

УДК 616.71-003.93/ 577

DOI 10.34014/2227-1848-2019-2-122-127

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТОВ ЧАБРЕЦА И ЦВЕТКОВ РОМАШКИ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНА

Е.Б. Артющкова, Ю.В. Фурман, А.В. Аниканов

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, Россия

e-mail: prof.furman@mail.ru

Развитие патологических процессов в организме человека и животных сопровождается разбалансировкой регуляторных механизмов, в частности состояния ферментов – протеиназ и их регуляторов. Эндогенные регуляторы, ингибиторы и активаторы зачастую не справляются со своей задачей по поддержанию баланса в системе «фермент-субстрат-ингибитор (активатор)», что приводит к возникновению деструктивных воспалительных, иммунных реакций, нарушению гомеостаза. Поэтому поиск пока еще неизвестных регуляторов протеиназ представляет собой важный шаг к созданию новых препаратов для лечения заболеваний, связанных с изменениями, происходящими в процессах протеолиза. В связи с этим нами предложена гипотеза о регуляторной роли лекарственных трав, широко используемых как в традиционной, так и в народной медицине. По нашему предположению, химические соединения, содержащиеся в лекарственных травах, вероятно, могут как активировать, так и ингибировать процессы протеолиза в клетках.

Целью исследования было изучение воздействия в модельных опытах воспалительного процесса, влияния регуляторной активности водных экстрактов чабреца и ромашки на активность протеолитического фермента трипсина.

Материалы и методы. В исследованиях использовали «Трипсин кристаллический», чабрец и цветки ромашки. Определение активности трипсина проводили по методу, разработанному Ансоном.

Результаты. Получены новые сведения о влиянии водного экстракта лекарственных трав, в частности чабреца и цветков ромашки, на активность протеолитического фермента трипсина. Данная информация позволит повысить эффективность использования лекарственных растений в лечении воспалительных процессов.

Выводы. Экстракты чабреца и цветков ромашки оказывают активирующее действие на протеолитический фермент трипсин. Уровень активации трипсина пропорционален количеству экстрактов, вносимому в инкубационную среду. Экстракт чабреца оказывает более выраженное влияние на активность трипсина.

Ключевые слова: трипсин, чабрец, цветки ромашки, протеолитическая активность, энзимы.

Введение. Жизнедеятельность любого организма обеспечивается сложной совокупностью химических реакций, осуществляемых ферментативными системами органов и тканей, и любое изменение в их взаимодействии может повлечь серьезные последствия. Известно, что развитие патологических процессов в организме человека и животных сопровождается разбалансировкой регуляторных механизмов, в частности состояния ферментов – протеиназ и их регуляторов. Эндогенные регуляторы, ингибиторы и активаторы зачастую не справляются со своей задачей по поддержанию баланса в системе «фер-

мент-субстрат-ингибитор (активатор)», что приводит к возникновению деструктивных воспалительных, иммунных реакций, нарушению гомеостаза [1–3].

Поэтому поиск пока еще неизвестных регуляторов протеаз не только позволяет получить новые знания о процессах регулирования метаболизма клетки, но и представляет собой важный шаг к созданию новых препаратов для лечения заболеваний, связанных с изменениями, происходящими в процессах протеолиза. В связи с этим нами предложена гипотеза о регуляторной роли лекарственных трав, широко используемых как в традици-

онной, так и в народной медицине. По нашему предположению, химические соединения, содержащиеся в лекарственных травах, вероятно, могут как активировать, так и ингибировать процессы протеолиза. Высокий уровень активности протеолитических ферментов востребован на первых стадиях развития воспалительного процесса, а в дальнейшем, после нейтрализации источника воспалительного процесса, необходимо снижение активности протеолитических ферментов [4–6].

Одними из растений, влияющих на процессы протеолиза, являются чабрец и ромашка. Их лечебные свойства неоспоримы и признаны как официальной, так и народной медициной. Применение этих трав ввиду их терапевтической универсальности эффективно при терапии множества болезней и неблагоприятных состояний. Польза растений объясняется их богатым составом. Они нашли применение в комплексной терапии при инфекционно-воспалительных заболеваниях лор-органов и полости рта, а также ряда желудочно-кишечных заболеваний. В ряде лекарственных препаратов чабрец и ромашка выступают как основное действующее вещество. Также эти травы эффективны в виде отваров и настоев как успокоительные средства и антисептики, они улучшают переваривание тяжелой жирной пищи, ускоряя обмен веществ [7, 8].

Следует отметить, что вопросу взаимодействия компонентов лекарственных трав с протеолитическими ферментами в современной литературе уделено незначительное внимание. В то же время такого рода взаимодействие представляет интерес в рамках способности этих соединений регулировать, ингибировать или активировать активность ключевых энзимов [9].

Цель исследования. Изучение в модельных опытах воспалительного процесса, влияния регуляторной активности водных экстрактов чабреца и ромашки на активность протеолитического фермента трипсин.

Материалы и методы. В исследованиях использовали следующие препараты:

1. «Трипсин кристаллический» с активностью 10000 ед./мг (ООО «Самсон-Мед», Россия, ЛС-000403).

2. Чабрец, или тимьян ползучий (*Thymus serpyllum herba*) (ЗАО «Иван-Чай», Россия, ФС. 2.5.0047.15).

3. Ромашки цветки (ООО ПКФ «Фитофарм», Россия).

Водные экстракты готовили по технологии, предложенной производителями. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со штифтом вместимостью 250 мл, прибавляли 100 г дистиллированной воды и проводили экстракцию в течение 15 мин на водяной бане при температуре 95–99 °С, далее охлаждали в течение 45 мин при комнатной температуре, процеживали через ватно-марлевый фильтр, а оставшееся сырье отжимали. Объем экстракта доводили до 100 мл.

Определение активности трипсина проводили по методу, разработанному Ансоном. Метод основан на количественном определении тирозина и триптофана в продуктах расщепления казеина.

Кристаллический трипсин растворяли в физиологическом растворе (рН=8,0), к 0,5 мл полученного раствора трипсина прибавляли 0,1, 0,15 и 0,2 мл водного экстракта чабреца, пробы термостатировали при 38 °С в течение 10 мин. Далее в пробирки вносили субстрат. В качестве субстрата был использован 1 % раствор казеина (рН=8,0). Образец термостатировали при 38 °С в течение 30 мин. Реакцию протеолиза останавливали прибавлением 1 мл 10 % трихлоруксусной кислоты (ТХУ). В качестве контроля использовали пробу, аналогичную опытной, но ТХУ вносили предварительно, до второго термостатирования [10].

Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 мин. Оптическую плотность раствора измеряли на приборе СФ-2000 в пробе против контроля в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 260 и 280 нм. Для вычисления концентрации в растворе гидролизованного протеина, маркером которого является тирозин, в продуктах гидролиза казеина использовали формулу Калькара:

$$A=1,45E_{280}-0,67E_{260},$$

где A – концентрация гидролизованного протеина, мг/мл; E – оптическая плотность при длине волны 260 и 280 нм.

Далее исходя из показателей оптической плотности растворов рассчитывали активность трипсина.

Регуляторную активность экстрактов чабреца и цветков ромашки оценивали по соотношению активности трипсина в опытной пробе и с различным количеством экстрак-

тов, по степени изменения активности трипсина.

Результаты и обсуждение. В проведенных исследованиях нами были созданы градиенты концентраций водных экстрактов чабреца и цветков ромашки, приготовленных по рекомендуемым технологиям, которые, по нашему предположению, позволяют оценить величину регуляторной активности исследуемых экстрактов (табл. 1).

Таблица 1

Показатели активности трипсина в присутствии водного экстракта чабреца

Состав инкубационной среды	Опытные группы			
	1	2	3	4
Количество экстракта чабреца, мл	0	0,1	0,15	0,2
Количество чабреца, мг	0	0,93	1,39	1,86
Соотношение «трипсин : чабрец»	1:0	1:0,75	1:1,11	1:1,48
Активность трипсина, нмоль/(мл·мин)	0,594±0,250	1,142±0,078	1,516±0,174	1,892±0,215

Как свидетельствуют полученные результаты исследований, водный экстракт чабреца модулирует значительное увеличение активности трипсина в данном диапазоне концентраций. Увеличение количества водного экстракта чабреца в инкубационной среде практически линейно коррелирует с активностью трипсина, коэффициент корреляции R составляет 0,99.

Был проведен регрессионный анализ влияния экстрактов изучаемых лекарственных трав на каталитическую активность трипсина. В качестве зависимой переменной (Y_1 и Y_2) была выбрана гидролитическая активность трипсина, а независимыми пере-

менными были в первом исследовании (X_1) количество водного экстракта чабреца, во втором (X_2) количество водного экстракта цветков ромашки. Уравнение регрессии взаимодействия переменных в первом исследовании имеет следующий вид:

$$Y_1 = 0,55 + 6,459X_1,$$

где Y_1 – активность фермента, нмоль/(мл·мин белка); X_1 – количество водного экстракта чабреца, мл.

Положительные значения коэффициента корреляции переменных и коэффициента уравнения регрессии свидетельствуют о прямой взаимосвязи изучаемых переменных.

Таблица 2

Показатели активности трипсина в присутствии экстракта цветков ромашки

Состав инкубационной среды	Опытные группы			
	1	2	3	4
Количество экстракта цветков ромашки, мл	0	0,1	0,15	0,2
Количество цветков ромашки, мг	0	0,93	1,39	1,86
Соотношение «трипсин : цветки ромашки», мг	1:0	1:0,75	1:1,11	1:1,48
Активность трипсина, нмоль/(мл·мин)	0,595±0,030	0,919±0,053	1,112±0,031	1,291±0,073

Как видно из табл. 2, прибавление экстракта цветков ромашки также увеличивает активность трипсина, причем это влияние имеет линейную зависимость, коэффициент корреляции составляет 0,99, но уравнение регрессионной зависимости имеет другие коэффициенты:

$$Y_2=0,58+3,485X_2,$$

где Y_2 – активность фермента, нмоль/(мл·мин белка); X_2 – количество водного экстракта ромашки, мл.

Положительные значения коэффициента корреляции переменных и коэффициента уравнения регрессии также свидетельствуют о прямой взаимосвязи изучаемых переменных.

В ходе проведения экспериментов проведен сравнительный анализ влияния регуляторной активности отваров чабреца и цветков ромашки на активность трипсина, результаты которого представлены на рис. 1.

Как видно из рисунка, экстракт чабреца оказывает более эффективное влияние на гидролитическую активность трипсина по сравнению с экстрактом ромашки при условии равного количества в инкубационной среде. Таким образом, экспериментальные исследования продемонстрировали возможность применения экстрактов лекарственных трав чабреца и цветков ромашки для воздействия на активность протеолитических ферментов, в частности трипсина.

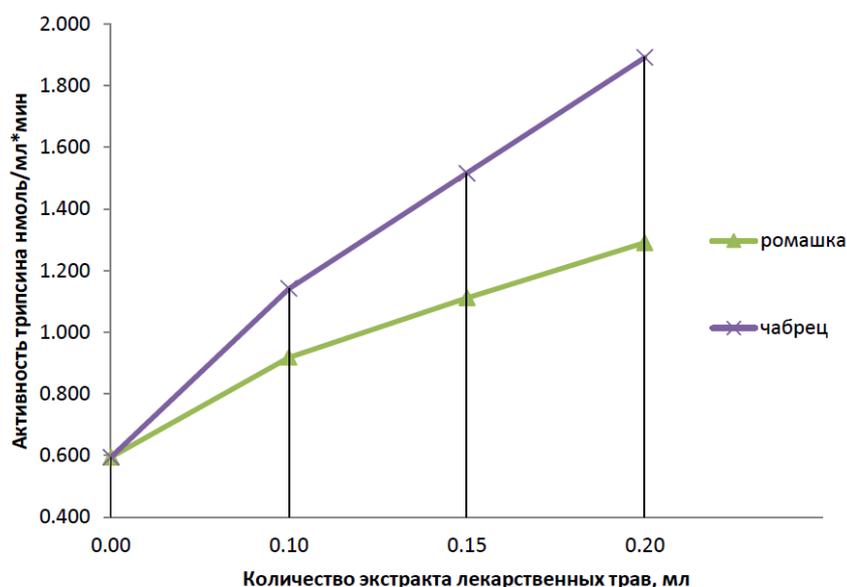


Рис. 1. Сравнительный анализ активности трипсина

Заключение. Результаты проведенных модельных исследований позволяют сформулировать некоторые выводы:

- экстракты чабреца и цветков ромашки оказывают активирующее действие на протеолитический фермент трипсин;
- уровень активации трипсина пропорционален количеству экстрактов, вносимому в инкубационную среду;

– экстракт чабреца оказывает более выраженное влияние на активность трипсина.

Полученные новые сведения о влиянии водных отваров лекарственных трав чабреца и цветков ромашки на гидролитическую активность трипсина позволят повысить эффективность использования лекарственных растений в практике лечения ряда патологических процессов.

Литература

1. Байдамышина Д.Р., Гризна Е.Ю., Холявка М.Г. Оценка генотоксичности и цитотоксичности препаратов иммобилизованного на матрице хитозана трипсина. Вестник Воронежского государственного университета. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2016; 3: 53–57.

2. Вовчук И.Л., Фурман Ю.В. Прогностическое значение определения активности катепсинов н, х, к, f, s, z, l и их эндогенных ингибиторов при неопластической трансформации. Ученые записки Российского государственного социального университета. 2011; 4: 202–205.
3. Смахтин М.Ю., Фурман Ю.В. Влияние регуляторных пептидов и их парных сочетаний на активность каталазы и фагоцитоз нейтрофилов крови при переломах. Российская наука и образование сегодня: проблемы и перспективы. 2017; 6: 43–45.
4. Столярова Е.А., Байгузина Д.Р. Использование ферментных препаратов в медицине. Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2017; 6: 1273.
5. Сазыкина С.М., Холявка М.Г., Артюхов В.Г. Исследование УФ-индуцированных изменений функциональных свойств протеаз растительного происхождения. Актуальная биотехнология. 2016; 1: 59–63.
6. Фурман Ю.В., Смахтин М.Ю. Некоторые функции протеолитических ферментов в норме и при патологии. Актуальные проблемы социально-гуманитарного и научно-технического знания. 2017; 4: 3–4.
7. Кузнецова С.С., Колесанова Е.Ф., Таланова А.В. Перспективы создания новых ингибиторов терапевтически значимых сериновых протеаз на основе кноттинов и пептидного ингибитора трипсина из семян подсолнечника. Биомедицинская химия. 2016; 62: 353–368.
8. Абдуллаев А.А., Пенджиев А.М. Медико-биологические особенности дынного дерева для медицинской промышленности. Успехи современного естествознания. 2015; 7: 70–77.
9. Макаренко О.А., Левицкий А.П. Взаимодействие флавоноидов с протеазами. Досягнення біології та медицини. 2012; 2: 75–82.
10. Фурман Ю.В., Артюшкова Е.Б., Смахтин М.Ю. Оптимизация среды фермент-субстратного взаимодействия с использованием матрицы планирования. Российская наука и образование сегодня: проблемы и перспективы. 2018; 1: 17–19.

THE IMPACT OF THYME AND CAMOMILE FLOWER EXTRACTS ON TRYPSIN CATALYTIC ACTIVITY

E.B. Artyushkova, Yu.V. Furman, A.V. Anikanov

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

e-mail: prof.furman@mail.ru

The development of pathological processes in humans and animals is accompanied by an imbalance of regulatory mechanisms, in particular, proteinase enzymes and their regulators. Endogenous regulators, inhibitors and activators often fail to maintain the balance in the system "enzyme-substrate-inhibitor (activator)", which leads to destructive inflammatory, immune reactions, and dyscrasia. Therefore, the search for unknown proteinase regulators is an important step towards the creation of new drugs to treat the diseases associated with changes in proteolysis processes. In this regard, we propose a hypothesis about the regulatory role of medicinal herbs that are widely used in both traditional and folk medicine. According to our assumption, the chemical compounds contained in medicinal herbs can both activate and inhibit proteolysis in cells.

The aim of the research was to study the effects of the inflammatory process, the influence of the regulatory activity of aqueous thyme and chamomile extracts on the trypsin activity in the model experiments.

Materials and Methods. In the studies the authors used crystalline trypsin, thyme, and chamomile flowers. They determined trypsin activity using the Anson method.

Results. New information was obtained on the effect of an aqueous extract of medicinal herbs, in particular, thyme and chamomile flowers, on the activity of the proteolytic enzyme trypsin. This information can improve the herbs efficacy in the treatment of inflammatory processes.

Conclusion. Thyme and chamomile flower extracts have an activating trypsin effect. The level of trypsin activation is proportional to the amount of extracts introduced into the incubation medium. Thyme extract has a more pronounced effect on trypsin activity.

Keywords: trypsin, thyme, chamomile flowers, proteolytic activity, enzymes.

References

1. Baydamshina D.R., Trizna E.Yu., Kholyavka M.G. Otsenka genotoksichnosti i tsitotoksichnosti preparatov immobilizovannogo na matritse khitozana tripsina [Assessment of the genotoxicity and cytotoxicity for preparations of the trypsin immobilized on chitozan matrix]. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Ser. Khimiya. Biologiya. Farmatsiya*. 2016; 3: 53–57 (in Russian).
2. Vovchuk I.L., Furman Yu.V. Prognosticheskoe znachenie opredeleniya aktivnosti katepsinov n, kh, k, f, s, z, l i ikh endogennykh ingibitorov pri neoplasticheskoy transformatsii [Prognostic value of determining the activity of n, x, k, f, s, z, l cathepsins and their endogenous inhibitors during neoplastic transformation]. *Uchenye zapiski Rossiyskogo gosudarstvennogo sotsial'nogo universiteta*. 2011; 4: 202–205 (in Russian).
3. Smakhtin M.Yu., Furman Yu.V. Vliyanie regulatorynykh peptidov i ikh parnykh sochetaniy na aktivnost' katalazy i fagotsitoz neytrofilov krovi pri perelomakh [Effect of regulatory peptides and their paired combinations on catalase activity and phagocytosis of blood neutrophils in fractures]. *Rossiyskaya nauka i obrazovanie segodnya: problemy i perspektivy*. 2017; 6: 43–45 (in Russian).
4. Stolyarova E.A., Bayguzina D.R. Ispol'zovanie fermentnykh preparatov v meditsine [Enzyme products in medicine]. *Byulleten' meditsinskikh internet-konferentsiy*. 2017; 6: 1273 (in Russian).
5. Sazykina S.M., Kholyavka M.G., Artyukhov V.G. Issledovanie UF-indutsirovannykh izmeneniy funktsional'nykh svoystv proteaz rastitel'nogo proiskhozhdeniya [Study of UV-induced changes of functional properties of proteolytic enzymes of plant origin]. *Aktual'naya biotekhnologiya*. 2016; 1: 59–63 (in Russian).
6. Furman Yu.V., Smakhtin M.Yu. Nekotorye funktsii proteoliticheskikh fermentov v norme i pri patologii [Some functions of proteolytic enzymes in health and disease]. *Aktual'nye problemy sotsial'nogumanitarnogo i nauchno-tekhnicheskogo znaniya*. 2017; 4: 3–4 (in Russian).
7. Kuznetsova S.S., Kolesanova E.F., Talanova A.V. Perspektivy sozdaniya novykh ingibitorov terapevticheskikh znachimykh serinovykh proteaz na osnove knottinov i peptidnogo ingibitora tripsina iz semyan podsolnechnika [Prospects for the design of new therapeutically significant protease inhibitors based on knottins and sunflower seed trypsin inhibitor (SFTI 1)]. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2016; 62: 353–368 (in Russian).
8. Abdullaev A.A., Pendzhiyev A.M. Mediko-biologicheskie osobennosti dynnogo dereva dlya meditsinskoy promyshlennosti [Medical and biological features of the melon tree for the medical industry]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya*. 2015; 7: 70–77 (in Russian).
9. Makarenko O.A., Levitskiy A.P. Vzaimodeystvie flavonoidov s proteazami [Interaction of flavonoids and proteases]. *Dosyagnennyya biologii ta meditsini*. 2012; 2: 75–82 (in Russian).
10. Furman Yu.V., Artyushkova E.B., Smakhtin M.Yu. Optimizatsiya sredey ferment-substratnogo vzaimodeystviya s ispol'zovaniem matritsy planirovaniya [Optimization of the enzyme-substrate interaction using the planning matrix]. *Rossiyskaya nauka i obrazovanie segodnya: problemy i perspektivy*. 2018; 1: 17–19 (in Russian).