

ВИСШ МЕДИЦИНСКИ ИНСТИТУТ — ВАРНА  
Катедра по обща биология  
Ръководител: доцент д-р М. Цонева-Манева

## ВЪРХУ НЯКОИ СВОЙСТВА НА ФИТОХЕМАГЛУТИНИНА ОТ *PHASEOLUS VULGARIS* И НЕГОВОТО ПРИЛОЖЕНИЕ В МЕДИЦИНСКАТА ЦИТОГЕНЕТИКА

М. Цонева-Манева

През последното десетилетие благодарение усъвършенствването на методите за цитогенетичното изследване на човека бяха отбелязани големи успехи в медицинската генетика (3, 4, 8, 9 и др.).

Особено място измежду тези методи заема използването на кратковременните култури от лимфоцитите и моноцитите на периферната кръв, които позволяват относително бързо и многократно изследване на човека в цитогенетичен аспект (6).

Идеята за получаването на култури от левкоцитите на периферната кръв на човека и използването им за нуждите на медицинската цитогенетика принадлежи на съветските изследователи Хрущов, Андреас, Илина-Какуева (1,2). Разработената от тях методика обаче не получи широко използване в практиката.

През 1960 г. беше установено от Nowell (6), че фитохемаглутинините от *Phaseolus vulgaris* и *Phaseolus communis* имат способността да стимулират митотичната активност на левкоцитите от периферната кръв на нелевкемично болен човек. Въз основа на това откритие беше разработена и методиката за получаване на кратковременни култури от левкоцитите от периферната кръв на човека.

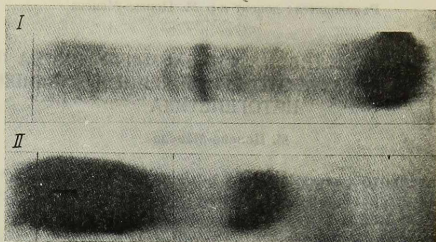
Фитохемаглутинините са вещества от растителен произход, които се срещат в големи концентрации в семената на растенията. Особено богати на фитохемаглутинини са семената на растенията от рода *Leguminosae*, към които спадат и видовете *Phaseolus vulgaris* и *Phaseolus communis*. Използуваните фитохемаглутинини от тези видове химично представляват мукопротеиди, които при ниско рН на средата се дисоциират на два компонента — протеин и полизахариди. Биологично активен от тези два компонента е протеинът. Химично чистият протеин — фитохемаглутинин, е няколко десетки пъти по-активен от мукопротеина фитохемаглутинин (7).

Ние си поставихме задачата да получим такъв препарат от протеин — фитохемаглутинин (П—ФГА), и да изучим неговите свойства с крайна цел използването му за нуждите на медицинската цитогенетика<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Този препарат се произвежда от фирмата „DIFCO“ в САЩ и е известен под името *Bactophytohemaaglutinin*. Препаратът се продава в две фирми: М — мукопротеин, търговски № 0528, и Р — протеин под търговски № 3110.

Като изходен материал използвахме семената на *Phaseolus vulgaris*, сорта на Сакс. Използувахме метода на Rigas и Osgood за получаването на П—ФГА (7).

Първоначално препаратът бе получен в суспензия в дестилирана вода, в която е неразтворим, и чрез последваща лиофилизация беше изолиран в аморфен вид. Същият е аморфно бяло вещество, добре разтворимо във физиологичен разтвор.



Фиг. 1. Электрофореграма на препарата фитохемаглютинин (I) и на нормален серум от заек (II). Мединал-вероналов пуфер, рН е 8,6, 18 часа

За изясняването химичната природа на получения от нас препарат беше направено спектрофотометрично и електрофоретично изследване.

При спектрофотометричното изследване бе установен един връх в поглъщането на ултравиолетовите лъчи с максимум в областта на дължината на вълните от 2800 Å, т. е. в зоната на спектъра за белтъчините.

При електрофоретичното изследване на препарата се установи, че той се състои от две фракции, едната от които се движи със скоростта на  $\gamma$ -глобулините на кръвния серум (I фракция), а втората — със скоростта на  $\alpha$ -глобулините (II фракция) (фиг. 1).

Последователно бяха изучени някои биологични свойства на препарата.

Първоначално бяха изучени аглутинационните свойства на препарата по отношение на следните обекти:

1. Човешки еритроцити от група А, В, 0 и еритроцити от заек, мишка, петел и жаба.

2. Клетки от човек, отглеждани в еднослойни култури от амнион (щам А—1), от нормален кожен епителий (щам 580) и от фибробласти (щам 558).

3. Ракови клетки, отглеждани в еднослойна култура от рак на стомаха у човек (щам Cave), от рак на матката у човек (щам Hela), рак на ларинкса у човек (щам HEp  $\neq$  2), както и ракови клетки от аденокарцинома на Ерлих у мишка и клетки от рак на овариума у плъх (щам О Я).

4. Чревни бактерии — *Bacterium coli* С—85, *Bacterium coli* К—12, *Bacterium prodigiosum* щам № 10, типични по своите културелни, морфологични и биохимични свойства.

При изучаване *хемоаглутинационните свойства* на получения препарат по отношение на различните видове еритроцити ние използвахме

разреждания на препарата във физиологичен разтвор и 5% еритроцитна суспензия. Към капка от различните разреждания на препарата прибавяхме капка от еритроцитните суспенсии. Отчитането на резултатите извършвахме двукратно: един час след престояване на стайна температура и след 24-часово престояване в хладилник при температура  $+4^{\circ}\text{C}$ .

При работата с клетъчен материал от еднослойните култури и асцитните тумори ние използвахме клетъчни суспенсии, приготвявани по следния начин: предварително сменяхме клетките от стената на стъклото, като за тази цел използвахме разтвора на Версен, и след трикратно промиване във физиологичен разтвор приготвявахме суспензия, съответстваща на микробния стандарт  $2^9$  микробни тела в мл.

При работата с бактериите използвахме същия метод както при използването на клетъчния материал.

Аглутинацията отчитахме по четирибалната система в зависимост от степента на аглутинацията и контролата. Като контрола използвахме смес от изходните клетъчни суспенсии и физиологичен разтвор. Всички разреждания се приготвяваха от начална концентрация 500 гами в мл на препаратата.

На второ място бяха поставени опити за проверка *стимулационните свойства* на препарата върху делението на левкоцитите от периферната кръв на човек. Поставени бяха опити за получаване на кратковременни култури от периферната кръв на човек по метода на Nowel (6). Към цялостната кръв от човек ние прибавяхме стерилния препарат до крайна концентрация 30—40 гами в мл. Стерилизацията на препарата извършвахме чрез филтрация през Зайц-филтър, тъй като последният се инактивира при висока температура. Аглютинираните еритроцити отделяхме чрез центрофугиране, а левкоцитите, суспендирани в кръвната плазма, поставяхме при посева в разреждане 1—2 милиона на мл. При култивирането използвахме хранителната среда 199. Концентрацията на кръвния серум в културите бе не по-малка от 20%. След тридневна инкубация на културите при температура  $37^{\circ}\text{C}$  се приготвяваха хистологични препарати за отчитане на резултатите по метода на Moorhead (5).

Няколко часа преди приготвяването на препаратите от културите беше прибавян към същите разтвори на колхицин до разреждане  $10^{-6}$  в мл, за да получим задържане на делящите се клетки в метафаза. Клетките също така бяха предварително подлагани на хипотонична обработка с 0,9% разтвор от натриев цитрат в продължение на 30 минути, което осигуряваше равномерно и поединично разположение на отделните хромозоми на клетката (абсолютно условие, за да бъдат последните преброявани и подробно изучени).

Бяха поставени също така и опити за определяне биологичните свойства на отделните фракции на препарата — аглутинационни и стимулационни.

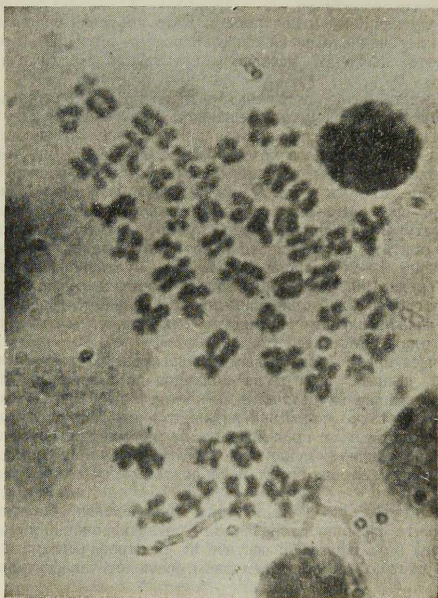
За тази цел бяха изрязвани частите на електрофореграмата и отделните фракции бяха екстрахирвани посредством физиологичен разтвор.

## Резултати

Резултатите от изучаване аглутинационните свойства на П—ФГА са представени в таблица 1. Както се вижда от таблицата, П—ФГА има силно изразени хемаглутинационни свойства. Те са особено силно изразени

по отношение на еритроцитите от мишка и значително по-слабо по отношение на еритроцитите от жаба. Освен това препаратът има и добре изразени цитоаглутинационни свойства към изследваните клетъчни шамове. Особено силно те са изразени към клетките от рак на стомаха, а сравнително по-слабо — към клетките от рак на матката и рак на ларинкса и към тези от нормален кожен епителий. Препаратът не аглутинира изследваните бактерии. Аглутинационните свойства на препарата се усилват на температура  $+4^{\circ}\text{C}$ .

При проверката на хемаглутинационните свойства на елуатите от отделените по електрофоретичен път I и II фракция ние установихме следното: I фракция аглутинира еритроцитите на човека дори при разреждане на препарата до 25 гами в мл, а II фракция няма такива свойства.



Фиг. 2. Хромозоми на човек от метафазна пластинка на бяла кръвна клетка в изкуствена култура от периферна човешка кръв, получена чрез стимулиране с протеин-фитохемаглутинин, изолиран от семената на *Phaseolus vulgaris*, сорта на Сакс. Оцветяване с ацет-орсеин

Таблица 1  
 Резултати от изследванията на аглутинационните свойства на  
 фитохемаглутинаина от *Phaseolus vulgaris*, сорта на Сакс

Вид клетки	Разреждане на фитохемаглутинаина										Конт- рол
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	
Еритроцити от човек :											
А група	++++	++++	++++	++++	++++	++	±	—	—	—	—
В група	++++	++++	++++	++++	++++	+++	±	—	—	—	—
0 група	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	±	—	—	—
0 група	++++	++++	++++	++++	++++	±	—	—	—	—	—
0 група	++++	++++	++++	++++	++++	++++	±	—	—	—	—
Еритроцити от заек	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—	±	—	—	—
Еритроцити от мишка	+++	+++	+++	+++	+++	++++	++++	++	±	—	—
Еритроцити от петел	+++	+++	++++	++++	+++	+++	—	—	—	—	—
Еритроцити от петел	+++	+++	+++	++++	+++	+++	±	—	—	—	—
Еритроцити от жаба	+++	+++	+++	±	—	—	—	—	—	—	—
Клетки от ам- нион на човек	++++	++++	++++	++++	++	+	±	—	—	—	—
Клетки от ам- нион на човек	++++	++++	++++	++++	+++	+++	±	—	—	—	—
Фибрилобласти от човек	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—	—	—	—
Фибрилобласти от човек	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—	—	—	—	—
Кожен епите- лний от човек	++	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—
Кожен епите- лний от човек	+++	++	++	++	—	—	—	—	—	—	—
Рак на стома- ха у човек	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—	—	—	—
Рак на стома- ха у човек	++++	++++	++++	++++	++++	+++	±	++	—	—	—
Рак на матка- та у човек	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Рак на матка- та у човек	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Рак на ларин- кса у човек	++	++	+	+	±	—	—	—	—	—	—
Рак на ларин- кса у човек	++++	+++	++	++	—	—	—	—	—	—	—
Аденокарци- ном у мишка	++++	++++	++++	++++	+++	++	—	—	—	—	—
Аденокарци- ном у мишка	++++	++++	++++	++++	+++	++	—	—	—	—	—
Рак на ова- риума у плъх	++++	++++	++++	++++	+++	+++	±	—	—	—	—
Рак на ова- риума у плъх	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+	—	—	—	—
Бактерии :	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Coli C—85	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Coli K—12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Prodigiosum щам № 10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Резултатите са двукратно отчитани: след едночасово престояване на стайна температура и след 24-часово престояване на температура +4°C.

В получените препарати от поставените опити за култивиране на левкоцитите от периферната кръв на човек бяха наблюдавани два вида клетки — подобни на моноцитите и лимфоцитите, както и клетки в процес на деление. Поради използването на колхицин преди обработването на клетъчния материал от културите бяха наблюдавани предимно метафазни пластинки в получените препарати. Предварителната хипотонична обработка на клетките помогна за получаването на метафазни пластинки с добре разположени,

удобни за преброяване и изучаване хромозоми (фиг. 2). Подобна беше картината и на препаратите, получени от културите, стимулирани с отделните фракции на препарата.

Тези наблюдения определено показват, че полученият фитохемаглутинин от *Phaseolus vulgaris*, сорта на Сакс, има способност да стимулира делението на моноцитите и лимфоцитите от периферната кръв и може да бъде използван за получаването на кратковременни култури от периферната кръв на човека за цитогенетични цели.

### З а к л ю ч е н и е

Изолираният от нас фитохемаглутинин от семената на *Phaseolus vulgaris* е протеин, който при електрофореза на хартия се разделя на две фракции: едната в областта на  $\gamma$ -глобулините на кръвния серум, а другата — в областта на  $\alpha$ -глобулините. Същият препарат е бяло аморфно вещество, неразтворимо във вода, но добре разтворимо във физиологичен разтвор.

Полученият препарат има силно изразени аглутинационни свойства както към еритроцитите на различни представители — човек, заек, мишка, петел и жаба, така и към клетки от нормален и злокачествен произход. Освен това той стимулира към дележ някои от белите кръвни клетки на периферната кръв — моноцити и лимфоцити.

Наблюдава се известна дисоциация в свойствата на двете фракции на препарата. Първата от тях има както аглутинационни, така и стимуляционни свойства, докато във втората са налице само стимуляционни такива. Установените свойства на получения препарат дават основание той да бъде използван за нуждите на медицинската цитогенетика.

### Л и т е р а т у р а

1. Хрущов Г. К., Андреас А. Г., Илина-Какуева Б. И.: Журн. експер. биологии, т. II, вып. I, стр. 445, 1931. — 2. Хрущов Г. К.: Тр. Медико-биолог. ин-та, т. III, стр. 213, 1934. — 3. Ford E., Hamerton J. L.: *Stain Tech*, 31, p. 247, 1956. — 4. Ford E., Hamerton J. L.: *Nature*, 178, p. 1020, 1956. — 5. Moorhead P. S. and all.: *Experimental cell Research*, v. 20, Nr. 3, p. 613, 1960. — 6. Nowell P. C.: *Cancer Research*, v. 20, p. 462, 1960. — 7. Rigas D. A., Osgood E. E.: *J. Biol. Chem.*, v. 212, p. 607, 1955. — 8. Tjio J. H., Levan A.: *Anais Estacian Exper., Aula Dei*, 3, 225, 1954. — 9. Tjio J. H., Levan A.: *Hereditas*, 42, 1, 1956.

ВМСШИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ — ВАРНА  
Кафедра общей биологии  
Зав. кафедрой : доцент д-р М. Цонева-Манева

## О НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВАХ ФИТОГЕМАГЛУТИНИНА ИЗ PHASEOLUS VULGARIS И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНСКОЙ ЦИТОГЕНЕТИКЕ

*М. Цонева-Манева*

Автор дает результаты исследований некоторых химических и биологических свойств фитохемаглютина из семян *Phaseolus vulgaris* сорта Сакса. Изолированный по методу Rigas и Osgood препарат оказался белым аморфным веществом, нерастворимым в дистиллированной воде и хорошо растворимым в физиологическом растворе. Спектральная характеристика препарата говорит об его белковом характере, а электрофорез на бумаге показывает, что он состоит из двух фракций: одна расположена в области  $\gamma$ -глобулинов, а другая в области  $\alpha$ -глобулинов сыворотки крови.

Установлено, что полученный препарат имеет сильно выраженные гемоглутинационные свойства к некоторым клеткам нормального и злокачественного происхождения.

Полученный препарат обладает свойством стимулировать деление моноцитов и лимфоцитов в периферической крови человека, в связи с чем он может быть использован при получении культур из этих клеток для цитогенетического анализа.

Higher Medical Institute — Varna  
Chair of General Biology  
Chief of the Chair : M. Tzoneva-Maneva

## ON CERTAIN PROPERTIES OF PHYTOHEMAGGLUTININ OF PHASEOLUS VULGARIS AND ITS APPLICATION IN MEDICAL CYTOGENETICS

*M. Tzoneva-Maneva*

### SUMMARY

The results are reported of the study of certain chemical and biological properties of the extracted from the seeds of *Phaseolus vulgaris*, Sax type, phytohemagglutinin. The preparation isolated after the Rigas and Osgood method, represents a white amorphous substance, insoluble in distilled water and readily solved in physiological solution. The spectral characteristics of the preparation reveals its protein nature, and the paper electrophoresis shows that it consists of two fractions: one is situated in the  $\gamma$ -globulin region, and the other — in the  $\alpha$ -globulin region of blood serum.

It is established that the preparation obtained displays a strongly pronounced hemagglutination properties towards the erythrocytes of man, rabbit, mouse, rooster and frog. Furthermore, the preparation shows strongly manifested cytohemagglutination properties with regard to certain cells of normal and malignant nature.

The preparation obtained has the property of stimulating the division of monocytes and lymphocytes in the peripheral blood of man, on account of which it is very appropriate for use in obtaining cultures for cytogenetics analysis.