

УДК 615.32:58+547.963

ЛЕКТИНЫ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЭХИНАЦЕЯ (*ECHINACEA* МОЕНШ.). 1. МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ

© С.В. Поспелов

Полтавская государственная аграрная академия, ул. Сковороды, 1/3,
Полтава, 36003 (Украина), e-mail: serg_ps@mail.ru

Разработана оригинальная методика оценки гемагглютинирующей активности экстрактов эхинацеи. Установлено, что для определения активности лектинов эхинацеи оптимальными условиями являются экстрагирование сырья физиологическим раствором и дальнейшее оценивание полученного экстракта с использованием фосфатно-цитратной буферной смеси (рН=4,4) при помощи эритроцитов крови человека, а определение активности следует проводить визуально в баллах.

Ключевые слова: лектины, гемагглютинация, эхинацея пурпурная, эхинацея бледная, сорт «Зирка Мыколы Вавылова», сорт «Красуня прерий», *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.

Введение

Виды рода эхинацея (*Echinacea* Moench, сем. Сложноцветные – *Asteraceae*) благодаря уникальному химическому составу используются во многих странах мира как сырье для создания препаратов иммуностимулирующего, противовоспалительного, антисептического действия [1]. Это в полной мере характерно и для стран СНГ, где эхинацея активно изучается и широко используется, особенно в связи с созданием новых продуктов и препаратов для ликвидации последствий аварии на Чернобыльской АЭС [2].

В этом плане украинские ученые занимают лидирующее положение. Только в Полтавской государственной аграрной академии в результате 20-летней планомерной работы собран и изучен родовой комплекс эхинацеи, выведены сорта эхинацеи пурпурной («Зирка Мыколы Вавылова») и эхинацеи бледной («Красуня прерий»), создана крупнейшая в СНГ сырьевая база, способная обеспечить всех потребителей экологически чистым сырьем самого высокого качества, разработаны и запатентованы технологии выращивания эхинацеи для лекарственного сырья, кормового направления для животноводства, медоносного – для пчеловодства [3].

В связи с углубленным изучением химического состава [4] и выяснением природы иммуностимулирующих свойств эхинацеи заслуживают внимания лектины – биологически активные вещества белковой природы, обладающие свойствами избирательно и обратимо взаимодействовать с углеводами и углеводсодержащими полимерами, что придает им ряд уникальных свойств [5].

Цель настоящих исследований – разработка методики определения агглютинирующей активности экстрактов эхинацеи.

Материалы и методы

В качестве растительного сырья использовали надземную и подземную части эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) сорта «Зирка Мыколы Вавылова» второго года вегетации, заготовленные в условиях промышленных плантаций в Полтавской области (Украина) в 2001–2004 гг. Траву эхинацеи

собирали в фазу массового цветения, корневища с корнями – в конце вегетационного сезона.

Воздушно-сухое сырье измельчали, просеивали на ситах с диаметром отверстий 1 мм и исполь-

Поспелов Сергей Викторович – доцент кафедры земледелия и агрохимии им. В.И. Сазанова, кандидат сельскохозяйственных наук, e-mail: serg_ps@mail.ru

зовали для экстракции. Для этого одну часть сырья заливали десятью частями экстрагента, настаивали 2 ч при комнатной температуре и фильтровали.

Оценку активности лектинов проводили путем постановки реакции гемагглютинации в иммунологических планшетах [5]. Для этого в каждую лунку планшета добавляли по 0,05 мл физиологического раствора или буферных смесей, затем вносили по 0,05 мл экстракта и готовили серию последовательных двукратных разведений. После этого в каждую лунку добавляли по 0,05 мл 2%-ной суспензии отмытых эритроцитов и планшет оставляли при 25 °С на 2 ч. Оценку проводили визуально по пятибалльной шкале [5]:

3 балла – резко выраженная агглютинация: эритроциты в виде тонкой пленки более или менее равномерно распределяются по всему дну лунки;

2 балла – умеренная агглютинация: эритроциты расходятся по дну лунки на расстояние, превышающее в диаметре 2 мм, образуя кольцо с резко выраженной зернистостью по краям;

1 балл – слабая агглютинация: эритроциты расходятся по дну лунки на расстояние менее 2 мм, образуя колечко или диск;

0,5 балла – минимальная агглютинация: в центре совокупности эритроцитов, осевших на дно лунки, возникает небольшой просвет;

0 баллов – отсутствие агглютинации: эритроциты скапливаются в центре лунки.

После визуальной оценки агглютинации в каждой лунке серии разведений подсчитывали сумму во всех лунках, где реакция определялась. Таким образом, максимальная активность в восьми лунках может составлять: $8 \times 3,0 = 24$ балла.

Углеводную специфичность определяли по разработанной нами ранее методике [6]. Препарат лектинов с постоянным титром (1 : 4) помещали в иммунологические планшеты, смешивали с равными объемами углеводов в серии их последовательных двукратных разведений. Систему инкубировали 1 ч при комнатной температуре, после чего в каждую лунку вводили равный исходному объему лектинов объем 2%-ной суспензии трижды отмытых эритроцитов и оставляли на 1–2 ч при температуре 25 °С. Аналогично проводили постановку реакции гемагглютинации с лектинами без добавления углевода-ингибитора. Для оценки специфичности подсчитывали сумму активности лектинов без углевода-ингибитора, затем с углеводом, и по разности определяли сродство лектинов к углеводам. При этом, чем больше величина разности, тем выше специфичность.

Статистическая оценка по t-критерию Стьюдента проводилась с помощью пакета анализа в программе EXEL.

Результаты и их обсуждение

Имеются данные о поиске лектинов в семенах эхинацеи узколистной (*Echinacea augustifolia* DC) среди других 167 видов растений североамериканской флоры [7]. Авторы использовали для этого эритроциты человека (обработанные и не обработанные ферментами), однако агглютинирующей активности экстрактов обнаружено не было.

Планомерный поиск лектинов эхинацеи пурпурной проводился в Украине [8] и Литве [9]. В исследованиях сотрудников Каунасской медицинской академии была проведена оценка гемагглютинирующей активности экстрактов эхинацеи пурпурной (не указано, какой части растения) с эритроцитами человека всех четырех групп крови, а также крови кролика, свиньи, мыши и лягушки. При этом слабая активность регистрировалась при взаимодействии с кровяными тельцами человека В(III) группы крови и мыши [9]. Ранее в наших опытах [8] была проведена экстракция корней, листьев, стеблей, соцветий и плодов забуференным физиологическим раствором в соотношениях сырье : экстрагент 1 : 5 и 1 : 10. Во всех случаях были отмечены отрицательные результаты.

Несколько иные данные были получены сотрудниками Национального университета им. Т.Г. Шевченко [10]. Водно-солевые экстракты корней и стеблей 10-дневных проростков, а также стеблей, листьев, нерасцветших соцветий и семян растений второго года вегетации не взаимодействовали с эритроцитами человека. В то же время экстракты корней и соцветий проявили специфическую активность. Авторы установили, что альбуминовая фракция не показала активности, а глобулиновая и глиадиновая фракции белков реагировали с экстрактами стеблей, нецветущих соцветий, листьев, цветущих соцветий и корней (по сте-

пени уменьшения активности). Положительная реакция была получена практически во всех вариантах при использовании эритроцитов крысы, что свидетельствует о специфизме рецепторов лектинов эхинацеи.

Неоднозначность имеющихся данных побудила нас продолжить совершенствовать методику определения активности лектинов эхинацеи. Поскольку известно, что плоды и семена растений содержат максимальное количество лектинов [5], нами были изучена активность экстрактов плодов после их фракционирования. Она определялась нами поэтапно в процессе проведения ступенчатого низкотемпературного этанольного фракционирования до 20, 35, 50 и 76% конечной концентрации [11].

Пробы измельчали, и после 2-часовой экстракции (1 : 10) раствор охлаждали до 4 °С, насыщали 96% этанолом до 20%-ной конечной концентрации и доводили до pH=3,0 1 н HCl. Смесь выдерживали 2 ч при +4 °С и полученный осадок отделяли центрифугированием (15 мин при 3000 об/мин), растворяли в 1 мл физиологического раствора и оценивали активность агглютинации. Супернатант доводили до pH=8,0 1 н NaOH, охлаждали 2 ч и опять центрифугировали. Осадок растворяли в 1 мл физиологического раствора и определяли активность агглютинации. Второй, третий и четвертый этапы заключались в последовательном насыщении надосадочной жидкости охлажденным 96% этанолом до 35, 50 и 76% конечной концентрации с отделением осадка после каждого этапа.

Осадок и надосадочную жидкость в каждом этапе проверяли на наличие лектинов. При этом реакция агглютинации регистрировалась только в двух вариантах: при 20%-ном насыщении этанолом с pH=3,0 (титр агглютинации 1 : 256) и pH=8,0 (титр 1 : 512) (табл. 1). В первом случае при начальном разведении наблюдалась реакция торможения агглютинации.

Нами установлено, что оптимальными условиями фракционирования было насыщение экстракта этанолом до 20%-ной конечной концентрации, доведение раствора до pH=8,0, охлаждение и центрифугирование. Полученный осадок проявил высокую активность в реакции с эритроцитами разных групп крови человека в системе АВ0: с первой О(I) группой она составила 16 баллов, А(II) – 15 баллов и АВ(IV) – 11 баллов.

По описанной методике [6] мы провели оценку взаимодействия частично очищенных лектинов листьев, стеблей и корневищ с корнями эхинацеи пурпурной с углеводами арабинозой, глюкозой, галактином, ксилозой, галактозой и фруктозой. При этом торможения реакции агглютинации практически не наблюдалось.

В.О. Антонюк и О.В. Рыбак [12] выделили и получили лектины эхинацеи пурпурной высокой степени очистки, изучили их углеводную специфичность. Авторы сделали вывод, что лектины эхинацеи можно отнести к группе маннозоспецифичных, хотя они отличаются от лектинов однодольных и двудольных, в частности семейства бобовых, которые тоже относятся к этой группе. Выход очищенного продукта составляет 133 мг на килограмм воздушно-сухого сырья.

При проведении массовых анализов концентрирование белков существующими методами (этанолом, ацетоном, солями и т.д.) в каждом образце представляется довольно проблематичным. Поэтому в своих опытах мы применили в качестве экстрагента физиологический раствор, а дальнейшую оценку проводили с использованием фосфатно-цитратной буферной смеси (ФЦБС) на основе физиологического раствора

Таблица 1. Геммагглютинирующая активность экстракта плодов эхинацеи пурпурной на разных этапах этанольного фракционирования

Этапы фракционирования	Величина активности, баллы
Экстракция физиологическим раствором	0,0
Осадок после 20%-ного насыщения, pH=3,0	14,0±0,9
Осадок после 20%-ного насыщения, pH=8,0	22,0±1,2
Супернатант при 20%-ном насыщении	0,0
Осадок после 35%-ного насыщения	0,0
Супернатант при 35%-ном насыщении	0,0
Осадок после 50%-ного насыщения	0,0
Супернатант при 50%-ном насыщении	0,0
Осадок после 76%-ного насыщения	0,0
Супернатант при 76%-ном насыщении	0,0

(табл. 2). Результаты свидетельствуют о том, что лектины эхинацеи проявляют свою активность в кислой зоне: в наших опытах при pH=4,0–4,4. При этом прослеживаются определенные закономерности. При извлечении белковых соединений из стебля наблюдается полный и частичный лизис при pH=4,0–4,2 и хорошо определяемое расположение эритроцитов в лунках планшета при pH=4,4. При извлечении из корневищ лизис был только при pH=4,0. В то же время лектины листьев хорошо определялись в кислой зоне (pH=4,0–4,4).

Таблица 2. Гемагглютинирующая активность лектинов в зависимости от кислотности среды

Условия определения	Величина активности, баллы		
	листья	стебель	корневище
Физиологический раствор + ФЦБС, pH=4,0	9,0±0,7	Л. полн.	Лизис
Физиологический раствор + ФЦБС, pH=4,2	9,0±0,6	Л. част.	3,0±0,3
Физиологический раствор + ФЦБС, pH=4,4	5,5±0,2	7,5±0,3	1,5±0,1
Физиологический раствор + ФЦБС, pH=4,6	0,0	0,0	0,0
Физиологический раствор + ФЦБС, pH=4,8	0,0	0,0	0,0
Физиологический раствор + ФЦБС, pH=5,0	0,0	0,0	0,0
Физиологический раствор + ФЦБС, pH=6,0	0,0	0,0	0,0
Физиологический раствор + ФЦБС, pH=7,0	0,0	0,0	0,0
Физиологический раствор + ФЦБС, pH=8,0	0,0	0,0	0,0

Примечание. Л.полн. – лизис полный; Л.част. – лизис частичный/

Оценивание результатов визуально в баллах позволяет быстро, объективно и достаточно точно определить интенсивность реакции гемагглютинации. Известный украинский лектинолог Е.Л. Голынская широко применяла этот метод в своих исследованиях, всячески его популяризировала и считала более точным по сравнению с оценкой по титру [6]. Кроме того, полученные данные можно сравнить и статистически оценить, что также очень важно. В таблице 3 приведены данные оценки активности по титру агглютинации и в баллах. Агглютинирующая активность экстрактов соцветий эхинацеи пурпурной изменяется в опыте от 4,5 до 6,0 баллов, в то же время по титру агглютинации это составляет 1 : 8 – 1 : 16. У эхинацеи бледной экстракты имеют высокую активность – 20,5–24,0 баллов, а по титру – 1 : 256. Оценивание результатов эксперимента по титру агглютинации не позволяет провести статистические расчеты, в то время как оценивание в баллах в полной мере позволяет сравнить между собой варианты опыта и вынести суждение о достоверности полученных данных.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что оптимальными условиями оценки лектиновой активности экстрактов эхинацеи следует считать использование фосфатно-цитратной буферной смеси с pH=4,4, приготовленной на основе физиологического раствора.

В процессе экспериментов нами была отмечена следующая важная особенность: при последовательном разведении лектинов в лунках планшета их активность в первых лунках была высокая, затем снижалась, после чего опять повышалась. Таким образом, наблюдалось торможение реакции агглютинации, сходное с тем, что происходит при определении наличия взаимодействия углеводов с лектинами. Вероятно, это было вызвано наличием в растворе полисахаридного комплекса, который «маскировал» активность гемагглютининов, что следует учитывать при поиске лектинов в растениях.

Таблица 3. Активность лектинов эхинацеи и их статистическая оценка

Варианты	Соцветия эхинацеи пурпурной		Соцветия эхинацеи бледной	
	Оценка по титру	Оценка в баллах	Оценка по титру	Оценка в баллах
Повторности опыта: 1	1 : 8	4,5	1 : 256	20,5
2	1 : 16	6,0	1 : 256	21,0
3	1 : 16	5,0	1 : 256	22,0
4	1 : 8	4,5	1 : 256	24,0
Среднее	–	5,0	–	21,9
Дисперсия	–	0,5	–	2,39
$t_{0,01}(\text{теоретическое}) = 3,18^*$ $t(\text{фактическое}) = 17,47$				

Примечание. *разница достоверна, если значение $t(\text{факт.})$ больше $t_{0,01}(\text{теор.})$.

Выводы

1. В результате исследований предлагается новая методика проведения массовых анализов определения гемагглютинирующей активности экстрактов эхинацеи.

2. Измельченное сырье следует экстрагировать физиологическим раствором, а дальнейшую оценку проводить с использованием фосфатно-цитратной буферной смеси (pH=4,4), приготовленной на основе физиологического раствора при помощи эритроцитов крови человека, а активность определять визуально в баллах.

Список литературы

1. Echinacea: the genus Echinacea / ed. S.C. Miller. CRC Press, 2004. 276 p.
2. Изучение и использование эхинацеи // Матер. межд. науч. конф. Полтава, 1998. 156 с.
3. Поспелов С.В., Самородов В.Н. Эхинацея пурпурная: от индейских прерий до украинских степей // Зерно. 2009. №6. С. 64–68.
4. Самородов В.Н., Поспелов С.В., Моисеева Г.Ф., Середа А.В. Фитохимический состав представителей рода эхинацея (*Echinacea Moench.*) и его фармакологические свойства (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 1996. №4. С. 32–37.
5. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. Львов, 1981. 156 с.
6. А.с. № 1732276 (СССР). Способ оценки физиологической активности лектинов к сахарам / Е.Л. Гольнская, С.В. Поспелов, В.Н. Самородов / 1992.
7. Hardman J.T., Beck M.L., Owensby C.E. Range for lectins // Transfusion. 1983. Vol. 23. Pp. 519–522.
8. Поспелов С.В., Самородов В.Н. Поиски и свойства лектинов эхинацеи пурпурной // Проблеми лікарського рослинництва. Тези доповідей Міжнародної науково-практичної конференції з нагоди 80-річчя Інституту лікарського рослинництва УААН. Полтава, 1996. С. 239–240.
9. Kondrotas A., Janulis V., Jurkstiene V., Simoniene G. Hemoagglutinative properties of *Desmodium caradense* and *Echinacea purpurea* (phytoimmunostimulators). // Laboratory and Clinical Immunology: International Scientific Conference. Vilnius, 1996. Pp. 121.
10. Погоріла Н.Ф., Меншова В.О., Брайон О.В. та ін. Лектини – біологічно активні речовини ехінацеї пурпурної // Фармацевтичний журнал. 1997. №4. С. 80–83.
11. Поспелов С.В. Лектины эхинацеи пурпурной – поиск, свойства и оценка активности // Изучение и использование эхинацеи : мат. межд. научн. конф. Полтава, 1998. С. 90–92.
12. Антонюк В.О., Рибак О.В. Вивчення вуглеводної специфічності лектинів підземних органів ехінацеї пурпурової та рудбекії роздільнолистої // Фармаком. 2002. №3. С. 153–158.

Поступило в редакцию 27 июня 2011 г.

После переработки 26 апреля 2012 г.

Pospelov S.V. LECTINS OF REPRESENTATIVES OF THE ECHINACEA GENUS (ECHINACEA MOENCH).
1. SOME METHODOLOGICAL ASPECTS OF ACTIVITY EVALUATION

Poltava State Agrarian Academy, st. Skovorody, 1/3, Poltava, 36003 (Ukraine), e-mail: serg_ps@mail.ru

During the studying of hemagglutination activity of Echinacea extracts depending on the extraction conditions, purification degree by low-temperature ethanol fractionating solution pH it was established that lectins evince their action to the most degree in acid zone (pH=4,0–4,4). As a result an original methodology of hemagglutination activity of Echinacea extracts evaluation was developed. It has been established that the optimal condition for Echinacea lectins activity evaluation is raw-materials extracting by physiological solution and its further estimation using phosphate-citrated buffer mixture (pH=4,4) with the help of human blood erythrocytes, while the activity should be determined visually in points.

Keywords: lectins, hemagglutination, purple coneflower, pale purple coneflower, «Zirka Mykoly Vavylova» breed, «Krasunya preriya» breed, *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.

References

1. Echinacea: the genus Echinacea / ed. S.C. Miller. CRC Press, 2004. 276 p.
2. *Izuchenie i ispol'zovanie jehinacei. Materialy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii.* [Learning and using echinacea. Proceedings of the International Conference]. Poltava, 1998, 156 p. (in Russ.)
3. Pospelov S.V., Samorodov V.N. *Zerno*, 2009, no. 6, pp. 64–68. (in Russ.)
4. Samorodov V.N., Pospelov S.V., Moiseeva G.F., Sereda A.V. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 1996, no. 4, pp. 245–251.
5. Lucik M.D., Panasjuk E.N., Lucik A.D. *Lektiny* [Lectins]. L'vov, 1981, 156 p. (in Russ.)
6. Patent 1732276 (USSR). 1992. (in Russ.)
7. Hardman J.T., Beck M.L., Owensby C.E. *Transfusion*, 1983, vol. 23, pp. 519–522.
8. Pospelov S.V., Samorodov V.N. *Problemy likars'kogo roslynnnyctva. Tezy dopovidej Mizhnarodnoi' naukovopraktychnoi' konferencii' z nagody 80-richchja Instytutu likars'kogo roslynnnyctva UAAN.* [Problems medicinal plant. Proceedings of the International Scientific Conference on the occasion of the 80th anniversary of the Institute of medicinal plant biochemistry]. Poltava, 1996, pp. 239–240. (in Ukr.)
9. Kondrotas A., Janulis V., Jurkstiene V., Simoniene G. *Laboratory and Clinical Immunology: International Scientific Conference.* Vilnius, 1996, pp. 121.
10. Pogorila N.F., Menshova V.O., Brajon O.V. *Farmaceutychnyj zhurnal*, 1997, no. 4, pp. 80–83. (in Ukr.)
11. Pospelov S.V. *Izuchenie i ispol'zovanie jehinacei. Materialy mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii.* [Learning and using echinacea. Proceedings of the International Conference]. Poltava, 1998, pp. 90–92. (in Ukr.)
12. Antonjuk V.O., Rybak O.V. *Farmakom*, 2002. no. №3, pp. 153–158. (in Ukr.)

Received June 27, 2011

Revised 26 April, 2012