

Белки высших водных растений Беларуси: роль в адаптации к действию неблагоприятных факторов среды и возможное применение в медицине

Ольга Канделинская¹, Елена Грищенко¹, Валентина Домаш¹, Ирина Сысой¹, Наталья Шуканова², Татьяна Шман³, Анатолий Таганович⁴, Елена Девина⁴, Павел Белый⁵, Владимир Разлуцкий⁶, Нийоле Савицкене⁷, Юрга Бернатонене⁷, Арунас Савицкас⁷

¹ Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича Национальной Академии наук Беларуси;

² Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной Академии наук Беларуси; ³ Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и Иммунологии; ⁴ Белорусский государственный медицинский университет; ⁵ Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси; ⁶ Научно-практический центр по биоресурсам Национальной академии наук Беларуси; ⁷ Литовский университет наук о здоровье

Проведен скрининг водных растений различных систематических групп по активности в них белков лектинов и ингибиторов протеиназ. Содержание ингибиторов в исследуемых растениях было незначительным. Выявлены наиболее перспективные представители по активности лектинов. На примере рогоза широколистного - *Typha latifolia* L., ежеголовника прямого - *Sparganium erectum* L. и тростника южного - *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. показано, что лектины вовлечены в процессы адаптации растений к неблагоприятным факторам среды. Так, установлено, что активность лектинов в данных растениях значительно варьирует в зависимости от температуры воды в озере Белое, являющееся водоемом-охладителем Березовской ГРЭС (Брестская область, Беларусь). Установлена индуцированная лектином аира обыкновенного - *Acorus calamus* L. активация иммунокомпетентных клеток – естественных киллеров (ЕК) и Т-клеток, и апоптоза клеток рака молочной железы человека. Проведена ресурсная оценка аира обыкновенного. Показано, что в Республике Беларусь имеется достаточная сырьевая база аира обыкновенного для региональных заготовок и производства лекарственных препаратов на основе дикорастущего растительного сырья.

Гидрофиты, фитолектины, адаптация, биоресурсы

Введение

Растения гидрофиты являются важнейшей составляющей водных экосистем и, как мощный средообразующий фактор, участвуют в почвообразовательных процессах, регулировании климата и состава атмосферы, определяют гидрологический режим поверхностных и грунтовых вод, имеют водоохранное, санитарно-гигиеническое и хозяйственно-экономическое значение (Гигевич и др., 2001). Водная растительность представляет собой также ценный источник биологически активных веществ, из которых наименее изучены гликопротеины семейства фитолектинов и белки ингибиторы протеиназ, обладающие широким спектром биологического действия. Так, фитолектины, как предполагается, участвуют в реализации механизмов неспецифической устойчивости растений (Шакирова и др., 2007). Кроме того, данные белки являются модификаторами биологического ответа, т.е. обладают способностью стимулировать клетки иммунной системы благодаря индуцированной ими активации углеводспецифических путей биосигнализации в клетках крови и регуляции функциональной активности нейтрофилов и лимфоцитов (Тимошенко, 2003). Фитолектины вызывают агглютинацию эритроцитов и других клеток млекопитающих, в том числе злокачественных, а также микроорганизмов (Луцик и др., 1981). Применение лектинсодержащих лекарственных растений при различных воспалительных и вирусных заболеваниях не только сокращает длительность базовой терапии, но и повышает ее эффективность (Корсун и др., 2007).

Ингибиторы протеиназ, помимо защитного действия в растениях, принимают участие в регуляции функциональной активности системы протеолиза, что весьма актуально при заболеваниях, связанных с патологией свертывающей системы крови, и с развитием воспалительных реакций, особенно в острой фазе воспаления различного генеза (Валуева и др., 1995). В связи с вышеизложенным, целью исследований являлась идентификация в составе гидрофитов различных таксономических групп фитолектинов и ингибиторов протеиназ и оценка возможности их использования в медицине и в качестве маркеров устойчивости растений к действию неблагоприятных факторов среды. Объектами исследования служили вегетативные органы растений гидрофитов, в частности, сем. Аирные – *Acoraceae*; Осоковые – *Cyperaceae*; Ирисовые – *Iridaceae*; Рдестовые – *Potamogetonaceae*; Рогозовые – *Typhaceae*; Кувшинковые – *Nymphaeaceae*; Частуховые – *Alismataceae*; Злаки – *Poaceae*, сем. Ароидные – *Araceae*.

Методы исследования

Подготовка экстрактов для скрининга растений на присутствие лектинов осуществлялась посредством гомогенизации растительного сырья в 0,15М растворе NaCl в соотношении 1:6-10 и последующей экстракции в течение суток. Осадок отделяли фильтрованием через капроновую ткань и центрифугировали в течение 15 мин при 5000 об/мин. Выделение лектина из корневищ аира обыкновенного – *Acorus calamus* L. (сем. Аирные – *Acoraceae*) проводили по методу (Bains

et al, 2005). Идентификацию гемагглютинирующей активности (ГА) лектинов осуществляли по лектин-индуцированной реакции агглютинации эритроцитов кролика. ГА выражали в величинах, обратных минимальной концентрации белка, при которой отмечали реакцию гемагглютинации $(\text{мкг белка/мл})^{-1}$, затем переводили данный показатель в пересчете на сырую массу (ЕД/г сырой массы) (Бабоша и др., 1992). Белок определяли по методу (Bradford, 1976). Лектин-индуцированную активацию Т-клеток и естественных киллеров (ЕК) периферической крови человека оценивали методом проточной цитофлуориметрии на проточном лазерном цитофлуориметре FACSCan ("Becton Dickinson", США) в программе CellQuestPro по экспрессии маркера CD69 на поверхности этих клеток (Caruso et al., 1997; Clausen et al., 2003). Для анализа использовали комбинацию моноклональных антител CD4FITC/ CD8 PE/ CD3 ECD/ CD56PC5/ CD69PC7. Мононуклеарные клетки четырех доноров культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % сыворотки в течение 48 ч в CO_2 -инкубаторе при 37° С. Тестировали следующие варианты: контроль без лектина аира, лектин аира (5 и 50 мкл/1 мл среды). Влияние фитолектина аира на клетки рака молочной железы (РМЖ) оценивали по их жизнеспособности и активности в них фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ), являющегося маркером клеточной дифференцировки (Ruiz-Espejo, 2003). Опухолевые клетки выделяли по разработанной методике из образца солидной опухоли, полученного из операционного материала пациенток с диагнозом РМЖ (Шуканова, 2013) и культивировали в течение 64 часов без фитолектина (контроль) и в присутствии лектина аира, а также в присутствии цитостатиков - АС (доксорубин + циклофосфан) и CVF (циклофосфан + винорельбин + фторурацил) в концентрациях, соответствующих клинически значимым дозам, применяемым в онкологической практике. Количество клеток определяли в счетной камере Горяева под световым микроскопом "Amplival" (Carl Zeiss, Jena, Германия). Жизнеспособность клеток оценивали с использованием витального красителя трипанового синего. Активность АХЭ выражали в нМ гидролизованного ацетилхолина на мг белка в мин. Урожайность аира обыкновенного определяли на учетных площадках и на ключевых участках (Методика..., 1986). Запасы данного вида рассчитывали по разработанному алгоритму кадастровой региональной оценки запасов сырья с помощью компьютерных программ (Мастибротская и др., 2010).

Результаты и обсуждение

Скрининг лекарственных, ресурсобразующих и кормовых видов растений гидрофитов, принадлежащих к различным семействам, на присутствие лектинов, позволил выявить широкий диапазон вариабельности данного показателя. Показано, что максимальная активность данных белков была характерна в основном для корней и корневищ исследованных растений, минимальная – для листьев и стеблей. Диапазон вариабельности показателей

активности данных белков составлял: для листьев - от 33,6 (тростник южный) до 1700 ЕД/мг сыр.массы (частуха подорожниковая); для корней – от 784,3 (камыш) до 4000 ЕД/мг сыр.массы (частуха подорожниковая). Особенностью данных растений являлось относительно низкое содержание ингибиторов трипсина, не превышающее 2 ИЕ/г абс.сух.массы. Исключение составляли корни рогоза широколистного (7 ИЕ/г абс.сух.массы), листья частухи подорожниковой и кувшинки чисто-белой (23 и 25 ИЕ/г абс.сух.массы, соответственно).

Для выяснения роли белков лектинов в механизмах устойчивости исследованных растений при действии неблагоприятных факторов среды, нами был роверен анализ динамики активности данных белков у отдельных представителей водной флоры в районе озера Белое, являющегося водоемом-охладителем Березовской ГРЭС (Брестская область, Беларусь), в градиенте температур 4-6° С в непогреваемой части озера и в местах сброса теплых вод (см. рисунок).

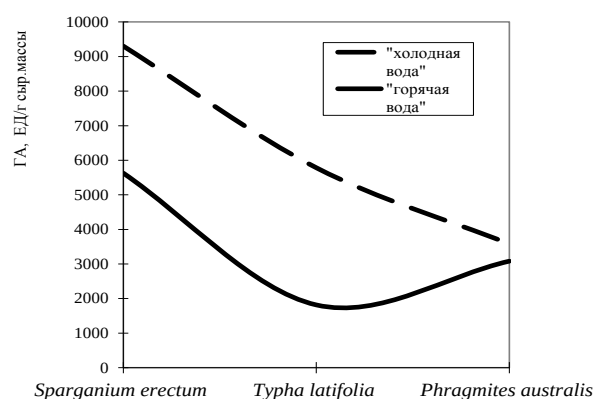


Рис. 1. Влияние изменения температуры воды в озере Белое, являющееся водоемом-охладителем Березовской ГРЭС, на активность лектинов в водных растениях

Fig. 1. Effect of water temperature changes in the Beloe lake which is the cooling reservoir of Berezovskaya power plant on lectin activity in aquatic plants

Согласно данным рис. 1, для растений разных систематических групп были характерны близкие по характеру температурозависимые сдвиги активности лектинов. При этом наиболее существенные изменения исследуемого показателя наблюдались в растениях ежеголовника и рогоза широколистного. По-видимому, показатель активности лектинов у данных растений является видоспецифичным.

Далее, нами показано, что в опытах in vitro образец лектина аира способствовал активации ЕК-клеток и незначительной - Т-клеток, причем при высокой дозе стимулирующий эффект был значительно ниже, чем при низкой (рис. 2).

Наблюдаемый эффект позволяет предполагать наличие относительно слабой в указанных условиях проведения эксперимента лектин-индуцированной бласттрансформации лимфоцитов изучаемых субпопуляций и умеренном иммуномодулирующем действии лектина аира.

Далее была исследована активность АХЭ в клетках РМЖ. Установлено, что в клетках РМЖ люминального

Б подтипа лектин аира обыкновенного ингибировал активность АХЭ на 80%, цитостатики группы АС – на 73% и цитостатики группы CVF – на 68%. В злокачественно трансформированных клетках молочной железы Нег+ подтипа фитолектин ингибировали активность АХЭ на 31%, цитостатики группы АС – на 41% и цитостатики группы CVF – на 57%.

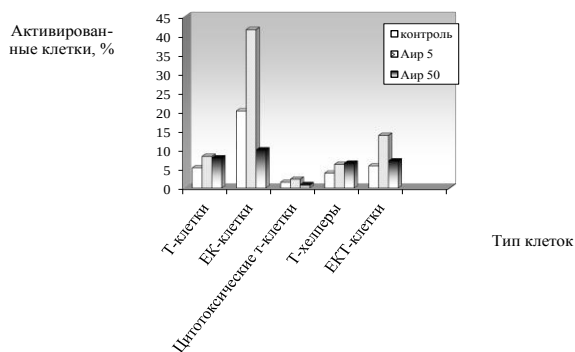


Рис. 2. Влияние лектина аира на активность иммунокомпетентных клеток

Fig. 2. Influence of *Acorus calamus* lectin on activity of immunocompetent cells

В клетках наиболее агрессивного базальноподобного подтипа опухоли лектин из аира обыкновенного ингибировал активность АХЭ на 64%, цитостатики группы АС – на 62% и цитостатики группы CVF – на 34%. Можно предполагать, что антипролиферативная активность лектина аира в отношении клеток РМЖ реализуется косвенно за счет ингибирования АХЭ, либо непосредственно благодаря активации определенных механизмов апоптоза.

По результатам ресурсной оценки аира обыкновенного были определены его запасы как лекарственного сырья и рекомендуемые объемы ежегодных заготовок в Республике Беларусь (таблица 1).

Таблица 1. Запасы и рекомендуемые объемы заготовки *Acorus calamus* на территории Республики Беларусь (в кг)

Table 1. Resources and the allowable volumes of annual use of *Acorus calamus* in Belarus (in kg)

Область	Биологический запас, кг	Эксплуатационный запас, кг	Рекомендуемый объем ежегодных заготовок, кг
Брестская	442175	221088	31584
Витебская	361300	180650	25807
Гомельская	384225	159990	22856
Гродненская	294135	147068	21010
Минская	353845	176922	25275
Могилевская	233915	103346	14764
Итого	2069595	989064	141296

Согласно данным таблицы 1, биологический запас лекарственного сырья аира обыкновенного составляет 2070 т, эксплуатационный – 989 т, а рекомендуемые объемы ежегодных заготовок сырья – 141 т.

Наибольшие запасы *Acorus calamus* в качестве лекарственного сырья сконцентрированы на территории Брестской области, а наименьшие запасы отмечены в Могилевской области.

Далее было изучено пространственное распределение биологического запаса аира обыкновенного, что позволило выявить центры его концентрации на территории Республики Беларусь (рис. 3).

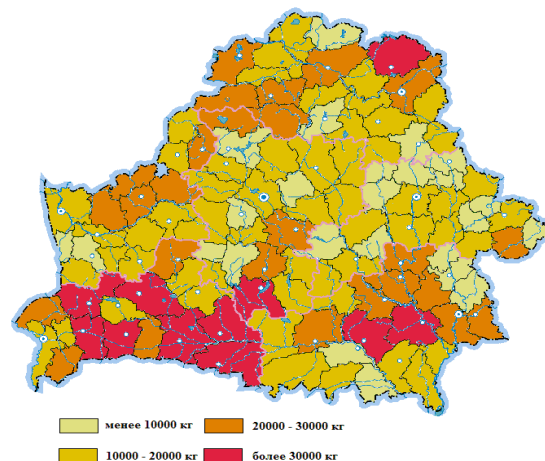


Рис. 3. Пространственное распределение биологического запаса аира обыкновенного

Fig. 3. Map of the spatial distribution of biological resources of *Acorus calamus* in Belarus (in kg)

Согласно данным рисунка 3, перспективными районами для заготовки сырья данного вида (более 30000 кг) являются: Дрогичинский (47355 кг), Кобринский (39680 кг), Пружанский (38660 кг), Пинский (38090 кг), Ивацевичский (35510 кг), Столинский (33130 кг) и Лунинецкий (30625 кг) районы Брестской области; Городокский район (32430 кг) Витебской области; Речицкий (39265 кг) и Калинковичский (35330 кг) районы Гомельской области; Солигорский район (38225 кг) Минской области.

Выводы

Таким образом, растения гидрофиты содержат в своем составе физиологически активные белки – ингибиторы протеиназ и лектины. Активность ингибиторов в исследуемых растениях было незначительным. Показано, что лектины вовлекаются в процессы адаптации растений к перепаду температур в акватории озера Белое, являющегося водоемом-охладителем Березовской ГРЭС (Брестская область, Беларусь), что позволяет рассматривать данные белки в качестве потенциальных маркеров устойчивости растений. Установлено, что лектин из *Acorus calamus* обладает умеренным иммуномодулирующим действием в отношении Т-клеток и ЕК, и антипролиферативным эффектом в отношении клеток рака молочной железы человека, сопоставимым с действием цитостатиков, которые применяются в онкологической практике. Показано, что в Республике Беларусь имеется достаточная сырьевая база аира обыкновенного для региональных заготовок и

производства лекарственных препаратов на основе его основе. Результаты могут быть использованы при организации заготовительных баз лекарственного сырья, что в свою очередь позволит организовать устойчивое использование растительных ресурсов.

Литература

1. БАБОША, АВ., ЛАДЫГИНА, МЕ. Определение фитогемагглютининов в связи с вирусоустойчивостью картофеля // Физиолого-биохимические и биофизические методы диагностики степени устойчивости растений к патогенам и другим факторам / Под ред. Ладыгиной МЕ. М.: МГУ, 1992. С.43-52.
2. ВАЛУЕВА, ТА., МОСОЛОВ, ВВ. Белки-ингибиторы протеолитических ферментов у растений, *Прикладная биохимия и микробиология*, 1995, Т. 31, №6, С. 579—589.
3. ГИГЕВИЧ, ГС., ВЛАСОВ, БП., ВЫНАЕВ ГВ. Высшие водные растения Беларуси. Минск: БГУ, 2001. 231 С.
4. КОРСУН, ВФ., ЛАХТИН, ВМ., КОРСУН, ЕВ., МИЦКОНАС, А. Фитолектины. Москва, 2007. 443 С.
5. ЛУЦИК, МД., ПАНАСЮК, ЕН., ЛУЦИК, АД. Лектины. Львов: Вища школа, 1981. 155 С.
6. МАСТИБРОТСКАЯ, ИП., МАСЛОВСКИЙ, ОМ., РОДИОНОВ, ПА. Методические подходы к региональной кадастровой оценке запасов сырья хозяйственно-полезных растений, *Проблемы лесоведения и лесоводства: Сборник научных трудов Института леса НАН Беларуси*. Гомель, 2010, Вып. 70, с. 76-88.
7. Методика определения запасов лекарственных растений. М., 1986. 2 с.
8. ТИМОШЕНКО, АВ. Лектины лекарственных растений, *Весті Нацыянальнай Акадэміі навук Беларусі*, 2003, № 2, с. 104-113/
9. ШАКИРОВА Ф.М., БЕЗРУКОВА М.В. Современные представления о предполагаемых функциях лектинов растений, *Журнал общей биологии*, 2007, Т.68, № 2, с.100-125.
10. ШУКАНОВА, НА. Способ определения у большого чувствительности клеток рака молочной железы к химиопрепарату или к группе химиопрепаратов. *Патент Республики Беларусь*, № 17447 от 07.05.2013.
11. BAINS, JS., DHUNA, V., SINGH, J., KAMBOJ, SS., et al. Novel lectins from rhizomes of two Acorus species with mitogenic activity and inhibitory potential towards murine cancer cell lines, *Int. Immunopharmacol.*, 2005, Vol. 5, Iss.9, p.1470-1478.
12. BRADFORD MM. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgramm Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding, *Anal.Biochem.*, 1976, Vol. 8, p.248-254.
13. CARUSO A., LICENZIATI S., CORULLI M. et al. Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation, *Cytometry*, 1997, Vol. 27, N 1, p. 71-76.
14. CLAUSEN J, VERGEINER B, ENK M. et al. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells, *Immunobiology*, 2003, Vol.207, N 2, p. 85-93.
15. RUIZ-ESPEJO F., CABEZAS-HERRERA J., ILLANA J. Cholinesterase activity and acetylcholinesterase glycosylation are altered in human breast cancer, *Breast cancer research and treatment.*, 2002, Vol.72, p. 11-22.

Olga Kandelinskaya, Elena Grischenko, Valentina Domash, Irina Sysoi, Natalia Shukanova, Tatiana Shman, Anatoly Taganovich, Elena Devina, Pavel Bely, Vladimir Razlutsky, Nijole Savickiene, Jurga Bernatoniene, Arunas Savickas

Proteins of Belarus higher aquatic plants: role in adaptation to adverse of environmental factors and possible application in medicine

Summary

It has been studied the activities of lectins and proteinase inhibitors in aquatic plants of different taxonomic groups by screening. The content of inhibitors in the test plants was negligible. It has been identified the most promising species on lectin activity. On the example of *Sparganium erectum* L., *Typha latifolia* L., *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud it have been shown that lectins are involved in the processes of adaptation of plants to environmental stress. It has been established that parameter of lectin activity in these plants was ranged considerably depending on the water temperature of Beloe lake which is the cooling reservoir of Berezovskaya power plant (Brest region of Belarus). It have been shown that lectin from *Acorus calamus* L. activated the natural killer cells (EK) and apoptosis of human breast cancer cells. The results of regional estimation of resources of *Acorus calamus* in the Republic of Belarus are presented in the paper.

Hydrophytes, phytolectins, adaptation, bioresources

Получено в марте 2014 г., подписано в печать в апреле 2014 г.

Olga KANDELINSKAYA. VF Kuprevich Institute of Experimental Botany of National Academy of Sciences of Belarus, candidate of biological sciences, assoc. prof., Address: Minsk, Belarus, 220072, Akademicheskaya, 27, Tel +375 293394413, e-mail: okandy@yandex.ru
Elena GRISCHENKO. VF Kuprevich Institute of Experimental Botany of National Academy of Sciences of Belarus, research associate, Address: Minsk, Belarus, 220072, Akademicheskaya, 27, Tel +375 172841660, e-mail: helegreen@yandex.ru
Valentina DOMASH. VF Kuprevich Institute of Experimental Botany of National Academy of Sciences of Belarus, doctor of biological sciences, Address: Minsk, Belarus, 220072, Akademicheskaya, 27, Tel +375172841660, e-mail: valdomash@mail.ru
Irina SYSOI. VF Kuprevich Institute of Experimental Botany of National Academy of Sciences of Belarus, research associate, Address: Minsk, Belarus, 220072, Akademicheskaya, 27, e-mail: mastibrotskaya@mail.ru
Natalia SHUKANOVA. Institute of biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus, candidate of Biological Sciences, Address: Minsk, Belarus, 220072, Akademicheskaya, 27, e-mail: natashu@yandex.ru
Tatiana SHMAN. Belarussian Scientific Practical Center of Pediatric Oncology, Hematology and Immunology, Minsk, Belarus, candidate of biological sciences, Address: e-mail: shman@oncology.by
Anatoly TAGANOVICH. Belarussian State Medical University, Minsk, Belarus, doctor of medical sciences, prof., Address: 220116, Minsk, Belarus, Dzerzhinsky pr., 83, Tel: +375 17 272-61-96, e-mail: bsmu@bsmu.by
Elena DEVINA. Belarussian State Medical University, Minsk, Belarus, candidate of medical sciences, assoc. prof., Address: 220116, Minsk, Belarus, Dzerzhinsky pr., 83, Tel: +375 17 272-61-96, e-mail: bsmu@bsmu.by
Pavel BELY. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, candidate of biological sciences, Address: Minsk, Belarus 220012, Minsk, Belarus, Surganov str., 2v, e-mail: pavel.bely@tut.by
Vladimir RAZLUTSKY. Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus, candidate of biological sciences, Address: Minsk, Belarus 220072, Akademicheskaya, 27, Tel.+ 37517 2841036, e-mail: zoo@biobel.bas-net.by
Nijole SAVICKIENE. Lithuanian university of health sciences, Kaunas, Lithuania, doctor of biomedical sciences, Address: Mickeviciaus 9, Kaunas, Lithuania, e-mail: savickienienijole@takas.lt
Jurga BERNATONIENE. Lithuanian university of health sciences, Kaunas, Lithuania, doctor of biomedical sciences, Address: Mickeviciaus 9, Kaunas, Lithuania, e-mail: jurgabernatoniene@yahoo.com
Arunas SAVICKAS. Lithuanian university of health sciences, Kaunas, Lithuania, habil. doctor of biomedical sciences, professor, Address: Mickeviciaus 9, Kaunas, Lithuania, e-mail: farmkurs@ismuni.lt