

УДК 577.32.579

Содержание глицина, аланина и пролина в некоторых биологических объектах

Е.О. Данченко

Учреждение образования «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»

В результате проведенных исследований установлено, что в лекарственных растениях (спирулина, эхинацея и родиола розовая) и казеине молока уровни пролина и аланина превышали содержание глицина. Общее содержание трех малых аминокислот в стандартном для анализа белке – казеине находилось в пределах 41,4–43,7 ммоль/л. В эхинацее суммарное содержание трех аминокислот было на 14% выше, чем в казеине за счет высокого содержания пролина. Содержание трех аминокислот в спирулине и родиоле розовой ниже, чем в казеине, но у спирулины содержание аланина на 41% больше, чем в казеине. В составе белков родиолы розовой содержится в 3 раза больше глицина, чем в казеине. По сравнению с казеином в гемолимфе куколок дубового шелкопряда в 4 раза меньше содержание пролина, но в 4,8 раза больше уровень глицина при одинаковом содержании аланина. В плазме крови крыс содержание суммы пролина, глицина и аланина в 19 раз меньше, чем в гемолимфе куколок дубового шелкопряда. В печени крыс в 3,8 раза больше содержание глицина, в 1,8 раза – аланина, но в 2,2 раза меньше уровень пролина по сравнению с сердцем. В эпифизе, среднем мозге и гипоталамусе мозга крыс содержание глицина превышает уровень аланина в 2,44, 2,63 и 1,61 раза, соответственно. В лимфоцитах печени, тимуса и селезенки содержание пролина и аланина превышает содержание глицина.

Ключевые слова: глицин, аланин, пролин, лекарственные растения, казеин, плазма крови, органы крысы.

The content of glycine, alanine and proline in some biological objects

Е.О. Danchenko

Educational establishment «Vitebsk State University named after P.M. Masherov»

The studies found out that in medicinal plants (*Spirulina*, *Echinacea*, and *Rhodiola rosea*) and milk casein levels of proline and alanine exceeded glycine content. The total content of the three small amino acids in the protein standard for analysis, casein, were within 41,4–43,7 mmol/l. In *Echinacea* the total content of the three amino acids was 14% higher than in the casein due to the high content of proline. The content of the three amino acids in *Spirulina* and *Rhodiola rosea* is lower than in casein, but the content of *Spirulina* alanine is 41% more than in casein. In the composition of proteins of *Rhodiola rosea* contains 3 times more glycine than casein. Compared to casein in the hemolymph of the oak silkworm pupae the content of proline is 4 times lower, but levels of glycine are 4,8 times higher, the content of alanine being the same. In rat blood plasma content of the amount of proline, glycine and alanine is 19 times less than in the hemolymph of oak silkworm pupae. In the liver of rats the content of glycine is 3,8 times higher, alanine – 1,8 times higher, but the level of proline in comparison with the heart is 2,2 times lower. In the epiphysis, midbrain, and hypothalamus of rat brain glycine content exceeds the level of alanine 2,44, 2,63 and 1,61 times, respectively. In lymphocytes of liver, thymus and spleen the content of proline and alanine exceeded the glycine content.

Key words: glycine, alanine, proline, medicinal plants, casein, blood plasma, organs of the rat.

Глицин, аланин и пролин являются классическими протеиногенными аминокислотами, важными для формирования вторичной структуры белков. Например, в организме млекопитающих на долю коллагена приходится 25% от общего белка. Коллаген присутствует в различных формах, прежде всего, в соединительной ткани. Это левая спираль с шагом 0,96 нм и 3,3 остатка в каждом витке, более пологая по сравнению с α -спиралью. В отличие от α -спирали образование водородных мостиков здесь невозможно. Коллаген имеет необычный аминокислотный состав: 1/3 составляет глицин, примерно 10% пролин, а также гидроксипролин и гидроксизин. Последние две аминокислоты образуются после биосинтеза коллагена путем посттрансляционной модификации. В структуре коллагена постоянно повторяется триплет гли-Х-У, причем положение Х часто занимает

пролин, а У – гидроксизин. Имеются веские основания для того, что коллаген повсеместно присутствует в виде правой тройной спирали, скрученной из трех первичных левых спиралей. В тройной спирали каждый третий остаток оказывается в центре, где по стерическим причинам помещается только глицин [1].

Глицин – это единственная оптически неактивная аминокислота; широко распространена в различных биологических объектах. Кроме структурной роли в формировании коллагена и желатина, глицин является предшественником пуринов, участвует в синтезе гема (гемоглобин, миоглобин, каталаза, цитохром *c*); через серин используется в синтезе керамидов и фосфатидилсерина, необходимых для построения клеточных мембран; является тормозным медиатором ЦНС.

Пролин (гидроксипролин) в большом количестве обнаруживается в белках семян злаков (про-

ламины), в коллагене, эластине и в белках эмали зубов; входит в состав ряда антибиотиков – циклических пептидов (граммицидины, лихениформин, актиномицин D). Кроме структурной роли пролин участвует в поддержании клеточного редокс-потенциала, регуляции экспрессии генов, синтеза ДНК, образовании орнитина и полиаминов; как сигнальная молекула участвует в киллинге патогенов, взаимодействии клеток и пролиферации лимфоцитов.

Аланин является исходным веществом для синтеза каротиноидов, каучука, жиров и углеводов; транспортной формой аммиака при его местном обезвреживании. Участвует в торможении апоптоза, стимуляции пролиферации лимфоцитов, повышении продукции антител (возможно путем воздействия на клеточные сигнальные механизмы) [2].

Таким образом, три малые по размерам аминокислоты – глицин, пролин, аланин – способны участвовать как в определении типа вторичной структуры белков, так и являются метаболически активными веществами и выполняют роль сигнальных молекул. Поэтому целью работы явился сравнительный анализ содержания глицина, пролина и аланина в различных биологических объектах.

Материал и методы. Учитывая, что стандартом по содержанию аминокислот являются гидролизаты белков молока, на первом этапе работы были исследованы аминокислотные спектры белковых препаратов молока (казеинаты, копреципитаты), а также экстракты растительных компонентов широко распространенных пищевых добавок. Гидролиз образцов производился в десятикратном объеме концентрированной соляной кислоты в запаянных ампулах при 110°C в течение 24 часов. После выпаривания соляной кислоты осадок гомогенизировали в 10-кратном объеме 0,2М HClO₄ с добавлением внутреннего стандарта (норлейцин). Количественная и качественная идентификация свободных аминокислот и их дериватов проводилась катионообменной хроматографией одноклоночным методом на автоанализаторе аминокислот Т-339М (Чехия) по модифицированному методу J.V. Venson, J.A. Paterson [3]. Принцип метода заключается в элюции аминокислот и родственных им соединений ступенчатым градиентом Li-цитратных буферных растворов. После нанесения кислотного экстракта на аналитическую колонку (22,0×0,35 см), заполненную сферическим катионообменником LGAN 2B (размер частиц 8 мкм) («Lachema», Чехия) хроматографическое разделение исследуемых соединений последовательно осуществляли Li-цитратными буферами. Количественное содержание каждого компонента спектра исследуемых соединений оценивали по реакции с 1% раствором нингидрина (скорость потока 12 мл/час) в капиллярной бане при 100°C при длине волны 520 нм после прохождения через проточную кювету однолучевого фотометра. Сигнал с выхода фотометра поступает на программно-аппаратный комплекс «Мультихром-1», где происходят регистрация, обработка, идентификация пиков и вычисление концентраций по площадям пиков. Воспроизводимость метода ±1,5%, чувствительность – 10⁻⁹ моль. На втором этапе работы определение свободных аминокислот проводили в хлорнокислых экстрактах плазмы крови, гомогенатов тканей и лизатов лимфоцитов методом обращеннофазной ВЭЖХ с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Условия определения: колонка Диасорб 130 C₁₆T, 3×150 мм; подвижная фаза: 0,1 М Na-ацетатный буфер pH 5,7 : 50% раствор метанола в соотношении 100 : 54 (об/об). Скорость потока 0,8 мл/мин, температура колонки 30°C. Дериватизация: смешивание пробы с 5 объемами 0,4% раствора о-фталевого альдегида и 0,3% 3-меркаптопропионовой кислоты в 0,4 М Na-боратном буфере, pH 9,4, затем нейтрализация добавлением равного объема 0,1 М хлорной кислоты. Все определения проводили на хроматографической системе Agilent 1200, прием и обработка данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. Статистическая обработка данных: t-тест с учетом различий дисперсий в группах с помощью программы Statistica 7.0.

Результаты и их обсуждение. Результаты проведенных исследований представлены в табл. В гидролизатах тканей лекарственных растений и различных производных молока концентрации исследуемых аминокислот были относительно близкими, причем уровни пролина и аланина превышали содержание глицина. Это, вероятно, связано с тем, что в данных биологических объектах нет коллагеноподобных белков. Можно лишь отметить, что у спирулины (*Spirulina platensis*) было найдено одинаковое содержание пролина и глицина, а у родиолы розовой (*Rhodiola rosea*) – одинаковое количество глицина и аланина. Общее содержание трех малых аминокислот в стандартном для анализа белке – казеине находилось в пределах 41,4–43,7 ммоль/л. В эхинацее (*Echinacea*

purpurea) суммарное содержание трех аминокислот было на 14% выше, чем в казеине за счет высокого содержания пролина. Не исключено, что с этим связано иммуномодулирующее действие биологически активных препаратов из эхинацеи. Общее содержание трех аминокислот в спирулине и родиоле розовой несколько ниже, чем в казеине, но у спирулины содержание аланина на 41% больше, чем в казеине, что может определять метаболические эффекты препаратов из этого растения. Спирулина принадлежит к изначальным формам жизни на нашей планете. Благодаря своему совершенству и гармоничности она выживает на протяжении миллиардов лет в условиях естественных водоемов. В настоящее время спирулина прочно занимает ведущее место на мировом рынке не только благодаря питательным качествам («суперпища», источник питания в длительных космических полетах), но и как эффективный терапевтический препарат. В составе белков родиолы розовой («золотой корень») содержится в 3 раза больше глицина, чем в казеине; это может служить одной из причин нейротропного действия препаратов из растения. В наши дни препараты «золотого корня» назначают в качестве психо-

стимулирующих и адаптогенных средств при функциональных заболеваниях нервной системы – неврозах, физическом и нервном истощении, бессоннице, импотенции, аменорее.

В результате исследования свободных аминокислот в различных биологических объектах оказалось, что содержание пролина, глицина и аланина в гемолимфе куколок дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) практически аналогично таковому в гидролизатах лекарственных растений и казеина. По сравнению с казеином в гемолимфе куколок почти в 4 раза меньше содержание пролина, но в 4,8 раза больше глицина при одинаковом содержании аланина. Это не удивительно, поскольку исследуемое жидкое содержимое куколок является следствием гистолиза тканей гусеницы V возраста и ферментативного гидролиза белков. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что гемолимфа куколок дубового шелкопряда может явиться малозатратным источником свободных аминокислот, полученным в процессе эндогенного протеолиза тканей. В ряде исследований доказана возможность использования куколок дубового шелкопряда в качестве эффективного биофармацевтического сырья [4–5].

Таблица

Содержание пролина, глицина и аланина в различных биологических объектах

Объект исследования	Пролин	Глицин	Аланин
Общие аминокислоты (гидролизаты)			
Спирулина, ммоль/л	6,41±0,62	6,64±0,71	25,5±0,95 ¹
Эхинацея, ммоль/л	30,5±0,89 ¹	4,43±0,05	14,9±0,12 ¹
Родиола розовая, ммоль/л	15,6±0,97 ¹	11,7±1,12	10,3±0,86
Казеин, ммоль/л	22,0±1,56 ¹	3,56±2,18	18,1±1,45 ¹
Казеинат натрия, ммоль/л	21,3±1,87 ¹	4,68±3,69	15,4±1,23 ¹
Копреципитат, ммоль/л	6,72±0,53	7,66±0,66	14,6±1,23 ¹
Пенообразователь, ммоль/л	11,1±0,94 ¹	4,34±1,37	19,3±1,46 ¹
Свободные аминокислоты			
Гемолимфа куколок дубового шелкопряда, ммоль/л	5,59±0,41 ¹	17,1±0,91	18,3±2,60
Плазма крови крыс, мкмоль/л	405±57,2 ¹	606±32,7	1149±92,8 ¹
Печень крыс, нмоль/г	276±63,0 ¹	3145±189	2581±231
Сердце крыс, нмоль/г	619±48,8 ¹	834±38,1	1412±66,8 ¹
Эпифиз крыс, нмоль/г	–	806±71,0	330±19,6 ¹
Средний мозг крыс, нмоль/г	–	1517±32,1	576±17,8 ¹
Стриатум мозга крыс, нмоль/г	–	906±19,7	1168±28,8 ¹
Гипоталамус крыс, нмоль/г	–	1327±98,8	822±31,4 ¹
Лимфоциты селезенки, мкмоль/10 ⁶	1,51±0,20 ¹	0,68±0,11	1,76±0,19 ¹
Лимфоциты тимуса, мкмоль/10 ⁶	4,29±0,76 ¹	1,91±0,45	3,39±0,78
Лимфоциты печени, мкмоль/10 ⁶	16,4±2,19 ¹	7,79±1,48	27,9±5,25 ¹

Примечание: ¹ – P<0,05 по сравнению с содержанием глицина.

В плазме крови крыс содержание суммы пролина, глицина и аланина в 19 раз меньше, чем в гемолимфе куколок дубового шелкопряда. В наибольшем количестве определялся аланин, а в наименьшем – пролин. В ткани печени крыс содержание трех исследуемых аминокислот в 2,1 раза больше, чем в сердце. Обращает на себя внимание и тот факт, что в печени в 3,8 раза больше содержание глицина, в 1,8 раза – аланина, но в 2,2 раза меньше пролина по сравнению с сердцем. Установлено, что в эпифизе, среднем мозге и гипоталамусе мозга крыс содержание глицина превышает уровень аланина в 2,44, 2,63 и 1,61 раза, соответственно. И только в стриатуме мозга достоверно больше содержание аланина.

Лимфоциты селезенки, тимуса и печени крыс массой 60–70 г выделяли из гомогенатов этих органов в градиенте плотности (фиколл-верографин, 1,077 г/см³). Установлено, что по содержанию свободных пролина, глицина и аланина клетки распределились в следующей последовательности: лимфоциты печени > лимфоциты тимуса > лимфоциты селезенки. В лимфоцитах органов содержание пролина и аланина превышало содержание глицина.

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что в лекарственных растениях (спирулина, эхинацея и родиола розовая) и казеине молока уровни пролина и аланина превышали содержание глицина. Общее содержание трех малых аминокислот в стандартном для анализа белке – казеине находилось в пределах 41,4–43,7 ммоль/л. В эхинацее суммарное содержание трех аминокислот было на 14% выше, чем в казеине за счет высокого содержания пролина. Содержание трех аминокислот в спирулине и родиоле розовой ниже, чем в казеине, но у спирулины содержание аланина на 41% больше, чем в казеине. В составе белков родиолы розовой содержится в 3 раза больше глицина, чем в казеине. По сравнению

с казеином в гемолимфе куколок дубового шелкопряда в 4 раза меньше содержание пролина, но в 4,8 раза больше уровень глицина при одинаковом содержании аланина. В плазме крови крыс содержание суммы пролина, глицина и аланина в 19 раз меньше, чем в гемолимфе куколок дубового шелкопряда. В печени крыс в 3,8 раза больше содержание глицина, в 1,8 раза – аланина, но в 2,2 раза меньше уровень пролина по сравнению с сердцем. В эпифизе, среднем мозге и гипоталамусе мозга крыс содержание глицина превышает уровень аланина в 2,44, 2,63 и 1,61 раза, соответственно. В лимфоцитах печени, тимуса и селезенки содержание пролина и аланина превышало содержание глицина. Таким образом, можно сделать заключение о вероятном наличии зависимости биологических и фармакодинамических эффектов малых аминокислот от их содержания в различных биологических объектах.

Автор статьи выражает благодарность кандидату биологических наук, доценту Е.М. Дорошенко за содействие в методической части работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чиркин, А.А. Биохимия: учеб. руководство / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: Медицинская литература, 2010. – 624 с.
2. Чиркин, А.А. Содержание свободных аминокислот в безбелковых фракциях гемолимфы куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Вестн. Віцебск. дзярж. ун-та. – 2011. – № 6(66). – С. 46–53.
3. Бенсон, Дж. Хроматографический анализ аминокислот и пептидов на сферических смолах и его применение в биологии и медицине / Дж. Бенсон, Дж. Патерсон // Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков. – М., 1974. – С. 9–84.
4. Трокоз, В.А. Биологически активные продукты из дубового шелкопряда: аспекты использования с лечебно-профилактической целью / В.А. Трокоз, Т.Б. Арегинская, Н.В. Трокоз // Сборник тезисов 2 Всероссийской конференции по вопросам онкологии и анестезиологии мелких домашних животных. – М., 2006. – С. 21–28.
5. Чиркин, А.А. Функциональные и биохимические характеристики гемолимфы куколок дубового шелкопряда / А.А. Чиркин [и др.] // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы: материалы VIII Междунар. конф., 1–2 апреля 2010 г. – Минск, 2010. – С. 130–132.

Поступила в редакцию 12.03.2012. Принята в печать 16.04.2012

Адрес для корреспонденции: e-mail: elena.danch@gmail.com – Данченко Е.О.