

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Lektíny – biologická aktivita
Lectins – biological activity

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Hradec Králové 2007

Lívia Boboňková

Vedúci diplomovej práce

Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Chcela by som poďakovať Prof. RNDr. Luďkovi Jahodářovi, CSc. za užitočné rady a pripomienky a za odborné vedenie celej práce.

Obsah

Použité skratky	5
1. Úvod	6
2. Cieľ práce	8
3. Chemická a biochemická charakteristika lektínov	9
3.1. Molekulárna štruktúra lektínov	9
Jednoduché lektíny	10
Multidoménové (mozaické) lektíny	16
Makromolekulárne zoskupenia	16
3.2. Špecifita a afinita lektínov	16
Špecifita ku krvným skupinám	16
Metodológia zisťovania špecifity k sacharidom	17
Špecifita k sacharidom.....	17
Lektíny špecifické pre monosacharidy	18
Lektíny špecifické pre oligosacharidy	21
tzv. Promiskuitné lektíny	23
Lektíny s dvojitou špecifitou.....	23
Význam konformácie oligosacharidov	23
Lekzýmy.....	24
4. Výskyt a funkcia lektínov v rastlinách	25
4.1. Výskyt lektínov v rastlinách a iných organizmoch. Ich detekcia a izolácia	25
Vyššie rastliny.....	25
Nižšie rastliny	26
Huby.....	27
Živočíchy	27
Detekcia prítomnosti lektínov.....	29
Izolácia a čistenie lektínov.....	29
4.2. Funkcia lektínov v rastlinách	34
Úloha sacharidov v bunkovom rozpoznávaní.....	34
Úloha lektínov v rastlinách	34
Lektíny ako mediátory symbiózy rásln a baktérií fixujúcich dusík.....	35
Obrana rastlín pomocou lektínov	36
5. Botanická a fytochemická charakteristika rastlinných čeľadí obsahujúcich lektíny	38
5.1. Dvojkľúčolistové rastliny (Dicotyledonopsida)	38
Asteraceae (hvězdnicovité/astrovité)	38
Cucurbitaceae (dýňovité/tekvicovité)	39
Euphorbiaceae (prýšcovité/mliečnikovité)	39
Fabaceae (bobovité/bôbovité).....	39
Moraceae (morušovníkovité/morušovité).....	40
Passifloraceae (mučenkovité/mučenkovité)	40
Sambucaceae (bezovité/bazovité).....	40

Solanaceae (lilkovité/ľuľkovité)	41
Urticaceae (kopřivovité/prhl'avovité)	41
Viscaceae (jmelovité/imelovité)	41
5.2. Jednoklíčnolistové rastliny (Monocotyledonopsida).....	42
Amaryllidaceae (amarylkovité/amarylkovité)	42
Liliaceae (liliovité/ľaliovité)	42
Poaceae (lipnicovité/lipnicovité)	42
6. Biologická aktivita a toxicita lektínov	44
6.1. Účinnok lektínov na gastrointestinálny trakt a d'alsie orgány.....	44
Účinnok lektínov na tráviaci trakt.....	45
Systémové účinky lektínov	48
6.2 Lektíny zo skupiny RIPs, typ II.....	50
Proteíny inaktivujúce ribozómy (RIPs, ribosome-inactivating proteins)	50
Ricín	52
Abrín	56
Viskumín.....	57
Modeksín.....	58
Volkensín	58
6.3. Biologická aktivita d'alsích vybraných rastlinných lektínov	58
Konkanavalín A	58
Momordín.....	60
Kurcín.....	60
Robín.....	61
PHA.....	61
7. Možnosti využitia lektínov	62
7.1. Využitie lektínov v oblasti výskumu	62
Metodológia	62
Skúmanie bunkových povrchov a využitie v diagnostike.....	63
Identifikácia mikroorganizmov.....	64
Neuroanatomické štúdie a použitie v neurochirurgii	65
Separácia buniek	66
Využitie mitogénnych vlastností lektínov	66
7.2. Klinické využitie.....	67
Určovanie krvných skupín	67
Diagnostika polyaglutinácie	67
Monitorovanie imunokompetencie	68
Karyotyping	68
Využitie lektínov vo forme imunotoxínov.....	68
Transplantácia kostnej drene	72
Enzymová substitučná terapia	72
Využitie lektínov v biosenzoroch	73
Využitie extraktov z <i>Viscum album</i> v terapii rakoviny	73
Potenciálne využitie lektínov v prevencii a liečbe AIDS	75
Targeting	76
Potenciálne využitie lektínov pri cystickej fibróze.....	76
8. Súhrn	78
9. Záver	81

Použité skratky

Ac	acetyl	MPA	<i>Maclura pomifera</i> agglutinin
ACA	<i>Amaranthus caudatus</i> agglutinin	MAH	<i>Maackia amurensis</i> hemagglutinin
AMK	aminokyselina	MAL	<i>Maackia amurensis</i> leukoagglutinin
APA	<i>Abrus precatorius</i> agglutinin	Man	D-manóza
ASA	<i>Allium sativum</i> agglutinin	ML	(mistletoe lectin) lektín z druhu <i>Viscum album</i>
Asn	asparagín	MLL	<i>Molucella laevis</i> lectin
BMA	<i>Bowringia mildbraedi</i> agglutinin	MPA	<i>Maclura pomifera</i> agglutinin
Calsepa	<i>Callistegia sepium</i> agglutinin	NeuNAc	N-acetylneuramínová kyselina (sialová kyselina)
Con A	(concanavalin A) konkanavalín A	NPL	<i>Narcissus pseudonarcissus</i> lectin
Cys	cystéin	OS	oligosacharid
DBL	<i>Dolichos biflorus</i> lectin	PHA	lektín z druhu <i>Phaseolus vulgaris</i>
DB58	<i>Dolichos biflorus</i> 58kDa lectin	PNA	(peanut agglutinin) lektín z druhu <i>Arachis hypogea</i>
DSA	<i>Datura stramonium</i> agglutinin	Pro	prolín
ECL	<i>Erythrina cristagalli</i> lectin	PSL	<i>Pisum sativum</i> lectin
ECorL	<i>Erythrina corallodendron</i> lectin	PWM	(pokeweed mitogen) lektín z druhu <i>Phytolacca americana</i>
ER	endoplazmatické retikulum	RCA	<i>Ricinus communis</i> agglutinin
Fuc	L-fukóza	RIPs	(ribosome inactivating proteins) proteíny inaktivující ribozómy
Gal	D-galaktóza	SBA	(soybean agglutinin) lektín z druhu <i>Glycine max</i>
GalNAc	N-acetyl-D-galaktozamín	SCA	<i>Scilla campanulata</i> agglutinin
Glc	D-glukóza	SJL	<i>Sophora japonica</i> lectin
GlcNAc	N-acetyl-D-glukozamín	SNA	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> agglutinin	STL	<i>Solanum tuberosum</i> agglutinin
GSL	<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin	Tyr	tyrozín
HPA	(<i>Helix pomatia</i> agglutinin) lektín zo slimáka záhradného	UEA	<i>Ulex europaeus</i> agglutinin
HTL	<i>Helianthus tuberosus</i> lectin (Heltuba)	UDA	<i>Urtica dioica</i> agglutinin
KM+	Man-špecifický lektín z druhu <i>Artocarpus integrifolia</i>	WBA	(winged bean agglutinin) lektín z druhu <i>Psophocarpus tetragonolobus</i>
LCL	<i>Lens culinaris</i> lectin	WGA	(wheat germ agglutinin) lektín z druhu <i>Triticum aestivum</i>
LEA	<i>Lycopersicon esculentum</i> agglutinin = TL (tomato lectin)		
LOA	<i>Listera ovata</i> agglutinin		
LOL	<i>Lathyrus ochrus</i> lectin		
LTA	<i>Lotus tetragonolobus</i> agglutinin		
MAA	<i>Maackia amurensis</i> agglutinin		
MAB	(monoclonal antibody) monoklonálna protilátka		

1. Úvod

Proteíny interagujúce so sacharidmi majú v prírode bohaté zastúpenie. Typickými príkladmi sú niektoré enzýmy či protilátky. V posledných rokoch sa do popredia biologického výskumu dostáva aj ďalšia skupina proteínov viažúcich sacharidy – lektíny.

Lektíny (syn. hemaglutiníny, rastl. lektíny - fytohemaglutiníny) sú proteíny alebo glykoproteíny (obsahujú 4-10% sacharidovej zložky) neimunitného pôvodu, schopné špecificky rozoznávať a reverzibilne viazať monosacharidy a oligosacharidy, bez zmeny ich kovalentnej štruktúry. Väzba na ligand - čo je prvý krok v reakcii medzi lektínmi a sacharidmi - je podobná pre lektíny a enzýmy reagujúce s daným sacharidom. Avšak následné kroky sú rozdielne, pretože oproti enzýmom, v komplexe lektín-sacharid nedochádza k štiepeniu kovalentných väzieb a k disociácii komplexu.^{1, 2, 3}

Každá molekula lektínu obsahuje dve, prípadne viac väzbových miest pre sacharid. Lektíny sú teda di- alebo polyvalentné a vďaka tomu sú schopné tvoriť skrížené väzby medzi viacerými makromolekulami obsahujúcimi sacharidy. Majú schopnosť aglutinovať erytrocyty a precipitovať polysacharidy či glykoproteíny. Hemaglutinačná aktivita je hlavnou črtou lektínov a je bežne využívaná pri ich detekcii a charakterizácii. Aglutinácia aj precipitácia sa dajú inhibovať pomocou sacharidov, pre ktoré sú dané lektíny špecifické. Kvôli schopnosti rastlinných hemaglutinínov rozoznávať erytrocyty rozličných krvných typov, Boyd a Shapleigh navrhli pomenovanie lektíny. Latinsky *legere* znamená rozoznať, vybrať si.^{1, 4}

Výskyt lektínov v prírode zaznamenali vedci už koncom 19. storočia. Pôvodne boli pomenované ako hemaglutiníny, alebo fytohemaglutiníny, pretože prvýkrát boli objavené v rastlinných extraktoch. Aj keď je ich zastúpenie v rastlinách rozšírené, veľmi málo z nich sa v tej dobe izolovalo a nevenovala sa im výraznejšia pozornosť. To sa však zmenilo po zistení, že lektíny sú mimoriadne užitočné pri skúmaní sacharidových štruktúr na bunkových povrchoch, najmä u zmenených malígnych buniek a takisto pri izolácii a charakterizácii glykoproteínov. Ich podrobnejšie štúdium začalo až v 60. rokoch 20. storočia. V následnej dobe bolo mnoho lektínov izolovaných a u stovák z nich bola odhalená aj štruktúra.

Lektíny boli nájdené vo väčšine organizmov, u vírusov, baktérií, rastlín a živočíchov. Pri ich izolácii a čistení sa s výhodou využíva afinitná chromatografia, je možné ich vyrobiť aj pomocou DNA rekombinantných technológií.^{1, 4}

Rastlinné lektíny reprezentujú značne heterogénnu skupinu proteínov, ktoré sa líšia veľkosťou, štruktúrou i molekulárnymi vlastnosťami. Aj keď boli rastlinné lektíny detailne študované, ich úloha vo fyziológii rastlín doteraz nie je dokonale objasnená.⁵

Je všeobecne uznané, že prvý popis rastlinného lektínu pochádza z roku 1888 od Hermanna Stillmarka, ktorý v tom čase pôsobil na Univerzite v estónskom Tartu. Tento hemaglutinín, značne toxický, izoloval zo semien druhu *Ricinus communis* a pomenoval ho ricín. Neskôr Hellin demonštroval prítomnosť ďalšieho toxického hemaglutinínu, abrínu, v semenách rastliny *Abrus precatorius*. Ricín a abrín sa čoskoro stali komerčne dostupnými, čo umožnilo Paulovi Ehrlichovi použiť ich vo svojich imunologických štúdiách ako modelové antigény. Pomocou nich sa mu podarilo odhaliť základné princípy imunológie. Pri pokusoch na myšiach zistil, že sa stali imúnne voči letálnym dávkam ricínu alebo abrínu, a to opakovaným podávaním malých (subletálnych) dávok subkutánnou cestou. Taktiež potvrdil, že anti-ricín neochránil pokusné zvieratá pred toxickým efektom abrínu tak ako ani anti-abrín pred ricínom. To jasne dokazovalo špecifitu imunitnej odpovede. Dospel k zisteniu, že imunita k toxínom sa krvou prenáša z matky na plod a po narodení tiež materským mliekom. Ehrlich študoval inhibičný efekt anti-ricínového séra na aglutinačnú aktivitu ricínu, demonštroval kvantitatívny vzťah medzi množstvom antiséra a antigénu, ktorý dokáže neutralizovať. Na základe toho poprvýkrát kvantitatívne determinoval protilátku *in vitro*. Tieto štúdie teda demonštrovali špecifitu protilátkovej odpovede, fenomén imunologickej pamäte a prenos humorálnej imunity z matky na plod.

Do povedomia širšej verejnosti sa rastlinné lektíny dostali vďaka ricínu, ktorý bol v roku 1978 použitý pri „dáždnikovej vražde“ bulharského spisovateľa Georgiho Markova. Použitie ricínu ako potenciálnu zbraň sa pokúšali USA počas prvej i druhej svetovej vojny. Ricínová bomba bola vyvinutá aj testovaná britským vojskom, ale nikdy nebola použitá ako zbraň hromadného ničenia. Ricín bol už viackrát zneužitý extrémistickými skupinami.⁴

Rastlinné lektíny patria medzi najdôležitejšie fyziologicky aktívne zložky potravy. Môžu významne ovplyvniť tráviaci trakt, bakteriálnu mikroflóru a aj celkový metabolizmus. Lektíny sú silné orálne a parenterálne imunogény a niektoré z ich účinkov na organizmus súvisia s ovplyvnením imunitného systému. Primárny efekt lektínov ako biologicky aktívnych molekúl vyplýva z ich schopnosti špecificky sa viazať k sacharidom. Keďže tieto reakcie sú predvídateľné, potenciálne použitie lektínov je veľmi sľubné.²

2. Cieľ práce

Rastliny predstavujú významný zdroj biologicky aktívnych látok, či už sú to produkty primárneho alebo sekundárneho metabolizmu. V posledných rokoch je veľká časť nových aktívnych substancií izolovaná práve z prírodných zdrojov, alebo je pripravená na základe štruktúry prírodných látok. V rastlinnej ríši je však ešte väčšina druhov fytochemicky nepreskúmaná, hľadanie nových zdrojov rastlinných metabolitov a ich štúdium je teda veľkým prínosom.

Táto diplomová práca je zameraná na rastlinné lektíny, lektíny z iných zdrojov sú spomenuté okrajovo. Cieľom práce je podať komplexný pohľad na rastlinné lektíny, ich štruktúru, špecifitu, výskyt v rastlinách, toxické vlastnosti, biologickú aktivitu a potenciálne využitie vo výskume ale aj v klinickej praxi.

Lektíny sú jedinečnou skupinou proteínov a glykoproteínov. Aj keď je ich úloha v rastlinách doteraz nejasná, sú to látky so značnou biologickou aktivitou. Najnovší výskum signalizuje, že rastlinné lektíny sú účinné v liečbe celej rady chorôb. V posledných rokoch sa záujem orientuje najmä na ich potenciálnu protinádorovú aktivitu, pôsobenie proti vírusu HIV, či možné využitie v liečbe metabolických porúch. V dostupných zdrojoch je však veľké množstvo experimentálnych dát, často sú výsledky štúdií odlišné a kontroverzné. Nesporné ale je, že rastlinné lektíny predstavujú obrovský potenciál a ďalší výskum určite v budúcnosti rozšíri škálu ich aplikácií.

3. Chemická a biochemická charakteristika lektínov

3.1. Molekulárna štruktúra lektínov

Sedemdesiate roky boli svedkom intenzívneho výskumu molekulárnych vlastností jednotlivých lektínov. Bol to nevyhnutný predpoklad lepšieho pochopenia ich aktivity na molekulárnej úrovni. Štúdie zahrňovali stanovenie hlavných fyzikálno-chemických parametrov lektínov, aminokyselinových sekvencií a objasnenie priestorovej štruktúry. Pokiaľ neboli využívané rekombinantné technológie, určenie primárnej štruktúry bolo časovo náročné, a preto boli koncom 70. rokov kompletne sekvencie odhalené iba u polovice vtedy známych lektínov. Konkanavalín A má niekoľko prvenstiev. Medzi nimi aj to, že to bol prvý lektín, u ktorého bola známa primárna, ale aj priestorová štruktúra (v roku 1989 bola objasnená štruktúra komplexu, Con A viazaného k metyl- α -D-manopyranozidu).

Poznanie primárnych štruktúr mnohých lektínov umožnilo identifikovať homologické sekvencie lektínov z taxonomicky príbuzných zdrojov.

V 90. rokoch významne vzrástol počet lektínov so známou primárnou a terciárnou štruktúrou. Čo sa týka živočíšnych lektínov, prvá známa štruktúra pochádza až z roku 1993. Prekvapujúce je, že bola zaznamenaná značná podobnosť v terciárnych štruktúrach lektínov pochádzajúcich z odlišných zdrojov, a to aj napriek výrazne rozdielnym primárnym štruktúram. Jedna takáto terciárna štruktúra, ktorá bola prvýkrát pozorovaná u lektínov z čeľade Fabaceae, je známa ako „lectin fold“ alebo tiež „jelly roll“. Tvoria ju dva antiparalené β -skladané listy. Táto štruktúra sa okrem lektínov z čeľade Fabaceae vyskytuje aj v galektínoch a ďalších živočíšnych lektínoch, akými sú pentraxíny, ale aj v sialidáze baktérie *Vibrio cholerae*.⁶

Rozdelenie lektínov na základe štruktúry

Doteraz už boli preskúmané aminokyselinové sekvencie a dodatočne aj priestorová štruktúra niekoľkých stovák lektínov. Tradičné delenie lektínov podľa pôvodu (t.j. rastlinné, živočíšne, mikrobiálne) bolo nahradené klasifikáciou založenou na štruktúre. Existujú 3 základné skupiny:

- A. jednoduché lektíny
- B. mozaické lektíny

- C. makromolekulárne zoskupenia.

V každej z nich môžu byť lektíny zoskupené do tzv. rodín, ktoré sa vyznačujú rovnakými sekvenciami a štruktúrnymi vlastnosťami. Zriedkavo sa rovnaké rodiny lektínov vyskytujú vo fylogeneticky nepríbuzných organizmoch, napr. v rastlinách a živočíchoch. V tomto prípade sa označujú ako tzv. superrodina lektínov.¹

Jednoduché lektíny

Pozostávajú z niekoľkých subjednotiek, nie vždy identických, o molekulovej hmotnosti do 40 kDa. Patria sem prakticky všetky známe rastlinné lektíny a galektíny (t.j. živočíšne lektíny viažúce galaktózu).¹

Fabaceae (bobovité/bôbovité)

Vzhľadom k lektínom je to najväčšia a zároveň aj najviac preskúmaná čeľaď. Bolo v nej popísaných asi 100 lektínov, takmer všetky izolované zo semien rastlín.

Konkanavalín A, prototyp tejto skupiny, izoloval prvýkrát James Sumner v roku 1919 a neskôr dokázal, že je špecifický pre Man a Glc. Ďalšie podrobne preštudované sú PHA, SBA, PNA a ECorL. Rôzne lektíny boli izolované aj zo semien rastliny *Griffonia simplicifolia*.¹

Tieto lektíny typicky pozostávajú z 2 alebo 4 identických (alebo takmer identických) podjednotiek o molekulovej hmotnosti 25–30 kDa. Každá obsahuje jedno väzbové miesto pre sacharid, pričom špecifita je u všetkých podjednotiek rovnaká. Nevyhnutnou súčasťou každej podjednotky je pevne viazaný Ca^{2+} a ďalší kovový ión - väčšinou Mn^{2+} , ktoré sú dôležité pri naviazaní sacharidu. Niektoré z lektínov majú hydrofóbnú oblasť, ktorá viaže nepolárne zlúčeniny (napr. adenín, indolctovú kyselinu, porfyríny).⁷

Podjednotky sú stavané z jednotlivých polypeptidových reťazcov obsahujúcich asi 250 aminokyselín. Často bývajú skrátané na karboxylovom konci, výsledkom čoho je zmes izoforiem s rozličnou dĺžkou reťazca. V určitých lektínoch (PSL, LCL), označovaných ako „dvojreťazcové“, sú polypeptidy fragmentované na C-koncové ľahké (α) a N-koncové ťažké (β) reťazce.^{1,7}

Až na zopár výnimiek (Con A, PNA, LCL) sú lektíny z čeľade Fabaceae glykozylované a nesú jeden, dva a príležitostne i tri dusíkom napojené oligosacharidy, ktoré sú naviazané v rôznych častiach proteínu (napr. na Asn17 a 114 v ECorL, 74 v SBA a 44 a 219 v WBA- I). Oligosacharidy sú buď oligomanóзовého typu, identické s tými, ktoré boli nájdené

v živočíšnych glykoproteínoch, alebo môžu obsahovať xylózu a fukózu spolu s manózou a N-acetylglukozamínom a tvoria skupinu rastlinne špecifických glykanov.^{8,9}

Primárna štruktúra

Lektíny v čeľadi Fabaceae vykazujú značnú sekvenčnú homológiu. Zhruba 20% aminokyselín je nemenných a 20% podobných. U Con A možno pozorovať neobvyklý typ homológie s ostatnými Fabaceae lektínmi, označovaný ako kruhová homológia (circular homology). Je to výsledok nezvyčajného preskupenia peptidového reťazca v poslednom kroku syntézy lektínu. Con A je syntetizovaný ako glykozylovaný prolektín. Posttranslačnou modifikáciou je deglykozylovaný, čím sa stáva aktívnym, schopným viazať sacharidy.¹

Terciárna štruktúra

Približne u 30 lektínov tejto čeľade je známa priestorová štruktúra. Podjednotky majú doménovú štruktúru. Doména je tvorená prevažne z troch β -skladaných listov:

- zadný - antiparalelný, 6-prameňový, takmer plochý
- predný - konkávny, 7-prameňový
- menší 5-prameňový, ktorého úlohou je spájať dva väčšie β -skladané listy

Väčšina zbytkov ktoré nie sú zahrnuté v β štruktúrach je v slučkách (loops) a β -ohyboch (β -bends), ktoré spájajú jednotlivé pramene v β -skladaných listoch. Tento typ terciárnej štruktúry nájdeme v anglicky písanej literatúre pod označením „ β jelly roll“, „Swiss roll“ alebo tiež „lectin fold“.¹⁰

Väzbové miesta pre sacharid a pre kovové ióny sú väčšinou lokalizované na 7-prameňovom reťazci. Konkávnosť väzbového miesta umožňuje ľahkú prístupnosť nielen pre monosacharidy, ale tiež pre oligosacharidy a polysacharidy. Ca^{2+} a Mn^{2+} (ten môže byť nahradený aj zinkom, niklom či kobaltom) sa nachádzajú blízko väzbového miesta pre sacharid. Pomáhajú správne orientovať aminokyseliny, ktoré sa zúčastňujú kontaktu so sacharidom, ale neviažu sa s nimi priamo. Obidva kovové ióny sú spojené so štyrmi aminokyselinovými bočnými reťazcami. Dva z nich, patriace k zvyškom kyseliny asparágovej, sú zdieľané oboma kovmi. Štyri molekuly vody sa primo či nepriamo zúčastňujú na viazaní kovu. Výrazné zmeny boli pozorované v kryštalografických štruktúrach Con A po demetalizácii lektínu, čo viedlo k strate schopnosti viazať sacharid.^{1,7}

Kvartérna štruktúra

Napriek tomu, že terciárna štruktúra Fabaceae lektínov je takmer identická, dimerizujú a oligomerizujú niekoľkými odlišnými spôsobmi.^{11, 12, 13}

Najbežnejším typom dimerizácie podjednotiek je antiparalelné, tzv. „side-by-side“ zoradenie dvoch plochých β -skladaných listov. Táto štruktúra predstavuje tzv. „kanonický“ dimér. Je typický pre Con A a takisto pre lektíny prítomné v hrachu (PSL), šošovici (LCL) a hrachore (LOL). Odlišný dimér bol prvýkrát pozorovaný u ECorL, kde dva monoméry vytvárajú tzv. „handshake“ zoskupenie.

Väčšina lektínov z čeľade Fabaceae je tetramérnych a možno ich považovať za „diméry dimérov“. Rozoznávajú sa celkom tri rozličné spôsoby tetramerického usporiadania. Con A predstavuje zvláštny prípad, existuje ako dimér alebo ako tetramér v závislosti na hodnotách pH. PNA má nezvyčajnú kvartérnu štruktúru, zaujímavé je, že tetramér je asymetrický.^{1, 4, 7}

Poaceae (lipnicovité/lipnicovité)

Táto čeľaď zahŕňa napr. lektíny z pšenice (WGA), ryže či jačmeňa. Všetky sú štruktúrne príbuzné homodiméry alebo heterodiméry. Pozostávajú prevažne z dvoch identických podjednotiek, ale značne sa líšia od lektínov z čeľade bôbových. Ich podjednotky (18 kDa) sú menšie než u Fabaceae (25-30 kDa). Sú bohaté na cysteín (20% vo WGA), ktorý u bôbových takmer vždy chýba, taktiež neobsahujú kovové ióny. WGA, ako jediný člen tejto lektínovej rodiny, ktorý bol detailne charakterizovaný, je zmes troch izolektínov, ktoré sa mierne líšia v kompozícii aminokyselín, tie sú produktmi odlišných, ale blízko príbuzných génov. Izolektíny sú diméry dvoch rovnakých 17 kDa podjednotiek a neobsahujú atómy kovu. Každá z podjednotiek je tvorená štyrmi homologickými subdoménami (A až D) zo 43 aminokyselín. Každá subdoména obsahuje štyri disulfidické väzby v rovnakej polohe. Podjednotka má teda 16 takýchto väzieb, preto má molekula vysokú stabilitu. V dimére sú subdomény pospájané spôsobom „head to tail“, čím sa vytvoria subdoménové páry (A–D a B–C), v ktorých obe zložky pochádzajú z rozdielnych podjednotiek. Nezvyčajným znakom proteínu je aj to, že neobsahuje bežne sa vyskytujúce sekundárne štruktúry, akými sú α -helix a β -skladaný list.^{1, 7, 14}

Domény majú vo veľkej miere homologické sekvencie, ktoré sú podobné špecifickému proteínu (tzv. heveín) zloženému zo 43 aminokyselín, prítomnému v latexe kaučukovníka brazílskeho (*Hevea brasiliensis*) z čeľade Euphorbiaceae. Heveín viaže oligosacharidy chitínu podobne ako WGA a ďalšie lektíny z čeľade Poaceae. Toto usporiadanie 43 aminokyselín je

známe aj ako „hevein domain“ alebo „chitin-binding domain“. Bolo nájdené vo väčšine lektínov s danou špecifitou, ktoré pochádzajú z taxonomicky nepríbuzných rastlinných čeľadí, akými sú Solanaceae, Urticaceae a Phytolaccaceae. Heveínová doména bola identifikovaná aj u živočíšnych lektínov, napríklad v jede pavúka druhu *Selenocosmia huwena*.^{15, 16}

Amaryllidaceae (amarylkovité/amarylkovité)

Lektíny prítomné v týchto jednoklíčnolistových rastlinách reprezentujú pomerne novú skupinu proteínov, ktorá je špecifická pre manózu. Prvým získaným lektínom bol GNA, izolovaný zo snežienky (*Galanthus nivalis*) v roku 1987. Všetky lektíny sú tvorené podjednotkami o približnej hmotnosti 12 kDa a ich aminokyselinové sekvencie vykazujú až 90% homológiu.⁷

Prevažne množstvo lektínov je homomérych, tvorených z dvoch alebo štyroch identických podjednotiek. Sú však známe aj lektíny jednoklíčnolistových rastlín tvoriace heterodiméry alebo heterotetraméry, majú teda rozdielne typy podjednotiek. Lektín nachádzajúci sa v cesnaku je heterodimér so sekvenčnou identitou medzi podjednotkami v 77% a podobnosťou v 82%, zatiaľčo v heterotetramerickom lektíne z druhu *Arum maculatum* je 41% identita a 50% podobnosť medzi dvoma druhmi podjednotiek.

Lektín z tulipánu je unikátny v tom, že je to tetramér identických podjednotiek (28 kDa), každá obsahuje manózu-viažúcu doménu v tandemovom zoskupení s nepríbuznými N-acetylgalaktozamín-viažúcimi doménami.¹⁷

Medzi GNA a ďalšími lektínmi jednoklíčnolistových rastlín je vysoký stupeň sekvenčnej homológie. To sa potvrdilo na základe kryštalických štruktúr niektorých lektínov, konkrétne u lektínu prítomného v cesnaku, v narcise, lektínu z hybridných druhov rodu *Hippeastrum* a z druhu *Scilla campanulata*.¹

Moraceae (morušovníkovité/morušovité)

Jacalin, so špecifitou pre galaktózu, pochádza z druhu *Artocarpus integrifolia*. Je to tetramerický glykoproteín (66 kDa), každá podjednotka pozostáva z ťažkého (133 AMK) a ľahkého (20 AMK) reťazca. Primárna štruktúra jacalinu nevykazuje podobnosť s inými lektínmi, s výnimkou MPA získaného z druhu *Maclura pomifera*, ktorý patrí do rovnakej čeľade. Jacalin je zmesou piatich rôznych polypeptidov. Naopak MPA existuje v dvoch izoformách, ktoré nie sú glykozylované.⁷

Kryštalografické štruktúry jacalinu preukázali, že jeho podjednotky sú tvorené tromi antiparalelnými β -skladanými listami, ktoré vytvárajú zoskupenie pripomínajúce trojboký

hranol. Toto usporiadanie sa označuje ako „ β -prism fold“. Je pozoruhodné, že sa vyskytuje aj v niekoľkých proteínoch, no v žiadnom inom lektíne.¹

Artocarpus integrifolia obsahuje okrem galaktóza-špecifických lektínov i dva lektíny štruktúrne príbuzné jacalinu, ktoré sú však špecifické pre manózu. Sú to artokarpín a lektín označovaný ako KM+, izolovaný z juhoamerického druhu. Ten je považovaný za identický s artokarpínom z indického druhu *Artocarpus integrifolia*, no boli pozorované menšie odlišnosti v primárnej štruktúre (10 zo 149 aminokyselín). Manóza-špecifické lektíny príbuzné jacalinu boli nájdené aj v rastlinách patriacich do nepríbuzných čeľadí. Napríklad lektín calsepa (špecifický aj pre maltózu) pochádza z druhu *Calystegia sepium* (Convolvulaceae), lektín označovaný ako HTL z hľúz druhu *Helianthus tuberosus* (Asteraceae), ako aj lektín nachádzajúci sa v ryži (*Oryza sativa*, Poaceae), či lektín banánovníka (*Musa acuminata*, Musaceae). Spoločným znakom všetkých je, že sú to jednoreťazcové proteíny pozostávajúce zo 150 aminokyselín a majú krátky spojovací peptid bohatý na glycín, v mieste, kde je jacalin štiepený na ťažký a ľahký reťazec.^{7, 18, 19, 20}

Amaranthaceae (laskavcovité/láskavcovité)

ACA, Gal β 3GalNAc-špecifický lektín z druhu *Amaranthus caudatus* (66 kDa) nie je glykozylovaný a nevyžaduje k aktivite kovové ióny. Je to homodimér, podjednotky obsahujú dve rovnaké globulárne domény, ktoré sa s ďalšími podjednotkami spájajú spôsobom “head to tail”.⁷

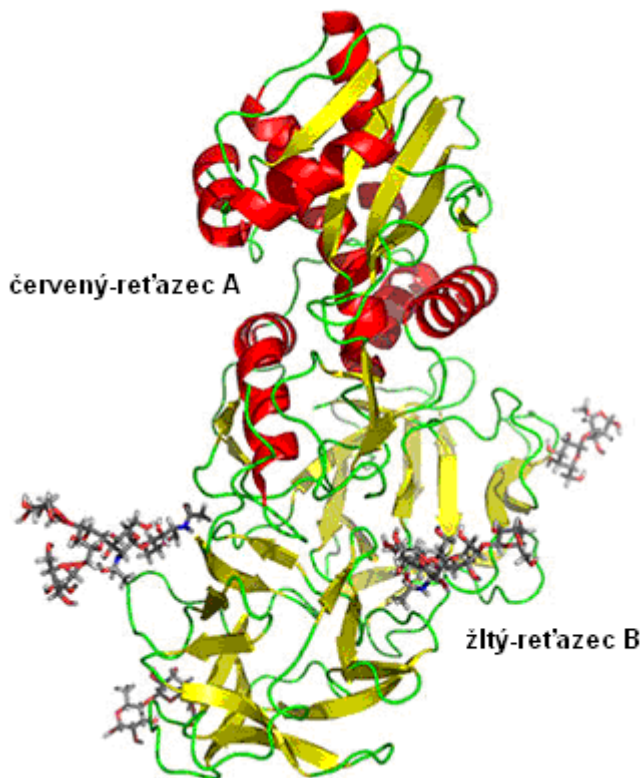
Euphorbiaceae (pryšcovité/mliečnikovité) a Viscaceae (jmelovité/imelovité)

Niektoré rastliny z nepríbuzných čeľadí (napr. Euphorbiaceae a Viscaceae) zahrňujú blízko príbuzné lektíny, z ktorých niektoré sú značne toxické. Najvýznamnejšie a najviac študované sú RCA a ricín, oba izolované z fazulí druhu *Ricinus communis* (Euphorbiaceae). Ricín je heterodimér, tvorený dvoma polypeptidmi spojenými disulfidicky. Jeden je označovaný ako A reťazec, je cytotoxický, zatiaľ čo B reťazec je zodpovedný za väzbu sacharidu. B reťazec pozostáva z dvoch domén, každú tvorí spájajúca doména a tri homologické subdomény.^{7, 21, 22}

Netoxický RCA je dimér dvoch podjednotiek, každá podobná ako v ricíne. Podjednotky sú spojené pomocou disulfidickej väzby medzi dvoma polypeptidmi A, Cys157 zapojený do tejto väzby v ricíne chýba.⁷

Lektíny príbuzné ricínu, označované ako RIPs typ 2 (ribosome inactivating proteins) boli objavené v mnohých rastlinných druhoch z odlišných taxonomických skupín, v semenách ale

aj vo vegetatívnych pletivách. Niektoré z nich obsahujú aj lektín príbuzný RCA. Toxíny podobné ricínu, ako sú abríń, modeksín a viskumín majú všetky toxický A polypeptid pripojený disulfidickou väzbou k B reťazcu, ktorý viaže sacharid. Oba polypeptidy vykazujú vysoký stupeň podobnosti s odpovedajúcimi polypeptidmi v ricíne. Priestorová štruktúra abríńu je veľmi podobná ricínu, tak ako aj viskumínu.^{7, 23, 24, 25}



Obrázok 1. Priestorová štruktúra ricínu²⁶

Solanaceae (lilkovité/ľuľkovité)

V tejto čeľadi sú známe tri lektíny, a to v semenách druhu *Datura stramonium*, v plodoch *Lycopersicon esculentum* a v hľuzach *Solanum tuberosum*. Všetky sú bohaté na cysteín a glycín a obsahujú 40-50% sacharidovej zložky, tvorenej arabinózou a galaktózou.

Lamiaceae (hluchavkovité/hluchavkovité)

Patrí sem MLL, lektín z druhu *Moluccella laevis*. Má osobité vlastnosti, čo sa týka špecifity a štruktúry. Vykazuje výnimočne vysokú afinitu k N-acetylgalaktozamínu, spájajúceho sa α -väzbou, je špecifický pre krvné skupiny A, N a Tn, ktoré daný cukor determinuje. MLL je extrémne stabilný a zachováva si hemaglutinačnú a väzbovú aktivitu aj za silných denaturačných podmienok, napr. pri pôsobení močoviny (8M) po dobu 48 hodín.⁷

Urticaceae (kopřivovité/prhl'avovité)

UDA, lektín z druhu *Urtica dioica* je monométny proteín (8,5 kDa). Boli identifikované gény kódujúce sedem izolektínov a ich primárne sekvencie majú 79-99% homogenitu. Detailne preskúmaný je izolektín VI, jeho dve domény obsahujú 42 a 43 aminokyselín a sú spojené tetrapeptidom, líšia sa afinitou k ligandom.^{7, 27}

Multidométnové (mozaické) lektíny

Túto skupinu tvoria rozličné lektíny, jednak virálne a živočíšne. Sú to zložité molekuly so širokou škálou molekulových hmotností, pozostávajú z viacerých domén, z ktorých len jedna viaže sacharid.

Makromolekulárne zoskupenia

Lektíny tohoto typu sú bežné u baktérií, zvyčajne vo forme fimbrií. Sú prítomné na povrchu baktérií, majú v priemere 3-7 nm a dĺžku 100-200 nm, pozostávajú z podjednotiek.¹

3.2. Špecifita a afinita lektínov

Špecifita ku krvným skupinám

V roku 1919 James Sumner (ako prvý izoloval aj enzým ureázu, za čo dostal Nobelovu cenu) izoloval z fazulí druhu *Canavalia ensiformis* proteín, ktorý pomenoval konkanavalín A (Con A). Bol to prvý hemaglutinín izolovaný v čistej forme.

Už Stillmark pozoroval, že u erytrocytov z rôznych druhov zvierat, je v aglutinácii indukovanej ricínom istá selektivita. Neskôr to vo svojich pokusoch potvrdil aj Karl Landsteiner - objaviteľ krvných skupín. Usúdil, že špecifita rastlinných hemaglutinínov vo svojej podstate pripomína protilátkovú reakciu.

V 40. rokoch minulého storočia dvaja vedci – Boyd z Univerzity v Bostone a Renkonen z Univerzity v Helsinkách – nezávisle na sebe odhalili špecifitu hemaglutinínov k jednotlivým krvným skupinám. Zistili, že extrakty z *Phaseolus limensis* a *Vicia cracca* aglutinujú erytrocyty krvnej skupiny A, ale nie B ani 0. Extrakty z *Lotus tetragonolobus* sú špecifické pre krvnú skupinu 0. Mäkelä, Renkonenov študent, študoval v 50. rokoch extrakty semien u 743 rastlinných druhov a 165 rodov, všetky z čeľade Fabaceae. Detekoval hemaglutinačnú aktivitu u viac než tretiny z nich. Asi jedna desatina z nich javila špecifitu ku

krvným skupinám. Niekoľko z nich bolo špecifických buď pre krvnú skupinu 0 alebo A, alebo pre A a B súčasne, extrakt z *Dolichos biflorus* reagoval oveľa výraznejšie s A1 erytrocytmi než s A2, jedine extrakt z *Griffonia simplicifolia* vykazoval takmer výhradne špecifitu pre krvnú skupinu B. Odvtedy bolo objavených mnoho hemaglutinínov so špecifitou pre skupiny A a 0 (ale nie B), ako aj pre ďalšie krvné skupiny - N (*Vicia graminea*), T (PNA) a Tn (*Vicia villosa*, *Molucella laevis*).

Hemaglutiníny špecifické pre krvné skupiny zohrali rozhodujúcu úlohu v skúmaní špecifity antigénov asociovaných s krvným systémom AB0. V 50. rokoch Morgan a Watkins zistili, že aglutinácia skupiny A lektínmi z *Phaseolus lunatus* je inhibovaná α -N-acetylglaktozamínom a u krvnej skupiny 0 aglutinovanej lektínom z *Lotus tetragonolobus* je inhibovaná α -L-fukózou. Usúdili, že α -N-acetylglaktozamín a α -L-fukóza sú cukry determinujúce A a 0 krvnú skupinu. Tieto závery boli potvrdené ďalšími výskumníkmi.

Kvôli schopnosti rastlinných hemaglutinínov rozoznávať erytrocyty rozličných krvných typov, Boyd a Shapleigh navrhli pomenovanie lektíny. Latinsky *legere* znamená rozoznať, vybrať si.⁴

Metodológia zisťovania špecifity k sacharidom

Štúdium špecifity lektínov k sacharidom je zvyčajne založené na haptenovej inhibičnej technike. Rozličné monosacharidy, oligosacharidy alebo glykopeptidy sú testované z hľadiska schopnosti inhibovať hemaglutináciu alebo inhibovať precipitáciu polysacharidu (alebo glykoproteínu) v prítomnosti lektínu. Sacharid alebo lektín sú imobilizované v otvoroch mikrotitračnej doštičky. Sleduje sa inhibičný efekt rôznych sacharidov na interakciu medzi imobilizovaným lektínom (prípadne sacharidom) a jeho reakčným partnerom v roztoku. S použitím špeciálne upravených glykočipov, s rôznymi mono- a oligosacharidmi, je možné určiť špecifitu lektínu. Táto technika je jednoduchá, rýchla a vyžaduje submiligramové množstvo materiálu.⁷

Z biologického hľadiska je významné, že interakcie medzi lektínom a ligandom sa môžu líšiť *in vitro* a vo fyziologických podmienkach.²⁸

Špecifita k sacharidom

Zo širšieho hľadiska môžeme lektíny rozdeliť na tie, ktoré viažu monosacharidy tak ako aj oligosacharidy a lektíny rozoznávajúce iba oligosacharidy. Z hľadiska biologickej aktivity

lektínov je dôležitý fakt, že z veľkého množstva monosacharidov vyskytujúcich sa v prírode, sú dané sacharidy typickými stavebnými súčasťami povrchu eukaryotických buniek.¹

Lektíny špecifické pre monosacharidy

Na základe špecifity sa lektíny klasifikujú do piatich skupín, podľa toho, ku ktorému monosacharidu vykazujú najväčšiu afinitu:

- Manóza (Man)
- Galaktóza/ N-acetylgalaktózamín (Gal/GalNAc)
- N-acetylglukozamín (GlcNAc)
- Fukóza (Fuc)
- N-acetylneuramínová kyselina (NeuNAc)

(tieto cukry majú D konfiguráciu, vynímajúc fukózu, ktorá je L)

Je to tzv. „primárna špecifita“ lektínov. Lektíny s afinitou k iným monosacharidom sú vzácne. Malé množstvo patrí do skupiny tzv. „promiskuitných“ lektínov. Sú nezvyčajné v tom, že interagujú z rôznymi typmi monosacharidov, viažu ich však na rovnaké väzbové miesto. Niektoré majú „dvojitú“ špecifitu, to znamená, že sa môžu súčasne kombinovať s rozličnými sacharidmi.^{7, 29}

Rozloženie lektínov patriacich do rozdielnych skupín nie je v prírode rovnomerné. Najpočetnejšie a zároveň zastúpené vo všetkých triedach organizmov sú lektíny špecifické pre Gal (a často aj GalNAc).

Isté lektíny preukazujú anomerickú špecifitu. Rozlišujú teda, či je substituent na uhlíku C1 v konfigurácii α alebo β a samozrejme jeden z anomérov preferujú.⁷

Afinita k monosacharidom

Afinita lektínov k monosacharidom je zvyčajne slabá, s asociačnými konštantami v milimolárnom rozpätí, je však často vysoko selektívna. To znamená, že lektíny špecifické pre Gal nereagujú s Glc (jej 4 epimér) alebo s Man (2 epimér galaktózy), tak ako lektíny špecifické pre Man neviažu Gal. Podobne, avšak s výnimkou WGA, zástupcovia skupiny so špecifitou pre GlcNAc sa nekombinujú s GalNAc.

V niektorých prípadoch lektíny neprejavujú k monosacharidom až tak značnú selektivitu. Veľa lektínov toleruje variácie na uhlíku C2 pyranózového kruhu. Väčšina lektínov viažúcich Gal interaguje tiež s GalNAc, v niektorých prípadoch prednostne (napr. SBA - afinita k druhému monosacharidu je 25-50 krát vyššia než ku galaktóze). Iné viažu oba

monosacharidy s takmer rovnakou afinitou, ako napr. ECorL. Z tohto dôvodu sú klasifikované ako jedna špecifická skupina, Gal/GalNAc, aj keď isté z nich (napr. PNA) vôbec neviažu GalNAc. Občas sa lektíny kombinujú s monosacharidmi ktoré nie sú štruktúrne príbuzné, ale majú podobné topografické vlastnosti. Napr. WGA viaže GlcNAc aj NeuNAc, avšak v porovnaní s inými GlcNAc a takisto GalNAc-špecifickými lektínmi, je to v slabšej miere. Preskúmanie priestorovej štruktúry týchto monosacharidov odhalilo podobnosť v pozíciách C2 (acetamidová skupina) a C3 (hydroxylová skupina) na pyranózovom cykle dvoch hexozamínov s C4 a C5 N-acetylneuramínovej kyseliny. Sú to miesta kritické pre kontakt s väzbovými miestami lektínu.¹

Vlastnosti aglykonu značne podmieňujú interakciu glykozidu s lektínom. Najmä aromatické glykozidy sa viažu k mnohým lektínom oveľa silnejšie než alifatické, čo svedčí o prítomnosti hydrofóbnej oblasti v blízkosti miesta viažúceho monosacharid.

Lektíny v spoločnej skupine sa môžu taktiež líšiť v afinite k ostatným derivátom. Napr. Con A a favín viažu oba Glc, ale zatiaľ čo afinita 3-O-metyl alebo fenyl éterov glukózy ku Con A je 20-30 krát nižšia než u Glc, u favínu je 3-4 krát vyššia. Celkom nezvyčajne, Con A interaguje tiež s peptidmi, ktoré obsahujú zoskupenie aminokyselín Tyr-Pro-Tyr, s afinitou podobnou ako k metyl- α -manozidu. Takéto peptidy sa môžu viazať k lektínu vodíkovými väzbami pomocou hydroxylových skupín tyrozínu a hydrofóbnymi interakciami pomocou uhlíkov na aromatickom postrannom reťazci.¹

Manóza

Táto skupina sa pôvodne označovala ako Man/Glc-špecifická, pretože ranné štúdie konkanavalínu A naznačovali, že lektíny špecifické pre Man viažu aj Glc. Neskôr však bolo objavených veľa Man-špecifických lektínov zo skupiny jednodielnych rastlín, ktoré z Glc nereagujú.⁷

Galaktóza/N-acetylgalaktózamín

Ako už bolo spomínané, veľa lektínov ktoré viažu Gal, reaguje aj z GalNAc. V rámci tejto skupiny je afinita k týmto cukrom variabilná. Lektín z druhu *Arachis hypogea* (PNA) vôbec neviaže GalNAc, na druhej strane lektín z druhu *Molucella laevis* má afinitu k danému sacharidu 500-krát vyššiu než ku Gal a DBL viaže takmer výlučne GalNAc.³⁰

N-acetylglukozamín

WGA ako aj väčšina Poaceae lektínov viaže GlcNAc a jeho oligoméry spojené β 4 väzbou, s afinitou ktorá rastie predlžovaním reťazca k štyrom zvyškom. Taktiež je jedným z lektínov, ktoré viažu kyselinu sialovú vo voľnej forme.⁷

Fukóza

Medzi lektíny špecifické pre Fuc patrí lektín z rastliny *Lotus tetragonolobus*. Spôsobuje aglutináciu erytrocytov krvnej skupiny 0.³¹

Kyselina sialová

Mnohé lektíny patriace do tejto skupiny neviažu voľnú kyselinu sialovú, iba v prípade, ak je napojená na ďalší monosacharid, obvykle Gal, alebo na disacharidy ako laktóza alebo N-acetyllaktozamín. Jedným z lektínov, ktorý rozoznáva voľnú kyselinu sialovú alebo jej acetylderiváty, je lektín z listov druhu *Morus alba*. Ostatné sú prevážne živočíšne.^{7, 32}

Väzbové miesta pre monosacharidy

Väzbové miesta lektínov sú vo forme plytkých priehlbín na povrchu proteínu. Typicky sa sacharidový ligand viaže k proteínu na jednom alebo dvoch kontaktných miestach. Tým sa líšia od bakteriálnych periplazmatických receptorov špecifických napr. pre Glc či Gal, kde je ligand „uzavretý“ vo vnútri proteínu.

Lektíny sa viažu so sacharidmi hlavne pomocou vodíkových väzieb a hydrofóbných interakcií, elektrostatické interakcie a koordinačné väzby sú tiež prítomné. Vodíkové väzby vznikajú medzi hydroxylovými skupinami cukru a NH-skupinami, hydroxylmi a kyslíkovými atómami proteínu. Ak obidva susedné hydroxyly monosacharidu interagujú s rôznymi atómami tej istej aminokyseliny (napr. dva kyslíky karboxylu glutámovej kyseliny), vznikajú dvojité vodíkové väzby.

Lektíny z čeľade Fabaceae, bez ohľadu na špecifitu, viažu ligandy pomocou postranných reťazcov, ktoré obsahujú tri kľúčové aminokyseliny: kyselinu asparágovú, asparagín a aromatickú aminokyselinu alebo leucín. Náhrada kyseliny asparágovej alebo asparagínu za inú aminokyselinu, spôsobená mutagenézou, vedie u niektorých lektínov (ECoRL, PSL, GSL-II) k strate schopnosti viazať sacharid. Tieto dve aminokyseliny taktiež zohrávajú úlohu pri koordinácii iónu kalcia. Ten je prítomný vo všetkých zástupcoch čeľade a je nevyhnutný pre väzbu sacharidu. Špecifickou charakteristikou väzbového miesta je zriedkavá *cis*-peptidická väzba medzi spomínanou asparágovou kyselinou a predchádzajúcou aminokyselinou, čo je obvykle alanín. Väzba zohráva dôležitú úlohu pri správnej orientácii asparágovej kyseliny.

Aminokyseliny tvoriace väzbové miesto lektínov čeľade Fabaceae pochádzajú zo štyroch fragmentov polypeptidového reťazca. Tie vytvárajú slučky (loops) a označujú sa A, B, C a D. Asparágová kyselina a glycín, ktoré sú zachované u všetkých lektínov čeľade Fabaceae, sú súčasťou fragmentov A a B, asparagín a hydrofóbný zvyšok sú prítomné v časti

C. Existuje vzťah medzi dĺžkou slučky D a špecifitou k monosacharidu. Napr. u všetkých lektínov so špecifitou pre Man, má časť D identickú dĺžku (pozostáva z 18 aminokyselín), ktorá sa líši od lektínov špecifických pre Gal/GalNAc a tiež od lektínov, ktoré sú špecifické len pre oligosacharidy. ¹

Lektíny špecifické pre oligosacharidy

Lektíny patriace do totožnej skupiny sa môžu odlišovať v afinite k príslušnému monosacharidu alebo jeho derivátom. Niektoré interagujú s di-, tri- a tetrasacharidmi s asociačnou konštantou až niekoľko tisíckrát vyššou než je tomu u monosacharidov. V daných oligosacharidoch sa monosacharid, ku ktorému je lektín špecifický, obvykle nachádza na neredukujúcom konci, aj keď niektoré (napr. Con A a WGA) rozpoznávajú komplementárny cukor vo vnútornej pozícii reťazca.

Ako už bolo spomenuté, určité lektíny interagujú výlučne s oligosacharidmi, no medzi rastlinami sú zriedkavé. V tejto skupine prevládajú lektíny špecifické pre oligosacharidy, ktoré majú v terminálnej neredukujúcej časti reťazca kyselinu sialovú. Lektíny rozoznávajúce oligosacharidy zakončené iným typom monosacharidu su málo početné, zatiaľčo lektíny rozoznávajúce glykozaminoglykány sú vzácne.

Lektíny so špecifitou pre oligosacharidy obsahujúce kyselinu sialovú sú prítomné u živočíchov a vírusov ale zriedkavé u iných organizmov. Iba niekoľko z nich bolo nájdených aj v rastlinách, napr. v kôre druhu *Sambucus nigra*.

Oligosacharidy s galaktózou sú ligandom napr. pre lektíny obsiahnuté v hubách *Agaricus bisporus* a *Arthrobotrys oligospora*. Huba *Marasmius oreades* zasa obsahuje lektín, ktorý je jediný známy so špecifitou pre Gal α 3Gal.

Špecifitu pre oligosacharidy obsahujúce N-acetylglukozamín, podobné oligosacharidom v chitíne, majú výhradne lektíny prítomné v čeľadi Solanaceae (*Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum* a *Datura stramonium*). Ich afinita je u tetramérov vyššia než u dimérov a je taktiež väčšia ako u monosacharidov. ⁷

Tabuľka 1. Prehľad špecifity lektínov k sacharidom^{1,7}

Sacharid	Zdroj lektínu (zástupcovia)
Manóza	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Allium sativum</i> • <i>Artocarpus integrifolia</i> (KM+, artokarpín)^a • <i>Calystegia sepium</i>^b • <i>Canavalia ensiformis</i>^a • <i>Crocus sativus</i> • <i>Dioclea grandiflora</i>^a • <i>Dolichos lablab</i> • <i>Galanthus nivalis</i> • <i>Helianthus tuberosus</i> • <i>Lathyrus ochrus</i>^a • <i>Lens culinaris</i>^a • <i>Listera ovata</i> • <i>Musa acuminata</i>^a • <i>Narcissus pseudonarcissus</i> • <i>Pisum sativum</i>^a • <i>Scilla campanulata</i> • <i>Vicia faba</i>^a
Galaktóza/N-acetylgalaktozamín	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Abrus precatorius</i> • <i>Adenia digitata</i> • <i>Arachis hypogea</i> • <i>Artocarpus integrifolia</i> (jacalin) • <i>Coprinus cinereus</i> • <i>Dolichos biflorus</i> • <i>Erythrina corallodendron</i> • <i>Glycine max</i> • <i>Griffonia simplicifolia</i> (GSL-I) • <i>Iris hollandica</i> • <i>Molucella laevis</i> • <i>Momordica charantia</i> • <i>Phaseolus limensis</i> • <i>Phaseolus vulgaris</i>^e • <i>Ricinus communis</i> • <i>Robinia pseudoacacia</i> • <i>Viscum album</i>
N-acetylglukozamín	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Datura stramonium</i>^e • <i>Griffonia simplicifolia</i> (GSL-II) • <i>Lycopersicon esculentum</i>^e • <i>Oryza sativa</i> • <i>Phytolacca americana</i> • <i>Solanum tuberosum</i>^e • <i>Triticum aestivum</i>^c • <i>Ulex europaeus</i> (UEA-II) • <i>Urtica dioica</i>

Fukóza	<ul style="list-style-type: none"> • Lotus teragonolobus • Ulex europaeus (UEA-I) • Griffonia simplicifolia (GSL-IV)^e
Sialová kyselina	<ul style="list-style-type: none"> • Morus alba • Sambucus nigra • Triticum aestivum^d • Maackia amurensis

^a viaže aj Glc

^b viaže aj Mal

^c viaže aj kyselinu sialovú

^d viaže aj N-acetylglukozamín

^e vykazuje špecifitu len k oligosacharidom

tzv. Promiskuitné lektíny

Do tejto skupiny môžeme zaradiť WGA. Ten má schopnosť viazať sa jednak s N-acetylglukozamínom ale takisto aj s N-acetylneuramínovou kyselinou. Ďalším príkladom sú dva blízko príbuzné Gal/GalNAc-špecifické lektíny z hl'uz druhu *Iris hollandica*, ktoré rozoznávajú aj manózu. Okrem toho, podľa nedávnych štúdií, lektín špecifický pre galaktózu-jacalin, taktiež viaže manózu.³³

Lektíny s dvojitou špecifitou

Lektíny majúce dve väzbové miesta na jednej podjednotke sú zriedkavé. Každé miesto je špecifické pre iný cukor, lektín preto môže viazať súčasne odlišné ligandy.⁷

Takéto lektíny sa našli v druhoch *Xanthosoma sagittifolium* a *Arthrobotrys oligospora*. Zaujímavé sú aj lektíny rodu *Tulipa*. Pri testovaní so zajačiami erytrocytmí bolo možné inhibovať aglutináciu jedine zmesou α -manozidu a N-acetylgalaktozamínu. Pri použití ľudských erytrocytov však bola aglutinácia inhibovaná N-acetylglukozamínom, laktózou, fukózou alebo galaktózou.^{17, 34, 35}

Význam konformácie oligosacharidov

Afinita k oligosacharidom je podmienená hlavne tvarom oligosacharidov – sú to flexibilné molekuly s možnosťou rotácie okolo glykozidických väzieb spájajúcich jednotlivé monosacharidy. To bolo demonštrované na základe molekulárneho modelovania, ako aj pomocou NMR štúdií oligosacharidov v roztoku. Vďaka flexibilitě reťazca môžu teda oligosacharidy, ktoré sa líšia chemickou štruktúrou, ale majú podobné topografické črty, viazať rovnaký lektín. Na druhej strane, rozličné lektíny s podobnou špecifitou môžu

rozpoznávať rozdielne miesta na tom istom oligosacharide. To znamená, že jeden oligosacharid je nositeľom rôznych informácií, ktoré sú dekodované rôznymi lektínmi.^{1,7}

Lektín uprednostňuje konformér, ktorý je priestorovo najvhodnejší na obsadenie väzbového miesta. Tento však nemusí byť v roztoku najviac preferovaný.^{36, 37}

Lekzýmy (Leczymes)

Existujú aj lektíny vykazujúce enzymatickú aktivitu, ktorá však nesúvisí s ich špecifitou k sacharidom. Sú označované ako lekzýmy. Ricín a príbuzné lektíny patria tiež medzi lekzýmy s RNA N- glykozidázovou aktivitou.^{7, 38}

4. Výskyt a funkcia lektínov v rastlinách

4.1. Výskyt lektínov v rastlinách a iných organizmoch. Ich detekcia a izolácia

Lektíny sa vyskytujú v podstate vo všetkých triedach a čeľadiach preskúmaných organizmov, hoci nie v každom rode či druhu. Ich distribúcia je v rámci jednotlivých pletív a buniek variabilná a býva ovplyvnená rôznorodými faktormi, ako je napríklad vývojové štádium, vek alebo podmienky za patologického stavu.⁷

Vyššie rastliny

Lektíny boli detekované vo viac než 1000 druhoch rastlín a niekoľko stovák z nich sa podarilo izolovať. Prevažná väčšina bola získaná zo semien, obzvlášť lektíny dvojkľúčolistových rastlín čeľade Fabaceae, kde sa v semenách akumulujú počas dozrievania a miznú po klíčení. Môžu tvoriť až 10% celkového množstva semenných proteínov, no izolované kvantily sú zvyčajne nižšie, medzi 0,1 až 1%. Lokalizácia vo vnútri semien sa medzi rastlinnými čeľadami líši.^{39,40}

V semenách čeľade Fabaceae je väčšina lektínov lokalizovaná v zárodočných listoch v proteínových telieskach. Sú to subcelulárne organely príbuzné lyzozómom, obsahujú lektíny v komplexe s endogénnymi proteínmi nazývanými „lectin binders“. V čeľadi Euphorbiaceae je endosperm hlavným miestom výskytu lektínov, ktoré sú takisto uzavreté do proteínových teliesok. V podzemkoch rastliny *Calystegia sepium* je lektín v cytoplazme, zatiaľ čo v čeľadi Poaceae je v semennom embryu.^{7,39,41}

Popri semenách boli lektíny nájdené vo všetkých druhoch vegetatívnych pletív. Obsah lektínov v týchto pletivách je variabilný a vykazuje sezónne zmeny. Je obvykle nižší ako v semenách, no môže dosahovať až 30% celkových pletivových proteínov, napríklad cibulové lektíny cesnaku, či naopak len niečo okolo 0,01% ako je tomu v listoch póru.

Väčšina rastlinných pletív obsahuje jediný lektín, avšak príležitostne dva i viac lektínov líšiacich sa v sacharidovej špecifite. Dva rozličné lektíny sa nachádzajú napríklad v semenách druhov *Ulex europaeus*, *Artocarpus integrifolia* a *Vicia cracca*, kým v semenách druhu *Griffonia simplicifolia* nájde tri rôzne lektíny. Lektíny s rozdielnou špecifitou sa tiež nachádzajú v kôre *Sambucus nigra* a tiež v druhu *Sophora japonica*. V rámci jednej rastliny

nie sú lektíny obmedzené iba na jedno pletivo. Sú známe prípady, keď sú lektíny nájdené vo vegetatívnych častiach rastliny identické s tými v semenách (napr. tri lektíny v semenách druhu *Griffonia simplicifolia* sú prítomné aj v listoch), no nie je to vždy tak. Napríklad v rastline *Dolichos biflorus*, najrozsiahlšie študovanej rastline ohľadom distribúcie lektínov v rôznych pletivách, listy obsahujú lektín (DB58) homologický tomu v semenách (DBL), ale s určitými odlišnosťami v špecifite. ⁴¹

Príležitostne sa jeden lektín, obzvlášť v čeľadi Fabaceae, vyskytuje ako zmes izoforiem označovaných izolektíny. Typicky majú rovnakú molekulárnu štruktúru, no môžu mať mierne rozdielnu špecifitu alebo niektoré fyzikálne vlastnosti, ako napr. elektrický náboj. Izolektíny zo semien druhu *Maackia amurensis* majú inú bunkovú špecifitu, jeden z nich (MAH) vykazuje hemaglutinačnú a druhý (MAL) leukoaglutinačnú aktivitu.

Niektoré izolektíny pochádzajú zo zreteľne odlišných génov, ako je to aj v prípade WGA. Iné sú výsledkom rôznych posttranslačných modifikácií produktu jedného génu, alebo rôznych zoskupení blízko príbuzných podjednotiek.

GSL-I je vlastne rodina piatich izolektínov, každý je tetramerický, tvorený jedným alebo dvoma typmi podjednotiek, A a B, ktoré sú si veľmi podobné molekulárnou veľkosťou a kompozíciou aminokyselín, no majú odlišnú špecifitu.

PHA izolektíny takisto reprezentujú rodinu piatich tetramerických proteínov. Sú tvorené dvoma typmi podjednotiek, E a L. Líšia sa v sacharidovej a bunkovej špecifite a taktiež v biologickej aktivite: E₄ (E-PHA) má silnú hemaglutinačnú aktivitu, L₄ (L-PHA) má leukoaglutinačnú a výraznú mitogénnu aktivitu. Prechodné formy (E₁L₃, E₂L₂ alebo E₃L₁) si zachovávajú aktivitu oboch typov, aj keď v nižšej miere.

Podobné zmesi izoforiem nájdeme aj v semenách druhu *Vicia villosa*, v kôre druhu *Maackia amurensis*, *Robinia pseudoacacia* a *Sophora japonica*. V semenách rastliny *Datura stramonium* sú prítomné tri izolektíny, dva z nich sú homodiméry - tvorené buď A alebo B podjednotkami, tretí je heterodimér - zložený z oboch podjednotiek. Dva typy lektínu (toxín a aglutinín) boli nájdené medzi ostatnými napr. v semenách druhov *Ricinus communis* a *Abrus precatorius*. Sú špeciálnym typom izolektínov. ^{7, 40, 42}

Nižšie rastliny

Hemaglutinačná aktivita bola detekovaná u mnohých druhov morských rias, hlavne červených. Avšak iba zopár lektínov bolo čistených a charakterizovaných, ako napríklad

lektín zo zelenej riasy *Codium fragile* subsp. *tomentosoides*, špecifický pre N-acetylgalaktozamín, či galaktóza-špecifický lektín z červenej riasy *Ptilota filiciana*.⁷

Huby

Medzi prvými hubami, z ktorých sa izolovali lektíny, boli *Agaricus campestris* a *Agaricus bisporus*. V súčasnej dobe je už známych mnoho ďalších. Lektíny sa taktiež našli vo fytopatogénnych hubách, akými sú *Botrytis cinerea*, *Pleurotus ostreatus*, *Rhizoctonia solani*, v zástupcoch čeľade Sclerotiniaceae a v hube s antinematódnou aktivitou, *Arthrobotrys oligospora*. V nedávnej dobe bol z druhu *Marasmius oreades* izolovaný lektín s unikátnymi väzbovými vlastnosťami a špecifitou pre krvnú skupinu B. V druhu *Coprinus cinereus* sa zasa našiel galektín - prvýkrát bol zástupca tejto skupiny lektínov objavený mimo živočíšnu ríšu.^{7, 39, 43, 44, 45}

Lektíny boli izolované aj z niektorých druhov kvasníc, napr. galaktóza-špecifický lektín zo *Saccharomyces cerevisiae* a dva z *Kluyveromyces bulgaricus*, z toho jeden špecifický pre galaktózu a ďalší pre N-acetylglukozamín.⁷

Živočích

Do roku 1980 boli hlavným zdrojom živočíšnych lektínov najmä bezstavovce. Lektíny s vyšších živočíchov sa získali až neskôr a počet novoobjavených neustále narastá. Zatiaľ čo rastlinné lektíny majú podobné vlastnosti v rámci jednotlivých čeľadí, živočíšne často vykazujú podobnosť aj napriek tomu, že majú taxonomicky odlišný pôvod. Sú preto klasifikované na základe sacharidy-rozoznávajúcich domén (carbohydrate recognition domains, CRDs). Existuje 12 štrukturálnych skupín živočíšnych lektínov, hlavnými sú lektíny typu C, galektíny a siglektíny. Niektoré lektíny sa však neradia ani do jednej zo známych skupín.^{7, 46}

Stavovce

Najviac rozšírenou skupinou živočíšnych lektínov sú galektíny (pôvodne nazývané lektíny typu S), špecifické pre galaktózu. U cicavcov ich bolo popísaných 12, ďalšie sa našli u vtákov, nižších stavovcov, červov a špongiovitých húb. Nachádzajú sa takmer vo všetkých typoch buniek, vo vnútri buniek aj mimo nich. Jednotlivé typy buniek však prednostne obsahujú určitý galektín. Napríklad galektín-5 je typický hlavne pre erytrocyty.

Lektíny typu C získali pomenovanie vďaka nevyhnutnosti vápenatých iónov pre väzbu sacharidu. Sú bohato zastúpené. Mnohé z nich sú spojené s plazmatickou membránou a intracelulárnymi membránami. Patria sem tri hlavné skupiny:

- endocytické lektíny - napríklad HBP (hepatic binding protein), lokalizovaný na parenchymálnych hepatocytoch, alebo pečeňový asialoglykoproteínový receptor (ASOGR).
- kolektíny - sú z tejto skupiny jediné rozpustné a membránovo neviazané. Patrí sem napr. manózu-viažúci lektín (MBL) prítomný v sére a v pečeni a surfaktantové proteíny A a D v alveolách.
- selektíny - (E-, L- a P-) sú membránové lektíny vyskytujúce sa v cievnom endotele a v leukocytoch.

L-selektín sa nachádza na monocytoch a neutrofiloch, T, B a NK bunkách.

E-selektín je obmedzený na endoteliálne bunky, jeho expresia je indukovaná cytokínmi (interleukín-1, tumor nekrotizujúci faktor) v procese zápalu.

V súvislosti s lektínmi typu C boli objavené mnohé proteíny obsahujúce domény podobné CRD doménam C-lektínov, takzvané CTLDs (C-type lectin-like domains) prítomné aj na povrchových receptoroch NK buniek. Tieto proteíny však nemajú schopnosť viazať sacharidy.

Ďalšia skupina, lektíny typu P, má iba dvoch zástupcov, no vyskytujú sa vo väčšine bunkových typov. Sú špecifické pre manóza-6-fosfát.

Siglektíny predstavujú skupinu 11 lektínov, nachádzajú sa v nervovom systéme. Sú to membránové glykoproteíny špecifické pre kyselinu sialovú. Obsahujú rôzny počet domén podobných imunoglobulínu.

Pentraxíny sú oligomerické plazmatické proteíny. Ich podjednotky sú diskovite usporiadané a majú cyklickú pentamerickú symetriu. Patrí sem C-reaktívny proteín a sérový amyloid P.^{7,47}

Bezstavovce

Lektíny sa prakticky vyskytujú vo všetkých triedach a podtriedach bezstavovcov. Napr. v kraboch, slimákoch, helmintoch, hmyze. Pravdepodobne najznámejšie sú lektíny zo záhradného slimáka *Helix pomatia* a zo séra kraba *Limulus polyphemus*.

Mikroorganizmy

Lektíny boli izolované aj z niektorých druhov prvokov, napríklad z povrchu patogénnych organizmov *Entamoeba histolytica*, z merozoítov pôvodcu malárie *Plasmodium falciparum*, z druhu *Trypanosoma cruzi* spôsobujúceho Chagasovu chorobu a tiež z niektorých druhov rodu *Trichomonas*.

U baktérií sa lektíny vyskytujú vo forme submikroskopických vláskovitých výbežkov známych ako fimbrie (napr. u *E.coli*, *Salmonellae* spp.), u niektorých sú intracelulárne (*Pseudomonas aeruginosa*).

Z vírusov sú najviac preskúmané lektíny influenza a polyoma vírusov patriacich medzi orthomixoviry a papovaviry, z retrovirov je to HIV.⁷

Detekcia prítomnosti lektínov

Klasická a stále najjednoduchšia metóda na zistenie prítomnosti lektínov v biologickom materiáli je príprava extraktu z daného materiálu a skúšanie schopnosti aglutinovať erythrocyty. Vylepšený spôsob skrínungu spočíva v schopnosti lektínov precipitovať polysacharidy alebo glykoproteíny. Ak je reakcia pozitívna, je nevyhnutné preukázať, že aglutinácia alebo precipitácia je špecificky inhibovaná mono- alebo oligosacharidmi.

K hemaglutinácii sa najčastejšie používajú ľudské alebo králičie erythrocyty, niekedy sa ich senzitivita k aglutinácii zvyšuje pomocou trypsínu či sialidázy. Hemaglutinácia taktiež slúži k monitorovaniu a kvantifikácii lektínovej aktivity v procese purifikácie.

Aby došlo k aglutinácii, lektín sa musí naviazať na bunky a vytvoriť medzi nimi skrížené väzby. Nie je tu však jednoznačný vzťah medzi množstvom naviazaného lektínu a mierou aglutinácie. Sú známe prípady, kedy je na bunky viazané značné množstvo lektínu, bez vzniku aglutinácie. Pokiaľ sa aglutinácia objaví a je inhibovaná mono- alebo oligosacharidmi, je to náznak že sacharidové štruktúry, pre ktoré je lektín špecifický, sú prítomné na povrchu bunky.

Lektínmi vyvolaná aglutinácia sa takisto používa pri štúdiu zmien bunkového povrchu v priebehu fyziologických a patologických procesov.^{7, 48}

Izolácia a čistenie lektínov

V minulosti boli lektíny získavané výhradne z prírodných zdrojov, dnes však môžu byť vyrábané aj pomocou rekombinantných technológií.

- Prvým krokom izolácie lektínu je extrakcia pletiva alebo rastlinného orgánu. K tomu sa používa neutrálny pufo. Ten môže obsahovať inhibítory proteáz, ktorých úlohou je zamedziť degradácii lektínov počas purifikácie. Pri úvodnej frakcionácii hrubého extraktu (napr. precipitáciou so síranom amónnym) sa získa frakcia zbavená polysacharidových prímiesí. Konečná purifikácia sa prevádza afinitnou chromatografiou pomocou vhodného adsorbenta. Syntetické nosiče pre afinitnú chromatografiu vyvinul Jan Kocourek na Karlovej Univerzite v Prahe. Pomocou nich sa mu podarilo izolovať a charakterizovať asi päťdesiat lektínov, väčšina z nich bola izolovaná prvýkrát.
- Lektíny je možné získať aj technológiou rekombinantnej DNA. Je založená na izolácii cDNA alebo genomickej DNA lektínu, jej inzercie do vhodného vektora a expresie v hostiteľskej bunke. Izolácia cDNA vyžaduje poznať aspoň časť primárnej sekvencie daného lektínu alebo štruktúrne podobného. Touto technológiou boli v *E. coli* exprimované napr. lektíny z druhov *Pisum sativum*, *Erythrina corallodendron*, *Arachis hypogea* a *Griffonia simplicifolia*. Na expresiu rastlinných lektínov sa použili okrem *E. coli* aj iné organizmy, napr. *Saccharomyces cerevisiae* pre WGA, bunky hmyzu pre PNA a opičie bunky pre SBA.^{7, 39, 48}

Tabuľka 2. Výskyt lektínov v dvojklíčnolistových rastlinách (*Dicotyledonopsida*)^{7, 49, 66-69}

Čeľad'	Latinský názov	Český názov	Slovenský názov	Názov lektínu/skratka	Lokalizácia v rastline	Špecifita
Asteraceae	<i>Helianthus tuberosus</i>	slunečnice topinambur	topinambur hlíznatý	HTL	H	Man
Convolvulaceae	<i>Calystegia sepium</i>	opletník plotní	povoja plotná	calsepa	O	Man, Mal
Cucurbitaceae	<i>Momordica charantia</i>	hořká okurka	momordika horká	momordín A	S	Gal/GalNAc
Euphorbiaceae	<i>Ricinus communis</i>	skočec obecný	ricín obyčajný	RCA, ricín	S	Gal/GalNAc
	<i>Hura crepitans</i>		hura rachotivá		S, X	Gal/GalNAc
Fabaceae	<i>Abrus precatorius</i>	sotorek ružencový	ružencovec obyčajný	abrín, APA	S	Gal/GalNAc
	<i>Arachis hypogea</i>	podzemnice olejná	podzemnica olejná	PNA	S	Gal/GalNAc
	<i>Bauhinia purpurea</i>		bauhinia sp.	BPA	S	Gal/GalNAc
	<i>Bowringia mildbraedi</i>			BMA	S	Man/Glc
	<i>Canavalia ensiformis</i>	dlohatec mečovitý	kanavália sp.	Con A	S	Man/Glc
	<i>Dioclea grandiflora</i>			DGL	S	Man/Glc
	<i>Dolichos biflorus</i>	dlohatec dvoukvětý	lablab dvojkvetý	DBL, DB58	S, L	Gal/GalNAc
	<i>Dolichos lablab</i>	dlohatec obecný	lablab obyčajný	FRIL	S	Man
	<i>Erythrina corallodendron</i>	zarděnice obecná	koralník obyčajný	ECorL	S	Gal/GalNAc
	<i>Erythrina cristagalli</i>	zarděnice kohoutí hřeben	koralník hřebenitý	ECL	S	Gal/GalNAc
	<i>Glycine max</i>	sója luštinatá	sója fazuľová	SBA	S	Gal/GalNAc
	<i>Griffonia simplicifolia</i>			GSL-I, GSL-II, GSL-IV	S	Gal/GalNAc, GlcNAc, Fuc-OS
	<i>Lathyrus ochrus</i>	hrachor žltoplodý	hrachor žltoplodý	LOL	S	Man/Glc
<i>Lens culinaris</i>	čočka jedlá	šošovica jedlá	LCL	S	Man/Glc	

	<i>Lotus tetragonolobus</i>		ľadenec sp.	LTA	S	Fuc
	<i>Maackia amurensis</i>			MAL, MAH	S	NeuNAc-OS
	<i>Onobrychis vicifolia</i>	vičeneľ ligrus	vičeneľ vikolistý		S	Man/Glc
	<i>Phaseolus lunatus</i>		fazuľa mesiacovitá	LBA	S	Gal/GalNAc
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	fazol obecný	fazuľa obyčajná	PHA	S	Gal/GalNAc-OS
	<i>Pisum sativum</i>	hrách setý	hrach siaty	PSL	S	Man/Glc
	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>		psofokarp paľadencový	WBA-I, WBA-II	S	Gal/GalNAc
	<i>Robinia pseudoacacia</i>	trnovník akát	agát biely	robín	K	Gal/GalNAc
	<i>Sophora japonica</i>	jerlín japonský	sofora japonská	SJL	S, K	Gal/GalNAc, Man/Glc
	<i>Ulex europaeus</i>	hlodáš evropský	útesoveľ európsky	UEA-I, UEA-II	S	Fuc, (GlcNAc) ₂
	<i>Vicia faba</i>	bob obecný	vika sp.	Favín	S	Man/Glc
Moraceae	<i>Artocarpus integrifolia</i>	chlebovník celolistý	chlebovník celistvolistý	jacalin, KM+, artokarpín	S	Gal/GalNAc, Man/Glc, Man/Glc
	<i>Maclura pomifera</i>	maklura oranžová	maklura oranžová	MPA	S	Gal/GalNAc
Musaceae	<i>Musa acuminata</i>	banánovník	banánovník končistolistý		P	Man/Glc
Passifloraceae	<i>Adenia digitata</i>	adenia prsnatá		modeksín	R	Gal/GalNAc
	<i>Adenia volkensii</i>	adenia Volkensova		volkensín	R	
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca americana</i>	líčidlo americké	líčidlo americké	PWM	R	(GlcNAc) ₂₋₄
Sambucaceae	<i>Sambucus nigra</i>	bez černý	baza čierna	SNA	K	NeuNAc-OS
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>	durman obecný	durman obyčajný	DSA	S	(GlcNAc) ₂₋₄
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	rajče jedlé	rajčiak jedlý	LEA/TL	P	(GlcNAc) ₂₋₄
	<i>Solanum tuberosum</i>	ľilek brambor	ľuľok zemiakový	STL	H	(GlcNAc) ₂₋₄
Urticaceae	<i>Urtica dioica</i>	kopřiva dvoudomá	pfhľava dvojdová	UDA	O	(GlcNAc) ₂₋₄
Viscaceae	<i>Viscum album</i>	jmelí bílé	imelo bílé	ML-I (viskumín), ML-II, ML-III	ZP	Gal/GalNAc

Tabuľka 3. Výskyt lektínov v jednoklíčnolistových rastlinách (*Monocotyledonopsida*) [7, 49, 66-69]

Čeľaď	Latinský názov	Český názov	Slovenský názov	Názov lektínu/skratka	Lokalizácia v rastline	Špecifita
Amaryllidaceae	<i>Galanthus nivalis</i>	sněžěnka podsněžník	sneženka jarná	GNA	C	Man
	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	narcis žlutý	narcis žltý	NPL	C	Man
Iridaceae	<i>Iris hollandica</i>	kosatec holandský	kosatec holandský		C	Gal/GalNAc, Man
Liliaceae	<i>Allium sativum</i>	česnek kuchyňský	cesnak kuchynský	ASA	C	Man
	<i>Scilla campanulata</i>	scila zvonkovitá	scila sp.	SCA	C	Man
Orchidaceae	<i>Listera ovata</i>	bradáček vejčitý	bradáčik vajcovitolistý	LOA	L	Man
Poaceae	<i>Oryza sativa</i>	rýže setá	ryža siata		S	GlcNAc
	<i>Triticum aestivum</i>	pšenice setá	pšenica siata	WGA	Z	GlcNAc, NeuNAc

C cibula
H hl'uzo
K kôra
L list
O podzemok
P plod
R koreň
S semeno
X latex
Z zárodok
ZP zelené pletivo

4.2. Funkcia lektínov v rastlinách

Lektíny majú v prírode značne širokú škálu funkcií, pričom všetky sú založené na ich schopnosti rozoznávať a viazať sacharidové štruktúry glykokonjugátov, jednak v roztoku ale i na povrchu buniek. Pretože sacharidy môžu byť špecifické pre rôzne druhy organizmov, ich tkanivá alebo bunky, jednotlivé typy lektínov dokážu rozlišovať vlastné a cudzie sacharidy. To je podstatou imunity a obrany rastlín a živočíchov pred nepriateľmi.⁵⁰

Úloha sacharidov v bunkovom rozpoznávaní

Lektíny a sacharidy, prítomné na povrchu buniek, sa podieľajú na bunkovom rozpoznávaní. Sacharidy majú obrovský potenciál kódovať biologické informácie. Tento potenciál pramení z faktu, že monosacharidy sú multifunkčné zlúčeniny, zvyčajne s tromi alebo štyrmi voľnými hydroxylmi, z ktorých každý môže kovalentne viazať ďalší sacharid α alebo β väzbou a vzniknuté oligosacharidy alebo polysacharidy sa môžu ďalej vetviť. V porovnaní s aminokyselinami či nukleotidmi, sacharidy dokážu na jednotku hmotnosti kódovať oveľa väčšie množstvo informácií. Dve molekuly glukózy môžu vytoriť 11 odlišných disacharidov, kým z dvoch aminokyselín alebo nukleotidov vzniká iba dipeptid alebo dinukleotid. So zvyšujúcim sa počtom stavebných jednotiek je tento kontrast výraznejší. Kým 4 rôzne monosacharidy môžu tvoriť $3,55 \times 10^4$ unikátnych tetrasacharidov, štyri odlišné aminokyseliny iba 24 tetrapeptidov. Zo všetkých možných sacharidových štruktúr bola doteraz nájdená v prírode iba malá časť, avšak tento počet sa neustále zvyšuje a v súčasnosti sa pohybuje v tisícoch.^{7, 51}

Úloha lektínov v rastlinách

Napriek tomu, že rastlinné lektíny sú známe dlhšiu dobu ako lektíny z iných organizmov, ich úloha je diskutabilná. Pravdepodobne majú lektíny z rôznych čeľadí aj iné fyziologické funkcie.⁵²

Už od počiatku štúdií rastlinných lektínov sa vedci snažili objasniť ich úlohu vo fyziológii rastlín. Existovali dohady o tom, že lektíny majú funkciu protilátok a ochraňujú rastliny pred škodlivými pôdnymi baktériami, regulujú klíčenie semien, alebo sa zúčastňujú transportu a uskladnenia sacharidov. Aj keď sa tieto hypotézy nepotvrdili, existujú dve, ktoré sú uznávané aj v súčasnosti⁴:

- Lektíny zohrávajú dôležitú úlohu pri symbióze medzi baktériami fixujúcimi dusík (hlavne rodu *Rhizobium*) a rastlinami z čeľade Fabaceae. Tento proces je nesmierne dôležitý v dusíkovom cykle a v poľnohospodárstve.⁵³
- Druhá teória je všeobecnejšia a navrhuje, že lektíny slúžia rastlinám ako obrana proti rôznym druhom fytopatogénnych húb a hmyzu, ako aj predátorným bezstavovcom a stavovcom.^{54, 55}

Lektíny ako mediátory symbiôzy rasiín a baktérií fixujúcich dusík

Schopnosť rastlín čeľade Fabaceae špecificky tvoriť symbiotický vzťah s pôdnymi nitrogénymi baktériami (rod *Rhizobium*) bola dlho pútavým fenoménom. Keď baktérie narazia na koreňové vlásky v pôde, naviažu sa na ne a nasleduje fáza pozmeňovania rastlinných koreňov. Dochádza k deformácii a skrúcaniu koreňových vlásokov, iniciácii bunkového delenia a nodulácii. Vznikajú tak koreňové uzly schopné fixovať vzdušný dusík. Mechanizmus síce nie je celkom jasný, ale predpokladá sa, že prvým krokom je vysoko špecifický kontakt baktérií s povrchom koreňových vlásokov. To znamená, že druh baktérií ktorý noduluje napr. sóju nemôže nodulovať záhradný hrach. Myšlienka, že v tomto procese je významná úloha lektínov, je vyše 30 rokov stará.⁷

Interakcia baktérií a koreňových vlásokov vzniká na základe kontaktu medzi sacharidmi bakteriálneho povrchu a lektínmi v koreňoch bôbových rastlín. To je podstatou tzv. „lektínovej rozpoznávacej hypotézy“. Zo začiatku bola táto hypotéza kontroverzná, najmä kvôli nedostatku dôkazov. Okrem toho, korelácia medzi špecifitou rastlinného lektínu a schopnosťou rozpoznávať nodulačné baktérie nie je až tak striktná. Napríklad heterologické baktérie rodu *Rhizobium* adherujú ku koreňom hrachu rovnako ako symbiont *Rhizobium leguminosarum*. Aplikovanie metód molekulárnej genetiky dospelo k výsledkom, ktoré síce lektínovú rozpoznávaciu hypotézu podporujú, ale nevyvracajú jej kontroverzitu. Transgénne d'ateľiny, ktoré obsahovali gén prenesený z hrachu mohli byť nodulované baktériami špecifickými pre hrach. Podobné výsledky boli získané aj s transgénymi alfalfa rastlinami nesúcimi rovnaký gén. Transfekcia hrachovým génom, v ktorom bola zmutovaná časť kódujúca kľúčovú aminokyselinu (asparagín 125), viedla aj k strate citlivosti voči infekcii hrachovými symbiontmi.^{7, 54, 56, 57, 58}

V paralených nezávislých štúdiách sa zistilo, že špecifita symbiotického vzťahu medzi nitrogénymi baktériami a bôbovými rastlinami súvisí s lipo-chitooligosacharidovými

(LCO) signálnymi molekulami, tiež nazývanými nodulačné faktory, ktoré sú produkované baktériami a indukujú bunkové delenie v koreňoch rastliny. Tieto faktory pozostávajú z chitínovej oligosacharidovej kostry, ktorá je N-acetylovaná nenasýtenými mastnými kyselinami na neredukujúcom konci. Faktory sa medzi sebou líšia v dĺžke hlavného reťazca a v substitúcii zbytkov naň viazaných. Modifikácia určuje špecifitu nitrogénnych baktérií k hostiteľskej rastline, príkladom je *Dolichos biflorus*, ktorého koreňový lektín s enzymatickou aktivitou (LNP, lektín-nukleotid fosfohydroláza) viaže nodulačný faktor špecifický pre materskú rastlinu. Preinkubácia koreňov druhu *Dolichos biflorus* s antisérom proti rekombinantnému LNP inhibovala deformáciu a noduláciu koreňových vláskov. Okrem toho bol lektín rôzne distribuovaný po povrchu koreňa v zónach kde došlo k nodulácii. Blízko príbuzné homológy tohoto lektínu sú prítomné aj v iných rastlinách čeľade Fabaceae, kde zohrávajú podobnú úlohu pri symbióze s baktériami, ale nie v iných čeľadiach.^{59, 60, 61, 62}

Obrana rastlín pomocou lektínov

Určité rastlinné lektíny sú toxické pre hmyz a vyššie organizmy a niektoré inhibujú rast húb. Zúčastňujú sa teda obrany proti predátorom a rôznym typom fytopatogénov.⁷

Väčšina informácií o toxickom efekte lektínov pochádza z experimentálnych podávaní PHA zvieratám, alebo z náhodných otráv ľudí nedovarenými fazuľami. Po požití PHA experimentálnymi zvieratami sa lektín viaže na bunky kartáčového lemu čreva, kde rýchlo nasleduje endocytóza. Po vstupe do buniek lektín zvýši ich metabolickú aktivitu, čo vedie k hyperplázii a hypertrofii tenkého čreva. Navyše, ingescia PHA alebo surových fazuľí spôsobila u pokusných zvierat akútnu nauzeu nasledovanú zvracaním a hnačkou. Celkový dyskomfort bol tak silný, že zvieratá sa následne zdráhali konzumovať potravu obsahujúcu PHA a v niektorých prípadoch radšej hladovali.^{2,7}

Lektíny prítomné v kôre rastlín *Robinia pseudoacacia* a *Sambucus nigra*, ako aj mnohé ďalšie, vyvolávajú podobné toxické efekty. Oba lektíny sú v kôre rastlín hojne zastúpené, čo vysvetľuje, prečo tieto rastliny nie sú nikdy napádané hlodavcami či vysokou zverou.⁷

Aj u ricínu a príbuzných toxínov bola popísaná ochranná funkcia lektínov voči bylinožravcom a fytopatogénnym bezstavovcom.²³

Potenciál lektínov v ochrane rastlín proti hmyzu je známy už dlhšiu dobu. Prvá publikácia o insekticídnom účinku lektínov pochádza z roku 1976. Bol popísaný úhyn lariev

chrobáka druhu *Callosobruchus maculatus*, a to účinkom lektínu z fazulí rastliny *Phaseolus vulgaris*.⁴

Následný skrining v množstve rastlinných druhov potvrdil, že napr. WGA, GNA, jacalin a MPA majú insekticídne vlastnosti. Tie neboli pozorované napr. u lektínov z hrachu a zemiakov. Prenos génu pre GNA do rastlín tabaku a ryže, udelil rastlinám ochranu pred voškami a ďalšími škodcami. Možnosti využitia vhodných lektínov v transgénnych úžitkových rastlinách je venovaná pozornosť, no zatiaľ je to v experimentálnom štádiu.⁶³

U niektorých lektínov bola zistená fungicídna aktivita. WGA, PNA a SBA inhibovali sporuláciu a rast u húb *Trichoderma viride*, *Penicilium notatum* a *Aspergillus niger*. Lektín z druhu *Solanum tuberosum* mal rovnaké účinky na *Botrytis cinerea*. Taktiež rekombinantný UDA (*Urtica dioica* agglutinin), podobne ako WGA inhibovali rast fungálnych fytopatogénov.^{7, 64}

5. Botanická a fytochemická charakteristika rastlinných čeľadí obsahujúcich lektíny

Ako už bolo spomenuté, lektíny sa vyskytujú vo všetkých triedach a čeľadiach preskúmaných organizmov, aj keď nie v každom rode a druhu. Lektíny boli detekované vo viac než 1000 druhoch rastlín a niekoľko stovák z nich sa podarilo izolovať. Čeľaď *Fabaceae* je vzhľadom k lektínom najväčšia a zároveň aj najviac preskúmaná. Bolo v nej popísaných asi 100 lektínov. Z dvojkľúčolistových rastlín sú významné aj čeľade: *Asteraceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Moraceae*, *Passifloraceae*, *Sambucaceae*, *Solanaceae*, *Urticaceae*, *Viscaceae*. V menšom množstve sú lektíny zastúpené v čeľadiach: *Convolvulaceae*, *Phytolaccaceae*, *Musaceae* a ďalších. Z jednokľúčolistových rastlín sa lektíny vyskytujú najmä v rastlinách z čeľadí: *Amaryllidaceae*, *Iridaceae*, *Liliaceae*, *Orchidaceae* a *Poaceae*.

5.1. Dvojkľúčolistové rastliny (*Dicotyledonopsida*)

Asteraceae (hvězdnicovité/astrovité)

Patria sem predovšetkým vytrvalé alebo jednoročné byliny a polokry, s rôznym typom žľaznatých či iných trichómov. Mnohé druhy majú v lyku systém článkovaných mliečnic, obsahujúcich latex, alebo systém živicových kanálikov. Oba sekrečné systémy sa obvykle v jednom druhu nevyskytujú. Listy sú striedavé, málokedy protistojné, jednoduché alebo zložené, občas premenené na šupiny. Kvety obojaké či jednopohlavné, koruna väčšinou 5-početná, kvety tvoria husté kvetenstvo – úbor so zákrovom z listeňov. Kvetenstvo tvoria buď samotné jazykovité kvety, alebo aj trubkovité kvety, ktoré vytvárajú terč úboru. Plodom je nažka.

Z chemotaxonomického hľadiska sú významné: zásobný polysacharid inulín, polyacetylény a seskviterpenické laktóny, pentacyklické triterpény v latexe, silice, kávové kyseliny, alkaloidy. V niektorých druhoch sú prítomné lektíny. Významným znakom je absencia iridoidov.⁶⁵

Cucurbitaceae (dýňovité/tekvicovité)

Existuje asi 105 rodov s 900 druhmi, rozšírenými najmä v trópoch a subtrópoch, vzácnejšie aj do mierneho pásma. V Európe sú pôvodné iba 2 rody. Mnoho druhov patrí k veľmi starým kultúrnym rastlinám.

Sú to jednoroké až vytrvalé, jednodomé alebo dvojdomé byliny. Korene bývajú tenké alebo hľuzovité, niekedy až repovito zhrubnuté, vetvené. Byle sú popínavé alebo plazivé, môžu byť mäkko či pichľavo chlpaté. Listy majú striedavé, bez palistov, celistvé alebo členené. Niektoré druhy majú úponky, ktoré môžu byť aj vetvené. Kvety sú jednopohlavné, pravidelné. Sú buď jednotlivé alebo tvoria vrcholičnaté či hroznovité kvetenstvá. Plodom je dužinatá, mäsitá, hubovitá alebo vysychavá bobuľa.⁶⁶

Sekundárny metabolizmus produkuje triterpénové horčiny (kukurbitacíny), pentacyklické triterpénové saponíny. V niektorých druhoch sú prítomné lektíny, fytosteroly i nebielkovinové aminokyseliny (kukurbitín).⁶⁵

Euphorbiaceae (pryšcovité/mliečnikovité)

Jedná sa o čeľaď obsahujúcu asi 8000 druhov v rámci 400 rodov, ktoré sa vyskytujú v trópoch a subtrópoch celého sveta.

Sú to jednoroké alebo vytrvalé byliny s jednoduchými až vetvenými, priamymi alebo plazivými byľami. V pletivách obsahujú nečlánkované mliečnice. Listy majú striedavé, zriedka protistojné, jednoduché, celistvé alebo dlanito členené. Kvety sú jednopohlavné, jednodomé či dvojdomé, pravidelné. Plodom je púzdrosečná tobolka, s jedným semenom v každom púzdre.⁶⁷

Čeľaď je bohatá na rôzne typy sekundárnych metabolitov: polyizoprén (kaučuk), kyanogénne zlúčeniny, alkaloidy, lektíny, cyklopenténové mastné kyseliny, lokálne dráždivé živice, diterpénové estery.⁶⁵

Fabaceae (bobovité/bôbovité)

Patria medzi najpočetnejšie čeľade a sú rozšírené takmer po celom svete. Zahrňujú približne 490 rodov a asi 12 000 druhov. U nás rastie cez 40 rodov s viac než 160 druhmi.

Sú to byliny alebo dreviny, ktoré sa nikdy nevyskytujú vo vodnom prostredí. Všetky rastliny tejto čeľade majú na koreňoch hľúzky s nitrogénnymi baktériami rodu *Rhizobium*, ktoré dokážu premeniť vzdušný dusík na dusíkaté zlúčeniny potrebné pre rast rastliny.

Listy sú striedavé, zložené, s palistami. Kvety súmerné, obojpohlavné. Väčšinou vytvárajú hroznovité kvetenstvá. Korunu tvorí pavéza, krídla a člnok. Pavéza je prítomná vždy, u niektorých rodov môžu chýbať krídla a člnok. Plodom je lusk, pukajúci v 1 alebo 2 švoch, prípadne nepukavý, s jedným alebo viacerými semenami.⁶⁸

V druhoch tejto čeľade je značný výskyt rôznych typov alkaloidov (pyrolizidínové, chinolizidínové, benzylizochinolínové), flavonoidov, izoflavonoidov, polysacharidov, antrachinónov, mastných olejov, špecifických aminokyselín a v neposlednom rade lektínov.⁶⁵

Moraceae (morušovníkovité/morušovité)

Táto čeľaď zahrňuje asi 53 rodov s 1400 druhmi, vyskytujúcimi sa prevažne v tropických oblastiach.

Sú to opadavé dreviny s početnými cystolitmi a mliečnicami. Listy majú striedavé, jednoduché alebo zložené, s palistami. Kvety sú drobné, jednopohlavné, pravidelné, zväčša 4-početné, jednodomé i dvojdomé, vytvárajú hroznovité kvetenstvá. Plodom je nažka v bohatom súplodí, oriešok alebo kôstkovica.

Plody predstavujú bohatý zdroj sacharidov, škrobu, enzýmov (papaín). V niektorých druhoch sa vyskytujú antokyánové glykozidy a lektíny.^{65, 66}

Passifloraceae (mučenkovité/mučenkovité)

Sú to dreviny alebo popínavé byliny, vyskytujúce sa najmä v tropických a subtropických oblastiach južnej pologule. Plodom je bobuľa alebo tobolka.

Čeľaď zahŕňa indolové alkaloidy, flavonoidy, kumaríny, fytosteroly, kyanogénne glykozidy, silice, lektíny.⁶⁵

Sambucaceae (bezovité/bazovité)

Čeľaď je pomerne málo zastúpená, existuje len jeden rod, *Sambucus*. Sú to kry, zriedka stromy alebo vytrvalé byliny s podzemkami. Majú nepárnooperovitozložené listy, ktoré môžu mať aj palisty. Kvety sú malé, obojpohlavné, obvykle 5-početné, s kolovitou až zvonkovitou korunou. Kvety tvoria vrcholičnaté kvetenstvá. Plodom je kôstkovica s 3-5 kôstkami.

Fytochemicky sú druhy tejto čeľade charakteristické hromadením fenolových látok vo forme glykozidov, živícami, saponínmi, iridoidmi a sekoiridoidmi. Môžu obsahovať aj kyanogénne glykozidy, antokyánové farbivá, flavonoidy, triesloviny, lektíny.^{65, 69, 70}

Solanaceae (lilkovité/ ul'kovit )

Existuje asi 96 rodov zahrnujucich cez 2500 druhov, z toho viac než polovica pochádza z rodu *Solanum*. Vyskytujú sa prevažne v tropickom a subtropickom pásme Strednej a Južnej Ameriky. U nás rastie 11 rodov a viac než 30 druhov.

Sú to jednoročné až dvojročné alebo viacročné byliny, polokry, kry, v trópoch i menšie stromy, nevyskytujú sa vo vodnom prostredí. Listy majú striedavé, bez palistov, jednoduché alebo zložené. Kvety sú jednotlivé, u niektorých druhov tvoria vrcholičnaté kvetenstvá. Bývajú nápadné, obojpohlavné, len zriedka súmerné, obvykle s 5-početnou trubkovitou, zvonkovitou či lievikovitou korunou. Plodom je tobolka alebo bobuľa.⁷¹

Čeľaď je bohatá na pyridínové, steroidné a tropánové alkaloidy (hyosciamín, atropín, skopolamín), steroidné saponíny, steroidy, pentacyklické triterpény, polyfenoly a iné.⁶⁵

Urticaceae (kopřivovité/prh'lavovit )

Čeľaď zahrnuje okolo 50 rodov s asi 1000 druhmi. Rastú po celom svete, najviac rozšírené sú v trópoch. U nás sa vyskytujú iba dva rody, a to *Urtica* a *Parietaria*, zahrnujúce 6 druhov, avšak bežne sa môžeme stretnúť iba s tromi, výskyt ostatných je ojedinelý.

Sú to jednoročné až vytrvalé byliny so striedavými či protistojnými listami. V pletivách sa nachádzajú cystolity rôznych tvarov. Neobsahujú mliečnice. Kvety sú drobné, nevýrazné, so 4 okvetnými lístkami, jednopohlavné alebo obojpohlavné, jednodomé či dvojdomé, zriedka môžu byť obojaké. Plodom je nažka obalená zväčšeným alebo slabo zduinatým okvetím.⁶⁶

V druhoch tejto čeľade sa vyskytujú: sacharidy, škrob, flavonoidy, fytosteroly, živicy, horčiny a lektíny. Rastliny rodu *Urtica* majú trichómy s obsahom histamínu, acetylcholínu a kyseliny mravčej.⁶⁵

Viscaceae (jmelovité/imelovité)

Tradične je táto čeľaď zahrnutá pod ochmetovit /imelovcovit  (Loranthaceae), nedávno publikované práce ju však vydeľujú ako samostatnú. Patrí sem 7 rodov so 400 druhmi, vyskytujú sa prevažne v trópoch a subtrópoch celého sveta.

Sú to poloparazitické zelené rastliny, rastú na vetvách a kmeňoch nahosemenných i dvojklíčnolistových drevín. Majú neopadavé, koovité a väčšinou celokrajné listy. Kvety sú drobné, nanajvýš 2 mm veľké, jednopohlavné, okvetné lístky sú nevýrazne zafarbené. Plody pripomínajú bobuľe, majú lepkavé oplodie.

Metabolitmi sú pentacyklické triterpény, steroidy, amíny, fenolové zlúčeniny (kyseliny, lignany a flavonoidy). Významný je výskyt proteínov viskotoxínov a lektínov (viskumín) ale aj neproteínových aminokyselín (kinurenín).^{65, 69}

5.2. Jednoklíčnolistové rastliny (*Monocotyledonopsida*)

Amaryllidaceae (amarylkovité/amarylkovité)

Existuje asi 65 rodov (asi 850 druhov) rozšírených v miernych, subtropických, menej v tropických oblastiach. Frekventným areálom rozšírenia je Južná Afrika (najmä Kapská oblasť), ďalej Južná a Stredná Amerika a oblasť Stredozemia.

Sú to vytrvalé rastliny s podzemnými cibuľami, oddenkami, alebo cibuľovými hľuzami. Väčšina druhov má bezlistú stonku, listy sú prízemné, úzke, čiarkovité. Kvety bývajú obojpohlavné, so spodným semenníkom, sú jednotlivé alebo v kvetenstvách. Plodom je tobolka alebo bobuľa.

Rastliny obsahujú najmä v cibuliach špecifické alkaloidy (lykorín, gentamín, nivalín, nivalidín, tazetín, galantamín). Neobsahujú steroidné saponíny.^{65, 70, 72}

Liliaceae (liliovité/l'aliovité)

Sú to vytrvalé byliny s cibuľami alebo stonkovými hľuzami. Listy striedavé, prisadlé, čiarkovité alebo vajcovité, väčšinou so súbežnou žilnatinou. Kvety sú rôznej veľkosti, buď jednotlivé alebo v kvetenstvách. Plodom je tobolka alebo bobuľa.

Charakteristickými metabolitmi sú steroidné saponíny, alkaloidy, glykozidy, triesloviny, organické kyseliny, farbivá a lektíny.^{65, 70}

Poaceae (lipnicovité/lipnicovité)

Jedná sa o najobsiahlejšiu čeľaď, obsahujúcu stovky rodov a niekoľko tisíc druhov, ktoré sú kozmopolitne rozšírené.

Sú to vytrvalé alebo jednoročné, často trstnaté rastliny s tenkými koreňmi a plazivým alebo krátko vetveným podzemkom. Ich duté stonky (steblá) sú zväčša oblé, listnaté, s nápadnými kolienkami (nódy) a rôzne dlhými článkami (internódiá).

Listy sú dvojradovo striedavé, s dlhou valcovitou pošvou, ktorá je na bázi zhrubnutá a tvorí tak listové kolienko. Čepeľ je úzko alebo kopinatá čiarkovitá, plochá alebo žliabkovitá.

Kvety vytvárajú kvetenstvo (lata), zložené z jedného alebo viackvetých kláskov, ktoré môžu byť stopkaté alebo prisadlé. Kvety v kláskoch sú dvojradové. Plodom je obilka, s krátkou až dlhou, niekedy perovitou osinou.

Medzi obsahové látky patrí škrob, kyanogénne zlúčeniny, saponíny, kumarínové deriváty, kyselina kremičitá, flavonoidy, silice, lektíny.^{72, 65}

6. Biologická aktivita a toxicita lektínov

Sacharidová špecifita je základom mnohých biologických účinkov lektínov, obzvlášť tých málo známych ako sú napr.:

- bunková aglutinácia (väčšina rastlinných lektínov)
- inhibícia nukleárneho transportu *in vitro* (WGA)
- imunosupresia *in vivo* (Con A)
- inhibícia rastu a zničenie nádorových buniek (ricín, viskumín)
- efekt podobný pôsobeniu inzulínu na tukové bunky (WGA)
- sprostredkovanie lýzy antigénne nepríbuzných buniek pomocou cytotoxických T lymfocytov (Con A, GSL-I)
- mitogénna stimulácia lymfocytov (PHA, Con A, PWM, artokarpín)
- ochrana ľudských T-buniek pred infekciou HIV (NPL, BMA, GNA)

Rastlinné lektíny však neprejavujú tieto aktivity na rastlinných bunkách, ale iba na živočíšnych. Je dokonca možné, že tieto účinky rastlinných lektínov napodobňujú doteraz neznáme biologické účinky živočíšnych lektínov. Túto hypotézu ilustruje mitogénna aktivita určitých rastlinných lektínov, ktorým nemôže byť táto funkcia pripísaná v rastlinnom organizme.⁷

6.1. Účinok lektínov na gastrointestinálny trakt a ďalšie orgány

Lektíny majú v rastlinnej ríši široké zastúpenie, následkom čoho sa v značnej miere vyskytujú vo väčšine rastlinnej potravy. Niektoré z nich prejavujú výraznú biologickú aktivitu a vplyv na tráviaci trakt. Lektíny sú prítomné v mnohých jedlých rastlinách. Už dlho je známe, že sa vyskytujú v rastlinách čeľade Fabaceae, ako sú napr.: *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus mungo*, *Lens culinaris*, *Arachis hypogea* atď. Časom bola ich prítomnosť zistená v množstve ďalších rastlín, ktoré sú bežnou súčasťou potravy, a to v obilninách, zelenine, ovocí, korení, hubách či pochutinách.

Vo všeobecnosti sú lektíny viac rezistentné voči denaturácii teplom než ostatné rastlinné proteíny. Lektíny z čeľade Fabaceae môžu byť inaktivované predĺženým varením. Veľa iných lektínov však teplom denaturovateľných nie je. Podobne ani zelenina a ovocie sa obvykle tepelne neupravujú, tráviaci trakt je teda zvyčajne vystavený biologicky aktívnym lektínom. Keďže

rôzne tepelné úpravy jedál sú relatívne neskorším vynálezom modernej civilizácie, predpokladá sa, že lektíny prítomné v potrave, zohrali významnú úlohu v evolúcii alimentárneho traktu u človeka i u zvierat. Avšak ani tepelná úprava jedla nezaručuje kompletnú inaktiváciu lektínov. Napríklad lektíny boli detekované aj v pražených arašidoch. Ani pomalé varenie fazulí, pod bodom varu, neeliminuje lektínovú aktivitu, čo bolo zistené u fazulí druhu *Phaseolus vulgaris* varených po dobu 11 hod pri 82 °C alebo 5 hod pri 91 °C.^{2, 73}

Biologická aktivita rastlinných lektínov na tráviaci trakt súvisí aj s ich insekticídnymi vlastnosťami. Zistilo sa, že lektíny sú ďaleko viac toxické pre hmyz ako pre vyššie živočíchy. Je teda možné, že určité druhy úžitkových rastlín sú prirodzene rezistentné ku škodcom, pretože obsahujú lektín interagujúci s glykozylovými skupinami na povrchu buniek tráviaceho traktu u hmyzu. To vedie k inhibícii asimilácie potravy. Preto sú niektoré lektíny prirodzenými insekticídmi. S rozvojom genetického inžinierstva je dnes možné transferovať gény, ktoré podmieňujú tvorbu lektínov do určitých rastlín a zabezpečiť tak ochranu senzitivných úžitkových rastlín voči škodcom a to bez použitia neekologických insekticídov a pesticídov.²

Účinok lektínov na tráviaci trakt

Lektíny reagujú s povrchom epitelu tráviaceho traktu. Ak sú konzumované vo veľkých množstvách, môžu mať antinutritívny efekt - bránia absorpcii živín, akými sú sacharidy, lipidy a aminokyseliny, ako aj kovové ióny. Príčinou je zmena črevnej permeability, prípadne vyvolávajú alergie či iné subklinické príznaky. V štúdiách však bolo zistené, že perorálne podávanie malých dávok lektínov môže mať dokonca pozitívny vplyv na trávenie, vstrebávanie živín, imunitný systém a bakteriálnu flóru. Je to v dôsledku modulácie sekrécie črevných hormónov, niektoré lektíny vplyvajú na endokrinný systém, čo je prospešné aj pre celkový metabolizmus.^{2, 74}

- **Interakcie lektínov s črevom**

Proteíny v potrave sú rýchlo enzymaticky degradované počas pasáže v tenkom čreve. Zvyšok nestrávenej hmoty je potom rozkladaný baktériami v hrubom čreve. Oproti tomu, lektíny odolávajú degradácii v tenkom čreve a sú taktiež rezistentné k väčšine črevných baktérií. Preto väčšina lektínov ostáva po črevnej pasáži vo forme, ktorá je imunologicky

a funkčne neporušená. Tak ako majú hormóny a rastové faktory zvýšenú stabilitu, pretože sú viazané na receptor, aj lektíny sú takto chránené pred proteolytickým odbúraním. Výnimkou je GNA, ktorý sa síce po orálnom podaní neviaže na povrch črevnej steny, no jeho rezistencia je zrejme daná molekulárnou štruktúrou. Stabilita rastlinných lektínov v žalúdku je evidentná. Con A, PHA alebo WGA boli intragastricky podané potkanom. 50 až 90% lektínov bolo získaných späť, po 1 hodine v žalúdku, pomocou fosfátového pufru s vhodným špecifickým sacharidom. Ďalšie lektíny, ako SBA a lektín z druhu *Lycopersicon esculentum*, boli získané v menšom množstve.

Najčastejšie je z hľadiska väzby lektínov študované tenké črevo, no môžu sa viazať v akejkoľvek časti gastrointestinálneho traktu - od ústnej dutiny až po distálny kolon. Povrchová glykozylácia sa v jednotlivých funkčných častiach čreva líši. Ak napríklad určitá glykosylová skupina nie je prítomná v tenkom čreve, ale hlavne na povrchu epitelu hrubého čreva, lektín sa bude špecificky viazať na stenu kolon. Vhodne vybraným lektínom je možné selektívne zasiahnuť do metabolizmu v rôznych častiach čreva.

- **Sacharidové štruktúry prítomné na povrchu čreva**

Povrch črevného epitelu obsahuje značné množstvo sacharidových štruktúr, pretože väčšina membránových proteínov, vrátane receptorov pre hormóny a rastové faktory, transportných proteínov a enzýmov, je pred začlenením do membrány kartáčového lemu glykozylovaná. Takisto membránové lipidy a gangliozidy sú glykozylované a všetok sekretovaný mucín je v podstate zložený z glykoproteínov bohatých na sacharidy. Z toho plynie, že škála potenciálnych interakcií lektín-črevo je široká. Aby však k interakcii došlo, je potrebná prítomnosť tej správnej sacharidovej štruktúry na povrchu črevnej mukózy. Napriek masívnej glykozylácii alimentárneho traktu, nie všetky lektíny reagujú s povrchom epitelu, a tie ktoré reagujú majú rozličnú schopnosť rozoznávať a viazať sa k špecifickým typom receptorov. Navyše štruktúra glykozylového postranného reťazca závisí na mnohých faktoroch, a to aj v rámci jedného živočíšneho druhu. Sú to napr.: vek, krvná skupina, genetické faktory, typ mukózných buniek a stav ich diferenciácie/maturácie.

Intestinálny epitel sa vyznačuje schopnosťou rýchlej bunkovej obnovy, čo umožňuje pohotovo reagovať na zmeny v prijímanej strave. Mapovanie väzbových miest pre lektíny a určenie väzbovej kapacity poskytuje užitočné informácie o funkčnom stave čriev.

- **Zmeny v bunkovom metabolizme vyvolané lektínmi**

Keďže receptory na povrchu bunkových membrán sú glykozylované, lektíny môžu napodobniť efekt endogénnych rastových faktorov, hormónov a cytokínov vo všetkých typoch buniek. Receptorové proteíny sú obvykle zložené z podjednotiek. Signálne molekuly sa viažu na povrch podjednotky exponovanej na vonkajšej strane membrány a sú glykozylované. Ďalšie podjednotky preklenujú membránu a zodpovedajú za prenos signálu a aktiváciu systému druhého posla. Sacharidové štruktúry sa môžu nachádzať na aktívnom centre receptrou alebo blízko neho. Aj keď väzbové miesto lektínu (glykozylový postranný reťazec) nie je funkčným väzbovým miestom receptoru, výsledná konformačná zmena receptorových podjednotiek v membráne a nasledujúca transdukcia signálu je podobná bez ohľadu na to, či bola vyvolaná fyziologickým ligandom alebo lektínom. V tomto prípade môže lektín napodobniť efekt prirodzeného ligandu a indukovať tak podobné fyziologické reakcie. Ďalšou možnosťou je, že naviazaný lektín nespôsobí konformačnú zmenu, ale blokovaním aktívneho miesta receptoru oslabuje alebo kompletne bráni fyziologickému efektu prirodzeného ligandu. Do tejto kategórie patria tzv. antimitogénne lektíny. Nakoniec, väzba lektínu na externú receptorovú podjednotku môže aditívne alebo synergicky zosilíť efekt prirodzeného ligandu.⁷³

- **Interakcie s membránou kartáčového lemu**

Aby sa prejavila biologická aktivita lektínu, sacharidová štruktúra pre ktorú je daný lektín špecifický musí byť prítomná na povrchu čreva. K interakcii dochádza mechanizmom kľúč-zámok. Lektín môže priamo vstúpiť do bunky endocytózou, alebo prenášať informácie prostredníctvom druhých poslov.

Rozpoznávanie receptoru lektínom je okamžité. Sila väzby závisí na asociačnej konštante medzi lektínom a glykozylovou skupinou a na množstve neobsadených receptorových miest. V prítomnosti veľkého počtu sacharidových štruktúr sa bude lektín rozsiahať viazať a tvoriť medzi nimi skrížené väzby.

Lektíny ktoré sa mohutne viažu k membráne kartáčového lemu sú potenciálnymi črevnými rastovými faktormi, pričom miera účinku súvisí najmä so silou a intenzitou ich väzby. Napríklad PHA je jedným z najsilnejšie sa viažúcich lektínov a teda aj silným potenciálnym črevným rastovým faktorom.^{73, 74}

- **Väzba lektínov v žalúdku a črevách a ich endocytóza**

Štúdie na modelových systémoch ukázali, že reakcia medzi väčšinou lektínov a ich ligandami je prerušená pri pH 3 a menej, no lektíny sa zrejme viažu k žalúdočnému epitelu *in vivo* aj napriek takémuto kyslému lumenálnemu pH. Týmto možno čiastočne vysvetliť, prečo prítomnosť lektínov v potrave spomaľuje vyprázdňovanie žalúdka u potkanov.

Viazanie lektínov a ich endocytóza enterocytmi môže nastať v celom čreve, aj keď endocytóza v tenkom čreve je zjavná iba v prítomnosti veľkého množstva komenzálnych baktérií. Endocytóza lektínov je teda mohutnejšia v kolon, kde je aj väčšie množstvo baktérií. Preto sa lektíny využívajú pri targetingu liečiv do epitelu kolon.

- **Vplyv lektínov na črevnú mikroflóru**

1. Lektíny môžu priamo reagovať s baktériami tráviaceho traktu a aglutinovať ich. Pozmeňujú tým bakteriálnu črevnú mikroflóru. Lektíny majú aj schopnosť urýchliť obnovu epitelálnych buniek, taktiež môžu pozmeniť glykozyláciu receptorov. Týmto spôsobom interferujú s adhéziou baktérií na povrch kartáčového lemu tenkého čreva.

2. Lektíny indukujú nárast počtu koliformných baktérií v tenkom čreve.

3. GNA a prípadne ďalšie netoxické lektíny sú vysoko efektívne v inhibícii nárastu počtu *E.coli* v tenkom čreve potkanov. Podmienkou je, aby sacharidová špecifita lektínu bola komplementárna s bakteriálnym adhezínom. Netoxické lektíny by tak v určitom zmysle mohli nahradiť antibiotiká, môžu byť podávané priamo v potrave a predstavujú tak prirodzenú ochranu pred bakteriálnymi infekciami.⁷³

Systemové účinky lektínov

Lektíny ovplyvňujú celkový metabolizmus dvomi odlišnými, ale simultánnymi cestami. Nepriamo vplývajú na endokrinný systém, pretože sa viažu na neuroendokrinné bunky čreva a stimulujú sekréciu črevných peptidických hormónov, ktoré sa potom dostávajú do systémového obehu. Prípadne môžu lektíny prejsť z črevnej steny do systémovej cirkulácie a priamo pôsobiť na periférne tkanivá tým, že napodobňujú účinok endokrinných hormónov. Najčastejšie zasahovanými orgánmi sú pankreas, kostrové svaly, pečeň, obličky a týmus.

- **Vplyv na pankreas**

Väčšina potravných lektínov spôsobuje trofické zmeny exokrinného pankreasu, paralelne s trofiou tenkého čreva. Najznámejším príkladom je PHA, ktorý je rastovým

faktorom pre črevo aj pankreas. Trofický efekt na pankreas je sprostredkovaný cholecystokinínom – črevným peptidickým hormónom, ktorý je uvoľňovaný pôsobením PHA z duodenálnych enteroendokrinných buniek. Mechanizmus rastu pankreasu súvisí s metabolizmom polyamínov v tomto tkanive. Sekrécia tráviacich enzýmov pankreasu je pri chronickej pankreatitíde vážne redukovaná, podávanie malých dávok netoxických lektínov by mohlo byť využité v klinickej praxi. Po podaní PHA potkanom, sa účinkom lektínu zdvojnásobila bunková proliferácia v žalúdku a tenkom čreve, no mal nízky efekt na midkolon. PNA preukázal výraznejší efekt na proximálny kolon, kde zvýšil proliferáciu o 166%. PHA a PNA značne stimulovali produkciu žalúdočných hormónov - gastrínu, cholecystokinínu a enteroglukagónu.^{73, 75}

- **Ovplyvnenie hormonálnych hladín**

Prevažná časť efektu lektínov na systémový metabolizmus je vyvolaná zmenami v hladine inzulínu. PHA zasahuje endokrinný pankreas a interferuje so sekréciou inzulínu, zatiaľ čo napr. SBA ovplyvňuje iba exokrinný pankreas a teda na hladinu inzulínu nevplýva. PHA spôsobuje pokles hladiny krvného inzulínu, no kompenzuje to aktiváciou ďalších homeostatických procesov, akými sú zmeny hormonálnych hladín glukagónu a glukokortikoidov. Je teda jasné, že PHA nemoduluje iba hladiny inzulínu, ale je schopný indukovať komplexné zmeny v hormonálnej bilancii organizmu.

Je všeobecne známe že proteíny z čeľade Fabaceae sú prospešné zdraviu, pretože znižujú koncentráciu plazmatických a telesných lipidov. Aj keď nie je úplne jasné či sú za to zodpovedné práve lektíny, je isté že PHA a iné lektíny sú silné lipolytické agens.

- **Kostrové svalstvo**

PHA napodobňuje biologické efekty inzulínu. Viaže sa na inzulínové receptory svalových buniek, ale nestimuluje syntézu proteínov ako inzulín. Pri perorálnom podávaní vysokých dávok PHA (nad 0,5 g na kg telesnej hmotnosti) u potkanov, v priebehu 10 dní, došlo k strate asi 30% kostrového svalstva. Svalová atrofia je následkom absencie stimulačného efektu inzulínu na syntézu svalových proteínov, pretože receptory pre inzulín sú blokované PHA. Napriek tomu strata svalovej hmoty nie je zas tak mohutná, pretože up-regulácia mRNA inzulínového receptora a inzulín-senzitívneho glukózového transportéru prostredníctvom PHA zvyšuje efektívnosť interakcií medzi inzulínom a receptorom. Napriek týmto kompenzačným mechanizmom, veľké množstvo živín a polyamínov je uvoľnené z atrofovaných svalov a použité k podpore trofických zmien čreva.

- **Týmus a slezina**

Pri vysokých dávkach antinutričných lektínov, podliehajú atrofickým zmenám aj týmus a slezina. Niektoré z nich sú irreverzibilné s vážnymi následkami pre imunitný systém, najmä pre imunitné odpovede sprostredkované T bunkami.

- **Srdce, pečeň, obličky**

Podobne ako kostrové svaly, môžu lektíny poškodiť aj srdce, pretože redukujú proteosyntézu a tým aj jeho hmotnosť. Po desiatich dňoch perorálneho podávania PHA došlo k miernemu poklesu hmotnosti pečene kvôli strate lipidov a glykogénu. Obličky sa mierne zväčšili. Aj keď boli tieto efekty pozorované u zvierat, je pravdepodobné že výsledky možno aplikovať aj na človeka.^{73, 74}

6.2 Lektíny zo skupiny RIPs, typ II

Abrín, ricín, viskumín, modeksín a volkensín sú značne toxické rastlinné glykoproteíny. Ich chemická štruktúra a mechanizmus toxicity sú podobné. Tieto fytotoxíny patria medzi proteíny schopné inaktivovať ribozómy (tzv. ribosome inactivating proteins, RIPs typ 2). Pozostávajú z dvoch polypeptidových reťazcov, spojených disulfidickou väzbou. Reťazec A zodpovedá za vlastnú toxicitu a vykazuje enzymatickú aktivitu. B reťazec zasa zohráva úlohu pri naviazaní sa na povrchové sacharidy cieľovej bunky a zabezpečuje tak vniknutie toxínu do bunky. Následne dochádza k blokovaniu proteosyntézy. Extrémna toxicita týchto lektínov v sebe skrýva aj riziko zneužitia.^{76, 84}

RIPs boli identifikované v mnohých druhoch rastlín. Niektoré z nich sú výrazne toxické, avšak iba v spojení s B reťazcom. A reťazec je aktívny až po vstupe do bunky.⁸⁴

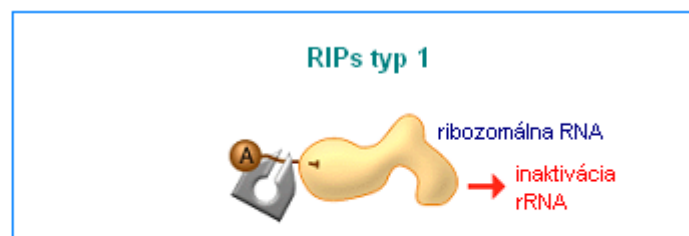
Proteíny inaktivujúce ribozómy (RIPs, ribosome-inactivating proteins)

RIPs sú toxické N-glykozidázy, ktoré depurínujú ribozomálnu RNA a tým blokujú syntézu proteínov. Sú bohato zastúpené medzi rastlinami, nachádzajú sa v rôznych rastlinných pletivách. U rastlín zohrávajú úlohu najmä pri obrane voči vírusom, patogénnym hubám a hmyzu. Antivirálna aktivita im bola pripisovaná už v roku 1925, na základe výskumu extraktov z druhu *Phytolacca americana* (Phytolaccaceae), aj keď presný mechanizmus bol neznámy.⁷⁸

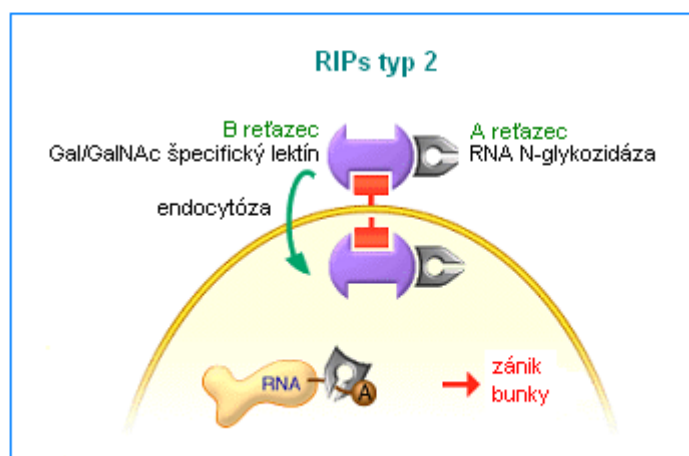
RIPs sa na základe fyzikálnych vlastností klasifikujú do troch skupín.

- RIPs typ 1 tvorí najpočetnejšiu skupinu. Patria sem napr. proteíny z druhov *Phytolacca americana* (PAP), *Saponaria officinalis* (saporín), či *Hordeum vulgare*. Sú to monomerické enzýmy s molekulovou hmotnosťou 30 kDa, ktoré inhibujú transláciu. Aj napriek tomu, že majú schopnosť inaktivovať ribozómy, nie sú cytotoxické, pretože neobsahujú časť, ktorá by im zabezpečila vstup do eukaryotických buniek.²¹
- RIPs typ 2, ako napr. ricín, sú výrazne toxické heterodimérne proteíny s enzymatickou a lektínovou aktivitou. Sú tvorené podjednotkami, každá s molekulovou hmotnosťou približne 30 kDa. Polypeptid s RIP-aktivitou (A reťazec) je spojený s B reťazcom viažúcim terminálnu galaktózu.⁷⁸
Toxíny patriace do tejto skupiny majú podobnú štruktúru a mechanizmus toxicity. Najpodrobnejšie popísaný je ricín, no podobnými vlastnosťami sa vyznačujú abrín, modeksín, volkensín a viskumín.⁷⁷
- RIPs typ 3 sú proteíny syntetizované ako inaktívne prekurzory (proRIPs), aktivitu získavajú až po proteolýze určitých častí peptidu. Sú zriedkavé, zatiaľ boli nájdené iba v kukurici a jačmeni.⁷⁸

RIPs typ 1 (🔪),
toxická podjednotka s RNA
N-glykozidázovou aktivitou



RIPs typ 2 pozostáva z dvoch
reťazcov:
- toxický reťazec A (🔪)
- Gal/GalNAc-špecifický
reťazec B (👉)



Obrázok 2. Schématická štruktúra a mechanizmus toxicity proteínov inaktivujúcich ribozómy (RIPs) typu 1 a 2⁷⁹

Ricín

Ricín bol objavený Stillmarkom v roku 1888, ako prvý rastlinný lektín, v semenách druhu *Ricinus communis* (Euphorbiaceae). Existuje niekoľko izoforiem ricínu - ricín D, ricín E a RCA. Spolu tvoria viac než 5% celkového množstva proteínov v zrelých semenách. Ricín je heterodimér, radí sa medzi proteíny, ktoré sú schopné inaktivovať ribozómy (RIPs typ 2). Pozostáva z reťazca A (RTA, 32 kDa) a reťazca B (RTB, 34 kDa). RCA je tetramér, zložený z dvoch heterodimérov podobných ricínu. Každý heterodimér obsahuje A reťazec (32 kDa) a B reťazec (36 kDa). Ricín a RCA sa líšia jednak štruktúrne ale aj biologickou aktivitou. Zatiaľ čo ricín je silný cytotoxín, ale slabý hemaglutinín, u málo toxického RCA zas prevláda hemaglutinačná aktivita. ^{21, 76}



Obrázok 3. Semená druhu *Ricinus communis* ⁸⁰

Toxicita ricínu

Toxicita ricínových fazulí je známa už od staroveku. U človeka bolo popísaných viac než 750 prípadov intoxikácie. Pri inhalácii alebo injekčnom podaní sa letálna dávka ricínu u človeka odhaduje na 1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ telesnej hmotnosti. ⁸¹

1-3 semená môžu byť smrteľné pre dieťa, 2-4 vyvolajú u dospelého jedinca otravu, 8 semien už môže byť fatálnych. ⁸²

Letálne dávky ricínu na kilogram telesnej váhy sú variabilné pre rôzne druhy domácich a laboratórnych zvierat. Z testovaných zvierat sú najmenej senzitívne žaba a kura, zatiaľ čo u koňa bola pozorovaná najvyššia citlivosť. Toxicita je taktiež variabilná v závislosti na ceste podania. U laboratórnych myší je približná dávka letálna pre 50% exponovanej populácie (LD_{50}) nasledovná:

Tabuľka 4. LD₅₀ ricínu u myši, v závislosti na ceste podania ⁷⁶

LD ₅₀ (µg/kg)	doba za ktorú nastane smrť (hod)	spôsob podania
3-5	60	inhalačne
5	90	intravenózne
22	100	intraperitoneálne
24	100	subkutánne
20 000	85	perorálne

Nízka perorálna toxicita signalizuje pomerne slabú absorpciu toxínu z gastrointestinálneho traktu. ⁷⁶

Mechanizmus toxicity

Ricín a jemu príbuzné rastlinné toxíny ako abrí, modeksín, volkensín a viskumín sú jedinou skupinou rastlinných lektínov u ktorej bol mechanizmus pôsobenia detailne popísaný. ⁸³

Ricín pozostáva z dvoch polypeptidových reťazcov, označovaných A a B, spojených disulfidickou väzbou. Patrí do skupiny proteínov inaktivujúcich ribozómy, ktoré depurujú adenosín v rRNA. Reťazec B hraje dôležitú úlohu vo väzbe na glykokonjugáty povrchu cieľových buniek a umožňuje translokáciu toxínu do cytosolu. Reťazec B je špecifický pre Gal a GalNAc. Reťazec A takéto väzbové miesta neobsahuje, vykazuje enzymatickú aktivitu a zodpovedá za toxicitu molekuly. Aby sa však toxicita prejavila, musí sa B reťazec naviazať na povrch bunky a následne sa toxín dostane do bunky. Reťazec A interferuje s prolongáciou peptidového reťazca na polyribozómoch, tým že štiepi N-glykozidickú väzbu medzi adenínom a ribózou v špecifickej pozícii (A4324) na ribozomálnej podjednotke 28S. Tak dochádza k inaktivácii ribozómu a teda aj k narušeniu proteosyntézy. Jedna molekula ricínu dokáže inaktivovať približne 2000 ribozómov, čo vysvetľuje, prečo je táto substancia tak toxická. Jediná molekula v sebe skrýva potenciál zabiť bunku. ^{7, 76}

Symptómy

Symptómy intoxikácie sú u všetkých RIPs veľmi podobné, vzhľadom na to, že mechanizmus toxicity je takmer identický. Najviac preskúmaná je toxicita ricínu. Klinický obraz, symptómy a patologické prejavy u intoxikovaných osôb závisia na spôsobe expozície. Toxický efekt sa prejaví po 2-24 h. Ricín inhalovaný vo forme aerosolu vyvoláva symptómy v priebehu 8 hodín. Respiračné ťažkosti, horúčka, kašeľ, dyspnoe, nauzea a bolesti na hrudi sú

nasledované návalmi potu, rozvojom pľúcneho edému, cyanózou, poklesom krvného tlaku a na záver zlyhaním dýchacieho a cirkulačného systému. Doba od podania k nástupu smrti kolíše v rozmedzí 36-72 hodín, v závislosti na veľkosti dávky. Po požití dochádza k bolestiam brucha, zvracaniu a často krvavej hnačke. V gastrointestinálnom trakte vyvoláva ricín krvácanie, nasleduje nekróza pečene, sleziny a obličiek. Intramuskulárna intoxikácia spôsobuje silnú lokalizovanú bolesť, nekrózu svalov a regionálnych lymfatických uzlín. Parenterálne aplikovaný ricín je asi dvakrát toxickejší než kobrí jed a je to pravdepodobne najtoxickejšia rastlinná látka, pokiaľ ide o parenterálnu aplikáciu. Ricín vyvoláva prechodnú leukocytózu, či už je podaný injekčne alebo orálne. Počet leukocytov presahuje fyziologické hodnoty 2-5 krát.

V priebehu niekoľkých dní dôjde k silnej dehydratácii, hrozí nebezpečenstvo smrti z hypovolemického šoku. Pred smrťou dochádza k poklesu telesnej teploty a k charakteristickej triaške. Postihnutý zomiera často v krčoch. Deti sú citlivejšie než dospelí, kvôli zvracaniu a hnačke sa rýchlo a masívne dehydratujú, čo má fatálne dôsledky. Pokiaľ smrť u obete intoxikácie nenastane do 3-5 dní, zvyčajne to znamená zotavenie.^{76, 84}

Lektíny patriace do skupiny RIPs typ 2 (abrin, ricín, viskumín, modeksín a volkensín) sú extrémne toxické pre všetky teplokrvné živočíchy, vrátane človeka a sú to potenciálne biologické zbrane. Najmä ricín je v poslednej dobe kvôli svojej dostupnosti nástrojom teroristických útokov.

Neexistuje žiadny protijed a zatiaľ ani vakcína. Ak dôjde k inhalácii ricínu, je možné podať kyslík, lieky tlmiace zápal a lieky stimulujúce srdce a obehový systém. Pri p.o. intoxikácii je možný výplach žalúdka a doplnenie telesných tekutín. Je otázne, či sú tieto opatrenia život zachraňujúce. Takisto neexistuje žiadna špecifická liečba pri i.v. intoxikácii ricínom. Je potreba zabrániť orgánovému zlyhaniu.

Na druhej strane, RIPs predstavujú nástroj v boji proti rakovine. Sľubné výsledky boli dosiahnuté napr. s rekombinantným viskumínom.⁸⁴

Využitie ricínu vo forme imunotoxínu

Cytotoxický potenciál RIPs je pre vedcov výzvou k použitiu týchto látok v terapii rakoviny. Najmä v nemecky hovoriacich krajinách sú prírodné extrakty z imela (*Viscum album*) široko využívané ako alternatívna doplnková terapia.⁸⁴

Aj cytotoxicita ricínu sa dá využiť pri liečbe rakoviny, pričom toxín je naviazaný na monoklonálnu protilátku, ktorá špecificky zasahuje nádorové bunky. Takto vytvorený

imunotoxín má obmedzené použitie, pretože často vyvoláva poškodenie endoteliálnych buniek, ktoré spôsobí hromadenie krvi v pľúcach, svaloch, mozgu a iných tkanivách (tzv. vascular leak syndrome, VLS). VLS je charakterizovaný vzostupom vaskulárnej permeability, ktorá vedie k poškodeniu orgánov. Kľúčovú úlohu zohráva zoskupenie troch aminokyselín, ktoré napádajú a ničia cievne endoteliálne bunky.⁸⁵

Skupina vedcov (Vitetta et al.) však zistila, že jediná bodová mutácia v ricíne môže toto nebezpečenstvo eliminovať, pričom žiaduca cytotoxicita ostáva zachovaná. Naviac sa im podarilo zostrojiť imunotoxín, ktorý je u myší tolerovaný vo vysokých dávkach a tým má zosilnenú protinádorovú aktivitu.⁸⁶

Imunizácia

Ricín je toxín vyskytujúci sa v prírode vo veľkom množstve. Je to súčasť vedľajšieho produktu pri výrobe ricínového oleja, izolácia je jednoduchá, lacná a je to zároveň látka s vysokou stabilitou. Ricín je potenciálnou biologickou zbraňou s extrémnou toxicitou.⁸⁷

Štúdie na zvieratách ukázali, že aktívna imunizácia i pasívna profylaxia sú značne efektívne proti intravenóznejšej či intraperitoneálnej intoxikácii ricínom. Inhalačnej expozícii ricínu je najlepšie čeliť aktívnou imunizáciou alebo profylaktickým podávaním aerosolu so špecifickými protilátkami proti ricínu.⁷⁶

Zatiaľ neexistuje registrovaná vakcína proti ricínu. Pre ribozómy je toxický reťazec A (RTA). Podarilo sa identifikovať sekvenciu troch aminokyselín v polohe 74-76 (leucín-aspartát-valín, LDV), ktorá je zodpovedná za apoptózu endoteliálnych buniek a teda spôsobuje VLS. Vedci vyvinuli rekombinantnú RTA vakcínu, v ktorej boli geneticky upravené dve aminokyseliny. Ich substitúciou sa dosiahla inaktivácia dvoch častí reťazca, ktoré zodpovedajú za ribotoxicitu (Y80A) a za VLS (V76M). Tento mutovaný rekombinantný proteín Y80A/V76M, tiež pomenovaný RiVax, si zachováva imunodominantné epitopy rozoznávané monoklonálnymi protilátkami. RiVax bol následne produkovaný pomocou expresie v *E. coli*. RiVax bol i.m. podaný myšiam a ochránil ich pred vysokou dávkou ($10 \times LD_{50}$) ricínu. Preklinické štúdie na myšiach a králikoch preukázali bezpečnosť vakcíny. V pilotnej klinickej štúdii bola trom skupinám dobrovoľníkov i.m. podaná vakcína, každému tri rovnaké dávky v mesačných intervaloch. Individuálne dávky boli 10, 33 a 100 μg . Pri dávke 10 μg došlo k vytvoreniu protilátok neutralizujúcich ricín (anti-RTA Ab) u jedného z piatich dobrovoľníkov, pri dávke 33 μg u štyroch z piatich a pri dávke 100 μg u všetkých piatich. Boli pozorované iba mierne nežiadúce účinky, ako bolestivosť v mieste vpichu a bolesti hlavy. Vakcína preukázala bezpečnosť a efektívnosť aj u ľudí. Je však potrebný jej

ďalší vývoj, stanovenie dávkovacieho režimu a taktiež formulácia prípravku. Vakcína by sa mohla objaviť na trhu v priebehu piatich rokov.⁸⁷

Abrín

Je to nebezpečný toxín získaný zo semien rastliny *Abrus precatorius* (Fabaceae). Existuje v dvoch formách, abrínu-a a abrínu-b. Obe sú dvojreťazcové. Disulfidická väzba medzi Cys247 v reťazci A a Cys8 v reťazci B spája oba reťazce dohromady. Reťazec A pozostáva z 251 aminokyselinových zvyškov, ktoré su rozdelené do 3 domén. Reťazec A katalyticky inaktivuje 28S ribozomálnu podjednotku a tým inhibuje proteosyntézu. Reťazec B vykazuje špecifitu pre galaktózu, čím umožňuje väzbu abrínu na bunkovú membránu. Reťazec B oboch foriem abrínu je tvorený 268 aminokyselinovými zvyškami, z toho 256 zvyškov majú obe formy identické.⁷⁶

Porovnávanie B reťazcov abrínu a ricínu preukázalo identitu v 60%. Mechanizmus toxicity abrínu je takmer totožný s ricínom, no miera toxicity je odlišná. Abrín je napríklad u myši 75 krát toxickejší než ricín (0.04 µg/kg abrínu v porovnaní s 3 µg/kg ricínu.) Oba lektíny sú do značnej miery molekulárne podobné. Reťazce A abrínu a ricínu obsahujú homologický úsek zložený zo 102 aminokyselín. Recipročným spôsobom je možné vytvoriť hybridné toxíny medzi A a B reťazcom abrínu a ricínu. Odhadovaná letálna dávka abrínu pre človeka je 0,1-1 µg/kg. Izolácia abrínu je pomerne nenáročná. Riziko zneužitia ako biologickej zbrane je však nižšie ako u ricínu, pretože *Abrus precatorius* nie je pestovaný v takých kvantitách ako *Ricinus communis*, využívaný na výrobu ricínového oleja.^{76, 88}

V koncentrácii 0,8 µg/ml abrínu-a aglutinuje ľudské erytrocyty skupiny 0. Akútna intoxikácia sa najprv prejavuje podráždením GITu, do 3 dní po požití sa objaví zvracanie a krvavé hnačky. V dôsledku elektrolytovej nerovnováhy vznikajú srdečné arytmie a edém mozgu. Ten je sprevádzaný ospalosťou, kŕčami, kómou a kardiovaskulárnym kolapsom. Ďalšie symptómy môžu zahŕňovať difúznú hemoragiu, hemolytickú anémiu, oligúriu, urémiu a v dôsledku srdečného zlyhania až smrť. Abrín môže byť príčinou kontaktnej dermatitídy, v ústnej dutine môže vyvolať vredy.³

Netoxická dávka abrínu (1,35 µg/kg) podávaná myšiam postupne po dobu 5 dní, stimulovala humorálny imunitný systém. Bol pozorovaný značný nárast celkového množstva leukocytov, zvýšila sa hmotnosť sleziny a týmusu, vzrástla hladina protilátok v organizme.⁸⁹

Abrín bo podávaný myšiam v subletálnej koncentrácii 7,5 µg/kg, každý druhý deň po dobu 10 dní. Obe cesty podania (i.p., priamo do léze) boli efektívne v redukcii nádorových buniek typu DLA (Dalton's Lymphoma Ascites) a typu EAC (Ehrlich's Ascites Carcinoma).

Línia DLA bola k abrínu citlivejšia. Abrín výrazne redukoval objem tumoru. Profylaktické podávanie abrínu sa však ukázalo ako neefektívne.⁹⁰

Pri výskumoch na slimákoch druhu *Lymnaea acuminata* bol skúmaný efekt 40% a 80% 24h LC₅₀ abrínu. Došlo k výraznému poklesu proteínov, voľných aminokyselín, DNA a RNA v nervovom systéme. Abrín tiež spôsobil zníženie hladiny fosfolipidov a súčasne vzrástla peroxidácia lipidov v nervovom systéme.⁹¹

Viskumín

Viskumín (ML-I) bol identifikovaný koncom 80. rokov 20. storočia ako hlavná farmakologicky aktívna súčasť extraktu z druhu *Viscum album* (Viscaceae).⁹²

Rastlina obsahuje celkom tri typy lektínov. ML-I (viskumín) je najviac zastúpený, nasleduje ML-III a ML-II. Sú to glykoproteíny špecifické pre D-galaktózu (ML-I), pre N-acetylgalaktozamín (ML-III) alebo pre oba cukry (ML-II). V rastline sa nachádzajú aj ďalšie proteíny, tzv. viskotoxíny.^{93, 94}

ML-I existuje ako nekovalentne spojený dimér, zatiaľ čo ML-II a ML-III sú monoméry. A reťazec viskumínu je proteín tvorený 252 aminokyselinami a má molekulovú hmotnosť 30 kDa. B reťazec má dve globulárne domény, 263 aminokyselín a molekulovú hmotnosť 35 kDa. Reťazce sú spojené disulfidickou väzbou medzi Cys247 reťazca A a Cys5 B reťazca.⁹³

Štruktúra, spôsob penetrácie do bunky a mechanizmus účinku viskumínu sú podobné s ricínom. Toxicita je takisto porovnateľná (100 µg/kg u potkana pri i.p. podaní).^{93, 94}

Lektíny z imela sú obzvlášť cytotoxické (pri koncentrácii 1-3 ng/ml inhibujú u človeka bunky leukémie), boli zaznamenané aj imunostimulačné účinky. Viskotoxíny sú tiež cytotoxické, ale v značne menšej miere. Majú cytolytický efekt. V roku 1996 bol na malom množstve pacientov prevedený výskum, pri ktorom sa zistilo, že produkt s určitým množstvom ML-I mal u pacientov pozitívne ovplyvniť kvalitu života, aj keď nezamedzil rozvoju tumoru. Iní autori u pacientov taktiež pozorovali zvýšenie kvality života a nárast hladiny β-endorfínov.⁹⁴

Mnohé *in vitro* štúdie preukázali, že inkubácia rôznych tumorových bunkových línií spolu s lektínmi imela má za následok apoptózu buniek. Jedným z prvých pozorovaných efektov je perforácia bunkovej membrány. Lektíny spôsobujú, že sa nádorové bunky stávajú citlivejšími k indukcii apoptózy vyvolanej TNFα. U ML-I bolo pozorované že potencuje efekt chemoterapeutik. Taktiež mnohé *in vivo* pokusy demonštrovali, že lektíny z imela vyvolávajú supresiu rastu tumoru. Lektíny boli podávané pokusným zvieratám lokálne do tumoru, systémovo, subkutánne, alebo orálnou cestou v potrave. V mnohých prípadoch bola

pozorovaná apoptóza a boli zaznamenané aj prípady u ktorých došlo kompletne k ablácii tumoru. Vytvorila sa hypotéza že antikancerogénna účinnosť tumor nekrotizujúceho faktora alfa (TNF α) je potencovaná lektínmi oboch druhov imela - európskeho i kórejského typu.⁹⁵

Modeksín

Je to lektín pochádzajúci z koreňov africkej sukulentnej rastliny *Adenia digitata* z čeľade Passifloraceae. Existuje v dvoch formách, ako modeksín 4B a 6B (čistený afinitnou chromatografiou na nosiči Sepharose 4B, 6B). Modeksín 4B tvoria dve podjednotky – A (26 kDa) a B (31 kDa). Modeksín 6B má tiež dve podjednotky, na rozdiel od modeksínu 4B neaglutinuje erytrocyty.⁸⁴

Volkensín

Pochádza z druhu *Adenia volkensis* (Passifloraceae). Toxicita a mechanizmus sú porovnateľné s ricínom. Využíva sa hlavne v neurológii, pretože je vychytávaný a transportovaný určitými typmi nervových buniek.⁸⁴

Volkensín a ricín vykazujú vysokú mieru sekvenčnej identity. Aktívne miesto na A reťazci ricínu obsahuje aminokyseliny (napr. Ser203), ktoré sú v rovnakých pozíciách aj u ďalších RIPs. Časť B reťazca, ktorá zodpovedá za väzbu sacharidu sa u volkensínu a ricínu tiež zhoduje.⁹⁶

Jeho molekulová hmotnosť je 62 kDa. Obsahuje 6,74% neutrálnych sacharidov. Akútna 48-hodinová LD₅₀ je pre potkana (i.p.) 320 μ g/kg, u myši 1,73 mg/kg. 14-denná LD₅₀ je 61 μ g/kg pre potkana a 1,38 mg/kg pre myš. Volkensín je silný inhibítor proteínovej syntézy v eukaryotických bunkách a aglutinuje ľudské erytrocyty, avšak bez špecifity ku krvnej skupine. Prejavy intoxikácie sú podobné ako u ricínu.³

6.3. Biologická aktivita ďalších vybraných rastlinných lektínov

Konkanavalín A

Konkanavalín A (Con A) pochádza z rastliny *Canavalia ensiformis* (Fabaceae) a systematicky bol prvýkrát študovaný v r. 1916. Z rastliny bol izolovaný proteín nazývaný kanavalín. Boli získané dve frakcie – konkanavalín A, rozpustný vo vode a interagujúci s glukózou a manózou a konkanavalín B, rozpustný iba v koncentrovanom roztoku soli.

Pretože u Con A sa pôvodne preukázala schopnosť aglutinácie, bol pôvodne označovaný aj ako hemaglutinín.

Proteín obsahuje štyri identické protoméry, ktoré sú viazané polárnymi väzbami, vodíkovými mostíkmi a elektrostatickými interakciami. Monomerické jednotky majú molekulovú hmotnosť približne 27 kDa. Medzi pH 2 až 5,5 existuje Con A ako dimér, nad pH 5,5 prevláda tetramér. Con A bol prvým lektínom u ktorého bola popísaná chemická a priestorová štruktúra.

Con A vyvoláva na bunkových kultúrach a u zvierat radu biologických efektov, zahrňujúcich mitogézu, cytotoxicitu, hepatotoxicitu a teratogenitu. Lektín stimuluje syntézu DNA, je to tiež imunostimulant. Existujú jasné dôkazy o jeho patologickom pôsobení na živočíšne bunky. Miera toxicity je samozrejme závislá na dávke a ceste podania. Najmenej toxická je subkutánná a intraperitoneálna aplikácia.

***In vitro* efekty Con A**

Mitogenicita

Con A indukuje mitogézu v T bunkách. Takisto sa viaže na glykoproteíny a glykolipidy mnohých bunkových typov vrátane leukocytov, keratinocytov a hepatocytov. Con A priamo stimuluje syntézu DNA v B bunkách. Zaujímavé je, že mitogenický efekt Con A na lymfocyty je závislý aj od veku buniek. U starších osôb je odpoveď na Con A menej výrazná, čo súvisí s menším množstvom buniek schopných mitogézy.

Cytotoxicita

Mnoho štúdií sa zaoberalo vplyvom Con A na viabilitu buniek v bunkových kultúrach lymfocytov. V prítomnosti 100 µg/ml sukcinylConA viac než 50% buniek myšacej sleziny ostalo životaschopných, zatiaľ čo pri použití natívneho lektínu to bolo iba 20%.

V štúdiách bolo zistené, že určité lektíny, vrátane ConA, dokážu indukovať aktiváciu T buniek a to interakciou s povrchovým CD3/Ti receptorovým komplexom. Aktivované T bunky sa takto stávajú efektorovými cytolytickými bunkami.

V literatúre sa však našli aj správy evidujúce anti-cytotoxický efekt konkanavalínu A. Tieto výsledky teda naznačujú, že mechanizmus cytotoxicity sprostredkovanej Con A zatiaľ nie je dokonale objasnený.

Hepatotoxicita

Con A pôsobil na kultivované hepatocyty toxicky pri koncentráciách vyšších než 25 µg/ml.

Teratogenita

Tetatozenita bola skúmaná na potkaních embryách. Potkanie embryá v 8. dni vývoja boli exponované konkanavalínu A o koncentráciách 12,5, 25, 50 a 100 µg/ml po dobu 72 hodín. Došlo k výraznému poklesu viability a zvýšenému výskytu morfológických abnormalít charakterizovaných defektami nervových vláken.

***In vivo* efekty Con A**

Výsledky toxikologických štúdií Con A indikujú, že stupeň toxického efektu Con A je závislý na dávke a spôsobe podania. Testy na myšiach a potkanoch ukázali, že pri i.p. a s.c. podaní dávok 5×10^{-2} mg/kg nespôsobil Con A smrť. Pri i.v. podaní dávky $2,2 \times 10^{-2}$ mg/kg došlo k úmrtiu 50% pokusných zvierat (LD50). V nižších dávkach ($0,9 \times 10^{-2}$ mg/kg) však k smrti nedošlo ani po i.v. podaní. Táto dávka vyvolala nekrozu pečene. Intradermálne podanie rovnakého množstva spôsobilo vznik hemoragií, stav pokožky sa znormalizoval po 6 dňoch.⁹⁷

Momordín

Momordín je lektín viažúci galaktózu. Bol získaný zo semien rastliny *Momordica charantia* z čeľade Cucurbitaceae. V čeľadi Cucurbitaceae boli lektíny izolované aj zo semien a koreňov druhu *Trichosanthes kirilowii*, z hl'úz *T. japonica*, zo semien *T. anguina*, plodov *Cucurbita pepo*, z druhov *C. maxima* a *C. argyrosperma*, z koreňov *C. ficifolia*.

Proteíny z čeľade Cucurbitaceae (α -momorcharín, β -momorcharín, momordín, trichosantín) patria do skupiny RIPs typ 1. Sú jednoreťazcové a majú oveľa nižšiu toxicitu než RIPs typ 2.

Momordín je asi v 26% štruktúrne podobný A reťazcom abrínu a ricínu a tiež trichosantínu a momorcharínu α i β . Jeho molekulová hmotnosť je 12,4 kDa a pozostáva z 3 podjednotiek. Vyznačuje sa silnou hemaglutinačnou aktivitou a má účinky podobné inzulínu (antipolytické a lipogenetické).⁹⁸

Kurcín

Zdrojom tohto proteínu sú *Jatropha curcas* a *J. natalensis* z čeľade Euphorbiaceae. Toxicita je podobná ako u ricínu, avšak má menšiu intenzitu.³

Medzi kurcínom a A reťazcom ricínu je homológia 54%. Kurcín vykazuje značný protirakovinový efekt, ktorého mechanizmus súvisí s N-glykozidázovou aktivitou.⁹⁹

Robín

Zdrojom je *Robinia pseudoacacia* z čeľade Fabaceae. Proteín (110 kDa) má mitogénne a hemaglutinačné vlastnosti, nevykazuje však špecifitu ku krvnej skupine. Jeho toxicita je spomedzi všetkých bežných lektínov najnižšia. Akútna intoxikácia sa prejavuje zvracaním, hnačkami, depresiami, bolestivými žalúdočnými kŕčami a pocitom chladu končatín.³

PHA

Pochádza z druhu *Phaseolus vulgaris* z čeľade Fabaceae. PHA (126 kDa) je zmesou piatich izolektínov. Má vysokú orálnu toxicitu pre človeka, prasatá, kurčatá a krysy. Viaže sa na bunky klkov črevného epitelu. Časť z naviazaných lektínov prechádza rýchlo do enterocytov a následne do krvného obehu. V priebehu 1 hodiny od dosiahnutia tenkého čreva sa aktívne lektíny objavujú v obehu. Čiastočne je PHA detoxikovaný pečeňou a obličkami. Nemetabolizovná časť spôsobuje radu porúch. U pokusných zvierat bola pozorovaná zástava rastu, pokles telesnej hmotnosti až úhyn. Príčinou je pravdepodobne zásah do humorálneho systému, klesá tvorba svalových bielkovín, no intenzita ich odbúrávania sa nemení. Ďalšími patologickými prejavmi sú hypertrofia tenkého čreva, poškodenie jeho epitelu, zníženie aktivity niektorých črevných enzýmov, hypertrofia pankreasu a pečene.³

7. Možnosti využitia lektínov

Lektíny majú široké využitie vo výskume, najmä pokiaľ je potrebná detekcia či identifikácia sacharidových štruktúr. Ich použitie má mnoho výhod, ako dostupnosť, značnú špecifitu a vysokú stabilitu. Dôležitý je aj fakt, že ich reakcie sú často reverzibilné, a to použitím jednoduchých sacharidov.

Špecifická interakcia lektínu s bunkou alebo nejakou substanciou je dôkazom prítomnosti sacharidovej štruktúry. Lektíny sa teda často využívajú k demonštrovaní toho, že membránové receptory pre určité hormóny, rastové faktory, neurotransmitery ale aj toxíny sú vlastne glykokonjugáty. Vďaka mnohým štúdiám s lektínmi dospeli vedci k zisteniu, že sacharidy hrajú významnú úlohu v bunkovom rozpoznávaní.

Okrem exogénnych lektínov, endogénne, membránovo viazané lektíny, nachádzajú perspektívu pri targetingu liečiv, enzýmov, nukleových kyselín, či génov do cieľových buniek. Zaujímavým príkladom tejto aplikácie je enzýmová substitučná terapia u pacientov trpiacich Gaucherovou chorobou, teda nedostatkom enzýmu β -glukocerebrozidázy.^{7, 100}

7.1. Využitie lektínov v oblasti výskumu

Metodológia

Okrem niekoľkých výnimiek (lektíny z druhov *Helix pomatia* a *Limulus flavus*) sa používajú rastlinné lektíny. Tam kde je žiadúca aglutinácia buniek (napríklad bunková separácia, určovanie krvných skupín) alebo mitogénna stimulácia, postačujú natívne lektíny. Vo väčšine prípadov, akými sú napr. detekcia glykokonjugátov v tkanivách, na povrchu buniek alebo bunkových organel, na tenkovrstvových chromatogramoch, geloch, či mikrotitračných doštičkách, sa používajú značené lektíny. Mnohé sú komerčne dostupné. Vo všetkých prípadoch sa prevádza kontrola špecifity reakcie pomocou inhibičných (alebo neinhibičných) sacharidov. Imobilizované lektíny kovalentne viazané k vhodným nosičom (napr. Sepharose), sú nevyhnutné pre afinitnú chromatografiu glykoproteínov, glykopeptidov a oligosacharidov.

Značené lektíny sa obyčajne pridávajú priamo ku skúšanému vzorku a následne sú detekované. Alternatívou je aj použitie nemodifikovaných lektínov, tie sa potom vizualizujú pomocou druhého reagens – to je napr. chrenová peroxidáza (horseradish peroxidase, HRP)

alebo značená anti–lektínová protilátka. V prípade peroxidázy, ktorá je glykoproteínom, dochádza k reakcii medzi sacharidovou časťou enzýmu a väzbovým miestom lektínu. Peroxidáza sa môže použiť len u lektínov, ktoré k jej súčastiam vykazujú špecifitu, ako je tomu v prípade konkanavalínu A.⁷

Predtým než sa lektíny začali používať v histochemii a cytochemii, existovali málo špecifické činidlá, ktoré detekovali cukry v bunkách a tkanivách. S lektínmi je však možné odhaliť špecifické sacharidové zbytky a sekvencie a získať informácie o lokalizácii a štruktúre glykokonjugátov. Preto sú lektíny stále viac využívané pri štúdiu membránových štruktúr, pri skúmaní mechanizmu glykozylácie intracelulárnych proteínov a zmien ktorými prechádzajú glykokonjugáty počas diferenciácie, rastu a vývoja. Zmeny v obsahu, distribúcii a prístupnosti celulárnych a extracelulárnych glykokonjugátoch často súvisia s patologickými procesmi. Potenciál lektínov spočíva aj v ich diagnostickom využití.^{7, 101}

Skúmanie bunkových povrchov a využitie v diagnostike

Lektíny sa používajú pri výskume bunkových povrchov, ale aj subcelulárnych organel živočíšnych buniek. Aj vďaka lektínom bolo demonštrované, že sacharidové štruktúry sú na cytoplazmatickej membráne rozmiestnené asymetricky. Taktiež prispeli k potvrdeniu fluidity biologických membrán.

Výskumy s celou škálou lektínov odhalili rozmanitú distribúciu glykokonjugátov v epiteliálnych bunkách kolon. V rámci jednotlivých častí hrubého čreva bola pozorovaná aj rôzna väzbovosť lektínov. Zatiaľ čo sa UEA-I a Gal–špecifický lektín z *Viscum album* selektívne viazali k proximálnemu kolon, DBL a SBA zasa primárne k jeho distálnej časti. Kvalitatívne a kvantitatívne zmeny vo väzbe lektínov boli pozorované u mnohých typov buniek a tkanív v procese delenia, maturácie a diferenciácie. Napr. receptory pre DBL boli selektívne exprimované na fetálnych tymocytoch myši, avšak nie u dospelých jedincov.

Nárast vo väzbovosti DBL a SBA bol prisudzovaný akútnemu zápalu intestinálnej mukózy, ktorý obyčajne sprevádza ulceratívnu kolitídu, Crohnovu chorobu ale aj apendicitídu. Pri ulceratívnej kolitíde vykazoval kolonálny epitel abnormálnu väzbovosť k PNA.^{7, 102}

Mnohé štúdie porovnávali mieru akou sa lektíny viažu k normálnym a malígnym bunkám. Tieto výskumy viedli k poznaniu štrukturálnych zmien, ktoré postihujú povrchové sacharidy buniek počas malígnej transformácie a ktoré vznikajú v procese vzniku metastáz.

Ukázalo sa, že lektínové receptory môžu výhodne slúžiť ako markery neoplastických buniek a tkanív a dajú sa teda použiť v diagnostike rozličných tumorov.⁷

Príkladom, hoci tento lektín nepochádza z rastlín, je HPA, lektín zo záhradného slimáka druhu *Helix pomatia*. Špecificky rozoznáva markery prítomné u mladých žien s rakovinou prsníka spojenou s vysokým potenciálom vzniku metastáz. Tento lektín je aj indikátorom adenokarcinómu pľúc.¹⁰³

Reaktivita s PNA môže byť nápomocná pri detekcii niektorých typov karcinómu u ľudí, hlavne pri rakovine prsníka a kolonu. K diagnostike rakoviny kolonu môže slúžiť aj lektín z rastliny *Vicia villosa*. Achatinin H, lektín pochádzajúci zo slimáka *Achatina fulica*, je zase indikátorom akútnej lymfoblastickej leukémie u detí.⁷

Pomocou lektínov sa dá zistiť aj to, ktoré sublínie nádorových buniek majú vysoký potenciál tvoriť metastázy a ktoré naopak nízky. Dôvodom sú rozdielne povrchové glykoproteíny u jednotlivých sublínií. Málo metastázujúca sublínia B12 myšacieho melanómu viazala Con A v malej miere. U buniek s vysokou schopnosťou tvoriť metastázy bola afinita ku Con A vyššia, no mali menej väzbových miest pre SBA a WGA.¹⁰⁴

Lektíny sú užitočné nielen pri štúdiu sacharidov na povrchu bunkových membrán ale aj intracelulárnych membrán. Aj tu bolo dokázané že distribúcia sacharidov je asymetrická a týka sa luminálnej strany organel, akými sú mitochondrie, lyzozómy, Golgiho aparát. Výnimkou je nukleárna membrána, kde sacharidové štruktúry zasahujú aj do cytoplazmy. Väzba WGA k nukleárnej membráne slinných žliaz drozofily (*Drosophila* sp.) bola prvou evidenciou výskytu glykoproteínov vo vnútri buniek.⁷

Identifikácia mikroorganizmov

Tak ako živočíšne bunky, aj mikrobiálne obsahujú na svojom povrchu sacharidy. Lektíny sú teda užitočné k identifikácii mikroorganizmov a k štúdiu ich povrchových štruktúr.

Aglutinácia baktérií izolovanej vzorky pomocou vhodného lektínu môže potvrdiť identitu mikroorganizmu. V neposlednom rade je oproti sérologickým a kultivačným vyšetreniam výhodou finančná a časová nenáročnosť. Napr. *Bacillus anthracis*, baktériu ktorá je obzvlášť ťažko identifikovateľná, možno ľahko určiť pomocou SBA alebo HPA. Podobne *Neisseria gonorrhoeae* sa dá identifikovať pomocou WGA. Lektíny boli použité aj k identifikácii ďalších rodov, medzi nimi sú stafylokoky, streptokoky a legionely.

Značené lektíny s rozličnou špecifitou boli využité k detekcii teichoovej kyseliny u baktérií *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus* a tiež k skúmaniu kompozície bunkovej steny u kvasníc.

Lektíny majú potenciálne využitie ako diagnostiká pri infekciách vírusmi, hubami a prvokmi. Achatinín H selektívne aglutinuje erytrocyty u pacientov s indickou viscerálnou leishmaniózou a nie u zdravých. Znamená to rýchly a neinvazívny spôsob diagnózy tejto choroby.⁷

Lektíny môžu byť v klinických laboratóriách užitočným nástrojom pri taxonomických a epidemiologických štúdiách kvasiniek. Bola prevedená štúdia, v ktorej sa pomocou 14 lektínov hodnotila aglutinácia 93 klinických vzorkov kvasiniek. Vzorky pochádzali z 5 druhov rodu *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* a *C. parapsilosis*). S použitím škály troch lektínov (Con A, LCL, PSL) so špecifitou pre α -D-manózu, nastala aglutinácia u všetkých vzoriek. Ďalšie tri lektíny umožnili rozlíšenie druhov *C. glabrata*, *C. tropicalis* a *C. albicans*.¹⁰⁵

Neuroanatomické štúdie a použitie v neurochirurgii

Pomocou lektínov je možné skúmať aj nervové dráhy a to vďaka glykokonjugátom na membránach určitých neurónov. Lektín je injekčne vpravený na špecifické miesto nervového systému, napr. do oblasti určitých nervových zakončení v mozgu. Následne je lektín neurónmi vychytávaný a transportovaný retrográdnym alebo anterográdnym transportom. Potom sa detekuje.

Prvým lektínom ktorý bol kedy použitý pri neuroanatomických štúdiách je WGA. Bol značený rádioaktívnym iódom a v súčasnosti je stále najpoužívanejší. Postupne pribudli aj iné, medzi nimi PHA. Oba lektíny sú v mieste aplikácie veľmi účinne vychytávané.⁷

Niektoré toxíny sa používajú v molekulárnej neurochirurgii k selektívnemu odstráneniu určitých neurónov, metódou tzv. samovražedného transportu. (suicide transport). Najpoužívanejšie sú toxické lektíny (ricín, volkensín) a OX7-saporín. Saporín je monomérený proteín tvorený 253 aminokyselinami. Molekulová hmotnosť je približne 28,6 kDa. Bol izolovaný zo semien a koreňov druhu *Saponaria officinalis* z čeľade Caryophyllaceae a *Mirabilis jalapa* z čeľade Nyctaginaceae. Aj keď to nie je lektín, podobne ako spomenuté toxické lektíny patrí k RIPs, teda proteínom, ktoré irreverzibilne inhibujú ribozómy. Toxické lektíny obsahujú väzbovú podjednotku, saporín však vyžaduje pre vstup do bunky vhodný vektor. Používa sa vo forme imunotoxínu, naviazaný na monoklonálnu protilátku, označovanú

ako OX7. V súčasnej dobe je saporín významným objektom farmakologických a toxikologických štúdií. Najnovšie výskumy preukazujú jeho antitumorový účinok, súvisiaci s N-glykozidázovou aktivitou.^{3, 106, 107}

Separácia buniek

V podstate je s využitím lektínov možné separovať akékoľvek bunky, či už rastlinné, živočíšne i mikrobiálne, ktoré sa líšia povrchovými sacharidmi. Väzba lektínu k bunke je reverzibilná a teda bunky s afinitou k lektínu, ale aj tie ku ktorým sa lektín neviaže, ostávajú neporušené a plne viabilné. To je značná výhoda v porovnaní s protilátkami.

K tomuto účelu sa používajú napr. SBA a PNA. PNA sa používa v imunológii, k rozdeleniu myšacích a ľudských tymocytov na dve podskupiny - tymocyty ktoré sú aglutinované lektínom (PNA⁺) a neaglutinované (PNA⁻). PNA⁺ frakcia pozostáva z imunologicky nezrelých kortikálnych buniek - 85-90% celkových tymocytov, PNA⁻ frakcia náleží zrelým medulárnym tymocytom, ktoré tvoria 10-15% z celkového počtu. PNA sa stal jedným z najpoužívanejších lektínov v imunológii.

Separáciu myšacích splenocytov na B a T bunky možno dosiahnuť pomocou SBA. Hlavné využitie SBA je však pri transplantácii kostnej drene.⁷

Využitie mitogénnych vlastností lektínov

Určité lektíny, najmä tie rastlinné, majú schopnosť indukovať rast a delenie lymfocytov. Lektíny napodobňujú účinok antigénov na lymfocyty, no kým antigény stimulujú iba určité klony lymfocytov (asi 0,1% celkového množstva), lektíny pôsobia na väčšinu z nich (70-80%) a preto sa radia medzi polyklonálne mitogény. Vďaka nim sa značne uľahčuje detekcia a štúdium zmien spojených s proliferáciou bunky. Taktiež sa využívajú pri objasňovaní mechanizmov antigénnej stimulácie, či prenosu signálu ktorý je iniciovaný väzbou agens na bunkový povrch. Väčšina mitogénnych lektínov stimuluje iba T bunky a na B bunky nepôsobí. Výnimkou je napr. artokarpín a mitogén z *Phytolacca americana*, ktoré stimulujú oba typy.⁷

Mechanizmus stimulácie

Mechanizmus akým lektíny aktivujú lymfocyty nie je dokonale objasnený, no je pravdepodobné že prebieha v dvoch krokoch. Najprv sa lektín naviaže na povrchové sacharidy bunky. Samotná väzba však nie je dostatačujúca, podmienkou je aby sa lektín

naviazal na receptorový komplex T buniek pre antigény, na ktorý sa viažu iba mitogénne lektíny. Mitogénne lektíny ovplyvňujú transdukciu signálu, ktorá vedie k aktivácii lymfocytov. Kľúčovým krokom je enzymatická hydrolýza fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfátu na diacylglycerol a inozitol-1,4,5-trisfosfát, ktoré oba slúžia ako sekundárni poslovia. Následkom je produkcia a uvoľnenie interleukínu-2, syntéza DNA a bunkové delenie.⁷

7.2. Klinické využitie

V porovnaní s rozsiahlym využitím lektínov v oblasti výskumu je ich bežné použitie pre klinické účely obmedzené. Je to najmä určovanie krvných skupín, karyotyping, čistenie kostnej drene pred transplantáciou, zisťovanie imunokompetencie u pacientov, substitučná terapia pri Gaucherovej chorobe.

Určovanie krvných skupín

Určovanie krvných skupín bolo prvou klinickou aplikáciou lektínov. Používajú sa dodnes, napr. lektín z *Lotus tetragonolobus* a UEA-I slúžia k identifikácii krvnej skupiny 0. DBL sa používa pri rozlišovaní podskupín A₁ a A₂, lektín z *Vicia graminea* zas k odlíšeniu krvných buniek M od N. Lektíny môžu slúžiť aj k oddeleniu jednotlivých populácií erytrocytov zo zmesi, napr. v zriedkavých prípadoch mozaicizmu krvných skupín, v prípade somatických mutácií, alebo pri transplantácii kostnej drene.⁷

Diagnostika polyaglutinácie

Polyaglutinácia (alebo polyaglutinabilita) sprevádza určité virové a bakteriálne infekcie. Ľudské erytrocyty sú aglutinované anti-T-protilátkami, ktoré sú bežne prítomné v krvnom sére u dospelých. Tieto protilátky reagujú s T antigénom (Galβ3GalNAc). Ten na povrchu erytrocytov vzniká až pôsobením bakteriálnej či vírusovej sialidázy. Aglutinované erytrocyty podliehajú vďaka anti-T-protilátkam hemolýze, ktorá môže vyústiť až v akútne renálne zlyhanie. Situácia je vážna ak sa pacientom s erytrocytmi pozitívnymi na T antigén aplikuje transfúzia obsahujúca krv a plazmu. Riziko sa dá znížiť transfúziou čistých erytrocytov. Včasná detekcia polyaglutinácie je klinicky významná a doporučuje sa u pacientov s ťažkými infekciami, u pacientov u ktorých sa v minulosti vyskytla hemolytická reakcia alebo reakcia na transfúziu krvi. Do roku 1963 bola detekcia T antigénu časovo náročná. Značným

zjednotením bolo zistenie, že PNA vykazuje pre daný antigén špecifitu. V literatúre je popísaných niekoľko prípadov, keď PNA, použitý k tomuto účelu, zachránil pacientovi život.
108, 109

Monitorovanie imunokompetencie

Z množstva mitogénnych lektínov, len Con A, PHA a PWM sa používajú v laboratórnom meradle k odhadu imunokompetencie u pacientov trpiacich rôznymi chorobami, alebo k monitorovaniu efektu imunosupresív.

Stimulácia lymfocytov k mitogéneze pomocou lektínov bola výrazne nižšia u pacientov s AIDS. Mitogénne lektíny boli využité aj pri skúmaní efektu kozmického letu na imunitný systém človeka. Ukázalo sa že odpoveď lymfocytov u kozmonautov na mitogénne účinky Con A bola až o 60% nižšia po návrate z vesmíru než pred ním. Stav sa normalizoval až v priebehu dvoch týždňov.⁷

Karyotyping

Cenným využitím mitogénnych lektínov je štúdium chromozómov, determinácia pohlavia ale aj detekcia chromozomálnych defektov. Chromozómy sú totiž v stimulovaných lymfocytoch dobre pozorovateľné.⁷

Využitie lektínov vo forme imunotoxínov

Imunotoxíny sú hybridné molekuly, ktorú vznikajú naviazaním určitého toxínu na molekulu monoklonálnej protilátky (MAB = monoclonal antibody).¹¹⁰

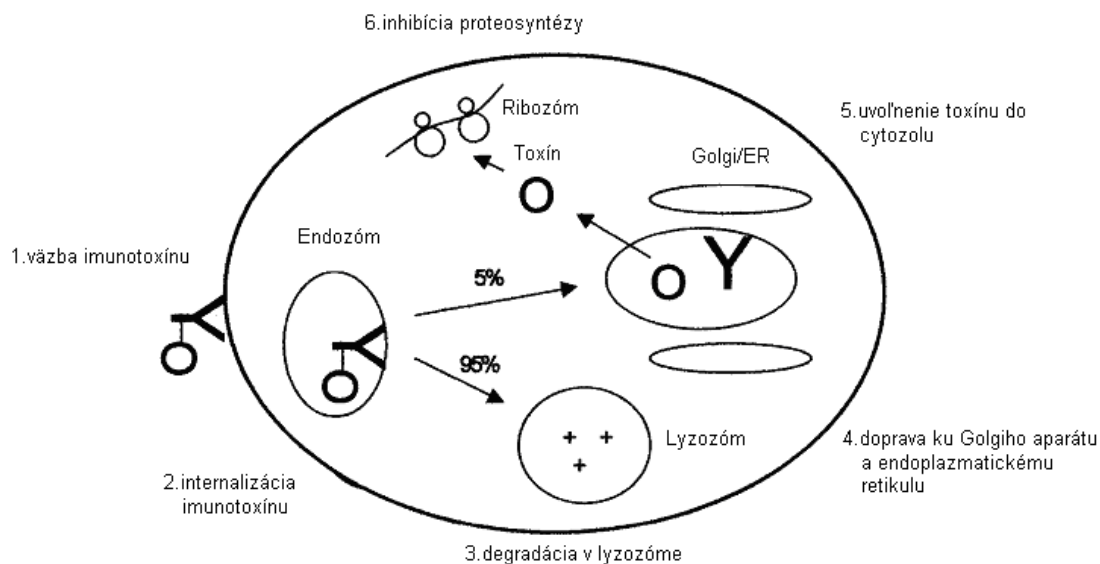
Používané toxíny sú vysoko čistené látky proteínovej povahy, získané z rastlín, húb i baktérií. Toxín je spojený s MAB a po jej naviazaní na špecifické štruktúry na povrchu cieľovej bunky prechádza do cytozolu. Je dopravený k ribozomálnemu komplexu, kde blokuje proteosyntézu, čo vedie k zániku bunky. K zničeniu cieľovej bunky stačí veľmi malé množstvo imunotoxínu, v porovnaní s použitím samotných nekonjugovaných MAB. V pokusoch *in vitro* boli zaznamenané klinické odpovede po podaní miligramových dávok nekonjugovaných MAB, zatiaľ čo imunotoxíny boli vysoko účinné aj pri koncentráciách minimálne o tri rady nižších.^{110, 111}

Teoreticky možno za letálnu dávku pre cieľovú bunku považovať jedinou molekulu imunotoxínu, ktorá je po vstupe do bunky dopravená k ribozomálnemu komplexu. Výhodou

imunotoxínov je aj schopnosť pôsobiť na bunky v kľudovej fáze a taktiež na deliace sa bunky. Pôsobenie imunotoxínov nie je viazané na bunkový cyklus a nádorové bunky nachádzajúce sa v G₀ fáze sú taktiež zasiahnuté.¹¹¹

Imunotoxíny boli prvýkrát popísané koncom 80. rokov. Odvtedy už bolo izolovaných mnoho toxínov, z rôznych rastlín, pliesní a baktérií, ktoré sa dajú použiť na ich prípravu. Z rastlinných toxínov sú najpoužívanejšie ricín, abrín, viskumín (dvojreťazcové), saporín, gelonín, momordín a trichosantín (jednoreťazcové). Miestom pôsobenia je 28S podjednotka rRNA. Mechanizmus účinku imunotoxínu je nasledujúci (viz **Obrázok 4**):

1. Naviazanie imunotoxínovej MAB na špecifické antigénne miesto na povrchu cieľovej bunky.
2. Internalizácia imunotoxínu do cytozolu endocytózou.
3. Väčšina imunotoxínu (95%) je degradovaná v lyzozómoch.
4. Časť imunotoxínu (5%) je v endozóme dopravená ku Golgiho aparátu a endoplazmatickému retikulu.
5. Odštiepenie toxínu od MAB a jeho vyplavenie do cytozolu.
6. Voľný toxín enzymaticky inhibuje proteosyntézu inaktiváciou ribozomálnej podjednotky 28S.



Obrázok 5. Mechanizmus účinku imunotoxínu¹¹³

- **Príprava imunotoxínov**

Rastlinné toxíny môžeme rozdeliť podľa štruktúry do dvoch skupín. Prvá skupina zahŕňa toxíny s jedným enzymaticky aktivovateľným proteínom, kým druhá skupina obsahuje dvojreťazcové proteíny. Reťazec A má enzymatickú aktivitu a reťazec B, ktorý sa viaže na glykoproteíny a glykolipidy obsahujúce galaktózu, zodpovedá za väzbu a vstup do bunky. Pri používaní druhej skupiny toxínov je nutné reťazec B odstrániť alebo pozmeniť. To je aj prípad často používaného ricínu, u ktorého je využívaný len reťazec A.

Spojenie toxínu s MAB musí zostať neporušené extracelulárne, ale intracelulárne musí byť labilné do takej miery, aby mohol byť samotný toxín uvoľnený do cytozolu cieľovej bunky. To je možné dosiahnuť disulfidickou väzbou medzi toxínom a MAB. Väzba toxínu k MAB musí byť vzhľadom k *in vivo* terapii stabilná v krvi a tkanivách. Vzhľadom k tomu, že krv i tkanivá obsahujú tiolové skupiny, ktoré môžu narušovať disulfidické väzby, bola vyvinutá stratégia, ktorá spočíva v naviazaní objemných skupín okolo danej väzby. Týmto mechanizmom je značne obtiažne narušenie disulfidickej väzby a tak je zaručená vyššia stabilita imunotoxínu v krvi a tkanivách.^{111, 112}

- **Nežiaduce účinky imunotoxínov**

Použitie imunotoxínov *in vivo* v klinickej praxi je limitované ich imunogenicitou a toxicitou. Imunogenicitu je problém myšacích MAB a tiež samotných toxínov. Bezprostredne po aplikácii sa môže objaviť hypersenzitívna reakcia (horúčka, zimnica, vyrážka, anafylaktický šok), najmä po opakovanom podaní. V priebehu 1-3 mesiacov vznikajú HAMA (human anti-mouse antibodies = ľudské protilátky proti myšacím MAB) a ďalšia terapia imunotoxínmi prestáva byť účinná. Potlačenie hypersenzitívnej reakcie je možné pomocou imunosupresív. Zabránenie tvorby HAMA bolo dosiahnuté tzv. humanizáciou MAB, ktorá spočíva v náhrade molekuly myšacieho imunoglobulínu ľudským, s výnimkou časti obsahujúcej väzbové miesto pre cieľový antigén.

Protilátky proti toxínom vznikajú u 30-100% pacientov a ich dlhodobé opakované podávanie je potom minimálne účinné alebo celkom neúčinné. V tomto ohľade je najlepšie preštudovaný A reťazec ricínu, kde sa tieto protilátky označujú ako HARA (human anti-ricin antibodies). Ich vzniku nie je možné zabrániť, keďže po odstránení imunogénnej časti toxínu sa stráca aj jeho účinnosť pri blokáde proteosyntézy v cieľovej bunke.

Limitujúcim faktorom imunotoxínov je ich vysoká toxicita. V klinických štúdiách fázy I bol hlavným faktorom limitujúcim zvýšenie dávky už spomínaný „vascular leak syndrome“ (VLS) a hepatotoxicita. VLS je charakterizovaný zvýšenou priepustnosťou kapilár a únikom

tekutín a bielkovín. Klinická manifestácia VLS zahŕňa hypoalbuminémiu, edém pľúc, periférne edémy, hypotenziu, hmotnostný prírastok a môže vyústiť do kardiopulmonálneho zlyhania. Príčinou VLS je poškodenie endotelu ciev toxínom. Napríklad A reťazec ricínu reaguje s ľudským alfa-2-makroglobulínom a fibronektínom v cievnej stene a vedie k jej deštrukcii. Na myšiacich modeloch k VLS takmer nedochádza, preto sa táto nepredvídateľná toxicita, ktorá limituje zvýšenie dávky imunotoxínu, prejavila až behom klinických skúšok fázy I. Na druhej strane je mierny VLS žiaduci, vzhľadom k doprave imunotoxínu až na povrch nádorovej bunky, v nádorovom tkanive. Hepatotoxicita so zvýšením pečenej enzýmov je obvykle reverzibilná.¹¹³

- **Klinické využitie imunotoxínov**

Klinické testovanie imunotoxínov bolo zahájené koncom 80. rokov. Použitie rekombinantných imunotoxínov v klinických štúdiách fázy I sa objavuje v priebehu 90. rokov. Zatiaľ najlepšie výsledky boli dosiahnuté u hematologických malignít pri likvidácii reziduálnej populácie leukemických alebo lymfomových buniek.^{114, 115, 116}

Liečba solidných nádorov s veľkou nádorovou masou pomocou imunotoxínov nebola príliš úspešná. Je to spôsobené zlou penetráciou imunotoxínu do ložiska nádoru, systémovou toxicitou limitujúcou zvyšovanie dávky a vznikom HAMA a HARA.¹¹¹

Ďalšou možnosťou môže byť kombinácia imunotoxínu s konvenčnou protinádorovou terapiou. V súčasnej dobe sú k dispozícii preklinické i klinické štúdie, ktoré preukazujú synergický účinok a bezpečnosť kombinovaného podávania imunotoxínu s chemoterapiou, prevažne u hematologických malignít.¹¹³

Vzhľadom k vysokej toxicite *in vivo* boli v posledných rokoch hľadané spôsoby využitia imunotoxínov *in vitro*. Transplantácia hematopoetických kmeňových buniek predstavuje jeden z príkladov *in vitro* aplikácie imunotoxínov. Čistenie transplantátu od nádorových buniek môže nájsť uplatnenie v prípade autologickej transplantácie u akútnej lymfoblastickej leukémie, non-hodgkinovho lymfómu, mnohopočetného myelómu a akútnej myeloidnej leukémie.

Alogénna transplantácia hematopoetických kmeňových buniek (HSCT) predstavuje účinnú liečbu mnohých hematologických maligných i nemaligných ochorení.^{113, 114, 115, 116}

Liečebný potenciál HSCT spočíva predovšetkým v uplatnení protinádorovej aktivity darcovských (alogénnych) T lymfocytov, schopných navodiť reakciu štepu proti leukémii/nádoru (GVL = graft-versus-leukemia, GVT = graft-versus-tumor).¹¹⁷

Alogénne T lymfocyty však často, súčasne vedľa žiadúceho GVL efektu, spôsobujú reakciu štetu proti hostiteľovi (GVHD = graft-versus-host disease), ktorá je jednou z hlavných príčin morbidity a mortality pacientov. Hlavnú úlohu hrajú T lymfocyty dárcu, ktoré v konečnom dôsledku vedú k poškodeniu tkanív hostiteľa, predovšetkým kože, pečene a gastrointestinálneho traktu. Deplécia alogénnych T lymfocytov vedie k zníženiu rizika GVHD, no súčasne narastá riziko oportunných infekcií, relapsu základného ochorenia a odvrhnutia štetu.

Ako ideálny sa javí prístup, ktorý by eliminoval iba tie dárcovské T lymfocyty, ktoré sú zodpovedné za GVHD, avšak ponechal T lymfocyty s protinádorovou a protiinfekčnou reaktivitou. Predpokladom je, že GVHD a GVL sú sprostredkované rôznymi klonmi T lymfocytov, je teda možné ich od seba oddeliť.

Eliminovať GVHD reaktívne klony dárcovských T lymfocytov možno po ich aktivácii nenádorovými bunkami príjemcu. Aktivované klony dárcovských T lymfocytov exprimujú na svojom povrchu molekuly CD25. Takto aktivované CD25⁺ T lymfocyty sa dajú eliminovať pomocou vysoko špecifického anti-CD25 imunotoxínu, bez výrazného poškodenia zvyšku populácie dárcovských T lymfocytov, ktorá si zachováva antileukemickú a antimikrobiálnu reaktivitu.¹¹³

Transplantácia kostnej drene

Bežne sa k čisteniu dárcovskej kostnej drene využíva SBA. Cieľom je odstrániť tie T lymfocyty, ktoré sú zodpovedné za GVHD. Táto metóda je často používaná pri transplantácii kostnej drene u detí, ktoré trpia ťažkou poruchou imunity, označovanou ako SCID (severe combined immune deficiency). V minulosti boli tieto deti odsúdené na smrť už v ranom veku, napriek tomu že boli držané v absolútnej izolácii, v plastových komorách („bubble children“). V USA a v Európe bola u viac než 250 detí transplantovaná kostná dreň čistená pomocou SBA. Až v 75% bola liečba úspešná. Metóda bola testovaná aj u pacientov s leukémiou, pričom dosiahnuté výsledky sú povzbudivé.

Enzymová substitučná terapia

Tá sa nevzťahuje k rastlinným lektínom, ale k lektínom prirodzene sa vyskytujúcim na povrchu buniek, ktoré sa dajú využiť pri tagetingu glykoproteínov, oligonukleotidov, nukleových kyselín a vhodne upravených liečiv. Výborné výsledky boli dosiahnuté s modifikovanou β -glukocerebrozidázou (cerezyme®, ceredase®) pri enzymovej substitučnej

terapii mnohých stovák pacientov trpiacich Gaucherovou chorobou, čo je vlastne genetický defekt spôsobujúci poruchu tvorby enzýmu glukocerebrozidázy. Následkom toho dochádza k akumulácii glukocerebrozidu, najmä v makrofágoch.⁷

Využitie lektínov v biosenzoroch

Už viac než dvadsať rokov sa vedci pokúšajú nájsť spôsob akým by sa lektíny špecifické pre Glc a Man dali využiť v biosenzoroch, ktoré by *in vivo* monitorovali hladinu glukózy u diabetikov. Mnohé výskumné skupiny v *in vitro* aj *in vivo* štúdiách úspešne potvrdili, že senzory obsahujúce Con A dokážu až po dobu niekoľkých mesiacov monitorovať hladinu glukózy s veľkou presnosťou. Stále však pretrvávala neistota kvôli novej toxicite Con A. Bolo však zistené, že množstvo Con A (<10µg/µl) použité v detektoroch citlivých na glukózu nepredstavuje žiadne zdravotné riziko. Senzory sa navyše aplikujú subkutánne.⁹⁷

Využitie extraktov z *Viscum album* v terapii rakoviny

Preparáty z imela patria k najširšie využívaným nekonvenčným metódam terapie rakoviny v strednej Európe. V prvom rade je nutné poznamenať, že výsledky štúdií nie sú jednoznačné a preto je klinická účinnosť kontroverzná. Viac než dve tretiny pacientov s rakovinou v Nemecku a Rakúsku sú liečené alternatívnymi metódami, predovšetkým extraktami z imela. Liečba rakoviny pomocou imela pochádza z roku 1920 a jej zakladateľmi sú Steiner a Wegman.

Prvá skupina imelových preparátov, tzv. „anthroposophical mistletoe preparations“ zahŕňa napr. Abnobaviscum, Helixor, Iscador, Iscucin, Isorel. Obsahujú extrakty z definovaných častí *Viscum album*, a to z čerstvých listnatých výhonkov a bobulí. Tie sa získavajú z rôznych hostiteľských stromov, akými sú dub, jablň, borovica a iné. Proces zbierania je štandardizovaný a šťava pochádzajúca zo zimnej a letnej úrody sa mieša dohromady. Aplikácia a dávkovanie je individuálne v závislosti na reakcii pacientovho organizmu a tiež na štádiu choroby.

Do druhej skupiny VAEs (*Viscum album* extracts) patria tzv. „non-anthroposophical mistletoe preparations“, Cafalektin, Eurixor, Lektinol, ktoré sa zbierajú v zime z topoľov. Sú dávkané na základe obsahu viskumínu (ML-I) (v rozmedzí 1ng/kg až 15 ng/kg telesnej hmotnosti). V súčasnej dobe sa imelo používa vo všetkých štádiách choroby, buď samotné alebo v kombinácii s chemoterapiou, rádioterapiou či hormonálnou terapiou.

Komerčné preparáty z imela sa pripravujú alkoholovo-vodnou extrakciou, fermentáciou vodného extraktu s baktériami produkujúcimi kyselinu mliečnu, alebo sa kombinujú s inými extraktami. Preparáty sú určené k subkutánnemu, intrakutánnemu a intavenóznemu podaniu a tie, ktoré sú kombinované s inými extraktmi sú vo forme kapslí alebo čajov. Na Ďalekom Východe sa rôzne druhy imela využívajú v tradičnej medicíne napr. pri lumbagu, hypertenzii, nádoroch.¹¹⁸

Biologické a farmakologické vlastností VAEs sa v posledných rokoch stali predmetom rozsiahlych výskumov. Z VAEs bolo izolovaných niekoľko farmakologicky aktívnych zlúčenín, a to lektíny (ML-I, ML-II, ML-III), viskotoxíny, oligo- a polysacharidy a iné. Poprednou vlastnosťou VAEs je cytotoxicita a inhibícia rastu mnohých nádorových bunkových línií u človeka. Cytotoxický efekt sa pripisuje hlavne lektínom, pretože indukujú apoptózu, zatiaľ čo viskotoxíny indukujú nekrotickú smrť buniek. U VAEs bola preukázaná aj imunomodulačná aktivita. *In vitro* a *in vivo* štúdie demonštrovali aktiváciu granulocytov, monocytov/makrofágov, NK buniek, T-buniek a rozličných cytokínov. U pokusných zvierat sa protinádorový efekt VAEs prejavil po podaní buď priamo do tumoru alebo systémovo.

Niektoré výskumné skupiny pokladajú ML-I za nositeľa hlavných farmakologických vlastností VAEs. Väčšina preparátov z imela je preto štandardizovaná práve na obsah tohto lektínu. V súčasnosti sa v klinických štúdiách skúma aj rekombinantný ML-I. Avšak na zvieracích modeloch boli pozorované nepriaznivé efekty nízkych dávok izolovaného ML-I na vývoj tumoru. Navyše lektíny imela sú viazané sérovými glykoproteínmi a tiež anti-ML protilátkami, ktoré sú počas týždňov terapie fyziologicky produkované. Preto sa biologický účinok izolovaných lektínov môže časom znižovať.

Výsledky klinických skúšok preparátov z imela sú predmetom diskusií. V roku 2003 Kienle a ďalší autori publikovali prácu v ktorej hodnotili 23 kontrolovaných klinických štúdií zameriavajúcich sa na terapiu rakoviny pomocou látok obsiahnutých v imele. 12 štúdií preukázalo aspoň jeden štatisticky významný pozitívny výsledok, ďalších 7 štúdií malo takisto pozitívny trend, u 3 sa efekt nepreukázal a 1 zo štúdií demonštrovala negatívne výsledky. Niektoré zo štúdií sú však po metodologickej stránke nedostačujúce a preto ich závery nemožno považovať sa presvedčivé. Sumarizovať efekt rôznych štúdií je problematické kvôli heterogenitám v metodológii, kvalite, študovanej populácii, metódam hodnotenia výsledkov ale aj kvôli rozdielným študovaným preparátom. Pretože je dosť málo kvalitných štúdií s pozitívnymi klinickými výsledkami je do budúcnosti žiaduci ďalší výskum.¹¹⁹

Tabuľka 5. Preparáty z imela používané pri liečbe rakoviny ¹¹⁹

Názov prípravku	Hostiteľský strom	Doba zberu	Typ extrakcie	Využívaná časť
Abnovaviscum	A, Ac, Am, B, C, F, M, P, Qu	L(leto) Z(zima)	lisovanie	čerstvé listnaté výhonky, plody
Helixor	A, M, P	L, Z	vodná	čerstvé listnaté výhonky, plody
Iscador	M, P, Qu, U	L, Z	vodná fermentácia	čerstvé listnaté výhonky, plody
Iscucin	A, C, M, P, Po, Qu, S, T	L, Z	vodná	sušené listnaté výhonky
Isorel	A, M, P	L, Z	vodná	čerstvé listnaté výhonky
Cefalektin	Po	Z	vodná	čerstvé listnaté výhonky
Eurixor	Po	Z	vodná	čerstvé listnaté výhonky
Lektinol	Po	Z	vodná	čerstvé listnaté výhonky

*A-Abies, Ac-Acer, Am- Amygdalus, B-Betula, C-Crataegus, F-Fraxinus, M-Malus, P-Pinus, Po-Populus, Qu-Quercus, S-Salix, T-Tilia, U-Ulmus

Ľudské nádorové bunky majú v *in vitro* podmienkach rôznu vnímavosť k jednotlivým typom imelových extraktov. U rôznych typov nádorových bunkových línií bola sledovaná proliferácia, mitochondriálna aktivita a nekrotická bunková toxicita za použitia rozlične riedených imelových preparátov. Abnovaviscum Fraxini vykazoval vyšší inhibičný efekt než Iscador. ¹²⁰

Potenciálne využitie lektínov v prevencii a liečbe AIDS

Lektíny patria medzi proteíny so schopnosťou viazať sacharidy (CBP, carbohydrate binding proteins). Niektoré z nich, najmä tie so špecifitou pre manózu a N-acetylglukozamín vykazovali na bunkových kultúrach značnú anti-HIV aktivitu. Lektíny nielenže inhibujú napadnutie buniek vírusom HIV, ale tiež pôsobia ako prevencia v prenose vírusu z infikovaných buniek na neinfikované CD₄⁺T-lymfocyty. Mechanizmus antivirovej aktivity spočíva v zabránení vstupu vírusu do cieľovej bunky. To bolo pozorované napr. u lektínov

z druhu *Galanthus nivalis* a *Hippeastrum* sp. Kľúčová je väzba lektínu na sacharidové štruktúry glykoproteínu (gp 120) vírusu HIV-1. Počas interakcie vírusu s bunkou vytvoria lektíny skrížené väzby medzi glykánmi a tým „zmrazia“ konformáciu gp120, čím zabránia interakcii s koreceptorom. Aj k lektínom však môže vzniknúť rezistencia. Jej miera koreluje s narastajúcim počtom mutácií glykosylovaných častí vírusového glykoproteínu gp120. Rastlinné lektíny a ďalšie CBP predstavujú novú skupinu látok s anti-HIV aktivitou s unikátnym mechanizmom účinku. Čo sa týka vzniku rezistencie, ich profil je odlišný od doterajších liečiv pôsobiacich proti vírusu HIV.^{121, 122}

U niekoľkých lektínov bolo *in vitro* testované inhibičné pôsobenie na reverznú transkriptázu a N-glykohydrolázy (α -glukozidáza, β -glukozidáza a β -glukuronidáza) vírusu HIV-1. Lektíny z druhov *Phaseolus vulgaris*, *Momordica charantia*, *Ricinus communis* a *Agaricus bisporus* vykazovali schopnosť inhibovať reverznú transkriptázu, pričom najvýraznejší efekt sa prejavil u lektínov z druhu *Phaseolus vulgaris* a *Agaricus bisporus*. Spomenuté lektíny mali iba slabý, prípadne žiadny inhibičný efekt na glykohydrolázy.¹²³

Ukázalo sa, že proti vírusu HIV je možné zasiahnuť aj pomocou už spomínaných imunotoxínov. Ricín spojený s protilátkou proti CD₄+T bunkám preukázal schopnosť ničieť tento typ T buniek napadnutých vírusom HIV.¹²⁴

Targeting

Princíp targetingu liečiv za pomoci lektínov je v podstate veľmi jednoduchý. Väčšina proteínov bunkového povrchu a mnohé lipidy v bunkových membránach sú glykozylované a tieto glykány sú väzbovým miestom pre lektíny. Kombináciou malého množstva sacharidov vzniká veľmi široká škála rôznych chemických štruktúr. Rozličné typy buniek majú aj rôzne glykánové zoskupenia, obzvlášť transformované rakovinové bunky vykazujú odlišné znaky v porovnaní so zdravými bunkami.¹²⁵

Potenciálne využitie lektínov pri cystickej fibróze

Cystická fibróza (mukoviscidóza) je genetický defekt postihujúci transportnú bielkovinu CFTR, čo je vlastne chloridový kanál regulovaný proteinkínázou závislou na cAMP. CFTR navyše inhibuje niektoré Na⁺-kanály (typ ENaC). Zvýšený počet otvorenia týchto kanálov, napr. v bronchiálnom epitele, zvýši resorbciu Na⁺ a vody z hlienu secernovaného do lumina, takže sa tento hlien zahustí. Morbidita pri mukoviscidóze je predovšetkým dôsledkom pôsobenia na bronchiálny epitel. Defekt CFTR spôsobuje že je tekutina namiesto sekrécie

resorbovaná, tvorí sa vysoko viskózna vrstva hlienu bohatá na bielkoviny. Tá obmedzuje dýchanie a zároveň sa stáva živnou pôdou infekcie, najmä pre *Pseudomonas aeruginosa*.¹²⁶

V pokusoch na myšiach bol skúmaný efekt niektorých rastlinných lektínov na iónový transport v dýchacích cestách a hrubom čreve. Lektíny PHA-E, PHA-L a Con A, ale nie WGA a SBA, inhibovali absorbciu Na^+ v epitele kolonu a trachey. Na príklade konkanavalínu A bolo preukázané že mechanizmus blokády absorpcie Na^+ súvisí s inhibíciou fosfolipázy C a proteínkinázy C, pravdepodobne s inhibíciou epiteliálneho sodíkového kanálu (ENaC). Práve tento efekt by mohol byť užitočný v terapii cystickej fibrózy.¹²⁷

8. Súhrn

Lektíny sú proteíny, ktoré viažu monosacharidy a oligosacharidy reverzibilne a s vysokou špecifitou, ale súčasne nevykazujú žiadnu katalytickú aktivitu a na rozdiel od protilátok nie sú produktom imunitnej reakcie organizmu. Každý lektín obsahuje typicky dve alebo viac väzbových miest pre sacharidy, lektíny sú teda di- až polyvalentné. Preto pri reakcii s bunkami, napr. erytrocytmi, nielenže viažu sacharidy na ich povrchu, ale vytvárajú medzi nimi skrížené väzby a spôsobujú aglutináciu, u polysacharidov precipitáciu. Oba deje sú inhibované sacharidovými ligandami pre ktoré sú lektíny špecifické.

Lektíny sú prítomné vo všetkých organizmoch, od vírusov a baktérií, cez rastliny až k živočíchom a cicavcom. Tvoria heterogénnu skupinu proteínov a glykoproteínov, ktoré sa líšia veľkosťou, štruktúrou aj špecifitou, ale je možné vystopovať určité podobnosti v sekvenciách aminokyselín.

Lektíny boli prvýkrát izolované z rastlín a je až neuveriteľné, že úloha lektínov v rastlinách je dodnes prakticky neznáma. Pravdepodobne slúžia ako obrana pred hmyzom, fytopatogénnymi hubami či predátormi. U rastlín z čeľade Fabaceae zohrávajú úlohu pri symbióze s baktériami fixujúcimi vzdušný dusík.

Lektíny boli nájdené vo viac než 1000 druhoch rastlín a niekoľko stovák z nich sa aj izolovalo. Čeľaď Fabaceae je vzhľadom k lektínom najväčšia a zároveň aj najviac preskúmaná. Bolo v nej popísaných asi 100 lektínov. Prevažná väčšina bola získaná zo semien, kde môžu tvoriť až 10% celkového množstva semenných proteínov. Lektíny boli nájdené vo všetkých druhoch vegetatívnych pletív, obsah je obvykle nižší ako v semenách a podlieha sezónnym zmenám. Distribúcia lektínov je v rámci jednotlivých pletív a buniek variabilná a býva ovplyvnená rôznymi faktormi, ako je vek alebo podmienky za patologického stavu. Lektíny sa získavajú jednak izoláciou z prírodných zdrojov ale aj pomocou rekombinantných technológií.

Rastlinné lektíny sa na základe špecifity rozdeľujú do 5 skupín, podľa toho, ku ktorému sacharidu vykazujú najvyššiu afinitu. Je zaujímavé, že dané sacharidy- manóza, galaktóza/N-acetylgalaktozamín, N-acetylglukozamín, fukóza a N-acetylneuramínová kyselina, sú typické povrchové štruktúry eukaryotických buniek.

Lektíny sú v rastlinách bohato zastúpené, následkom čoho sa v značnej miere vyskytujú v potrave. Vo všeobecnosti sú lektíny viac rezistentné voči denaturácii teplom, než iné rastlinné proteíny. Predpokladá sa, že lektíny prítomné v potrave zohrali významnú úlohu

v evolúcii alimentárneho traktu u človeka i zvierat. Lektíny menia črevnú permeabilitu a tak môžu brániť vstrebávaniu živín. Napriek tomu, podávanie malých dávok lektínov môže mať dokonca pozitívny vplyv na trávenie, vstrebávanie živín, imunitný systém a bakteriálnu mikroflóru. Je to dôsledok modulácie sekrécie črevných hormónov. Povrchová glykozylácia a tým aj väzbovosť určitých lektínov sa v jednotlivých častiach tráviaceho traktu líši, vhodne vybraným lektínom je možné zasiahnuť do metabolizmu v rôznych častiach GITu. Lektíny ovplyvňujú črevnú mikroflóru. Majú schopnosť priamo reagovať s povrchovými štruktúrami baktérií a aglutinovať ich. Lektíny vplývajú aj na celkový metabolizmus, môžu napodobňovať účinok endokrinných hormónov, často vplývajú na hladinu inzulínu. Najčastejšie zasahovanými orgánmi sú pankreas, kostrové svaly, pečeň, obličky a týmus.

Mnohé lektíny majú toxické vlastnosti. Obzvlášť výraznú toxicitu vykazujú lektíny zo skupiny RIPs typu 2. Majú enzymatickú aktivitu a sú schopné inaktivovať ribozómy a následne zablokovať proteosyntézu. Patrí sem abríin, ricín, viskumín, modeksín a volkensín. Ich chemická štruktúra a mechanizmus toxicity sú podobné. Pozostávajú z reťazca A, ktorý zodpovedá za vlastnú toxicitu a z reťazca B, ktorý zabezpečuje naviazanie na povrch bunky a vstup do bunky. Najpodrobnejšie je preštudovaný ricín, prvý lektín, objavený v roku 1888. Jediná molekula ricínu môže inaktivovať až 2000 ribozómov. To vysvetľuje prečo je táto substancia tak toxická. Ricín v sebe skrýva potenciál biologickej zbrane, nástrojom teroristických útokov sa stal už mnohokrát. Riziko zneužitia je pomerne vysoké aj vďaka tomu, že *Ricinus communis*, využívaný na výrobu ricínového oleja, je pestovaný vo veľkom množstve. Proti ricínu neexistuje protijed, vakcína je momentálne vo vývoji.

Lektíny majú široké využitie vo výskume, najmä pokiaľ je potrebná detekcia či identifikácia sacharidových štruktúr. Ich použitie má mnoho výhod, ako dostupnosť, vysokú špecifitu, stabilitu a reverzibilitu reakcií. Lektíny sú čoraz viac využívané pri štúdiu membránových štruktúr, pri skúmaní mechanizmu glykozylácie intracelulárnych proteínov a zmien, ktorými prechádzajú glykokonjugáty počas diferenciácie, rastu a vývoja. Zmeny v obsahu, distribúcii a prístupnosti celulárnych a extracelulárnych glykokonjugátov často súvisia s patologickými procesmi. Lektíny majú potenciálne využitie aj ako diagnostiká pri infekciách vírusmi, hubami a prvokmi.

V podstate je s využitím lektínov možné separovať akékoľvek bunky, či už rastlinné, živočíšne i mikrobiálne, ktoré sa líšia povrchovými sacharidmi. Väzba lektínu k bunke je reverzibilná a teda bunky s afinitou k lektínu, ale aj tie ku ktorým sa lektín neviaže, ostávajú neporušené a plne viabilné. To je značná výhoda v porovnaní s protilátkami.

Určité lektíny, najmä tie rastlinné, majú schopnosť indukovať rast a delenie lymfocytov. Vďaka nim sa značne uľahčuje detekcia a štúdium zmien spojených s proliferáciou bunky.

V porovnaní s rozsiahlym využitím lektínov v oblasti výskumu je ich bežné použitie pre klinické účely obmedzené. Prvou a stále využívanou aplikáciou lektínov je určovanie krvných skupín. Medzi ďalšie patrí karyotyping, čistenie kostnej drene pred transplantáciou, zisťovanie imunokompetencie u pacientov či substitučná terapia pri Gaucherovej chorobe.

9. Záver

Mnohé rastlinné lektíny sú toxické, s tým súvisí aj hypotéza, že lektíny slúžia rastlinám ako obrana proti rôznym druhom fytopatogénnych húb, hmyzu, predátorovým stavovcom a bezstavovcom. Výraznú toxicitu preukazujú lektíny patriace do skupiny proteínov inaktivujúcich ribozómy (RIPs), ako ricín, abríň či viskumín. Ricín sa vyznačuje extrémnou toxicitou, jediná jeho molekula dokáže zabiť bunku. Napriek tomu sú RIPs skupinou proteínov, ktorá púta pozornosť vedcov kvôli svojej potenciálnej bioaktivite. Farmakologická aktivita týchto látok zahŕňa antivirálnu aktivitu, vrátane anti-HIV aktivity, protinádorové pôsobenie, imunosupresiu i enzymatickú aktivitu.

Popri značnej toxicite majú rastlinné lektíny mnoho použití. Nachádzajú uplatnenie najmä vo výskume, sú nenahraditeľné pri štúdiu glykokonjugátov bunkových povrchov ale aj intracelulárnych štruktúr. S tým súvisí aj ich použitie v diagnostike, pretože zmeny bunkových sacharidových štruktúr často signalizujú patologický proces. Pomocou lektínov je možné separovať akékoľvek bunky, ktoré sa líšia povrchovými sacharidmi. Značnou výhodou je reverzibilita väzby. Lektíny sú užitočným nástrojom aj pri identifikácii mikroorganizmov. Ďalšou oblasťou využitia je štúdium neuroanatomických štruktúr, ale aj použitie toxických lektínov v neurochirurgii. Rastlinné lektíny významne prispeli k rozvoju imunológie a v tejto oblasti sú dodnes široko využívané. V porovnaní s rozsiahlym využitím lektínov vo výskume je ich klinické použitie obmedzené. Prvou a stále uplatňovanou klinickou aplikáciou lektínov je určovanie krvných skupín. Lektíny slúžia aj na diagnostiku polyaglutinácie, ktorá sprevádza určité vírusové a bakteriálne infekcie. Lektíny stimulujúce mitogézu lymfocytov sú užitočné pri monitorovaní imunitného stavu pacientov alebo pri sledovaní efektu imunosupresív. Cenným využitím je aj využitie mitogénnych lektínov pri štúdiu chromozómov či určovaní pohlavia. Obzvlášť zaujímavé je použitie lektínov vo forme imunotoxínov. Najpoužívanejšie sú ricín, abríň a viskumín, ktoré patria medzi proteíny inaktivujúce ribozómy a teda inhibujú proteosyntézu. Tento účinok sa využíva v liečbe nádorových ochorení, najlepšie výsledky boli dosiahnuté u hematologických malignít. Neoceniteľné je aj použitie lektínov, prípadne imunotoxínov pri čistení kostnej drene pred transplantáciou. V terapii rakoviny je vo veľkom rozsahu skúmané aj imelo biele (*Viscum album*), no výsledky štúdií sú kontroverzné a preto jeho protirakovinový účinok nemožno považovať za fakt. V súčasnosti sa výskum zameriava aj na protivirové pôsobenie lektínov. Výsledky naznačujú, že niektoré rastlinné lektíny by mohli byť použité v prevencii a liečbe AIDS.

10. Použitá literatura

- ¹ Lis, H., Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* **98**, 637-674
- ² Puzstai, A., Bardocz, S. (1996). Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **8**, 149-165
- ³ Hrdina, V., Hrdina, R., Jahodář, L. et al. *Přírodní toxiny a jedy*. Praha: Galen, 2004, 302 s.
- ⁴ Sharon, N., Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**, 43-52
- ⁵ Van Damme, E. J. M., Barre, A., Rougé, P. et al. (2004). Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Trends in Plant Science* **9**, 484-489
- ⁶ Loris, R. (2002). Principles of structure of animal and plant lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 198-208
- ⁷ Sharon, N., Lis, H. *Lectins*. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003, 454 pp.
- ⁸ Imberty, A., Gautier, C., Lescar, J. et al. (2000). An unusual carbohydrate binding site revealed by the structures of two *Maackia amurensis* lectins complexed with sialic acid-containing oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **275**, 17541-17548
- ⁹ Ueda, H., Ogawa, H. (1999). Glycobiology of plant glycoprotein epitope: structure, immunology and allergenicity of plant glycoproteins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **11**, 413-428
- ¹⁰ Srinivasan, N., Rufino, S. D., Pepys, M. B. et al. (1996). A superfamily of proteins with the lectin fold. *Chemtracts - Biochem. Mol. Biol.* **6**, 149-164
- ¹¹ Elgavish, S., Shaanan, B. (2001). Chemical characteristics of dimer interfaces in the legume lectin family. *Protein Science, Struct. Funct. Genet.* **10**, 753-761
- ¹² Srinivas, V. R., Reddy, G. B., Ahmad, N. et al. (2001). Legume lectin family, the „natural mutants of the quaternary state“ provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochim. Biophys. Acta* **1527**, 102-111
- ¹³ Vijayan, M., Chandra, N. (1999). Lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 707-714
- ¹⁴ Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., Barre, A. et al. (1998). Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **17**, 575-692
- ¹⁵ Asensio, J. L., Canada, F. J., Siebert, H. C. et al (2000). Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. *Chem. Biol.* **7**, 529-543
- ¹⁶ Lü, S., Liang, S., Gu, X. (1999). Three-dimensional structure of *Selenocosmia huwena* by 2D-NMR. *J. Protein Chem.* **18**, 609-617
- ¹⁷ Van Damme, E. J., Brike, F., Winter, H. C. et al. (1996). Molecular cloning of two different mannose-binding lectins from tulip bulbs. *Eur. J. Biochem.* **236**, 419-427
- ¹⁸ Pratap, J. V., Yeyaprakash A. A., Rani, P. G. et al. (2002). Crystal structures of artocarpin, a Moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl α -D-mannose: implication to the generation of carbohydrate specificity. *J. Mol. Biol.* **317**, 237-247
- ¹⁹ Rosa, J. C., de Oliveira, P. S. L., Garratt, R. et al. (1999). Km+ a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the β -prism fold. *Protein Science* **8**, 13-24
- ²⁰ Bourne, Y., Astoul, C. H., Zamboni, V. et al. (2002). Structural basis of the unusual carbohydrate-binding specificity of jacalin towards galactose and mannose. *Biochem. J.* **364**, 173-180
- ²¹ Lord, M., Roberts, L. M., Robertus, J. D. et al. (1994). Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* **8**, 201-208
- ²² Sandvig, K., van Deurs, B. (2000). Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J.* **19**, 5943-5950
- ²³ Peumans, W. J., Hao, Q., Van Damme, E. J. (2001). Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB J.* **15**, 1493-1506
- ²⁴ Tahirov, T. H., Lu, T. H., Liaw, Y. C. et al. (1995). Crystal structure of abrin -a at 2,14 Å. *J. Mol. Biol.* **250**, 354-367
- ²⁵ Krauspenhaar, R., Rypniewski, W., Kalkura, N. et al. (2002). Crystallisation under microgravity of mistletoe lectin I from *Viscum album* with adenine monophosphate and the crystal structure at 1.9 Å resolution. *Acta Crystallogr.* **58**, 1704-1707
- ²⁶ <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=13>

- ²⁷ Harata, K., Muraki, M. (2000). Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-N-acetylchitotriose. *J. Mol. Biol.* **297**, 673-681
- ²⁸ Sanders, W. J., Gordon, E. J., Dwir, O. et al. (1999). Inhibition of L-selectin-mediated leukocyte rolling by synthetic glycoprotein mimics. *J. Biol. Chem.* **274**, 5271-5278
- ²⁹ Goldstein, I. J., Winter, H. C., Poretz, R. D. et al.: Plant lectins: tools for the study of complex carbohydrates. In *Glycoproteins II* (Montreuil, J., Vliegthart, J. F. G. & Schachter, H., eds). Amsterdam: Elsevier, 1997, pp. 403-474
- ³⁰ Lis, H., Sharon, N. (1994). Moluccella laevis lectin - an unusual protein with a unique specificity. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **6**, 65-74
- ³¹ Bianchet, M. A., Odom, E. W., Vasta, G. R. et al. (2002). A novel fucose recognition fold involved in innate immunity. *Nature Struct. Biol.* **9**, 628-634
- ³² Ratanapo, S., Ngamjunyaporn, W., Chulavatnatol, M. (1998). Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*) *Plant Sci.* **139**, 141-148
- ³³ Hao, Q., Van Damme, E. J. M., Hause, B. et al. (2001). Iris bulbs express type 1 and type 2 ribosome-inactivating proteins with unusual properties. *Plant Physiol.* **125**, 866-876
- ³⁴ Mo, H., Rice, K. G., Evers, D. L. et al (1999). *Xanthosoma sagittifolium* tubers contain a lectin with two different types of carbohydrate binding sites. *J. Biol. Chem.* **274**, 33300-33305
- ³⁵ Rosen, S., Bergström, J., Karlsson, K. A. et al. (1996). A multispecific saline soluble lectin from the parasitic fungus *Arthrotrichy oligospora*. Similarities in the binding specificities compared with a lectin from the mushroom *Agaricus bisporus*. *Eur. J. Biochem.* **238**, 830-837
- ³⁶ Imberty, A., Perez, A. (2000). Structure, conformation and dynamics of bioactive oligosaccharides: theoretical approaches and experimental validations. *Chem. Rev.* **100**, 4567-4588
- ³⁷ von der Lieth, C., Siebert, H., Kozar, T. et al. (1998). Lectin ligands: new insights into their conformation and their dynamic behavior and the discovery of conformer selection by lectins. *Acta Anat.* **161**, 91-109
- ³⁸ Nitta, K. (2001). Leczyme. *Methods Enzymol.* **341**, 368-374
- ³⁹ Goldstein, I. J., Poretz, R. D. : Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine* (Liener, I. E., Sharon, N. & Goldstein, I. J., eds.). Orlando, FL: Academic press, 1986, pp. 35-247
- ⁴⁰ Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J. , Pusztai, A. et al. *Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications*. Chichester: John Wiley & Sons, 1998, pp. 452
- ⁴¹ Peumans, W. J., Hause, B., Van Damme, E. J. (2000). The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments. *FEBS Lett.* **477**, 186-192
- ⁴² Young, N. M., Watson, D. C., Yaguchi, M. et al. (1995). Terminal post-translational proteolysis of plant lectins and their recombinant forms in *E. coli*: characterisation of „ragged ends“ by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **270**, 2563-2570
- ⁴³ Cooper, D. N. , Boulianne, R. P., Charlton, S. et al. (1997). Fungal galectins, sequence and specificity of two isolectins from *Coprinus cinereus*. *J. Biol. Chem.* **272**, 1514-1521
- ⁴⁴ Winter, H. C., Mostafapour, K., Goldstein, I. J. (2002). The mushroom *Marasmius oreades* lectin is a blood group type B agglutinin that recognizes the Gal α 1, 3Gal and Gal α 1, 3Gal β 1, 4GlcNAc porcine xenotransplantation epitopes with high affinity. *J. Biol. Chem.* **277**, 14996- 15001
- ⁴⁵ Guillot, J., Kanska, G. (1997). Lectins in higher fungi. *Biochem. Syst. Ecol.* **25**, 203-230
- ⁴⁶ Kilpatrick, D. C. (2002). Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 187- 197
- ⁴⁷ Drickamer, K. (1999). C-type lectin –like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 585-590
- ⁴⁸ Rüdiger, H.: Purification of plant lectins. In *Lectins and Glycobiology* (Gabijs, H.-J.& Gabiys, S., eds.). Berlin: Springer, 1993, pp. 31-46
- ⁴⁹ Červenka, M., Činčura, F., Jasičová, M. et al. *Slovenské botanické názvoslovie*. Bratislava: Príroda, 1986
- ⁵⁰ Fujita, T. (2002). Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Rev. Immunol.* **2**, 346-353
- ⁵¹ Laine, R. A. (1994). A calculation of all possible oligosaccharide isomers both branched and linear yields 1.05 x 10¹² structures for a reducing hexasaccharide: The isomer barrier to development of a single-method saccharide sequencing or synthesis system. *Glycobiology* **4**, 759-767
- ⁵² Rüdiger, H. (1998). Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. *Acta Anat.* **161**, 130-152
- ⁵³ Hirsch, A. M., Lum, M. R., Downie, J. A. (2001). What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Planta Physiol.* **127**, 1484-1492
- ⁵⁴ Kijne, J. W. (1996). Functions of plant lectins. *Chemstracts – Biochem. Mol. Biol.* **6**, 180-187
- ⁵⁵ Murdock, L. L., Shade, R. E. (2002). Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *J. Agric. Food. Chem.* **50**, 6605-6611

- ⁵⁶ van Rhijn, P., Fujishige, N. A., Lim, P. O. et al. (2001). Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant Physiol.* **126**, 133-144
- ⁵⁷ Diaz, C. L., Spaink, H. P., Kijne, J. W. (2000). Heterologous rhizobial lipochitin oligosaccharides and chitin oligomers induce cortical cell divisions in red clover roots, transformed with the pea lectin gene. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 268-276
- ⁵⁸ Hirsch, A. M. (1999). Role of lectin rhizobial exopolysaccharides in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 320-326
- ⁵⁹ Kalsi, G., Etzler, M. E. (2000). Localization of a Nod factor-binding protein in legume roots and factors influencing its distribution and expression. *Plant Physiol.* **124**, 1039-1048
- ⁶⁰ Etzler, M. E., Kalsi, G., Ewing, N. N. et al. (1999). A Nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5856-5861
- ⁶¹ Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 257-288
- ⁶² Roberts, N. J., Brigham, J., Wu, B. et al. (1999). A Nod factor is a member of distinct class of apyrases that may be unique to the legumes. *Mol. Gen. Genet.* **262**, 262-267
- ⁶³ Rao, K. V., Rathore, K. S., Hodges, T. K. et al. (1998). Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J.* **15**, 469-477
- ⁶⁴ Ciopruga, J., Gozia, O., Tudor, R. et al. (1999). *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochim. Biophys. Acta* **1428**, 424-432
- ⁶⁵ Jahodář, L. *Farmakobotanika, semenné rostliny*. Praha: Karolinum, 2006, 258 s.
- ⁶⁶ Hejny, S., Slavík, B. et al. *Květena České republiky 1*. 2. vyd., Praha: Academia, 1997, 557 s.
- ⁶⁷ Hejny, S., Slavík, B. et al. *Květena České republiky 3*. 1. vyd., Praha: Academia, 1992, 543 s.
- ⁶⁸ Slavík, B. et al. *Květena České republiky 4*. 1. vyd., Praha: Academia, 1995, 531 s.
- ⁶⁹ Slavík, B. et al. *Květena České republiky 5*. 1. vyd., Praha: Academia, 1997, 569 s.
- ⁷⁰ Tomko, J., Kresánek, J., Hubík, J. et al. *Farmakognózia*. 2. vyd., Martin: Osveta, 1999, 423 s.
- ⁷¹ Slavík, B. et al. *Květena České republiky 6*. 1. vyd., Praha: Academia, 2000, 770 s.
- ⁷² <http://www.faf.cuni.cz/daidalea/Plant.asp>
- ⁷³ Wang, Q., Lu-Gang, Y., Campbell, B. J. (1999). Identification of intact peanut lectin in peripheral venous blood. *Lancet* **352**, 1831-1832
- ⁷⁴ Pusztai, A. *Plant Lectins*. Cambridge: Cambridge University Press, 1991, 263 s.
- ⁷⁵ Jordinson, M., Goodlad, R. A., Brynes, A. et al (1999). Gastrointestinal responses to a panel of lectins in rats maintained on total parenteral nutrition. *Amer. J. Physiol* **276**, 1235-1242
- ⁷⁶ <http://www.asan/tr.com/newsletter/01-4/articles/Abrin&RicinRev.htm>
- ⁷⁷ Olsnes, S., Kozlov, J. V. (2001). Ricin. *Toxicon* **39**, 1723-1728
- ⁷⁸ Nielsen, K., Boston, R. (2001). Ribosome-inactivating proteins: A Plant perspective. *Plant Mol. Biol.*, **52**, 785-816
- ⁷⁹ <http://www.gak.co.jp/FCCA/glycoword/LE-A08/LEA08E.htm>.
- ⁸⁰ <http://en.wikipedia.org/wiki/Ricin>
- ⁸¹ Smallshaw, J. E., Firan, A., Fulmer, J.R. et al. (2002). A novel recombinant vaccine which protects mice against ricin intoxication. *Vaccine*, **20**, 3422-3427
- ⁸² Patočka, J., Středa, L. (2006). Protein biotoxins of military significance. *Acta Medica*. **49**, 3-11
- ⁸³ Sandvig, K., van Deurs, B. (2002). Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* **529**, 49-53
- ⁸⁴ Patočka, J., Středa, L. (2003). Plant toxic proteins and their current significance for warfare and medicine. *Journal of Applied Biomedicine*. **1**, 141-147
- ⁸⁵ Nielsen, K., Boston, R. (2001). Ribosome-inactivating proteins: A Plant perspective. *Plant Mol. Biol.*, **52**, 785-816
- ⁸⁶ Kreitman, R. (2003). Taming ricin toxin. *Nature Biotechnology* **21**, 372-374
- ⁸⁷ Vitetta, E. S., Smallshaw, J. E., Coleman, E. et al.(2006). A pilot clinical trial of a recombinant ricin vaccine in normal humans. [online 3.2.2006], [cit. 19.1.2007].
Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/content/full/103/7/2268>
- ⁸⁸ Dickers, K. J., Bradberry, S. M., Rice, P. (2003). Abrin poisoning. *Toxicol Rev.* **22**, 137-142
- ⁸⁹ Ramnath, V., Kuttan, G., Kuttan, R. (2002). Immunopotentiating activity of abrin, a lectin from *Abrus precatorius* Linn. *Indian J Exp Biol.* **40**, 910-930
- ⁹⁰ Ramnath, V., Kuttan, G., Kuttan., R. (2002). Antitumor effect of abrin on transplanted tumours in mice. *Indian J Physiol Pharmacol.* **46**, 69-77
- ⁹¹ Singh, S., Singh, D. K. (1999). Effect of molluscicidal components of *Abrus precatorius*, *Argemone mexicana* and *Nerium indicum* on certain biochemical parameters of *Lymnaea acuminata*. *Phytot. Res.* **13**, 210-213

- ⁹² Krauspenhaar, R., Eschenburg, S., Perbandt, M. et al. (1999). Crystal structure of mistletoe lectin I from *Viscum album*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 418-424
- ⁹³ Niwa, H., Tonevitsky, A. G., Agapov, I. I. et al. (2003). Crystal structure at 3 Å of mistletoe lectin I, a dimeric type-II ribosome inactivating protein, complexed with galactose. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2739-2749
- ⁹⁴ Bruneton, J. *Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants*. Andover: Lavoisier publishing, 1999, 1119 pp.
- ⁹⁵ Pryme, I. F., Bardocz, S., Pusztai, A. et al. (2006). Suppression of growth of tumor cell lines in vitro and tumours in vivo by mistletoe lectins. *Histol. Histopathol.* **21**, 285-299
- ⁹⁶ Chambery, A., Di Maro, A., Monti, M. M. et al. (2004). Volkensin from *Adenia volkensii* (kilyambati plant), a type 2 ribosome-inactivating protein. *Eur. J. Biochem.* **271**, 108-117
- ⁹⁷ Ballerstadt, R., Evans, C., McNichols, R. et al. (2006). Concanavalin A for in vivo glucose sensing: A biotoxicity review. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 275-284
- ⁹⁸ Wang, H. (1998). Ribosome inactivating protein and lectin from Bitter melon (*Momordica charantia*) seeds: sequence comparison with related proteins. *Biochemical and Biophys. Research Communications*, **253**, 143-146
- ⁹⁹ Lin, J., Yan, F., Chen, F. (2003). Antitumor effects of curcumin from seeds of *Jatropha curcas*. *Acta Pharmacol. Sin.* **24**, 241-246
- ¹⁰⁰ Kilpatrick, D. C. (2002). Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 401-413
- ¹⁰¹ Satish, P. R., Suroliya, A. (2001). Exploiting lectin affinity chromatography in clinical diagnosis. *J. Biochem. Biophys. Methods* **49**, 625-640
- ¹⁰² Brinck, U., Karabiowska, M., Bosbach, R. et al. (1998). Detection of inflammation- and neoplasia-associated alterations in human large intestine using plant/invertebrate lectins, galectin-1 and neoglycoproteins. *Acta Anat.* **161**, 219-223
- ¹⁰³ Dwek, M. V., Ross, H. A., Streets, A. J. et al. (2001). Helix pomatia agglutinin-lectin binding oligosaccharides of aggressive breast cancer. *Int. J. Cancer* **85**, 79-85
- ¹⁰⁴ Gorelik, E., Galili, U., Raz, A. (2001). On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **20**, 245-277
- ¹⁰⁵ Munoz, A., Alonso, B., Alvarez, O. et al. (2003). Lectin typing of five medically important *Candida* species. *Mycoses* **46**, 85-89
- ¹⁰⁶ Zarovni, N., Vago, R., Solda, T. et al. (2007). Saporin as a novel suicide gene in anticancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **14**, 165-173
- ¹⁰⁷ Wiley, R. G., Kline, R. H. (2000). Neuronal lesioning with axonally transported toxins. *J. Neurosci. Methods.* **103**, 73- 82
- ¹⁰⁸ Beck, M. L. (2000). Red blood cell polyagglutination: clinical aspects. *Semin. Hematol.* **37**, 186-196
- ¹⁰⁹ Levene, C., Sela, R., Blat, J. et al. (1986). Intravascular hemolysis and renal failure in a patient with T-polyagglutination. *Transfusion.* **26**, 243-245
- ¹¹⁰ Multani, P. S., Grossbard, M. L. (1998). Monoclonal antibody-based therapies for hematologic malignancies. *J. Clin. Oncol.* **16**, 3691-3710
- ¹¹¹ Farah, R. A., Clinchy, B., Herrera, L. et al. (1998). The development of monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *Crit. Rev. Eucaryot. Gene Express* **8**, 321-356
- ¹¹² Engert, A., Martin, G., Amlot, P. et al. (1991). Immunotoxins constructed with anti-CD25 monoclonal antibodies and deglycosylated ricin A-chain have potent anti-tumour effect against human Hodgkin cells in vitro and solid Hodgkin tumours in mice. *Int. J. Cancer* **94**, 450-456
- ¹¹³ Michálek, J., Collins, R. H., Vitetta, E. S. (2003). Prevence reakce štěpu proti hostiteli u pacientů podstupujících alogenní transplantaci hematopetických kmenových buněk pomocí anti-CD25 imunotoxinu. *Klinická onkologie* **16**, 134-137
- ¹¹⁴ Schnell, R. (1998). Clinical trials with an anti-CD25 ricin A-chain experimental and immunotoxin (RTF5-SMPT-dgA) in Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **30**, 525-537
- ¹¹⁵ Kreitman, R. J. (1999). Responses in refractory hairy cell leukemia to a recombinant immunotoxin. *Blood* **94**, 3340-3348
- ¹¹⁶ LeMaistre, C. F. (1998). Phase I trial of a fusion-protein (DAB₃₈₉IL-2) in lymphomas expressing the receptor for interleukin-2. *Blood* **91**, 399-405
- ¹¹⁷ Mavroudis, D. A., Dermime, S., Mollrem, J. et al. (1998). Specific depletion of alloreactive T cells in HLA-identical siblings: a method for separating graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactions. *Br. J. Haemat.* **101**, 565-570
- ¹¹⁸ Park, J. H., Hyun, C. K., Shin, H. K. (1999). Cytotoxic effects of the components in heat-treated mistletoe (*Viscum album*). *Cancer Lett.* **139**, 207-213
- ¹¹⁹ Kienle, G.S., Berrino, F., Büssing, A. et al. (2003). Mistletoe in cancer, a systematic review on controlled clinical trials. *Eur. J. Med. Res.* **8**, 109-119

-
- ¹²⁰ Knopfl-Sidler, F., Viviani, A., Rist, L. et al. (2005). Human cancer cells exhibit in vitro individual receptiveness towards different mistletoe extracts. *Pharmazie*. **60**, 448-454
- ¹²¹ Balzarini, J. (2006). Inhibition of HIV entry by carbohydrate-binding proteins. *Antiviral Res.* **71**, 237-247
- ¹²² Balzarini, J., Van Laethem, K., Hatse, S. et al. (2004). Profile of resistance of human immunodeficiency virus to mannose-specific plant lectins. *J Virol.* **78**, 10617-10627
- ¹²³ Wang, H. H., Nq, T. B. (2001). Examination of lectins, polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases. *Planta Med.* **67**, 669-672
- ¹²⁴ Saavedra/Loyano, J., McCoig, C., Xu, J. et al. (2002). An anti-CD45RO immunotoxins kills latently infected human immunodeficiency virus (HIV) CD4T cells in the blood of HIV-positive persons. *J. Infect Dis.* **185**, 306-314
- ¹²⁵ Bies, Ch., Lehr, C.-M., Woodley, J. F. (2004). Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **56**, 425-435
- ¹²⁶ Silbernagl, S., Lang, F. *Atlas patofyziologie člověka*. Praha: Grada, 2001, 390 s.
- ¹²⁷ Kunzelmann, K., Sun, J., Schreiber, R. et al. (2005). Effects of dietary lectins on ion transport in epithelia. *Br. J. Pharmacol.* **8**, 1219-1226