

Michał Chlabicz, Marta Siergiejuk, Anna Worowska, Radosław Łapiński

WPŁYW EKSTRAKTU Z NASION ROŚLIN SPOŻYWANYCH PRZEZ CZŁOWIEKA NA AKTYWNOŚĆ KATEPSYNY A, B, C I D

Klinika Chirurgii Naczyń i Transplantacji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Kierownik: prof. dr hab. med. *M. Gacko*

Oceniano wpływ ekstraktu z nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywność katepsyny A, B, C i D. Żaden z ekstraktów nasion badanych roślin nie hamuje aktywności katepsyny A. Aktywność katepsyny B hamuje ekstrakt z nasion gryki, jęczmienia, kukurydzy, maku i prosa. Aktywność katepsyny C hamuje ekstrakt maku i słonecznika. Aktywność katepsyny D hamuje ekstrakt z nasion fasoli, soczewicy i soi.

Hasła kluczowe: ekstrakt z nasion, aktywność katepsyny A, B, C i D.

Key words: seed extract, A, B, C, and D cathepsin activity.

Nasiona roślin spożywanych przez człowieka zawierają inhibitory peptydazy przewodu pokarmowego: pepsyny, enteropeptydazy, tripsyny, chymotrypsyny, elastazy trzustkowej oraz karboksypeptydazy A i karboksypeptydazy B (1-4).

Celem pracy jest ocena wpływu ekstraktu z nasion czternastu gatunków roślin na aktywność peptydaz lizosomalnych: katepsyny A, katepsyny B, katepsyny C i katepsyny D.

MATERIAŁY I METODY

Nasiona bobu, dyni, fasoli, grochu, gryki, jęczmienia, kukurydzy, maku, owsa, prosa, pszenicy, słonecznika, soczewicy, soi i żyta rozdrabniano za pomocą młynka mechanicznego. Rozdrobnione nasiona ekstrahowano 0,9% NaCl w stosunku 1:9 w/v, w temperaturze laboratoryjnej, w ciągu dwóch godzin, stosując ciągle

mieszanie. Płyn nadosadowy otrzymany przez wirowanie (2500 x g, 30 minut) posłużył do badań.

Oceniano wpływ ekstraktu z nasion w/w roślin na aktywność: katepsyny A przy użyciu Z-Phe-Ala, w pH 5,5 (5), katepsyny B przy użyciu Bz-DL-Arg-pNa, w pH 6,5 (6), katepsyny C przy użyciu Gly-Phe-pNA, w pH 6,0 (7) i katepsyny D przy użyciu globiny w pH 3,5 (8). Źródłem tych katepsyn był 20% homogenat wątroby wołu sporządzony wg (9). Test składał się z 0,2 ml homogenatu, 0,2 ml ekstraktu z nasion i 0,1 ml odpowiedniej dla każdej katepsyny nieszaniny aktywującej lub takiej samej objętości buforu. Po 10 minutowej preinkubacji dodawano 0,5 ml odpowiednio dla każdej katepsyny substratu i próby inkubowano 2 godziny w temperaturze 37⁰C. Reakcje przerywano przez dodanie 0,1 ml 10% kwasu trichlorooctowego. Próby wytracone w czasie zero stanowiły kontrolę. Próby wirowano (1500 x g, 30 minut, 2⁰C). W klarownym płynie nadosadowym oznaczono ilość uwolnionej alaniny (Ala) metodą ninhydrynową, ilość p-nitroaniliny (pNA) przez pomiar absorbancji przy 410 nm i ilość tyrozyny (Tyr) metodą *Folina* i *Ciocalteau*.

Obniżenie aktywności poszczególnych katepsyn o 10% i wyższe przyjęto jako znaczące.

Aktywność katepsyno -A, katepsyno -B, katepsyno -C i katepsyno -D podobną oznaczano w testach zawierających zamiast 0,2 ml homogenatu wątroby bufor fosforanowy o odpowiednim pH. Dalsze postępowanie metodyczne było jak w przypadku oznaczania aktywności inhibitorowej.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Jak wynika z tabeli I żaden z ekastraktów badanych nasion nie hamuje znacząco aktywności katepsyny A. Największe hamowanie aktywności katepsyny B (powyżej 30%) wykazuje ekstrakt nasion kukurydzy i maku, mniejsze (hamowanie 10-20%) ekstrakt z nasion bobu, gryki i jęczmienia, natomiast ekstrakt z nasion dyni, fasoli, grochu, owsa, pszenicy, słonecznika, soczewicy i żyta nie zawiera inhibitorów katepsyny B. Hamowanie aktywności katepsyny C (powyżej 30%) wykazuje ekstrakt z nasion maku, mniejsze (hamowanie 10-20%) ekstrakt z nasion dyni i słonecznika. Ekstrakt z pozostałych nasion nie hamuje aktywności katepsyny C. Aktywność katepsyny D hamuje znacznie (hamowanie powyżej 30%) jedynie ekstrakt z nasion soczewicy.

Nie znana jest struktura chemiczna substancji hamujących aktywność poszczególnych katepsyn. Najprawdopodobniej są nimi inhibitory peptydowe, w strukturze których niezbędna jest obecność grupy -S-S- dla wystąpienia aktywności inhibitorowej (10). Mogą je inaktywować związki polifenolowe występujące w nasionach (11-13). Nie można też wykluczyć działania inhibitorów zbudowanych z nietypowych aminokwasów syntetyzowanych przez drobnoustroje (14, 15).

Tabela 1. Hamowanie aktywności katepsyny A, katepsyny B, katepsyny C i katepsyny D przez ekstrakt z nasion roślin

Table 1. Inhibition of A cathepsin, B cathepsin, C cathepsin and D cathepsin activities by plant seed extracts

Nasiona	Aktywność (%hamowania)			
	Katepsyna A, Ala nmol/ml/h	Katepsyna B, pNa, nmol/ml/h	Katepsyna C, pNa, nmol/ml/h	Katepsyna D, Tyr nmol/ml/h
Bób	55,0 (0,9)	19,8 (10,0)	55,0 (0,0)	184,0 (0,0)
Dynia	44,0 (2,1)	28,6 (0,0)	44,0 (16,7)	175,0 (0,0)
Fasola	56,0 (0,0)	26,4 (0,0)	56,4 (0,0)	152,0 (2,0)
Groch	54,0 (2,0)	33,0 (0,0)	75,9 (0,0)	168,0 (0,0)
Gryka	54,0 (1,9)	19,8 (10,0)	56,0 (0,0)	180,8 (0,0)
Jęczmień	42,0 (2,5)	17,6 (20,0)	59,4 (0,0)	182,0 (0,0)
Kukurydza	54,0 (1,4)	13,2 (40,0)	50,6 (0,0)	176,0 (0,0)
Mak	56,0 (0,0)	15,4 (30,0)	36,3 (30,0)	180,0 (0,0)
Owies	52,0 (7,0)	33,0 (0,0)	64,0 (0,0)	176,6 (0,0)
Proso	55,0 (1,0)	19,8 (10,0)	56,0 (0,0)	178,6 (0,0)
Pszenica	56,0 (0,0)	24,2 (0,0)	55,0 (0,0)	182,0 (0,0)
Słonecznika	56,0 (0,0)	37,0 (0,0)	44,0 (16,6)	158,4 (1,0)
Soczewica	56,0 (0,0)	23,0 (0,0)	76,2 (0,0)	48,6 (72,0)
Soja	56,0 (0,0)	22,0 (0,0)	54,8 (0,0)	129,0 (33,0)
Żyto	56,0 (0,0)	22,0 (0,0)	59,0 (0,0)	160,0 (0,0)
Kontrola	56,0	22,6	52,8	168,0

M. Chlabicz, M. Siergiejuk, A. Worowska, R. Łapiński

INFLUENCE OF EXTRACTS OF CONSUMED SEEDS ON A, B, C, AND D CATHEPSIN ACTIVITY

Summary

Seed extract influence on A, B, C, and D cathepsin activity was evaluated. A cathepsin activity is not inhibited by any seed extracts while B cathepsin activity is inhibited by seed extracts from buckwheat, barley, corn, poppy, and millet. Seed extracts from poppy and sunflower inhibit C cathepsin activity and seed extracts from bean, lentil, and soya inhibit D cathepsin activity.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bańkowska A., Roszkowska-Jakimiec W., Worowski K.*: Inhibitor sof pepsin, trypsin and chymotrypsin In seeds of plants consumer by humans and animals. *Rocz. AM Białystok*, 1998; 43: 278-286. - 2. *Chojnacka-Zdrowska A.*: Inhibitory pepsyny występujące w nasionach dyni, grochu i słonecznika. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2005; 37 (suppl.): 329-331. - 3. *Siergiejuk M., Bańkowska-Luksza A., Worowska A., Gacko M.*: Wpływ inhibitorów peptydaz nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywację prokarboksypeptydaz i aktywność karboksypeptydaz trzustkowych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2011; 44: w druku. - 4. *Siergiejuk M., Karwowska A., Gacko M., Worowska A.*:

Wpływ inhibitorów z nasion roślin spożywanych przez człowieka na aktywność enteropeptydazy i aktywację trypsynogenu przez ten aktywator. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008; 41: 265-269. - 5. *Kawamura Y., Matoba T., Hata T., Doi E.*: Purification and some properties of cathepsin A of large molecular size from pig kidney. *J. Biochem.*, 1974; 76: 915-924. -6. *Keilova H., Tomasek V.*: Effect of papain inhibitor from chicken egg white on cathepsin B. *Biochem. Biophys. Acta*, 1974; 334: 179-183. - 7. *Planta R.J., Gruber M.*: A simple estimation of cathepsin C using a new chromogenic substrate. *Anal. Biochem.*, 1963; 5: 360-367. - 8. *Minarowska A., Karwowska A., Gacko M.*: Quantitative determination and localization of cathepsin D and its inhibitors. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2009; 47: 153-177. - 9. *Karwowska A., Gacko M., Worowska A., Krupkowska A.*: Próba standaryzacji rozdrabniania tkanek zwierzęcych do badań analitycznych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2006; suppl.: 199-202. - 10. *Winiarska-Mieczan A.*: Inhibitory trypsyny z rodziny Bosmana_Birka – budowa oraz znaczenie w żywieniu ludzi i zwierząt. *Med. Wet.*, 2007; 63: 276-281.

11. *Manach C., Scalbert A., Mirand C.*: Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79: 727-747. - 12. *Marita J.M., Hatfield R.D., Drink G.*: In vitro proteolytic inhibition, polyphenol oxidase activity and soluble o-diphenols in Grassems and cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 2010; 58: 959-966. - 13. *Santor L., Pezzato E., Dell'Aica I.*: Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem. Pharmacol.*, 2002; 64: 229-237. - 14. *Worowski K.*: Inhibitory enzymów proteolitycznych syntetyzowane przez drobnoustroje. *Post. Mikrobiol.*, 1979; 6: 267-282. - 15. *Worowski K.*: Proteoliza komórkowa i mechanizmy jej regulacji. *Post. Biol. Kom.*, 1997; 4: 243-250.

Adres: 15-276 Białystok, ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A.