

УДК 612.015:615.3:581.19

# МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФОРМЫ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА СЛОЖНОЦВЕТНЫЕ

© 2014 И.Ф. Шаталаев, Н.В. Расцветова

Самарский государственный медицинский университет

Поступила в редакцию 29.09.2014

Исследовали малатдегидрогеназу лекарственных растений семейства Сложноцветные (*Asteraceae*) – одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* L.), ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.). Установлены структура и динамика молекулярных форм малатдегидрогеназы лекарственного растительного сырья в условиях повышенной влажности.

Ключевые слова: малатдегидрогеназа, молекулярные формы, лекарственные растения, повышенная влажность

В настоящее время до 40% всех лекарственных препаратов, применяемых в современной медицине, получают из растительного материала. По своей фармакологической активности фитопрепараты не уступают своим синтетическим аналогам, а благодаря сбалансированному комплексу биологически активных веществ они благоприятно действуют на организм человека, практически не давая побочных эффектов. Стандартизация лекарственных средств растительного происхождения имеет свои особенности, а проблема сохранения действующих веществ в лекарственном растительном сырье в процессе его сушки и хранения полностью не решена. При высушивании лекарственного растительного сырья (ЛРС) белки с ферментативной активностью утрачивают гидратную оболочку, четвертичную, третичную структуру молекулы и биологическую активность. При формировании оптимальных значений температуры, рН и влажности происходит денатурация белка с восстановлением первоначальной конформации и каталитической функции энзима. Это приводит к снижению концентрации действующих веществ и терапевтического действия препарата. В связи с этим становится актуальным исследование биохимических характеристик ЛРС, в частности, изучение состава и динамики

молекулярных форм (МФ) малатдегидрогеназы (L-малат: NAD-оксидоредуктаза, 1.1.1.37, МДГ) [1]. В современной литературе данные о МФ МДГ лекарственных растений немногочисленны. В связи с этим настоящее исследование приобретает важное теоретическое и практическое значение.

**Методика исследования.** Объектом исследования на молекулярном уровне явилась МДГ лекарственных растений семейства Сложноцветные (*Asteraceae*) – одуванчика лекарственного (*Taraxacum officinale* L.), ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium* L.). Определение проводилось в свежем ЛРС, а также в высушенном ЛРС после экспозиции во влажных условиях в течение 12, 24, 72 и 120 часов при  $T=20^{\circ}\text{C}$ . Молекулярные формы МДГ разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле и выявляли феназинметасульфат-тетразолиевой реакцией: гелевые пластины инкубировали 12 часов при  $37^{\circ}\text{C}$  в чашках Петри в оптимизированной инкубационной среде, содержащей водные растворы NAD (1 мг/мл) – 40 мл, нитросинего тетразолиевого (1 мг/мл) – 30 мл, 1 М раствора малата натрия (рН=7,0) – 10 мл, феназинметасульфата (1 мг/мл) – 4 мл, 0,2 М трис-НСI буферного раствора (рН=7,1) – до 100 мл. Молекулярные формы МДГ выявлялись в виде темно-синих полос. Количественный анализ электрофореграмм проводили на денситометре АФ-1 («Львовприбор») в проходящем луче с фильтром 560 нм [2].

Шаталаев Иван Федорович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой химии фармацевтического факультета. E-mail: shatalaev@list.ru

Расцветова Наталья Владимировна, кандидат биологических наук, доцент кафедры химии фармацевтического факультета. E-mail: rastsvetova@yandex.ru

**Результаты исследования и их обсуждение.** Проведенный анализ свежего ЛРС позволил обнаружить две изоформы МГД – МДГ-1 и МДГ-3 в траве одуванчика лекарственного, ромашки аптечной, тысячелистника обыкновенного,

календулы лекарственной, бессмертника песчаного (табл. 1). Относительная электрофоретическая подвижность МФ МДГ соответствует справочным литературным данным и является критерием для их идентификации.

**Таблица 1.** Относительная электрофоретическая подвижность (ОЭП) МФ МДГ лекарственных растений семейства Сложноцветные

Лекарственное растительное сырье	МФ МДГ	Свежее ЛРС	Время экспозиции сухого ЛРС в условиях повышенной влажности при T =20 <sup>0</sup> C			
			12 час	24 час	72 час	120 час
			ОЭП *, (M±m)	ОЭП *, (M±m)	ОЭП *, (M±m)	ОЭП *, (M±m)
одуванчика лекарственного трава	МДГ 3	0,37±0,02	0,94±0,01	0,12±0,02	0,13±0,02	0,34±0,02
	МДГ 1	0,96±0,01		0,94±0,01	0,94±0,01	0,95±0,01
ромашки аптечной трава	МДГ 3	0,27±0,02	0,94±0,02	0,10±0,01	0,10±0,01	0,25±0,02
	МДГ 1	0,88±0,01		0,94±0,02	0,94±0,02	0,86±0,01
тысячелистника обыкновенного трава	МДГ 3	0,31±0,01	0,93±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01	0,31±0,02
	МДГ 1	0,88±0,04		0,91±0,01	0,92±0,01	0,87±0,04
календулы лекарственной трава	МДГ 3	0,28±0,02	0,93±0,02	0,89±0,03	0,89±0,03	0,27±0,02
	МДГ 1	0,91±0,03				0,89±0,04
бессмертника песчаного трава	МДГ 3	0,35±0,02	0,85±0,01	0,88±0,01	0,87±0,02	0,33±0,02
	МДГ 1	0,86±0,04				0,83±0,03

Наибольшая активность изоформы МДГ-1 характерна для свежей травы одуванчика, календулы и бессмертника, наименьшая – для ромашки аптечной. Об этом свидетельствует интенсивность окраски и ширина зоны МДГ-1 на фореграммах. В то же время в наибольшей степени деятельность изоформ МДГ-3 проявляется в траве тысячелистника, одуванчика и бессмертника, а в траве календулы – в наименьшей. В целом, в траве ромашки работоспособность обеих форм МДГ минимальная, а в траве одуванчика, тысячелистника и бессмертника – максимальная.

При экспозиции высушенной травы одуванчика лекарственного в условиях повышенной влажности при T=20<sup>0</sup>C в течение 12 часов происходит восстановление функций изофермента МДГ-1, сохраняющихся и через 5 суток. Спустя 72 часа после начала увлажнения начинает функционировать МДГ-3. Интенсивность окраски в зоне МДГ-3 через 5 суток выше, чем через 3 суток. Следовательно, на ренатурацию МДГ-3 требуется большее время, чем для МДГ-1.

Анализ полученных данных показал, что при хранении ЛРС травы ромашки аптечной при температуре 20<sup>0</sup>C и повышенной влажности происходит изменение деятельности изоферментов МДГ-1 и МДГ-3, аналогичное установленному в траве одуванчика лекарственного: оба фермента действуют уже через сутки после начала увлажнения. Однако если в траве одуванчика одновременно увеличивается

каталитическая способность МДГ-1 и МДГ-3, то в траве ромашки рост активности МДГ-3 сопровождается снижением работоспособности МДГ-1. В свежем ЛРС ромашки и в траве после экспозиции в течение 5 суток отмечено аналогичное соотношение. Но через 5 суток после начала увлажнения активность МДГ-3 еще не достигает показателя для МДГ-3 в свежей траве.

В высушенной траве тысячелистника обыкновенного уже через 12 часов после начала увлажнения синхронно начинают функционировать оба изофермента и максимальных показателей через 5 суток. Аналогичные изменения наблюдаются на фореграммах травы одуванчика.

В высушенной траве календулы лекарственной резкая активация изофермента МДГ-1 происходит через 12 часов после начала увлажнения, о чем свидетельствует интенсивная окраска зоны изофермента. Спустя 5 суток выявленная особенность МДГ-1 сохраняется. К этому моменту восстанавливает свою структуру и функции изоформа МДГ-3. Аналогичная динамика характерна для травы одуванчика.

В ходе эксперимента обнаружено, что МДГ-1 в траве бессмертника песчаного возобновляет деятельность через 12 часов после начала экспозиции, достигая наибольших значений через 120 часов. Аналогичные закономерности обнаружены в траве календулы. Но на фореграмме МДГ инкубированной травы бессмертника видно, что зона МДГ-1 через 5 суток

значительно уже, чем на фореграмме его свежей травы и на фореграмме МДГ травы календулы. Через 5 суток после начала экспозиции полностью восстанавливает свою структуру и активность изоформа МДГ-3 (начало этого процесса было отмечено на фореграмме спустя 72 часа после начала инкубации во влажной среде).

Анализ проведенных экспериментов (табл. 1) выявляет следующие закономерности. Как видно из таблицы, через 12 час после увлажнения при комнатной температуре происходит восстановление структуры и деятельности изофермента МДГ-1 во всех образцах лекарственного растительного сырья, а в траве тысячелистника обыкновенного начинает работать и изоформа МДГ-3. Через 24 часа после хранения влажного сырья при комнатной температуре восстанавливает свою работу МДГ-3 в траве одуванчика лекарственного и ромашки аптечной. Спустя 3 суток изофермент МДГ-3 травы бессмертника песчаного показывает свою активность. В траве одуванчика лекарственного, ромашки аптечной и тысячелистника обыкновенного оба изофермента продолжают работать.

Обращает внимание функциональная особенность изофермента МДГ-3 травы календулы лекарственной. На его восстановление структуры и активности потребовался самый большой период времени – 5 суток. Полученные данные свидетельствуют о практически полном восстановлении конформации молекул и максимальной активности изоферментов МДГ-1 и МДГ-3 исследуемого растительного сырья спустя 5 суток после начала экспозиции его в условиях повышенной влажности. Активизация МДГ-1 указывает на усиление анаэробных процессов обмена по сравнению с аэробными процессами. О

стабилизации процессов обмена и выравнивании скорости реакции окисления-восстановления малата свидетельствует одинаковая активность всех МФ МДГ. Наличие только изофермента МДГ-3 указывает на преобладание процессов окисления малата и в целом на мобилизацию цикла трикарбоновых кислот. Таким образом, определение изоферментов МДГ в РЛС может служить показателем качества РЛС.

#### Выводы:

1. В лекарственных растениях семейства Сложноцветные (одуванчик лекарственный, ромашка аптечная, тысячелистник обыкновенный, календула лекарственная, бессмертник песчаный) выявлены две МФ фермента МДГ – МДГ-1 и МДГ-3.

2. Динамика активности молекулярных форм МДГ в вышеуказанном ЛРС в условиях повышенной влажности носит индивидуальный характер и может быть использована как критерий подлинности и качества ЛРС.

3. Полученные результаты могут быть использованы для составления нового регламента сушки и хранения лекарственного растительного сырья, а также нормативной документации для изготовления лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного сырья.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Пинеїру де Карвалью, М.А.А.* Малатдегидрогеназа высших растений / *М.А.А. Пинеїру де Карвалью, А.А. Землянухин, Е.Т. Епринцев.* – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1991. 216 с.
2. *Шаталаев, И.Ф.* Методы выявления молекулярных форм некоторых оксидоредуктаз микроорганизмов активного ила / *И.Ф. Шаталаев, М.М. Телитченко* // Гидробиологический журнал. 1992. Т. 28, №2. С. 70-74.

## MALATE DEHYDROGENASE MOLECULAR FORMS OF THE MEDICINAL PLANTS

© 2014 I.F. Shatalayev, N.V. Rastsvetova

Samara State Medical University

Investigated a malate dehydrogenase of medicinal plants family *Asteraceae* – dandelion medicinal (*Taraxacum officinale* L.), chamomiles pharmaceutical (*Matricaria chamomilla* L.), yarrow ordinary (*Achillea millefolium* L.), calendulas medicinal (*Calendula officinalis* L.), immortelle sandy (*Helichrysum arenarium* L.). The structure and dynamics of molecular forms of malate dehydrogenase of medicinal vegetable raw materials in the conditions of the increased humidity are established.

Key words: *malate dehydrogenase, molecular forms, medicinal plants, increased humidity*

*Ivan Shatalayev, Doctor of Biology, Professor, Head of the Chemistry Department of Pharmaceutical Faculty. E-mail: shatalayev@list.ru*  
*Nataliya Rastsvetova, Candidate of Biology, Associate Professor at the Chemistry Department of Pharmaceutical Faculty. E-mail: rastsvetova@yandex.ru*