

medical industry in order to create a new generation of pharmacological agents.

References

1. Buchholz F. Metabolic and enzymatic adaptations in northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, and Antarctic krill, *Euphausia superba* / F. Buchholz, S. Reinhard // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. – 2000. – Vol. 57. – P. 115–129.
2. Campell D. Debridging ability of a novel multi-enzyme preparation isolated from Antarctic krill (*Euphausia superba*) / D. Campell, L. Hellgren, B. Karlstam // Experientia. – 1987. – Vol. 43. – P. 578–579.
3. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.

4. Affinity Chromatography. Principles and Methods. – Sweden: Amersham Pharmacia Biotech AB, 2001. – P. 89–96.
5. Kimoto K. Purification and characterization of serine proteinases from *Euphausia superba* / K. Kimoto, S. Kusama, K. Murakami // Agricultural and biological chemistry Journal. – 1983. – Vol. 47. – P. 529–534.
6. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / M. M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 86. – P. 193–200.
7. Luke B. Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection / B. Luke, J. R. Vásquez, C. S. Craik // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2005. – Vol. 87 (17). – P. 63.

Надійшла до редколегії 24.03.15

Д. Гладун, асп., Н. Чорненька, студ., С. Остапчук, студ., Н. Ракша, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОТРИМАННЯ ФРАКЦІЙ ТРИПСИНОПОДІБНИХ ФЕРМЕНТІВ З АНТАРКТИЧНИХ МОРСЬКИХ ОРГАНІЗМІВ

Сучасна біотехнологія потребує постійного пошуку альтернативних джерел сировини. Мета проведеної роботи – виділити та охарактеризувати трипсиноподібні ферменти морських антарктичних гідробіонтів (криль, морська зірка, немертина). Ідентифікацію трипсиноподібних ферментів проводили методом диск-електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі. Фракцію трипсиноподібних ферментів отримували шляхом афінної хроматографії на колонці з бензамідин-сефарозою. Показано присутність у тканинах досліджуваних гідробіонтів активних гідролаз з різними молекулярними масами. Білкові смуги з молекулярною масою нижче 10-14 кДа можуть бути фрагментами трипсиноподібних ферментів, які зазнали процесу автолізу.

Ключові слова: морські організми, трипсиноподібні ферменти.

Д. Гладун, асп., Н. Чорненька, студ., С. Остапчук, студ., Н. Ракша, канд. біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ПОЛУЧЕНИЕ ФРАКЦИИ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ АНТАРКТИЧЕСКИХ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ

Современная биотехнология требует постоянного поиска альтернативных источников сырья. Цель проведенной работы – выделить и охарактеризовать трипсиноподобные ферменты морских антарктических гидробионтов (криль, морская звезда, немертина). Идентификацию трипсиноподобных ферментов проводили методом диск-электрофореза в 10% полиакриламидном геле. Фракцию трипсиноподобных ферментов получали путем аффинной хроматографии на колонке с бензамидин-сефарозой. Показано присутствие в тканях исследуемых гидробионтов активных гидролаз с различными молекулярными массами. Белковые полосы с молекулярной массой ниже 10-14 кДа могут быть фрагментами трипсиноподобных ферментов, которые подверглись процессу автолиза.

Ключевые слова: морские организмы, трипсиноподобные ферменты.

УДК 581.135.51

С. Ковтун-Водяницька, канд. біол. наук, О. Вергун, канд. біол. наук
Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України, Київ

АНТИОКСИДАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ НАДЗЕМНОЇ ЧАСТИНИ ІНТРОДУЦЕНТІВ РОДУ *ISODON* (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH

Визначено сумарну антиоксидантну активність надземної частини рослин *Isodon japonicus* (Burman) H. Nara та *I. japonicus* (N. Z. Burm) Nara var. *glauco-salux* (Maxim.) H. W. Li, інтродукованих в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України (Правобережний Лісостеп). Використано спектрофотометричний метод зі спиртовим розчином радикалу DPPH. Досліджено зразки сировини інтродуцентів, екстраговані водою, метанолом, етанолом. Найвищу антиоксидантну активність рослин отримано в метанолі 82-83%. Відмічено, що фаза розвитку рослин не мала кардинального впливу на отриманий результат. Встановлено високу загальну антиоксидантну активність представників роду *Isodon*, інтродукованих в Україні. Отримані результати дозволяють розглядати їх як потенційне джерело сировини для створення продукції зі спрямованою антиоксидантною дією.

Ключові слова: інтродуценти, *Isodon*, антиоксидантна активність, DPPH-метод.

Вступ. Збереження рослинного біорізноманіття (видового, генетичного, екологічного) та його раціональне використання і надалі не втрачає своєї актуальності, а навпаки, постає на часі гостріше. Суттєво зменшити навантаження на природні популяції рослин, які експлуатуються людиною, дозволяє інтродукційна робота. В останні 10-15 років відмічається тенденція пошуку та використання рослин, які вирізняються поліфункціональними властивостями. Це спонукає в інтродукційних дослідженнях до одночасного багатовекторного вивчення окремо взятого виду рослин, до виявлення та оцінки сукупних господарсько-цінних ознак. Сьогодні одним із трендових напрямків у дослідженні корисних властивостей рослин є встановлення їх позитивної дії на організм людини, зокрема антиоксидантної активності. Адже згідно останніх даних ВОЗ близько 80% населення планети, як і раніше, спирається на використання

лікарських засобів рослинного походження [1]. Іншим, не менш важливим аспектом у дослідженнях є те, що на думку вчених активність антиоксидантної системи рослин може використовуватися для оцінки ступеню їх стресу і адаптації до несприятливих умов зростання [2].

Цікавим об'єктом в цьому розрізі постає рід *Isodon* (Schrad. ex Benth.) Spach родини *Lamiaceae* Lindley. На сьогодні в межах роду *Isodon* нараховують 117 видів і внутрішньовидових таксонів, які поширені переважно в тропічній і субтропічній Азії з центром різноманіття в південно-західному Китаї та 2 види – в тропічній Африці. Види даного роду достатньо рідко представлені в ботанічних колекціях Європи, практично невідомі в Україні. Однак вони мають тривалу історію використання в країнах Азії, насамперед в якості рослин-цілительів: сировина окремих видів активно використовується в народній ме-

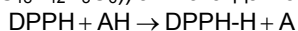
дицині як антибактеріальний, протипухлинний, проти-алергійний, протизапальний і глистогінний засіб.

Найбільш активно наукове вивчення видів роду *Isodon* розгорнуто протягом останніх 30-ти років. Це переважно біохімічні і мікробіологічні дослідження, зосереджені на даний час в Кореї, Китаї, Японії та США. Серед біохімічних сполук найбільше зацікавлення дослідників викликають дитерпеноїди, в тому числі, з антиканцерогенними властивостями [3-7]. На основі сировини *Isodon* та її похідних здійснюється розробка нових лікарських препаратів, БАДів, косметологічних засобів, препаратів для харчової промисловості, тощо. З початку XXI століття зарубіжними вченими виявлено нові властивості видів роду *Isodon* в біохімічному плані і палітра їх позитивної дії у боротьбі з різними захворюваннями значно розширилася. На сьогодні це рослини номер один у дослідженнях з подолання ракових захворювань, із здатністю виявляти протимутаційну і імунотимулюючу дію [8-10].

Проте, більшість публікацій, які висвітлюють результати досліджень зарубіжних вчених, стосується рослин *Isodon* із природних місцезростань. Інформація стосовно дослідження сировини інтродукованих рослин носить вкрай фрагментарний характер. В межах України оприлюднених результатів із такого плану досліджень видів роду *Isodon* на сьогодні нами не виявлено. Це спонукало нас провести біохімічні дослідження надземної частини інтродукованих видів *Isodon*, зокрема результати з визначення сумарної антиоксидантної активності сировини викладено нижче.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження слугувала повітряно-суха сировина багаторічників *Isodon japonicus* (Burman) H. Hara та *I. japonicus* (N. Z. Burm) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) H. W. Li, інтродукованих в Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України. Зразки сировини, використані в дослідженнях, заготовляли у фазу вегетативного росту (липень) та цвітіння (вересень) рослин. Аналізували надземну облістену частину рослин, зрізану на висоті 20-25 см відносно поверхні ґрунту.

Із чималої кількості методів з визначення антиоксидантної активності (AA), які об'єднані в кілька груп (хемілюмінесцентні, флуориметричні, тощо), застосовано непрямий фотометричний DPPH метод, що відрізняється високою чутливістю до антирадикалів [11]. Даний метод ґрунтується на відновленні радикалу DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрілгідразил ($C_{18}H_{12}N_5O_6$)) антиоксидантом за схемою:



В результаті реакції інтенсивність пурпурово-синього забарвлення DPPH, розчиненого в метанолі, знижується [12, 13].

Визначення загальної антиоксидантної активності даних рослин здійснювали згідно модифікованої методики [14]. Подрібнену рослинну сировину (три проби масою по 1 г) екстрагували в 25 мл кожного із розчинників (дистильованої води, метанолу, етанолу) протягом 12 годин при постійному перемішуванні (8000 об./год на шейкері LT 2, Czechoslovakia). З отриманих екстрактів відбирали 0,1 мл розчину і додавали до 3,9 мл метанольного розчину DPPH. Оптичну густину всіх розчинів визначали на спектрофотометрі GENESYS 20 (Termo Electron, Germany) за довжини хвилі 515 нм. Обраховано % інгібування радикалів DPPH різними розчинами вихідного антиоксиданту. Антиоксидантну активність (AA) обраховували за формулою:

$$AA = \frac{A_0 - A_{10}}{A_0} \times 100,$$

A_0 – оптична щільність розчину радикалу; A_{10} – оптична щільність розчину радикалу із зразком.

Повторність дослідів трикратна. Обробку експериментальних даних проводили параметричним методом прикладної математичної статистики з розрахунком середнього значення (M), похибки середнього значення (m_m) та коефіцієнту варіації (V) за допомогою програми Office Excel 2003.

Результати та їх обговорення. На сьогодні відомо понад 3000 антиоксидантів рослинного походження. Антиоксиданти (АО) – речовини, які інгібують перекисне окислення ліпідів, стабілізують структуру і функції мембран клітин та створюють оптимальні умови для підтримки гомеостазу клітин і тканин під час різноманітних впливів патогенних факторів на живий організм. Головною мішенню АО є вільні радикали (ВР) – продукти неповного відновлення кисню, яким властива надзвичайно висока реакційна здатність, завдяки чому вони виявляють виражену пошкоджувальну дію на клітинні макромолекули. Найбільш слабким місцем для атаки ВР є клітинна мембрана, зокрема мембранні ліпіди, а також ДНК.

ВР виникають в організмі людини шляхом утворення із нейтрального кисню під дією ультрафіолетового чи іонізуючого опромінення або ж шляхом аутоокислення. Здорова клітина здатна відбити до 10 тисяч атак ВР завдяки роботі ферментів, а також дії вітамінів, мікроелементів, зокрема Mg, K, Zn, Se. Механізм дії АО полягає у перериванні реакційних ланцюжків між ВР і структурами клітини: молекули АО взаємодіють із активними радикалами, утворюючи малоактивні радикали. АО є ендегенні, тобто ті, що наявні в організмі, та екзогенні – надходять ззовні. Екзогенні АО можуть бути різного походження – природні (вітаміни, поліненасичені жирні кислоти, тощо) і синтетичні (ефіри галлової кислоти, органічні сполуки сірки і т.п.) [15-17].

На сьогодні види роду *Isodon* розглядаються як потенційне джерело природних АО. Серед низки видів відмічена висока антиоксидантна дія, яку виявляють насамперед фенольні сполуки рослин [18, 19]. До речі, вважається, що вміст речовин, які взаємодіють з DPPH радикалом, корелює з вмістом фенольних сполук. Це може вказувати на домінуючу роль останніх в сумарній активності рослинних екстрактів відносно цього радикалу [20]. В науковій літературі є відомості, що саме етанольний екстракт *I. japonicus* індукує значне підвищення активності клітин-вбивць (natural-killer cells) проти пухлинних клітин, а також інгібує ріст клітин лейкемії людини (K562) на 74%. Дослідження зарубіжних вчених показують, що ефект протипухлинної дії *I. japonicus* може бути пов'язаний із його здатністю стимулювати клітини-вбивці, тобто виступати в ролі неспецифічного імунотимулятора зазначених клітин. Експериментально встановлено, що для етанольних екстрактів рослин *Isodon* властива висока AA: зразки сировини, зібрані і проаналізовані в Китаї методом DPPH, мають 93,72% AA [21]. На сьогодні є чимало оприлюднених результатів із біологічної активності *Isodon*, зокрема *I. japonicus*, проте механізм дії з наукової точки зору ще не доведено [22, 23].

Наразі види роду *Isodon*, а саме *I. japonicus* та *I. japonicus* var. *glaucoalyx* є новими маловідомими рослинами на території України. В результаті біохімічних досліджень виявлено, що сировина інтродукованих в умовах Правобережного Лісостепу рослин має якісні характеристики антиоксидантної активності. Із трьох видів екстрактів, використаних в експерименті, показники сумарної AA сировини *I. japonicus* та *I. japonicus* var. *glaucoalyx* були вищими у метанольних екстрактах, порівняно із іншими розчинниками, і найнижчими – у водних (табл.).

Таблиця. Сумарна антиоксидантна активність інтродуцентів роду *Isodon* (Schrad. ex Benth.) Spach в різних екстрактивних речовинах

Назва рослини	Фаза розвитку рослини	DPPH					
		CH ₃ OH		C ₂ H ₅ OH		H ₂ O	
		M±m _M , %	V, %	M±m _M , %	V, %	M±m _M , %	V, %
<i>Isodon japonicus</i>	вегетативний ріст	82,25±1,88	1,88	79,44±0,78	1,69	55,85±3,8	11,78
<i>Isodon japonicus</i> var. <i>glaucocalyx</i>	вегетативний ріст	82,55±1,27	2,67	63,57±0,67	1,82	57,18±0,65	1,98
<i>Isodon japonicus</i> var. <i>glaucocalyx</i>	цвітіння	82,74±0,56	1,18	48,23±1,66	5,96	40,89±2,0	8,45

Зауважимо, що для аналізу *I. japonicus* var. *glaucocalyx* використана сировина двох строків заготівлі: літнього і осіннього. Влітку у рослин триває фаза вегетативного росту і спостерігається інтенсивний розвиток бічних пагонів, при цьому облиственість є максимальною. На початку осені рослини переходять до генеративної фази розвитку. В цей період починається стрімкий розвиток суцвіть, однак в результаті зміни теплового режиму листки нижнього ярусу всихають і таким чином суттєво зменшується загальна облиственість рослин. Порівнявши результати аналізу, вочевидь, що сировина *I. japonicus* var. *glaucocalyx* в осінній період виявляє меншу АА (на 15-16%), судячи із водних та етанольних екстрактів, хоча в метанолі лишається стабільно високою. Враховуючи ці особливості ритму сезонного розвитку рослин кращим періодом для заготівлі сировини є літній.

Висновки. В результаті проведених експериментальних досліджень встановлено, що в умовах Правобережного Лісостепу України інтродуценти роду *Isodon*: *I. japonicus* та *I. japonicus* var. *glaucocalyx* продукують сировину з високою АА. Це дає підстави розглядати їх як сировинне джерело при створенні продукції зі спрямованою антиоксидантною дією. Також, враховуючи їх маловідомий статус в Україні, в подальшому інтродукційна робота має бути зосереджена на вивченні біологічних особливостей та продуктивного потенціалу видів роду *Isodon*.

Подяка. Автори висловлюють глибоку подяку Яну Бріндзі, професору, директору Інституту охорони біорізноманіття та біологічної безпеки Словачького аграрного університету (м. Нітра, Словаччина) за сприяння у виконанні вищеписаних досліджень.

Список використаних джерел

1. Tuhinandri S. Medicinal plants Human Health and Biodiversity: A Broad Review / S. Tuhinandri, K. S. Samir // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. – 2015. – Vol. 147. – P. 59–110. Available from: www.link.springer.com
2. Вагабова Ф. А. Изучение суммарного содержания флавоноидов и антиоксидантной активности надземной части *Satureja subdentata* Boiss., произрастающей в условиях Дагестана / Ф. А. Вагабова, А. М. Мусаев, А. Н. Алибегова [и др.] // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 4(1). – С. 103–107.
3. Chen S. N. Diterpenoids from *Isodon eriocalyx* / S. N. Chen, J. M. Yue, S. Y. Chen, Z. W. Lin, G. W. Qin, H. D. Sun [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 1999. – Vol. 62 (5). – P. 782–784.
4. Selection for high oridonin yield in the Chinese medicinal plant *Isodon* (Lamiaceae) using a combined phylogenetics and population genetics approach / E-S. J. Harris, S. Cao, S. D. Schoville [et al.] // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7(11). – P. 1-12.

5. Ent-Kaurane diterpenoids from *Isodon japonicus* / S. S. Hong, S. A. Lee, X. H. Han [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 2008. – Vol. 71 (6). – P. 1055-1058.
6. Diterpenoids from *Isodon adenantha* / B. Jiang, H. Yang, M. L. Li [et al.] // *Journal of Natural Products*. – 2002. – Vol. 65 (8). – P. 1111–1116.
7. Ren K. Studies on oridonin solid lipid nanoparticles: preparation and pharmacodynamics / K. Ren, D. Chen, R. Zhang, L. Xie, H. Wang // *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2008. Vol. 3(2). – P. 88-93.
8. Feng W.S. Progress in studies of chemical compositions from *Isodon rubescens* / W. S. Feng, H. Lii, X. Zheng, Y. Wang // *Chinese Journal of New Drugs*, 2008. Available from: www.cnki.cn
9. Hong S.S. A new furofuran lignan from *Isodon japonicus* / S.S. Hong, C. Lee, C.H. Lee, M. Park, M.S. Lee, J.T. Hong [et al.] // *Archives of Pharmacological Research*. – 2009. – Vol. 32(4). – P. 501-504.
10. Huang H. Phenolic Compounds of *Isodon oresbii* / H. Huang, H.D. Sun, M.S. Wang, S.X. Zhao // *Journal of Natural Products*. – 1996. – Vol. 59 (11). – P. 1079–1080.
11. Хасанов В.В. Методы исследования антиоксидантов / В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева // *Химия растительного сырья*, 2004. – №3. – С. 63-75.
12. Бидарова Ф.Н. Экспресс-методы оценки антиокислительной антирадикальной активности органических субстратов / Ф.Н. Бидарова, Т.О. Хубаева, М.Т. Кисиева [и др.] : матер. VI междунар. студ. эл. науч. конф. "Студенческий научный форум", 15-февраля-31 марта 2014 г. – <http://www.scienceforum.ru/>
13. Lim J. H. Method for quantitatively analysing antioxidant using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) / J. H. Lim, J. B. Kim, D. H. Kim, Y. S. Hwang // *Korea Patent KR 1019970014958*. -1999 Sept 02. Available from: www.patent.ipexl.com/KR/
14. Brand-Williams W. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity / W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset // *Lebensmittel Wissenschaften und Technologie*. – 1995. – Vol. 28. – P. 25-30.
15. Смирнов Л. Антиоксиданты в медицине: новые возможности / Л. Смирнов // *Наука и жизнь*. – 2002. – № 12. – www.nkj.ru
16. Антиоксиданты в медицине и косметологии. – Available from: www.medobzor.net
17. Науменко Т. С. Антиоксиданты, их роль в биологии и медицине / Т. С. Науменко. – Волгоград, 2014. – www.bibliofond.ru
18. Masuoka N. Antioxidants from *Rabdosia japonica* / N. Masuoka, T. Isobe, I. Kubo // *Phytotherapy research*. – 2006. – Vol. 20(3). – P. 206–213.
19. Zhou W. Phenolic constituents from *Isodon lophanthoides* var. *graciliflorus* and their antioxidant and antibacterial activities / W. Zhou, H. Xie, X. Xu // *Journal of Functional Foods*. – 2014. – Vol. (6). – P. 492–498.
20. Волков В.А. Физико-химические закономерности взаимодействия 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила с антиоксидантами растительного происхождения : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 02.00.04 / Волков Владимир Анатольевич. – Тверь, 2010. – 137 с.
21. Of 22 Labiatae Antioxidant Activity of Plants. *Clinical Medicine Papers*. 2011;11. Available from: www.anpaper.com
22. Hwang Y. J. Study on the Immunomodulation Effect of *Isodon japonicus* and NK Anti-Tumor Activity / Y. J. Hwang, J. Kim, D.S. Park, K.A. Hwang // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2012. – Vol. 13(4). – P. 4880–4888.
23. An B. J. Antioxidant and Antibacterial Effects of Korean *Isodon japonicus* H. / B.J. An, J.M. Park, H.J. Bae [et al.] // *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 49(2). – P. 129–134.

Надійшла до редколегії 16.03.15

С. Ковтун-Водяницкая, канд. биол. наук., Е. Вергун, канд. биол. наук
Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины, Киев, Украина

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ ИНТРОДУЦЕНТОВ РОДА *ISODON* (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH

Определено суммарную антиоксидантную активность надземной части растений *Isodon japonicus* (Burman) H. Hara и *I. japonicus* (N. Z. Burm) Hara var. *glaucocalyx* (Maxim.) H. W. Li, интродуцированных в Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины (Правобережная Лесостепь). Использован спектрофотометрический метод со спиртовым раствором радикала DPPH. Исследованы образцы сырья интродуцентов, экстрагированные водой, метанолом и этанолом. Наиболее высокая антиоксидантная активность получена в метаноле 82-83%. Фаза развития растений не оказывала кардинального влияния на высокий результат. Установлена высокая антиоксидантная активность представителей рода *Isodon*, интродуцированных в Украину. Полученные результаты позволяют рассматривать их как потенциальный источник сырья для создания продукции с нацеленным антиоксидантным действием.

Ключевые слова: интродуценты, *Isodon*, антиоксидантная активность, DPPH-метод.

S. Kovtun-Vodyanitska, PhD, O. Vergun, PhD

M.M. Gryshko National Botanical Garden National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THE ABOVE-GROUND PARTS INTRODUCTENTS OF THE GENUS *ISODON* (SCHRAD. EX BENTH.) SPACH

It was determined the total antioxidant activity above-ground parts of plants *Isodon japonicus* (Burman) H. Hara and *I. japonicus* (N. Z. Burm) Hara var. *glaucoalyx* (Maxim.) H. W. Li, introduced in M.M. Gryshko National Botanical Garden of NAS of Ukraine (Right-bank Forest-steppe). Used spectrophotometric method with an alcoholic solution of the radical DPPH. Samples of raw plant extracted with water, methanol and ethanol. The high antioxidant activity was obtained in methanol 82-83%. Phase development of plant did not has a cardinal effect on higher result. Installed the high antioxidant activity the species of genus *Isodon*, introduced in Ukraine. The obtained results allow us to consider them as a potential source of raw materials to creating products with the targeted antioxidant effect.

Key words: *introducents, Isodon, antioxidant activities, DPPH*.

УДК 577.217.5

А. Малина, асп.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ,

О. Корнелюк, чл.-кор. НАН України, д-р біол. наук, проф.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

ВЗАЄМОДІЯ ПРОТИПУХЛИННОГО ЦИТОКІНА ЕМАР II З ГІДРОКСИПРОПІЛ- β -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

Проведено дослідження зі взаємодії протипухлинного цитокіну ЕМАР II з гідроксипропіл- β -циклодекстрином методами оптичної спектроскопії. Встановлено, що ГПЦД специфічно зв'язується з ЕМАР II, причому найбільш вірогідним сайтом зв'язування є частково експонований залишок триптофану Trp126, локалізований в заглибині на поверхні ЕМАР II поряд з функціонально важливим лізин-багатим кластером.

Ключові слова: флуоресценція, гідроксипропіл- β -циклодекстрин, рекомбінантний цитокін ЕМАР II.

Вступ. Неправильний фолдинг і агрегація білків супроводжуються утворенням нерозчинних внутрішньоклітинних структур, що призводять до пошкодження і загибелі клітин. Дослідження механізму агрегації білків і механізмів, які запобігають їх агрегації, поряд з фундаментальним значенням має істотну практичну цінність для терапії так званих конформаційних (дегенеративних і нейродегенеративних) хвороб, зумовлених агрегацією білків. Індукувати агрегацію білків в клітинах можуть різні процеси. Перш за все це тепловий та окиснювальний стреси. *In vitro* нативні білки можуть бути розгорнуті в результаті теплової денатурації, а також під дією денатуруючих агентів, таких як гуанідінгідрохлорид або сечовина [3; 6]. Розгорнуті білки можуть взаємодіяти між собою, в основному за участю контактів гідрофобних поверхонь, з утворенням амілоїдних або аморфних агрегатів [3; 6; 15]. У зв'язку з цим дослідження механізму агрегації білків і механізмів пригнічення їхньої агрегації агентами природного і штучного походження є одним із актуальних напрямів сучасної біології.

Дослідження кінетики теплової агрегації різних білків в широкому діапазоні температур і концентрацій з використанням методу динамічного світлорозсіювання показало, що початковою стадією процесу агрегації білків є стадія утворення стартових агрегатів [8; 10; 11]. Стартовий агрегат включає сотні молекул денатурованого білка. Подальша агрегація білка обумовлена злипанням стартових агрегатів і агрегатів більш високого порядку. Стадія зростання білкових агрегатів протікає в кінетичному режимі, при якому кожне зіткнення призводить до злипання білкових агрегатів (так званий режим diffusion-limited cluster-cluster aggregation, DLCA) [10; 11].

Для зниження агрегації білків використовують низькомолекулярні сполуки, такі як циклодекстрини (ЦД) та їхні похідні [2; 10; 13-15]. Здатність ЦД пригнічувати агрегацію білків пояснюється їх властивістю зв'язуватися з залишками ароматичних амінокислот в ненативних (частково розгорнутих) формах білків.

Дослідження впливу ЦД на теплову інактивацію, денатурацію і агрегацію білків має важливе значення для біотехнології (підвищення виходу розчинної форми нативного рекомбінантного білка з солюбілізованих тілець

включення) і медицини (збільшення терміну зберігання білків, які мають терапевтичне значення, таких як гормон росту та інсулін; створення систем цілеспрямованої доставки ліків).

Відомо, що АРСазі можуть приймати участь в регуляторних процесах в клітинах. Клонування і секвенування гена тирозил-тРНК синтетази ссавців виявило високу гомологію амінокислотної послідовності С-кінцевого некаталітичного модуля цього ферменту до цитокіну ЕМАР II (endothelial monocyte activating polypeptide II), яка складає більше 80% (52% ідентичності) [5; 16]. Цитокін ЕМАР II було відкрито при дослідженні факторів, які забезпечують підвищену чутливість мікроциркуляторного русла деяких пухлин до фактору некрозу пухлин (TNF). Подальші дослідження ЕМАР II показали, що він має протипухлинну і протизапальну активність, бере участь в ангіогенезі, ембріогенезі та деяких патологічних процесах, індукує апоптоз клітин ендотелію. Пізніше було встановлено, що білком-попередником цього цитокіну є AIMP1/p43 – один з білків мультиферментного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз вищих евкаріотів. Загальновідомо, що злоякісні пухлини займають друге місце серед причин смерті в економічно розвинутих країнах та третє – в країнах, що розвиваються. Дослідження процесів, які лежать в основі взаємодії злоякісних новоутворень з організмом-хазяїном, мають теоретичні підстави для розробки нових протипухлинних препаратів і підходів до лікування онкологічних захворювань.

Метою роботи було дослідження взаємодії протипухлинного цитокіну ЕМАР II з гідроксипропіл- β -циклодекстрином.

Матеріали і методи. Експресія, виділення і очистка рекомбінантного білка ЕМАР II з клітин *Escherichia coli*. Для експресії білка ЕМАР II було використано штам-продуцент, отриманий на основі реципієнта *E. coli* BL21(DE3)pLysE. Штам клітин трансформовано плазмідним вектором pET-30a-ЕМАР II, у якого під контролем промотора фага T7 міститься ген, який кодує синтез цільового білка ЕМАР II. Генетичним маркером плазмиди pET-30a є ген *kan*, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотику канаміцину.