

НАУЧНЫЕ АСПЕКТЫ РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭНЕРГОСБЕРЕЖЕНИЕ

БЕЛКОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕИНАЗ ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

В.И. Домаш¹, О.А. Иванов¹, М.А. Белозерский², Я.Е. Дунаевский²,
Т.П. Шарпио¹, С.А. Забрейко¹

¹*Институт экспериментальной ботаники НАН Беларуси, Минск,
valdomash@mail.ru*

²*НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ, Москва,
mbeloz@belozersky.msu.ru*

Введение. Дикорастущие виды растений являются богатейшим источником биологически активных веществ, представляющих интерес для практического применения. Среди них особое внимание уделяется белкам-ингибиторам протеолитических ферментов. Основным свойством этих белков является способность образовывать обратимые устойчивые комплексы с ферментами, лишённые каталитической активности. Высокое содержание ингибиторов протеиназ в запасующих органах предполагает их роль в качестве запасных белков, а также участие в регуляции активности эндогенных протеиназ, что предотвращает преждевременный распад белковых резервов. Ингибиторы протеиназ также выступают в качестве защитных агентов, нейтрализующих активность протеиназ патогенных микроорганизмов. Известно, что болезни, вызываемые фитопатогенными микроорганизмами и насекомыми-вредителями, наносят большой урон урожаю сельскохозяйственных культур. В комплексе свойств, определяющих степень вирулентности фитопатогенов и вредителей, существенная роль принадлежит их гидролитическим ферментам, при помощи которых эти организмы, перерабатывая ткани растения хозяина, обеспечивают себе условия для роста и дальнейшего развития [1-3].

Биохимические исследования показывают, что растения синтезируют собственные защитные вещества в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды. Но скорость их наработки и количество могут быть недостаточными для защиты от атаки фитопатогенов и насекомых-вредителей. Поэтому выделение таких веществ из природного сырья и получение на их основе специальных препаратов для обработки растений могут обеспечить повышение устойчивости и урожайности сельскохозяйственных культур

Препараты ингибиторов протеолиза широко используются и в медицине [4]. Складывается мнение, что ингибиторы протеолитических ферментов можно рассматривать как полифункциональные белки [5].

Нам представляло интерес выявить перспективные дикорастущие виды растений, значимые с точки зрения содержания ингибиторов протеолиза, и исследовать возможности их практического использования.

Объекты и методы исследования. Объектами исследований служили дикорастущие виды растений сем. *Leguminosae*, *Compositae* и представители флоры Беларуси из некоторых других семейств растений.

Активность белков-ингибиторов трипсина определяли по уменьшению скорости гидролиза субстрата ферментом в присутствии белков-ингибиторов [6]. В качестве субстрата использовали синтетический N α -бензоиларгинин п-нитроанилид (БАПА)

Статистическая обработка данных проводилась с использованием компьютерных программ “Stadia” и “Microsoft Excel”.

Результаты и их обсуждение. Скрининг дикорастущих растений Беларуси, принадлежащих к различным семействам, на присутствие белков-ингибиторов протеиназ, позволил выявить вариабельность данного показателя как между видами, так и в зависимости от локализации этих белков (таблица 1).

Таблица 1. – Активность ингибиторов протеиназ у дикорастущих растений Беларуси

№№ пп	Вид растений	Активность ингибиторов трипсина, ИЕ/г сух. массы
1	2	3
1.	<i>Achillea millefolium</i> (тысячелистник лекарственный) листья корневище	12,77 \pm 0,20 22,69 \pm 0,83
2.	<i>Agrimonia eupatoria</i> L. (репешок аптечный), листья	124,6 \pm 0,97
3.	<i>Arnica montana</i> рника горная), листья	141,27 \pm 4,32
4.	<i>Algododium podagraria</i> (сныть обыкновенная), листья корневище	14,96 \pm 0,21 16,71 \pm 0,11
5.	<i>Cirsium arvense</i> (осот полевой), листья	38,55 \pm 1,91
6.	<i>Echinaceae purpurea</i> (эхинацея пурпурная), листья корневище	210,6 \pm 3,96 239,6 \pm 7,51
7.	<i>Epilobium angustifolium</i> L. (Иван-чай), листья	136,33 \pm 0,84
8.	<i>Gnaphalium uliginosum</i> L. (сушеница топяная), листья	47,90 \pm 2,92
9.	<i>Helianthus tuberosus</i> (топинамбур), листья корневище	4,16 \pm 0,01 1,95 \pm 0,04
10.	<i>Inula britannica</i> L., (девясил британский), листья корневище	5,51 \pm 0,17 3,74 \pm 0,07
11.	<i>Lathyrus niger</i> (чина черная), семена	3,7 \pm 0,27
12.	<i>Potentilla alba</i> L. (лапчатка белая), листья корни	28,96 \pm 0,21 162,00 \pm 0,12
13.	<i>Solidago virgaurea</i> L. (золотарник обыкновен- ный), листья корневище	41,94 \pm 1,99 132,50 \pm 2,98
14.	<i>Solidago canadensis</i> , (золотарник канадский) листья корневище	18,24 \pm 0,75 121,43 \pm 2,21

Окончание таблицы 1

1	2	3
15.	<i>Tanacetum vulgare</i> (пижма обыкновенная), листья корневище	21,95 ±0,45 28,35± 0,34
16.	<i>Taraxacum officinale</i> Wigg. (одуванчик лекарственный) листья корневище	4,39 ±0,01 2,80 ± 0,10
17.	<i>Tussilago farfara</i> L. (мать и мачеха) листья корневище	3,44 ±0,03 5,17 ±0,01
20.	<i>Trifolium repens</i> (клевер ползучий) листья	2,21 ±0,01
21.	<i>Trigonella foenum graecum</i> (пажитник сенной), листья семена	24,15 ±0,02 44,15±0,04
22.	<i>Urtica dioica</i> L. (крапива двудомная). листья корневище	2,94± 0,01 172,00±0,10

Согласно данным таблицы 1, уровень активности ингибиторов протеиназ (трипсина) варьирует в листьях различных видов растений от 1,55 до 210,6 ИЕ (эхинацея пурпурная), а в корневище – от 2,8 (одуванчик лекарственный) до 239,6 (эхинацея пурпурная). Следует отметить и довольно высокое содержание ингибиторов трипсина в корневище золотарника обыкновенного, золотарника канадского, лапчатки белой, крапивы двудомной и др.

Проведенные исследования дали возможность разработать способ получения ингибиторов протеиназ из корневищ и листьев перспективных видов растений. Он включал экстракцию белков, осаждение балластных белков, высаливание сульфатом аммония при 80%-ном насыщении, ионообменную и гелевую хроматографии. Конечным этапом служил диализ и лиофилизация препарата.

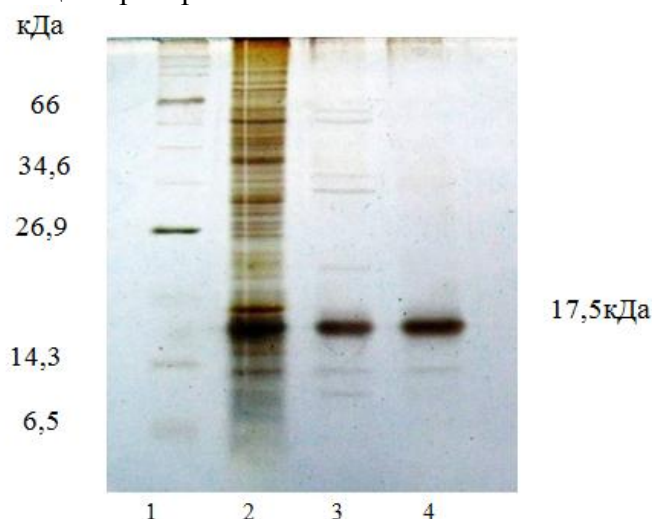


Рисунок – Электрофорез белков в 15% ПААГ в процессе всех стадий очистки ингибитора трипсина из *Solidago canadensis*. 1 – белки-маркеры, 2 – грубый экстракт; 3 – ионообменная хроматография; 4 – гель-хроматография

Нами получены препараты из корневищ эхинацеи пурпурной, золотарника канадского, крапивы двудомной и др. Исследования физико-химических свойств препаратов показали, что их молекулярная масса лежит в области 17-25 кДа. Выделенные белки обладают термо- и рН-устойчивостью. В качестве примера на рисунке приведена электрофореграмма очищенного до гомогенного состояния ингибитора трипсина из корневищ золотарника канадского.

Молекулярная масса гомогенного препарата составляет 17,5 кДа.

Наши исследования позволили установить и способность ингибиторов протеиназ из корневищ золотарника влиять на рост фитопатогенных грибов. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Влияние ингибитора трипсина из золотарника канадского на рост мицелия фитопатогенов в жидкой культуре

Концентрация ингибитора	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
	масса, г	% угнетения	масса, г	% угнетения
Контроль (вода)	7,64 ± 0,21	–	13,52 ± 0,24	–
80 мкг/мл	2,33 ± 0,02	69,5	3,90 ± 0,15	71,2
160 мкг/мл	1,64 ± 0,01	78,5	2,00 ± 0,08	85,2

Как видно из таблицы 2, белок в концентрации 160 мкг/мл снижал рост и развитие мицелия исследованных грибов на 78,5% и 85,2%. Угнетающее действие на фитопатогенные микроорганизмы оказывали препараты из корней крапивы двудомной, эхинацеи пурпурной и лапчатки белой. В опыте по действию препаратов на рост и развитие фитопатогена показана способность ингибиторов протеаз из корневища лапчатки белой снижать диаметр роста колоний фитопатогенов на 40 (*Colletotrichum gl.*) -100% (*Fusarium avenacium*, *Botrytis cinerea*). Установлено также, что препарат в концентрации 78 мкг/мл угнетает рост опухолевых клеток по отношению к контролю на 87,5%.

Совместно с Институтом биоорганической химии НАН Беларуси нами проведены исследования антикоагулянтных свойств препарата из корневищ эхинацеи. В опыте на крысах установлено, что препарат при внутривенном введении на 81% увеличивал по сравнению с контролем тромбиновое время крови и на 12% тромбопластиновое время. Результаты исследований позволили получить средство, защищенное патентом, расширяющее ассортимент препаратов растительного происхождения с повышенной степенью очистки, обладающее антикоагулянтным действием, которое может быть использовано в медицине.

Заключение. Результаты исследований показали разнообразие уровня активности ингибиторов протеиназ среди дикорастущих видов растений флоры Беларуси. Показана широкая специфичность их активности. Выявлены наиболее перспективные по содержанию ингибиторов протеиназ виды растений. Разработаны методы выделения и очистки препаратов. Установлены их антикоагулянтные и фунгицидные эффекты. Полученные результаты вносят весомый вклад в расширение представлений о физико-химических и биологических свойствах системы протеолиза и показывают возможность использования ингибиторов протеиназ из перспективных видов растений для разработки медицинских препаратов и средств защиты растений от патогенной микрофлоры.

Работа поддержана грантами БРФФИ № Б18Р-053 и РФФИ № 18-54-00008-Бел.

Список использованных источников

1. Мосолов В.В., Валуева Т.А. Растительные белковые ингибиторы протеолитических ферментов. Под ред. Кретовича В.Л. М., – 1993. 207 с.

2. Мосолов, В.В., Валуева Т.А. Ингибиторы протеиназ и их функции у растений (обзор). // Прикл. биохим. и микробиол. – 2005. – Т. 41, № 3. – С. 261–282.

3. Дунаевский, Я.Е., Цыбина Т.А., Белозерский М.А.. Ингибиторы протеаз из семян высших растений как фактор устойчивости к патогенной микрофлоре. // Агроэкология. – 2000, № 10. – С. 56-61.

4. Домаш В.И., Шарпио Т.П., Забрейко С.А. Растительные ингибиторы протеиназ и перспективы их использования в медицине. // Весці НАН Беларусі. Сер. мед. навук. – 2008. – № 1. – С. 58-63.

5. Мосолов В.В., Григорьева Л.И., Валуева Т.А. Ингибиторы протеиназ из растений как полифункциональные белки (обзор). // Прикл. биохим. и микробиол. – 2001. – Т. 37, № 6, – С.643-650.

6. Гофман Ю.Я., Вайсблай И. М.. Определение активности ингибиторов трипсина в семенах гороха. // Прикл. биохим. и микробиол. – 1975. Т.11, вып.5. – С. 777-787.