgryninti lektinų frakciją iš išskirtų *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų baltymų.
3. Nustatyti kokybinę *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknyse esančių lektinų sudėtį.
4. Atlikti *Echinacea purpurea* L. Moench šaknyse identifikuoto lektino peptido kiekio nustatymą.
5. Ištirti *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų lektinų poveikį eksperimentinių Balb/c pelių imuninės sistemos reakcijoms *in vivo*.

Mokslinio darbo naujumas

Atliktas rausvažiedžių ežiuolių šaknų baltymų kiekinis ir kokybinis tyrimas, pirmą kartą identifikuojant hemagliutinaciniu aktyvumu pasižyminčius glikoproteinus, turinčius LysM domeną. Nustatytas *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknyse esantis ~ 40 kDa dydžio glikoproteinas, turintis lektinų klasei priskirtą LysM domeną, ir pasižymintis specifiskumu laktozei, D-manozei ir D-galaktozei. Be to, pirmą kartą nustatytas LysM domenui priklausančio vieno iš peptidų, esančių rausvažiedžių ežiuolių šaknyse, kiekis.

Atlikus bioinformatinę analizę aptikta identifikuotų glikoproteinų homologija su kitose augalų rūšyse esančiais glikoproteinais.

Pirmą kartą įvertintas LysM lektinų frakcijos poveikis eksperimentinių gyvūnų imuninės sistemos reakcijoms *in vivo*.

Praktinė ir teorinė reikšmė

Atlikti tyrimai suteikia naujų žinių apie rausvažiedžių ežiulių šaknų baltymų kiekinę ir kokybinę sudėtį. Tai sudaro prielaidas tolimesniems šios augalinės žaliavos tyrimams ir naujų biologiškai aktyvių junginių paieškai bei identifikacijai.

Nustatyti glikoproteinai, turintys LysM domeną, pasižymėjo imuninę sistemą stimuliuojančiomis savybėmis. Tai suteikia naujų žinių apie rausvažiedžių ežiulių šaknyse esančių cheminių junginių – lektinų, biologinį aktyvumą.

Identifikuotų glikoproteinų bioinformatinės analizės rezultatai galėtų būti panaudoti tolimesniems *Echinacea purpurea* (L.) Moench genomo, genų raiškos ir nuo jos priklausančio augalinės žaliavos fitocheminės sudėties tyrimams. Atlikus šiuos tyrimus būtų galima optimizuoti *Echinacea* Moench genties augalų vaistinės žaliavos kultivavimą, paruošimą ir preparatų su tiksliniu imunologiniu efektu gamybą.

Atlikti etanolinės tinktūros, pagamintos iš šviežios *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų žaliavos, kiekinės – kokybinės sudėties tyrimai. Nustatyta, kad šios tinktūros kiekinės sudėties rodikliai buvo skirtingi, palyginus su etanolinės tinktūros, pagamintos iš džiovintos žaliavos, kiekinės sudėtimi. Remiantis literatūros šaltinių duomenimis, rausvažiedžių ežiulių džiovintų šaknų žaliavos viename grame aptinkama $22,79 \pm 1,39$ mg kavos rūgšties darinių [144], tuo tarpu rausvažiedžių ežiulių šviežių šaknų žaliavos viename grame nustatėme $16,37 \pm 0,82$ μ g kavos rūgšties darinių. Etanolinės tinktūros, pagamintos iš šviežios ir džiovintos *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų žaliavos, pasižymi skirtingu poveikiu antriniam imuniniam atsakui: džiovintos žaliavos etanolinė tinktūra veikia kaip imunostimuliatorius [111], tuo tarpu mūsų tyrimų *in vivo* rezultatai parodė, kad šviežios žaliavos etanolinė tinktūra slopina antrinį imuninį atsaką. Šie rezultatai yra svarbūs, kuriant vaistinius rausvažiedžių ežiulių preparatus.

Darbo rezultatų aprobavimas

Tyrimų rezultatai pristatyti 1 nacionalinėje ir 8 tarptautinėse mokslinėse konferencijose: 5th *international conference „Pharmaceutical sciences and pharmacy practice“* skirtą prof. Petro Raudonikio 145-ajam jubiliejui paminėti (Kaunas, 2014 m. lapkričio 22 d.), tarptautinė konferencija *BaltPharm Forum* 2016, (Klaipėda, 2016 m. balandžio 15–16 d.), Nacionalinė doktorantų konferencija „Mokslas sveikatai 2016“ (Kaunas, 2016 m. balandžio 13 d.), 10th *International Scientific Conference „Vital Nature Sign 2016“*, (Vilnius, 2016 m. gegužės 19–20 d.), 7th *International Pharmaceutical Conference „Science and practice 2016“*, skirtą prof. Johann Friedrich Wolfgang 240-ajam jubiliejui paminėti, (Kaunas, 2016 m. spalio 20–21 d.), 11th *Internatio-*

nal scientific conference „The Vital Nature Sign” (Vilnius, 2017 m. spalio 19–20 d.), 8th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice (Kaunas, 2017 m. gruodžio 15 d.), 1st International PhD students’ conference „Science for health”, (Kaunas, 2018 m. Balandžio 13 d.), 9th International Pharmaceutical Conference „Science and practice 2018” skirtą nepriklausomos Lietuvos vaistinininkijos 100 metų jubiliejui (Kaunas, 2018 m. lapkričio 9d.). Tyrimų tematika paskelbtos 2 publikacijos, atspausdintos tarptautiniuose mokslo leidiniuose, turinčiuose cituojamumo rodiklį Clarivate Analytics Web of Science (CA WoS) duomenų bazėje.

Doktoranto indėlis disertaciniame darbe

Eksperimentai atlikti bendradarbiaujant su kitomis mokslo įstaigomis. Tyrimo objektas *Echinacea purpurea* (L.) Moench šviežių šaknų žaliava surinkta Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sode, Vaistinių augalų skyriuje, ekstrakcijos sąlygų, baltymų išsodinimo sąlygų atrinkimas, afininės chromatografijos kolonėlės užpildymas ir lektinų gryninimo eksperimentai atlikti doktorantės LSMU MA Farmakognozijos katedroje. Baltymų kiekio frakcijose nustatymas, triušių eritrocitų suspensijos paruošimas, hemagliutinacinio aktyvumo, hemagliutinacinio aktyvumo inhibicijos angliavandeniais eksperimentai doktorantės atlikti LSMU MA Farmakognozijos katedroje. Hemagliutinacijos reakcijose naudojami triušių kraujo mėginiai buvo paimti LSMU VA Gyvūnų anatomijos ir fiziologijos katedros mokslininkų bei LSMU VA Vivariumo veterinarų. Lektinų kokybinio vaizdinimo imunocheminės analizės metodu eksperimentai ir mėginių paruošimas identifikacijai masių spektrometrijos metodu atlikti doktorantės. Paruoštų mėginių analizė masių spektrometrijos metodu atlikta Lietuvos agrarinių miškų ir mokslų centro filialo Sodinininkystės ir daržininkystės instituto, Atviros prieigos žemės ir miškų jungtinio tyrimų centro, Biologinių žymeklių laboratorijos mokslininkų. Gautų baltymų identifikacijos duomenų bioinformatinė analizė atlikta doktorantės kartu su laboratorijos mokslininkais. Identifikuoto lektino peptido kiekio nustatymas atliktas Kauno technologijų universiteto, Maisto mokslo ir technologijos katedros mokslininkų. Tyrimas *in vivo* su pelių modeliu atliktas Biologinių tyrimų centre: preparatų injekcijas, gyvūnų priežiūrą, eutanaziją ir organų disekciją atliko tyrimų centro veterinarai. Palyginamoji šviežių rausvažiedžių ežuolių šaknų tinktūra pagaminta ir ekstraktyviųjų medžiagų kiekis nustatytas gravimetriniu metodu doktorantės, kavos rūgšties darinų analizė atlikta LSMU MA Farmakognozijos katedros mokslininkų. Pelių kraujo tyrimai atlikti kartu su LSMU VA Stambųjų gyvulių klinikos, Klinikinių tyrimų laboratorijos mokslininkais. Pelių blužnies imunohistologinių mėginių parafinavimas, pjaustymas bei dažymas atliktas LSMU

MA Patologinės anatomijos klinikos mokslininkų. Gautų pjūvių analizė atlikta doktorantės.

Konferencijoms pateiktos mokslinės tezės paruoštos ir pristatytos doktorantės.

Darbo apimtis ir struktūra

Disertaciją sudaro įvadas, literatūros apžvalga, tyrimo objektas ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, bibliografijos sąrašas (219 šaltinių), disertacijos tema paskelbtų publikacijų sąrašas, leidimo atlikti tyrimus su gyvūnais kopija, mokslinių publikacijų disertacijos tema kopijos, santrauka (anglų k.), mokslinės ir kūrybinės veiklos aprašymas. Darbe pateikta 10 lentelių ir 14 paveikslų. Disertacijos apimtis – 132 puslapiai.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Augalų lektinų apibūdinimas, struktūra ir klasifikacija

Lektinai – neimuninės kilmės glikoproteinai, specifiskai, bet grįžtamai prisijungiantys angliavandenius [160, 152], o mokslas, nagrinėjantis šių junginių struktūrą, specifiskumą ir funkcijas vadinamas lektinomika. Gebėjimas agliutinuoti ląsteles šiuos junginius išskiria iš kitų angliavandenius prijungiančių baltymų, o jų neimuninė kilmė – nuo angliavandenius surišančių ir ląsteles agliutinuojančių imunoglobulinų [176]. Gyvuose organizmuose aptinkami imunoglobulinai yra tarpusavyje struktūriškai panašūs, tuo tarpu lektinai gali skirtis aminorūgščių sudėtimi, struktūrinių metalų jonų sudėtimi, tretine struktūra bei molekuline mase. Be to, priešingai nei imunoglobulinai, lektinai gali būti aptinkami ne tik gyvūnuose, bet ir imuninės sistemos neturinčiuose organizmuose, tokiuose kaip grybai ir augalai.

1.1.1. Augalų lektinų baltyminės dalies struktūra

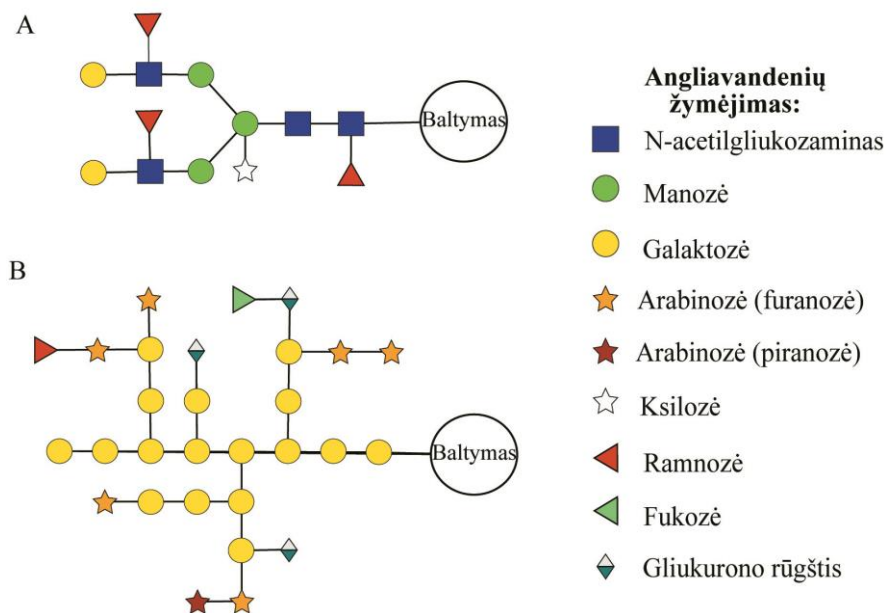
Lektinų išskirtinė savybė – gebėjimas atrankiai prisijungti angliavandenius. Aktyvūs domenai (aminorūgščių konservatyvios sekos) būdingos atskiroms lektinų klasėms, pavyzdžiui, pupinių šeimos lektinams, Ricino B lektinų klasei ir kt. [43]. Domeno trimatė angliavandenių prijungimo struktūra nulemia lektinų specifiskumą. Vienas lektinas gali turėti nuo 2 iki 12 konservatyvios struktūros angliavandenius prijungiančių baltymo sričių (APS), priklausomai nuo molekulės ir jos oligomerizacijos laipsnio [149]. Skirtingoms klasėms priklausančių lektinų ne konservatyvios dalies baltymo struktūra gali skirtis aminorūgščių seka, struktūrinių subvienetų (domenų) skaičiumi, ketvirtine struktūra ir polipeptidų prigimtimi. Lektino ketvirtinė struktūra lemia viso junginio stabilumą. Domenai specifiskai susijungia su angliavandeniais van der Valso vandeniliniais ryšiais bei hidrofobine sąveika su aromatinėmis aminorūgštimis [176]. Lektinų specifiskumas angliavandeniams nustatomas hemagliutinacijos inhibicijos reakcija, kuri aptariama 1.3.2 skyriuje.

Kai kurių lektinų struktūrai būdingi metalų jonai, nulemiantys baltymo išsilankstymą erdvėje ir sąveiką su angliavandeniais [106]. Metalų jonai sumažina baltymo tretinės ir ketvirtinės struktūros entropiją, sumažindami susidarančios lektino-angliavandensio sąveikos mobilumą, tačiau metalų jonai nedalyvauja angliavandensio – lektino sąveikoje [153, 77]. Lektinai yra itin heterogeniška glikoproteinų klasė, galinti skirtis tiek pirmine, tiek ketvirtine

baltymo struktūra. Nepaisant to, visus juos vienija atsikartojančios aminorūgščių sekos, suformuojančios aktyvias APS.

1.1.2. Augalų lektinų glikozilinimas

Glikozilinimas yra baltymų potransliacinė modifikacija, kurios metu prie baltymo pirminės struktūros kovalentinėmis jungtimis prijungiami angliavandeniai. Išskiriamas *N*-glikozilinimas ir *O*-glikozilinimas. Šios potransliacinės modifikacijos įvyksta specifinėse polipeptidinės grandinės vietose. *O*-glikozilinimas įvyksta fermentų pagalba, prijungiant angliavandenius prie serino arba treonino aminorūgščių. *N*-glikozilinimo atveju būtinas trijų aminorūgščių fragmentas: asparaginas-X (bet kokia aminorūgštis, išskyrus proliną)-treoninas arba serinas. Tačiau glikozilinimo sėkmė priklauso nuo aminorūgščių padėties sekoje, jų vietos baltymo konformacijoje ir nuo glikozilinimą vykdančio fermento [28, 175].



1.1.2.1 pav. Tipinės augalų baltymams būdingo *N*-glikozilinimo (A) ir *O*-glikozilinimo (B) šakotos struktūros schema, kurioje pavaizduoti kovalentinėmis jungtimis susijungę angliavandeniai (pažymėti simboliais). Schema modifikuota pagal [131].

Įvykus glikozilinimui prie baltymo prijungiami tam tikra tvarka išsidėsčiusių angliavandenių kompleksai „grandinėlių“, sudarytos iš *N*-acetilgliukozamino (GlcNAc), fukozės (Fuc), ksilozės (Xyl), manozės (Man) ir galaktozės (Gal) molekulių [177]. Schematinis angliavandenių kompleksų „grandinėlių“ vaizdas pateiktas 1.1.2.1 paveiksle. Augalų ląstelių lektinams dažniausiai būdingas *N*-glikozilinimas.

Dalis lektinų neturi kovalentinėmis jungtimis prijungtų angliavandenių, pavyzdžiui, biologiškai aktyvus neglikozilintas lektinas konkanavalinas A (Con A) arba kviečių gemalų agliutininas (WGA). Tačiau jų prekursoriai glikoproteinai yra neaktyvūs, o aktyvumą įgauna tik fermentams „nukarpius“ angliavandenių grandinėles. Nuo Con A prekursoriaus yra pašalinamos šoninės angliavandenių grandinėlės, o nuo WGA prekursoriaus „nukerpamas“ polipeptidinės sekos C gale esantis glikopeptidas [159]. Glikozilinimas lektinams suteikia termodinaminio stabilumo, tačiau nekeičia jų biologinio aktyvumo. Atlikti tyrimai rodo, kad tos pačios klasės skirtingų augalų lektinų glikozilinimas gali vykti skirtingose polipeptidinės sekos vietose [33, 21], tačiau tai neturės įtakos šių lektinų biologiniam aktyvumui [123].

1.1.3. Augalų lektinų klasifikacija

Augaluose aptinkami lektinai išsiskiria struktūriniu įvairove. Skirtumai išryškėja ne tik baltyminės dalies struktūroje ir specifiškume, bet ir dėl posttransliacinių modifikacijų. Šie ypatumai leidžia lektinus klasifikuoti keliais skirtingais būdais. Viena pirmųjų mokslininkų pasiūlytų lektinų klasifikacijų – klasifikacija pagal lektinų specifiškumą angliavandeniams: 1) manozei ir manozei/gliukozei specifiški lektinai; 2) manozei/maltozei; 3) galaktozei/galaktozės-*N*-acetilgliukozaminui; 4) *N*-acetilgliukozaminui; 5) fukozei ir 6) sialo rūgščiai specifiški lektinai [41]. Tokia klasifikacija nebuvo tiksli, nes vienoje grupėje galėjo būti ir struktūriškai skirtingi lektinai. Siekiant augalų lektinus suklasifikuoti į struktūriškai homogeniškesnes grupes buvo pasiūlytas lektinų grupavimas pagal aktyvių subvienetų (domenų) kiekį ir lektino struktūrą: 1) merolektinai, turintys vieną APS, pvz.: heveinas; 2) hololektinai su dviem ar daugiau identiškų arba labai panašių APS, galinčių agliutinuoti ląsteles ir/ar nusodinti angliavandenių turinčius junginius, pvz., galaktozei specifiškas daržinės pupelės (lot. *Phaseolus vulgaris* L.) agliutininas (PHA); 3) superlektinai, turintys dvi ir daugiau neekvivalentiškas APS, galinčias atpažinti struktūriškai nepanašius angliavandenius, pvz., tulpių svogūnėlių lektinai, turintys dvi skirtingas APS, galinčias prisijungti manozę vienoje APS ir *N*-acetilgalaktozaminą – kitoje; 4) Chimerolektinai, sudaryti iš dviejų ir daugiau struktūriškai nesusijusių APS, pasižyminčių nevienodu biologiniu aktyvumu, pvz. antrojo tipo ribosomas inaktyvuojančių

baltymų klasei priskiriamas ricinas, sudarytas iš katalitiškai aktyvios ir angliavandenius prijungiančios A dalies ir neaktyvios B dalies, kuri atlieka svarbų vaidmenį ricino molekulei prisijungiant prie ląstelių [91, 130]. Didžioji dalis iki šiol išgrynintų ir charakterizuotų lektinų yra priskiriami hololektinų klasei. Nors chimerolektinų išgryninta nedaug, tačiau augalų genomų sekoskaitos duomenys atskleidžia, kad jie augaluose pasitaiko gana dažnai [131, 72]. Tokia lektinų klasifikacija apjungia lektinus į grupes pagal tai, kiek ir kokių aktyviųjų sričių turi lektino molekulė, tačiau neatspindi tretinės baltymo struktūros skirtumų tarp grupių.

Naujausia yra mokslininkų Kristof De Schutter ir Els Van Damme [178] pasiūlyta tikslesnė lektinų klasifikacijos sistema. Mokslininkai suskirstė lektinus pagal struktūrinę ir evoliucinę APS homologiją (1.1.3.1 lentelė) [172]. Klasifikacija apjungia į grupes struktūriškai panašius lektinus, tačiau grupėse šie junginiai gali specifiškai prisijungti skirtingus angliavandenius.

1.1.3.1 lentelė. Lektinų klasifikacija pagal struktūrinę ir evoliucinę APS homologiją, pagal [178]

Lektinų klasė	Tipiniai angliavandenių ligandai	Vieta ląstelėje
Dvisporių pievagrybių (lot. <i>Agaricus bisporus</i> L.) lektinų klasė	N-acetilgliukozaminas / N-acetilgalaktozaminas Galaktozė	Branduolys Citozolis
Amarantinų klasė	N-acetilgalaktozaminas	Branduolys Citozolis
Su chitinazėmis susijusių agliutininų klasė	Daug manozės turintys N-glikanai	Vakuolė Plazminė membrana
Cianovirinių šeima	Manozė	Branduolys
Europinio ožekšnio (lot. <i>Euonymus europaeus</i> L.) lektinų klasė	Galaktozidai Daug manozės turintys N-glikanai	Branduolys Citozolis
Baltosios snieguolės (lot. <i>Galanthus nivalis</i> L.) lektinų klasė	Manozė	Vakuolė Branduolys Citozolis Plazminė membrana
Heveino šeima	Chitinas	Vakuolė
Džakalino šeima	Manozė Galaktozei specifiška subgrupė	Branduolys Citozolis Vakuolė
Pupinių šeimos lektinai	Manozė	Vakuolė Branduolys Citozolis Plazminė membrana

1.1.3.1 lentelė (tęsinys) Lektinų klasifikacija pagal struktūrinę ir evoliucinę APS homologiją, pagal [178]

Peptidoglikanus prijungiančio lizino M (Lys M) domeno lektinų šeima	Chitinas Peptidoglikanai	Vakuolė Branduolys Citozolis Plazminė membrana
Paprastojo tabako (lot. <i>Nicotiana tabacum</i> L.) lektinų šeima	N-acetilgliukozamino - polimerai Daug manozės turintys N-glikanai	Branduolys Citozolis
Ricino B lektinų šeima	Galaktozė/ N-acetilgalaktozaminas Sialinizuota galaktozė/ N-acetilgalaktozaminas	Vakuolė Branduolys Citozolis

Lektinų molekulių įvairovė yra labai didelė, todėl juos galima klasifikuoti pagal keletą ypatumų: specifiškumą angliavandeniams, struktūrinį panašumą ir struktūrinę – evoliucinę APS homologiją.

1.2. Augalų lektinų biologinis aktyvumas

Augalų lektinai pasižymi išskirtiniu biologiniu aktyvumu, todėl yra pritaikomi biotechnologijoje, biomedicinoje ir ligų kontrolėje. Lektinų sąveika su ląstelių glikokaliksu, nulemia jų hemagliutinacinį, priešbakterinį, priešgrybelinį, insekticidinį, citotoksinį ir imunomoduliacinį aktyvumą.

Hemagliutinacinis aktyvumas

Ląstelių hemagliutinaciją sukeliantis augalų lektinų poveikis išskiria lektinus iš kitų augaluose aptinkamų glikoproteinų. Hemagliutinacinis aktyvumas priklauso nuo lektinų savybės prisijungti prie mono-, di-, polisacharidų, esančių ant ląstelių paviršiaus [176]. Lektinai, turėdami bent dvi APS, nekovalentinėmis jungtimis prisijungia angliavandenius, kurie yra ant bent dviejų greta esančių ląstelių glikokalikso. To pasekoje susidaro ląstelių aglomeratai. Atliekant lektinų identifikaciją hemagliutinacijos testu, imunofermentinių reakcijų lėkštelėje ant eritrocitų suspensijos užnešamas lektino mėginys. Lėkštelės esančio konusinės formos šulinėlio dugne matomas iš ląstelių aglomeratų sudarytas raudonas apskritimas parodo teigiamą agliutinacijos testo rezultatą. Hemagliutinacinį aktyvumą taip pat galima įvertinti atliekant lektino ir eritrocitų sąveikos mikroskopinę analizę. Tokiu atveju mikroskopo regėjimo lauke matomi ląstelių aglomeratai parodo teigiamą hemagliutinacijos testo rezultatą. [1].

Hemagliutinacijos testui gali būti naudojami įvairių rūšių gyvūnų eritrocitai: triušių, pelių, avių, arklių, žmonių ir kitų gyvūnų. Iš visų paminėtų rūšių išskirtiniu jautrumu agliutinacijos testui pasižymi triušių eritrocitų suspensija [95], todėl ji yra naudojama rutininėje analizėje. Jautrumas agliutinaciniam lektinų aktyvumui didėja triušių eritrocitus prieš analizę paveikus tripsinu, papainu, neuraminidaze arba sialidaze [79, 176]. Hemagliutinacinis aktyvumas nepriklauso nuo lektino struktūroje esančių APS skaičiaus, tačiau aktyvumą gali nulemti tokie faktoriai kaip lektino molekulės dydis, eritrocitų paviršiaus glikokalikso savybės (kraujo grupė) ir metabolinė ląstelės stadija. Fizinės aplinkos veiksniai (temperatūra, eritrocitų suspensijos koncentracija, mėginio sumaišymo greitis) taip pat gali turėti įtakos hemagliutinaciniam lektinų aktyvumui [90].

Hemagliutinacinis aktyvumas išskiria lektinus iš visų kitų augaluose randamų baltymų, todėl remiantis šiuo testu galima identifikuoti lektinus biologiniuose mėginiuose.

Priešbakterinis poveikis

Aptikus augaluose lektinus, mokslininkams rūpėjo atsakyti į klausimą, kokia lektinų funkcija augaluose, kodėl augalams reikalingi ląsteles agliutinuojantys glikoproteinai. Įpusėjus praeitam šimtmečiui, buvo iškelta lektinų apsauginės funkcijos nuo bakterijų, grybelių, vabzdžių ir žolėdžių gyvūnų hipotezė, kuri vėliau patvirtinta. Ištyrus pupinių šeimos augalų simbiozės su bakterijomis mechanizmus, nustatyta, kad šiame procese svarbų vaidmenį atlieka augalų ląstelių membraniniai lektinai. Augalo šaknis į dirvožemį išskiria molekulinis signalas – flavonus. Bakterijos atpažįsta flavonus ir inicijuoja signalinių lipochitino oligosacharidų (vadinamų Nod (pagal *angl.* nodules – mazgeliai) faktorių) sintezę [7]. Nod faktorius, išskirtus į dirvožemį, atpažįsta polisacharidus prijungiantys lizino domenai (LysM), sujungti su membraninėmis receptorinėmis kinazėmis [120, 144]. LysM domenui atpažinus *Mesorhizobium loti* bakterijų išskirtus Nod faktorius, inicijuojama simbiozė, leidžianti bakterijai įsiskverbti į augalo šakniaplaukį ir ten sudaryti kolonijas, iš išorės primenančias mazgelius [12, 120, 197]. Kita vertus, LysM receptorinėms kinazėms atpažinus patologinę bakteriją, tokią kaip *Phytophthora palmivora*, inicijuojama genų ekspresija, įjungianti gynybinius augalo mechanizmus [78, 197].

Atpažinimo funkciją atliekantys LysM domenai yra nedidelės molekulinės masės polipeptidai, sudaryti iš 45–65 aminorūgščių. Jie turi konservatyvią antrinę struktūrą, sudarytą iš dviejų β -klosčių ir dviejų α -spiralijų [211]. Ląstelių membranose esantys augalų lektinai yra pirmieji, kurie sąveikauja su patogeniniais ir simbiotiniais mikroorganizmais. Veikiant abiotiniam ar

biotiniam stresoriui membraniniai lektinai gali būti perkelti į ląstelės citoplazmą arba susintetinti ir sandėliuojami ląstelės citoplazmoje bei branduolyje [99]. Nors tokių lektinų funkcijos augale dar nėra gerai ištirtos, tačiau manoma, kad jie atlieka svarbų vaidmenį ląstelinių signalų perdavime ir augalo gynybos mechanizmuose prieš žolėdžius gyvūnus ir vabzdžius [42].

Iš augalų išskirti lektinai pasižymi priešbakteriniu veikimu ir žmogui patogeninių bakterijų rūšims. Chitinui specifiski brazilinio pirulio (*Schinus terebinthifolius* Raddi.) lapų lektinai baktericidiškai ir bakteriostatiškai veikia *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* ir *Staphylococcus aureus* bakterijų rūšis [64]. Galaktozei specifiski įvairiadyglės indigažolės (*Indigofera heterantha* Wall.) sėklų lektinai pasižymi poveikiu prieš *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ir *Bacillus subtilis* bakterijų rūšis [162]. Dėl šių priešbakterinių savybių lektinai, patekę į žolėdžių gyvūnų organizmą, gali sukelti žarnyno mikrofloros disbalansą [128].

Membraniniai lektinų receptoriai atpažįsta ir identifikuoja simbiotinius mikroorganizmus bei sudaro sąlygas simbiozei įvykti, o atpažinę patologinę bakteriją, lektinai įjungia savigynos mechanizmą –aktyvinama genų ekspresija ir apsauginių baltymų gamyba. Patekę į gyvūnų organizmą augalų lektinai gali veikti bakteriostatiškai ir bakteriocidiškai, sutrikdydami normalią gyvūnų žarnyno mikroflorą.

Priešgrybelinis poveikis

Membraniniai augalų lektinai, galintys prisijungti grybų ląstelių paviršiuje esančius polisacharidus, pasižymi priešgrybeliniu aktyvumu. Grybų ląstelių sienelių pagrindinė sudedamoji dalis yra *N*-acetilgliukozamino polisacharidas chitinas. Lektinas heveinas, išskirtas iš brazilinio kaučiukmedžio (lot. *Hevea brasiliensis* L.) latekso, pasižymi specifiskumu chitinui, todėl turi išreikštas priešgrybelines savybes [74, 125]. Baltažiedžio lubino (lot. *Lupinus albus* L.) sėklose aptiktas 20 kDa chitinui specifiskas lektinas Blad aktyvumu nenusileido sintetiniams priešgrybeliniams junginiams. Šis lektinas gali sąveikauti ne tik su grybų ląstelių sienele ir plazminėje membranoje esančiais membraniniais jonų nešikliais, bet ir pasižymi chitiną skaidančiu poveikiu, kuomet nuo polisacharido molekulės galų atrankiai nukerpamos tik po dvi *N*-acetil- β -D-gliukozamino molekulės. Šis chitinui specifiskas lektinas Blad taip pat geba skaidyti chitiną į smulkesnius fragmentus atsitiktinėse polisacharidinės molekulės vietose. Agronomijos praktikoje naudojamas fungicidinis Blad poveikis prieš vynuogių, pomidorų ir bulvių miltligės sukėlėjus [79]. 2017 metais Blad lektinas įtrauktas į fungicidų, sukeliančių rezistentiškumą, žemos rizikos grupės sąrašą. Tokiu būdu atsirado nauja biolo-

ginių fungicidų (BM 1) klasė [59]. Išgryninti lektinai sąveikauja ir su žmogui patogeninėmis grybelių rūšimis. Brazilinio kaučiukmedžio (*Hevea brasiliensis* L.) latekso lektinas pasižymi priešgrybeliniu poveikiu *Candida albicans* (ATCC90028) padermei, minimali slopinanti koncentracija (MSK) lygi 95 µg/ml, o *Candida tropicalis* (ATCC 750) augimą inhibuojanti MSK koncentracija – 11,9 µg/ml [85]. Kitas chitinui specifiškas paprastojo granatmedžio (*Punica granatum* L.) sėklų luobelų lektinas pasižymėjo priešgrybeliniu poveikiu prieš *Candida albicans* (URM 5901) – MSK 25 µg/ml ir *Candida krusei* (URM 6391) – MSK 12,5 µg/ml, padermėms [119]. Specifiškumu kitiems angliavandeniams pasižymintys lektinai taip pat gali turėti išreikštą priešgrybelinį poveikį. Gliukozei ir manozei specifiški *Dioclea violacea* L. sėklų lektinai pasižymi priešgrybeliniu poveikiu *Candida albicans* (URM 4987) – MSK 16 µg/ml, *Candida tropicalis* (URM 4989) – MSK 8 µg/ml ir *Rhodotorula glutinis* (URM 5092) – MSK 256 µg/ml, padermėms [63].

Priešgrybelinėmis savybėmis pasižymintys lektinai yra pritaikomi agromijos praktikoje. Atliktų lektinų poveikio žmogaus patogeniniams grybeliams tyrimų rezultatai sudaro prielaidas naujų priešgrybelinių vaistų atsiradimui. Stipriausiai išreikštomis priešgrybelinėmis savybėmis pasižymintys lektinai yra specifiški chitinui bei jo monomerui *N*-acetilgliukozaminui.

Insekticidinis poveikis

Augalų lektinų savybė jungtis prie gyvūninės kilmės polisacharidų nulemia jų poveikį žolėdžiams gyvūnams. Insekticidinis lektinų veikimas pasireiškia per lektino sąveiką su epitelinių ląstelių glikokaliksu ir su vabzdžių išorinio skeleto sudėtyje esančiu chitinu. Prieš vabzdžius nukreiptas lektino aktyvumas priklauso nuo atsparumo virškinimo fermentams, tokiems kaip vabzdžių žarnyne aptinkama α -amilazė [3]. Gerau ištirtas insekticidinėmis savybėmis pasižymintis lektinas – WGA. Jis specifiskai jungiasi prie *N*-acetil-*D*-gliukozamino, sustabdydamas chitino dangalų formavimąsi ir vabzdžių vystymąsi [207], o patekęs į vabzdžių virškinimo sistemą sukelia vabalų, drugių ir dvisparnių vabzdžių organizmų struktūrines pažeidas [70]. Manozę prijungiantis baltosios snieguolės (*Galanthus nivalis* L.) lektinas pasižymi insekticidinėmis savybėmis prieš amarus [69], maistiness kandis [169] ir žiogus [203]. Lektinai negrįžtamai pakeičia augalais mintančių vabzdžių fiziologiją: mažėja vabzdžių kūno masė, stabdoma chitininio dangalo sintezė, pažeidžiama jų virškinimo sistema.

Citotoksinis poveikis

Lektinų citotoksinis poveikis gyvūninėms ląstelėms įrodytas eksperimentais *in vitro* ir *in vivo*. Ištyrus ConA lektino veikimą gyvūninėms ląstelėms *in vitro*, buvo pastebėtas piknotinis (negrįžtamą chromatinio sutankėjimą, būdingą apoptotinėms ir nekrotinėms ląstelėms, sukeliantis poveikis) bei pelių peritoninių makrofagų [50], hepatocitų [61] vakuolizaciją (vakuolių susidarymą ląstelėse) sukeliantys efektai ir viščiukų simpatinės nervų sistemos neuronų egzocitozę slopinantis poveikis [19]. Gauti tyrimų rezultatai atsikartojo, ištyrus lektinų poveikį eksperimentiniams gyvūnams. Vakuolizaciją sukeliantis lektinų poveikis nustatytas ir *in vivo* – tyrimų su žiurkėmis metu. Smailialapės pupelės (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) lektinai sukėlė kasos ląstelių vakuolizaciją. Yra žinoma, kad ląstelių vakuolizacija yra patologinis pakitimas, dažnai sukeliantis ląstelių mirtį [183], todėl susidomėta proapoptotinėmis lektinų savybėmis.

Apoptozę inicijuojantis veikimas pastebėtas įvertinus iš paprastojo ricinmedžio (lot. *Ricinus communis* L.) sėklų išskirto lektino – ricino, poveikį pelių žarnyno epitelinėms ląstelėms [76]. Vėlesnių tyrimų metu bandyta išsiaiškinti lektinų sukeliamos apoptozės mechanizmus. Ištyrus ricino poveikį žmogaus gimdos kaklelio vėžio ląstelių linijai (HeLa), lektinas sukėlė nuo kaspazių priklausomą apoptozės kaskadą – paveiktose ląstelėse suintensyvėjo reaktyviųjų deguonies formų (ROS) gamyba, tokiu būdu buvo inicijuotas oksidacinis stresas, vėliau – ląstelių žūtis [166]. Ricinas sukėlė apoptozę ir kitoms ląstelių linijoms: nuo kaspazių priklausomą apoptozę L540 Hodžkino limfomos ląstelėms [155], nuo Bcl-2 proapoptozinių baltymų Bak priklausomą apoptozę BEL7404 hepatomos ląstelėms [72] ir kitoms ląstelių linijoms [117].

Ląstelių apoptozę sukeliantis poveikis būdingas ir mažiau toksiškiems lektinams. Iš mongolinės kulkšnės (lot. *Astragalus mongholicus* L.) šaknų išgrynintas galaktozei specifiškas lektinas sukėlė žmogaus gimdos kaklelio vėžio ląstelių (HeLa), žmogaus į osteoblastus panašių ląstelių (MG63) bei leukemijos ląstelių (K562) linijų apoptozę [215]. Paprastojo duonmedžio (lot. *Artocarpus incisa* L.) sėklose aptiktas lektinas futalinas apoptotiškai veikė krūties adenokarcinomos MCF7 ir HeLa ląstelių linijas [28].

Gauti *in vitro* tyrimų rezultatai patvirtinti ir tyrimuose su gyvūnais. Paprastojo amalo (lot. *Viscum album* L.) mažos lektinų dozės (30 ng/kg gyvūno masės per parą) sumažino žmogaus melanomos auglių, sukeltų eksperimentinėms pelėms, vidutinę masę ir metastazių kiekį plaučiuose. To paties tyrimo metu pastebėtas dendritinių ląstelių infiltracijos į auglius suintensyvėjimas. Buvo pateikta išvada, kad toks veikimas pasireiškė dėl imuninės siste-

mos aktyvacijos prieš vėžines ląsteles [200]. Kito tyrimo metu paprastųjų amalų lektinas buvo įtrauktas į kasdienį pelių, kurioms buvo sukelta Hodžki-
no limfoma, racioną. Buvo stebėtas auglių masės sumažėjimas, augliuose išaugęs apoptotinių ląstelių skaičius bei išaugusi limfocitų infiltracija į auglių audinius. Pasibaigus tyrimui net 25 proc. gyvūnų, kurie buvo maitinti lektiniais, nebuvo aptikta gyvybingų auglių [158].

Nekrozė, priešingai nei apoptozė, yra nekontroliuojama ląstelių žūtis, sukelta stipraus ląstelės pažeidimo. Apoptotinių lektinų poveikį dažnai lydi ir nekrozė. Nekrotizuojant ląstelėms į intraląstelinę terpę patenka nesusardyti baltymai, nukleino rūgštys ir kiti junginiai. Dažniausiai lektinų poveikis apoptozei priklauso nuo dozės. Tyrimai parodė, kad apoptotiniu veikimu pasižymi nedidelės lektinų dozės, tuo tarpu didesnės gali turėti stipresnį nekrozę sukeliantį efektą [98]. Atlikus tyrimą su manozei specifiniais gelsvosios soforos (lot. *Sophora flavescens* L.) šaknų lektiniais, stebėtas jų apoptozę sukeliantis poveikis HeLa ląstelėms. Tiek apoptotinių, tiek nekrozuotų ląstelių skaičius didėjo proporcingai ląstelių inkubacijos su lektinu laikui ir lektino dozei. Kadangi apoptotinių ląstelių skaičius mėginiuose buvo didesnis, mokslininkai priėjo išvados, kad lektinas sukėlė ląstelių mirtį apoptotiniu keliu [104]. Tokia pati tendencija pastebėta ir ištyrus chitinui specifinius purpurinės tradeskantės (lot. *Tradescantia pallida* Boom) šaknų lektinus [216].

Nekrozinio poveikio ląstelėms tyrimų rezultatus patvirtino tyrimų *in vivo* rezultatai. Ištyrus į virškinamąjį traktą patenkančių skrandžio fiziologiniam barjerui atsparių didelių dozių lektinų (WGA ar PHA) poveikį žarnyno mikrorgaureliams *in vivo*, pastebėta, kad šie lektinai sukelia struktūrines audinio pažaidas. Lektinai jungiasi prie žarnų mikrorgauelių paviršiuje esančios N-glikolio neuramino rūgšties [121] ir gali sukelti žarnyno epitelio ląstelių nekrozę ar visišką jų sunykimą (tam tikrose audinio zonose). Dėl to sutrinka maisto medžiagų virškinimas ir įsisavinimas [208]. Lektinai, prisijungę prie žarnyno ląstelių, gali veikti kaip blužnies augimo faktorius, todėl ilgainiui mažėja žolėdžių gyvūnų kūno masė, sutrinka hormonų pusiausvyrą [160]. Kai kurie lektinai gali patekti pro žarnų sienelės į sisteminę kraujotaką ir veikti kitus vidaus organus [44]. Buvo nustatyta, kad lektinai gali sukelti nekrozę nepriklausomai nuo lektino preparato įvedimo į organizmą būdo [71, 10].

Ištyrus apoptozę inicijuojantį lektinų veikimą *in vivo* ir *in vitro*, nustatyti skirtingi lektinų poveikio mechanizmai. Eksperimentuose su ląstelėmis nustatyta, kad lektinai tiesiogiai sąveikauja su ląstelių membranomis ir jose esančiais receptoriais, sukeldami ląstelių mirtį. Patekę į gyvą organizmą lektinai veikia ir kaip antigenai – aktyvina organizmo imuninę sistemą kovai su vėžinėmis ląstelėmis. Lektinų sukelta ląstelių mirtis yra nuo jų dozės pri-

klausantis procesas. Didinant lektinų dozę, nepriklausomai nuo preparato įvedimo būdo, didėja rizika sukelti ląstelių žūtį nekrotiniu keliu.

Imunomoduliacinis veikimas

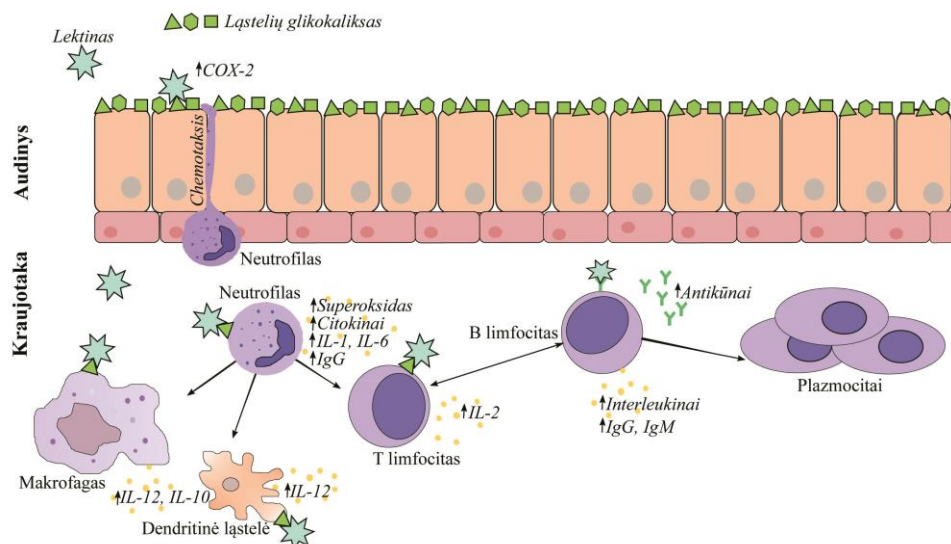
1960 metais (lektinomikos mokslo pradžioje) susidomėta lektinų imunogeninėmis savybėmis. Mokslininkas Nowell [132], atlikęs *in vitro* eksperimentą su žmogaus eritrocitų ir baltųjų kraujo kūnelių (WBC) mišiniu, pastebėjo, kad PHA lektinas inicijavo baltųjų kraujo kūnelių skaičiaus mėginyje padidėjimą, t. y. pasižymėjo mitogeninėmis savybėmis sąveikoje su leukocitais. Vėliau buvo išgryninta daugiau lektinų, taip pat charakterizuotas imuninių ląstelių mitozę inicijuojantis lektinų aktyvumas, kuris priklausė nuo lektinų gebėjimo prisijungti prie imuninių ląstelių plazminės membranos paviršiuje esančių angliavandenių bei glikozilintų membraninių receptorių [29].

Pirminis imuninis atsakas blokuoja antigenų (infekcijos) plitimą ir jų patekimą į organizmo ląsteles. Pirminio atsako metu kraujyje padidėja imunoglobulinų koncentracija, kuri lemia prasidėjusią reakciją. Ištyrus Balb/C peles, gavusias manozei specifiško bananų (lot. *Musa acuminata* L.) vaisių lektino (po 20 µg lektino injekuota į raumenis ir po 40 µg lektino skirta *per os*), buvo nustatytas padidėjęs imunoglobulinų M ir G kiekis. Ištyrus *per os* lektinus gavusių pelių virškinamojo trakto gleivines nustatyta, kad lektinai jungėsi prie gleivinių paviršiuje esančių polisacharidų ir tokiu būdu galimai aktyvavo imuninį atsaką [47].

Pirminiame imuniniame atsake dalyvaujantys neutrofilai – baltųjų kraujo kūnelių rūšis, atsakinga už lokalių imuninių atsaką. Stimuliuojamos uždegimo mediatorių šios ląstelės migruoja į uždegimo židinį. Augalų lektinai sąveikauja su neutrofilais tiesiogiai, skatindami jų migraciją. Neutrofilų chemotaksis gali intensyvėti priklausomai nuo lektino sąveikos su ląstelėmis, makrofagais ir putliosiomis ląstelėmis [57]. *In vitro* tyrimų rezultatai parodė, kad manozei specifinis stambiojo duonmedžio (lot. *Artocarpus heterophyllus* Lam.) lektinas ArtinM, prisijungdamas prie neutrofilų paviršiuje esančių Toll-2 receptorių ir chemokinių receptorių N-glikanų, aktyvino neutrofilus: skatino jų migraciją, superoksido produkciją ir fagocitinį aktyvumą [145]. Kitų *in vitro* eksperimentų rezultatai atskleidė, kad ArtinM aktyvino putliųjų ląstelių degranuliaciją ir imuninių mediatorių, tokių kaip navikų nekrozės faktorius α (TNF- α), sintezę po sąveikos su Toll-2 receptorių N-glikanais ir didelio afiniteto IgE receptorių (Fc ϵ R) paviršiuje esančiais N-glikanais [122]. Poodinės 0,5 µg ArtinM injekcijos eksperimentinėms pelėms Balb/C inicijavo IL-12 sintezę makrofaguose ir dendritinėse ląstelėse po sąveikos su Toll-2 receptorių paviršiuje esančiais N-glikanais [36]. Manozei specifinių tinkliškosios anonos (lot. *Annona coriacea* L.) sėklų lektinų peritoninės injekcijos

dėl lektinų sąveikos su ląstelių glikokalikso molekulėmis skatino pelių neutrofilų migraciją į pilvo ertmę ir uždegimo mediatoriaus COX-2 sintezę [35]. N-acetil-galaktozaminui/galaktozei specifinis gauruotosios sojos (lot. *Glycine max* L.) sėklų lektinas pasižymėjo prouždegiminiu arba priešuždegiminiu veikimu (nepriklausomai nuo injekcijos būdo). Injekavus lektiną pelėms į veną, intensyvėjo neutrofilų migracija į pilvo ertmėje karagenanu sukeltą uždegiminį židinį, tuo tarpu lektiną injekavus tiesiai į pilvo ertmę – neutrofilų migracija į karagenanu sukeltą uždegimo židinį nepakito [16]. Augalų lektinai, sąveikaudami su gyvūnų gleivinėmis ir su imuninėmis ląstelėmis, atsakingomis už pirminį atsaką, aktyvina pirminį imuninį atsaką.

Gyvūnai turi specifinį antrinį imuninį atsaką, kuris atpažįsta pakartotinai patekusį antigeną ir nedelsiant įjungia imuninio atsako mechanizmą. Už gyvūnų antrinį ląstelinį imuninį atsaką yra atsakingi T limfocitai. Augalų lektinai su limfocitų ląstelėmis reaguoja atrankiai. Tyrimų duomenys parodė, kad dauguma augalų lektinų mitogeniškai veikia tik T limfocitus ir yra neaktyvūs arba inhibuoja kitų klasių limfocitų mitozę [7, 138]. Antigenui arba mitogenui prisijungus prie T ląstelių receptorių, T limfocitai yra aktyvuojami. Mitogenui prisijungus prie ląstelės glikoproteinų, aktyvuojami T limfocito viduląsteliniai signaliniai keliai. Vienas iš pavyzdžių – mitogenu aktyvuotos baltymų kinazės, kurios inicijuoja CD25 ir CD69 receptorinių baltymų ekspresiją. Vėliau seka interleukino 2 sekrecija ir limfocitų proliferacijos aktyvinimas. Toks poveikio mechanizmas būdingas PHA, ConA ir Jakalino lektinams [198]. Ištyrus lektino ArtinM *in vitro* poveikį T limfocitų pagalbininkams, nustatyta sąveika su CD4⁺ receptoriais – lektinas aktyvino ląstelių mitochondrijas, inicijavo interleukino 2 sintezę ir ląstelių proliferaciją [187]. Tyrimo *in vivo* metu poodinės 1,0 µg ir 2,5 µg ArtinM injekcijos Balb/C pelėms padidino T ir B limfocitų tankį blužnyje, o didelės 5,0 µg ArtinM dozės sukėlė vidutinio stiprumo uždegiminius pažeidimus [136].



1.2.1 pav. Skyriuje aptarto augalų lektinų imunomoduliacinio poveikio schema

Augalų lektinų imunomoduliacinis veikimas pasireiškia per lektinų sąveiką su ląstelių glikokaliksu. Lektinas patekęs į kraują gali sąveikauti su neutrofilų, makrofagų, dendritinių ląstelių, T ir B limfocitų N-glikozilintais membraniniais receptoriais ir plazminė membrana. Tai sukelia superoksido sintezės suaktyvėjimą, paskatina citokinų, interleukinų ir imunoglobulinų sintezę, nulemiančių kitų kraujo forminių elementų kiekio augimą. Lektinams sąveikaujant kitų audinių (pvz. žarnyno gleivinė) ląstelių glikokaliksu, inicijuojamas pirminis imuninis atsakas bei uždegiminės reakcijos.

Tyrimais *in vitro* ir *in vivo* nustatyta, kad augalų lektinai aktyvina tiek pirminį, tiek ir antrinį imuninį atsaką (1.2.1 paveikslas). Imunomoduliacinis poveikis pasireiškia dėka lektinų sąveikos su imuninių ląstelių glikokaliksu ir plazminėje membranoje randamais glikozilintais receptoriais. Dėl šios sąveikos inicijuojama imuninių ląstelių mitozė ir chemokinių sintezė. Todėl lektinų sukeltas imuninis atsakas neutralizuoja (sunaikina) pažeistas ir vėžines ląsteles.

1.3. Lektinų išskyrimas iš vaistinės augalinės žaliavos, gryninimas, kokybinė ir kiekinė analizė

Didelis lektinų biologinis aktyvumas ir jų pritaikymo galimybės skatina mokslininkus ieškoti naujų gamtinių lektinų bei jų išgavimo būdų. Augaluose lektinai aptinkami visose augalų dalyse: šaknyse, stiebuose, žievėje, lapuose, pumpuruose, žieduose, vaisiuose ir sėklose [149].

1.3.1. Lektinų išskyrimas ir gryninimas iš vaistinės augalinės žaliavos

Lektinų išskyrimą iš vaistinės augalinės žaliavos ir jų gryninimą apima eilė procesų: pirmiausia, vandeniniame buferiniame tirpale vykdoma lektinų ekstrakcija iš žaliavos, vėliau – baltymų išsodinimas, mėginių valymas ir chromatografinio gryninimo metodai. Augalų lektinai yra gana gerai tirpūs vandenyje ir lengvai išekstrahuojami iš žaliavos. Augalinės žaliavos smulkinimo procese naudojamas skystas azotas, palengvinantis ląstelių suardymą ir baltymų išlaisvinimą iš ląstelių [75]. Nedideliems žaliavos kiekiams naudojami homogenizatoriai arba specialios purtyklės, kurios skystu azotu užšaldytą žaliavos mėginį susmulkina metalinių šratų pagalba.

Gera susmulkinta žaliava ekstrahuojama buferiu, kurio sudėtis patikslinama eksperimentiškai. Remiantis literatūros duomenimis, lektinų ekstrakcinių buferių pH reikšmė varijuoja nuo 4,0 iki 8,5 [80, 154]. Ekstrakcijos sąlygų pagerinimui į ekstrakcinį buferį papildomai galima įdėti baltymus stabilizuojančių medžiagų, pvz., redukuojančių agentų (2-merkaptoetanolis, ditiotreitolis), chelatininių junginių (etilendiamintetraacto rūgštis, urėja), proteazių inhibitorių [174, 50, 192]. Siekiant sumažinti polifenolinių junginių sąveiką su baltymais, į ekstrakcinį buferį pridedama polivinilo pirolidono, kuris reaguoja su fenolinių junginių hidroksilo grupėmis ir tokiu būdu juos suriša [37]. Baltymų ekstrakto paruošimui svarbi ir temperatūra, nes nuo jos priklauso baltymų stabilumas. 4 °C temperatūra ekstrakcijos metu reikšmingai slopina proteazių, mažinančių aktyvių baltymų išeigą, aktyvumą [86].

Optimalus ekstrakcijos laikas nustatomas taip pat eksperimentiškai. Ekstrakcijos trukmė varijuoja nuo keletos valandų iki paros [71]. Ekstrakcijai pasibaigus, pirminis baltymų ekstraktas centrifuguojamas – nuo ekstrakto atskiriama žaliava. Paruoštas ekstraktas tinka tolimesniam lektinų gryninimui chromatografiniais metodais. Kai kurie autoriai papildomai atlieka ekstrakto valymą nuo balastinių medžiagų, išsūdant baltymus neorganinėmis druskomis [108] ar išsodinant juos organiniais tirpikliais, pvz., etanoliumi [140], acetono ir trichloracto rūgšties mišiniu [116]. Dažniausiai naudojamas baltymų “išsodinimo” metodas – išsūdytas amonio sulfatu [126]. Šis meto-

das yra pranašesnis už kitus, nes yra santykinai pigesnis, o baltymai nepakeičia savo konformacijos, išsaugomas baltymų aktyvumas, be to, didelė amonio sulfato koncentracija inhibuoja bakterijų augimą ir sumažina baltymų nuostolius [67]. Literatūros šaltiniuose nurodyta, kad baltymų išsūdymui naudotos amonio sulfato druskos koncentracijos gali būti: 0–15 proc. [81], 0–60 proc. [108], 40–60 proc. [137], 60–80 proc. [100], 30–50 proc. [45] ir t. t. Išsodinti baltymai resuspenduojami ekstrakciniame buferyje. Po to atliekama baltymų dializė, kurios metu pro atrankiai dalelių dydžiui pralaidžią membraną osmozės būdu į buferį pereina didelė druskos koncentracija. Osmozė vyksta tol, kol abiejose membranos pusėse susidaro druskų koncentracijos pusiausvyra. Prieš atliekant tolimesnę analizę, mėginių dializė yra būtina, nes baltymų mėginyje esanti didelė druskų koncentracija sudaro hipertoniinę terpę, todėl gali iškreipti eritrocitų hemagliutinacinio aktyvumo tyrimo rezultatus. Be to didelė druskų koncentracija gali trukdyti chromatografiniam baltymų gryninimo procesui.

Nuo didelės druskų koncentracijos išvalytų baltymų mėginiai naudojami tolimesniame lektinų gryninime. Klasikinis ir bene efektyviausias lektinų gryninimo metodas – afininė chromatografija. Šis chromatografinis metodas pasižymi dideliu atrankumu gryninamiems lektinams, nes iš viso baltymų mišinio atskiria tik su matrica (kolonėlės stacionariąja faze) specifiskai sąveikaujančius junginius. Angliavandenių molekulės, cheminės modifikacijos būdu prijungtos prie agarozės, dekstrano ar silikagelio matricos, specifiskai sąveikauja su gryninamų lektinų APS ir sulaiko juos kolonėlėje. Šiam procesui yra svarbus stacionariosios fazės stabilumas gryninimo metu: atsparumas slėgiui, pH, denatūruojančioms medžiagoms, pvz. natrio sulfatui, organiniams tirpikliams. Agarozės matricos, kurių dalelių dydis paprastai yra nuo 40 iki 165 μm skersmens, yra populiariausios. Šios matricos išlieka stabilios esant plačiam pH intervalui (pH reikšmė nuo 3 iki 12) ir sąveikaujant su dauguma vandeninių tirpalų, kurių sudėtyje yra denatūruojančių medžiagų (pvz., šlapalas, tiošlapalas ir kt.) bei organinių tirpiklių (pvz., etanolis, metanolis ir kt.). Tačiau dėl savo cheminės struktūros agarozė yra palanki mitybinė terpė bakterijų augimui, todėl reikalauja specialios priežiūros: gausaus plovimo buferiniais tirpalais ir vandenių, konservavimo etanolio tirpale. Dekstrozę pasižymi panašiomis stabilumo savybėmis kaip ir agarozė, bet matricos dalelių dydis mažesnis – iki 50 μm . Tokia matrica labiau tinka mažų (1–100 kDa dalelių dydžio) lektinų gryninimui. Silikagelis, priešingai nei agarozė ir dekstrožė, yra netinkamas bakterijų augimui ir yra mechaniškai atsparesnis aukšto slėgio poveikiui, tačiau šarminėje terpėje vyksta silikagelio hidrolizė, mažinanti matricos stabilumą. Be to, dėl hidrofobiškumo gali pasireikšti nespecifinė šios matricos sąveika su baltymais, galinti sumažinti

išgryninamo baltymo kiekį ir padidinti pašalinių, su stacionariąja faze specifškai nesąveikaujančių baltymų kiekį [205].

Nuo kolonėlės matricos lektinai išplaunami, keičiant eliuacijai naudojamo buferio joninę jėgą, pH reikšmes arba konkurentinėmis angliavandenių molekulėmis, kurios sąveikauja su prie matricos prikibusiais lektinais. Susidarę konkurentinių angliavandenių – lektinų kompleksai išplaunami iš kolonėlės kartu su eliuento tėkme [142]. Lektinų gryninimui naudojami ir mažiau atrankūs metodai, tokie kaip jonų mainų [73], gelinė (dalelių dydžio) chromatografijos [189] arba šių metodų deriniai tarpusavyje ir kartu su afinine chromatografija.

Jonų mainų chromatografijos metodu atliekamas lektinų gryninimas iš baltymų mišinių yra pagrįstas elektrostatische (jonine) sąveika tarp analičių ir nejudriosios fazės jonizuotų grupių. Lektinai yra sudaryti iš amfoterinių jonų – aminorūgščių, turinčių tiek teigiamą, tiek neigiamą krūvį. Aminorūgščių kiekis ir jų išsidėstymas lektino molekulėje nulemia lektino suminį paviršiaus krūvį. Pagal tai gryninimui pasirenkama jonų mainų chromatografijos stacionarioji fazė (jonitas): anijonito (turinčio teigiamą krūvį) kolonėlė – kai lektino makromolekulės paviršiaus suminis krūvis yra neigiamas, arba kationito (turinčio neigiamą krūvį) kolonėlė – kai suminis lektino makromolekulės paviršiaus krūvis yra teigiamas. Užnešus mėginį ant stacionariosios fazės, analitės išplaunamos keičiant judriosios fazės joninę jėgą arba pH reikšmę. Kuo stipresnė mišinio komponentų sąveika su jonitu, tuo lėčiau analitės judės kolonėlėje [56].

Jonų mainų chromatografijos metodas pasižymi geru biologinio aktyvumo atkuriamumu (skirstomi baltymai nedenatūruojami), naudojama stacionarioji fazė yra didelės talpos (galinti adsorbuoti didelį kiekį skirstomo baltymų mėginio) ir lengvai prižiūrima (po kiekvieno chromatografinio skirstymo praplaunama 1 M NaCl tirpalu). Tačiau šis metodas nėra selektyvus ir reikalauja papildomų gryninimo procedūrų [102].

Gelinės filtracijos arba dydžio chromatografija remiasi mišinių frakcionavimu pagal dalelių (molekulių) dydį. Chromatografinė kolonėlė užpildoma porėtomis sferinės formos polimerinio gelio dalelėmis. Priklausomai nuo molekulės dydžio, analitės juda tiek tarp sferinių gelio dalelių, tiek pro jų vidų. Gelio dalelių viduje polimeras sudaro tinklinę struktūrą, kuri ilgesniam laikui sulaiko mažesnes analites. Chromatografinio skirstymo metu iš kolonėlės pirmiausiai išplaunamos didžiausios, o vėliau – kolonėlėje užsilaikiusios mažesnės analitės. Analčių eliuacijai naudojamo buferio pH reikšmė, joninė jėga ir sudėtis reikšmingai nekeičia šios chromatografijos skirstymo skiriamosios gebos. Frakcionavimas gali būti atliekamas judriojoje fazėje esant kofaktorių ir detergentų, denatūrantų, pvz., šlapalo arba guanidino hid-

rochlorido, ir susidarius tiek didelei, tiek ir mažai judrios fazės joninei jėgai. Tačiau tai gali turėti įtakos analičių stabilumui [153].

Priešingai nei jonų mainų ar afininė chromatografija, gelinės filtracijos chromatografija nepriklauso nuo skirstomų baltymų ir lektinų mišinių cheminės sąveikos su stacionariąja faze, tačiau metodui turi įtakos analitės dalelių dydis. Gelinės filtracijos chromatografija yra tinkama analičių, kurios reaguoja į pH reikšmės ir metalų jonų koncentracijos pokyčius, tyrimui. Tačiau šis metodas nėra specifiškas ir reikalauja papildomų gryninimo žingsnių [130].

Lektinų išeiga, priklausomai nuo išskyrimui naudojamos žaliavos, gali kisti nuo 0,002 proc. raudonuosiuose dumbliuose, pvz., *Amansia multifida* L. [38], iki 92,5 proc. puošniosios raudūnės (lot. *Erythrina speciosa* L.) sėklose [95]. Tyrimais nustatyta, kad gryninimo efektyvumas didėja, panaudojant vieną – du gryninimo metodus, tačiau naudojant tris ir daugiau – lektinų išeiga ženkliai sumažėja [126]. Taip yra todėl, kad kiekvieno papildomo gryninimo etapo metu kartu su kitais baltymais prarandama ir dalis gryninamo lektino. Norint išvengti šių nuostolių, reiktų pasirinkti kiek įmanoma atrankesnius gryninimo metodus, pvz. afininę chromatografiją.

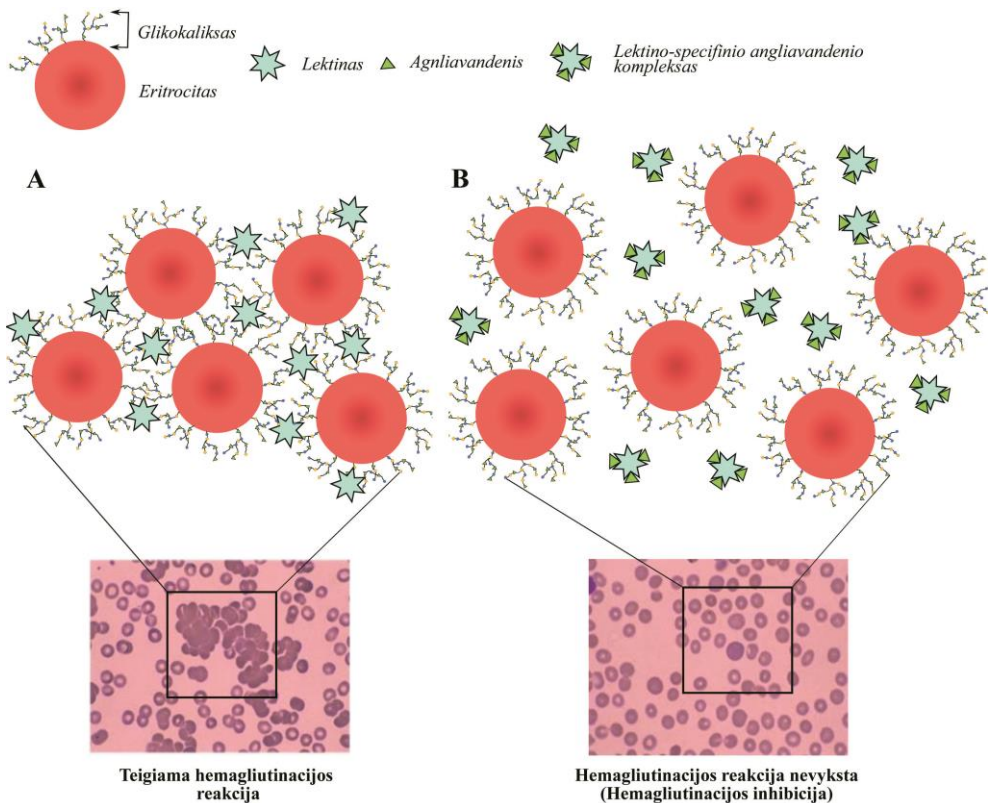
Kiekvieno lektinų išskyrimo etapo metu svarbus optimalių sąlygų parinkimas. Selektyvūs lektinų išskyrimo ir gryninimo metodai, tokie kaip vandenyje tirpių baltymų išsodinimas amonio sulfatu bei afininė chromatografija sumažina tyrimo laiko sąnaudas ir užtikrina mažesnius baltymų išeigos nuostolius.

1.3.2. Kokybinė lektinų analizė

Kokybinėje lektinų analizėje dažniausiai yra naudojamas hemaglutinacinio aktyvumo testas, imunoblotingas ir masių spektrometrinė analizė. Hemagliutinacijos nustatymas baltymų mėginiuose leidžia daryti prielaidą, kad baltymų mišinyje yra lektinų. Ši prielaida patvirtinama arba atmetama hemagliutinacijos inhibicijos testu, naudojant įvairius angliavandenius: mono-, di-, polisacharidus. Atrankiai lektinų paieškai ir vaizdinimui baltymų mišiniuose pritaikomas ir imunoblotingo metodas, tuo tarpu masių spektrometrinė analizė yra skirta mėginyje esančių lektinų kokybiniam identifikavimui, jų struktūros išaiškinimui.

Lektinų hemagliutininio aktyvumo nustatymas

Ląstelių hemagliutinaciją sukeliantis lektinų veikimas yra klasikinis ir plačiausiai naudojamas lektinų kokybinės ir pusiau kiekinės analizės metodas (1.3.2.1 paveikslas, A)



1.3.2.1 pav. Lektinų atpažinimui biologiniuose mėginiuose naudojamos hemagliutinacijos (A) ir hemagliutinacijos inhibicijos reakcijos (B)

A – lektinai atpažįsta eritrocitų glikokalikso angliavandenius ir prie jų prisijungia per APS eritrocitus sujungdami į ląstelių aglomeratą. B – Hemagliutinacijos inhibicija stebima kuomet prieš sumaišymą su eritrocitais tiriamasis mėginys inkubuojamas su lektinui specifiniu angliavandeniu, kuris prisijungia prie lektino APS užblokuodamas lektino reakciją su eritrocitų glikokaliksu.

Hemagliutininio aktyvumo nustatymui naudojami žinduolių, pavyzdžiui, pelių, jūrų kiaulyčių, triušių, avių, žmonių ir paukščių (vištų, ančių, žąsų) kraujo eritrocitų suspensijos [109]. Vieni dažniausiai naudojamų – triušių eritrocitų mėginiai. Palyginus su kitomis gyvūnų rūšimis, triušių eritrocitai pasižymi didesniu jautrumu agliutininiam lektinų veikimui [95].

Spėjama, kad aktyvesnei triušio eritrocitų agliutinacinijai (trumpesnei agliutinacijos trukmei) turi įtakos didesnė kraujyje esančių katecholaminų koncentracija (aktyvumas) [209].

Kokybinė lektinų hemagliutinacijos reakcija patvirtinama hemagliutinacijos inhibicijos angliavandeniais testu (1.3.2.1 paveikslas, B). Tai yra ir pusiau kiekinis metodas, leidžiantis ne tik patvirtinti lektinų buvimą analizuojamame mėginyje, bet ir išaiškinti jų specifiškumą angliavandeniams. Hemagliutinacijos inhibicijos testas atliekamas serijiniu būdu, skiedžiant tiriamo angliavandens mėginį, į kurį pridedamas fiksuotas baltymo kiekis ir fiksuotas kiekis eritrocitų suspensijos. Stebima mažiausia angliavandens koncentracija, kuria angliavandenis inhibuoja lektino hemagliutinacinį veikimą. Atskirų lektinų hemagliutinacinis aktyvumas gali būti inhibuojamas įvairių angliavandenių, tačiau kai kurie iš jų aktyvumą slopina geriau nei kiti [127]. Tokiu būdu yra išvengiama klaidingo lektinų identifikavimo, nes ląstelių agliutinaciją taip pat gali sukelti ir augaluose randamos rauginės medžiagos bei riebalų rūgštys [173]. Lektinų hemagliutinacinis aktyvumas gali būti inhibuojamas angliavandeniais, tuo tarpu rauginių medžiagų ar riebalų rūgščių sukeltą agliutinaciją angliavandeniai neužslopina.

Hemagliutinacijos aktyvumo testas yra vienas iš paprastų metodų, nustatant, ar analizuojamuose baltymų mėginiuose yra lektinų, koks jų specifiškumas, tačiau šio testo nepakanka tiriamo lektino aminorūgščių sekos ir struktūros nustatymui.

Lektinų kokybinė analizė (vaizdinimas) imunocheminės analizės metodu

Baltymų imunocheminė analizė, dar vadinama *Western blot*, yra tyrimo metodas, leidžiantis specifiniais antikūnais identifikuoti lektiną baltymų mišinyje. Šis metodas remiasi elektroforezės būdu išskirstyto baltymų mišinio perkėlimu ant kietos, elektriniam laukui pralaidžios membranos. Iš gelio pereinančius baltymus sulaikanti blotingo membrana padedama tarp elektroforezės gelio ir katodo. Elektroforezės būdu išskirstyti baltymai iš gelio perkeliama ant blotingo membranos, naudojant statmenai gelio paviršiui nukreiptą elektrinį lauką, kuris priverčia elektroforezės gelyje esančius baltymus judėti link teigiamu krūviu įkrauto elektrodo. Ant blotingo membranos gaunama tiksli elektroforegramos kopija, kurioje galima pažymėti ir vaizdinti dominančius baltymus, panaudojant specifinius antikūnus [110]. Šis metodas tinkamas lektinų paieškai baltymų mišiniuose pagal specifines, tik augalams būdingas *N*-glikozilintų baltymų struktūroje esančias molekules: β -1,2-ksilozę arba α -1,3-fukozę [33, 127]. Imunocheminę analizę taip pat galima pritaikyti konkrečių lektinų, pvz., WGA [206] ar PHA [170], paieškai baltymų

mų mišiniuose. Šis metodas pasižymi plačiomis pritaikymo galimybėmis, leidžiančiomis ne tik aptikti lektiną (us), bet ir jį (juos) identifikuoti baltymų mišiniuose.

Kokybinė lektinų analizė masių spektrometrijos metodu

Informatyvus lektinų nustatymo būdas – masių spektrometrija, atliekama pasitelkiant dvi tyrimų strategijas: masių pirštų atspaudų „*bottom-up*“ ir baltymų sekvenacijos „*top-down*“ metodus. Pirmoji, anksčiau atrasta, išstobulinta ir plačiai taikoma baltymų identifikacijai tyrimų strategija vadinama „*bottom-up*“ tyrimu. Fermentiniu arba cheminiu būdu suskaidyti peptidų mišiniai analizuojami masių spektrometru. Gauti peptidų masių spektro smailių duomenys yra vadinami masių pirštų atspaudais (angl. *mass fingerprint*), pagal kuriuos atliekama paieška duomenų bazėse *Sequest* [51] arba *Mascot* [146]. Čia sukaupti peptidų masių pirštų atspaudų duomenys su genų sekoskaitos tyrimų metu išaiškintomis baltymų aminorūgščių sekomis [68]. Algoritminės paieškos metu gauti baltymo fragmentų masių pirštų atspaudai lyginami su duomenų bazėse sukaupta informacija, o struktūros atitikimas šiai informacijai įvertinamas balu, pagal kurį atrenkamas identifikuojamas baltymas.

Antroji tyrimų strategija pavadinta „*top-down*“ baltymų sekvenacija, nes tokiu būdu tiriamas nesuskaidytas į fragmentus išvalytas baltymas arba mažos kompleksinės sudėties polipeptidų mišinys. Toks baltymas fragmentuojamas masių spektrometru. Gaunami duomenys apie baltymo molekulinę masę ir visus masių spektrometre susidarančius fragmentus. Pagal tai atliekama analizė duomenų bazėse, gaunami duomenys apie visą tiriamo baltymo aminorūgščių seką. Tos pačios analizės metu galima nuodugniau ištyrinėti ir baltymo potransliacines modifikacijas [214]. Nors ši tyrimo strategija yra naujesnė ir pasižymi mažesniu už „*bottom-up*“ strategijos našumu, tačiau metodas yra sparčiai tobulinamas dėl platesnių baltymo ištyrimo galimybių.

Pagal pasirinktą tyrimų strategiją atliekamai baltymų identifikacijai naudojami masių spektrometrai susideda iš jonizatoriaus ir analizatoriaus. Dažniausiai baltymų analizei naudojami šie jonizacijos metodai: analitės iš matricos lazeriu desorbuojantis ir jonizuojantis metodas (MALDI, angl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*) bei elektropurkštuvinė jonizacija (ESI, angl. *Electro-spray ionisation*). Šie jonizacijos metodai tinkami didelių ir nelakių junginių, (pvz., baltymų ir peptidų) švelniai jonizacijai be reikšmingos analitės fragmentacijos [2]. MALDI jonizacijai pagaminamos specialios plokštelės – matricos. Analizuojamas mėginys įliejamas į kietą matricą, kuri vėliau patalpinama ant mėginių laikiklio masių spektrometre. Analitė ir matricos molekulės, esant 337 nm ir 355 nm bangos ilgiui, UV lazerinių impulsų pagalba jonizuojamos į dujinę būseną [107]. Tokiu būdu įprastai gau-

namis vienakrūviai, rečiau daugiakrūviai jonai. Jonų krūvis atsiranda dalelės praradus ar įgavus papildomų protonų (atitinkamai esant bazinei arba rūgštinei eliuento pH reikšmei). Tokiu būdu suformuojami MH^+ , MH^{2+} , MH^- ir panašūs jonai, arba prijungiami maži jonai, tokie kaip Na^+ , acetato jonas, amonio jonas ir panašūs [214]. ESI jonizacijos metu, esant atmosferiniam slėgiui, pro didelę įtampą įkrautą adatą išpurškiamas mėginys. Tokiu būdu gaunami įkrauti maži mėginio lašeliai, iš kurių išgarinama analitė (išgarinimas vyksta prieš mėginio patekimą į aukšto vakuumo kamerą masių spektrometre). ESI jonizacijos būdu gaunamos daugeliu krūvių įkrautos dalelės, kurios visos analizės metu sudaro platų jonų spektrą [212].

Baltymų identifikacijoje naudojami MALDI ir ESI jonizacijos metodai derinami su keturių rūšių masių analizatoriais. Pirmasis jų – kvadrupolio analizatorius. Kvadrupolis analizuoja gautus dalelių masės ir krūvio santykio (m/z) duomenis, pritaikydamas radijo dažnį ir pastovią elektrinę įtampą, leidžiančius aptikti tik siauro m/z santykio reikšmes, pasiekiančias detektorių. Kvadrupolio analizatoriai su ESI jonizacija gali išanalizuoti ribotą masių diapazoną ir duoti nedidelės rezoliucijos rezultatus. Dažniausiai tokie analizatoriai apima nuo 50 iki 4000 m/z reikšmes, esant rezoliucijos reikšmei 1000, o jautrumas siekia pikomolines koncentracijas. Kvadrupolinės jonų gaudyklės veikia panašiai kaip ir kvadrupoliai, tačiau yra technologiškai pažangesnės, nes turi papildomą jonų koncentravimo funkciją. Kvadrupolinė jonų gaudyklė kintamu magnetiniu lauku koncentruoja jonizuotas daleles į mažą tūrį. Šios dalelės aktyvuojamos rezonansiškai ir elektroninės manipuliacijos būdu išmetamos iš magnetinio lauko link detektoriaus [112]. Masių spektrometrija, naudojant kvadrupolines jonų gaudykles, yra labai jautrus metodas, nes galima sukonzcentruoti ir užlaikyti jonizuotas daleles. Tokios detekcijos sistemos skiriamoji geba išauga iki 2000, o jautrumas siekia femtomolines koncentracijas [193, 58].

Lėkio trukmės (TOF, angl. *Time Of Flight*) analizatoriai trumpu įtampos gradientu pagreitina jonizacijos metu gaunamus jonus ir matuoja laiką, per kurį išsviesti jonai nuskrieja nustatytą atstumą. Dalelių skrydžio lėkio trukmė yra proporcinga kvadratinei šakniai iš m/z . Komerciniai TOF analizatoriai apima m/z reikšmes, nenurodant viršutinio m/z dydžio, esant 10 000-20 000 rezoliucijai [84]. Minimalus detektuojamas analitės kiekis siekia femtomolinę koncentraciją. TOF analizatoriai įprastai naudojami greta MALDI jonizacijos metodo [68].

Furjė transformacijų jonų ciklotrono rezonansinis (FTICR, angl. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) analizatorius yra jautriausias iš visų biologinių mėginių identifikacijai naudojamų analizatorių. FTICR analizatorius sukurtame magnetiniame lauke, pagreitina jonizuotas daleles, jas sulaiko greitintuvo bloke ir pagal jų ciklinį dažnį, priklausančią nuo dalelės masės,

nustato dalelių m/z reikšmes. Šio metodo rezoliucija siekia $> 1\,000\,000$, leidžiančią atskirti femtomolinių koncentracijų $1000,000\,m/z$ daleles nuo $1000,001\,m/z$ jonizuotų dalelių. FTICR analizatoriai naudojami tiek su MALDI, tiek su ESI dalelių jonizatoriais [179].

Masių spektrometrijos tyrimams yra būtina speciali įranga ir analitiniai įgūdžiai, tačiau masių spektrometrija – tikslus ir greitas lektinų identifikacijos būdas. Priklausomai nuo techninių galimybių ir pasirinktos tyrimų strategijos galima nustatyti ne tik analizuojamo junginio aminorūgščių seką, bet ir įvairias potransliacines modifikacijas.

1.3.3. Kiekinė lektinų analizė

Kiekiniai lektinų analizė naudojami modifikuoti kokybinės analizės metodai. Pusiaus kiekinis hemagliutininio titro nustatymo metodas – greitas būdas norint nustatyti lektinų kiekį mėginyje, o kiekinis masių spektrometrijos metodas, naudojant standartų medžiagas, leidžia nustatyti konkretaus analizuojamo lektino kiekį tiriamajame mėginyje.

Hemagliutininio titro nustatymas

Hemagliutinacijos testas yra patogus ne tik lektinų kokybinei analizei, bet yra pritaikomas ir pusiau kiekiniam lektinų tyrimui. Naudojant šį metodą galima nustatyti analizuojamo lektino hemagliutinacinį tūrą $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ baltymų pavyzdžio. Tūru $^{-1}$ laikomas didžiausias lektinų tirpalo praskiedimas, kuriame dar matoma eritrocitų agliutinacija. Jis parodo lektino kiekį $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pavyzdžio [175].

Kiekinė lektinų analizė masių spektrometrijos metodu

Klasikinis kiekinis baltymų nustatymas remiasi dvikryptės elektroforezės gelių analize, palyginant ant gelių nudažytų baltymų dėmelių ploto dydį bei intensyvumą ir identifikuojant baltymą masių spektrometrijos metodu [199]. Pastebėjus koreliaciją tarp baltymų peptidų kiekio ir smailių ploto, bei MS/MS spektrų smailių intensyvumo, tik masių spektrometrija paremti baltymų kiekinio nustatymo metodai sulaukė didesnio susidomėjimo. Biologiniuose mėginiuose lektinų kiekinė analizė masių spektrometrijos metodu vykdoma, naudojant žymekliais pažymėtus peptidus arba žymekliais nepažymėtus peptidus.

Kiekiniam nustatymui naudojami žymekliais pažymėti baltymo peptidai yra tiriamo baltymo peptidų analogai, kurių masė yra padidinta žinomu dydžiu. Prijungus masių žymeklį šiek tiek padidėja tiriamojo baltymo peptidų

masės, tačiau tai nepakeičia pažymėto („sunkaus“) ir nepažymėto („lengvo“) baltymo bei jo peptidų sulaikymo laiko. Modernioje proteomikoje naudojami metabolinio ir cheminio žymėjimo metodai.

Metabolinio žymėjimo strategija paremta ląstelių kultūrose, grybeliuose arba bakterijose *in vitro* sintetintų baltymų žymėjimu izotopais. Pavyzdžiui, pažymint sintetintus baltymus ir peptidus izotopu ^{15}N , ląstelių ar bakterijų mitybinė terpė papildoma ^{15}N izotopą turinčiomis druskomis. Norint pažymėti baltymus ^{13}C izotopu, į mitybinę terpę pridedama šiuo izotopu pažymėtos gliukozės. Taip pat *in vitro* sintetintus baltymus galima pažymėti ^{13}C ar ^{15}N izotopais, kai mitybinė terpė papildoma šiais izotopais pažymėtomis aminorūgštimis (dažniausiai naudojamos aminorūgštys – lizinas ir argininas) [27, 123]. Naujausi metabolinio proteomos žymėjimo izotopais metodai leidžia pažymėti ir tirti *in vivo* susintetintus baltymus [181].

Cheminio žymėjimo metodai (prie tiriamųjų baltymų prijungiant afininius, izobarinius arba izotopinius žymeklius) pritaikomi visiems baltymų mėginiams, pasibaigus jų metabolinei sintezei. Tuo atveju baltymų ir peptidų mėginiai pažymimi žinomos masės molekulėmis, prijungiant jas kovalentiniais ryšiais. Pavyzdžiui, prie vieno iš dviejų tiriamųjų baltymų mėginio gali būti prijungtas izotopais pažymėtas afininis žymeklis – jodacetamidas, sujungtas su biotinu per tiltelį, sudarytą iš anglies atomų grandinėlės, turinčios aštuonis deuterio atomus („sunkusis žymeklis“). Prie antrojo tiriamojo baltymų mėginio prijungiamas tas pats jodacetamido žymeklis, sujungtas su biotinu per tiltelį, sudarytą iš anglies atomų grandinėlės, turinčios lengvojo vandenilio atomus („lengvasis žymeklis“). Tuomet, sunkiuoju ir lengvuoju žymekliu pažymėtų dviejų baltymų mėginių masių spektro smailės viena nuo kitos bus nutolusios per 8 Da m/z atstumą. Pirma analizė, matoma masių spektre, bus pažymėta „lengvuoju“ žymekliu, o antra – pažymėta deuterio turinčiu, „sunkiuoju“ afininiu žymekliu [66].

Kitas cheminio žymėjimo būdas – panaudojant izobarinius (vienodos nominalios masės) žymeklius. Šiuo metodu pažymimas peptidų mišinys, prieš tai tiriamąjį baltymą suskaidžius tripsinu į peptidus. Dažniausiai naudojami specifiskai su peptidų N gale esančiu azotu reaguojantys žymekliai. Jų struktūra sudaryta iš trijų dalių: su azotu reaguojanti grupė (gali būti įvairios struktūros, pvz. 2-hidroksiciklopentan-1,3-dionas arba N-hidroksisukcinimidas), signalinė N-metilpiperazino grupė, pažymėta izotopais: ^{13}C , ^{15}H arba ^{18}O , ir žymeklio masės suvienodinimo grupė. Izobariniais žymekliais pažymėti tos pačios masės peptidai iš kolonėlės išeina vienodu sulaikymo laiku, o po pirmos fragmentacijos masių analizatoriuje gaunama viena šių peptidų jonų smailė. Tik atlikus antrąją peptidų jonų fragmentaciją masių analizatoriuje atsiskiria izobarinių žymeklių fragmentai – signalinės nedidelės

(126–131 m/z) masės molekulės. Pagal šių signalinių molekulių masių spektro smailių intensyvumą galima nustatyti peptidų kiekį mišinyje [168].

Cheminio-izotopinio žymėjimo metodas paremtas izotopų turinčių žymeklių kovalentiniu prijungimu prie baltymų. Taikant kiekinę peptidų analizei deuterio žymeklį, vykdomas peptidų dimetilinimas (deuterio turinčiais radikalais). Atliekant peptidų žymėjimą ^{18}O atomais, baltymų skaidymo metu pridodamas „sunkusis vanduo“, kurio visi deguonies (^{16}O) atomai yra pakeisti sunkiuoju deguonies (^{18}O) atomu [210].

Kiekinis baltymų nustatymas, naudojant žinomos masės žymeklius, tinka nustatant santykinę analizuojamų analizių kiekį. Tačiau šiam metodui reikalingi brangūs žymekliai su izotopais, specifinė programinė įranga ir analitiniai įgūdžiai. Be to, ne visiems tyrimų objektams šis metodas tinka ir dažnai yra svarbesnis baltymo absoliutaus kiekio nustatymas [129].

Bežymeklinis baltymų kiekinis nustatymas vykdomas, remiantis keliomis strategijomis. Pirmosios strategijos principas – lyginami tiriamojo mėginio chromatografinių smailių plotai ir masių spektro smailių intensyvumas su žinomos koncentracijos peptido standarto chromatografinės smailės plotu ir masių spektro smailės intensyvumu. Pavyzdžiui, ankstesnių tyrimų metu nustatyta peptidų chromatografinių smailių ploto ir masių spektro smailių intensyvumo tiesinė priklausomybė nuo peptidų koncentracijos ($r^2=0,9978$), kai peptido koncentracija mėginyje varijavo nuo 10 fmol iki 1000 pmol [17, 135].

Alternatyva pirmajai strategijai – bežymeklis santykinio baltymų kiekio nustatymas, paremtas pastebėjimu, kad didesnis baltymo kiekis mėginyje po fragmentacijos masių spektre bus matomas proporcingai intensyvesnių smailių pavidalu. Baltymo kiekio mėginyje skaičiavimas atliekamas pritaikant algoritmus [77], paskaičiuojant baltymo kiekio indeksą (baltymo kiekio indeksas – visų mėginyje užfiksuotų peptidų kiekio santykis su identifikuotų atskirų baltymų peptidų kiekiu [111, 115]. Šiuos skaičiavimus galima atlikti, pasitelkus Mascot programinę įrangą [173, 196].

Kiekinės analizės rezultatų tikslumui būtinos vienodos eksperimento sąlygos: temperatūra, buferių pH reikšmė, joninė jėga, mėginio sumaišymo greitis. Kiekinis masių spektrometrijos metodas išsiskiria specifiskumu – naudojant šį metodą galima ir neišgrynintuose baltymų mėginiuose nustatyti tiriamų lektinų kiekį, tačiau tyrimo metodas reikalauja ypatingų analitinių įgūdžių.

1.4. *Echinacea purpurea* (L.) Moench vaistinės augalinės žaliavos – šaknų, fitocheminė sudėtis ir vartojimas medicinoje

Rausvažiedė ežiuolė (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) – graižaziedžių (*Compositae*) šeimai priklausantis vaistinis augalas. *Echinacea* Moench genties atstovai yra endeminės Šiaurės Amerikos rūšys, paplitusios didžiosiose lygumose, nuo Apalačių kalnų rytuose ir Uolinių kalnų vakaruose [14].

Rausvažiedžių ežiuolių vaistinėje augalinėje šaknų žaliavoje vyrauja polisacharidai (39,2–79,8 proc.) - inulinas, arabinoranolgalaktanai ir heteroksilainai [39], kavos rūgšties dariniai: kavos, cichoro, kaftaro, chlorogeno rūgštys (2–3 proc.) [139], lipofiliniai alkilamidai (2,03–5,46 proc.) [147][101], eterinio aliejaus junginiai: borneolis, bornilo acetatas, kariofilenas, kariofileno oksidas, humulenai (0,05–0,48 proc.) [133].

Tradicinėje liaudies medicinoje rausvažiedžių ežiuolių vaistinė augalinė žaliava vartota Šiaurės Amerikos Indėnų gentyse. Augalinė žaliava buvo vertinama dėl žaizdas, gyvačių įgėlimus ir peršalimą gydančių savybių [22]. Modernioje medicinoje rausvažiedžių ežiuolių preparatai tiriami ir vartojami nuo 20 amžiaus pradžios. Manoma, kad už imunomoduliacinį poveikį *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų žaliavoje yra atsakingi polisacharidai ir kavos rūgšties dariniai. *In vitro* tyrimų metu įvertinta vandeninių rausvažiedžių ežiuolių šaknų ekstraktų, kurių sudėtyje sudarė nustatyta apie 80 proc. polisacharidų, įtaka T limfocitų funkcijai. Gauti tyrimo rezultatai parodė, kad 12-*O*-tetradekanoilforbolio-13-acetatu ir jodacetamidu aktyvuo-tų Jurkat ląstelių liniją paveikus tokiu ekstraktu pasireiškė nuo dozės stipriai priklausantis interleukino-2 ir γ -interferono sintezės suintensyvėjimas [58]. Vandeniniu rausvažiedžių ežiuolių šaknų ekstraktu paveikus Balb/C pelių splenocitus *in vitro*, ląstelėse suintensyvėjo interleukinų 6 ir 10, TNF- α ir makrofagų uždegimo baltymo (MIP-1 α) sintezė [74]. Tačiau kiti tyrimai su rausvažiedžių ežiuolių šaknų vandeniniu ekstraktu atskleidė, kad toks ekstraktas neturėjo stimuliuojančio poveikio NK ląstelėms [49], bet pasi-žymėjo prieš uždegiminį poveikį, pasireiškiančiu per fosfatidilinozitolio-3-kinazės/Akt baltymo signalinį kelią [55].

Rausvažiedžių ežiuolių šaknų žaliavoje aptinkamos kavos rūgštys ir alkilamidai pasižymi antioksidantiniu poveikiu [202]. Etanolinis šaknų žaliavos ekstraktas, kuriame nustatyti kavos rūgšties dariniai ir alkilamidai, stimuliuo-vo CD49⁺ ir CD19⁺ limfocitus blužnyje ir NK ląstelių citotoksiškumą, α in-terferono sintezę, tačiau blokavo TNF- α ir IL-1 sintezę *in vivo* [217]. Kitų *in vivo* tyrimų metu nustatyta, kad *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų eta-nolinis ekstraktas (priklausomai nuo dozės) stimuliuo interleukino 6 ir

TNF- α ekspresiją, tačiau šio ekstrakto alkilamidų frakcija pasižymėjo ekspresiją slopinančiu poveikiu *in vivo* [17].

Tyrimų rezultatai parodė, kad nuo *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų ekstrakto cheminės sudėties gali kisti ir jo poveikis. Cheminės sudėties skirtumai atsiranda dėl skirtingų vaistinių augalų auginimo ir klimatinių sąlygų bei ekstrakcijos metodų – vandeniniuose ekstraktuose nustatyta daugiau polisacharidų, tuo tarpu etanoliniuose ekstraktuose – fenolinių rūgščių ir alkilamidų.

2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Baltymai, išskirti iš dvejų metų amžiaus rausvažiedės ežiuolės (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) šaknų vaistinės augalinės žaliavos, surinktos 2014 ir 2015 metų spalio mėnesį Vytauto Didžiojo universiteto Kauno botanikos sodo vaistinių augalų skyriuje.

2.2. Reagentai ir medžiagos

2.2.1. Reagentai

Ac-galaktozė ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); amonio sulfatas ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); D-(+)-galaktozė ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); D-(+)-gliukozė ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); dinatrio hidrofosfatas ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); jakalino lektino standartas ($\geq 97,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); D-(–)-fruktozė ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); jaučio serumo albuminas (BSA) ($\geq 96,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); D-(+)-ksilozė ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); α -laktozės monohidratas ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); D-(+)-maltozės monohidratas ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); D-(+)-manozė ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); N-ac-gliukozaminas ($\geq 95,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); natrio chloridas ($\geq 99,5$ proc.); natrio dodecilsulfatas (SDS) ($\geq 99,5$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); natriodihidrofosfatas ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); polivinilpolipirolidonas (PVPP) (~ 110 μm dalelių dydžio) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); D-(–)-ribozė (≥ 99 proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); skruzdžių rūgštis Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); sukrozė ($\geq 99,5$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); γ -aminokaproino rūgštis ($\geq 99,0$ proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Vokietija); peptidoglikanus prijungiančio lizino domeno standartas, pagal užsakymą įsigytas

Sigma-Aldrich Chemie GmBh (Steinheim, Vokietija); tripsinas 25 g/l Biochrom GmbH (Berlynas, Vokietija); Coomasie brilliantinis mėlynasis dažiklis Roti[®]-Quant Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Vokietija); suskystintas azotas, įsigytas UAB Gaschema (Jonava, Lietuva). manozės-Separopore[®] 4B-CL afininė matrica, įsigyta GE Healthcare AB (Helsinkis, Švedija). Išgrynintas dejonizuotas vanduo (18,2 mΩ/cm), ruoštas „Millipore“ (JAV) vandens valymo sistema. Naujosios Zelandijos baltųjų triušių kraujo eritrocitai (LSMU Veterinarijos akademija).

Poliakrilamidas/Bis-akrilamido 19:1 tirpalas (30 proc.) elektroforezės geliams BioRad Laboratories (Helsinkis, Suomija); baltymų dydžio standartai (dalelių dydis 10–200 kDa, rinkinys PageRuler[™]) UAB Fermentas (Vilnius, Lietuva); Tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris bazė) (≥ 99,0 proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmBh (Steinheim, Vokietija); polietilenglikolio sorbitano monolauratas (Tween[®]), Sigma-Aldrich Chemie GmBh (Steinheim, Vokietija); polivinildieno fluorida (PVDF) blotingo membrana (porų dydis 0.2 μm) Sigma-Aldrich Chemie GmBh (Steinheim, Vokietija).

Pirminis antikūnas: anti-ksilozės polikloninis antikūnas, išskirtas iš triušių serumo DAKO Denmark A/S (Glostrup, Danija); antrinis antikūnas: anti-triušių antrinis polikloninis antikūnas, išskirtas iš ožių serumo, sujungtas su šarmine fosfataze, įsigytas DAKO Denmark A/S (Glostrup, Danija); CDP Star[®] chemiliuminescenciniai dažai (0,25 μM) Sigma-Aldrich Chemie GmBh (Steinheim, Vokietija); rentgeno plokštelės AGFA-Gevaert N. V. (Morstelis, Belgija).

Etanolis (96,6 proc.) AB Vilniaus degtinė (Vilnius, Lietuva); acetonitrilas gradientinio švarumo, kavos rūgšties standartas (≥ 98,0 proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmBh (Steinheim, Vokietija); fiziologinis natrio chlorido tirpalas AB Sanitas (Kaunas, Lietuva).

Parafino granulės, ksilenas histologinio grynumo, izopropanolis (≥ 98,0 proc.) Sigma-Aldrich Chemie GmBh (Steinheim, Vokietija). Išlaisvinantis tirpalas (pH reikšmė 9,0) DAKO Denmark A/S (Glostrup, Danija); 3,3'-diaminobenzidinetrahydrochlorido+chromogeno tirpalas DAKO Denmark A/S (Glostrup, Danija), CD3 antikūnas DAKO Denmark A/S (Glostrup, Danija).

2.2.2. Buferinių tirpalų sudėtis

Fosfatinis (PBS) buferis: 7,6 mM Na₂HPO₄, 2,3 mM NaH₂PO₄, 0,15 mM NaCl, pH reikšmė 7,4. *Kolonėlės paruošimo buferis:* 0,5 M NaCl, 20 proc. (v/v) etanolio. *PBS-laktozės buferis:* 7,6 mM Na₂HPO₄, 2,3 mM NaH₂PO₄, 0,2 M laktozės, pH reikšmė 7,4. *NDS-PAGE elektroforezės buferis:* 19,2 mM Tris-HCl, 2,5 mM glicino, 0,1 proc. (m/v) NDS.

Elektroforezės metu naudojamas pavyzdžių buferis (×5): 10 proc. (m/v) NDS, 10 mM β-merkaptoetanolio, 20 proc. (v/v) glicerolio, 0,2 M Tris-HCl, 0,05 proc. (m/v) bromfenolio mėsio, pH reikšmė 6,8. *Imunocheminės analizės metu naudojamas pernašos buferis*: 25 mM Tris-HCl, 200 mM glicino, 20 proc. (v/v) etanolio. *Tris-bazės (TBS) buferis*: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH reikšmė 7,4. *Fiksacinis tirpalas*: 1,58 M natrio tiosulfato, 0,12 M bevandenio natrio sulfito, 28 proc. acto rūgšties, 58 mM kalio alūno sulfato. *Ryškinantis tirpalas*: 2,9 M metolio, 22,7 mM hidrochinolono, 0,395 M bevandenio natrio sulfito, 2,6 M natrio borato. *Histocheminių mėginių paruošimui naudojamas blokuojantis buferis*: TBS, 4 proc. (m/v) BSA. *Aktyvacijos buferis*: 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂.

2.2.3. Laboratorinė įranga

Magnetinė maišyklė RTC basic IKAMAG®, smulkinimo malūnėlis M20IKA® Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Vokietija), centrifuga Heraeus Stratos 10513822 Thermo Fisher Scientific Inc. (Pitsburgas, PA, JAV), pH matuoklis pH1100 VWR International (Randoras, PA, JAV), spektrofotometras Spectronic camspec M550 UV/VIS (Lydsas, Jungtinė karalystė), spektrofotometras NanoDrop™ 2000 Thermo Fisher Scientific (Vilmingtonas, DE, JAV), ultragarso vonelė Elmasonic P Elma Schmidbauer GmbH (Zingenas, Vokietija), tuščia chromatografinė kolonėlė XK 16/20 GE Healthcare AB (Helsinkis, Švedija), chromatografinis siurblys Waters 1500, pusiau preparatyvinės chromatografijos sistema, sudaryta iš binarinio chromatografinio siurblio Waters 1525, mėginių paskirstymo sistemos Waters 2767, diodų matricos detektoriaus Waters 2998, eluentų paskirstymo bloko SFO Waters – Waters Corporation (Milfordas, MA, JAV).

Elektroforezės sistema Mini-protean® ir imunocheminės analizės sistema Trans-Blot® Turbo™ su elektros šaltiniu PowerPac™ BioRad Laboratories (Helsinkis, Suomija), vakuuminė centrifuga Eppendorf Vacufuge 5301 (Hamburgas, Vokietija).

Skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos sistema peptidų identifikacijai, sudaryta iš chromatografinės sistemos Ultimate 3000 RSLC-Thermo Fisher Scientific Inc. (Pitsburgas, PA, JAV) ir masių spektrometro Maxis 4G UHR-TOF su Captive spray (jonų gaudyklės) jonizacijos šaltiniu – Bruker (Billerica, MA, JAV).

Skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos sistema peptidų kiekiniam nustatymui: Waters Acquity H-class UPLC (Milfordas, MA, JAV) su TQ-S (trigubo kvadrupolio) masių spektrometrinės detekcijos sistema Waters, skirstymui naudota Acquity CSH-C18 chromatografinė kolonėlė (150 mm × 2,1 mm Ø, dalelių dydis 1,7 μm) Waters (Milfordas, MA, JAV).

Mėgintuvėliai Vacutainer® su heparinu ir Vacutainer®, padengti etilendiamintetraacto rūgštimi (EDTA) – Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ, JAV), hemocitometras Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Vokietija), melanžetė Thomas Scientific (Swedesboro, NJ, JAV), mikroskopai Olympus CX21 ir Olympus BX51 su kamera Olympus DP70 (Tokijas, Japonija), histologinių preparatų procesorius Shandon Pathscentre Thermo Electron Corporation (Cheshire, Jungtinė Karalystė), histologinių preparatų skeneris Panoramic MIDI II (3DHISTECH, Vengrija), parafininių blokų formavimo centras TBS88 Medite GmbH (Burgdorf, Vokietija), rankiniu būdu valdomas rotacinis mikrotomas Leica RM2125RT Leica Biosystems (Veclaras, Vokietija), mikro bangų įrenginys RHS-1 (Soriso, Italija).

Naudota programinė įranga: MassLynx™ Waters Corporation (Milfordas, MA, JAV), Panoramic Viewer 1.15.2 iš 3DHISTECH Kft. (Budapeštas, Vengrija), Matrix – Matrix Science (Bostonas, MA, JAV).

2.3. Tyrimo metodai ir metodika

2.3.1. *Echinacea purpurea* (L.) Moench vaistinės augalinės žaliavos paruošimas ir laikymas

Tyrimui naudota Lietuvos sąlygomis introdukuotos rausvažiedžių ežiulių šaknų žaliava, surinkta Vytauto Didžiojo universiteto, Kauno botanikos sode [165]. *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknys iškastos rudenį (spalio mėn.). Ant šaknų likusi smulkių žemės priemaišų dalis nuplauta šaltu tekančiu vandeniu. Popieriniu rankšluosčiu nusaustos nesmulkintos rausvažiedžių ežiulių šaknys užšaldytos -20 ± 2 °C temperatūroje. Šaknų žaliava atšildyta tik prieš pat baltymų išskyrimą.

2.3.2. Baltymų išskyrimas iš *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų ir lektinų gryninimas

Baltymų išskyrimas iš *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų ir lektinų gryninimas iš baltymų vykdytas trimis etapais. Pirmajame etape pagamintas vandeninis baltymų ekstraktas, kuris naudotas tolimesniam baltymų išsūdymui. Vėliau atliktas išsūdytų baltymų frakcijų hemagliutininio aktyvumo testas. Didžiausiu hemagliutinininiu aktyvumu pasižyminti baltymų frakcija naudota lektinų gryninimui afininės chromatografijos metodu.

Baltymų vandeninio ekstrakto gamyba

Prieš ekstrakciją atšildyta rausvažiedžių ežuolių šaknų žaliava skalpeliu supjaustyta į mažesnius, iki 1 cm ilgio, gabalėlius. Tokiu būdu paruošta žaliava sudėta į smulkinimo malūnėlį, suskystintu azotu atšaldyta iki $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ ir homogenizuota 5 min. Susmulkinta šaknų žaliava perkelta į porcelianinę grūstuvę ir rankiniu būdu piestele pertrinta su suskystintu azotu iki 0,5–1,5 mm dydžio dalelių. Taip paruošta šaknų žaliava naudota pirminio baltymų ekstrakto gamybai.

50 g homogenizuotų rausvažiedžių ežuolių šaknų 2 val. ekstrahuota fosfatinio buferiu (PBS) su 2 proc. (*m/v*) PVPP ir 5 mM γ -aminokaproino rūgšties pastoviai maišant magnetine maišykle, $4 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Naudotas žaliavos ir ekstrakcinio buferio santykis 1:5 (*m/m*).

Gautas ekstraktas centrifuguotas $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 20 min., panaudojant $8500 \times g$ santykinę išcentrinę jėgą. Surinktas centrifugatas toliau naudotas baltymų išsūdimui amonio sulfatu, o atskirtos žaliavos nuosėdos pašalintos.

Baltymų išsūdimas amonio sulfatu

Iš pirminio baltymų ekstrakto baltymai išsodinti juos išsūdant amonio sulfatu. Pirmoji baltymų frakcija (F_{0-60}) gauta prisotinant pirminį baltymų ekstraktą (*m/v*) amonio sulfatu iki 60 proc. Į 100 ml pirminio ekstrakto pridėta 36,1 g amonio sulfato druskos ir $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje pastoviai maišyta 2 val. Po to tirpalas su nuosėdomis centrifuguotas $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 20 min. panaudojant $8500 \times g$ santykinę išcentrinę jėgą. Gautas baltymų precipitatas atskirtas nuo centrifugato ir resuspenduotas 5 ml PBS buferio, pH reikšmė 7,4. Pirmos frakcijos centrifugatas toliau naudotas baltymų išsūdimui jį prisotinant amonio sulfatu nuo 60 iki 80 proc. (*m/v*) Antroji baltymų frakcija (F_{60-80}) gauta į 100 ml pirmos frakcijos centrifugato pridėdant 12,9 g amonio sulfato druskos. Tirpalas paliktas išsodinimui 16 val. pastoviai maišant magnetine maišykle $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Pasibaigus išsodinimo laikui, toks tirpalas centrifuguotas $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 20 min. panaudojant $8500 \times g$ santykinę išcentrinę jėgą. Po centrifugavimo gautos nuosėdos resuspenduotos 5 ml PBS buferio (pH reikšmė 7,4), o centrifugatas prisotintas amonio sulfato druska nuo 80 iki 100 proc. (*m/v*). Trečioji baltymų frakcija (F_{80-100}) gauta į 100 ml antrosios frakcijos centrifugato pridėdant 13,9 g amonio sulfato druskos. Tirpalas paliktas baltymų išsodinimui 10 val. pastoviai maišant magnetine maišykle $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po to baltymų tirpalas centrifuguotas $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 20 min. panaudojant $8500 \times g$ santykinę išcentrinę jėgą. Gautos nuosėdos resuspenduotos 5 ml PBS buferio (pH reikšmė 7,4), o centrifugatas pašalintas.

Pagamintos trys amonio sulfatu išsūdytos baltymų frakcijos: F_{0-60} ; F_{60-80} ir F_{80-100} išvalytos dializės pagalba. Naudojant membraną (MWCO, 10 000 Da) suformuotas dializės maišelis, kuris pripildytas frakcijų mėginiais. Dializės maišeliai sudėti į 1 l talpos chemines stiklines, pripildytas PBS (pH reikšmė 7,4) tirpalo, ir dializuoti pastoviai maišant 12 val., 4 °C temperatūroje, kas 4 val. pakeičiant PBS buferį. Gautos frakcijos, išvalytos nuo mažamolekulinių (< 10 000 Da) junginių, naudotos tolesnėje analizėje. Mėginiai surinkti, pagal metodą aprašytą 2.3.4 skyriuje išmatuotas bendras baltymų kiekis, nustatytas hemagliutinacinis titras ir atlikti hemagliutinacijos inhibicijos angliavandeniais testai, aprašyti 2.3.3 skyriuje.

Lektinų gryninimas afininės chromatografijos metodu

Didžiausiu hemagliutinaciniu titru pasižymėjusi baltymų frakcija F_{60-80} toliau naudota lektinų gryninimui afininės chromatografijos metodu. Atlikus hemagliutinacijos inhibicijos testą, aprašytą 2.3.3 skyriuje, buvo nustatytas baltymų mišinyje esančių lektinų didžiausias specifiškumas D-manozės ir laktozės molekulėms. Pagal gamintojo nurodymus chromatografinė kolonėlė XK 16/20 užpildyta manozės-Separopore[®] 4B-CL afinine matrica.

Prieš chromatografinį skirstymą atliktas 30 min. trukmės lygsvarinimas PBS buferiu (Eliuentas A). Gryninimui naudota didžiausiu hemagliutinaciniu titru pasižyminti baltymų frakcija F_{60-80} . Ši frakcija išskirstyta pagal baltymų giminingumą (afiniškumą) manozei, imobilizuotai ant kolonėlės matricos. Į kolonėlę injekuota 1000 μ l (1,14 mg) F_{60-80} baltymų mėginio, esant judrios fazės tekėjimo greičiui – 1 ml/min. Po mėginio injekcijos kolonėlės eliuacija vykdyta dviem etapais. Pirmąsias 30 min. elientu A iš kolonėlės išplauti su afinine matrica nesąveikaujantys baltymai. Antrame etape, pirmąją minutę (nuo 30 iki 31 min.) tolygiai didinta eliuento B (0,2 M laktozės PBS buferyje) koncentracija nuo 0 iki 100 proc. (m/v), eliuacija vyko iki 50 min. Šiame gryninimo etape hemaglutininai, prisijungę prie eliuente B esančios laktozės molekulių, konkurenciniu būdu išstumti nuo kolonėlės matricos. Abiejų gryninimo etapų metu "išėję" baltymai surinkti į 2 ml tūrio frakcijas, patikrintas gautų frakcijų hemagliutinacinis aktyvumas, frakcijos 4 kartus sukonzentruotos ir nustatytas bendras baltymo kiekis frakcijose.

Chromatografinio skirstymo metu užregistruotos chromatogramos, duomenys išsaugoti ir apdoroti, naudojant „MassLynx Mass Spectrometry Software“ („Waters“, JAV) programinę įrangą, analičių išėjimo iš kolonėlės detekcijai naudotas fotodiodų matricos detektorius.

2.3.3. Iš *Echinacea purpurea* (L.) Moench šviežių šaknų žaliavos išskirtų baltymų ir lektinų kokybinė analizė

Pirminė kokybinė lektinų analizė, atliekant hemagliutinacinio aktyvumo testą, atlikta po kiekvieno gryninimo etapo. Taip pat vykdytas lektinų specifškumo angliavandeniams nustatymas, kuris yra svarbus pasirenkant afinišės chromatografijos gryninimo metodo ligandą. Ši imunocheminė analizė atskyrė aktyvioje frakcijoje esančius baltymus, kurie kokybiškai identifikuoti masių spektrometrijos metodu.

Hemagliutinacinio aktyvumo testas

Triušių kraujo mėginių paruošimas hemagliutinacijos testui

Triušių kraujo mėginiai gauti iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademijos Anatomijos ir fiziologijos katedros ir Vivariumo. Pagal Dhuna ir bendraautorių metodiką [46] paruošta 2 proc. (v/v) Naujosios Zelandijos baltųjų triušių kraujo suspensija, kurios 1 ml yra $3,5 \times 10^9$ eritrocitų. Kraujo mėginiai surinkti į Vacutainer® mėgintuvėlius su heparinu ir iki suspensijos ruošimo laikyti ne ilgiau kaip 3 dienas 4 °C temperatūroje.

1 ml triušio kraujo mėginio suspenduota 14 ml PBS buferinio tirpalo (pH reikšmė 7,4) ir 10 min. centrifuguota 800 aps/min. greičiu, 4 °C temperatūroje. Gautas centrifugatas nupiltas, o nuosėdose esanti eritrocitų masė resuspenduota 15 ml PBS buferinio tirpalo (pH reikšmė 7,4). Centrifugavimas ir gautos eritrocitų masės resuspendavimas PBS pakartotas 4 kartus.

Po 4 plovimų eritrocitų masė suspenduota 7,5 ml tripsino tirpalo (1 mg tripsino/1ml PBS (pH reikšmė 7,4)). Toks mėginys inkubuotas termostate 37 °C temperatūroje 1 val., pastoviai maišant rotaciniais judesiais. Pasibaigus inkubacijai tripsinu apdorota eritrocitų suspensija 10 min. centrifuguota 800 aps/min. greičiu, 4 °C temperatūroje. Gautas centrifugatas nupiltas, o išsodinta eritrocitų masė suspenduota 15 ml PBS, pH reikšmė 7,4. Centrifugavimo ir eritrocitų masės suspendavimo procedūra pakartota 4 kartus. Paibaigus tripsinu paveiktos eritrocitų masės plovimą, ląstelės suspenduotos 15 ml PBS, pH reikšmė 7,4. Paruošta eritrocitų suspensija laikyta 4 °C temperatūroje ne ilgiau kaip 1 savaitę.

Hemagliutinacinio aktyvumo nustatymas

Į plokščiadugnius imunofermentinių reakcijų lėkštelės šulinėlius įpilta po 50 μ l PBS (pH reikšmė 7,4) tirpalo. Į pirmą šulinėlį įpilta 50 μ l baltymų ekstrakto, išmaišyta pipetuoiant. Į šulinėlį įpilta 50 μ l 2 proc. tripsinu apdorotų triušio kraujo eritrocitų suspensijos. Mikro plokštelė švelniai pamaišyta rotaciniais judesiais ir uždengta. Po 60 min. inkubacijos, esant 22 °C temperatūrai, mikroskopuojant 4 $\times$ objektyvu stebėta eritrocitų reakcija į baltymų mėginį. Frakcija laikyta pasižyminčia hemagliutinaciniu aktyvumu tuo atveju, kai regimajame lauke buvo matomos į gumulėlius sukibusios eritrocitų ląstelės. Tuo tarpu aktyvumo neturinti frakcija nesukėlė eritrocitų ląstelių sukibimo, o šulinėlio dugne buvo matomos tolygiai dugną padengusios ląstelės [1]. Neigiamai kontrolei naudotas PBS buferis, teigiamai kontrolei – jalkalino lektino standartas.

Pagal 1 formulę apskaičiuotas specifinis hemagliutinacinis aktyvumas (HA), išreikštas hemagliutinacinio titro (T) santykiu su baltymų kiekiu (mg) frakcijoje (m_F). Nustatytas HA hemagliutinacinio aktyvumo vienetais (HU) 1 mg baltymo. Taip pat apskaičiuota minimali baltymo koncentracija (C_{min}), sukelianti 2 proc. triušio eritrocitų suspensijos hemagliutinaciją. C_{min} yra lygi baltymų koncentracijos (C, μ g/ml) tiriamajame mėginyje santykiui su hemagliutinaciniu titru (T) (2 formulė). Iš gautų duomenų pagal 3 formulę paskaičiuotas baltymų gryninimo laipsnis (GL), kuris parodo, kiek kartų baltymas buvo išgrynintas, palyginus su pradiniu vandeniniu baltymų ekstraktu. GL yra lygus vandeninio baltymų ekstrakto minimalios koncentracijos (C_e), sukeliančios hemagliutinaciją, santykiui su tiriamojo mėginio C_{min} .

$$HA = \frac{T}{m_F} \text{ (1 formulė)} \quad C_{min} = \frac{C}{T} \text{ (2 formulė)}$$
$$GL = \frac{C_e}{C_{min}} \text{ (3 formulė)}$$

Kuo daugiau lektinas yra išgrynintas, tuo didesnis jo hemagliutinacinis aktyvumas (HU/mg) ir grynumo laipsnis, o C_{min} reikšmė mažėja.

Hemagliutinacijos inhibicijos angliavandeniais tyrimas

Hemagliutinacijos inhibicijos testas atliktas pagal Silva M.C.C. ir bendraautorų pateiktą metodiką [186]. Imunofermentinių reakcijų plokštelėse su konusinės formos šulinėlių dugnu atlikti pasirinkto angliavandenio praskiedimai PBS tirpalu, esant pradinei 400 mM angliavandenio koncentracijai pirmame šulinėlyje ir 0,4 mM koncentracijai – paskutiniame. Galutinis ang-

liavandenio tirpalo tūris – 50 µl. Į šulinėlius su praskiestu angliavandeniu užnešta po 2 µg (50 µl) F₆₀₋₈₀ baltymų frakcijos mėginių. Turinys lėkštelėje švelniai sumaišytas ir paliktas 20 min. trukmės inkubacijai 22 °C temperatūroje. Pasibaigus inkubacijos laikui į kiekvieną šulinėlį įpilta po 50 µl 2 proc. triušių eritrocitų suspensijos. Turinys lėkštelėje pakartotinai švelniai sumaišytas ir paliktas 60 min. Tuomet įvertintas inhibicinis poveikis angliavandeniui. Hemagliutinacijos inhibicijos testui naudoti šie angliavandeniai: ksilozė, ribozė, fruktozė, D-gliukozė, D-galaktozė, D-manozė, laktozė, sacharozė, maltozė, acetilgalaktozaminas, N-acetilgliukozaminas.

Lektinų kokybinis vaizdinimas imunocheminės analizės metodu

Afininės chromatografijos metodu atskirta ir surinkta hemagliutinaciniu aktyvumu pasižyminti lektinų frakcija ištirta imunocheminės analizės (angl. *Western blot*) metodu. Atliktas lektinų frakcijos skirstymas vienakryptės vertikalios elektroforezės sistemoje, į gelį pridedant denatūruojančio natrio dodecilsulfato. Ant 12 proc. (v/v) natrio dodecilsulfato – poliakrilamido elektroforezės gelio (NDS-PAGE) užnešta 1 µg lektinų frakcijos mėginių pavyzdžių buferyje ir 5 µl baltymų standarto PageRuler™ (10–170 kDa). Elektroforezinis skirstymas vyko 2 val. esant 12 mA srovės stipriui. Pasibaigus elektroforezei NDS-PAGE gelyje išskirstyti baltymai perkelti ant PVDF blokingo sudrėkintos membranos, naudojant pusiau sausos pernašos imunoblokingo sistemą Baltymų perkėlimas ant membranos vykdytas 80 min., naudojant pernašos buferį, esant 55 mA srovės stipriui. Pasibaigus pernašai membrana perkelta į plastikinę dėžutę ir 30 min. laikyta TBS buferyje su 3 proc. (m/v) BSA 20 °C temperatūroje. Pasibaigus šiam procesui 2 val. membrana inkubuota su anti-ksilozės antikūnu (išskirtu iš triušio) TBS buferyje (1:2500). Tuomet membrana tris kartus po 5 min. perplauta TBS buferiu ir perkelta 1 val. trukmės inkubacijai su antriniu iš ožių išskirtu anti-triušių antikūnu TBS buferyje 20 °C temperatūroje (skiedimas 1:10 000). Po žymėjimo antriniu antikūnu membrana tris kartus po 5 min. perplauta TBS ir aktyvacijos buferiais. Membrana nudažyta chemiliuminescenciniu CDP-Star® dažikliu ir vaizdinta ant fotosensibilios rentgeno plokštelės Agfa 20 s. Gautas imunoblokingo vaizdas ant rentgeno plokštelės laikytas 30 s fiksacinio tirpalo ir 15 s – ryškinančio tirpalo vonelėse. Išryškinta rentgeno plokštelė 1 min. perplauta distiliuoto vandens vonelėje, siekiant pašalinti naudotą tirpalą likučius.

Lektinų kokybinė analizė masių spektrometrijos metodu

Iš elektroforezės gelio iškirptos juostelės su glikoproteinais ir vėliau suardytos tripsinu [182]. Šios gelio juostelės išblukintos laikant 10 min. tirpale, sudarytame iš 25 mM NH_4HCO_3 ir 50 proc. (v/v) acetonitrilo. Po to gelinės juostelės dehidratuotos inkubuojant su grynu acetonitrilu 10 min. Tuomet tirpalas nusiurbtas, o dehidratuotos gelio juostelės užpildtos 100 μl tirpalu, sudarytu iš 13 ng/ μl tripsino, 5 mM NH_4HCO_3 , 10 proc. (v/v) acetonitrilo, mėginius laikant 37 °C temperatūroje 16 val. Peptidai ekstrahuoti 10 min., pridėjus 200 μl išgryninto vandens. Po to vandeninis tirpalas nusiurbtas ir laikytas tolesnei analizei, o peptidai toliau ekstrahuoti 10 min. 200 μl 50 proc. (v/v) acetonitrilo tirpalu. Abu ekstrakcijos tirpalai sujungti ir džiovinti vakuuminėje centrifugoje.

Prieš analizę išdžiovintas peptidų mėginys valytas, panaudojant C18 matricą pagal Rappsilber J. ir bendraautorių metodiką [167]. Mėginys resuspenduotas: į išdžiovintą mėgintuvėlį su peptidais įpilta 60 μl tirpiklio, sudaryto iš 2 proc. (v/v) acetonitrilo ir 0,1 proc. (v/v) trifloracto rūgšties, bei 45 s maišyta purtyklėje. Po to mėgintuvėlis centrifuguotas 1 min. $3000 \times g$ santykyje išcentrine jėga. Mikrodozatoriaus antgalyje esantis filtras C18 sudrėkintas 60 μl tirpalo, sudaryto iš 80 proc. (v/v) acetonitrilo ir 0,1 proc. (v/v) trifloracto rūgšties. Sudrėkintas antgalis centrifuguotas 2 min. $450 \times g$ santykyje išcentrine jėga, tuomet uždėtas ant mėgintuvėlio. Resuspenduotas mėginys perkeltas ant įtaisyto antgalio su C18 filtru. Toks mėgintuvėlio ir antgalio su filtru konstruktas centrifuguotas 2 min. $450 \times g$ santykyje išcentrine jėga. Centrifuguotas filtras su jame esančiais peptidais papildomai du kartus perplautas ir įtaisytas ant naujo 2 ml mėgintuvėlio. Nuo filtro peptidai išplauti eliuaciniu tirpalu, sudarytu iš 60 proc. (v/v) acetonitrilo ir 0,1 proc. (v/v) trifloracto rūgšties, centrifuguojant $450 \times g$ santykyje išcentrine jėga 2 min. Išplauti peptidai džiovinti vakuuminėje centrifugoje. Prieš analizę mėginys resuspenduotas 2 proc. (v/v) acetonitrilo ir 0,05 proc. (v/v) skruzdžių rūgšties tirpale.

Peptidų mėginys analizuotas skysčių chromatografijos – tandeminės masių spektrometrijos metodu, kartu naudojant Ultimate3000 RSLC ir Maxis 4G įrangą su Captive Spray jonizacijos šaltiniu. Matrix paieškos programine įranga atlikta baltymų identifikacija, panaudojant paprastosios saulėgražos genomo [10] ir rausvažiedės ežiulės transkriptomo *Medicinal Plant Genomics Resource* duomenų bazes. Taikyti patikimumo kriterijai: Mascot kriterijus ≥ 50 , parodantis, kaip stipriai identifikuojamo baltymo seka atitinka duomenų bazėje esančią baltymo seką [92], peptidų skaičius ≥ 2 .

2.3.4. Iš *Echinacea purpurea* (L.) Moench šviežių šaknų žaliavos išskirtų baltymų ir lektinų kiekinė analizė

Bendro baltymų kiekio nustatymas Bradford metodu

Bendras baltymų kiekis mėginiuose nustatytas fotometriniu Bradford metodu [23].

Hemagliutinacinio titro nustatymas

Į plokščiadugnius imunofermentinių reakcijų lėkštelės šulinėlius įpilta po 50 μ l PBS (pH reikšmė 7,4) tirpalo. Į pirmą šulinėlį įpilta 50 μ l baltymų ekstrakto, išmaišyta pipetuoju. Iš šio šulinėlio 50 μ l ekstrakto perkelta į kitą šulinėlį. Skiedimas pakartotas 1–8 šulinėliuose. 50 μ l mėginio iš 8 šulinėlio išpilta į atliekas. Į kiekvieną šulinėlį įpilta po 50 μ l 2 proc. tripsinu apdorotų triušio kraujo eritrocitų suspensijos. Mikro plokštelė švelniai pamaišyta rotaciniu įdėsiu ir uždengta. Vykdyta 60 min. inkubacija, esant 22 °C temperatūrai. Pasibaigus inkubacijos laikui, mikroskopuojant (4 $\times$) stebėta eritrocitų reakcija į baltymų mėginį ir nustatytas hemagliutinacinis titras (T) [1]. Baltymų mėginio hemagliutinacinis titras yra didžiausias mėginio, kuriame matoma visiška eritrocitų agliutinacija, skiedimas [96].

Lektinų kiekinis nustatymas masių spektrometrijos metodu

Lektinų kiekinė analizė atlikta pagal Bronsema ir kt. [24]. Lektino LysM peptido standartas susintetintas pagal užsakymą ir įsigytas SigmaAldrich Chemie GmBh (Steinheim, Vokietija). Tyrimui naudotas 1084 g/mol dydžio peptidas, atitinkantis identifikuoto LysM lektino konservatyvios srities aminorūgščių seką: Ala-Asp-Thr-Ile-Ile-Asp-Val-Pro-Leu-Lys. Kiekinis nustatymas atliktas tandemine aukšto slėgio skysčių chromatografijos analizės sistema Acquity H-class UPLC su TQ-S trigubo kvadrupolio Waters masių spektrometrine detekcija. Skirstymui naudota chromatografinė kolonėlė Acquity CSH-C18 (150 mm $\times$ 2,1 mm skersmens, dalelių diametras – 7 μ m). Analizės metu kolonėlė laikyta 45 °C temperatūroje. Judrią fazę sudarė: 0,1 proc. (v/v) skruzdžių rūgšties vandeninis tirpalas (eliuentas A) ir acetonitrilas (eliuentas B). Naudotas judriosios fazės gradiento kitimas: 12 proc. eliuento B nuo 0 min. iki 2 min., toliau iki 5 min. eliuentas B kito iki 45 proc., tada iki 7 min. – eliuentas B kito iki 90 proc., iki 7,5 min. eliuentas B išliko 90 proc., tada iki 8 min. eliuentas B kito iki 12 proc. ir iki 10 min. liko taip pat 12 proc. Eliuento tekėjimo greitis – 0,400 ml/min. Injekcijos tūris – 2 μ l.

Eliuentų mišinio iš kolonėlės išplautų jonizuotų peptidų masių spektrai skenuojami, taikant vienos masės jono stebėjimo režimą (SIM), esant standarto m/z reikšmei 542,8 bei peptido m/z reikšmei – 745,89 $[M+2H]^{2+}$.

2.3.5. Biologinio aktyvumo tyrimo *in vivo* modelis

Atliktas *in vivo* tyrimas su 8 savaičių 20–24 g kūno masės Balb/c eksperimentinių pelių patinėliais. Gyvūnėliai buvo įsigyti LSMU VA Vivariume ir perkelti tyrimui į LSMU Biologinių tyrimų centrą. Tiriamieji gyvūnai apgyvendinti narveliuose, laikantis geros laboratorinės praktikos taisyklių. Iki tyrimo pradžios ir tyrimo metu gyvūnai laikyti kontroliuojamos drėgmės ir temperatūros sąlygomis, 12 val./12 val. šviesos/tamsos paros ciklu. Subalansuotas graužikams komercinis pašaras bei vanduo buvo tiekiamas *ad libitum*. Valstybinė Maisto ir Veterinarijos tarnyba patvirtino leidimą tyrimui (2017-02-07, leidimo numeris G. 2-56).

Prieš tyrimą pelių patinėliai buvo aklimatizuoti 7 paras LSMU VA Gyvūnų tyrimų centre.

Pasirinktos trys tiriamųjų gyvūnų grupės po 15 individų. *Pirmoji grupė* – kontrolinė, gyvūnams atliktos peritoninės injekcijos po 50 μ l fiziologinio tirpalo. *Antrajai pelių grupei* įjekuota po 50 μ l šviežių rausvažiedžių ežiuolių šaknų tinktūros (1:5), kuri atitiko 1,36 mg/g vaistinės augalinės žaliavos dozę arba 2,55 mg sausų ekstraktiviųjų medžiagų. *Trečiajai pelių grupei* atliktos 50 μ l (250 μ g/kg) išskirtos rausvažiedžių ežiuolių šaknų LysM lėktinų frakcijos *peritoninės injekcijos*. Injekcijos atliktos 1 kartą per 7 paras, 4 savaičių laikotarpyje. Penktos savaitės pabaigoje po anestezijos anglies dioksido dujomis tiriamiesiems gyvūnams atlikta eutanazija. Punkcijos į širdį būdu iš kiekvieno apsvaiginto gyvūno paimti kraujo mėginiai perkelti į anti-koagulantu – etilendiamintetraacto rūgšties (EDTA) padengtus Vacutainer® mėgintuvėlius. Tolimesniems tyrimams naudota kiekvieno gyvūno blužnis perkelta į 10 proc. (v/v) buferinį formaldehido tirpalą.

2.3.6. *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų tinktūros gamyba ir analizė

Biologinio aktyvumo tyrimo modeliui pasirinkti tos pačios rausvažiedžių ežiuolių šviežių šaknų žaliavos du preparatai, turintys skirtingą aktyvių junginių kompoziciją (antrinius arba pirminius metabolitus). Vienai iš tiriamųjų gyvūnų grupių ($n=15$) atliktos rausvažiedžių ežiuolių šviežių šaknų etanolinės tinktūros (1:5) peritoninės injekcijos. Tinktūros gaminimo metu šviežioje vaistinėje žaliavoje esantys baltymai denatūravo etanolio poveikyje. Todėl tikėtina, kad imuninį atsaką sukelia tinktūroje esančios fenolinės rūgštys ir

kiti junginiai, pavyzdžiui, alkilamidai. Kitai tiriamųjų gyvūnų grupei skiriant išgrynintą lektinų frakciją, taip pat išskirtą iš šviežių *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų, buvo galimybė įvertinti šių baltymų poveikį imuninėms reakcijoms.

***Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų tinktūros gamyba**

Rausviedžių ežiuolių šviežių šaknų tinktūra pagaminta pagal Rezaei ir bendraautorių optimizuotą ekstrakcijos metodiką [171]. Šviežių šaknų žaliava susmulkinta iki 0,5–1,5 µm skersmens dalelių. Smulkintos žaliavos ekstrakcija vykdyta 50 proc. (v/v) vandeniniu etanolio tirpalu ultragarso vonelėje sonikuojant 10 min., palaikant 30 °C temperatūrą. Ekstrakcijai naudotos žaliavos ir ekstrahento santykis – 1:5 (m/m) (žaliavos ir ekstrahento santykis atitiko pradinio baltymų ekstrakto gamybai naudotos žaliavos ir ekstrakcinio buferio santykį 1:5).

Pabaigus ekstrakciją, tinktūra centrifuguota 20 min. 8500 × g santykine išcentrine jėga. Po to surinktas centrifugatas, o nusėdusi augalinė žaliava pašalinta. Tinktūra sukoncentruota 2 kartus rotacine vakuumine sistema ir perfiltruota per 0,2 µm porų dydžio filtrą. Tokia tinktūra naudota kokybinėje-kiekinėje analizėje ir tyrimuose su pelių modeliu *in vivo*.

Tinktūros sausojo likučio nustatymas

Tinktūros sausasis likutis nustatytas pagal Europos farmakopėjoje nurodytą metodą [54].

Tinktūros kokybinė – kiekinė analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

Etanolinės šviežių rausvažiedžių ežiuolių šaknų tinktūros (1:5) fenolinių junginių kokybinė – kiekinė analizė atlikta pagal Brown P.N. ir bendraautorių publikuotą metodiką [25] pateiktą efektyviosios skysčių chromatografijos metodą, panaudojant chromatografą „Waters 2695 Alliance“, sujungtą su diodų matricos detektoriumi „Waters 2998 PDA“. Junginių skirstymui naudota „ACE C18“ kolonėlė (250 mm × 4,6 mm, stacionariosios fazės dalelių dydis – 5 µm). Kolonėlė laikyta 35 °C temperatūroje. Skirstymui naudoti eliuantai: 0,01 proc. vandeninis fosforo rūgšties tirpalas (eliuentas A) ir 100 proc. acetonitrilas (eliuentas B). Naudotas Europos farmakopėjos monografijoje aprašytas gradientinis eliuavimo būdas: iki 13 min. eliuentas B kito nuo 10 iki 22 proc., iki 14 min. – eliuentas B kito iki 40 proc., iki

20 min. – eliuentas B išliko 40 proc. Injekuoto mėginio tūris – 10 µl, o judriosios fazės tėkmės greitis – 1,5 ml/min.

Fenolinių junginių chromatografinės smailės identifikuotos lyginant analičių ir etaloninių junginių sulaikymo laikus kolonėlėje bei jų spektrų charakteristikas 200–400 nm ilgio šviesos bangų intervale. Kiekiniui fenolinių junginių nustatymui sudaryta kalibracinė kreivė, naudojant junginio standartų skirtingų koncentracijų tirpalus. Pagal šią kalibracinę grafiką apskaičiuoti fenolinių junginių (cihoro rūgšties, chlorogeninės rūgšties, kaftarų rūgšties) kiekiai kavos rūgšties ekvivalentais. Kavos rūgštis nustatyta 320 nm šviesos bangos ilgyje.

2.3.7. Eksperimentinių Balb/c linijos pelių kraujo mėginių analizė

Leukocitų kiekio nustatymas

Tirti antikoaguliantu EDTA stabilizuoti pelių kraujo mėginiai. Juose leukocitai skaičiuoti, naudojant hemocitometrą. Į melanzetę paimta kraujo mėginio 1 tūrio dalis, kuri praskiesta 20 tūrio dalių Tiurko tirpalo. Praskiestas mėginys melanzetėje sumaišytas ir perkeltas ant hemocitometro kameros. Stebint mikroskopu per objektyvą – 40×, skaičiuotas leukocitų skaičius 25 hemocitometre pažymėtuose tinklelio didžiuosiuose kvadratuose. Ląstelių skaičius X paskaičiuotas pagal formulę:

$$X = \frac{(a \times 250 \times b)}{e \times 10^6}$$

kur, a – suskaičiuotų leukocitų skaičius, b – praskiedimo koeficientas, e – hemocitometre subraižytų 1/25 mm² ploto kvadratų, kuriuose suskaičiuoti leukocitai, skaičius, 250 – kvadrato, kuriame skaičiuotos ląstelės, tūris mm³, 10⁶ – µl kiekis 1 litre.

Leukocitų skaičiaus normos pateiktos lentelėje 2.3.7.1.

Leukocitų formulės nustatymas

Kraujo formulės nustatymui kiekvienos pelės kraujo mėginio tepinėlis buvo dažytas Papancheimo metodu [120]. Kapiliarinės pipetės pagalba ant pirmojo objektinio stiklelio uždėtas kraujo lašas. Kitas stiklelis 45° kampu lėtai priglaustas prie kraujo lašo. Priglaudus stiklelį prie tiriamojo kraujo lašo, leista jam tolygiai pasiskirstyti per visą antrojo stiklelio plotą. Kraujui pasiskirsčius, švelniai spaudžiant ir braukiant antrąjį stiklelį per pirmojo ilgį, kraujas tolygiai paskirstytas ant viso pirmojo objektinio stiklelio ir paliktas nudžiūti 10 min. Nefiksuotas kraujo mėginio tepinėlis dažytas May-Grun-

vald-Gimzos-Ramanovskio dažais. Kraujo mėginio tepinėlis uždėtas ant stiklinio rėmelio, užpiltas 20–25 lašais May-Grunvaldo dažų ir inkubuotas 3 min. Tokiu būdu tepinėlis ne tik dažytas, bet ir fiksuotas. Nupylus pirmuosius dažus, ant tepinėlio užpiltas PBS buferinis tirpalas, pH reikšmė 7,4. Mėginiai inkubuoti 1 min. Pasibaigus inkubacijos laikui, buferinis tirpalas nuimtas ir ant tepinėlių užpilti Gimzos-Ramanovskio dažai, praskiesti distiliuotu vandeniu (į 1 ml distiliuoto vandens įpilta 2 lašai Gimzos-Ramanovskio dažų). Dažymo trukmė – 20 min. Po inkubacijos tepinėlis perplautas išgrynintu vandeniu, išdžiovintas ore ir naudotas tyrime. Leukocitų ląstelės skaičiuotos mikroskopo imersine sistema – objektyvas –100×, okuliaras –10×. Iš viso viename kraujo tepinėlyje suskaičiuota iki 300 leukocitų. Leukocitų formulėje pateikti kraujo mėginio kiekvienos rūšies baltųjų ląstelių kiekiai procentais.

2.3.7.1 lentelė. *Balb/c pelių patinėlių kraujyje esančių baltųjų kraujo kūnelių normos pagal [32]*

Leukocitų kiekis ($\times 10^6/l$)	Neutrofilai (proc.)	Limfocitai (proc.)	Monocitai (proc.)	Eozinofilai (proc.)	Bazofilai (proc.)
3,48–14,03	9,86–39,11	48,18–83,19	3,29–12,48	0,11–4,91	0,0–1,84

Sveikų 8–10 savaičių amžiaus Balb/c pelių patinėlių kraujyje aptiktų kraujo ląstelių kiekio (proc.) normos pateiktos 2.3.7.1 lentelėje pagal [32].

2.3.8. Eksperimentinių Balb/c linijos pelių blužnies imunohistocheminis tyrimas

Blužnies audinių paruošimas tyrimui

Tiriamųjų pelių blužnys, fiksuotas 10 proc. (v/v) buferiniame formalino tirpale, patalpintos standartizuotose histologinių tyrimų kasetėse ir perkeltos į procesorių Shandon Pathscentre, kur atlikta audinių dehidratacija, skaidrinimas ir impregnavimas parafinu pagal 2.3.8.1 lentelėje pateiktą schemą.

Parafinu impregnuoti kiekvienos tiriamosios pelės blužnies preparatai įliejami į parafiną naudojant blokų formavimo centrą TBS88. Į atidarytų histologinių kasečių vidurį pincetu įdėti tiriamieji organai. Kasetės šaldytos ant šaldomosios plokštelės ir dozatoriumi užpiltas parafinas. Parafinu užpildyta kasetė su tiriamu organu palikta atvėsti. Parafinui sustingus, iš histologinės kasetės išimtas parafino ir tiriamojo organo blokelis.

2.3.8.1 lentelė. Tiriamųjų blužnies organų fiksavimo, dehidratavimo, skaidrinimo ir impregnavimo parafinu protokolas.

Procesas	Reagentas	Trukmė
Fiksavimas	10 proc. formalino vandeninis tirpalas	2 × 60 min.
Dehidratacija	70 proc. (v/v) vandeninis etanolio tirpalas	45 min.
	96 proc. (v/v) vandeninis etanolio tirpalas	45 min.
	2-propanolis	3 × 60 min.
Skaidrinimas	Ksilenas	3 × 60 min.
Impregnavimas	Parafinas	2 × 45 min.
	Parafinas	2 × 60 min.

Rotaciniu mikrotomu parafininis blokelis supjaustytas 3 µm storio pjūviais. Atliekami ne mažiau nei 5 pjūviai blužnies antrajame ketvirtyje. Kiekvienas pjūvis perneštas į 37 °C vandeniu užpildytą termostatinę vonelę. Pjūvis ištiesintas ir perkeltas ant objektinio stiklelio. Gautas preparatas išdžiovintas 22 °C temperatūroje, vėliau perkeltas į 60 °C termostatą, kur parafinas išsilydė, o audinys fiksuotas prie objektinio stiklelio.

Blužnies preparatų imunohistocheminis dažymas CD3 antikūnu

Imunohistocheminis blužnies audinių dažymas atliktas pagal Smalinskienės ir bendraautorių aprašytą dažymo metodą [192]. Nuo pjūvių pašalintas parafinas, po to pjūviai rehidratuoti, naudojant ksilolą ir įvairių koncentracijų etanolio tirpalus. Blužnies audinio pjūviai patalpinti į slėgiminį indą, įdėti į mikrobangų įrenginį RHS-1, kur pjūviuose esantys specifiskumu imuniniam atsakui pasižymintys CD3 epitopai apdoroti karščiu (110 °C) 8 min., naudojant išlaisvinantį tirpalą (10 mM Tris, 1,0 mM EDTA, pH reikšmė 9,0). Toliau blokuota endogeninė peroksidazė, ir kiekvienas preparatas inkubuotas su monokloniniu antikūnu CD3. Antigenas vizualizuotas su 3,3'-diaminobenzidinetrahydrochlorido+chromogeno tirpalu.

Blužnies preparatų, pažymėtų CD3 antikūnu, imunohistocheminė analizė

Gauti nudažyti preparatai skenuoti Pannoramic MIDI II skeneriu esant 0,2325 µm/pxl raiškai, leidžiančiai aiškiai vizualizuoti nudažytus preparatus. Vieno preparato morfometriniui įvertinimui pasirinkta po 8 nepersidengiančius PALS ir folikulų ir raudonosios pulpos plotus (27392,0 µm²

($214,0 \times 128,0 \mu\text{m}$)). Pasirenkant PALS zonas, stebėtas tik skersinis arteriolės pjūvis [185]. Tiriamuosiuose laukuose skaičiuotas teigiamai nusidažiusių ląstelių kiekis vienetais [103, 82, 20], ląstelių populiacijos tankis, kuris yra lygus apskaičiuotų ląstelių kiekio (vnt.) santykiui su apibrėžtu plotu (μm^2). Paskaičiuotas struktūrinėje blužnies zonoje (PALS, folikuluose, raudonojoje pulpoje) esantis vidutinis ląstelių skaičius, kuris lygus ląstelių populiacijos tankio ir kompartmento (stebėtos srities) ploto sandaugai [185]. Vaizdų analizė atlikta, naudojant Panoramic Viewer 1.15.2 programinę įrangą.

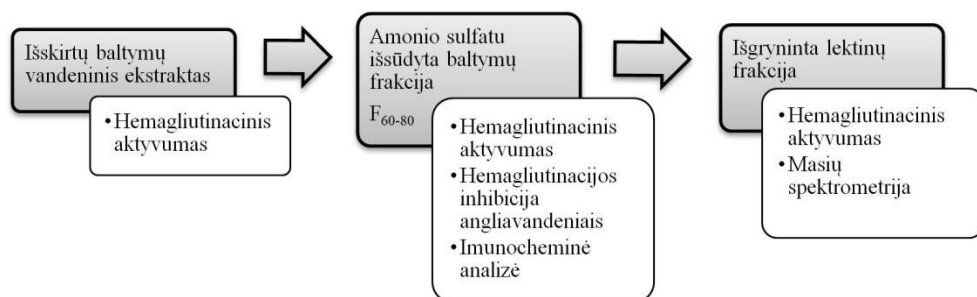
2.3.9. Statistinės analizės metodai

Pateikiant tyrimų rezultatus, apskaičiuotas parametų statistinis vidurkis ir standartinis nuokrypis. Statistinio įvertinimo tikslumo ir patikimumo nustatymui skaičiuoti pasikliautinieji intervalai, kai pasikliovimo lygmuo – 0,95. Daugiau kaip dviejų nepriklausomų grupių imčių vidurkių skirtumai vertinti pagal dvipusį ANOVA modelį. Dispersijų lygybės hipotezė tikrinta, naudojant Leveno (*Levene*) testą, *post hoc* analizė atlikta pasitelkiant *Tuckey* testą. Kai požymiai neturėjo normaliojo skirstinio, skirtumų tarp dviejų nepriklausomų grupių nustatymui taikytas Mano-Vitnio (*Mann-Whitney*) testas. Duomenų analizei naudotas IBM Statistics SPSS 20.0 statistinis programinis paketas.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Iš šviežių *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų žaliavos išskirtų baltymų kokybinis tyrimas

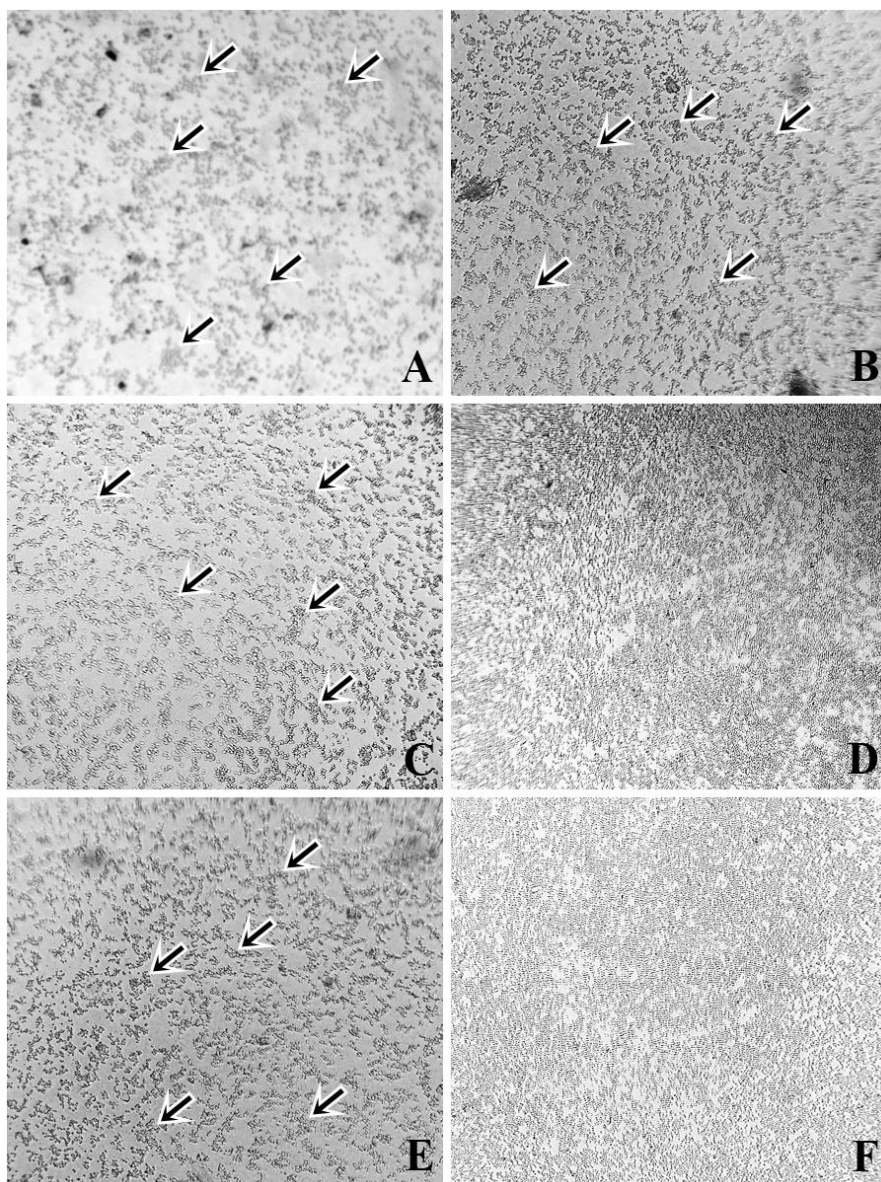
Atliekant rausvažiedžių ežiulių šviežių šaknų baltymų kokybinę analizę naudoti trys kokybinės analizės metodai: hemagliutininio aktyvumo nustatymas, lektinų vaizdinimas imunoblotingo metodu ir tandeminės skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos analizė. 3.1.1 paveiksle pateikti skirtinguose lektinų gryninimo etapuose naudoti analizės metodai.



3.1.1 pav. Rausvažiedžių ežiulių šviežių šaknų baltymų kokybinės analizės schema

3.1.1. Hemagliutininio aktyvumo nustatymo rezultatai

Ištyrus baltymų mėginių hemagliutininį aktyvumą gauti rezultatai parodė, kad hemagliutininio aktyvumu pasižymėjo visi paruošti baltymų mėginiai, išskyrus baltymų frakciją, išsūdytą amonio sulfatu nuo 80 iki 100 proc. (3.1.1.1 paveikslas, D). Lektinų frakcija (E), išgryninta afininės chromatografijos metodu, taip pat pasižymėjo hemagliutininio aktyvumu. Su visomis tirtomis frakcijomis atlikta pusiau kiekinė analizė – hemagliutininio titro nustatymas. Gauti rezultatai aprašyti 3.2.2 skyrelyje.



3.1.1.1 pav. Šviežių rausvažiedžių ežiulių šaknų baltymų kokybinės hemagliutinacinio aktyvumo analizės rezultatai

A – iš šviežių rausvažiedžių ežiulių šaknų išskirtų baltymų vandeninis ekstraktas, B – baltymų frakcija, išsūdyta amonio sulfatu nuo 0 iki 60 proc., C – baltymų frakcija, išsūdyta amonio sulfatu nuo 60 iki 80 proc., D – baltymų frakcija, išsūdyta amonio sulfatu nuo 80 iki 100 proc., E – afininės chromatografijos metodu išgryninta lektinų frakcija, F – neigiama kontrolė - PBS buferis. Paveiksle rodyklėmis parodyti agliutinuotų eritrocitų gumulėliai.

3.1.2. Hemagliutinacijos inhibicijos angliavandeniais tyrimo rezultatai

Lektinų specifiskumas angliavandeniams nustatytas atlikus hemagliutinacijos inhibicijos angliavandeniais testą. Nustatytas stipriausiai išreikštas hemagliutinacinį aktyvumą inhibuojantis laktozės poveikis (3.1.2.1 lentelė). 3mM laktozės (gliukozės ir galaktozės disacharido) tirpalas inhibavo lektinų sukeltą triušio eritrocitų suspensijos hemagliutinaciją. Mažesniu inhibiciniu aktyvumu pasižymėjo D-manozė ir D-galaktozė, tuo tarpu D-gliukozė hemagliutinacijos neinhibavo. Mokslininkų, atlikusių analogiškus tyrimus, duomenimis, ir kiti laktozei specifiški lektinai pasižymėjo panašiomis savybėmis. Pvz., lektinų, išskirtų iš *Cinachyrella apion* L. gniužulų, hemagliutinacinis aktyvumas inhibuotas laktoze, tačiau D-gliukozė ir D-galaktozė hemagliutinacino aktyvumo neinhibavo [116]. Specifiškumu manozei pasižymėjo lektinai, išskirti iš rausvažiedei ežiulei genetiškai artimos tikrosios saulėgražos (*Helianthus annuus* L.) šaknų [151].

3.1.2.1 lentelė. Rausvažiedžių ežiulių šaknų lektinų specifiskumas angliavandeniams, išreikštas minimalia hemagliutinaciją inhibuojančia koncentracija (mM). NI – nėra inhibicijos

Angliavandenis	Minimali angliavandenio, inhibuojančio hemagliutinacinį aktyvumą, koncentracija (mM)
Laktozė	3
D-manozė	21
D-galaktozė	21
Fruktozė	42
Sacharozė	42
Maltozė	42
Riboze	NI
D-gliukozė	NI
D-ksilozė	NI
Acetil-galaktozaminas	NI

Hemagliutinacijos inhibicijos rezultatai parodė, kad rausvažiedžių ežiulių šaknyse esantys lektinai pasižymi specifiskumu D-gliukozės enantiomerams, tačiau ne pačiai D-gliukozei. Galime daryti prielaidą, kad specifiskumui svarbi yra epimerinė D-galaktozės konfigūracija ir disacharido (laktozės) molekulės dydis, tačiau laktozės sudėtyje esančios gliukozės stereoizomerinė struktūra nėra svarbi, sąveikaujant su lektino aktyviuoju centru.

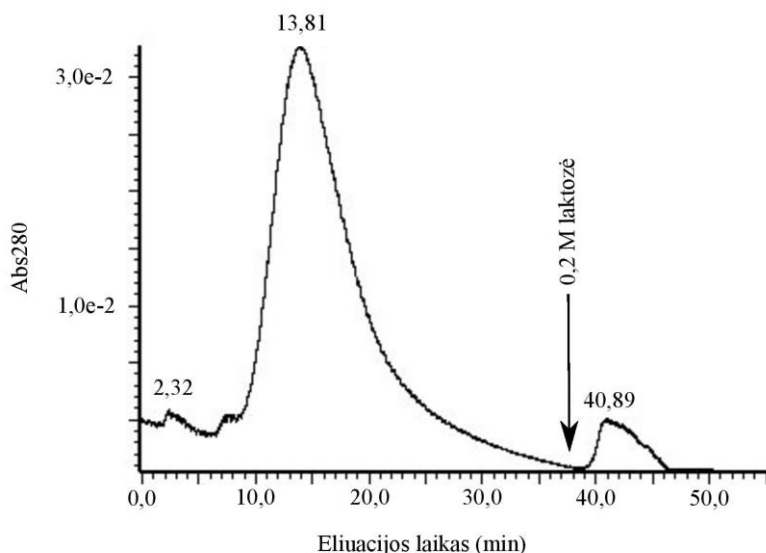
3.1.3. Lektinų kokybinės analizės (vaizdinimo) imunocheminės analizės metodu rezultatai

Atsižvelgiant į gautus teigiamus hemagliutinacijos inhibicijos angliavandeniais testo rezultatus, atliktas lektinų gryninimas afininės chromatografijos metodu ir jų kokybinė analizė (vaizdinimas) imunocheminės analizės metodu.

Lektinų gryninimui afininės chromatografijos metodu pasirinktas D-manozės ligandas, nes remiantis gautais hemagliutinacijos inhibicijos testo duomenimis tiriamoje rausvažiedžių ežiuolių šaknų žaliavoje esantys lektinai pasižymėjo vienodai išreikštu specifiškumu D-galaktozės ir D-manozės molekulėms [41]. Naudojant afininės chromatografijos matricą su imobilizuotu D-manozės monosacharidu yra didesnė tikimybė, kad prie tokios matricos (aktyvuotos agarozės (sefarozės)) prisijungę monosacharidai turės mažiau prisijungimo variantų nei disacharidas (laktozė). D-manozės molekulėje prie pirmojo anglies atomo esanti hidroksilo grupė yra reaktyviausia, todėl didžiausia tikimybė, kad prie aktyvuotos matricos prisijungusi D-manozė sudarys kovalentinį ryšį tik ties pirmu anglies atomu. Remiantis literatūros duomenimis, D-manozei specifiški lektinai buvo išgryninti iš rausvažiedei ežiulei genetiškai artimo *Asteraceae* šeimos augalo – paprastosios saulėgrąžos (*Heliathus annus* L.) šaknų [151]. Genetiškai susijusiuose augaluose aptinkami baltymai ir lektinai gali būti panašūs – turėti šeimai būdingų homologiškų baltymų, atliekančių vienodas arba panašias funkcijas ir turinčių atsikartojančių konservatyvių aminorūgščių sekų, pvz.: pupinių šeimos lektinai. Tai leidžia daryti prielaidą, kad rausvažiedžių ežiuolių šaknų žaliavoje nustatyti lektinai yra homologiški, ir jų specifiškumas angliavandeniams yra panašus į paprastosios saulėgrąžos šaknų žaliavoje aptiktų lektinų. Ištyrus rausvažiedžių ežiuolių šaknų baltymų mėginį, nustatytas didžiausias jame esančių lektinų specifiškumas laktozei, dėl šios priežasties šis D-gliukozės ir D-galaktozės disacharidas pasirinktas lektinų eliuacijai iš D-manozės-sefarozės afininės kolonėlės.

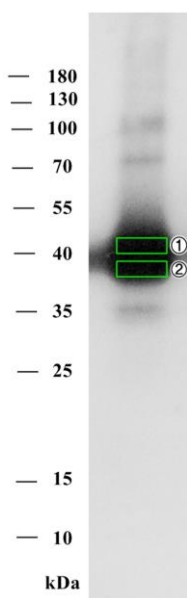
Po gryninimo gautos dvi chromatografinės smailės. Būdingas chromatogramos profilis pavaizduotas 3.1.3.1 paveiksle. Nuo 7 iki 38 minutės iš chromatografinės kolonėlės išplauti su kolonėlės matrica nesąveikaujantys baltymai. Pasikeitus PBS buferio (pH reikšmė 7,4) judriai fazei, iš kolonėlės 0,2 M laktozės-PBS buferiu išplauti su manozės-sefarozės afinine matrica specifiškai sąveikaujantys baltymai (nuo 38 iki 46 min), 3.1.3.1 paveikslas. Iš kolonėlės išplauti baltymai užfiksuoti detektoriumi, o chromatogramoje matomos nustatytų baltymų smailės. Iš kolonėlės išplauti baltymai surinkti į frakcijas, tuomet patikrintas jų hemagliutininis aktyvumas. Nustatyta, kad

aktyvumu pasižymėjo tik su afinine matrica sąveikavusių baltymų frakcija, iš kolonėlės išplauta nuo 38 iki 46 min.



3.1.3.1 pav. *Lektinų gryninimo (afinės chromatografijos metodu su manozės-sefarozės afinine matrica) chromatograma*

Išgrynintos lektinų frakcijos, pasižyminčios hemagliutinaciniu aktyvumu, glikoproteinų sudėtis nustatyta imunocheminės analizės metodu, taikant ksilozei specifiskus antikūnus. Nustatyta, kad šioje frakcijoje dominuoja ~ 40 kDa dydžio glikoproteinai (3.1.3.2 paveikslas). Elektroforezės gelio sritys, pažymėtos numeriais 1 ir 2, išpjautos, ir glikoproteinai identifikuoti masių spektrometrijos metodu. Taip pat buvo atlikta kokybinė glikoproteinų masių spektrometrijos analizė kitų išpjautų (~ 100 kDa, ~ 70 kDa ir ~ 35 kDa) gelio sričių. Tačiau nepavyko nustatyti glikoproteinų tapatybės. Eksperimentus riboja *Echinacea* Moench genomo tyrimų trūkumas. Darome prielaidą, kad genomas, kuriame būtų surinktas visų organizmo somatinių ląstelių deoksiribonukleorūgščių (DNR) koduojamų produktų (ribonukleorūgščių (RNR) ir baltymų) sekos, leistų identifikuoti platesnį glikoproteinų spektrą.



3.1.3.2 pav. Išgrynintos lektinų frakcijos imunocheminės analizės, taikant ksilozei specifiskus antikūnus, rezultatai

1 ir 2 numeriu pažymėtos glikoproteinų sritys analizuotos masių spektrometrijos metodu.

3.1.4. Lektinų kokybinės analizės masių spektrometrijos metodu rezultatai

Taikant *Echinacea* L. transkriptomos duomenis ir masių spektrometrijos analizę, pagal masių pirštų atspaudus nustatyta, kad glikoproteinų sritys Nr. 1 ir 2 atitinka dvi skirtingas transkriptomos sritis, atitinkamai 9450 ir 7790, kurios koduoja analogišką du peptidoglikanus prijungiančius lizino M domenų (LysM) turintį baltymą, prikabinamą prie membranos per glikozilfosfatidilinozitolį (GPI) (3.1.4.1 lentelė). Identifikuoto lektino molekulinė masė Nr. 1 buvo 38 kDa, o Nr. 2 – 40,1 kD. *Echinacea* L. transkriptomos lektinų molekulinės masės varijuoja dėl skirtingo glikozilinimo: identifikuotų lektinų aminorūgščių seka Nr. 1 gali būti modifikuota prijungiant angliavandenius šešiose ar daugiau pozicijų, o seka Nr. 2 – trijose ir daugiau pozicijų. Pagal masių spektro pirštų atspaudus identifikuotų peptidų aminorūgščių sekos pažymėtos raudona spalva ir pateiktos 3.1.4.1 paveiksle. Identifikacijai naudojant *Echinacea* transkriptomą, srities Nr. 1 glikoproteiną apibūdinančio Mascot kriterijaus reikšmė buvo mažesnė nei rekomenduojama patikimumo riba (> 50). Tačiau atlikus masių spektrometrijos duomenų analizę taikant *Echinacea* genčiai genetiškai artimo ir geriau ištirto *Asteraceae* šeimos augalo *Helianthus annuus* L. genomo duomenis, pagal

masių pirštų atspaudus gauta patikima šio glikoproteino identifikacija. Nustatytas patikimas glikoproteinų sričių - Nr. 1 ir 2 atitikimas tam pačiam peptidoglikanus prijungiančiam LysM domenų turinčiam baltymui.

3.1.4.1 lentelė Identifikuoti *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų glikoproteinai, pasižymintys hemagliutinaciniu aktyvumu

	Srities Nr.	Sekos kodas duomenų bazėje	Baltymo pavadinimas	Mascot kriterijus	Molekulinė masė (kDa)
<i>Echinacea</i> transkriptomas	1.	epa_locus_9450_iso_2_len_1348_ver_2 (Ep-9450)	Peptidoglikanus prijungiančius lizino M domenų (LysM) turintis baltymas prikabinamas prie membranos per glikozilfosfatidilinozitolį	49,2	38,0
	2.	epa_locus_7790_iso_1_len_1277_ver_2 (Ep-7790)	Peptidoglikanus prijungiančius lizino M domenų (LysM) turintis baltymas prikabinamas prie membranos per glikozilfosfatidilinozitolį	137,2	40,1
<i>Helianthus annuus</i> genomas	1.	IPR018392	Baltymas, turintis peptidoglikanus prijungiančių lizino domenų LysM	132,7	43,3
	2.	IPR018392	Baltymas, turintis peptidoglikanus prijungiančių lizino domenų LysM	182,0	43,3

Siekiant įvertinti pagal *Echinacea* transkriptomą identifikuotų baltymų tapatumą, papildomai atlikta homologiškų baltymų sekų paieška BlastP programoje, panaudojant NCBI baltymų sekų duomenų bazę [4, 110]. 3.1.4.2 lentelėje pateikti rezultatai rodo, kad tirtos *E. purpurea* (L.) Moench transkriptomo baltymų sekos pasižymi tapatumu su *Artemisia annua* L., *Helianthus annuus* L. ir *Lactuca sativa* L. analogiškų baltymų sekoms. Tačiau didžiausias tapatumas būdingas *H. annuus* L. baltymams: Ep-9450 srities baltymų seka 81 proc. atitinka LysM domenų turinčio baltymo prijungiamo prie membranos per glikozilfosfatidilinozitolį (XP_022025891.1) seka, o Ep-7790 srities baltymų seka 90 proc. atitinka LysM domenų turinčio baltymo prijungiamo prie membranos per glikozilfosfatidilinozitolį (XP_021976452.1) seka. Minimalus homologiškais laikomų baltymų

3.1.4.2 lentelė *Echinacea* transkriptome identifikuotų baltymų sekų tapatumas su kitų augalų genčių baltymų sekomis

EP baltymas	Baltymo, aptikto kitose augalų gentyse, pavadinimas	Maksimalus įvertis*	Gautas įvertis*	Sekos persidengimas*	E vertė *	Identiškumo procentai *	Baltymo kodas NCBI Protein duomenų bazėje
epa_locus_9450_iso_2_len_1348_ver_2	LysM domenų turintis baltymas, prie membranos prijungiamas per glikozilfosfatidilinozitolį [<i>Helianthus annuus</i>]	570	570	98%	0,0	81	XP_022025891.1
	LysM domenų turintis baltymas, prie membranos prijungiamas per glikozilfosfatidilinozitolį [<i>Lactuca sativa</i>]	493	493	98%	2e-172	70	XP_023756149.1
	LysM domenų turintis baltymas prie membranos prijungiamas per glikozilfosfatidilinozitolį [<i>Artemisia annua</i>]	463	463	97%	1e-160	70	PWA55567.1
epa_locus_7790_iso_1_len_1277	LysM domenų turintis baltymas, prie membranos prijungtas per glikozilfosfatidilinozitolį [<i>Helianthus annuus</i>]	676	676	96%	0,0	90	XP_021976452.1
	LysM domenų turintis baltymas, prie membranos prijungtas per glikozilfosfatidilinozitolį [<i>Lactuca sativa</i>]	629	629	97%	0,0	85	XP_023762850.1
	LysM domenų turintis baltymas, prie membranos prijungiamas per glikozilfosfatidilinozitolį [<i>Cynara cardunculus</i> var. <i>scolymus</i>]	646	646	99%	0,0	83	XP_024991685.1

*Maksimalus įvertis – didžiausias teorinis sekų sutapimo įvertinimas bitais, kuris yra lygus maksimalaus aminorūgščių sutapimo ir aminorūgščių nesutapimo baltų skirtumui.

Gautas įvertis – realus sekų suliginimo įvertis bitais.

Sekos persidengimas – tiriamosios aminorūgščių sekos sutapimas su duomenų bazėje atrinkto baltymo aminorūgščių seka, išreikštas procentais.

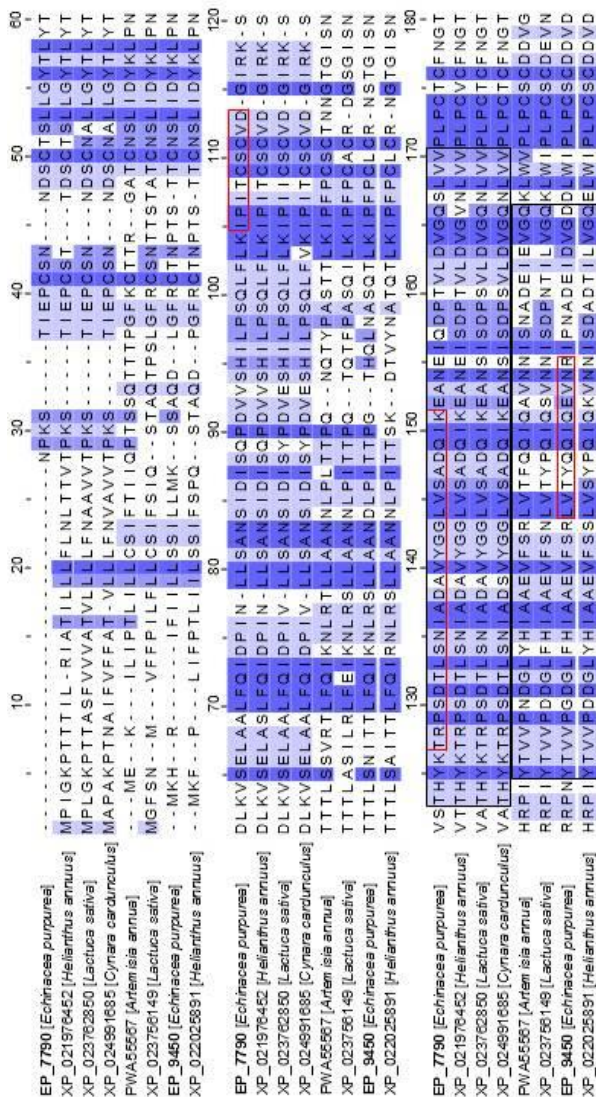
E vertė – tikimybė, kad duomenų bazėje identifikuotas baltymas bus atsitiktinis arba identifikuotas klaidingai. Kuo mažesnė E vertė, tuo didesnis panašumas tarp sekų ir tuo didesnė tikimybė, kad rezultatas tikrai yra homologinis su palyginamąja seka.

Identiškumo procentai – E-vertės pakaitinis dydis. Jis parodo tikslų sutapimų skaičių procentais.

identiškumo procentinis lygis yra 20 proc. [103]. Aukštas identifikuojamų baltymų identiškumo procentinis lygis, apibrėžiamas kaip analizuojamo baltymo amino rūgščių sekos sutapimo su duomenų bazėje identifikuojamų baltymų amino rūgščių seka, rodo analizuojamų baltymų homologiją.

Skirtingų augalų homologiškų baltymų sekų daugybinio palyginimo rezultatai, pateikti 3.1.4.1 paveiksle, dar kartą patvirtina jų homologiją su *Echinacea* L. transkriptome identifikuotais baltymais. Iš rezultatų galime matyti, kad *Echinacea* transkriptome identifikuojami baltymai yra homologiški, tačiau ne identiški. Taip pat galime teigti, kad *Echinacea* L. genties augalai yra genetiškai artimi *Helianthus annuus* L. augalams (tai patvirtina *Echinacea* transkriptome esančių baltymų sekų homologijos su *Helianthus annuus* L. genomo baltymais). Remiantis gautais rezultatais galima teigti, kad *Echinacea* transkriptome identifikuoti lektinai su peptidoglikanus prijungiančiais LysM domenais yra homologiški ir kituose genetiškai mažiau susijusiuose augaluose, tokiuose kaip *Lactuca sativa* L., *Artemisia annua* L. ir *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.

3.1.4.1 paveiksle pateiktas daugybinis identifikuotų baltymų amino rūgščių sekų tapatumo palyginimas, naudojant *Clustal Ω* bioinformatinės analizės programą [184]. Palyginus aminorūgščių sekas, baltymai suklasifikuoti pagal homloginį panašumą.



3.1.4.1 pav. Identifikuotų baltymų aminorūgščių sekų tapatumo palyginimas Clustal O Jalview 2.10.5 bioinformatinės analizės platformoje

Cia „–“ žymimas aminorūgščių sekos trūkis; Aminorūgščių spalvinis žymėjimas pagal į sekų identiškumą (proc.): „■“ – palyginamų baltymų aminorūgščių identiškumas sekoje, tapatumas > 80 proc., „■“ – palyginamų baltymų chemiškai panašių aminorūgščių tapatumas sekoje, tapatumas > 60 proc., „■“ – aminorūgštys, kurių cheminis panašumas mažesnis (sutapimas > 40 proc.). Aminorūgščių sekose raudonai apibrėžti pagal masių pirštų atspaudus identifikuoti peptidai. Identifikuotų baltymų aminorūgščių sekoje juodai įrėmintos LysM domenų aminorūgščių sekos.

EP_7790 [Echinacea purpurea]	DNNVPAVYLSVYKPVDTLAGIAARYMTITDLMVVALGNA-AVEDGDILAI	190	200	210	220	230	240
XP_021976452 [Helianthus annuus]	DNGVPAVYLSVYKPVDTLAGIAARYMTITDLMVVALGNA-DVEDGDILAI						
XP_023762850 [Lactuca sativa]	DNFLPAIYMSVYKPVDTLAGIAARYMTITDLMVVALGNA-AIEDGDILAI						
XP_024991695 [Cynara cardunculus]	DNFLPAIYMSVYKPVDTLAGIAARYMTITDLMVVALGNA-AIEDGDILAI						
PWA55567 [Artemisia annua]	GE--KVVHYGSMPTGSNVAGIVNQFNITTESVLENLGDKADKLADSVLKVCTT						
XP_023766149 [Lactuca sativa]	GD--TVVHYGLVAGTSSVIAEQSTTESLNLNGMNSANLADSLDVLKVCTT						
EP_9450 [Echinacea purpurea]	GD--KVLHYGLVATGNTVAGIAAEFNTEGTLDLNGLSSDKDMADSLDVLKVCTT						
XP_022025891 [Helianthus annuus]	GE--AVMHYGLVLAAGNSVAGIAAEFNTEGTLDLNGLSSDKDMADSLDVLKVCTT						
EP_7790 [Echinacea purpurea]	SNLMGNVTVCQSASAGCNVTSCQVMVGFFV-NGTIVITLSSSLQPRCPGQVPPVI	310	320	330	340	350	360
XP_021976452 [Helianthus annuus]	TNLMGNATVCQSASAGCNVTSCQYGGFFV-NGTIVITLSSSLQPRCPGQVPPVI						
XP_023762850 [Lactuca sativa]	SNLMGNVTVCQSASAGCNVTSCQYGGFFV-NGTIVITLSSSLQPRCPGQVPPVI						
XP_024991695 [Cynara cardunculus]	SNLMGNVTVCQSASAGCNVTSCQYGGFFV-NGTIVITLSSSLQPRCPGQVPPVI						
PWA55567 [Artemisia annua]	TAFDLGNST--SDSNCLNLRCAVAGYNTLTITQEE-STCAGN-N-----						
XP_023766149 [Lactuca sativa]	TAFDLGNST--SDSNCLNLRCAVAGYNTLTITQEE-STCAGN-N-----						
EP_9450 [Echinacea purpurea]	TSPDLGNST--SDSNCLNLRCAVAGYNTLTITQEE-STCAGN-N-----						
XP_022025891 [Helianthus annuus]	TSPDLGNST--SDSNCLNLRCAVAGYNTLTITQEE-STCAGN-N-----						
EP_7790 [Echinacea purpurea]	VSPDMGLAPAPSPFQLGGAPIGRLPGSVVVPST-SSGIAFPSSANGPSGS-INS	370	380	390	400	410	420
XP_021976452 [Helianthus annuus]	VTPTMGLAPAPSPFQIGGAPIGRLPGSVVVPSTSSGIAFPSSANGPSGS-INS						
XP_023762850 [Lactuca sativa]	VSPDMVLAPAPSPGQLGGSPHAGLPSVVPSS-GSSIVLPAAANGPSGS-INS						
XP_024991695 [Cynara cardunculus]	VSPDMVLAPAPSPGQLGGSPHAGLPSVVPSS-GSSIVLPAAANGPSGS-INS						
PWA55567 [Artemisia annua]	VSPDMALAPSPSPQVGGAPGVGLPGSVVVPST-SSSIVLPSSANGPSGS-FSG						
XP_023766149 [Lactuca sativa]	-----NNGSPSGNSKGLRSSLA-----						
EP_9450 [Echinacea purpurea]	-----NNTPSGNSKGLRSSFI-----						
XP_022025891 [Helianthus annuus]	-----NPSGNSKGLRSSFA-----						
EP_7790 [Echinacea purpurea]	MSSFVAVAMFLVLLVLPPL-----	430	440				
XP_021976452 [Helianthus annuus]	ISGFSLAVLVVFLGLV--VPFL-----						
XP_023762850 [Lactuca sativa]	LTTSTFISIGLVFLKVKVVPFL-----						
XP_024991695 [Cynara cardunculus]	LFSSTFISIGLVFLKVKVVPFL-----						
PWA55567 [Artemisia annua]	LVAQLIALHLR-----						
XP_023766149 [Lactuca sativa]	VGVLIAFHLLK-----						
EP_9450 [Echinacea purpurea]	LAAFIIVLPLLSL-----						
XP_022025891 [Helianthus annuus]	LAAFIIVLPLLSL-----						

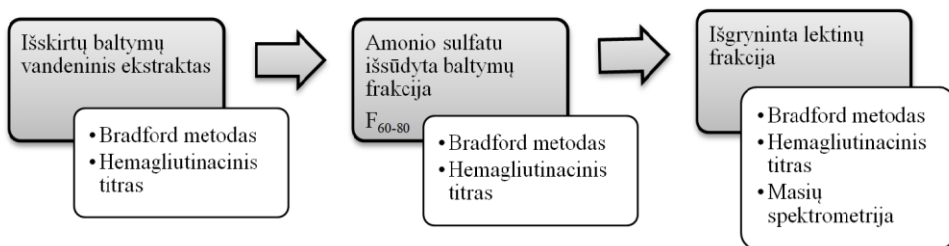
3.14.1 pav. (tęsinys) Identifikuotų baltymų aminorūgščių sekų tapatumo palyginimas Clustal O Jalview 2.10.5 bioinformatinės analizės platformoje. Čia „–“ žymimas aminorūgščių sekos trūkis; Aminorūgščių spalvinis žymėjimas pagal į sekų identiškumą (proc.): „■“ palyginamų baltymų aminorūgščių identiškumas sekoje, tapatumas > 80 proc., „■“ palyginamų baltymų chemiškai panašių aminorūgščių tapatumas sekoje, tapatumas > 60 proc., „■“ – aminorūgštys, kurių cheminis panašumas mažesnis (sutapimas > 40 proc.). Aminorūgščių sekose raudonai apibrėžti pagal masių pirštų atspaudus identifikuoti peptidai. Identifikuotų baltymų aminorūgščių sekoje įrėmintos LysM domenų aminorūgščių sekos.

Echinacea L. transkriptome identifikuoti baltymai yra homologiški *Helianthus annuus* L., *Lactuca sativa* L., *Artemisia annua* L. ir *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L. identifikuotiems baltymams. Palyginus visų aštuonių augalų genčių aminorūgščių sekų tapatumą, nustatytas persidengimo laipsnis 89 proc.

Apibendrinus kokybinio rausvažiedžių ežiulių šaknų hemagliutininio aktyvumu pasižyminčių baltymų (hemagliutininų) tyrimų rezultatus, galima teigti, kad laktozei, D-manozei ir D-galaktozei specifiški ~ 40 kDa dydžio glikoproteinai turi du peptidoglikanus prijungiančius LysM domenus ir pagal struktūrinės ir evoliucinės homologijos klasifikaciją priklauso LysM lektinų šeimai.

3.2. Baltymų, išskirtų iš *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų, kiekinio nustatymo rezultatai

Atliekant rausvažiedžių ežiulių šviežių šaknų baltymų ir lektinų kiekinę analizę naudoti trys kiekinės analizės metodai: spektrofotometrinis Bradford metodas, hemagliutininio titro nustatymas ir tandeminės skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos analizė. 3.2.1 paveiksle pateikiami skirtinguose baltymų ir lektinų gryninimo etapuose naudoti analizės metodai.



3.2.1 pav. Rausvažiedžių ežiulių šviežių šaknų baltymų kiekinės analizės schema.

3.2.1. Baltymų kiekio nustatymo spektrofotometrinio Bradford metodu rezultatai

Siekiant nustatyti rausvažiedžių ežiulių šviežių šaknų žaliavoje esantį baltymų kiekį, pagaminamas vandeninis baltymų ekstraktas pagal 2.3.4.1 skyriuje aprašytą metodiką. Nustatytas baltymų, išskirtų iš 50 g šviežių raus-

važiedžių ežiuolių šaknų, kiekis buvo $90,58 \pm 1,74$ g arba $1,82 \pm 0,03$ mg/g šviežios žaliavos (3.2.1.1 lentelė).

Iki šiol *Echinacea* L. genties augalų genomai nėra pilnai sekvenuoti, o tai apsunkina baltymų identifikaciją. Anksčiau atliktų tyrimų metu yra nustatytas tik rausvažiedžių ežiuolių šaknų arabinogalaktano baltymas [201]. Bergeron su bendraautorais [18] nustatė skirtingų ekstrahentų įtaką glikoproteinų, išskirtų iš džiovintų rausvažiedžių ežiuolių šaknų, kiekiui: žaliavą ekstrahuojant karštu vandeniu (1:20) gauta glikoproteinų išeiga – $0,442$ mg/g žaliavos, tuo tarpu ekstrahuojant žaliavą 65 proc. glicerolio tirpalu (1:20) ar 65 proc. etanolio (1:20), gauta mažesnė glikoproteinų išeiga, atitinkamai – $0,387$ mg/g ir $0,353$ mg/g džiovintos rausvažiedžių ežiuolių šaknų žaliavos. Kitų tyrimų metu nustatyta, kad žaliavos džiovinimas turi neigiamą įtaką baltymų ir glikoproteinų išeigai. Džiovinimo metu, priklausomai nuo naudojamos temperatūros ir džiovinimo trukmės, vyksta baltymų proteolizė ir denatūracija, nulemianti baltymų kiekio sumažėjimą augalinėje žaliavoje [3, 67, 85]. Lyginant su Bergeron ir kt. [18] tyrimų rezultatais, mes nustatėme, kad didesnė baltymų išeiga gauta, atliekant *Echinacea purpurea* (L.) Moench šviežios žaliavos (šaknų) ekstrakciją.

3.2.1.1 lentelė. Baltymų, išskirtų iš 50 g šviežių rausvažiedžių ežiuolių šaknų žaliavos, kiekinis nustatymas ($\bar{X} \pm SD$)

Baltymų mėginys	Mėginio tūris (ml)	Baltymų kiekis mėginyje (mg)	Baltymų kiekis šviežioje žaliavoje ($\mu\text{g/g}$)
Vandeninis baltymų ekstraktas	250	$90,58 \pm 1,74$	$1820,0 \pm 0,03$
F ₀₋₆₀ baltymų frakcija	10	$25,44 \pm 1,42$	$508,8 \pm 0,75$
F ₆₀₋₈₀ baltymų frakcija	10	$11,38 \pm 0,71$	$230,0 \pm 0,01$
Išgryninta lektinų frakcija	2	$0,04 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,01$

Atlikus baltymų ekstrakto mėginio kiekinę analizę, baltymai toliau buvo frakcionuoti, išsūdam juos amonio sulfatu. Nors didesnis baltymų kiekis gautas įsotinant ekstraktą amonio sulfatu nuo 0 iki 60 proc. tačiau nustačius hemagliutininį titrą paaiškėjo, kad baltymų frakcija, išsūdyta amonio sulfatu nuo 60 iki 80 proc. (F₆₀₋₈₀), pasižymėjo didesniu hemagliutininio aktyvumu. Nustatytas baltymų kiekis F₆₀₋₈₀ frakcijoje siekė $230,0 \pm 0,01$ $\mu\text{g/g}$ žaliavos (3.2.1.1 lentelė).

Nustačius hemagliutinacinį titrą tolimesniam frakcionavimui pasirinkta F₆₀₋₈₀ frakcija, pasižymėjusi didesniu hemagliutinaciniu aktyvumu. Pagal hemagliutinacijos inhibicijos testo rezultatus, aprašytus 3.1.2 skyriuje, naudota afininės chromatografijos matrica, kurią pritaikius išgryninta hemagliutinaciniu aktyvumu pasižyminti lektinų frakcija. Išmatavus baltymų koncentraciją, nustatyta, kad iš 50 g šviežių rausvažiedžių ežiulių šaknų žaliavos gauta 0,04 ± 0,01 mg arba 0,8 ± 0,01 µg/g (žaliavos) aktyvių glikoproteinų.

3.2.2. Hemagliutinacinio titro nustatymo rezultatai

Atlikus vandeninio baltymų ekstrakto hemagliutinacinio aktyvumo tyrimą, nustatyta, kad ekstrakto hemagliutinacinis titras buvo 16 (3.2.2.1 lentelė). Baltymų frakcija F₆₀₋₈₀ turėjo didžiausią hemagliutinacinį titrą – 32. Ji naudota tolimesniuose lektinų gryninimo etapuose.

Nustačius hemagliutinacinį baltymų mėginių titrą, apskaičiuotas specifinis hemagliutinacinis aktyvumas ir minimali baltymo koncentracija vandeniame baltymų ekstrakte, galinti sukelti matomą triušio eritrocitų suspensijos hemagliutinaciją – 113,22 µg/ml (3.2.2.1 lentelė).

3.2.2.1 lentelė. Lektinų gryninimo ir aktyvumo analizės rezultatai

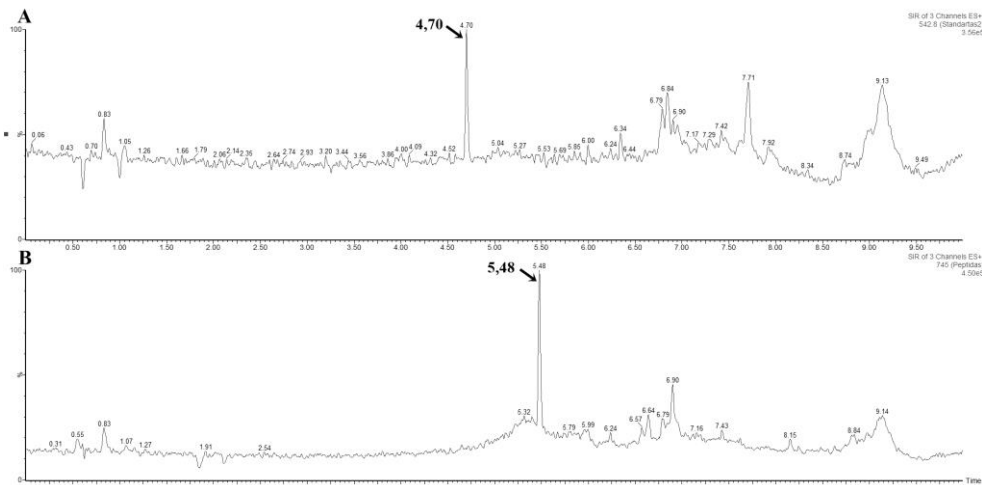
Baltymų mėginys	Hemagliutinacinis titras	Specifinis hemagliutinacinis aktyvumas (HU/µg baltymo)	Minimali hemagliutinaciją sukelianti lektino koncentracija (µg/ml)	Gryninimo laipsnis
Baltymų vandeninis ekstraktas	16	5660	113,22	1,00
F ₆₀₋₈₀ baltymų frakcija	32	350	35,56	3,18
Išgryninta lektinų frakcija	2	2,04	1,02	111,00

Minimali hemagliutinaciją sukelianti lektino koncentracija mažėja, didėjant grynumo laipsniui. Galutiniame baltymų frakcijos gryninimo etape gauta tik 1,02 µg/ml lektino, nes hemagliutinaciniu aktyvumu nepasižymintys baltymai kiekvieno gryninimo metu buvo pašalinti, o mėginyje liko tik aktyvūs lektinai. Tokia tendencija pastebėta kitų autorių atliktuose lektinų gryninimo iš skirtingų augalinių žaliavų tyrimuose [171, 88, 183]. Minimali rausvažiedžių ežiulių šaknų lektinų hemagliutinuojanti koncentracija yra mažesnė nei sėjamųjų žirnių 3,12 µg/ml [191], didžiųjų dilgėlių šaknų agliutinino 2,5 µg/ml [150], tačiau didesnė nei WGA minimali hemagliutinuojanti koncentracija 0,4 µg/ml [216]. Pospelov su bendraautorais nustatė hemaglutini-

nų, išskirtų iš džiovintų rausvažiedžių ežuolių šaknų, aktyvumo kitimą skirtinguose augalo vegetacijos tarpsniuose. Išsiaiškinta, kad pirmamečių rausvažiedžių ežuolių šaknų žaliavoje didžiausias hemagliutininis aktyvumas aptiktas rugsėjo – spalio mėnesį [156]. Tačiau šie tyrimai neatliko kiekinės hemagliutininės analizės.

3.2.3. Identifikuoto lektino, turinčio LysM domeną, peptido kiekinio nustatymo rezultatai

Rausvažiedžių ežuolių šaknų lektino LysM domeno kiekio nustatymas atliktas tandeminės skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodu. Nustatytas 745,0 m/z dydžio vieno identifikuoto LysM peptido kiekis, išreikštas pagal susintetinto referencinio 542,8 m/z peptido ekvivalentą. Skirstymo chromatograma pateikta 3.2.3.1 paveiksle.



3.2.3.1 pav. *LysM kiekinio nustatymo chromatograma, naudojant tandeminės skysčių chromatografijos – masių spektrometrijos metodą*
A – peptido standarto 542,8 m/z , chromatograma (sulaikymo laikas 4,70 min.), B – tiriamo LysM peptido 745,0 m/z , chromatograma (sulaikymo laikas 5,48 min.)

Tirto lektinų peptido (745,0 m/z) kiekinio nustatymo rezultatai pateikti 3.2.3.1 lentelėje.

3.2.3.1 lentelė. Šviežių rausvažiedžių ežiulių šaknų LysM lektinų peptido (745,0 m/z) kiekinės analizės rezultatai

SL*	Junginys	Tiesiškumo ribos, ng/ml	Kalibracinės kreivės lygtis	R ² *	AR*, ng/ml	NR*, ng/ml	Kiekis, ng/ml	Kiekis ng/g šaknų žaliavos
5,48	LysM peptidas	0,1084–10,84	y=0,0002x–0,2473	0,997	0,029	0,096	1,58 ± 0,01	0,32 ± 0,01

*SL – sulaikymo laikas, R² – regresijos koeficientas, AR – aptikimo riba, NR – nustatymo riba

Nustatyta LysM peptido, esančio tiriamo baltymo konservatyvioje aminorūgščių sekoje, koncentracija – 1,582 ± 0,010 ng/ml. Nors LysM aptiktas daugelyje augalų proteomų tyrimų [211], tačiau kiekinis LysM nustatymas ežiulių žaliavoje atliktas pirmą kartą. Baltymų kiekinė analizė pagal vieną referencinį peptidą yra plačiai taikomas analizės metodas, tačiau pilną kiekinį nustatymą galima atlikti taikant keletos LysM aminorūgščių sekos peptidų kalibraciją.

3.3. Lektinų biologinio aktyvumo pelių imuniniam atsakui tyrimas *in vivo*

Atlikus rausvažiedžių ežiulių šviežių šaknų lektinų frakcijos kokybinę – kiekinę analizę, vykdytas šios lektinų frakcijos biologinio aktyvumo tyrimas *in vivo*. Pagaminus vienai iš tiriamųjų gyvūnų grupei vartotą tinktūrą, atliktas aktyvių junginių kokybinis – kiekinis nustatymas.

3.3.1. Palyginamosios *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų tinktūros gamyba, ekstraktinių medžiagų kiekio ir kavos rūgšties darinių analizė

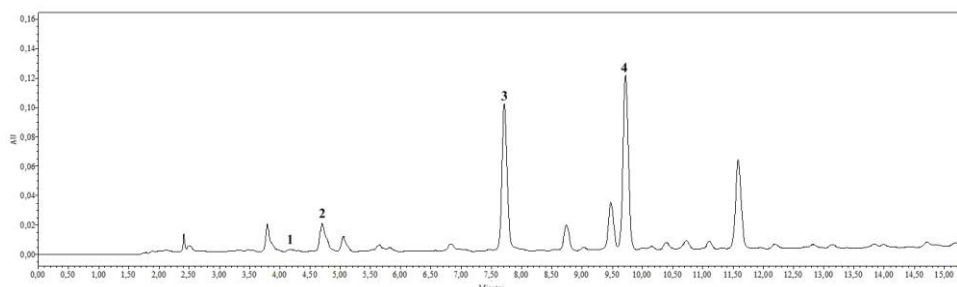
Tinktūros sausojo likučio kiekio nustatymas

Pagamintos šviežių rausvažiedžių ežiulių šaknų tinktūros kokybė įvertinta gravimetriniu sausojo likučio kiekio nustatymo metodu. Šis tyrimas parodo bendrą nelakių iš vaistinės augalinės žaliavos išekstrahuotų veikliųjų junginių kiekį. Tyrimo rezultatai parodė, kad 1 l tinktūros, atitinkančios 550 g

Echinacea purpurea (L.) Moench šviežių šaknų žaliavos, sausasis likutis sudarė $51,02 \pm 0,38$ g.

Tinktūros kokybinė ir kiekinė analizė efektyviosios skysčių chromatografijos metodu

Chromatografinis šviežių rausvažiedžių ežiulių šaknų 50 proc. (v/v) etanolinės tinktūros junginių skirstymas (3.3.1.1 paveikslas) atliktas pagal Europos farmakopėjoje aprašytą metodą [54]. Pagal sulaikymo laiką ir UV šviesos absorbcijos spektrus identifikuotos šios fenolio rūgštys: kaftaro, chlorogeno, kavos ir cichoro.



3.3.1.1 pav. Šviežių rausvažiedžių ežiulių šaknų tinktūros (1:5) ESC chromatograma

Identifikuotos fenolio rūgštys: 1 – chlorogeno rūgštis, 2 – kaftaro rūgštis, 3 – kavos rūgštis, 4 – cichoro rūgštis

Atlikta fenolio rūgščių kiekinė analizė, išreiškiant analizių kiekį pagal kavos rūgšties ekvivalentą. Vertinta analitės smailės ploto priklausomybė nuo koncentracijos tiriamajame tirpale. Sudarytas kavos rūgšties kalibracinis grafikas, įvertintas regresijos koeficientas ir kalibracinės kreivės regresijos lygtis. Rezultatai pateikti 3.3.1.1 lentelėje.

Aptikimo ir nustatymo ribos apskaičiuotos, palyginus smailės aukštį su bazinės linijos triukšmu. Smailės aukščio ir bazinės linijos triukšmo santykis, naudotas skaičiuojant aptikimo ribą, yra 3:1, o nustatymo ribą – 10:1. Aptikimo ribos pagal kavos rūgšties ekvivalentą kito nuo $0,031 \mu\text{g/ml}$ iki $0,646 \mu\text{g/ml}$, o kiekinio nustatymo riba – $0,104 \mu\text{g/ml}$ iki $2,154 \mu\text{g/ml}$. Įvertinus kavos rūgšties kiekį nustatyta, kad tiriamoje tinktūroje jos koncentracija siekė $3,78 \pm 0,23 \mu\text{g/ml}$. Apskaičiavus kaftaro rūgšties kiekį kavos rūgšties ekvivalentais gauta $1,95 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$ koncentracija, tuo tarpu cichoro rūgšties – $3,47 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$. Nustačius chlorogeno rūgšties kiekį kavos rūgšties ekvivalentais, aptikta $1,75 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ koncentracija, tačiau ji buvo mažesnė nei apskaičiuota nustatymo riba, todėl gautas rezultatas yra nepatikimas.

Mūsų atlikti tyrimai parodė, kad šviežioje rausvažiedžių ežiuolių šaknų žaliavoje dominavo kavos ir chlorogeno rūgštys. Tai neprieštarauja anksčiau atliktų tyrimų rezultatams [69, 24, 133], tačiau šių nustatytų junginių kiekiai mūsų tirtoje rausvažiedžių ežiuolių šaknų tinktūroje buvo mažesni.

3.3.1.1 lentelė Šviežių rausvažiedžių ežiuolių šaknų tinktūros (1:5) kiekinio fenolio rūgščių sudėties nustatymo pagal kavos rūgšties ekvivalentą rezultatai ($\bar{X} \pm SD$)

Nr.	SL	Junginys	Tiesiškumo ribos, $\mu\text{g/ml}$	Kalibacinės kreivės lygtis	R^2	AR, $\mu\text{g/ml}$	NR, $\mu\text{g/ml}$	Kiekis, $\mu\text{g/ml}$	Kiekis $\mu\text{g/g}$ šviežių šaknų
1.	4,69	Kaftaro rūgštis	1,56–50,00	$y=357000x-574000$	0,997	0,158	0,527	$1,95 \pm 0,10$	$0,18 \pm 0,01$
2.	6,83	Chlorogeno rūgštis				0,646	2,154	$1,75 \pm 0,09$	$3,16 \pm 0,13$
3.	7,712	Kavos rūgštis				0,025	0,085	$3,78 \pm 0,23$	$6,80 \pm 0,34$
4.	9,719	Cichoro rūgštis				0,031	0,104	$3,47 \pm 0,14$	$6,24 \pm 0,25$

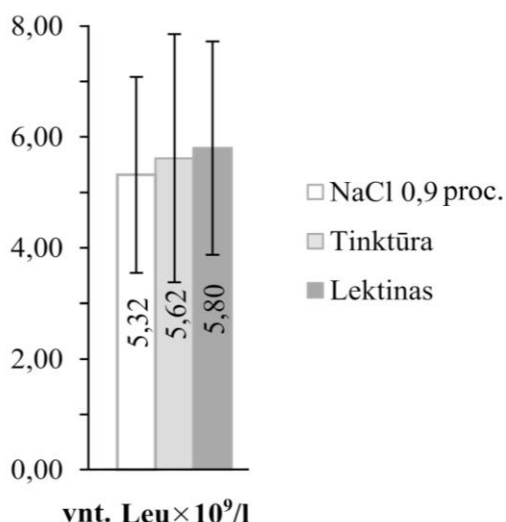
SL – sulaikymo laikas, R^2 – regresijos koeficientas, AR – aptikimo riba, NR – nustatymo riba.

Apibendrinus *Echinacea purpurea* (L.) Moench šviežių šaknų tinktūros kokybinės – kiekinės analizės duomenis, nustatyta, kad iš 1 g žaliavos išekstrahuota $92,75 \pm 34,47$ mg sausųjų medžiagų, iš kurių identifikuoti kavos rūgšties dariniai sudarė $16,37 \mu\text{g}$, t.y. 0,01 proc. Tiriamojoje tinktūroje didžiąją dalį galima sudarė kiti neidentifikuoti biologiškai aktyvūs junginiai, būdingi rausvažiedžių ežiuolių šaknų žaliavai: alkilamidai, polisacharidai, lipopolisacharidai ir kt.

3.3.2. Eksperimentinių Balb/C linijos pelių kraujo mėginių analizės rezultatai

Leukocitų kiekio kraujo mėginiuose nustatymo rezultatai

Apskaičiavus leukocitų kiekį tiriamųjų gyvūnų kraujo mėginiuose, nustatyta kiekio (vnt.) didėjimo tendencija gyvūnų, gavusių šviežių rausvažiedžių ežiulių šaknų tinktūros ir LysM lektinų frakcijos injekcijas, grupėse (3.3.2.1 paveikslas).



3.3.2.1 pav. Eksperimentinių gyvūnų kraujo mėginių leukocitų kiekio nustatymo rezultatai

NaCl 0,9 proc. – sterilus fiziologinis tirpalas, Tinktūra – iš šviežių rausvažiedžių ežiulių šaknų paruošta 50 proc. (v/v) etanolinė tinktūra (1:5), Lektinas – LysM lektinų frakcija

Tyrimo metu nebuvo nustatyti statistiškai reikšmingi rezultatų skirtumai tarp grupių. Darome prielaidą, kad statistiniam duomenų reikšmingumui reikėjo didesnės tiriamųjų gyvūnų imties grupėse.

Leukocitų formulės kraujo mėginiuose nustatymo rezultatai

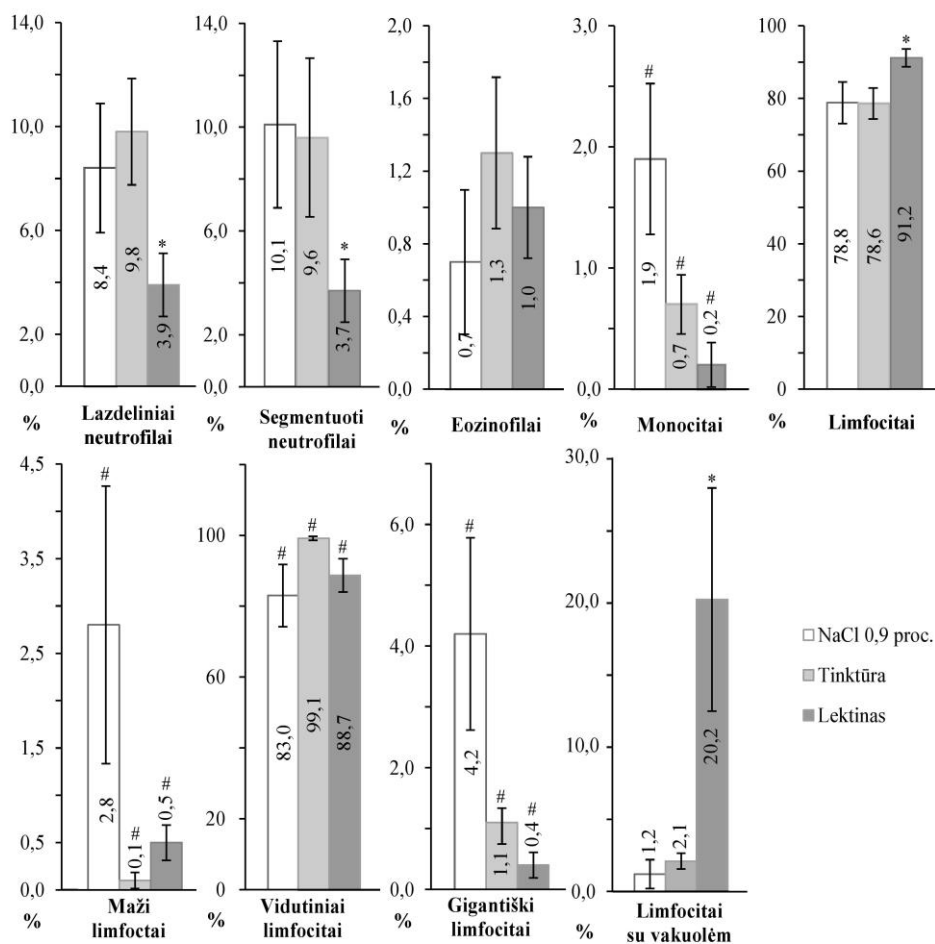
Atlikus tiriamųjų gyvūnų kraujo mėginiuose esančių leukocitų formulės skaičiavimus gauti rezultatai pateikti 3.3.2.2 paveiksle. Tiriant visų pelių grupių kraujo mėginius, eozinofilų kiekio (proc.) pokyčiuose nenustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų. Lektinų LysM frakcijos injekcijas gavusių gyvūnų kraujyje lazdelinių neutrofilų kiekis sumažėjo iki $3,9 \pm 1,21$ proc., segmentuotų neutrofilų kiekis sumažėjo iki $3,7 \pm 1,21$ proc., limfocitų kiekis padidėjo iki $91,2 \pm 2,42$ proc., o leukocitų (neutrofilų ir limfocitų) su vakuumėmis kiekis išaugo iki $20,2 \pm 7,27$ proc. Gauti rezultatai statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi, lyginant su gyvūnų, gavusių peritoninės fiziologinio tirpalo ar tinktūros injekcijas, kraujo mėginių atitinkamų ląstelių kiekiu (proc.).

Monocitų, mažų, vidutinių ir gigantiškų limfocitų procentinis kiekis statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) skyrėsi tarp visų tiriamųjų gyvūnų grupių. LysM lektinų frakcijos injekcijas gavusių gyvūnų grupėje monocitų procentinis kiekis sumažėjo iki $0,2 \pm 0,18$ proc., tuo tarpu, fiziologinio tirpalo injekcijas gavusių eksperimentinių pelių kraujyje monocitų kiekis siekė $1,9 \pm 0,62$ proc. Monocitų kiekis mažėjo ir tinktūros injekcijas gavusioje gyvūnų grupėje – iki $0,7 \pm 0,24$ proc. Mažų limfocitų procentinis kiekis gyvūnų grupėje, gavusioje lektino injekcijas, sumažėjo iki $0,5 \pm 0,18$ proc., tuo tarpu fiziologinio tirpalo injekcijas gavusių eksperimentinių pelių kraujyje mažų limfocitų kiekis siekė

$2,8 \pm 1,47$ proc. Mažų limfocitų kiekis tinktūros injekcijas gavusioje gyvūnų grupėje dar labiau sumažėjo ir siekė $0,1 \pm 0,09$ proc. LysM lektinų frakcijos injekcijas gavusių gyvūnų grupėje vidutinių limfocitų kiekis statistiškai reikšmingai padidėjo iki $88,7 \pm 4,70$ proc., tačiau dar daugiau vidutinio dydžio limfocitų nustatyta tinktūros injekcijas gavusioje gyvūnų grupėje – $99,1 \pm 0,55$ proc. Tuo tarpu fiziologinio tirpalo injekcijas gavusios gyvūnų grupės kraujyje nustatyta $83,0 \pm 8,80$ proc. vidutinio dydžio limfocitų. Gigantiškų limfocitų kiekis LysM lektinų frakcijos injekcijas gavusioje gyvūnų grupėje sumažėjo ir siekė $0,4 \pm 0,21$ proc., o tinktūros grupėje – $1,1 \pm 0,35$ proc. Tuo tarpu fiziologinio tirpalo injekcijas gavusioje pelių grupėje apskaičiuota $4,2 \pm 1,58$ proc. gigantiškų limfocitų.

Eksperimentinių gyvūnų kraujo mėginių tyrimų rezultatai parodė, kad lektinų injekcijas gavusių gyvūnų pirminis imuninis atsakas – fagocitinis ląstelių aktyvumas sumažėjo. Tai parodė statistiškai reikšmingai sumažėjęs neutrofilų ir monocitų kiekis (proc.). Tuo tarpu šviežių rausvažiedžių ežiuolių šaknų tinktura turėjo tendenciją skatinti pirminį imuninį atsaką (lazdelinių neutrofilų skaičiaus (proc.) padidėjimas) bei alerginę reakciją, kurią parodė padidėjęs eozinofilų skaičius (proc.). Kiti tyrėjai nagrinėjo ežiuolių gen-

ties augalų alergijas sukeliantį poveikį, susijusį su eozinofilų kiekio ir imunoglobulino E koncentracijos kraujyje padidėjimu [5, 11, 98, 109].



3.3.2.2 pav. Eksperimentinių gyvūnų leukoformulės kraujo mėginiuose nustatymo rezultatai.

* $p < 0,05$ lyginant su kontroline grupe (NaCl 0,09 proc.) ir su tinktūros grupe. # $p < 0,05$ lyginant visas grupes tarpusavyje.

NaCl 0,9 proc. – sterilus fiziologinis tirpalas, Tinktūra – iš šviežių rausvažiedžių ežiulių šaknų paruošta 50 proc. (v/v) etanolinė tinktūra (1:5), Lektinas – LysM lektinų frakcija.

Lektinų injekcijos veikė kaip antigenas ir stimulavo antrinę imuninę atsaką. Tai parodė statistiškai reikšmingai padidėjęs limfocitų skaičius (proc.). Statistiškai reikšmingai padidėjęs vidutinio dydžio limfocitų skaičius (proc.) leidžia teigti, kad lektinai skatino limfocitų brendimą ir diferenciaciją, tačiau ne naujų ląstelių gamybą, nes kraujyje ženkliai sumažėjo mažųjų (jaunų) limfocitų skaičius (proc.). Šią hipotezę patvirtino ir ženkliai padidėjęs leukocitų (neutrofilų ir limfocitų) su vakuolėmis skaičius, rodantis, kad šios imuninės ląstelės dėl sumažėjusio fagocitinio aktyvumo kraujotakoje užsilaikė ilgiau nei kitų grupių tiriamųjų gyvūnų kraujyje. Vakuolizaciją galėjo sukelti ir lektinų sąveika su ląstelių plazminė membrana. Literatūros šaltinių duomenimis, lektinai, prisijungę prie ląstelių plazminės membranos, gali sutrikdyti membranos funkciją, o tai sukelia didesnę vandens ir Na^+ jonų patekimą į ląstelę bei vakuolių formavimąsi [42, 52, 55].

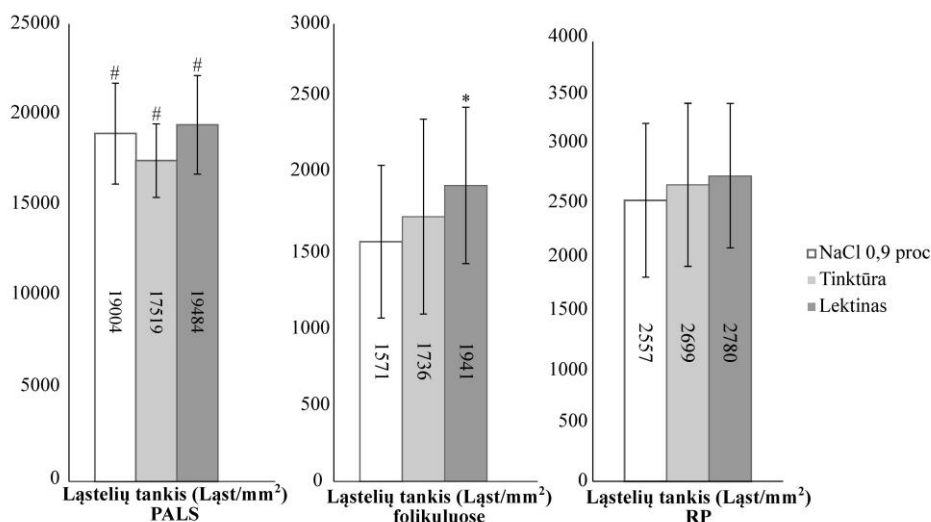
3.3.3. Eksperimentinių Balb/c linijos pelių blužnies imunohistocheminio tyrimo rezultatai

Blužnis yra didžiausias antrinis imuninės sistemos organas, kuriame vystosi specifinis imuninis atsakas į kraujyje esančius antigenus, hematopoezė ir senų eritrocitų išardymas [25, 100]. Eksperimentinių pelių blužnies imunohistocheminio tyrimo rezultatai (3.3.3.1 paveikslas) parodė, kad rausvažiedžių ežiulių šaknų tinktūra statistiškai reikšmingai, palyginus su fiziologinio tirpalo injekcijas gavusių pelių grupe ($p < 0,05$) ir su lektinų injekcijas gavusia tiriamųjų gyvūnų grupe ($p < 0,001$), sumažino T limfocitų tankį blužnies PALS srityje. Tuo tarpu lektinų injekcijas gavusių pelių blužnies PALS zonoje statistiškai reikšmingai ($p < 0,001$), lyginant tiek su fiziologinio tirpalo, tiek su tinktūros injekcijas gavusių gyvūnų grupėmis, padidėjo T limfocitų tankis.

Folikuluose statistiškai reikšmingai ($p < 0,001$), palyginti su fiziologine grupe, ir su tinktūros grupe ($p < 0,05$), padidėjo T limfocitų tankis tiriamiesiems gyvūnams, kuriems buvo injekuotas rausvažiedžių ežiulių šaknų hemagliutinas. T limfocitų tankis folikuluose buvo didesnis rausvažiedžių ežiulių šaknų tinktūros injekcijas gavusioje pelių grupėje, tačiau statistiškai patikimo skirtumo tarp fiziologinio tirpalo ir rausvažiedžių ežiulių lektinų injekcijas gavusios pelių grupės nerasta. Statistiškai patikimų T limfocitų tankio skirtumų nerasta ir tiriamųjų gyvūnų blužnies raudonojoje pulpoje.

Gauti tyrimų rezultatai parodė, kad iš šviežios rausvažiedžių ežiulių šaknų žaliavos paruošta tinktūra (1:5) slopino specifinę (antrinę) imuninę atsaką. Remiantis literatūros šaltiniais, iš šviežių *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų paruoštuose preparatuose randama didesnė koncentracija lipofilinių alkilamidų [163], slopinančių imunines reakcijas [114]. Priešingai šios tink-

tūros poveikiui, lektinų LysM frakcija sukėlė stiprų specifinį imuninį atsaką, kuris paprastai pasireiškia veikiant baltyminės kilmės antigenui. Statistiškai reikšmingai padidėjęs T limfocitų tankis blužnies PALS ir folikulų zonose leidžia daryti prielaidą, kad lektinų injekcijos nulėmė specifinę imuninę stimuliaciją ir T limfocitų diferenciaciją PALS zonoje. Iš T limfocitų zonos subrendusios ląstelės per folikulų zoną migravo į periferinę kraujotaką ir neutralizavo antigeną. Mūsų gauti tyrimų rezultatai neprieštaruoja kitų augalų lektinų imuninės stimuliacijos tyrimų *in vitro* [168, 178] ir *in vivo* [41, 167] rezultatams.



3.3.3.1 pav. T limfocitų tankio (ląstelių/mm²) pasiskirstymas Balb/C pelių blužnyje: PALS, folikuluose, raudonojoje pulpoje

* $p < 0,01$ lyginant su fiziologinio tirpalo (NaCl 0,9 proc.) ir $p < 0,05$ lyginant su tinktūros grupe. # $p < 0,05$ lyginant visas grupes tarpusavyje. NaCl 0,9 proc. – sterilus fiziologinis tirpalas, Tinktūra – iš šviežių rausvažiedžių ežiulių šaknų paruošta 50 proc. (v/v) etanolinė tinktūra (1:5), Lektinas – LysM lektinų frakcija

LysM lektinų frakcija skatino antrinį imuninį atsaką tiriamųjų gyvūnų organizme. Tai parodė kraujyje sumažėję neutrofilų ir monocitų kiekiai bei padidėjęs senų su vakuolėmis imuninių ląstelių skaičius kraujyje. Dėl lektinų specifinio poveikio ląstelių plazminei membranai taip pat galėjo didėti leukocitų su vakuolėmis kiekis kraujyje. Statistiškai reikšmingai didesnis vidutinio dydžio limfocitų procentinis kiekis kraujyje ir T limfocitų tankis ploto vienetu pelių blužnies PALS zonoje parodė suintensyvėjusį specifinį imuninį atsaką.

Iš šviežių rausvažiedžių ežuolių šaknų paruošta etanolinė tinktūra (1:5) pasižymėjo specifinį imuninį atsaką slopinančiomis savybėmis, tačiau skatino pirminį tiriamųjų gyvūnų imuninį atsaką, nors rezultatai nebuvo statistiškai patikimi.

IŠVADOS

1. Parinktos optimalios sąlygos baltymų išskyrimui iš *Echinacea purpurea* (L.) Moench šviežios šaknų žaliavos: ekstrakcija vykdyta fosfatinu buferiu (pH reikšmė 7,4) (1:5), po kurios atliktas baltymų išsūdimas amonio sulfatu. Nustatytas išskirtų baltymų kiekis viename grame žaliavos – $1820,0 \pm 0,03$ µg. Lektinai sudarė 0,04 proc. baltymų.
2. Gauta didžiausiu hemagliutinaciniu aktyvumu pasižyminti baltymų frakcija, išotinant vandeninį *Echinacea purpurea* (L.) Moench šviežios šaknų žaliavos baltymų ekstraktą amonio sulfatu nuo 60 iki 80 proc. Ši frakcija naudota lektinų gryninimui. Nustatytas atrankiausias metodas lektinų gryninimui – afininė chromatografija su D-manozės, laktozės arba D-galaktozės ligandais.
3. Išskirta lektinų frakcija, kurioje identifikuoti du LysM lektinų klasės ~ 40 kDa dydžio LysM domenų turintys glikoproteinai, prisitvirtinantys prie membranos per glikozilfosfatidilinozitolį ir pasižymintys specifiskumu laktozei, D-manozei ir D-galaktozei.
4. Nustatytas identifikuoto LysM domeną turinčio lektino peptido kiekis – 0,316 ng (viename grame šviežios šaknų žaliavos).
5. Nustatyta *Echinacea purpurea* (L.) Moench šviežios šaknų žaliavos lektinų sukelta antrinio imuninio atsako stimuliacija. Tiriamųjų gyvūnų kraujo mėginiuose statistiškai reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjo neutrofilų bei monocitų kiekis, tačiau padidėjo limfocitų kiekis, o blužnyje statistiškai reikšmingai ($p < 0,001$) padidėjo T limfocitų kiekis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adamova L, Malinovska L, Wimmerova M. New sensitive detection method for lectin hemagglutination using microscopy. *Microsc Res Tech.* 2014;77(10):841–9.
2. Aebersold R, Goodlett DR. Mass Spectrometry in Proteomics. *Chem Rev.* 2001;101(2):269–96.
3. Agrahar-Murugkar D, Jha K. Effect of drying on nutritional and functional quality and electrophoretic pattern of soyflour from sprouted soybean (*Glycine max*). *J Food Sci Technol.* 2010;47(5): 482–7.
4. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):338934 02.
5. Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Schäffer AA, Yu Y. Gapped NIH Public Access. Library (Lond). 2006;272(20):5101–9.
6. Ardjomand-Woelkart K, Bauer R. Review and Assessment of Medicinal Safety Data of Orally Used *Echinacea* Preparations. *Planta Med.* 2016;82:17–31.
7. Ardourel M, Demont N, Debellb F, Maillet F, Billy F De, Promb J, *et al.* *Rhizobium meliloti* Lipooligosaccharide Nodulation Factors : Different Structural Requirements for Bacterial Entry into Target Root Hair Cells and Induction of Plant Symbiotic Developmental Responses. *Plant Cell.* 1994;6:1357–74.
8. Ashraf MT, Khan RH. Mitogenic lectins. *Med Sci Monit.* 2003;9(11):RA265-9.
9. Attar R, Tabassum S, Fayyaz S, Ahmad MS, Nogueira DR, Yaylim I, *et al.* Natural products are the future of anticancer therapy: Preclinical and clinical advancements of *Viscum album* phytometabolites. *Cell Mol Biol.* 2015;61(6):62–8.
10. Badouin H, Gouzy J, Grassa CJ, Murat F, Staton SE, Cottret L, *et al.* The sunflower genome provides insights into oil metabolism, flowering and *Asterid* evolution. *Nature.* Nature Publishing Group; 2017;546(7656):148–52.
11. Barbosa T, Arruda S, Cavada B, Grangeiro TB, De Freitas LAR, Barral-Netto M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the *Diocleinae* subtribe. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96(5):673–8.
12. Barnes J, Anderson L a, Gibbons S, Phillipson JD. *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.)

- Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharmacol* . 2005;57(8):929–54.
13. Barrett B. Medicinal properties of *Echinacea*: A critical review. *Phytomedicine*. 2003;10(1):66–86.
 14. Bauer R. *Echinacea*: Biological Effects and Active Principles. ACS Symp Ser. 1998;691(7).
 15. Bellande K, Bono JJ, Savelli B, Jamet E, Canut H. Plant lectins and lectin receptor-like kinases: How do they sense the outside? *Int J Mol Sci*. 2017;18(6).
 16. Benjamin CF, Figueiredo RC, Henriques MGMO, Barja-Fidalgo C. Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. *Brazilian J Med Biol Res*. 1997;30(7):873–81.
 17. Benson JM, Pokorny AJ, Rhule A, Wenner CA, Kandhi V, Cech NB, *et al.* *Echinacea purpurea* extracts modulate murine dendritic cell fate and function. *Food Chem Toxicol.*;2010;48(5):1170–7.
 18. Bergeron C, Gafner S. Quantitative analysis of the polysaccharide and glycoprotein fractions in *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* by HPLC-ELSD for quality control of raw material. *Pharm Biol*. 2007;45(2):98–105.
 19. Boehm S, Huck S. Presynaptic inhibition by concanavalin A: are alpha-latrotoxin receptors involved in action potential-dependent transmitter release? *J Neurochem*. 1998;71(6):2421–30.
 20. Bonamin LV, De Carvalho AC, Waisse S. *Viscum album* (L.) in experimental animal tumors: A meta-analysis. *Exp Ther Med*. 2017;13(6):2723–40.
 21. Bondarenko P V., Chelius D, Shaler TA. Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography - Tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002;74(18):4741–9.
 22. Borchers AT, Keen CL, Stern JS, Gershwin ME. Inflammation and Native American medicine : the role of botanicals. *Am Soc Clin Nutr*. 2000;72(2):339–47.
 23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1–2):248–54.
 24. Bronsema K, Bischoff R, Merbel N Van De. High- Sensitivity LC-MS/MS Quantification of Peptides and Proteins in Complex Biological Samples: The Impact of Enzymatic Digestion and Internal Standard Selection on Method Performance. *Anal Chem*. 2013;85(02):9528–9535.

25. Brown PN, Columbia B, Ave W, Chan M, Betz JM. Determination of Major Phenolic Compounds in *Echinacea spp.* Raw Materials and Finished Products by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: Single- Laboratory Validation Matrix Extension. J AOAC Int. 2013;94(5):1400–10.
26. Burgener IA. Horizontal and Vertical Distribution of CD3+ Lymphocytes in the Intestine of Healthy Adult and Neonatal Dogs. J Clin Gastroenterol Hepatol. 2017;1(3).
27. Cagliari R, Kremer FS, Pinto L da S. Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. Int J Biol Macromol.; 2018;119:811–20.
28. do Carmo Avides M, Teixeira J a, Vicente A. Apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (futalin) of *Artocarpus incisa* seeds. Phytomedicine.; 2010:2008–11.
29. Carvalho EVMM, Oliveira WF, Coelho LCBB, Correia MTS. Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. Life Sci.; 2018;207:152–7.
30. Cech NB, Eleazer MS, Shoffner LT, Crosswhite MR, Davis AC, Mortenson AM. High performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for simultaneous analysis of alkalamides and caffeic acid derivatives from *Echinacea purpurea* extracts. J Chromatogr A. 2006;1103(2):219–28.
31. Cesta MF. Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. Toxicol Pathol. 2006;34(5):599–608.
32. Charles R. BALB/C Mouse Hematology and Biochemistry [Priega per internetą 2017-08-07]. 2008. Available from: http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_rm_r_BALBc_mouse_hematology_2008.pdf.
33. Chen X, Wei S, Ji Y, Guo X, Yang F. Quantitative proteomics using SILAC: Principles, applications, and developments. Proteomics. 2015;15(18):3175–92.
34. Cherepanova N, Shrimal S, Gilmore R. N-linked glycosylation and homeostasis of the endoplasmic reticulum. Curr Opin Cell Biol.; 2016;41:57–65.
35. Coelho MB, DeSouza IA, Freire MGM, Marangoni S, Antunes E, Macedo MLR. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. Toxicon. 2006;48(5):529–35.
36. Coltri KC, Oliveira LL, Pinzan CF, Vendruscolo PE, Martinez R, Goldman MH, *et al.* Therapeutic administration of KM+lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-

- 12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. *Am J Pathol.* 2008;173(2):423–32.
37. Cortes-Giraldo I, Giron-Calle J, Alaiz M, Vioque J, Megias C. Hemagglutinating activity of polyphenols extracts from six grain legumes. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(6):1951–4.
 38. Costa FHF, Sampaio AH, Neves SA, Rocha ML a, Benevides NMB, Freitas ALP. Purification and Characterisation of a Lectin From the Red Marine Alga *Amansia multifida*. *Physiol Mol Biol Plants.* 1999;5:53–61.
 39. Dalby-Brown L, Barsett H, Landbo AKR, Meyer AS, Mølgaard P. Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on *in vitro* oxidation of human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem.* 2005;53(24):9413–23.
 40. Dam S, Thaysen-Andersen M, Andersen T, Stenkjær E, Lorentzen A, Roepstorf P, *et al.* Combined N-glycome and N-glycoproteome analysis of the *Lotus japonicus* seed globulin fraction shows conservation of protein structure and glycosylation in legumes. *J Proteome Res.* 2013;12:3383–92.
 41. Damme EJM Van, Peumans WJ, Barre A, Rougé P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 1998;17(6):575–692.
 42. Van Damme EJM, Barre A, Rougé P, Peumans WJ. Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Trends Plant Sci.* 2004;9(10):484–9.
 43. Delatorre P, Rocha BAM, Souza EP, Oliveira TM, Bezerra GA, Moreno FBMB, *et al.* Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: New structural insights for old molecules. *BMC Struct Biol.* 2007;7:1–9.
 44. Delebinski CI, Twardziok M, Kleinsimon S, Hoff F, Mulsow K, Rolff J, *et al.* A natural combination extract of *Viscum album* L. containing both triterpene acids and lectins is highly effective against AML *in vivo*. *PLoS One.* 2015;10(8):1–20.
 45. Devi SK, Singh SS, Singh SJ, Rully H, Singh LR. Purification and Characterization of a Magnesium Ion Requiring N-Acetyl-D-glucosamine specific lectin from seeds of *Quercus ilex* L. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2011;75(9):1752–7.
 46. Dhuna V, Bains JS, Kamboj SS, Singh J, Kamboj S, Saxena AK. Purification and characterization of a lectin from *Arisaema tortuosum* Schott having *in vitro* anticancer activity against human cancer cell

- lines. J Biochem Mol Biol. 2005 Sep 30;38(5):526–32.
47. Dimitrijevic R, Stojanovic M, Micic M, Dimitrijevic L, Gavrovic-Jankulovic M. Recombinant banana lectin as mucosal immunostimulator. J Funct Foods. 2012;4(3):636–41.
48. Ditamo Y, Rupil LL, Sendra VG, Nores GA, Roth GA, Irazoqui FJ. *In vivo* immunomodulatory effect of the lectin from edible mushroom *Agaricus bisporus*. Food Funct. Royal Society of Chemistry; 2016;7(1):262–9.
49. Driggins SN, Whalen M, Lewis Myles E. The Inhibitory Effect of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallida* on BT-549 and Natural Killer Cells. MOJ Cell Sci Rep. 2017;4(3):10.
50. Edelson BYPJ, Cohn ZA. Effects of Concanavalin A on mouse peritoneal macrophages. Stimulation of Endocytic Activity and Inhibition of Phago-Lysosome Formation. J Exp Med. 1974;140:1364–86.
51. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An Approach to Correlate Tandem Mass Spectral Data of Peptides with Amino Acid Sequences in a Protein Database. Am Soc Mass Spectrom. 1994;5:976–89.
52. Estrada-Martínez LE, Moreno-Celis U, Cervantes-Jiménez R, Ferriz-Martínez RA, Blanco-Labra A, García-Gasca T. Plant lectins as medical tools against digestive system cancers. Int J Mol Sci. 2017;18(7).
53. European Pharmacopoeia 9.0. *Echinaceae purpureae radix* (01/2008:1824). Strasbourg; 2018. p. 1488–90.
54. European Pharmacopoeia 9.0. Dry residue of extracts (2.8.17.). European Pharmacopoeia. Strasbourg; 2018. p. 289.
55. Fast DJ, Balles JA, Scholten JD, Mulder T, Rana J. *Echinacea purpurea* root extract inhibits TNF release in response to Pam3Csk4 in a phosphatidylinositol-3-kinase dependent manner. Cell Immunol.; 2015;297(2):94–9.
56. Fekete S, Beck A, Veuthey JL, Guilleme D. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. J Pharm Biomed Anal.; 2015;113:43–55.
57. Figueiredo JG, Bitencourt FS, Mota MRL, Silvestre PP, Aguiar CN, Benevides RG, *et al.* Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. Toxicon. 2009;54(6):736–44.
58. Fonseca FN, Papanicolaou G, Lin H, Lau CBS, Kennelly EJ, Cassileth BR, *et al.* *Echinacea purpurea* (L.) Moench modulates human T-cell cytokine response. Int Immunopharmacol.; 2014;19(1):94–102.

59. FRAC. FRAC Code List © * 2017: Fungicides sorted by mode of action [Prieiga per internetą 2018-10-15]. <http://www.phibase.org/images/fracCodeList.pdf>. 2017. p. 1–10. Aktyvi nuoroda: <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2015-finalC2AD7AA36764.pdf?sfvrsn=4>
60. Fujii Y, Kawsar SM a, Matsumoto R, Yasumitsu H, Ishizaki N, Dogasaki C, *et al.* A D-galactose-binding lectin purified from coronate moon turban, Turbo (Lunella) coreensis, with a unique amino acid sequence and the ability to recognize lacto-series glycosphingolipids. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*; 2011;158(1):30–7.
61. Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology.* 1995;21(1):190–8.
62. Goldman R, Sharon N, Lotan R. A differential response elicited in macrophages on interaction with lectins. *Exp Cell Res.* 1976; 99(2):408–22.
63. Gomes BS, Siqueira ABS, Maia R de CC, Giampaoli V, Teixeir EH, Arruda FVS, *et al.* Antifungal activity of lectins against yeast of vaginal secretion. *Brazilian J Microbiol.* 2012;43(2):770–8.
64. Gomes FS, Procópio TF, Napoleão TH, Coelho LCBB, Paiva PMG. Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *J Appl Microbiol.* 2013;114(3):672–9.
65. Gupta PK, Asthana S, Jaiswal AK, Kumar V, Verma AK, Shukla P, *et al.* Exploitation of lectinized lipo-polymerosome encapsulated amphotericin b to target macrophages for effective chemotherapy of visceral leishmaniasis. *Bioconjug Chem.* 2014;25(6):1091–102.
66. Gygi SP, Aebersold R. Using mass spectrometry for quantitative proteomics. *Trends Biotechnol.* 2000;18(1):31–6.
67. Hamid R, Masood A, Wani I, Rafiq S. Lectins: proteins with diverse applications. *J Appl Pharm Sci.* 2013;3(4.1):93–103.
68. Han X, Aslanian A, Yates JR. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 2008;12(5):483–90.
69. Hogervorst PAM, Ferry N, Gatehouse AMR, Wäckers FL, Romeis J. Direct effects of snowdrop lectin (GNA) on larvae of three aphid predators and fate of GNA after ingestion. *J Insect Physiol.* 2006; 52(6):614–24.
70. Hopkins TL, Harper MS. Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary wheat germ agglutinin on their formation and structure. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2001;47(2):100–9.
71. Hou Y, Hou Y, Yanyan L, Qin G, Li J. Extraction and purification of

- a lectin from red kidney bean and preliminary immune function studies of the lectin and four Chinese herbal polysaccharides. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:1–9.
72. Hu R, Zhai Q, Liu W, Liu X. An Insight Into the Mechanism of Cytotoxicity of Ricin to Hepatoma Cell: Roles of Bcl-2 Family Proteins, Caspases, Ca^{2+} -Dependent Proteases and Protein Kinase C. *J Cell Biochem.* 2001;593.
 73. Hung LD, Sato Y, Hori K. High-mannose N-glycan-specific lectin from the red alga *Kappaphycus striatum* (Carrageenophyte). *Phytochemistry*; 2011;72(9):855–61.
 74. Hwang SA, Dasgupta A, Actor JK. Cytokine production by non-adherent mouse splenocyte cultures to *Echinacea* extracts. *Clin Chim Acta.* 2004;343(1–2):161–6.
 75. Isaacson T, Damasceno CMB, Saravanan RS, He Y, Catalá C, Saladié M, *et al.* Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat Protoc.* 2006;1(2):769–74.
 76. Ishiguro M, Nakashima H, Tanabe S, Sakakibara R. Interaction of Toxic Lectin Ricin with Epithelial Cells of Rat Small Intestine *in vitro*. *Chem Pharm Bull.* 1992;40(2):441–5.
 77. Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, *et al.* Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for Estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(9):1265–72.
 78. Clement A, Olatunde M, Patrick O, Joyce O. Effect of drying temperature on the nutritional quality of *Moringa oleifera* leaves. *African J Food Sci.* 2015;1(3):93–96.
 79. Janusz P. White lupin (*Lupinus albus* L.) – nutritional and health values in human nutrition – a review. *Czech J Food Sci.* 2017;35(2):95–105.
 80. Jeong JA, Wu CH, Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY. Application of an airlift bioreactor system for the production of adventitious root biomass and caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea*. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2009;14(1):91–8.
 81. Jiang B, Yuan Y, Zhang X, Feng Z, Liu C. Separation and enrichment of lectin from zihua snap-bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds by PEG 600–ammonium sulfate aqueous two-phase system. *Molecules.* 2017;22(10).
 82. Jiang S li, Hu X dong, Liu P. Immunomodulation and liver protection of Yinchenhao decoction against concanavalin A-induced chronic liver injury in mice. *J Integr Med.*; 2015;13(4):262–8.

83. John FC, Tabbasum K, Rao CP. Chemico-biological aspects of plant lectins with a preference to legume lectins. Studies in Natural Products Chemistry [Prieiga per internetą 2018-09-27]. 1st ed. Copyright © 2013 Elsevier B.V. Visos teisės saugomos.; 2013. p. 359–81. Aktyvi nuoroda: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59603-1.00010-2>
84. Jurinke C, Oeth P, van den Boom D. MALDI-TOF Mass Spectrometry: A Versatile Tool for High-Performance DNA Analysis. Mol Biotechnol. 2004;26(2):147–64.
85. Kanokwiroon K, Teanpaisan R, Wititsuwannakul D, Hooper AB, Wititsuwannakul R. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. Mycoses. 2008;51(4):301–7.
86. Kansal R, Gupta RN, Koundal KR, Kuhar K, Gupta VK. Purification, characterization and evaluation of insecticidal potential of trypsin inhibitor from mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) seeds. Acta Physiol Plant. 2008;30(6):761–8.
87. Katzameyer M. Zusammensetzungen mit schleimhautschützender Wirkung und deren Verwendung, insbesondere als Nahrungsergänzungsmittel. EP 2 106 705 A1. 2009. p. 1–16.
88. Kaushik S, Mohanty D, Surolia A. The role of metal Ions in substrate recognition and stability of concanavalin A: A molecular dynamics study. Biophys J. Biophysical Society; 2009;96(1):21–34.
89. Kelly S, Radutoiu S, Stougaard J. Legume LysM receptors mediate symbiotic and pathogenic signalling. Curr Opin Plant Biol.; 2017;39:152–8.
90. Khan F, Khan MI. Fungal Lectins: Current molecular and biochemical perspectives. Int J Biol Chem. 2011;5(1):1–20.
91. Kieliszewski MJ, Showalter a M, Leykam JF. Potato lectin: a modular protein sharing sequence similarities with the extensin family, the hevein lectin family, and snake venom disintegrins (platelet aggregation inhibitors). Plant J. 1994;5(6):849–61.
92. Koenig T, Menze BH, Kirchner M, Monigatti F, Parker KC, Patterson T, *et al.* Robust prediction of the MASCOT score for an improved quality assessment in mass spectrometric proteomics. J Proteome Res. 2008;7(9):3708–17.
93. Kondrotas A, Simonienė G, Janulis V, Jurkštieņe V. Hemoagglutinative properties of *Desmodium caradense* and *Echinacea purpurea* (phytoimmunostimulators). Laboratory and Clinical Immunology: International Scientific Conference. 1996. p. 121.
94. Kong J, Sertel O, Shimada H, Boyer KL, Saltz JH, Gurcan MN, *et al.*

- Computer-aided evaluation of neuroblastoma on whole-slide histology images: Classifying grade of neuroblastic differentiation. *Pattern Recognit.* 2009;42(6):1080–92.
95. Konozy EHE, Bernardes ES, Rosa C, Faca V, Greene LJ, Ward RJ, *et al.* Isolation, purification, and physicochemical characterization of a d-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Arch Biochem Biophys.* 2003;410(2):222–9.
 96. Kudrya VA, Simonenko IA. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1994;41:505–9.
 97. Lalita S, Maneerate J. Effect of drying methods on fiber content in dried fruit and vegetable from non-toxic agricultural field. *Int J Geomate.* 2016;11(28):2896–900.
 98. Lam SK, Ng TB. Apoptosis of human breast cancer cells induced by hemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* cv. *Legumi secchi*. *Food Chem.*; 2011;126(2):595–602.
 99. Lannoo N, Van Damme EJM. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Front Plant Sci.* 2014;5(397)1-16.
 100. Lavanya Latha V, Nagender Rao R, Nadimpalli SK. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (Indian lablab beans). *Protein Expr Purif.* 2006;45(2):296–306.
 101. Lee TT, Huang CC, Shieh XH, Chen CL, Chen LJ, Yu B. Flavonoid, phenol and polysaccharide contents of *Echinacea purpurea* L. and its immunostimulant capacity *in vitro*. *Int J Environ Sci Dev.* 2013; 1(1):5–9.
 102. Lenhoff AM. Ion-exchange chromatography of proteins: The inside story. *Mater Today Proc.*; 2016;3(10):3559–67.
 103. Levitt M. Nature of the protein universe. *PNAS.* 2009;106(27): 11079–84.
 104. Liu Z, Liu B, Zhang Z-T, Zhou T-T, Bian H-J, Min M-W, *et al.* A mannose-binding lectin from *Sophora flavescens* induces apoptosis in HeLa cells. *Phytomedicine.* 2008;15(10):867–75.
 105. Lopez Nunez OF, Pizon AF, Tamama K. Ricin poisoning after oral ingestion of castor beans: A case report and review of the literature and laboratory testing. *J Emerg Med.*; 2017;53(5):e67–71.
 106. Loris R, Walle I Van, Greve H De, Beeckmans S, Deboeck F, Wyns L, *et al.* Structural Basis of Oligomannose Recognition by the *Pterocarpus angolensis* Seed Lectin. 2004;1227–40.
 107. Lu I-C, Lee C, Lee Y-T, Ni C-K. Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *Annu Rev Anal Chem.*

- 2015;8(1):21–39.
108. Luz LDA, Silva MCC, Ferreira RDS, Santana LA, Silva-Lucca RA, Mentele R, *et al.* Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* Lectin and its effect on hemostatic parameters. *Int J Biol Macromol.*; 2013;58:31–6.
 109. Madani TA, Abuelzein ETME, Abu-Araki H, Azhar EI, Al-Bar HMS. Trypsin-dependent hemagglutination of erythrocytes of a variety of mammalian and avian species by *Alkhumra* hemorrhagic fever virus. *Arch Virol.* 2013;158(1):97–101.
 110. Mahmood T, Yang PC. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429–34.
 111. Manayi A, Vazirian M, Saeidnia S. *Echinacea purpurea* : Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacogn Rev.* 2015;9(17).
 112. March RE. Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century. *Int J Mass Spectrom.* 2000;200(1–3):285–312.
 113. Maskatia ZK, Baker K. Hypereosinophilia associated with echinacea use. *South Med J.* 2010;103(11):1173–4.
 114. Matthias A, Banbury L, Stevenson LM, Bone KM, Leach DN, Lehmann RP. Alkylamides from *Echinacea* modulate induced immune responses in macrophages. *Immunol Invest.* 2007;36(2): 117–30.
 115. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):606–16.
 116. Medeiros DS, Medeiros TL, Ribeiro JKC, Monteiro NK V, Migliolo L, Uchoa AF, *et al.* A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania* promastigotes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2010; 155(3):211–6.
 117. De Mejía EG, Prisecaru VI. Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45(6): 425–45.
 118. Mezei T, Horváth E, Turcu M, Gurzu S, Raica M, Jung I. Microvascular density in non-Hodgkin B-cell lymphomas measured using digital morphometry. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(1):67–71.
 119. Michelle P, Celine M, Moura D, Soares F, Trentin S, Patrícia A, *et al.*, The lectin found in *Punica granatum* juice , is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Int J Biol Macromol.*; 2018;108:391–400.

120. Mikniene Z, Sutkevicius JA, Kucinskas A, Januskevicius A, Kerziene S, Kucinskiene J. Evaluation of blood biochemistry, morphology and the amount of isthmuses in the eosinophils nuclei for standard dark mink (*Mustela Vision*). Vet Ir Zootech. 2010;49(71):61–5.
121. Miyake K, Tanaka T, McNeil PL. Lectin-based food poisoning: A new mechanism of protein toxicity. PLoS One. 2007;2(8):1–6.
122. Moreno AN, Jamur MC, Oliver C, Roque-Barreira MC. Mast cell degranulation induced by lectins: Effect on neutrophil recruitment. Int Arch Allergy Immunol. 2003;132(3):221–30.
123. Mulder L, Lefebvre B, Cullimore J, Imberty A. LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. Glycobiology. 2006;16(9):801–9.
124. Mullins RJ, Robert H. Adverse reactions associated with *Echinacea*: The Australian experience. Ann Allergy.; 2002;88(1):42–51.
125. Nakamura T, Oda Y. Mass spectrometry-based quantitative proteomics. Biotechnol Genet Eng Rev. 2007;24(1):147–64.
126. Nascimento KS, Cunha AI, Nascimento KS, Cavada BS, Azevedo AM, Aires-Barros MR. An overview of lectins purification strategies. J Mol Recognit. 2012;25(11):527–41.
127. Nasi A, Picariello G, Ferranti P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. J Proteomics.; 2009; 72(3):527–38.
128. Nciri N, Cho N. New research highlights: Impact of chronic ingestion of white kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L. var. Beldia) on small-intestinal disaccharidase activity in Wistar rats. Toxicol Reports.; 2018;5:46–55.
129. Neilson KA, Ali NA, Muralidharan S, Mirzaei M, Mariani M, Assadourian G, *et al.* Less label, more free: Approaches in label-free quantitative mass spectrometry. Proteomics. 2011;11(4):535–53.
130. Netopilík M. Toward ideal separation by size-exclusion chromatography. J Chromatogr A. 2017;1487:139–46.
131. Nguema-Ona E, Vitré-Gibouin M, Gotte M, Plancot B, Lerouge P, Bardor M, *et al.* Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. Front Plant Sci. 2014;5:1–12.
132. Nowell PC. Phytohemagglutinin : An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. Cancer Res. 1960;20:462–6.
133. Nyalambisa M, Oyemitan IA, Matewu R, Oyedeji OO, Oluwafemi OS. Volatile constituents and biological activities of the leaf and root of *Echinacea* species from South Africa. Saudi Pharm J.;

- 2017;25(3):381–6.
134. Ofek I, Hasty DL, Sharon N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: Prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;38(3):181–91.
 135. Oldroyd GED, Downie JA. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol.* 2008;59(1): 519–46.
 136. Oliveira Brito PKM, Gonçalves TE, Fernandes FF, Miguel CB, Rodrigues WF, Lazo Chica JE, *et al.* Systemic effects in naïve mice injected with immunomodulatory lectin ArtinM. *PLoS One.* 2017; 12(10):1–19.
 137. Oliveira PSS De, Rêgo MJBDM, Da Silva RR, Cavalcanti MB, Galdino SL, Correia MTDS, *et al.* *Cratylia mollis* 1, 4 lectin: A new biotechnological tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 induction and generation of immunological memory. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
 138. Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, *et al.* Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1(5):376–86.
 139. Oniszczyk T, Oniszczyk A, Gondek E, Guz L, Puk K, Kocira A, *et al.* Active polyphenolic compounds, nutrient contents and antioxidant capacity of extruded fish feed containing purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.). *Saudi J Biol Sci.* 2016;
 140. Ozen T, Korkmaz H. Modulatory effect of *Urtica dioica* L. (*Urticaceae*) leaf extract on biotransformation enzyme systems, antioxidant enzymes, lactate dehydrogenase and lipid peroxidation in mice. *Phytomedicine.* 2003;10(5):405–15.
 141. Parijs J Van, Broekaert W, Goldstein I, Peumans W. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta.* 1991;(183):258–64.
 142. Parikh I, Cuatrecasas P. Affinity chromatography, principles and applications. In: Magdeldin S, editor. *Methods of Protein Separation.* In Tech; 2012. p. 368.
 143. Pedersen CT, Loke I, Lorentzen A, Wolf S, Kamble M, Kristensen SK, *et al.* N-glycan maturation mutants in *Lotus japonicus* for basic and applied glycoprotein research. *Plant J.* 2017;91(3):394–407.
 144. Pellati F, Benvenuti S, Melegari M, Lasseigne T. Variability in the composition of anti-oxidant compounds in *Echinacea* species by HPLC. *Phytochem Anal.* 2005;16(2):77–85.
 145. Pereira-Da-Silva G, Moreno AN, Marques F, Oliver C, Célia Jamur M, Panunto-Castelo A, *et al.* Neutrophil activation induced by the

- lectin KM⁺ involves binding to CXCR2. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2006;1760(1):86–94.
146. Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999;20(18):3551–67.
 147. Perry NB, Van Klink JW, Burgess EJ, Parmenter GA. Alkamide levels in *Echinacea purpurea*: Effects of processing, drying and storage. *Planta Med.* 2000;66(1):54–6.
 148. Peumans WJ, Van Damme EJM, Barre A, Pierre R. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. In: Wu AM, editor. *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates* —2 [Prieiga per internetą 2019-09-05]. Boston, MA: Springer; 2001. p. 26–54. Aktyvi nuoroda: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-1267-7_28
 149. Peumans WJ, Van Damme EJM, Nausicaa L. Plant Lectins. *Adv Bot Res.* 2008;48:107–209.
 150. Peumans WJ, Ley M De, Broekaert WF. An unusual lectin from stinging nettle (*Urtica dioica*) rhizomes. *FEBS Lett.* 1984;177(1):99–103.
 151. Pinedo M, Regente M, Elizalde M, Y. Quiroga I, A. Pagnussat L, Jorin-Novotny J, *et al.* Extracellular sunflower proteins: evidence on non-classical secretion of a jacalin-related lectin. *Protein Pept Lett.* 2012;19(3):270–6.
 152. Pires C, Martins N, Carvalho AM, Barros L, Ferreira ICFR. Phytopharmacologic preparations as predictors of plant bioactivity: A particular approach to *Echinacea purpurea* (L.) Moench antioxidant properties. *Nutrition.* 2016;32(7–8):834–9.
 153. Pirok BWJ, Breuer P, Hoppe SJM, Chitty M, Welch E, Farkas T, *et al.* Size-exclusion chromatography using core-shell particles. *J Chromatogr A.* 2017;1486:96–102.
 154. Podwojski K, Eisenacher M, Kohl M, Turewicz M, Meyer HE, Rahnenführer J, *et al.* Peek a peak: A glance at statistics for quantitative label-free proteomics. *Expert Rev Proteomics.* 2010;7(2):249–61.
 155. Polito L, Bortolotti M, Farini V, Battelli MG, Barbieri L, Bolognesi A. Saporin induces multiple death pathways in lymphoma cells with different intensity and timing as compared to ricin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(5):1055–61.
 156. Pospelov S, Pospelova A. Lectins of representatives of *Echinacea* genus (*Echinacea* Moench). 2. Some particularities of activity in ontogenesis *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *Chim Rastit sirja.*

- 2012;3:149–56.
157. Prasanna VK, Venkatesh YP. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response *in vitro*. *Int Immunopharmacol.*; 2015;26(2):304–13.
 158. Pryme I, Bardocz S, Pusztai A, Ewen S. Dietary mistletoe lectin supplementation and reduced growth of a murine non-Hodgkin lymphoma. *Histol Histopathol.* 2002;17(1):261–71.
 159. Pusztai A. Structure of lectins. *Plants lectins*. Cambridge University Press; 1991. p. 32–8.
 160. Pusztai A, Bardocz S. Biological Effects of Plant Lectins on the Gastrointestinal Tract: Metabolic Consequences and Applications. *Trends GlycosciGlycotechnol.* 2009;2:149–65.
 161. Pusztai AJ, Bardocz ZM, Palmer RM, Fish NW. EP000942741B1. Lectin compositions and uses thereof. 2002. p. 1–30.
 162. Qadir S, Hussain Wani I, Rafiq S, Ahmad Ganie S, Masood A, Hamid R. Evaluation of antimicrobial activity of a lectin isolated and purified from *Indigofera heterantha*. *Adv Biosci Biotechnol.* 2013;04(11):999–1006.
 163. Qu L, Chen Y, Wang X, Scalzo R, Davis JM. Patterns of variation in alkalamides and cichoric acid in roots and aboveground parts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. *HortScience.* 2005;40(5):1239–42.
 164. Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, *et al.* Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature.* 2003;425(6958):585–92.
 165. Ragazinskiene O. Purpurinės ežiulės (*Echinacea purpurea* L. Moench) introdukcija Lietuvoje: daktaro disertacijos santrauka. 1999.
 166. Rao PVL, Jayaraj R, Bhaskar ASB, Kumar O, Bhattacharya R, Saxena P, *et al.* Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2005;69(5):855–65.
 167. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc.* 2007;2(8):1896–906.
 168. Rauniyar N, Yates JR. Isobaric Labeling-Based Relative Quantification in Shotgun Proteomics. 2014;
 169. Reyes-Montaña EA, Vega-Castro NA. Plant lectins with insecticidal and insectistatic activities. In: Begum G, editor. *Insecticides - Agriculture and Toxicology* [Prieiga per internetą 2018-11-03]. InTech; 2018. p. 17–41. Aktyvi nuoroda: <http://www.intechopen.com/books/insecticides-agriculture-and-toxicology/plant-lectins-with-insecticidal-and-insectistatic-activities>

170. Reynoso-Camacho R, González De Mejía E, Loarca-Piña G. Purification and acute toxicity of a lectin extracted from tepary bean (*Phaseolus acutifolius*). Food Chem Toxicol. 2003;41(1):21–7.
171. Rezaei E, Abedi M. Efficient Ultrasound-assisted extraction of cichoric acid from *Echinacea purpurea* root. Pharm Chem J. 2017;51(6):471–5.
172. Ribeiro AC, Ferreira R, Freitas R. Plant Lectins : Bioactivities and Bioapplications [Prieiga per internetą 2018-11-10]. 1st ed. Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier B.V.; 2018. 1–42 p. Aktyvi nuoroda: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64056-7.00001-5>
173. Rüdiger H, Gabius HJ. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. Glycoconj J. 2002;18(8):589–613.
174. Sadananda TS, Govindappa M, Ramachandra YL. *In vitro* antioxidant activity of lectin from different endophytic fungi of *Viscum album* L . 2014;4(5):626–43.
175. Sansone ACMB, Sansone M, dos Santos Dias CT, Oliveira do Nascimento JRJR. Oral administration of banana lectin modulates cytokine profile and abundance of T-cell populations in mice. Int J Biol Macromol.; 2016;89:19–24.
176. Santos AFS, da Silva MDC, Napoleão TH, Paiva PMG, Correia MT dos S, Coelho LCBB. Lectins : Function, structure, biological properties and potential applications. Curr Top Pept Protein Res. 2014;15:41–62.
177. Schoberer J, Strasser R. Plant glyco-biotechnology. Semin Cell Dev Biol.; 2018;80:133–41.
178. De Schutter K, Van Damme EJM. Protein-carbohydrate interactions as part of plant defense and animal immunity. Molecules. 2015;20(5):9029–53.
179. Schweikhard L, Alber GM, Marshall AG. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. 1993. 0–4 p.
180. Sharon N. Lectins: past, present and future. Biochem Soc Trans. 2008;36(6):1457–60.
181. Shenoy A, Geiger T. Super-SILAC: Current trends and future perspectives. Expert Rev Proteomics. 2014;12(1):13–9.
182. Shevchenko A, Tomas H, Havliš J, Olsen J V., Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. Nat Protoc. 2006;1(6):2856–60.
183. Shubin A V., Demidyuk I V., Komissarov AA, Rafieva LM, Kostrov S V., Shubin A V., *et al.* Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. Oncotarget. 2016;7(34):55863–89.
184. Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega for making accurate

- alignments of many protein sequences. *Protein Sci.* 2018;27(1):135–45.
185. Silva JS, Andrade AC, Santana CC, Santos LQ, de Oliveira CI, Veras PST, *et al.* Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. *PLoS One.* 2012;7(1):1–10.
 186. Silva MCC, Santana LA, Mentele R, Ferreira RS, De Miranda A, Silva-Lucca RA, *et al.* Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process Biochem.*; 2012;47(7):1049–59.
 187. Silva TA parecid. da, Souza MA parecid. de, Cecílio NT atian., Roque-Barreira MC ristin. Activation of spleen cells by ArtinM may account for its immunomodulatory properties. *Cell Tissue Res.* 2014;357(3):719–30.
 188. Da Silva TA, Mariano VS, Sardinha-Silva A, De Souza MA, Mineo TWP, Roque-Barreira MC. IL-17 induction by ArtinM is due to stimulation of IL-23 and IL-1 release and/or interaction with CD3 in CD4+T cells. *PLoS One.* 2016;11(2):1–16.
 189. Singh Bains J, Singh J, Kamboj SS, Nijjar KK, Agrewala JN, Kumar V, *et al.* Mitogenic and anti-proliferative activity of a lectin from the tubers of Voodoo lily (*Sauromatum venosum*). *Biochim Biophys Acta.* 2005;1723(1–3):163–74.
 190. Singh RS, Bhari R, Rana V, Tiwary AK. Immunomodulatory and therapeutic potential of a mycelial lectin from *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol.*; 2011;165(2):624–38.
 191. Sitohy M, Doheim M, Badr H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. *Food Chem.* 2007;104(3):971–9.
 192. Smalinskiene A, Savickiene N, Zitkevicius V, Pangonyte D, Sadauskiene I, Kasauskas A, *et al.* Effect of *Acanthopanax senticosus* on the accumulation of cadmium and on the immune response of spleen cells. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues.* 2014;77(21):1311–8.
 193. Song E, Pyreddy S, Mechref Y. Quantification of glycopeptides by multiple reaction monitoring liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2012;26(17):1941–54.
 194. Soper AS, Aird SD. Elution of tightly bound solutes from concanavalin A sepharose. factors affecting the desorption of cottonmouth venom glycoproteins. *J Chromatogr A.* 2007;1154(1–2):308–18.
 195. Strasser R. Plant protein glycosylation. *Glycobiology.*

- 2016;26(9):926–39.
196. Suarez JE, Urquiza M, Curtidor H, Rodriguez LE, Ocampo M, Torres E, *et al.* A GBP 130 derived peptide from *Plasmodium falciparum* binds to human erythrocytes and inhibits merozoite invasion *in vitro*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(4):495–501.
 197. Takebe Y, Saucedo CJ, Lund G, Uenishi R, Hase S, Tsuchiura T, *et al.* Antiviral lectins from red and blue-green algae show potent *in vitro* and *in vivo* Activity against Hepatitis C Virus. PLoS One. 2013;8(5):1–10.
 198. Tamma SML, Kalyanaraman VS, Pahwa S, Dominguez P, Modesto RR. The lectin jacalin induces phosphorylation of ERK and JNK in CD4+ T cells. J Leukoc Biol. 2003;73:682–8.
 199. Tannu N, Hemby SE. Quantitation in two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis: Effect of protein fixation. Electrophoresis. 2006;27(10):2011–5.
 200. Thies A, Dautel P, Meyer A, Pfüller U, Schumacher U. Low-dose mistletoe lectin-I reduces melanoma growth and spread in a scid mouse xenograft model. Br J Cancer. 2008;98(1):106–12.
 201. Thude S, Classen B. High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: an arabinogalactan-protein and an arabinan. Phytochemistry. 2005;66(9):1026–32.
 202. Thygesen L, Thulin J, Mortensen A, Skibsted LH, Molgaard P. Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination. Food Chem. 2006;101(1):74–81.
 203. Tinjuangjun P, Loc NT, Gatehouse AMR, Gatehouse JA, Christou P. Enhanced insect resistance in Thai rice varieties generated by particle bombardment. Mol Breed. 2000;6(4):391–9.
 204. Tomatsu M, Mujin T, Shibamoto N. Production of Aralin , a Selective Cytotoxic Lectin against Human Transformed Cells , in Callus Culture of *Aralia elata*. Planta Med. 2004;70:469–71.
 205. Urh M, Simpson D, Zhao K. Affinity chromatography: general methods. Methods in enzymology. 1st ed. Elsevier Inc.; 2009 [Prieiga per internetą 2018-11-27]. p. 417–38. Aktyvi nuoroda: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892186>
 206. Urtasun N, Baieli MF, Cascone O, Wolman FJ, Miranda M V. High-level expression and purification of recombinant wheat germ agglutinin in *Rachiplusia nu* larvae. Process Biochem.; 2015;50(1):40–7.
 207. Vandenborre G, Smagghe G, Van Damme EJMM. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. Phytochemistry; 2011;72(13):1538–50.

208. Vasconcelos IM, Oliveira JT a. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*. 2004;44(4):385–403.
209. Volodchenko AI, Tsirkin VI, Kostyaev AA. The mechanism of change in the rate of agglutination of human erythrocytes under the influence of adrenaline. *Hum Physiol*. 2014;40(2):171–8.
210. Wal L van der, Demmers JAA. Quantitative Mass Spectrometry-based Proteomics. *Recent Advances in Proteomics Research*. 2015. p. 1–21.
211. Wan J. Diverse roles of lysin-motif (LysM) proteins in mediating plant-microbe interactions. *Walailak J Sci Technol*. 2015;12(8):631–41.
212. Wilm M. Principles of Electrospray Ionization. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(7):1-8.
213. Wong JH, Ng TB. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(2):234–43.
214. Wysocki VH, Resing K a, Zhang Q, Cheng G. Mass spectrometry of peptides and proteins. *Methods*. 2005;35(3):211–22.
215. Yan Q, Li Y, Jiang Z, Sun Y, Zhu L, Ding Z. Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongholicus*. *Phytomedicine*. 2009;16(6–7):586–93.
216. Yao Q, Wu C, Luo P, Xiang X, Liu J, Mou L, *et al*. A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. *Process Biochem*. 2010;45(9):1477–85.
217. Zhai Z, Liu Y, Wu L, Senchina DS, Wurtele ES, Murphy PA, *et al*. Enhancement of innate and adaptive immune functions by multiple Echinacea species. *J Med Food*. 2007;10(3):423–34.
218. Zhu W, Smith JW, Huang C-MM. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:840518.
219. Zipfel C, Oldroyd GED. Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature*. 2017;543(7645):328–36.

STRAIPSNĖJŲ, KURIUOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS

1. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Dam, Svend; Pesliakas, Henrikas; Žvirblis, Gintautas; Mištinienė, Edita; Ragažinskienė, Ona; Pamparienė, Ina; Žymantienė, Judita; Baniulis, Danas; Savickienė, Nijolė. Investigation of *Echinacea purpurea* root proteins with hemagglutinating activity // Natural product communications. Westerville: Natural product communications. 2017, vol. 12, no. 6, p. 947-950.
2. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Juodsnuokyte, Jovita; Savickas, Arūnas; Ragažinskienė, Ona; Šiatkutė, Luka; Žvirblytė, Gitana; Mištinienė, Edita; Savickienė, Nijolė. Fractionation and evaluation of proteins in roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench // Acta Pharmaceutica. Zagreb: Hrvatsko Farmaceutsko Društvo. 2015, Vol. 65, Iss. 4, p. 473-479.

MOKSLINIŲ KONFERENCIJŲ, KURIOSE BUVO PASKELBTI DISERTACIJOS TYRIMŲ REZULTATAI, SĄRAŠAS

1. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Baniulis, Danas; Ragažinskienė, Ona; Baranauskas, Vytautas; Grigalevičiūtė, Ramunė; Zigmantaitė, Vilma; Juodžiukynienė, Nomeda; Pangonytė, Dalia; Savickienė, Nijolė. Hemagglutinin fraction from *Echinacea purpurea* L. (Moench) roots impact on mice kidney morphology // 1st International doctoral students' conference "Science for Health": book of abstracts: April 13, 2018, Kaunas, Lithuania / Lithuanian university of health sciences. LSMU Department of Research Affairs. Council of LSMU Doctoral Students. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai, 2018. p. 68–69.
2. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Baniulis, Danas; Ragažinskienė, Ona; Juodžiukynienė, Nomeda; Pangonytė, Dalia; Savickienė, Nijolė. Impact of *Echinacea purpurea* L. (Moench) hemagglutinin LysM to mice secondary immune response // 9th International Pharmaceutical conference „Science and practice“ 2018, dedicated to the 100th anniversary of independent Lithuania's pharmacy: book of abstracts : November 9, 2018, Kaunas, Lithuania / Lithuanian University of Health Sciences (LUHS) Faculty of Pharmacy and Lithuanian University of Health Sciences Faculty of Pharmacy Alumni [et al.]. Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universitetas, 2018, p. 111.
3. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Baniulis, Danas; Baranauskas, Vytautas; Grigalevičiūtė, Ramunė; Zigmantaitė, Vilma; Miknienė, Zoja; Savickienė, Nijolė. Hemagglutinin fraction from *Echinacea purpurea* L. (Moench) roots impact on mice immune response *in vivo* // The 8th International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy Practice dedicated to the 80th anniversary of the Museum of History of Lithuanian Medicine and Pharmacy : book of abstracts : December 15, 2017 Kaunas, Lithuania / organized by the Faculty of Pharmacy of Lithuanian Health Sciences University in collaboration with Lithuanian Pharmaceutical Association and LSMU FF Alumni Association. Kaunas: Lithuanian University of Health Sciences, 2017. p. 42–43.
4. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Ragažinskienė, Ona; Baniulis, Danas; Savickienė, Nijolė. Hemagglutinin from *Echinacea purpurea* L. root separation and identification // The Vital

Nature Sign: 11th International scientific conference „The Vital Nature Sign“: 19–20 October, 2017, Vilnius, Lithuania : abstract book / Vytautas Magnus University. Instrumental Analysis Open Access Center; Editors: Dr. Nicola Tiso, dr. Vilma Kaškonienė. Kaunas: Vytautas Magnus University. 2017, p. 27–27.

5. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Dam, Svend; Savickienė, Nijolė; Ragažinskienė, Ona; Baniulis, Danas; Pamparienė, Ina; Žymantienė, Judita. Fractionation of *Echinacea purpurea* L. (Moench) proteins and assessment of Glycosylated proteins distribution in fractions // The Vital Nature Sign: 10th International Scientific Conference „The Vital Nature Sign“: May 19-20, 2016, Vilnius, Lithuania; Vytautas Magnus University, Kaunas. 2016, p. 132–132.
6. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Savickienė, Nijolė; Dam, Svend; Ragažinskienė, Ona; Baniulis, Danas; Pamparienė, Ina; Žymantienė, Judita. Fractionation and hemagglutinating activity determination of proteins from *Echinacea purpurea* L. (Moench) root // International scientific-practical conference BaltPharm Forum 2016 main theme: „Complementary and self-care health products: A pharmacist competences and responsibilities“: 15–17 April, 2016, Klaipėda, Lithuania: abstract book / organized by Lietuvos Farmacijos sąjunga in collaboration with EEsti Farmaatsia Selts and Latvijas Farmaceitu Biedriba. Klaipėda: Lithuanian Pharmaceutical Society, 2016. p. 55–55.
7. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Savickienė, Nijolė; Dam, Svend; Ragažinskienė, Ona; Baniulis, Danas; Žymantienė, Judita. Hemagliutinaciniu aktyvumu pasižyminčių baltymų išskyrimas iš rausvažiedžių ežiulių šaknų ir jų frakcionavimas // IX nacionalinė doktorantų mokslinė konferencija „Mokslas - sveikatai“: konferencijos tezių knyga: 2016 balandžio 13 d. Kaunas / Lietuvos sveikatos mokslų universitetas; Kaunas : Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai, 2016. p. 14–16.
8. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Žvirblis, Gintautas; Ragažinskienė, Ona; Savickienė, Nijolė. Purification of purple coneflower root hemagglutinin by affinity chromatography // The 7th International Pharmaceutical Conference „Science and practice 2016“, dedicated to the 240th anniversary of prof. Johann Friedrich Wolfgang: book of abstracts : October 20–21, 2016, Kaunas, Lithuania / Faculty of Pharmacy of Lithuanian university of Health Sciences [et al.]. Kaunas: Lithuanian university of Health Sciences, 2016. p. 16–17.
9. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Savickienė, Nijolė; Baniulis, Danas; Ragažinskienė, Ona. Extraction conditions of proteins from *Echinacea purpurea* L. (Moench) roots and leaves // The 6th „International Pharmaceutical Conference Science and Practice 2015“: book of abstracts: November 5–6, 2015, Kaunas, Lithuania / Faculty of Pharmacy of Lithuanian university of Health Sciences. LSMU FF Alumni association. Lithuanian Pharmaceutical association. Lithuanian Pharmacists' Society. Kaunas: Lithuanian university of Health Sciences, 2015. p. 27–27.
10. **Balčiūnaitė, Gabrielė**; Savickienė, Nijolė; Žvirblis, Gintautas; Žvirblytė, Gitana; Ragažinskienė, Ona; Kandelinskaya, Olga; Grischenko, Helena. Determination of proteins in *Echinacea purpurea* (L.) Moench roots and rhizomes // Pharmaceutical sciences and pharmacy practice dedicated to 145th anniversary of prof. Petras Raudonikis: the 5th international conference, November 22, 2014 Kaunas, Lithuania: 2014. p. 22–24.

STRAIPSNŲ KOPIJOS, KURIUOSE SKELBIAMI SVARBIAUSI TYRIMŲ REZULTATAI

Acta Pharm. 65 (2015) 473–479

DOI: 10.1515/acph-2015-0036

Short communication

Fractionation and evaluation of proteins in roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench

GABRIELE BALCIUNAITE¹
JOVITA JUODSNUKYTE¹
ARUNAS SAVICKAS³
ONA RAGAZINSKIENE⁴
LUKA SIATKUTE¹
GITANA ZVIRBLYTE²
EDITA MISTINIENE²
NIJOLE SAVICKIENE^{1*}

¹Department of Pharmacognosy
Lithuanian University of Health Sciences
Kaunas, Lithuania

²Institute of Biotechnology
Vilnius University, Vilnius, Lithuania

³Department of Social Pharmacy and
Drug Technology, Lithuanian University
of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

⁴Kaunas Botanical Garden of Vytautas
Magnus University Kaunas, Lithuania

Accepted July 14, 2015

Echinacea purpurea (L.) Moench, a member of the *Asteraceae* family, is a plant rich in flavonoids, essential oils, phenolic compounds, saponins, polysaccharides and glycoproteins. The aim of the study was to evaluate the protein content in dried roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench after homogenization of roots with liquid nitrogen, extraction in 0.01 mol L⁻¹ phosphate-buffered saline (PBS) and purification followed by fractionation of proteins using gel filtration chromatography. Total concentration of proteins was measured using the Bradford method, and evaluation of the molecular mass of proteins was accomplished by applying the SDS-PAGE gel electrophoresis. The Bradford assay revealed that the highest concentration of proteins in fractions collected after gel filtration chromatography was 4.66–6.07 mg mL⁻¹. Glycoproteins, alkalimides and polysaccharides in roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench are chemical compounds that are responsible for their immunomodulatory properties. However, information about the difference of protein contents in fresh and dried roots of *E. purpurea* is insufficient.

Keywords: *Echinacea purpurea* (L.) Moench, proteins, gel filtration chromatography, SDS-PAGE

Echinacea purpurea (L.) Moench (*Asteraceae*) is a herb well known for its usage in medicine. It is rich in phenolic compounds, including caffeic acid derivatives (0.6–2.1 %) – mainly cichoric, caftaric, chlorogenic and isochlorogenic acids and flavonoids (e.g., rutoside, quercetin and kaempferol). Alkalimides (0.01–0.04 %) mostly isobutylamides of C11–C16 straight-chain fatty acids with olefinic or acetylenic bonds are also characteristic constituents of the roots of *E. purpurea*. Polysaccharides (inulin, arabinogalactan), proteins and glycoproteins extracted from the roots of *E. purpurea* exhibit anti-inflammatory activity by stimulating the immune cells. Other constituents, including the saturated pyrrolizidine-type alkaloids, such as tussilagine and isotussilagine, polyacetylene derivatives, and up to 0.2 % of essential oils (e.g., containing caryophyllene or humulene, limonene and camphene) have also been isolated from the roots of *E. purpurea* (1). Even though plant proteins

* Correspondence; e-mail: savickienenirole@takas.lt

are currently being intensively studied for their antiproliferative (2), antibacterial (3), antioxidant (4) and anti-inflammatory (5) activities, there is a lack of information about such compounds in the roots of *E. purpurea*. In this study, proteins extracted from the dried roots of *E. purpurea* were evaluated according to their molecular size and their molecular mass, and their content in the roots was determined.

EXPERIMENTAL

Chemicals and materials

Ammonium sulfate (99.0 %) and ϵ -amino-capronic acid (> 99.0 %) were supplied by Carl Roth GmbH + Co. KG (Germany). Polyvinylpyrrolidone (PVPP), benzamidine (99.0 %), and 0.01 mol L⁻¹ phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, consisted of 10.9 g sodium phosphate monobasic (Sigma-Aldrich, USA), anhydrous ($\geq$ 99.0 %) (Sigma-Aldrich), 3.2 g of sodium phosphate dibasic, anhydrous ($\geq$ 99.0 %) (Sigma-Aldrich), and 90.0 g of sodium chloride (Sigma-Aldrich), all dissolved in 1000 mL of distilled water.

Whatman® regenerated cellulose membrane filters, pore size 0.45 μ m, were purchased from Sigma-Aldrich. Centriprep YM-3 centrifugal filters obtained from EMD Millipore (USA) were used in the desalting and concentration procedure of the *E. purpurea* protein sample. The phosphate buffer (PB) Centipur®, pH 7.0, was obtained from Merck (Germany). Bovine serum albumin (> 99.0 %) used as a standard substance in the Bradford protein assay, acrylamide/bis-acrylamide (30 %), sodium dodecyl sulphate (98.5 %) and Bradford reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) were purchased from Sigma-Aldrich.

The PageRuler Prestained Protein Ladder used as a standard mixture in SDS-PAGE, 10 to 180 kDa, was purchased from the Thermo Scientific™ Protein Biology Products (Lithuania). The Thermo Scientific Pierce Silver Stain Kit was obtained from Fisher Scientific (USA). The tris-buffer (0.25 mol L⁻¹ Tris, 1.92 mol L⁻¹ glycine, pH approx. 8.3) was purchased from Sigma-Aldrich.

Apparatus

AnIKA M20 grinder was obtained from IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Germany). Gel filtration chromatography was carried out using the ÄKTA Purifier 100 system Plus supplied by GE Healthcare Life Sciences (Sweden). The UNICORN 5.31 software [GE Healthcare Life Sciences (USA)] was employed to collect and analyze the gel filtration chromatography data. The separation of proteins was performed using Superdex 200 10/300 GL column (13 μ m particles, 300 $\times$ 10 mm) obtained from GE Healthcare Life Sciences (USA).

An Infinite M200 spectrophotometer obtained from TECAN (Germany) was used to measure the absorbance of samples in order to determine their protein concentration. A thermostat Techne Dri-Block (R) Model DB-2D was purchased from Techne (UK).

Preparation and storage of plant material

Dried roots (300 g) of 3-year-old *E. purpurea* plants were purchased from the Botanical Garden of Vytautas Magnus University, Kaunas, Lithuania, in September 2013. The specimens were taxonomically identified at the Department of Pharmacognosy of the Lithua-

nian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania. Dried roots were stored in a dark place. This plant material was exposed to the temperature of 20 ± 1 °C and a humidity-controlled environment (50 ± 5 %) until required for extraction.

Protein extraction and purification

The roots of the plant were ground with an IKA M20 grinder just before extraction. The plant material (40 g) was homogenized with liquid nitrogen in a mortar. The homogeneous material was extracted in 200 mL of PBS with 5 mmol L⁻¹ of benzamidine, 5 mmol L⁻¹ of ϵ -amino-capronic acid, and 2 % of PVPP for 12 h at the temperature of 4–5 °C. The extract was filtered through a cellulose membrane filter and centrifuged at 1,500 rpm for 30 min at 4–5 °C. Purification of proteins was followed by the salting out procedure. The filtrate (150 mL) was saturated (6). After 24 h of constant stirring, saturated solution was centrifuged at 15,000 rpm for 30 min. The resulting precipitate was dissolved in 1 mL of PBS solution and kept at 4 °C.

The precipitate was re-suspended and dialyzed for 48 h in dialysis membrane tubing with 0.22- μ m pores against three changes of PBS. The peptide solution was desalted, removing ammonium sulfate, and concentrated to 1.5 mL with Centrprep YM-3 centrifugal filters (7).

Gel filtration chromatography

Gel filtration chromatography was used to separate the protein mixture into fractions according to size (8). The procedure was performed with the ÄKTA Purifier 100 Plus system, using the Superdex 200 10/300 GL column, applying isocratic elution with PB. The procedure was carried out at constant temperature of +4 °C. The column matrix was a spherical composite of cross-linked agarose and dextran. The column was previously equilibrated with 50 mL of distilled water. Afterwards, the system was pre-equilibrated and eluted with PB. The flow rate was 0.5 mL min⁻¹ and the maximum pressure over the column was 1.4 MPa.

Prior to the injection into the system, the protein sample (1.5 mL) was centrifuged at 10000 rpm for 15 min at the temperature of +4 °C. After that, the protein sample was manually injected into the system with a 500- μ L injection loop. Each 0.5 mL fraction was collected in tube. Proteins were detected by monitoring their UV absorbance: proteins with aromatic amino acids were tested at 280 nm and peptide bonds at 215 nm. Following that, the protein amounts and molecular masses were examined in the collected fractions. Negative control (PB) was treated in the same manner (10).

Bradford microassay

Protein quantity was measured by applying the Bradford method (9) using 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, and 2 mg mL⁻¹ of the bovine serum albumin (BSA) protein standard. Each pre-diluted standard or sample (120 μ L) was placed into a separate microplate well and mixed with 120 μ L of Coomassie Brilliant Blue Dye G250. The absorbance of both standard and sample solutions was measured at 595 nm. The concentration of an unknown protein in

the sample was determined by using the equation $y = 0.0205x + 0.0105$ ($R^2 = 0.9955$) defining the calibration curve plot (10).

SDS-PAGE gel electrophoresis

The samples were prepared by mixing proteins with an electrophoresis sample buffer and heating the mixture at 95 °C for 5 min. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out in a slab mini-gel apparatus, using 15 % polyacrylamide as the separating gel, and 4 % polyacrylamide as the stacking gel. During the analysis, 30 µL of each sample was added into the wells of the gel slab, and 5 µL of the PageRuler Prestained Protein Ladder was used as the standard mixture. Power conditions for gel electrophoresis were 200 V and 25 mA, and the run time was 90 min. After SDS-PAGE, the gels were fixed and stained with silver nitrate. Molecular masses were estimated by comparison with the migration rates of the standard protein.

RESULTS AND DISCUSSION

Fractionation by gel filtration chromatography

Proteins from the roots of *E. purpurea* were separated into 80 fractions during gel filtration chromatography. Peaks were obtained in fractions No. 29, 30, 36, 40, 42–43, 48, 54, 58–59, 62–63, and 65–66. Fractions No. 29, 30, 36, 37, 40, 42, 48, 62, and 65 were chosen for the Bradford microassay because they showed the highest peaks.

Protein microassay

The amount of proteins in the fractions was determined as mentioned previously. The concentrations are shown in Table I. The highest amount of proteins was in fractions No. 29, 30, 36, and 37, and hence these fractions were chosen for SDS-PAGE gel electrophoresis.

Table I. Concentration of proteins in fractions when applying the Bradford method

Fraction No.	Concentration (µg mL ⁻¹)
29	6.068 ± 0.020
30	5.083 ± 0.016
36	4.663 ± 0.046
37	5.956 ± 0.036
40	4.01 ± 0.011
42	4.288 ± 0.006
48	2.044 ± 0.025
62	2.302 ± 0.019
65	1.259 ± 0.003

SDS-PAGE gel electrophoresis

SDS-PAGE electrophoresis showed separated protein fractions No. 29, 30, 36, and 37. According to the PageRuler Prestained Protein Ladder, the standard molecular mass of the proteins in fraction No. 29 was 14, 30, 35, and 120 kDa, and in fraction No. 30–14, 25, 30, 35, and 120 kDa. The molecular mass of the protein in fractions No. 36 and 37 was 36 kDa (Fig. 1). Glycoproteins with a molecular mass of 17, 21, 30 and 120 kDa were isolated from the roots of *E. purpurea* in previous studies (11). It was estimated that glycoproteins with lower molecular mass contained approximately 3 % of protein. Aspartate, glycine, glutamate, and alanine are the major amino acids of the protein moiety while arabinose, galactose, and glucosamine are the main sugars (12).

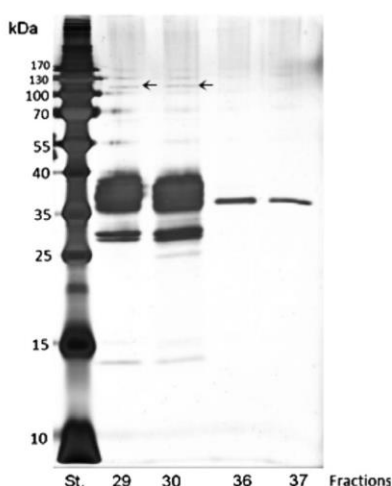


Fig. 1. Molecular mass of proteins in separated fractions of *E. purpurea* (arrows show 120 kDa sized protein bands).

The experimental data revealed that the pressed juice of *E. purpurea* contained 120 kDa arabinogalactan protein (AGP) known to be responsible for the immunomodulatory properties of the plant (13). Previous studies have shown that the polysaccharide moiety of AGP is 90 % and mainly consists of arabinose and galactose residues. Glutamine, asparagine, hydroxyproline, serine, threonine and alanine are the dominant amino acids of the protein moiety (14). According to our investigations, the bands of 120 kDa in fractions No. 29 and 30 were pale and blurred, which means that there was only a very small amount of 120 kDa sized protein. This suggests that fresh plant material contained more AGP sized protein than dried material (12). The presence of AGP in dry plant material still remains to be evaluated.

Two bands of 30 kDa in fractions No. 29 and 30 were identified, which indicated the presence of two polypeptides that shared the same amino acid sequence. Such polypeptides are usually isoenzymes that perform similar functions, but each of them is differently specialized for a specific tissue and/or purpose (14).

The aim of our experiment was to determine the protein size in dried *E. purpurea* roots and to compare our results with those presented in the literature. Our pilot experiments hypothesize that proteins in dried roots of *E. purpurea* could be isomers or glycosylated protein forms, judging by the SDS-PAGE image. Nevertheless, structural, quantitative and qualitative investigations of protein and glycoprotein, content should be carried out in the future.

CONCLUSIONS

Our results showed a trace of AGP-sized proteins in dried plant material, suggesting that the drying process affected protein content in the roots when compared to the fresh juice of *E. purpurea*. Therefore, a more thorough characterization of small-sized protein content in dry root material is required in order to determine its chemical structure and biological activity.

Acknowledgments. – The authors gratefully acknowledge the support through a Grant (No. TAP-LB-12-006) of the Lithuanian Foundation for Research and Studies.

REFERENCES

1. D. C. Hell, J. Barnes, L. Anderson, S. Gibbons and J. D. Phillipson, *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties, *J. Pharm. Pharmacol.* **57** (2005) 929–954; DOI: 10.1211/0022357056127.
2. Q. Zheng, D. Qiu, X. Liu, L. Zhang, S. Cai and X. Zhang, Antiproliferative effect of *Dendrobium catenatum* Lindley polypeptides against human liver, gastric and breast cancer cell lines, *Food Funct.* **5** (2015) 1489–1495; DOI: 10.1039/C5FO00060B.
3. J. J. Dong, F. Wu, X. Ye, C. F. Sun, Y. Y. Tian, M. X. Lu, R. Zhang and Z. H. Chen, β -Defensin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Sequence, tissue expression, and anti-bacterial activity of synthetic peptides, *Gene* **566** (2015) 23–31; DOI: 10.1016/j.gene.2015.04.025.
4. I. Arcan and A. Yemenicioglu, Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans, *Food Chem.* **103** (2007) 301–312; DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.07.050.
5. P. Abreu, S. Matthew, T. Gonzalez, D. Costa, M. A. Segundo and E. Fernandes, Anti-inflammatory and antioxidant activity of a medicinal tincture from *Pedilanthus tithymaloides*, *Life Sci.* **78** (2006) 1578–1585; DOI: 10.1016/j.lfs.2005.07.037.
6. R. J. Simpson, Protocol: Bulk precipitation of proteins by ammonium sulfate, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2006; DOI: 10.1101/pdb.prot4308.
7. A. Gupta and R. S. Sandhu, A new high molecular weight agglutinin from garlic (*Allium sativum*), *Molec. Cell. Cell. Biochem.* **166** (1997) 1–9; DOI: 10.1023/A:1006827921151.
8. H. C. Silva, A. U. Bari, B. A. Rocha, K. S. Nascimento, E. L. Ponte, A. F. Pires, P. Delatorre, E. H. Teixeira, H. Debray, A. M. Assreuy, C. S. Nagano and B. S. Cavada, Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties, *J. Mol. Recogn.* **26** (2013) 470–478; DOI: 10.1002/jmr.2289.
9. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248–254; DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

10. K. Hyung-Keun, L. Hyuk-Min, O. Kyong-Hwa, Y. Hyo-Jin, J. Ji-Seon and K. Sook-Kyung, Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: Comparison with two calculation models, *Anal. Biochem.* **434** (2013) 178–180; DOI: 10.1016/j.ab.2012.10.045.
11. S. Thude and B. Classen, High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: An arabinogalactan-protein and an arabinan, *Phytochemistry* **66** (2005) 1026–1032; DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.02.028
12. J. B. Harborne and C. A. Williams, *Phytochemistry of the Genus Echinacea*, in *Echinacea: The genus Echinacea* (Ed. S. C. Miller), CRC Press, Boca Raton 2004, pp. 61–77.
13. R. B. Volk, W. Blaschek and B. Classen, Characterization of an arabinogalactan protein from the pressed juice of *Echinacea purpurea*: investigations into the type of linkage between the protein and polysaccharide moieties, *J. Nat. Med.* **61** (2007) 397–401; DOI: 10.1007/s11418-007-0174-3.
14. A. Bossy, W. Blaschek and B. Classen, Characterization and immunolocalization of arabinogalactan-proteins in roots of *Echinacea purpurea*, *Planta Med.* **75** (2009) 1526–1533; DOI: 10.1055/s-0029-1185801.

Investigation of *Echinacea purpurea* root proteins with hemagglutinating activity

Gabriele Balciunaite^a, Svend Dam^b, Henrikas Pesliakas^c, Gintautas Zvirblis^c, Edita Mistiniene^c, Ona Ragazinskiene^d, Ina Pampariene^e, Judita Zymantienė^e, Danas Baniulis^f and Nijole Savickiene^g

^a Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, , Kaunas, Lithuania

^b Aarhus University, Department of Molecular biology and genetics, Centre of carbohydrate recognition and signaling, Kaunas, Lithuania

^c Institute of Biotechnology, Vilnius University, Vilnius, Lithuania;

^d Kaunas Botanical Garden, Vytautas Magnus University, Lithuania;

^e Lithuanian University of Health Sciences, Faculty of Veterinary medicine, Department of Anatomy and Physiology, Kaunas, Lithuania

^f Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry, Department of Plant Genetics and Biotechnology, Babtai, Lithuania

Gabriele.balciunaite@ismuni.lt

Received: January 3rd, 2017; Accepted: March 24th, 2017

Proteins were extracted and fractionated from *Echinacea purpurea* L. (Moench) (purple coneflower) roots, to evaluate their hemagglutinating activity. Our data suggests that the ~ 25 kDa glycosylated protein is responsible for the hemagglutinating activity and might be worth for its investigation for other biological activities.

Keywords: *Echinacea purpurea*, Glycoproteins, hemagglutination, ion exchange chromatography.

Purple coneflower, or *Echinacea purpurea* L. (Moench) (family Asteraceae), is a plant well known for its medicinal usage. Immunostimulatory [1] and anti-inflammatory [2] properties of this plant have been known from studies of traditional medicine in Indian tribes. Currently, the focus has been on chemical substances accumulated in *E. purpurea*, including glycosides (such as caffeic acid derivatives), polyanthracenes in the aerial parts of a plant, and polysaccharides and inulin in the roots [3]. Although purple coneflower extracts and juice have been used for a long time, the data on the biological activities of its proteins - including glycoproteins - are ambiguous. Our hypothesis is that glycoproteins in purple coneflower roots might be responsible for the biological activity of this plant species, and lectins could be an excellent candidate.

Lectins, carbohydrate-specific glycoproteins of non-immune origin, are distributed widely in a variety of plant species. Plant lectins are known to contain up to 10% of N-linked carbohydrates that can be found in two different types. One of them consists of N-acetylglucosamine and mannose, which is identical to oligomannose units found in animals. The second one is a plant-specific type with β 1 $\rightarrow$ 2 linked xylose and with (or without) α 1 $\rightarrow$ 3 linked L-fucose [4]. Lectins have attracted attention because of their various biological activities. Even considered toxic compounds [5], at lower concentrations, they can be used as antiproliferative [6], immunomodulating [7], or antiviral [8] agents *in vitro* and *in vivo*. An important activity that distinguishes lectins from other plant proteins is their ability to agglutinate red blood cells. Hemagglutination assay is considered a classical technique to identify and semi-quantify lectins in protein fractions [9].

Our study detected hemagglutinating activity in glycoprotein fractions from fresh roots of *E. purpurea*, where the active fractions were distinguished by the presence of 25 kDa glycoproteins.

Even though purple coneflower is a herb well known for its health-enhancing properties, information about its biologically active proteins is scarce. The initial step is to extract and fractionate proteins from harvested *E. purpurea* (Moench) roots to characterize/identify proteins(s) with biological activity. Firstly, the proteins were fractionated on a SPFF cationite column, which revealed the presence of a slightly larger amount of unbound proteins (Table 1), indicating that most of our extracted proteins were positively charged in our experiment conditions.

Table 1: The amount of proteins loaded for ion exchange chromatography. The values are the mean of three independent experiments $\pm$ SD

Separation technique	Protein amount (mg)		
	Loaded sample	Flow through	Wash
Cationite column	149.5 $\pm$ 2.9	100.0 $\pm$ 0.5	29.0 $\pm$ 0.6
Anionite column	100.0 $\pm$ 0.5	26.3 $\pm$ 0.04	13.4 $\pm$ 0.03

In order to maximally separate and enrich fractions with hemagglutinating active proteins, the flow-through fraction was subsequently loaded on the Q FF anionite column (Figure 1).

Hemagglutinating activity assay is the main technique for screening phytohemagglutinins or lectins in protein samples. Hemagglutinating activity was detected in a crude *Echinacea purpurea* L. (Moench) root protein extract. Fractions of cationite separation did not show any hemagglutinating activity. Cationite flow through proteins showed hemagglutinating activity,

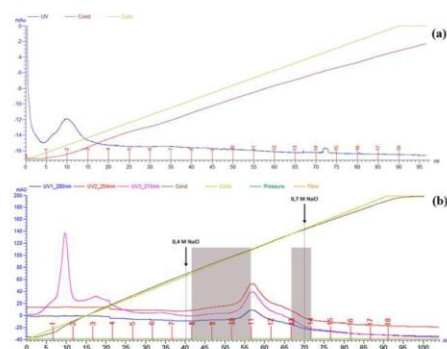


Figure 1: (a) Fractionation of crude *E. purpurea* protein extract on SPFF cationic column B; (b) - the unbound (flow-through) protein fraction was loaded on the Q FF anionite column and was fractionated similar to the crude protein extract. Arrows show NaCl gradient at the point of 0.4 M and 0.7 M. Gray-colored boxes mark active fractions.

and was loaded for the second fractionation on the anionite column. After overnight dialysis, hemagglutinating activity was observed in 4 fractions: 8, 9, 10, and 13 (Figure 2). Anionite separation fractions 1-7 were not selected for further analysis because there was no hemagglutinating activity, and no immunoblotting signal was detected. The amount of the loaded proteins in fractions that contained hemagglutinating activity varied between 14.9 μg and 28.5 μg in fraction 8-9, and 13 (Table 2). Fractions 11 and 12 did not show any hemagglutinating activity even after up-concentration by 16 times.

It is known by definition that lectins are carbohydrate-binding glycoproteins with the ability of agglutinating cells [9]. Previous studies showed an estimation of carbohydrate content in purified lectin samples. According to the literature, most of N-glycans in plants contain the xylose sugar, and thus we used the anti-xylose antibody recognizing the xylose sugar in plant N-glycans, which that allowed us to detect glycosylated proteins in protein samples of *E. purpurea* roots.

Glycosylated proteins started eluting out of the column when the ion strength reached 0.4 mol L⁻¹ NaCl. Glycoprotein elution decreased after the elution volume reached the ion strength at 0.7 mol L⁻¹ NaCl (Figure 1b). The majority of xylosylated proteins were observed in fractions 8 to 13, and fractions 8, 9, 10, and 13 showed hemagglutinating activity. As seen in Figure 3, the four active fractions had a signal at approximately 25 kDa, which was not detected in the non-active fractions.

The active protein fractions 8-10 and 13 had the highest immunoblotting signal (exposure time - 1 min), but lower protein content, compared to non-active fractions 14-18. In contrast, fractions 11 and 12 had the lowest protein amount but medium immunoblotting signal, albeit without any hemagglutinating activity. Fractions without the said activity did not agglutinate rabbit blood cells even when concentrated.

Hemagglutinating active fractions shown in Figure 3a differ in their pattern of immunoblotting signals from fractions without hemagglutinating activity, as seen in Figure 3b. Even though the loaded protein samples contained different levels of proteins (Table 2), they did not correlate with film exposure time (Figure 4). This

might have been caused by the decreased level of glycosylated proteins in the tested protein fractions with higher protein content,

Table 2: Protein content (μg) of fractions tested for hemagglutinating activity. Values are the mean of three independent experiments $\pm$ SD

Fraction No.	8	9	10	11	12	13	14
Amount of loaded protein (μg)	27.8 $\pm$ 1.3	14.9 $\pm$ 1.7	24.1 $\pm$ 1.1	5.3 $\pm$ 0.9	13.9 $\pm$ 1.3	28.5 $\pm$ 0.1	55.9 $\pm$ 0.1
Fraction No.	15	16	17	18			
Amount of loaded protein (μg)	29.4 $\pm$ 0.1	53.0 $\pm$ 0.3	29.5 $\pm$ 0.1	8.9 $\pm$ 0.1			

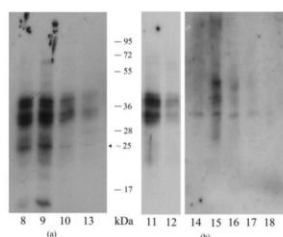


Figure 2: Immunoblotting with primary anti-xylose rabbit antibody of glycosylated proteins. a - fractions contained hemagglutinating activity; b - fractions without hemagglutinating activity.

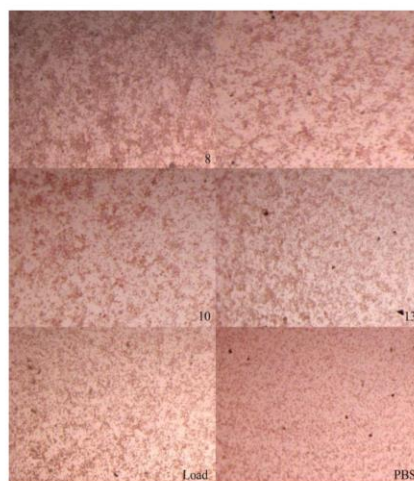


Figure 3: View of hemagglutinating activity in the loaded protein sample and protein fractions No. 8, 9, 10, and 13 fractionated on the Q FF column. Test results visualized with light microscopy. The PBS buffer was used as a negative control.

compared to fractions with low protein content but a strong immunoblotting signal. The highest amount of protein (111.8 μg) was loaded from fraction 14, but it took 5 min of exposure time to get a visible immunoblotting signal. Meanwhile, the loaded low protein amount (29.6 μg) from fraction 9 (which showed

hemagglutinating activity) was visible after 2 min of film exposure time.

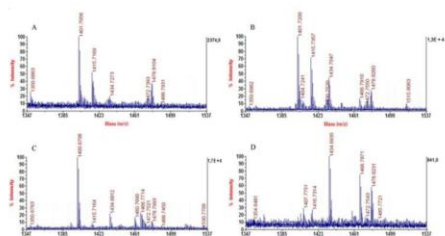


Figure 4: Results of MALDI TOF-TOF mass spectrometry. Spectrum A corresponds to a ~25 kDa-sized glycoprotein from the hemagglutinating-active fraction 8, Spectrum B corresponds to a ~25 kDa-sized glycoprotein from hemagglutinating active fraction 9, Spectrum C corresponds to a ~25 kDa-sized glycoprotein from the hemagglutinating active fraction 10, and Spectrum D corresponds to a ~25 kDa sized glycoprotein from hemagglutinating active fraction 13.

Table 3: Protein content (μg) of each fraction loaded on a blotted SDS-PAGE gel (Protein content estimated by the Bradford assay). Values are the mean of three independent experiments $\pm$ SD.

experiments $\pm$ SD.															
Hemagglutinating active	Fraction No.	8		9		10		13							
	Amount of loaded protein (μ g)	55.6 $\pm$ 2.7		29.6 $\pm$ 1.4		48.2 $\pm$ 2.2		57.1 $\pm$ 0.2							
Hemagglutinating non-active	Fraction No.	11		12		14		15		16		17		18	
	Amount of loaded protein (μ g)	10.6 $\pm$ 1.8		27.9 $\pm$ 2.7		111.8 $\pm$ 0.1		58.9 $\pm$ 0.1		105.6 $\pm$ 0.1		58.9 $\pm$ 0.1		97.8 $\pm$ 0.1	

We suggest that the hemagglutinating activity could be correlated to a xylosylated protein at ~25 kDa, since this signal is unique for the four active fractions. To confirm this, the corresponding protein band at 25 kDa was excised from the gel for the four lanes, and was analyzed using mass spectrometry. Figure 4 represents the MS spectra of the tryptic digestion of proteins at 25 kDa for the active fractions. These spectra indicated that the four bands contained an identical protein (probably with different post-translational modifications). MS/MS was performed for the most intensive peaks, and all data were searched against Swiss-Prot and NCBI plant databases. However, the lack of sufficient homology with protein sequences in the databases did not allow for the elucidation of the primary sequence of this protein by the peptide mass fingerprint. Thus, the primary structure of *E. purpurea* roots remains to be determined by other techniques.

Experimental

Phosphate buffer saline (PBS) solution (buffer B) (7.6 mM Na_2HPO_4 , 2.3 mM NaH_2PO_4 , 0.15 mM NaCl), pH 7.4, and **PBS buffer (buffer A)** (7.6 mM Na_2HPO_4 , 2.3 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4 were used in the experiment. Buffer A and B were filtered through 0.2 μm filter and degassed before usage.

Other buffers included the **SDS-PAGE running buffer** (19.2 mM Tris-HCl, 2.5mM glycine, 0.1 % sodium dodecyl sulphate (SDS)), the **transfer buffer** (25 mM Tris-HCl, 200 mM glycine, 20 % (v/v) ethanol), the **TBS buffer** (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl), pH 7.4, **TBS-T buffer** (TBS buffer, 0.1 % (v/v) Tween), the **blocking buffer**

(TBS buffer, 0.1% (v/v) Tween, 3% (w/v) skimmed milk powder), and the **alkaline phosphate buffer** (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2).

Preparation of herbal material: Fresh roots (100 g) of 3-year-old *E. purpurea* were purchased from the Botanical Garden of Vytautas Magnus University, Kaunas, Lithuania, in November 2015. The specimens were taxonomically identified at the Department of Pharmacognosy of the Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania. Fresh roots were frozen at -30 ± 1 °C until protein extraction.

Preparation of crude extract and protein precipitation: In total, 22 g of frozen *E. purpurea* roots were homogenized in a mortar cooled with liquid nitrogen. Fine root powder was extracted in 100 mL of the phosphate buffer saline (PBS) solution (pH 7.4), constantly stirring for 2 h at 4 ± 1 °C. the supernatant was collected after centrifugation (at 10,000 g for 20 min at 4 °C), and was used for protein precipitation.

Proteins were precipitated as previously described by Gorg and colleagues [10] After the washing procedure, the protein pellet was air-dried for 5 min, and was then re-suspended in the PB buffer. The protein concentration was measured using the Bradford assay [11] with bovine serum albumin as a standard. Three biological replicates were performed, and were expressed as an average with standard deviation ($\bar{x} \pm \text{SD}$). Microsoft Excel 2010 software was used for statistical analysis.

Protein separation by ion-exchange chromatography: Before the analysis, strong cationite HiTrap SPFF (0.7 $\times$ 2.5 cm) and strong anionite HiTrap Q Sepharose FF (GE Healthcare) (0.7 $\times$ 2.5 cm) columns were prepared according to the manufacturer's recommendations. The protein sample was centrifuged at 8,000 g for 10 min at 4 °C, and was filtered through a membrane filter (Minisart®) with the pore size of 0.2 μm before loading to the column. Firstly, the protein sample was loaded on a strong cationite column with the peristaltic pump speed set at 1 mL/min. Subsequently, the flow through fraction was evaluated. After the completion of the sample loading, the column was washed with 15 mL of buffer A. The fraction with unbound proteins was collected into the falcon tube.

After the initial stage of sample loading and washing of the unbound proteins, the column was connected to the ÄKTA Prime plus (GE Healthcare, Finland) system. The proteins were eluted with 95 mL of linear gradient 0-100% buffer B. The peaks were determined with a UV detector at 280 nm wavelength. In total, 18 protein fractions of 5 mL were collected into test tubes. After the analysis, the column was washed with 15 mL of 2M NaCl. The washed proteins were collected into the falcon tube. The unbound fraction was loaded on the HiTrap Q Sepharose FF column, and fractionation was repeated as written above.

Protein sample dialysis: After protein separation on the HiTrap Q Sepharose FF column, all 18 protein fractions were dialyzed in the PB buffer for 18 h at 4 °C. The molecular weight cut-off (MWCO) of the dialysis membrane was 10,000 Da.

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting: Polyacrylamide gel electrophoresis was performed with sodium dodecyl sulphate, on a 12% gel slab according to Lämmli [12]. The electrophoresis chamber was filled with the SDS-PAGE running buffer. A total of 64 μL , or 1.28% of each protein fraction was loaded on the gel slab, and was subjected

to electrophoresis at 30 mA for approximately 90 min. The gel was removed from the electrophoresis apparatus, was briefly soaked in the transfer buffer, and was then transferred to a polyvinyl fluoride (PVDF) membrane that had been pre-wetted with the following solutions: at first, the membrane was soaked in 96% ethanol for 1 min, then transferred to 50% ethanol for 10 sec, and then was exposed to the transfer buffer for 10 seconds. Proteins from the SDS-PAGE gel were transferred in a semi-dry manner for 70 min at 90 mA per stack.

The membrane was washed three times for 10 min in the TBS buffer, pH 7.4, was blocked in the blocking buffer for 1 hour, and was subsequently incubated in the primary anti-xylose (Antisera, Sweden) antibody used at the dilution of 1:1000 on a rotating platform overnight at 4 °C. On the next day, the membrane was washed with TBS-T, and was incubated in secondary anti-rabbit antibody used at the dilution of 1:3000 on a rotating platform for 1 hour at 22 °C. After being washed for three times (10 min each) in the TBS-T buffer, the membrane was washed with the alkaline phosphate buffer for 5 min. The binding proteins were detected by enhanced chemiluminescence using the CDP Star solution, and were visualized on an X-ray film (AmershamHyperfilm ECL) developed by using the Agfa Curix 60 (Belgium) film processor.

Protein digestion and analysis by MALDI TOF-TOF mass spectrometry: The corresponding protein bands were excised from protein gels where unique immunoblotting signals for the active fractions at 25 kDa were observed. The proteins were in-gel tryptic digested and purified. The digested peptides were eluted and applied on a MALDI target using 0.5 µL of 20 mg/mL 2,5-dihydroxybenzoic acid in 70% acetonitrile/0.1% (v/v) TFA. The MS spectra were obtained on a 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (AB SCIEX) mass spectrometer operated in the reflector, positive

ion mode and using an acceleration voltage of 20 kV with a mass range between 700 to 5,000 Da. For intensive peaks that were not correlated to contaminants such as keratin and trypsin, MS/MS were performed. The obtained data were analyzed by using the Mascot software and by applying the following parameters: peptide tolerance was set at to 1.2 D, the MS/MS tolerance was set to 0.6 D, the maximum of miscleavage was set to one, the peptide charge was set to +1, and the oxidation of Met residues and the modification of Cys residues were included as a possible modification. The data were searched against the Viridiplantae in the following databases: SwissProt with/without contaminants (version 2016_06 (551385 sequences; 196,948,568 residues)) and NCBI nr with/without contaminants (version 20160604 [88,499,796 sequences; 32,486,953,934 residues]) for a significant protein hit ($p < 0.05$).

Erythrocyte preparation: Rabbit blood samples were purchased by the Lithuanian University of Health Sciences, the Vivarium of the Veterinary academy. All procedures were approved by the local Animal Ethical Committee, license No. G2-16. (July 21, 2014). Blood samples were mixed with 4% trisodium citrate anticoagulant at the ratio of 4:1.

2% erythrocyte suspension was prepared as previously described by Yan and colleagues [13].

Hemagglutination assay: Flat-shaped 96-well microtiter plates were used in the hemagglutinating activity (HA) assay. Each well of the plate received 25 µL of the PBS buffer, pH 7.4, followed by the addition of 25 µL of protein sample and 25 µL of 2% of the RBC suspension. In the study, pH 7.4 was used as a negative control PBS buffer. After incubation at the temperature of 22 °C for 2 h, the test results were checked under the light microscope (Leica M165FC) at the magnification of $\times 10$.

References

- [1] Kim HR, Oh SK, Lim W, Lee HK, Moon B-, Seoh JY. (2014) Immune enhancing effects of *Echinacea purpurea* root extract by reducing regulatory T cell number and function. *Natural Product Communications*, **9**, 511–514.
- [2] Borchers AT, Keen CL, Stern JS, Gershwin ME. (2000) Inflammation and Native American medicine: the role of botanicals. *American Society for Clinical Nutrition*, 339–347.
- [3] Barnes J, Anderson L a, Gibbons S, Phillipson JD. (2005) *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **57**, 929–954.
- [4] Sharon N, Lis H. (1990) Legume lectins—a large family of homologous proteins. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **4**, 3198–3208.
- [5] Heim C, Hertzberg H, Butschli A, Bleuler-Martinez S, Aepli M, Deplazes P, Künzler M, Štefanić S. (2015) Inhibition of *Haemonchus contortus* larval development by fungal lectins. *Parasites & Vectors*, **8**, 425.
- [6] Kumar P, Mukhopadhyay S, Behera B, Sekhar C, Dey S, Nandini D, Sinha N, Bissoyi A, Pramanik K, Maiti TK, Bhutia SK. (2014) Antitumor effect of soybean lectin mediated through reactive oxygen species-dependent pathway. *Life Sciences*, **111**, 27–35.
- [7] Souza MA, Carvalho FC, Ruas LP, Ricci-Azevedo R, Roque-Barreira MC. (2013) The immunomodulatory effect of plant lectins: A review with emphasis on ArabinM properties. *Glycoconjugate Journal*, **30**, 641–657.
- [8] Takebe Y, Saucedo CJ, Lund G, Uenishi R, Hase S, Tsuchiura T, Kneteman N, Ramessar K, Tyrrell DJ, Shirakura M, Wakita T, McMahon JB, O'Keefe BR. (2013) Antiviral Lectins from Red and Blue-Green Algae Show Potent In Vitro and In Vivo Activity against Hepatitis C Virus. *PLoS ONE*, **8**, 1–10.
- [9] Goldstein I, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. (1980) What should be called a lectin? *Nature*, **285**, 66–66.
- [10] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **21**, 1037–1053.
- [11] Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248–254.
- [12] Lämmlü UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- [13] Yan Q, Jiang Z, Yang S, Deng W, Han L. (2005) A novel homodimeric lectin from *Astragalus mongolicus* with antifungal activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **442**, 72–81.

SUMMARY

Introduction

Phytochemical composition research is a promising research field for a new innovative drug compound screening. Plant secondary metabolites, like alkaloids, saponins, flavonoids, anthraquinones, etc. are used in medicine as active drug compounds. However, there is a lack of activity investigation of plant primary metabolites, like proteins and glycoproteins.

Lectins are reversible and specifically carbohydrate-binding, non-immune origin glycoproteins, found in all live organisms. Carbohydrate specificity causes lectin activity, like hemagglutinating [176], antibacterial [64], antifungal [85], antiviral [197], insecticidal [207], cytotoxic [204], immunomodulatory [190] and antiproliferative [215].

Plant lectins are accumulated in the whole plant, leaves, flowers stems, but especially in storage tissues in roots and seeds [172]. Carbohydrate specificity causes lectin interaction with target cells. It enables biological activity application for therapeutic purposes. Galactose and chitin specific mistletoe (*Viscum album* L.) lectins were proven to act as anticancer agents *in vivo* and *in vitro* [16, 37], and in clinical studies [9]. Studies with animals and humans showed positive results and it might become an innovative resolution for bacterial disease occurrence [134]. Various drug forms with lectins are already used in practice. Preparations with common bean lectins for mucous surface regeneration are already registered by the European Patent Office [161]. Another European patent is registered for lentil (*Lens culinaris* L.) lectin preparation as an adjuvant after chemotherapy and radiotherapy [87].

Plant lectins are promising compounds for new drugs development. Therefore lectin purification and characterisation have to be done thoroughly. Extensive lectin screening in various plant species is limited by the lack of full plant genome sequencing data. Genomes with predicted protein sequences in plant somatic cells would ease targeted lectin purification and would help to save time and expense spent on experimental screening. There is a lack of lectin quantitative and qualitative evaluation in plants. Previous studies showed a hemagglutinating activity of purple coneflower ethanolic extracts [93], however, no further studies haven't been done as well as there is no data on *Echinacea purpurea* (L.) Moench lectin effect on immune response *in vivo*.

The aim of the study.

To purify lectins from purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) roots, evaluate their quality, quantity and effect on immune system reactions *in vivo*.

The objectives of the study:

1. To purify and quantify proteins from fresh purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) roots;
2. To purify lectins from extracted proteins;
3. To evaluate purified lectins qualitatively;
4. To estimate peptide quantity of identified;
5. To assess the impact of purified lectins to Balb/c mice immune system reactions *in vivo*.

Scientific novelty.

Quantitative and qualitative evaluation of proteins from *Echinacea purpurea* (L.) Moench roots has been done. ~ 40 kDa hemagglutinating active and specific to lactose, D-mannose and D-galactose glycoproteins with LysM domain, were identified in purple coneflower roots for the first time. Furthermore, one of LysM peptides were quantified in *Echinacea purpurea* L. (Moench) roots for the first time.

Bioinformatic analysis of identified glycoprotein showed homology in the other plant species, like *Helianthus annuus* L., *Lactuca sativa* L., *Artemisia annua* L.

Identified lectin fraction was tested for its' impact on mice immune system reactions *in vivo* for the first time.

Practical and theoretical significance

Our investigation gives new knowledge about *Echinacea purpurea* L. (Moench) protein qualitative and quantitative characteristics. It enables further purple coneflower investigations and screening of new biologically active compounds.

Identified glycoproteins with LysM domain had an immune system stimulating properties *in vivo*. It gives us new information about the biological activity of lectins in *Echinacea purpurea* L. (Moench) roots.

Bioinformatic analysis results of identified glycoprotein could be used for further *Echinacea* genome and gene expression studies. It could be applied in the field of phytochemical genomics, which focuses on genome-based synthesis and function of phytochemicals (plant metabolites). It could help to optimize the cultivation of *Echinacea* plants species for targeted phytochemical composition and pharmacological effects in new products.

Quantitative – qualitative analysis of fresh *Echinacea purpurea* L. (Moench) root ethanolic tincture has been done. Results showed different quantitative characteristics from dry *Echinacea purpurea* L. (Moench) root tinctures. Moreover, fresh *Echinacea purpurea* L. (Moench) root tincture demonstrated immunosuppressive effect for mice immune response *in vivo*. These results are important in the development of a new phytopreparations.

Materials and methods

Plant material. Fresh *Echinacea purpurea* (L.) Moench roots were collected at Vytautas Magnus University, Kaunas Botanical garden and cleaned under cold running tap water. Water from the surface of the washed roots was absorbed with paper towels. Cleaned and drained roots were frozen in a freezer at -20 ± 2 °C and kept until needed.

Preparation of aqueous protein extract. Frozen purple coneflower roots were cut in 1 cm long pieces, transferred to the grinding mill, frozen with liquid nitrogen to -195 °C and homogenized for 5 min. Homogenized root material was transferred to the mortar and mashed in liquid nitrogen with a pestle until particles were 0.5–1.5 mm size.

50 g of homogenized *Echinacea purpurea* (L.) Moench roots were extracted for 2 h in phosphate buffer saline (PBS) with 2.0 % (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVPP) and 5 mM of γ -aminocaproic acid constantly stirring at 4 ± 2 °C. The ratio between root material and extraction buffer was 1:5 (w/w). The extract was centrifuged at 4 °C for 20 min at $8500 \times g$. Centrifugate was collected and used for protein precipitation by ammonium sulphate.

Protein precipitation. Proteins were precipitated from crude extract by salting out using ammonium sulphate. A first protein fraction was obtained by adding ammonium sulphate to 60 % (w/v) saturation and constant stirring for 16 h. Precipitated proteins were collected by centrifugation at 8500 g for 20 min. The supernatant was subjected to precipitation with 80 % (w/v) saturated ammonium sulphate by stirring for 2 h and precipitated proteins were collected by centrifugation as described above. Further, the ammonium sulphate was added to 100 % (w/v) saturation and precipitated proteins were collected by centrifugation after stirring for 10 h.

The ammonium sulphate-precipitated protein pellets were resuspended in 5 mL of PBS (Buffer A), and subjected for extensive 16 h dialysis against the Buffer A with buffer changed every 4 h using dialysis membrane with 10,000 Da molecular weight cut – off.

The protein concentration was measured using the Bradford assay [23] using bovine serum albumin standards. Three replicates of the extraction were per-

formed, and protein concentration was estimated as an average with standard deviation ($M \pm SD$).

Lectin separation by affinity chromatography. 1 mL of 60–80 % (w/v) ammonium sulphate fraction was loaded on affinity column (1×11 cm) filled with Sepharose-mannose matrix and was equilibrated with 40 mL of Buffer A at the flow rate 1 mL min^{-1} by Waters semipreparative chromatography system. One millilitre of the 80 % (w/v) saturated ammonium sulphate fraction was loaded and the column was washed with 40 mL of Buffer A at the flow rate 1 mL min^{-1} . Proteins were eluted with 50 mL of Buffer B containing 0.2 M lactose and 2 mL fractions were collected.

Erythrocyte preparation. Rabbit blood samples were purchased by the Lithuanian University of Health Sciences, the Vivarium of the Veterinary Academy. All procedures were approved by the local Animal Ethical Committee, license No. G2-16. (July 21, 2014). Blood samples were mixed with 4 % (w/v) trisodium citrate anticoagulant at 4:1 ratio. The erythrocytes were separated by centrifugation at 800 g for 15 min. at 4 °C. Precipitated red blood cells (RBC) were resuspended in PBS solution (pH 7.4) at 1:14 ratio and washed four times by centrifugation. One volume of erythrocytes was treated with 7 volumes of trypsin in PBS solution (1 mg mL^{-1}), pH 7.4, for 1 h at 37 °C. Trypsin removed by centrifugation as described above. The cells were washed four times in PBS, pH 7.4, and resuspended as 2 % RBC suspension ($3.5 \times 10^8 \text{ cells mL}^{-1}$).

Hemagglutination assay. Flat-shaped 96-well microtiter plates were used in the hemagglutinating activity (HA) assay. Each well of the plate received 25 μL of the PBS buffer, pH 7.4, followed by the addition of 25 μL of protein sample and 25 μL of 2 % of the RBC suspension. PBS buffer was used as a negative control. After incubation at the temperature of 22 °C for 1 h, the test results were checked under the light microscope (Leica M165FC) at the magnification of $10\times$.

Hemagglutination inhibition assay. The carbohydrate specificity of the lectin was determined in the microtiter plates described by Silva M.C.C. [168]. All carbohydrate inhibitors to be tested were dissolved in PBS at an initial concentration of 400 mM. Twofold carbohydrate serial dilutions were made in a microplate and final concentration in the last well was 0.4 mM. The following mono- and disaccharides were used: xylose, ribose, fructose, D-glucose, D-galactose, D-mannose, lactose, sucrose, maltose, acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine. 50 μL (2 μg) of the lectin solution was added to the twofold serially diluted inhibitor carbohydrate solutions, at a final volume of 100 μL , and the plate was incubated for 20 min at room temperature. 50 μL of rabbit erythrocytes (2 % (v/v) suspension) was added to each well and allowed to incubate for 60 min at room temperature. The degree of

haemagglutination was examined and the maximum dilution of the inhibitor solution showing inhibition was recorded. The controls were set up with saline and erythrocytes, sugar and erythrocytes, and lectin and erythrocytes. Results were expressed as the minimal sugar or glycoprotein concentration required to inhibit haemagglutinating doses of the lectin

SDS-PAGE and Western blot. Active protein fraction was analysed by SDS-PAGE on 12 % gel slab with 5 % stacking gel by Lämmli using a Protean Mini electrophoresis unit. PageRuler molecular marker was used as a protein size reference. Proteins were transferred to polyvinyl fluoride (PVDF) membrane using Fastblot semi-dry electrophoretic transfer apparatus for 70 min at 90 mA per stack.

The membrane was washed three times for 10 min in TBS buffer, pH 7.4, blocked in blocking buffer for 1 h and incubated in primary rabbit anti-xylose (Antisera, Sweden) antibody at 1:2500 dilution on rotating platform overnight at 4 °C. The membrane was washed with TBS-T and incubated in secondary anti-rabbit antibody used at dilution 1:10 000 on a rotating platform for 1 hour at 22 °C. After three 10 min washes in TBS-T buffer, the membrane was washed with alkaline phosphate buffer for 5 min. The antibody labelling was detected by enhanced chemiluminescence using CDP Star solution and visualized using X-ray film.

In-gel protein digestion, sample preparation and mass spectrometry analysis. Protein bands were excised from protein gels and digested with trypsin according to [182]. Sliced gel slabs were incubated in a destaining solution containing 25 mM NH_4HCO_3 , 50 % acetonitrile (ACN) for 10 min. Destained gel slabs were soaked in ACN and dehydrated for 10 min. All liquid was removed and 50 μL of trypsin solution ($13 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ trypsin, 5 mM NH_4HCO_3 , 10 % ACN) was added to the dry gel pieces and incubated at 37 °C for 16 h. Digested peptides were extracted with 200 μL of water for 10 min, followed by extraction with 200 μL of 50 % acetonitrile. Both extraction liquids were combined and dried in a vacuum centrifuge.

Peptides were desalted according to Rappsilber and colleagues [167]. Samples were reconstituted in 60 μL of wash solvent (2 % (v/v) ACN, 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid), vortexed for 45 s and centrifuged 3000 g for 1 min. Sixty microliters of wetting solvent (80 % (v/v) ACN, 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid) was pipetted onto the Stage Tip/Tube assembly and centrifuged 450 g for 2 min followed by 60 μL of washing solvent and centrifuged as above. Samples were pipetted into the Stage tip and centrifuged. The tip was washed 2 times with wash solvent by centrifugation. Cap/Stage tip assembly was placed on a new Eppendorf tube and peptides were eluted from with elution solvent (60 % (v/v) ACN, 0.1 % (v/v) trifluoroacetic acid) by

centrifugation. Desalted peptide mixture was dried in vacuum centrifuge and reconstituted in 2 % (v/v) ACN, 0.05 % (v/v) formic acid solvent.

Peptides were analysed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, equipped with Ultimate3000 RSLC and Maxis 4G with Captive Spray ionisation source. Protein identification was carried out using Mascot software (Matrix Science, USA) using sunflower genome [10] and *Echinacea purpurea* (L.) Moench transcriptome database [10] with criteria for mascot score ≥ 50 , peptide number ≥ 2 .

Protein quantitation. The protein concentration was measured using the Bradford assay [23] with bovine serum albumin as a standard. Three biological replicates were performed and were expressed as an average with standard deviation ($\pm$ SD).

Hemagglutination titre. Each well in a flat-transparent bottom microtiter plate was filled with 25 μ L PBS, pH 7.4. 25 μ L of protein extract was pipetted to the first well and serially diluted. Dilution repeated in 1 to 8 wells. 25 μ L of sample from the 8th well was eliminated. Twenty-five microlitre of 2 % RBC suspension was added to each well and gently swirled for 10 s. Hemagglutination titre was assessed by light microscope (Olympus CX21, Japan) after 60 min incubation at 22 ± 2 °C. Hemagglutination activity was defined as a titer reciprocal of the maximum dilution giving positive hemagglutination.

Lectin quantitation by mass spectrometry. The chromatographic system consisted of an Acquity H-class UPLC system and a 150 mm $\times$ 2.1 mm i.d., 1.7 μ m particle diameter Acquity CSH-C18 analytical column thermostatted at 45 °C. The mobile phase, a mixture of 0.1 % (v/v) formic acid in water (A) and acetonitrile (B) was delivered at a flow rate of 0.400 mL min⁻¹. Detection was performed with a TQ-S triple quadrupole mass spectrometer (Waters).

Standard peptide from conservative LysM domain amino acids (Ala-Asp-Thr-Ile-Ile-Asp-Val-Pro-Leu-Lys) was custom made by Sigma-Aldrich. Compounds were monitored in SIR positive ionization mode, an m/z of 745, corresponding to $[M+2H]^{2+}$ of sample and $m/z=542.8$, corresponding to of standard were used. Cone voltages of 64V and 30 V were used for the sample and standard respectively. Dwell times were 0,025 s for both compounds. Injection volume was 2 μ L. A mobile phase gradient of 12 % B hold for two minutes and then raised to 45 % B in 3 min, following by the raise to 90 % B and the holding at this concentration for 0.5 min. After that, the gradient was returned to initial conditions in 0.5 minutes and column was re-equilibrated for 2 minutes.

Biological activity tests model *in vivo*. Male Balb/C mice (8 weeks old, 18–20 g, n=45) were acquired from Lithuanian University of Health Sciences,

Academy of Veterinary, Vivarium. Animals were kept under standard conditions in the Animal Research Center under optimized hygienic conditions with 12:12 h light-dark cycle. They were fed with standard pellet diet and water *ad libitum*. Experiments were approved by State Food and Veterinary Service, permission No. G. 2-56.

Three different test animal groups were selected: animals (n=15) in negative control group got 50 μ L peritoneal injections of physiological NaCl solution; animals in tincture group (n=15) got 50 μ L peritoneal injection of *Echinacea purpurea* (L.) Moench root tincture, corresponding to 1.36 mg/g herbal material dose or 2.55 mg of dry residue (1:5). Animals in hemagglutinin group (n=15) got 50 μ L (250 μ g kg⁻¹) of purified hemagglutinin peritoneal injection. Injections were repeated 4 times every 7 days. On 5th week animals were sedated with carbon dioxide and euthanized by cervical dislocation. Spleen samples from each animal were aseptically removed and fixed in 10 % (v/v) neutral buffered formalin. Blood samples were collected by cardiac puncture into Microvette[®] 200 tubes with EDTA anticoagulant.

***Echinacea purpurea* (L.) Moench fresh root tincture preparation and analysis.** Tincture was made at optimized extraction conditions described by [171]. *Echinacea purpurea* (L.) Moench fresh roots were homogenized with liquid nitrogen in the cooled IKA M20 universal mill to 0.5–1.5 μ m size particles. One part of fine root powder was suspended in five parts 50 % (v/v) ethanol and sonicated for 10 min, 30 °C temperature in Elmasonic P ultrasound bath, then centrifuged at 8500 rpm for 10 min to separate liquid tincture from residues.

Tincture was twice concentrated with a rotary evaporator and qualitatively-quantitatively analysed by high-performance liquid chromatography (HPLC) method described by Brown *et al* [25]. „Waters 2695 Alliance“ chromatography system with „Waters 2998 PDA“ detector was used. Separation was performed using an ACE C18 column (250 mm $\times$ 4.6 mm, particle size 5 μ m).

Chromatographic peak identification was carried out according to the analyte and reference compound retention time and comparing UV absorption spectra of reference compounds and analytes obtained by a diode array detector. The purity of the peaks was assessed on the basis of their UV absorption spectra at 200–400 nm. Quantitative assessment of the analytes was performed based on the analyte peak area dependence on analyte concentration in the test solution. The content of caffeic acid derivatives was identified at a wavelength of 320 nm and quantified by caffeic acid equivalents.

Tincture's dry residue was determined by the method described in European Pharmacopoeia [54].

Analysis of mice blood samples. The peripheral blood samples of each animal were used to measure the total leukocyte count by the Neubauer chamber after 1:20 dilution in Turkey's solution. The diluted blood sample was transferred on the hemocytometer chamber. Calculations were made manually in 25 hemocytometer squares, using a 40× objective lens. Thereafter, blood samples were smeared on a glass slide and stained with May-Grünwald-Giemsa to perform differential leucocyte count. Neutrophils, lymphocytes, and monocytes were counted using a light microscope (Nikon, Japan) under a 100× objective lens. 300 cells were counted and used for percentage calculations.

Immunohistochemical analysis of mice spleen samples. Spleen samples were prepared according to Smalinskiene *et al* [192]. Each spleen was fixed in 10 % (v/v) neutral buffered formalin and placed in standardised histology cassettes and transferred to Shandon Pathscentre where they were dehydrated, cleared and impregnated in paraffin. After those histology cassettes were placed in paraffin blocks in block forming centre TBS88. Parafinated spleen blocks were sectioned in at least five 3 µm sections from the second quarter of the spleen by rotational microtome on a silanized surface. Sections were then deparaffinized and rehydrated with various concentrations of ethanol and xylol. The sections were then washed with distilled water and heated in Tris/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) buffer, pH 9, for 8 min at 110 °C in a Histoprocessor RHS-1 microwave. A Shandon cover plate system was then employed for immunohistochemical labelling. Specifically, after blocking the activity of endogenous peroxidases with a specific blocking solution, the slides were incubated with primary antibody for 1 h. The specific rabbit anti-mouse antibodies were used in a 1:300 dilution of anti-CD3. After primary incubation and rinsing away of unbound antibody, the samples underwent sequential 30 min incubations with Advance HRP Link and Advance HRP Enzyme reagents. Binding of the primary antibodies was detected using a Liquid 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride Substrate+Chromogen System.

Each slide was scanned with Panoramic MIDI II scanner at 0,2325 µm/pixel resolution. For one slide evaluation 8 nonoverlapping periarterial lymphoid sheaths (PALS), follicles and red pulp (RP) sections (27392,0 µm² (214,0 × 128,0 µm)) were chosen. Transverse arteriole section criteria for PALS section selection was determined by [185]. Positively stained cells were counted in chosen sections [20, 82, 103] and cell density in selected sections was counted by dividing the number of counted positively stained cells by defined area (µm²). Image analysis was done with Panoramic Viewer 1.15.2 software.

Statistical analysis. The data were expressed as a mean $\pm$ SD. A probability $p < 0.05$ was considered to be significant. Statistical comparison between the groups were performed using two-way analysis of variance (ANOVA) with Wilkison-Mann-Whitney test and nested ANOVA with *Levene* test and *post hoc* analysis with Tuckey's test. SPSS ver. 22.0 was used for calculations.

RESULTS AND DISCUSSION

Qualitative analysis of proteins, extracted from purple coneflower fresh roots

Hemagglutinating activity results. All protein samples demonstrated hemagglutinating activity except one, saturated by ammonium sulphate from 80 to 100 % (w/v) (3.1.1.1 picture, D). Lectin fraction (3.1.1.1 picture, E), purified by affinity chromatography, also demonstrated hemagglutinating activity. All fractions were used for semiquantitative hemagglutination titre test, whose results described further in the text.

Hemagglutinating activity inhibition by carbohydrates test results. Lectins in our tested protein sample were strongly specific to lactose. 3 mM lactose solution (3.1.2.1 table.) inhibited lectin-induced rabbit red blood cell agglutination. Lectins demonstrated a bit less specificity to D-galactose and D-mannose molecules. However, D-glucose did not inhibit lectin activity. According to literature, lactose specific lectins demonstrated similar specificity characteristics. Lectin from *Cinachyrella apion* L. thallus hemagglutinating activity was inhibited by lactose, but D-glucose and D-galactose did not show the same inhibiting effect [116]. Furthermore, D-mannose specific lectins were purified from genetically related to purple coneflower – *Helianthus annuus* L. roots [151].

Hemagglutination inhibition results showed that lectins in *Echinacea purpurea* (L.) Moench roots were specific to D-glucose enantiomers, but not D-glucose itself. We can assume that epimeric D-galactose configuration and disaccharide (lactose) molecular size are important to tested lectin specificity. However, D-glucose stereoisomeric configuration in the lactose molecule isn't important in interaction with lectin carbohydrate binding centre.

Results of lectin purification and qualitative imaging by Western blot. Results of lectin purification and qualitative analysis (imaging) by Western blot. Lectin purification by affinity chromatography was based on the results of haemagglutination inhibition by carbohydrate test results. D-mannose and D-galactose demonstrated equally expressed hemagglutination inhibition activity. There are two reasons why D-mannose was chosen to be used as an affinity ligand. Firstly, mannose-specific lectins were purified from the

Asteraceae family plant, genetically related to purple coneflower – sunflower roots [151]. Homologous proteins in genetically related plants might be similar by their structure, repeated conservative amino acid sequences, and function like *Phaseolus* plant family lectins [41]. This fact allows us to presume that lectins in purple coneflower roots might be homologous and demonstrate similar carbohydrate specificity with sunflower root lectins. Moreover, the affinity matrix with immobilised D-mannose molecules might be more consistent than the affinity matrix with lactose ligand. The carbon atom in the first hexose's position with the hydroxyl group attached to it is the most reactive part in D-mannose molecule. So, there is the highest probability that most of D-mannose will covalently attach to affinity matrix through this part of a molecule, whilst lactose is a disaccharide molecule and it could be immobilised on affinity matrix in more than one position.

Two chromatography peaks were obtained after lectin purification by affinity chromatography. Characteristic chromatogram profile might be seen in the 3.1.3.1 picture. Proteins which did not interact with mannose ligands were eluted between 7th and 38th minute. Elution buffer change to 0.2 M lactose solution in PBS eluted mannose-specific lectins from mannose-sepharose matrix between 38th and 46th minutes. Eluted proteins were collected to fractions and tested for hemagglutination activity. Only D-mannose specific protein fraction demonstrated hemagglutinating activity.

Purified lectin fraction was visualized during western blot analysis by xylose specific antibodies. Results showed that ~ 40 kDa glycoproteins were the most prominent in hemagglutinating active lectin fraction (3.1.3.2 picture). Glycoproteins, marked number 1 and 2, were excised from electrophoresis gel and identified by mass spectrometry.

Compounds of ~ 100 kDa, ~ 70 kDa and ~ 35 kDa sizes also were excised from the gel and analysed by the mass spectrometry method. However, we didn't get statistically significant identification results of these glycoproteins. Experiments were limited by the lack of *Echinacea* Moench genome data. We assume that genome with RNA, coded proteins and DNA data in somatic cells would allow extensive glycoprotein identification.

Results of the lectin qualitative analysis by mass spectrometry. *Echinacea* L. transcriptome based mass fingerprint scanning helped us to identify glycoproteins 1 and 2: epa_locus_9450_iso_2_len_1348_ver_2 (EP9450) and epa_locus_7790_iso_1_len_1277_ver_2 (EP7790) respectively, named as protein with peptidoglycan binding lysin (LysM) domain (3.1.4.1 table.). Value of a Mascot criteria was less than recommended (>50) for identified glycoprotein No. 1. However, the same glycoprotein identification by mass fingerprint search in *Helianthus annuus* L. genome demonstrates statistically

significant identification of the same protein with peptidoglycan binding LysM domain. Glycoprotein 2 peptidoglycan binding lysin (LysM) domain identity was also confirmed by *Helianthus annuus* L. genome fingerprint analysis.

In order to check the identity of identified glycoforms, homologous protein sequence search by BlastP program in NCBI database was performed [110, 4]. Results of this analysis represented in the 3.1.4.2 table shows that proteins from *E. purpurea* (L.) Moench transcriptome are identical to LysM domain-containing proteins in *Artemisia annua* L., *Helianthus annuus* L. and *Lactuca sativa* L. Moreover, proteins from *Helianthus annuus* L. demonstrated the highest sequence identity: EP-9450 protein sequence was 81 % identical to LysM domain-containing protein anchored with glycosyl phosphate (XP_022025891.1) and EP-7790 protein sequence was 90 % identical to LysM domain-containing protein anchored with glycosyl phosphate (XP_021976452.1) sequence. In the 3.1.4.1 picture *Clustal Ω* [184] multiple sequence alignment of identified *E. purpurea* (L.) Moench, *Artemisia annua* L., *Helianthus annuus* L. and *Lactuca sativa* L. proteins sequences are represented. Proteins were classified in accordance to their homology. Results confirm their homology once again – 89 % of the mentioned sequences are overlapping. It allows us to presume that plants from *Echinacea* L. genus and *Helianthus annuus* L. are genetically related. We can also premise that peptidoglycan binding LysM domains identified in *Echinacea* transcriptome are homologous to less genetically close plants as *Lactuca sativa* L., *Artemisia annua* L. and *Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.

To sum up, purple coneflower fresh root hemagglutinating active glycoproteins are ~ 40 kDa size and contains two peptidoglycan binding LysM domains that are specific to lactose, D-mannose and D-galactose. According to structural and evolutionary homology classification identified lectins belong to LysM lectin family.

Quantitative analysis of proteins, extracted from purple coneflower fresh roots

Results of protein quantity determination by Bradford assay. In order to evaluate protein quantity in purple coneflower fresh roots, aqueous protein extract was prepared. 50 g of herbal material was extracted and 90.58 ± 1.74 mg of protein or 1.82 ± 0.03 mg of proteins in one gram of fresh roots was obtained (3.2.1.1 table).

Protein identification in *Echinacea* L. genus plants is still complicated because of the lack of fully sequenced *Echinacea* genome. Arabinogalactan protein was identified in purple coneflower previously [201]. Berheron with colleagues [18] evaluated an impact of purple coneflower root extraction

method on glycoprotein yield. When roots were extracted with hot water (1:20) obtained protein yield was 0.442 mg from one gram of roots, meanwhile, extraction with 65 % glycerol solution (1:20) and 65 % ethanol yield fewer glycoproteins – 0.387 mg and 0.353 mg from one gram of roots respectively. Other investigations showed the negative impact of herb material drying to protein and glycoprotein yield. Drying cause protein proteolysis and denaturation depending on drying temperature and time [3, 67, 85]. Compared to previously mentioned data, our results show that higher protein quantity might be obtained by protein extraction from fresh purple coneflower roots.

Quantitative analysis of aqueous protein extract was followed by protein fractionation by ammonium sulphate saturation. Even though the highest protein yield was obtained from 0–60 % ammonium sulphate saturated protein fraction (F_{0-60}), higher hemagglutination titre was noticed in fraction saturated 60–80 % of ammonium sulphate (F_{60-80}). Protein quantity in F_{60-80} was 230.0 ± 0.01 μg in one gram of purple coneflower fresh roots (3.2.1.1 table.).

Protein fraction F_{60-80} was chosen to be used for further analysis because higher hemagglutination titre determined in it. Lectin purification by affinity chromatography method was modified in accordance with previously described hemagglutination inhibition by carbohydrates results. 0.4 ± 0.01 mg of hemagglutinating active glycoproteins from 50 g of *Echinacea purpurea* (L.) Moench fresh roots or 0.8 ± 0.01 μg of active lectin per one gram of a root material (3.2.1.1 table) was quantified after lectin purification by mannose-sepharose affinity column.

Results of hemagglutination titre assessment. Hemagglutination titre in aqueous protein extract was 16 (3.2.2.1 table). Meanwhile, F_{60-80} had the highest hemagglutination titre – 32. This fraction was chosen to be used in lectin purification by affinity chromatography. Hemagglutination titre helped to define specific hemagglutination activity and minimal protein concentration, required to cause hemagglutination. Minimal protein amount causing hemagglutination in aqueous protein extract was 113.22 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (3.2.2.1 table). Minimal protein concentration decrease and protein purification fold increase. In the final purified lectin fraction, this concentration was only 1.02 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Hemagglutinating inactive proteins were eliminated during each purification step, and the active ones were still present in the fraction sample. This tendency also was noticed in previously published papers [88, 171, 183]. Minimal hemagglutinating concentration of purple coneflower root lectins was less than a pea (*Pisum sativum* L.) seed lectin 3.12 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [191] or stinging nettle root agglutinin 2.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [150] minimal hemagglutinating concentrations, but higher than WGA minimal agglutinating concentration

0.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ [216]. Pospelov and others determined hemagglutination activity variation in different purple coneflower plant vegetation states. Hemagglutinins from first-year *Echinacea* shoots demonstrated highest hemagglutinating activity during September-October [156]. However, quantitative hemagglutinin analysis hasn't been done by these authors.

Identified peptide from lectin with LysM domain quantitation by mass spectrometry results. Identified purple coneflower fresh root lectin containing LysM domain peptide was quantified by tandem liquid chromatography-mass spectrometry method. 745.0 m/z size peptide quantified by 542.8 m/z reference peptide. The chromatogram is represented in the 3.2.3.1 picture. Quantitative analysis results are represented in 3.2.3.1 table. Identified LysM peptide quantity in purified lectin fraction was $1.58 \pm 0.01 \text{ ng mL}^{-1}$ or $0.32 \pm 0.01 \text{ ng}$ in one g of purple coneflower fresh roots. Even though LysM domains were determined in many plant proteomes [211], quantitative evaluation of one identified LysM peptide in *E. purpurea* (L.) Moench fresh roots have been done for the first time. However, more experiments have to be done in order to evaluate all LysM domains in identified *Echinacea purpurea* (L.) Moench protein.

Results of lectin biological activity investigation *in vivo*

After qualitative-quantitative lectin from purple coneflower fresh root analysis, investigation *in vivo* have been done. Fresh root tincture preparation for this study was followed by its qualitative – quantitative analysis.

Preparation of *Echinacea purpurea* (L.) Moench tincture, quantity of extractive compounds determination and analysis of caffeic acid compounds.

The quantity of a dry residue in prepared tincture. Dry residue in *Echinacea purpurea* (L.) Moench fresh root tincture was evaluated by the gravimetric method described in European Pharmacopoeia. This test shows the total quantity of extracted non-volatile compounds in prepared tincture. Results indicate that 1 L of prepared tincture, corresponding to 550 g of *Echinacea purpurea* (L.) Moench fresh roots, contained $51.02 \pm 0.38 \text{ g}$ of dry residue.

Results of tincture qualitative and quantitative assessment by HPLC. HPLC analysis of 50 % (v/v) ethanolic purple coneflower fresh root tincture (1:5) done by the method described by Brown *et al* [25]. Results are represented in 3.3.1.1 picture. Phenolic acids (1 – chlorogenic, 2 – caftaric, 3 – caffeic and 4 – cichoric acids) were identified according to their retention time and UV light absorption spectra. These phenolic acids were quantified in caffeic acid equivalents. Quantitative assessment of the analytes was performed based on the analyte peak area dependence on analyte concentration in the test solution. The formula of the caffeic acid calibration curve, regres-

sion coefficient, lowest observed quantity and lowest quantity detected and calculations are represented in 3.3.1.1 table.

3.78 ± 0.23 μg of caffeic acid per one of mL tincture was estimated. Caftaric acid quantity in caffeic acid equivalents was 1.95 ± 0.10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, cichoric acid – 3.47 ± 0.14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 1.75 ± 0.09 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of chlorogenic acid. However, chlorogenic acid quantity was lower than detectable concentration, so this result isn't significant.

Our experiments show that caffeic and chlorogenic acids are dominant in our tincture. These results agree with previous investigations [69, 24, 133]. Nonetheless, quantities of these acids in our tincture were smaller compared to tinctures made from dried *Echinacea purpurea* (L.) Moench roots.

To sum up, we extracted 92.75 ± 34.47 mg of chemical substances from 1 g of purple coneflower fresh roots. We have identified 16.37 μg of phenolic compounds or 0.01 % from all extracted dry residue. Our tincture contained higher quantities of non-identified biologically active compounds, like alkylamides, polysaccharides and lipopolysaccharides, typical to purple coneflower roots.

Blood sample test results. White blood cell count. There was a tendency of leucocyte count increase in animal groups treated with purple coneflower fresh root tincture and lectin fraction peritoneal injections (3.3.2.1 picture). However, no statistically significant differences were observed between tested groups. We assume that a higher number of experimental animals could have helped to get statistical significance.

Results of leukocyte formula determination in experimental animal's blood samples. Leukocyte formula in experimental animal blood samples is represented in diagrams, 3.3.2.1 picture. There was no statistical significance in eosinophil percentage change between tested animal groups. Lectin LysM injections caused a statistically significant decrease of band neutrophils quantity to 3.91 ± 1.21 % and segmented neutrophils quantity to 3.7 ± 1.21 %, but statistically significantly increased lymphocyte quantity to 91.2 ± 2.42 % and leukocyte (neutrophils and lymphocytes) with vacuoles quantity to 20.2 ± 7.27 %. These results differed from animal groups injected with physiological solution and fresh root tincture statistically significant when the p-value was less than 0.05.

Monocyte, small, medium-sized and giant sized lymphocyte percentage amount statistically significantly ($p < 0.05$) differed between all animal groups. LysM lectin fraction decreased monocyte percentage amount to 0.2 ± 0.18 %, meanwhile animal blood samples in a physiological solution injection group contained 1.9 ± 0.62 % of monocytes. Monocyte quantity also decreased in tincture injection group to 0.7 ± 0.24 %. Small lymphocyte percentage decreased in lectin injection group to 0.5 ± 0.18 %, meanwhile, small

lymphocyte percentage in physiological solution group was 2.8 ± 1.47 %. Small lymphocyte quantity decreased in tincture group and was 0.1 ± 0.09 %. LysM lectin injections increased medium sized lymphocyte quantity to 88.7 ± 4.70 % statistically significantly ($p < 0.05$). Meanwhile, tincture injections caused medium sized lymphocyte quantity increase to 99.1 ± 0.55 %. Physiological solution group blood samples contained 83.0 ± 8.80 % of medium-sized lymphocytes. Giant sized lymphocyte quantity decreased in LysM injection group to 0.4 ± 0.21 %, in tincture group – 1.1 ± 0.35 %. Meanwhile, the physiological solution injection group blood samples contained 4.2 ± 1.58 % of giant-sized lymphocytes.

Analysis of experimental animal blood samples showed decreased primary immune response and phagocytic activity in lectin injection group. This is indicated by neutrophils and monocytes percentage quantity decrease. In the meantime, tincture injections caused phagocytic activity increase indicated by a band neutrophil quantity increase. Elevated allergic immune state indicated by the increase of an eosinophil quantity. *Echinacea* genera plants allergies inducing effect related to eosinophil and immunoglobulin E concentration increase already was proved by other authors [5, 11, 98, 109].

Lectin injections stimulated a secondary immune response in an antigenic manner. It can be indicated by a statistically significant increase of lymphocyte percentage. A statistically significant increase of medium-sized lymphocytes allows us to assume that lectins induced immune cell maturation and differentiation, but hadn't changed the generation of new cells indicated by the decrease of small lymphocytes percentage. This hypothesis is confirmed by the substantial increase of a leukocyte (neutrophils and lymphocytes) with vacuole quantity. It indicates that cells stayed in blood circulation for a long time since the phagocytic activity declined. Vacuolisation might have been provoked by lectin interaction with the plasmic membrane of immune cells. According to literature, lectins can interact with the plasmic membrane of a cell and disrupt membrane function, which can cause increased water and Na^+ ion influx into the cell and vacuole formation [42, 52, 55]

Results of spleen immunohistochemical investigation. The spleen is the biggest immune system organ, where a specific immune response is generated, hematopoiesis and erythrocyte deconstruction occurs [25, 100]. Experimental data of immunohistochemical spleen analysis is represented in 3.3.3.1 picture. Purple coneflower fresh root tincture statistically significantly decreased ($p < 0.05$) T lymphocyte quantity in peritoneal lymphoid sheaths (PALS) compared to physiological solution injection group ($p < 0.05$) and lectin injection group. ($p < 0.001$). Meanwhile, lectin injections caused statistically significant ($p < 0.01$) T lymphocyte increase in a spleen PALS zone,

compared to physiological solution and tincture injection group. Lectin injections statistically significantly increased ($p < 0.001$) compared to physiological solution injections and tincture injections ($p < 0.05$) T lymphocyte count in follicles. T lymphocyte quantity was higher in tincture injection group than physiological solution injection group, but there was no statistical significance. There were no statistically significant T lymphocyte quantity changes in red pulp of a spleen.

Results showed that *Echinacea purpurea* (L.) Moench fresh root tincture suppressed the secondary immune response. According to literature, purple coneflower fresh roots contain higher quantities of lipophilic alkylamides [163], that can cause immunosuppression [114]. Opposite to these results, *Echinacea purpurea* (L.) Moench fresh root lectin injections induced a high secondary immune response, which typically is caused by antigenic proteins. The statistically significant increase of T lymphocyte quantity in PALS and follicles allows us to assume that lectin injections caused T lymphocyte differentiation in PALS zone of a spleen. Mature T lymphocytes migrated through follicle zone to neutralize antigens in peripheral blood circulation. These results in spleen T lymphocyte changes confirm blood test results discussed previously. Our results do not conflict other lectin immune stimulation results *in vitro* [168, 178] and *in vivo* [41, 167].

To sum up, lectins from purple coneflower fresh roots induced the secondary immune response in Balb/c mice experimental model *in vivo*. These results can be supported by statistically significant neutrophil and monocyte quantity decrease and statistically significant leukocyte (neutrophils and lymphocytes) quantity increase in mice blood samples. Leukocyte with vacuole quantity could also have been increased because of lectin interaction with plasmic membranes of mentioned cells. Statistically, significantly higher medium-sized lymphocyte quantity in blood samples and T lymphocyte count in mice spleen PALS zone indicates augmentation of the specific immune response.

Purple coneflower fresh root ethanolic tincture (1:5) caused immune suppression of specific immune response but had a tendency to induce a primary immune response.

Conclusions

1. Optimal conditions for the *Echinacea purpurea* (L.) Moench fresh root proteins extraction were estimated: extraction in phosphate buffer saline (pH 7.4) (1:5), followed by protein salting out from 60 to 80 % with ammonium sulphate saturation. Estimated protein quantity was 1820.0 ± 0.03 μ g in one gram of fresh root material. Lectins estimated for 0.04 % of protein.
2. The protein fraction with the highest haemagglutinating activity was obtained by saturating the aqueous extract of *Echinacea purpurea* (L.) Moench fresh root raw material with ammonium sulfate from 60 to 80%. This fraction was used to purify lectins. The most selective method for purification of lectins was affinity chromatography with D-mannose, lactose or D galactose ligands.
3. A lectin fraction which identifies two glycoproteins with LysM domains of the LysM class of 40 kDa attached to the membrane via glycosylphosphatidylinositol and having specificity for lactose, D-mannose and D-galactose was isolated.
4. The quantity of identified LysM domain peptide in one gram of fresh roots was 0.32 ± 0.002 ng.
5. Lectins from purple coneflower fresh roots caused secondary immune response increase. It is indicated by a statistically significant decrease ($p < 0.05$) of neutrophils and monocytes, together with a statistically significant increase ($p < 0.001$) of lymphocytes in blood samples and T lymphocytes in spleen samples. Further investigations of this effect could help to apply these lectins with LysM domain in immunodeficiency control and treatment.

PRIEDAS

GAUTA
2017 m. 06-15 d.
Nr. 67C1-1

VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA

LEIDIMAS ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROJEKTĄ

2017-02-07 Nr. G2-56
Vilnius

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. *specialusis leidimas*, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2017-02-01 išvada Nr. 1 „Dėl leidimo atlikti bandymo su gyvūnais projektą“,

leidi a m a šiam ūkio subjektui atlikti bandymo su gyvūnais projektą:

duomenys apie ūkio subjektą:

pavadinimas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Gyvūnų tyrimų centras,

adresas Tilžės g. 18, Kaunas,

kodas Juridinių asmenų registre 100005579315;

duomenys apie bandymo su gyvūnais projektą:

pavadinimas „Lektinų, išskirtų iš *Echinacea purpurea* (L.) Moench šaknų, kiekio ir kokybės bei poveikio imuninės sistemos kompensacinėms reakcijoms *in vivo* tyrimas“;

vadovas Vytautas Baranauskas,

naudojami gyvūnai 45 pelės;

duomenys apie bandymo su gyvūnais projekto atlikimo vietą:

pavadinimas Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Gyvūnų tyrimų centras,

adresas Tilžės g. 18, Kaunas.

Duomenys apie veterinarinius vaistus, vaistinius preparatus ar kitas medžiagas (toliau – vaistai), kurie bus naudojami vykdant bandymo su gyvūnais projektą*, netaikoma.

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais projektą (toliau – leidimas) galioja iki 2018 m. gegužės 1 d.

Direktoriaus pavaduotojas,
atliekantis direktoriaus funkcijas



Vidmantas Paulauskas

* – Nurodomi naudojamo (-ų) vaisto (-ų) pavadinimas (-ai), gamintojas (-ai), vaistinė (-ės) forma (-os), kiekis, reikalingas vykdant bandymo su gyvūnais projektą. Jei vykdant bandymo su gyvūnais projektą vaistai gyvūnams nenaudojami, leidime įrašomas žodis „Nenaudojama“

CURRICULUM VITAE

<i>Name</i>	Gabrielė
<i>Surname</i>	Balčiūnaitė
<i>Adress</i>	Sukilėlių pr. 13, Kaunas
<i>E-mail</i>	gabriele.balciunaite@lsmuni.lt

EDUCATION:

2014–2018	Lithuanian University of Health Sciences, Medical academy, Faculty of pharmacy (PhD studies)
2009–2014	Lithuanian University of Health Sciences, Medical academy, Faculty of Pharmacy (Master's degree of Pharmacy and professional qualification of pharmacist)
2005–2009	Panevėžys Juozas Balčikonis Gymnasium

WORK EXPERIENCE:

2018.01–Present	Lithuanian University of Health Sciences, Institute of pharmaceutical technologies, Laboratory of Biopharmaceutical research, Junior research fellow
2014.07.–2015.08.	JSC Gintarinė vaistinė, Community pharmacist
2014.06.–2014.07.	JSC Gintarinė vaistinė, Assistant pharmacist
2013.04.–09.	JSC Nemuno vaistinė, Assistant pharmacist

PADĖKA

Už besąlygišką palaikymą ir meilę noriu padėkoti šeimai ir artimiesiems, kurie visą šį laiką buvo kartu.

Už kantrybę, visakeriopą palaikymą, gyvenimiškas ir mokslines diskusijas bei tikėjimą, kad, rodos, nesibaigiantys eksperimentai duos įdomių rezultatų, noriu padėkoti mokslinio darbo vadovei prof. dr. Nijolei Savickienei.

Visam Lietuvos agrarinių miškų ir mokslų centro filialo Sodininkystės ir daržininkystės instituto, Sodo augalų genetikos ir biotechnologijų skyriui bei Atviros prieigos žemės ir miškų jungtinio tyrimų centro Biologinių žymeklių laboratorijos darbuotojams, ypač dr. Danui Baniuliui noriu padėkoti už galimybę žengti pačius pirmuosius žingsnius mokslininko kelyje, išugdytus analitinius gebėjimus, mokslines diskusijas ir pagalbą atrandant vis naują kelią tikslo link.

Dėkoju farmakognozijos katedros kolektyvui už mokslines diskusijas, kūrybišką darbo aplinką, vertingus patarimus ir suteiktą materialinę bazę.

Vytauto Didžiojo universiteto, Kauno botanikos sodo, Vaistinių augalų skyriaus vadovei prof. dr. Onai Ragažinskienei noriu padėkoti už suteiktą augalinę žaliavą, nuoširdžią šypseną ir padrąsinimus judėti pirmyn.

Aarhus universiteto Molekulinės biologijos ir genetikos fakulteto, Angliavandenių atpažinimo ir signalų perdavimo centro prof. dr. Jens Stougaard ir dr. Svend Secher Dam dėkoju už suteiktą galimybę atlikti tyrimus ir gauti naudingos patirties multikultūrinėje laboratorijoje.

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinacijos akademijos, Anatomijos ir fiziologijos katedros vedėjai prof. dr. Juditai Žymantienei dėkoju už suteiktą medžiagą biologinio aktyvumo nustatymui ir konsultacijas.

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinacijos akademijos, Stambiųjų gyvulių klinikos, Klinikinių tyrimų laboratorijos lekt. dr. Zojai Miknienei ir Veterinarinės patobiologijos katedros doc. dr. Nomedai Juodžiukynienei už parodytą naują žavingą histologinių tyrimų pasaulį, konsultacijas ir biologinio aktyvumo rebusų sprendimo idėjas.

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto, Medicinos akademijos Patologinės anatomijos klinikos prof. habil. dr. Daliai Pangonytei dėkoju už parodytą mokslinio preciziškumo pavyzdį, suteiktą materialinę bazę, konsultacijas ir mokslines diskusijas.

Už geranoriškumą ir bendradarbiavimą noriu padėkoti LSMU Biologinių tyrimų centro veterinarijos gydytojoms Vilmai Zigmantaitei ir Ramunei Grigalevičiūtei.

KTU Maisto mokslo ir technologijos katedros doc. dr. Audriui Pukalskui už atliktą peptidų kiekio nustatymą masių spektrometrijos metodu.

KTU Polimerų chemijos ir technologijos katedros prof. habil. dr. Jolantai Liesienei už mokslines konsultacijas.

Vilniaus Universiteto Biotechnologijų instituto Eukariotų genų inžinerijos skyriui dr. Gintautui Žvirbliui, dr. Henrikuui Pesliakui ir dr. Editai Mištinieniui už mokslines konsultacijas

Noriu padėkoti sielos draugei ir bendražygei nuo mokyklinio suolo laikų – Urtei Račytei ir kitiems draugams, kurie visą laiką palaikė ir padėjo pamatyti pasaulį už laboratorijos ribų.

LSMU Mokslo fondui ir Atviram LSMU fondui už suteiktą finansinę paramą.

LSMU Tarptautinių ryšių ir studijų centrui už suteiktą galimybę išvykti į stažuotę.