

*Alicja Karwowska¹, Ewa Grzegorzczuk¹, Anna Worowska²,
Joanna Filon¹, Jan Karczewski¹*

HAMOWANIE AKTYWNOŚCI KATEPSYNY D I KATEPSYNY E PRZEZ EKSTRAKTY Z NASION

¹Zakład Higieny i Epidemiologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku,
alicja.karwowska@umb.edu.pl

Kierownik prof. dr hab. n. med. *J. Karczewski*

²Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku,
chirnacz@umb.edu.pl

Celem pracy było określenie stopnia hamowania aktywności peptydaz karboksylowych: katepsyny D i katepsyny E przez ekstrakt z nasion z uwzględnieniem ewentualnego wpływu polifenoli na aktywność tych peptydaz. Stwierdzono, że aktywność katepsyny D jest hamowana w największym stopniu przez ekstrakty z soi (40%), słonecznika (39%) i soczewicy (25,2%). Ekstrakty z bobu, gryki i maku nie wywierają wpływu na aktywność tego enzymu. Ekstrakty z soczewicy i grochu hamują aktywność katepsyny E w około 70%. Ekstrakty z maku i żyta nie hamują aktywności katepsyny E. Największe stężenie polifenoli stwierdzono w nasionach słonecznika, soczewicy, soi.

Hasła kluczowe: nasiona roślin, hamowanie aktywności katepsyny D
i katepsyny E

Key words: plant seeds, activity inhibition of cathepsin D and cathepsin E

Nasiona roślin zawierają peptydazy i ich inhibitory (1, 2, 3, 4, 5, 6). W okresie spoczynku inhibitory zabezpieczają białka nasion przed proteolityczną degradacją. W okresie kiełkowania, peptydazy zawarte w nasionach trawią białka zapasowe dostarczając aminokwasów uczestniczących w rozwoju rośliny (7, 8). Nasiona stanowią źródło białek odżywczych, peptydaz, a także ich inhibitorów/inaktywatorów. Mogą one wywierać wpływ na ustrojowe enzymy proteolityczne mające udział w patogenezie niektórych chorób przewodu pokarmowego, naczyń krwionośnych i innych narządów (9, 10). Zawarte w nasionach związki hamujące aktywność peptydazową to polipeptydowe inhibitory (4). Inaktywacji tych peptydaz mogą dokonywać także niespecyficzne inaktywatory, takie jak polifenole (11).

Celem pracy było określenie stopnia hamowania aktywności peptydaz karboksylowych: katepsyny D i katepsyny E przez ekstrakt z nasion roślin spożywanych przez człowieka. W interpretacji wyników uwzględniono ewentualny wpływ polifenoli zawartych w nasionach na aktywność tych peptydaz.

MATERIAŁ I METODY

Źródłem katepsyny D był homogenat aorty człowieka (12), a katepsyny E hemolizat erytrocytów człowieka (13).

Aktywność katepsyny D oznaczano przy użyciu globiny wołu (13). Do oznaczenia aktywności katepsyny E posłużono się roztworem albuminy człowieka (14). Pozostałe odczynniki: bufor Brittona i Robinsona o pH 2,5 i 3,5; odczynnik miedziowy o składzie: 1 objętość 0,5% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ w 1% cytrynianie sodu $\times 5 \text{H}_2\text{O}$ i 30 objętości 10% Na_2CO_3 ; kwas trichlorooctowy (TCA), Chempur, Polska, albumina ludzka, odczynnik Folina i Ciocalteau, Sigma, USA.

Pozbawione łupiny nasiona bobu właściwego (*Vicia faba major*), dyni olbrzymiej (*Cucurbita maxima*), fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris*), grochu siewnego (*Pisum sativum*), gryki zwyczajnej (*Phagopyrum sagittatum*), jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*), kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*), maku lekarskiego (*Papaver somniferum*), owsa siewnego (*Avena sativa*), prosa zwyczajnego (*Panicum miliaceum*), pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*), słonecznika zwyczajnego (*Helianthus napus*), soczewicy jadalnej (*Lens culinaris*), soi zwyczajnej (*Glycine Willd*) i żyta zwyczajnego (*Secales cereale*) rozdrażniano w młynku mechanicznym. Następnie poddano ekstrakcji 0,15 mol/dm³ NaCl, pH 7,4 w stosunku 1:9 w/v w ciągu 2 godzin, ciągle mieszając. Płyn nadosadowy otrzymany przez wirowanie (1500 x g, 4°C, 30 minut) użyto do oznaczeń. pH ekstraktów mierzono przy użyciu pehametru Lab 850 Schott Instruments. Białko oznaczano metodą *Bradforda* (15).

W celu określenia aktywności inhibitorowej katepsyny D do 0,35 cm³ homogenatu aorty dodawano 0,05 cm³ ekstraktu z nasion, (w kontroli 0,05 cm³ buforu), preinkubowano 30 minut w temperaturze 37°C, dodawano 0,1 cm³ globiny i inkubowano 6 godzin w temperaturze 37°C. Wszystkie odczynniki posiadały pH 3,5. Reakcję przerywano przez dodanie 0,1 cm³ 10% TCA. Próby wytrącone w czasie zero stanowiły kontrolę. W otrzymanym przez wirowanie płynie nadosadowym oznaczono ilość uwolnionej tyrozyny za pomocą odczynnika miedziowego i odczynnika *Folina* i *Ciocalteau* (16).

W celu określenia aktywności inhibitorowej katepsyny E do 0,35 cm³ hemolizatu erytrocytów dodawano 0,05 cm³ ekstraktu z nasion, (w kontroli 0,05 cm³ buforu), preinkubowano 30 minut w temperaturze 37°C, dodawano 0,1 cm³ albuminy i inkubowano 30 minut w temperaturze 45 °C. Wszystkie odczynniki posiadały pH 2,5. Reakcję przerywano przez dodanie 0,1 cm³ 10% TCA. Próby wytrącone w czasie zero stanowiły kontrolę. W otrzymanym przez wirowanie płynie nadosadowym oznaczono ilość uwolnionych peptydów (14).

Aktywność katepsyny D i katepsyny E w teście bez ekstraktu przyjęto za 100%. Z obniżenia ilości uwolnionej tyrozyny w teście z ekstraktami wnioskowano o stopniu inhibicji peptydaz (16).

Stężenie polifenoli oznaczono metodą spektrofotometryczną *Singletona* i *Rossi* (17) i wyrażono w przeliczeniu na ekwiwalenty kwasu galusowego.

Obniżenie aktywności enzymatycznej o ponad 10%, w stosunku do próby bez ekstraktu, przyjęto za znaczące. Oznaczenia wykonano w sześciu oddzielnych próbkach ekstraktu z nasion, a uzyskane wartości średnie zamieszczono w tabelach.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Ekstrakty nasion wykazują słabo kwasowe pH (tab. I). Zawartość białka była najniższa w ekstrakcie z nasion jęczmienia i wynosiła od 0,8842 mg/cm³, a w ekstrakcie z nasion soi była najwyższa – 1,49 mg/cm³.

Tabela 1. Wartość pH i stężenie białka

Table 1. pH value and protein content

Ekstrakt z nasion	pH (SD)	Stężenie białka mg/cm ³ , (SD)
Bób	6,3 (0,14)	1,19 (0,26)
Dynia	6,8 (0,24)	1,09 (0,33)
Fasola	6,0 (0,15)	1,35 (0,21)
Groch	6,4 (0,13)	1,31 (0,19)
Gryka	6,2 (0,21)	1,05 (0,22)
Jęczmień	5,3 (0,11)	0,40 (0,13)
Kukurydza	6,1 (0,28)	1,34 (0,16)
Mak	6,0 (0,16)	1,46 (0,18)
Owies	6,0 (0,2)	0,66 (0,34)
Proso	6,3 (0,14)	0,52 (0,13)
Pszenica	6,3 (0,25)	0,73 (0,17)
Słonecznik	6,4 (0,16)	1,09 (0,19)
Soczewica	6,3 (0,5)	1,44 (0,35)
Soja	6,2 (0,17)	1,49 (0,12)
Żyto	6,3 (0,11)	0,88 (0,19)

Aktywność katepsyny D jest hamowana w największym stopniu przez ekstrakty z nasion soi (40%), słonecznika (39%) i soczewicy (25,2%) (tab. II). Aktywność tego enzymu hamują również nieznacznie ekstrakty z owsa i pszenicy. Ekstrakty z bobu, gryki i maku nie wywierają wpływu na aktywność tego enzymu.

Ekstrakty z soczewicy i grochu hamują aktywność katepsyny E w około 70% (tab. II). Znaczny stopień inhibicji wykazują również ekstrakty z bobu, dyni, fasoli, gryki, jęczmienia, kukurydzy, owsa, prosa, pszenicy, słonecznika i soi. Ekstrakty z maku i żyta nie hamują aktywności tego enzymu.

Tabela II. Hamowanie aktywności katepsyny D i katepsyny E przez ekstrakty z nasion

Table II. Impeding cathepsin D and cathepsin E activity by seeds extracts

Ekstrakt z nasion	Hamowanie aktywności Katepsyny D		Hamowanie aktywności Katepsyny E	
	Tyrozyna, nmol/cm ³ (SD)	% ¹	Peptydy, ng/cm ³ (SD)	% ²
Bób	450,3 (9,25)	0,0	0,825 (0,20)	31,3
Dynia	430,5 (10,55)	4,1	0,888 (0,29)	26,0
Fasola	437,5 (14,29)	2,5	0,663 (0,34)	44,8
Groch	445,2 (7,02)	0,8	0,388 (0,22)	67,7
Gryka	450,1 (5,54)	0,0	0,663 (0,21)	44,8
Jęczmień	440,2 (21,76)	1,9	0,538 (0,41)	55,2
Kukurydza	429,7 (19,34)	4,3	1,063 (0,23)	11,4
Mak	453,2 (28,32)	0,0	1,25 (0,14)	0,0
Owies	352,6 (21,29)	21,4	0,663 (0,21)	44,8
Proso	448,2 (19,11)	0,3	0,95 (0,25)	20,8
Pszenica	381,4 (15,35)	15,0	0,625 (0,27)	47,9
Słonecznik	273,8 (7,78)	39,0	0,85 (0,31)	29,2
Soczewica	335,8 (21,94)	25,2	0,325 (0,10)	72,9
Soja	269,4 (16,36)	40,0	0,75 (0,24)	37,5
Żyto	439,2 (32,31)	2,1	1,238 (0,26)	0,0

¹ 100% - 448,8 nmol/cm³

² 100% - 1,20 ng/cm³

Największe stężenie polifenoli stwierdzono w nasionach słonecznika, soczewicy, soi i grochu, a najmniejsze w nasionach gryki, bobu, maku i żyta (tab. III).

Tabela III. Zawartość polifenoli w ekstraktach z nasion roślin

Table III. Polyphenol content in seeds extract

Ekstrakt z nasion	Polifenole mg/100 g (SD)
Dynia	96,18 (2,80)
Fasola	102,86 (6,33)
Groch	314,06 (3,45)
Gryka	61,00 (4,56)
Jęczmień	157,94 (10,25)

Kukurydza	148,58 (9,35)
Mak	84,68 (5,77)
Owies	166,18 (12,91)
Proso	96,46 (5,6)
Pszenica	123,40 (7,35)
Słonecznik	1202,28 (20,67)
Soczewica	558,86 (15,48)
Soja	376,58 (13,42)
Żyto	85,40 (15,20)

Ekstrakty z nasion, które w znacznym stopniu hamowały aktywność peptydazową zawierały duże stężenie polifenoli. Pozwala to na przypuszczenie, że związki te mogą mieć wpływ na inaktywację peptydaz niezależnie od hamującego działania inhibitorów katepsyny D i E. Wymaga to jednak potwierdzenia oddzielnymi eksperymentami.

WNIOSKI

1. Ekstrakty z nasion soi, słonecznika, soczewicy i w mniejszym stopniu innych roślin hamują aktywność katepsyny D.

2. Duże stężenie polifenoli w nasionach, których ekstrakty hamują aktywność katepsyny D i E, może świadczyć o wpływie tych związków na obniżanie aktywności enzymatycznej badanych peptydaz.

A. Karwowska, E. Grzegorzczak, A. Worowska,
J. Fiłon, J. Karczewski

IMPEDING CATHEPSIN D AND CATHEPSIN E ACTIVITY BY SEEDS EXTRACTS

Summary

The seeds consumed by people contain proteolytic enzymes and their inhibitors that prevent seed storage proteins from proteolytic degradation. They may affect systemic proteolytic enzymes that participate in pathogenesis of certain diseases of gastrointestinal tract, vessels and other organs.

The aim of the work was an attempt to evaluate the influence of seeds extract on impediment of cathepsin D and cathepsin E activity by extracts from these seeds.

Homogenate from abdominal aorta obtained from healthy organ donors was used as a source of cathepsin D while human erythrocyte hemolysate was the source of cathepsin E.

Cathepsin D activity is to a largest extent impeded by extracts from soy (40%), sun flower (39%) and lentil (25.2%). Extracts from broad bean, buckwheat and poppy seed exert no influence on this enzyme's activity. Extracts from lentils and peas impede cathepsin E activity in approximately 70%. Extracts from poppy seed and rye do not impede it.

PIŚMIENICTWO

1. *Koiwa H., Bressan R. A., Hasegawa P. M.*: Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Sci.*, 1997; 2: 379-384. -2. *Ryan C. A.*: Protease inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens. *Ann. Rev. Physiol.*, 1990; 28: 425-449. -3. *Shewry P. R., Lucaf J. A.*: Plant proteins the confer resistance to pests and pathogens. *Adv. Bot. Res.*, 1997; 26: 135-192. -4. *Laskowski M., Kato I.*: Protein inhibitors of proteases. *Ann. Rev. Biochem.*, 1980; 49: 593-626. -5. *Ryan C. A., Walker-Simmons M.*: Plant proteinases, w: *The biochemistry of plants*, red. A. Marcus. Acad. Press, New York, 1981; Vol. 6: 321-350. -6. *Simoes L., Faro C.*: Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.*, 2004; 271: 2067-2075. -7. *Golaszewski T., Siwecka M. A., Szarkowski J. W.*: Podstawowe procesy biochemiczne podczas kiełkowania nasion. *Post. Bioch.*, 1972; 18: 125-137. -8. *Viersta R. D.*: Protein degradation in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1993; 44: 385-410. -9. *Billing P.C., Longnecker M.P., Keary M., Taylor P.R.*: Protease inhibitor content of human dietary samples. *Nutr. Cancer*, 1990, 14: 81-93. -10. *Rackis J.J., Wolf W.J., Baker E.C.*: Protease inhibitors in plant foods: content and inactivation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1986; 199: 299-347.
11. *Karwowska A., Filon J., Grzegorzczak E., Karczewski J.*: Aktywność peptydazowa i hamowanie aktywności katepsyny D przez ekstrakt z nasion soczewicy. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011; 44: 805-808. -12. *Karwowska A., Gacko M., Worowska A., Krupkowska A.*: Próby standaryzacji rozdrabniania tkanek zwierzęcych do badań analitycznych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2006; 38 (supl.): 199-202. -13. *Marciniszyn J., Hartsuck J. A., Tang J.*: Mode of inhibition acid protease by pepstatin. *J. Biol. Chem.*, 1976; 251: 7088-7094. -14. *Chlabicz M., Gacko M., Worowska A., Łapiński R.*: Cathepsin E (EC 3.4.23.34) – a review. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2011, 49: 547-557. -15. *Bradford M. M.*: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976; 72: 248-254. -16. *Minarowska A., Karwowska A., Gacko M.*: Quantitative determination and localization of Cathepsin D and its inhibitors. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2009, 47: 153-177. -17. *Singelton V.L., Rossi J.A.*: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965; 16: 144-158.

Adres: 15-089 Białystok, ul. Mickiewicza 2c.