

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТ- И МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗ ТИМОЛСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *ГУБОЦВЕТНЫЕ* ПО ФАЗАМ ВЕГЕТАЦИИ

© 2002

И.Ф. Шаталаев, З.Е. Мащенко,¹ В.А. Куркин,² П.П. Пурыгин, Ю.П. Зарубин³

Методом электрофореза в полиакриламидном геле исследованы состав и активность молекулярных форм лактат- и малатдегидрогеназ душицы обыкновенной, монарды дудчатой и тимьяна ползучего (чабрец) по фазам вегетации. Установлена множественность молекулярных форм указанных ферментов и фракций белка, находящихся в прямой зависимости от фаз вегетации растений и сроков хранения лекарственного растительного сырья. Обсуждается возможность применения полученной информации при разработке рекомендаций в части времени сбора, сроков хранения и идентификации исследуемых лекарственных растений.

Введение

Фитопрепараты антимикробного, противовоспалительного и отхаркивающего действия успешно конкурируют на фармацевтическом рынке с их синтетическими аналогами. В эфирных маслах исследуемых лекарственных растений обнаружено более тридцати веществ, среди которых преобладают тимол и карвакрол. В меньших количествах представлены α -пинен, лимонен, терпинеол, борнеол и некоторые другие вещества, обладающие в индивидуальном виде и в смеси с другими веществами выраженным отхаркивающим и противовоспалительным действием при лечении заболеваний дыхательных путей [1].

В настоящее время продолжается поиск в области изучения химического состава действующих веществ названных растений. Однако в доступной литературе крайне мало сведений в части биохимических исследований, особенно ферментов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. Нам представляется важным владеть информацией о составе, структурной организации и динамике активности терминального фермента гликолиза лактатдегидрогеназы (ЛДГ), ключевого фермента

¹ Шаталаев Иван Федорович, Мащенко Зинаида Евгеньевна, кафедра химии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета, 443001, Самара, ул. Арцыбушевская, 171.

² Куркин Владимир Александрович, кафедра фармакогнозии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета, 443079, Самара, ул. Гагарина, 18.

³ Пурыгин Петр Петрович, Зарубин Юрий Павлович, кафедра органической химии Самарского государственного университета, 443011, Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

цикла трикарбоновых кислот малатдегидрогеназы (МДГ) и фракций белка по фазам вегетации, поскольку зачастую приходится решать следующие задачи (проблемы):

- 1) идентификация лекарственного растительного сырья;
 - 2) соответствие времени сбора с требованием Государственной фармакопеи;
 - 3) установление примесей других лекарственных растений.
- Это определило цель и содержание данных исследований.

Материалы и методы исследований

Объекты исследований — высушенная трава монарды дудчатой, чабреца и душицы обыкновенной. Ферментные образцы получали дезинтеграцией клеток сырья в механическом дезинтеграторе при 4 °С с последующей солиubilизацией тритоном X-100. Гомогенат центрифугировали при 8000 об/мин 10 мин, в супернатанте определяли молекулярные формы (МФ) ЛДГ, МДГ и фракции белка. Полученные образцы в объеме 50 мкл в смеси с 40% раствором сахарозы наносили на линию старта. В качестве электродного буфера использовали 1 М трис-ЭДТА-боратный буфер с рН 9.2. Электрофорез проводили при 5.0 мА/см в первые 30 мин, а затем 10.0 мА/см до окончания электрофореза. МФ ферментов выявляли феназинметасульфат-тетразолиевой реакцией в средах следующего состава:

Для МФ ЛДГ: водные растворы НАД (1 мг/мл) — 40 мл, нитросиний тетразолиевый (1 мг/мл) — 25 мл, 1 М раствор лактата лития с рН 7.0 — 10 мл, феназинметасульфат (1 мг/мл) — 4 мл, 0.2 М трис-НСl буфер с рН 7.1 — до 100 мл. Инкубировали 12 ч при 37 °С. МФ ЛДГ выявлялись в виде темно-синих зон.

Для МФ МДГ: водные растворы НАД (1 мг/мл) — 40 мл, нитросиний тетразолиевый (1 мг/мл) — 30 мл, 1 М раствор малата натрия с рН 7.0 — 10 мл, феназинметасульфат (1 мг/мл) — 4 мл, 0.2 М трис-НСl буфер с рН 7.1 — до 100 мл. Инкубировали 12 ч при 37 °С. МФ ЛДГ выявлялись в виде темно-синих полос [3].

Фракции белка окрашивали 1% раствором амидочерного В в 7% уксусной кислоте [2].

Относительную активность МФ исследуемых ферментов устанавливали путем прямой денситометрии на анализаторе фореграмм АФ-1.

Результаты исследований и их обсуждение

Установили следующий спектр МФ МДГ: до цветения выявлено по одной МФ у всех исследуемых растений, причем по относительной электрофоретической подвижности (ОЭП) они соответствуют МДГ-1 (табл. 1). Ранее полученные сведения о структурной организации и активности МФ МДГ свидетельствуют, что активизация МДГ-1 указывает на преобладание анаэробных процессов обмена над аэробными. Логично предположить, что до цветения в растениях преобладают биосинтез и накопление биологически активных соединений над процессами энергетического обмена.

Во время цветения МДГ представлена уже тремя МФ: МДГ-1, МДГ-2 и МДГ-3, что не противоречит литературным данным о составе и организации МДГ растений и микроорганизмов [4]. При этом активными в равной степени стано-

вятся все МФ, что указывает на стабилизацию процессов обмена и выравнивание скорости реакции окисления-восстановления малата.

После цветения и вплоть до отмирания МДГ исследуемых растений представлена преимущественно высокомолекулярной МДГ-3. По ОЭП МДГ-3 монарды дудчатой несколько отличается от МДГ-3 чабреца и душицы обыкновенной, что свидетельствует о незначительной разности в молекулярных массах МФ. Полученные данные указывают на преобладание процессов окисления малата и в целом на мобилизацию цикла трикарбоновых кислот.

Таблица 1

Молекулярные формы малатдегидрогеназы лекарственных растений в различные фазы вегетации

Фаза вегетации	Монарда дудчатая		Душица обыкновенная		Чабрец	
	ОЭП	МФ	ОЭП	МФ	ОЭП	МФ
До цветения	0.5	МДГ-1	0.72	МДГ-1	0.69	МДГ-1
Во время цветения	0.38	МДГ-3	0.31	МДГ-3	0.36	МДГ-3
	0.54	МДГ-2	0.46	МДГ-2		
	0.78	МДГ-1	0.62	МДГ-1		
После цветения	0.25	МДГ-3	0.33	МДГ-3	0.33	МДГ-3

ЛДГ представлена четырьмя МФ, причем до цветения выявлена только ЛДГ-1 и ЛДГ-5. По ОЭП они практически не отличаются, что указывает на их идентичный субъединичный состав. По активности ЛДГ-5 превосходит ЛДГ-1, что характеризует лимитирование процессов обмена кислородом (табл. 2). Это подтверждается ранее полученными данными в экспериментах с микроорганизмами [4].

Таблица 2

Молекулярные формы лактатдегидрогеназы лекарственных растений в различные фазы вегетации

Фаза вегетации	Монарда дудчатая		Душица обыкновенная		Чабрец	
	ОЭП	МФ	ОЭП	МФ	ОЭП	МФ
До цветения	0.18	ЛДГ-1	0.18	ЛДГ-1	0.18	ЛДГ-1
	0.64	ЛДГ-5	0.72	ЛДГ-5	0.55	ЛДГ-5
Во время цветения	0.42	ЛДГ-2	0.4	ЛДГ-2	0.45	ЛДГ-2
	0.58	ЛДГ-3	0.6	ЛДГ-3	0.63	ЛДГ-3
После цветения	0.31	ЛДГ-1	0.33	ЛДГ-1	0.36	ЛДГ-1

Во время цветения обнаруживаются две МФ формы фермента, по локализации на электрофореграммах и ОЭП они соответствуют ЛДГ-2 и ЛДГ-3. Полученные данные предполагают продолжение экспериментальных исследований и более детальное теоретическое обоснование, однако уже сейчас можно говорить о достижении стационарной фазы развития растений. Не выявлена ни в одной серии экспериментов ЛДГ-4, возможно, она замаскирована в области ЛДГ-3, что будет

установлено в дальнейшем методом двумерного электрофореза. После цветения активность фермента локализуется в области ЛДГ-1.

Спектр фракций белка по фазам развития представлен в табл. 3. По ОЭП это белки с молекулярной массой от 30 до 80 кДа. В процессе развития растений по фазам число фракций увеличивается, что указывает на биосинтез белка и накопление биологически активных соединений. При этом на всех фазах вегетации присутствовала фракция белка с ОЭП около 0.6, что может быть идентификационным признаком для лекарственного растительного сырья.

Таблица 3

**Фракционный состав белков лекарственных растений
в различные фазы вегетации**

Фаза вегетации	Монарда дудчатая (ОЭП)	Душица обыкновенная (ОЭП)	Чабрец (ОЭП)
До цветения	0.55	0.6	0.72
	0.82		0.91
Во время цветения	0.42	0.38	0.42
	0.58	0.54	0.5
	0.67		
После цветения	0.35	0.33	0.36
	0.65	0.67	0.69

Полученные данные имеют определенное значение для решения поставленных задач, нам представляется возможным применение информации о структурной организации некоторых ферментов и фракций неспецифического белка для идентификации и качественного анализа лекарственного растительного сырья.

Литература

- [1] Николаевский В.В., Еременко А.Е., Иванов И.К. Биологическая активность эфирных масел. М.: Медицина, 1987. 144 с.
- [2] Шаталаев И.Ф. Фракционный состав белков активного ила очистных сооружений нефтеперерабатывающего завода // Гидробиологический журнал. 1992. № 5. С. 28–32.
- [3] Шаталаев И.Ф., Телитченко М.М. Методы выявления молекулярных форм некоторых оксидоредуктаз микроорганизмов активного ила // Гидробиологический журнал. 1992. № 2. С. 70–74.
- [4] Шаталаев И.Ф., Телитченко М.М., Волгина Т.Б. Динамика молекулярных форм лактат-, малат- и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназ в моделях экосистемы активного ила // Гидробиологический журнал. 1992. № 3. С. 32–39.

COMPOSITION AND ACTIVITY OF MALATE AND LACTATE DEHYDROGENASE OF MEDICINAL PLANTS OF THE *LAMIACEAE* FAMILY IN THE VEGETATION PERIOD

© 2002

I.F. Shatalaev, Z.Ye. Mashchenko⁴, V.A. Kurkin⁵, P.P. Purygin, Yu.P. Zarubin⁶

The method of electrophoresis in polyacrylamid gel is used to study the composition and activity of malate and lactate dehydrogenases of grasses *Origanum vulgare* L., *Thymus serpyllum* M. and *Monarda fistulosa* L. in vegetation period. Different molecular forms of studied enzymes and fractions of proteins are determined in the direct dependence of vegetation period and storage period. Usability of the obtained data is discussed with relation to the development of recommendations on the time for gathering, expiry terms and identification of medicinal plants.

Поступила в редакцию 9/XII/2002.

⁴ Shatalaev Ivan Fyodorovich, Mashchenko Zinaida Yevgen'yevna, Dept. of Chemistry of Pharmaceutical Faculty, Samara State Medicinal University, Samara, 443001, Russia.

⁵ Kurkin Vladimir Aleksandrovich, Dept. of Pharmacognosy of Farmaceutical Faculty, Samara State Medicinal University, Samara, 443079, Russia.

⁶ Purygin Pyotr Petrovich, Zarubin Yury Pavlovich (zarubin@ssu.samara.ru), Dept. of Organic Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.