

Сельско-хозяйственные науки

УДК 615.015.4(075.8); 620.383; 621.472

НАУЧНЫЙ ОБЗОР: ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МЛЕЧНОГО СОКА ДЫННОГО ДЕРЕВА³

А.М. Пенджиев, Туркменский государственный архитектурно-строительный институт (Ашхабад, Туркменистан).

А. Абдуллаев, Туркменский государственный медицинский университет (Ашхабад, Туркменистан).

Аннотация. В статье описываются фармакологические особенности, биологическая особенность протеолитических ферментов полученных из дынного дерева выращенные в условия защищенного грунта Туркменистана с использованием возобновляемых источников энергии и промышленных тепловых отходов для создания микроклимата. Приведены целебные химические, физические и фармакологические свойства протеолитических ферментов полученных из плодов дынного дерева млечный сок, содержащие полезные вещества и их применения в медицинской промышленности.

Ключевые слова: фармакологические, физические, химические свойства, млечный сок, протеолитические ферменты, папайин, химопапайн, пептидаза, дынное дерево, гелиотеплица, Туркменистан.

SCIENTIFIC REVIEW: PHARMACOLOGICAL FEATURES OF LACTEAL JUICE OF MELON TREE

A. M. Penjiyev, Turkmen state architecturally-building institute (Ashkhabad, Turkmenistan).

A. Abdullaev, Turkmen state medical university (Ashkhabad, Turkmenistan)

Abstract. In article the pharmacological features, biological feature of proteolytic enzymes received of a melon tree grown up in conditions of the protected ground of Turkmenistan with use of renewed energy sources and an industrial thermal waste for microclimate creation are described. Curative chemical, physical and pharmacological properties of proteolytic enzymes received of fruits of the melon tree, containing useful substances and their applications in the medical industry are resulted.

Keywords: pharmacological, physical, chemical properties, lacteal juice, proteolytic enzymes, papain, chimopapain, peptidaza, melon tree, heliohothouse, Turkmenistan.

Введение

На исходе XX-го века биотехнология, фармакология и генная инженерия, развивались чрезвычайно динамично. В XXI-ом же веке им предстоит играть роль ведущих отраслей науки. Их примени будет способствовать прогрессу в медицине и здравоохранении, сельском хозяйстве и производстве продуктов питания.

Несмотря на огромный прогресс в медицине и успех в фармакологии, достигнутые в прошлом, перед учеными все еще непочатый край работы. Сегодня врачи научились

³ Рецензент: доктор медицинских наук, профессор Т. Ходжагельдиев

устранить причину лишь одной третьей из примерно 30 тысяч известных заболеваний. Что касается остальных двух третей, то доктор вынужден либо лечить симптомы, либо вообще ничего не предпринимать. Кроме того, возникают дополнительные проблемы: известны, считавшиеся побежденными возбудители болезней приобретает резистентность. По всему миру быстро распространяются новые заболевания, чему способствует растущая мобильность людей. В промышленно развитых странах с ростом числа пожилых людей увеличивается доля хронических и возрастных заболеваний.

Генная инженерия и, прежде всего расшифровка геном человека позволяют создавать новые лекарственные препараты. Если мы будем лучше понимать роль генов в развитии болезней и то, как протекают процессы в наших клетках на молекулярном уровне, сможем более целенаправленно вести исследования. С помощью генетики и биотехнологии мы сможем в будущем более эффективно выявлять причины заболеваний; тем самым исследования в области фармакология – это существенный шаг вперед в деле создания новых лекарств, устраняющих саму причину болезни. Большой интерес в этом предоставляют протеолитические ферменты растительного происхождения [1].

На заседании Кабинета Министров Туркменистана, состоявшемся 14 августа 2015 г., Президент страны Гурбангулы Бердымухамедов подчеркнул необходимость увеличения числа тепличных хозяйств по производству сельхозпродукции с целью круглогодичного обеспечения ею населения страны. Опыт работы тепличных хозяйств Лебапского велаята свидетельствует о том, что помимо овощей и фруктов, в них можно выращивать и другие растения, например, дынное дерево [1-5].

I. ХИМИЧЕСКИЕ И ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДЫННОГО ДЕРЕВА

1. Биологические активные вещества дынного дерева

Биологические активные вещества. Методом электрофореза в кислой среде в латексе дынного дерева (*Carica papaya L.*) идентифицировано 7 белков: липаза, хитиназа, лизоцим и комплекс протеолитических ферментов:

Папаин (ЕС 3.4.22.2) - монотиоловая цистеиновая эндопротеаза. По характеру ферментативного действия ее называют «растительным пепсином». Но, в отличие от пепсина, папаин активен не только в кислых, но и в нейтральных и щелочных средах (диапазон рН 3–12, оптимум рН 5). Он сохраняет активность в широком температурном диапазоне. В каталитическом центре папаина содержится дитиоацильная группа. Фермент связывается с субстратом в местах локализации дисульфидных связей, отдавая преимущество ароматическому аминокислотному остатку в следующей позиции (Jacquet A. etc., 1989). Ген папаина клонирован и секвенирован (Cohen L. W. etc., 1986). Установлено, что он продуцируется растением в виде пропапаина, который после отщепления пептидного фрагмента превращается в активный фермент — папаин. Ген пропапаина, полученный из плодов папайи, клонирован в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* (Ramjee M. K. etc., 1996) [2-19].

Химопапаин (ЕС 3.4.22.6) — монотиоловая цистеиновая протеиназа. Благодаря субстратной специфичности похожа на папаин, но отличается от него электрофоретической

состоящий из 218 аминокислотных остатков, проявляет значительное структурное сходство с папаином и протеиназой w папайи, включая консервативный каталитический участок и дисульфидные связи (Watson D. C. etc., 1990). Из латекса в процессе хроматографии выделяется несколько изоферментных фракций химопапаина: химопапаин А, В и М. Тем не менее иммунологические исследования указывают на их гомогенность (Buttle D. J. и Barrett A. J., 1984). Установлено, что химопапаин М идентичен ранее описанным

По специфичности ферментативного действия напоминает папаин, поскольку связывается с субстратом в сайтах локализации дисульфидных связей, но, в отличие от папаина, расщепление субстрата происходит только в том случае, если в следующей позиции находятся лейцин, валин, треонин или пролин. Активность химопапаина измеряют в нанокаталитических (нКат) и пикокаталитических (пКат) единицах; 1 мг фермента содержит по крайней мере 0,52 нКат единиц [2-19].

Протеиназа IV — цистеиновая протеиназа, основная протеиназа латекса, составляет около 30% присутствующего в нем белка (Buttle D. J. etc., 1989). Проявляет высокую степень гомологии с протеиназой III папайи (81%), химопапаином (70%) и папаином (67%). Очень близка к химопапаину по молекулярной массе и заряду молекулы. Загрязнение этим ферментом химопапаина является причиной его гетерогенности в ходе исследований. М. Р. Thomas и соавт. (1994) относят этот фермент к фракции химопапаина М [].

Карикаин (EC 3.4.22.30) — наиболее щелочная среди цистеиновых протеиназ латекса папайи. Подобно папаину, он сначала продуцируется в форме неактивного зимогена прокарикаина, содержащего ингибиторный прорегион из 106 N-терминальных

в последующих конформационных изменений. Строение протеиназ папайи изучено с помощью рентгенструктурного анализа (Maes D. etc., 1996) [2-19].

Протеиназа w (эндопептидаза А, пептидаза А) — монотиоловая цистеиновая протеиназа. Это полипептид, содержащий 216 аминокислотных остатков и 3 дисульфидные связи. Для проявления его ферментативной активности важно наличие свободного остатка цистеина в активном центре (Dubois T. etc., 1988). Проявляет высокую степень гомологии с папаином (68,5%). По специфичности ферментативного действия напоминает папаин, поскольку связывается с субстратом в участках локализации дисульфидных связей. Расщепление происходит тогда, когда в следующей позиции находятся лейцин, валин или треонин. Пептидаза II — щелочная монотиоловая цистеиновая протеиназа. В каталитическом центре содержит дитиоацильную группу. Глицил-эндопептидаза (EC 3.4.22.25) [2-19].

В латексе незрелых плодов папайи содержатся также ингибиторы протеолитических ферментов: цистатин (ингибитор протеиназ с мол.м. 11 262 Да) и белок со свойствами ингибитора цистеиновых протеиназ, молекула которого состоит из 184 аминокислотных остатков, содержит 2 дисульфидные связи и 2 углеводных остатка в позициях Asp84 и Asp90 (Odani S. etc., 1996). Последний обладает способностью блокировать активность трипсина крупного рогатого скота и α -химотрипсина за счет экранирования участков связывания этих ферментов на их субстратах. Важное медицинск

комплекс ферментов латекса папайи — папаин. В состав этого комплекса входит несколько протеолитических ферментов, среди которых пептидаза I (расщепляющая белки на ди- и полипептиды), рениноподобный коагулирующий фермент (свертывает казеин молока), амилолитический фермент, свертывающий фермент, подобный пектазе, и слабый липолитический фермент [2-19].

Свойство папаина. Папаин расщепляет белки до полипептидов и аминокислот, причем гидролизует любые пептидные связи, за исключением связей пролина и связей глютаминовой кислоты с дисоциированной карбоксильной группой. Папаин обладает

животного и бактериального происхождения. Хотя активность препаратов папаина отличается в зависимости от способа приготовления, он обладает способностью

Папаин высокого качества переваривает яичный альбумин, количество которого в 300 раз больше его собственной массы. При кипячении папаин инактивируется. Глутатион, цистеин и тиосульфат повышают активность папаина, а медь и перекись водорода — угнетают ее. Резко повышает активность папаина синильная кислота в микродозах, которые могут быть введены перорально (семена яблок, вишен, миндаля или абрикос). E. Smith и соавт. в 1955 г. обнаружил и получил в кристаллическом виде из млечного сока дынного дерева лизоцим, который отличается от лизоцимов другого происхождения (белка куриного яйца, селезенки кролика и собаки) большей молекулярной массой (приблизительно 25000 кДа) и аминокислотным составом. В плодах папайи найдено 56 летучих органических кислот, среди которых преобладает бутановая кислота (1,2 мг/кг), а также терпеновые соединения, в частности линалоолоксиды. В спелых плодах дынного дерева содержится 8–12% сахара, значительное количество витаминов А, В1, В2, С и D, тонизирующие вещества. В листьях папайи выявлены свободные и связанные фенольные соединения, танины, органические кислоты и алкалоиды. Другие возможностях папаина приведены на схеме.

В кулинарии, помимо уникальных качеств, у папайи есть еще одно немаловажное достоинство – универсальность. Она может использоваться и как фрукт, и как овощ, и как лекарство. Как так? – удивитесь вы. Очень просто. Спелая папайя – фрукт, ее едят на десерт, слегка полив соком лимона или лайма, незрелая- овощ, и используется как компонент овощных салатов и гарниров. А высушенные и размолотые зерна папайи – прекрасная специя, которую добавляют в соусы и винегреты [2-19].

Внутри плодов находятся семена, в состав которых входят: олеиновая, пальмитиновая, стеариновая, линолевая, архидоновая кислоты, применяемые для лечения атеросклероза, и других болезней, а также для изготовления моющих средств, пластификаторов, пеногасителей и прочих изделий, широко применяемых в различных отраслях промышленности.

В листьях имеются свободные и связанные фенольные соединения, танины, органические кислоты, стероидные и тритерпеновые сапонины, флавоноиды, липиды, кумарины, глюкозы, альколоиды, применяемые при лечении туберкулеза и обладающие желче- и мочегонными свойствами. В Перу листья папайи славятся как незаменимое средство для заживления ран [16-

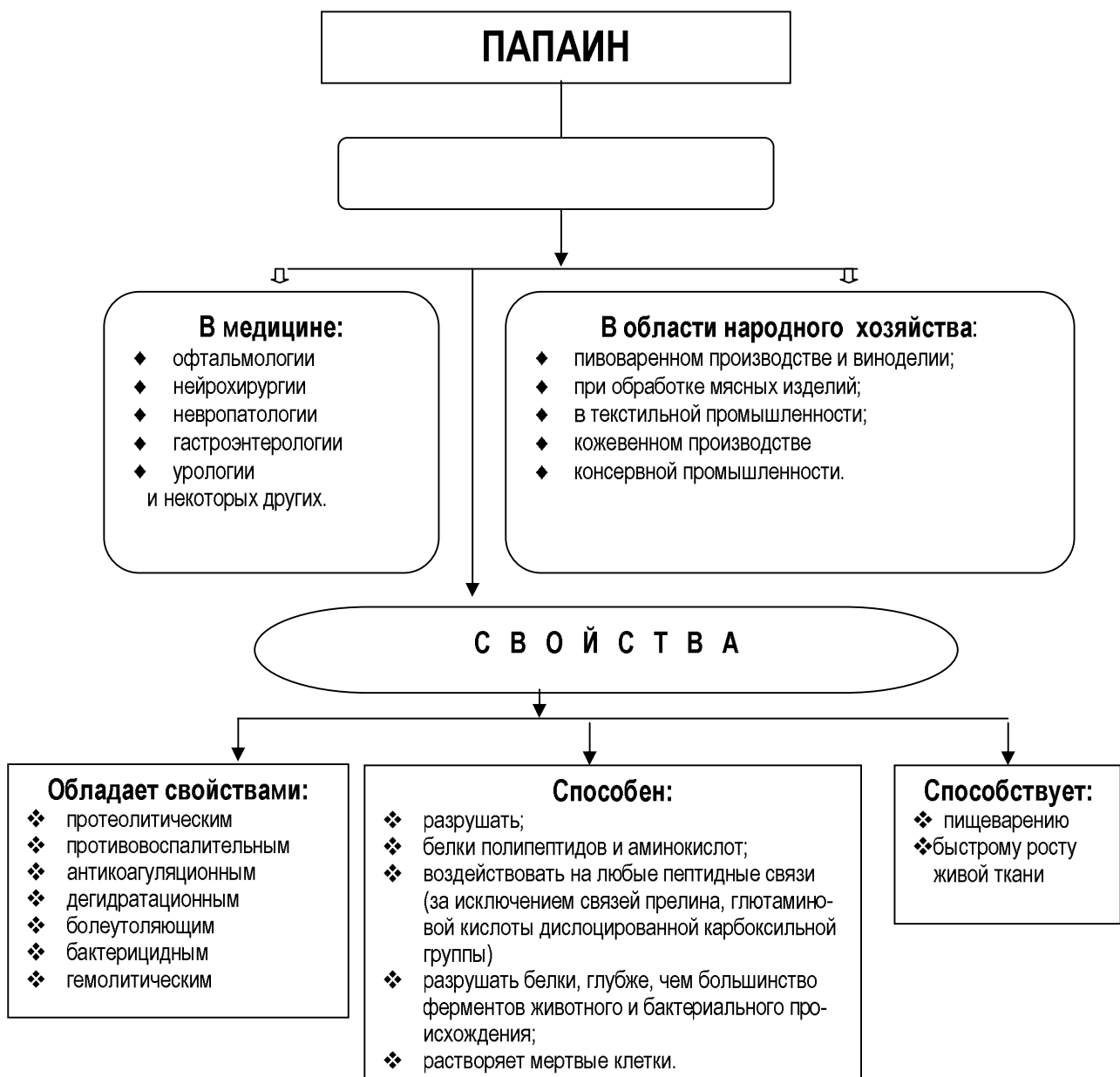
Недавно папайя произвела сенсацию в медицинском мире: индийские ученые обнаружили, что в коре дынного дерева (на котором, как мы говорили, и растения папайя) содержится вещество, в 250 раз более эффективно подавляющее рост раковых клеток, чем самые современные и продвинутое лекарства. Сейчас ведутся исследования (кора никогда прежде не использовалась в медицине), если не будут выявлены противопоказания, папайя даст миру действенное средство от страшной болезни.

В пищевой промышленности плоды дынного дерева идут на приготовление тонизирующих напитков, соков, сиропов, желе.

В пивоваренном производстве и виноделии протеолитический фермент папаин используется для осветления растворов и увеличения срока хранения.

В текстильной промышленности добавка папаина уменьшает скручивание нити и предотвращает усадку шерсти.

Схема свойств и применения фермента папаина в народном хозяйстве



В фармацевтической промышленности зарубежных стран выпускается более 100 лекарственных препаратов (лекозим, лекопаин, вобензим, карпазим, кариказа, супер - сжигатель жира N1, бионормалайзер и многие др.), широко применяемых в различных областях медицины [2-5, 16-21].

Например, лекарственный препарат Лекозим — лиофилизированная смесь растительных протеолитических ферментов дынного дерева. Она белого цвета, без запаха и вкуса, хорошо растворимая в воде.

Химически Лекозим — 99.% белок, состоящий из папаина (12,4%), химопапаина (43,5%), лизоцина (17,4%) и протеиназы X (26,7%). Специфическая активность — 6—7 МЕД ед/мг, что соответствует FIP единицам (FIP — Международная фармацевтическая федерация). Известны различия в аминокислотном составе отдельных протеолитических ферментов, входящих в Лекозим. Папаин не содержит метионина, в химопапаине его очень мало, а в лизоцине много. Во всех ферментах высоко содержание глицина, а химопапаине, в отличие от других двух энзимов, больше лицина.

N — терминальная группа папаина — изолейцин, химопапаина — глютаминовая кислота, лизоцина — глицин. Ферменты, входящие в состав Лекозима — основные белки, имеющие изоэлектрическую точку в щелочной области. Приблизительный молекулярный вес папаина — 21.000, химопапаина — 36.000, лизоцима — 25.000. Энзимы эти легко

температуре более 70° они инактивируются. При длительном сохранении в растворенном состоянии теряют активность. Неочищенная смесь стабильна больше года, очищенный препарат менее стабилен. Папаин, химопапаин и протеиназа X — протеолитически активные энзимы, лизоцим-мукополисахарид.

2. Дизайн субстратов цистеиновых пептидаз семейства С1

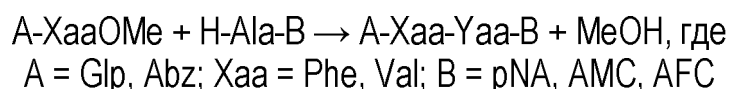
В своей научно-исследовательской работе Семашко Т.А. «Новые селективные пептидные субстраты цистеиновых пептидаз семейства папаина» рассмотрела задачу получение пептидных субстратов семейства папаина, которые отвечали бы следующим требованиям: 1) соответствие аминокислотной последовательности субстратов специфичности ферментов; 2) наличие в субстратах таких структурных элементов, которые обеспечивали бы возможность прямого детектирования ферментативной активности. В соответствии с этим структура субстратов может быть выражена общей формулой A-Хаа-Υаа↓B, где A = Glp (пироглутамил), Abz (о-аминобензоил); B = pNA (п-нитроанилид), AMC (7-амидо-4-метилкумарин) и AFC (7-амидо-4-трифторметилкумарин); Хаа = Phe, Val; Υаа = Ala; место предполагаемого гидролиза субстратов показано стрелкой. Поскольку субстратсвязывающая область цистеиновых катепсинов невелика по размерам, предлагаемые субстраты — короткие ди- и трипептиды. Исходя из анализа имеющихся литературных данных, мы предположили, что в подцентре P1 субстратов может находиться небольшой по размеру аминокислотный остаток аланина (Υаа = Ala). В положении P2, которое является определяющим для специфичности пептидаз семейства С1, находятся гидрофобные остатки (Хаа = Phe, Val). N-концевая группировка субстратов (A) представлена остатками пироглутаминовой (Glp) и о-аминобензойной кислот (Abz).

использующихся защитных групп, введен для обеспечения растворимости субстратов в водно-органических смесях. Группировка Abz является флуорогенным маркером. В качестве C-концевых остатков (B) использованы хромогенная п-нитроанилидная (pNA) и флуорогенные 7-амино-4-метил- и 7-амино-4-трифторметилкумаридные группировки (AMC) и (AFC) соответственно, присутствие которых обеспечивает простоту и высокую чувствительность анализа ферментативной активности по изменению спектральных и флуоресцентных характеристик субстратов в ходе гидролиза. Таким образом, нами были предложены следующие субстраты: Glp-Phe-Ala-pNA (I), Glp-Val-Ala-pNA (II), Abz-Phe-Ala-pNA (III), Glp-Phe-Ala-AMC (IV) и Glp-Phe-Ala-AFC (V).

Возможность всех предложенных соединений являться субстратами цистеиновых пептидаз семейства С1 была проверена с помощью метода молекулярного докинга. На рис. 1 (А – Г) показано возможное связывание предложенных субстратов с молекулами папаина, катепсинов В и L и моделью бромелаина, построенной гомологичным моделированием на основе пространственной структуры химопапаина. На рис 1Д представлены модули энергии связывания полученных комплексов. Было показано, что все вышеперечисленные соединения могут связываться в районе активного центра выбранных пептидаз в конформации, благоприятствующей дальнейшему расщеплению субстратов только по предполагаемой для гидролиза пептидной связи, и, следовательно, являться субстратами исследованных пептидаз.

3. Химико-энзиматический синтез субстратов цистеиновых пептидаз семейства С1

На первом этапе был проведен химический синтез карбоксильных и ряда аминокислотных компонентов пептидной конденсации. Для получения карбоксильных компонентов – Abz-Phe-OMe, Glp-Phe-OMe, Glp-Val-OMe были разработаны методики, основанные на применении метода активированных эфиров. Синтез аминокислотных компонентов пептидной конденсации – Ala-pNA и Gln-pNA проводили с Вос-производными аминокислот и п-нитроанилином в присутствии POCl₃ с последующим удалением защитных групп. Заключительной стадией синтеза субстратов являлась ферментативная конденсация компонентов: фермент



Ферментативное образование пептидной связи гарантировало селективность протекания реакции, обеспечивало оптическую чистоту целевых соединений, а также позволило упростить схему синтеза и выделения продуктов. В качестве катализаторов использовались пептидазы α-химотрипсин (ХТР) и субтилизин Карлсберг (СЛ), специфичность которых удовлетворяла структуре синтезируемых субстратов. Возможность проведения ферментативного синтеза субстратов была исследована в двух вариантах: (1) под действием нативных ХТР и СЛ в смеси DMF/водный буфер 50/50 об.%. и (2) с использованием модифицированных ферментов в безводной среде полярных органических растворителей (DMF-

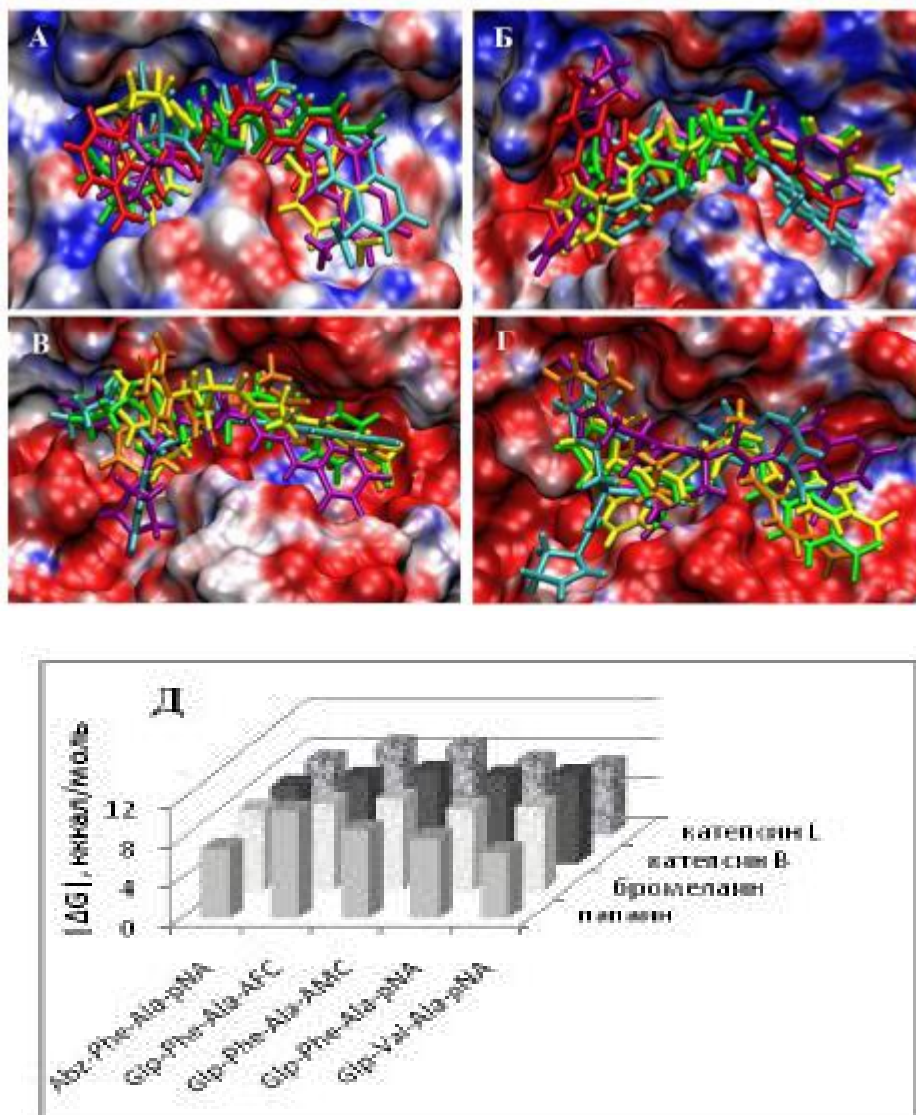


Рис.1. Моделирование положения субстратов (I)-(V) в зоне связывания папаина (А), бромелина (Б), катепсина В (В), ктпсина L (Г). Glp-Phe-Ala-pNA (I) - отмечен желтым цветом, Glp-Val-Ala-pNA (II) - зеленым, Abz-Phe-Ala-pNA (III) - красным, Glp-Phe-Ala-AMC (IV) - голубым и Glp-Phe-Ala-AFC (V) - фиолетовым. Д – модуль энергии связывания полученных комплексов.

В случае проведения синтезов под действием нативных ферментов концентрация исходных соединений составляла 0,13 М, концентрация ферментов – 50 мкМ ([S]:[E] = 2600:1). Смещение равновесия в сторону синтеза определялось ускорением образования ацилфермента за счет активации карбоксильного компонента, содержащего сложноэфирную группу.

Дополнительным фактором смещения равновесия в сторону синтеза являлось выведение продукта из сферы реакции за счет выпадения его в осадок.

Было показано, что под действием нативных пептидаз в водно-органической среде может быть проведен синтез только некоторых субстратов – Glp-Phe-Ala-pNA (I) под действием ХТР и СЛ с выходами 70% и 66% соответственно, Abz-Phe-Ala-pNA (III) под де

ствием ХТР с выходом 70% и Glp-Phe-Ala-AFC (V) под действием ХТР и СЛ с выходами 50% и 18% соответственно.

Более универсальным оказалось проведение ферментативного синтеза субстратов в безводной органической среде под действием ХТР и СЛ, иммобилизованных на криогеле поливинилового спирта (КПВС). Реакция проводилась в смеси DMF-MeCN (20/80 об. %), молярные соотношения фермент/субстрат составляли для синтеза с использованием СЛ 1/(3600-5600), ХТР – 1/(800-2200). Сдвиг равновесия в сторону синтеза осуществлялся благодаря недостатку воды в реакционной смеси. В отличие от водной среды, в органических растворителях под действием иммобилизованных ферментов удалось получить все субстраты, однако эффективность синтеза была различна. В исследованных нами условиях синтез субстратов (I) и (III)-(V), содержащих остаток Phe, проходил гораздо лучше под действием иммобилизованного ХТР (выходы целевых соединений варьировались от 11 до 100% (в случае Glp-Phe-Ala-AMC)), в то время как под действием иммобилизованного СЛ выходы не превышали 44% (Glp-Phe-Ala-pNA (I)). Вместе с тем, синтез Glp-Val-Ala-pNA (II) удалось осуществить только с использованием СЛ – в присутствии ХТР образования этого пептида не наблюдалось.

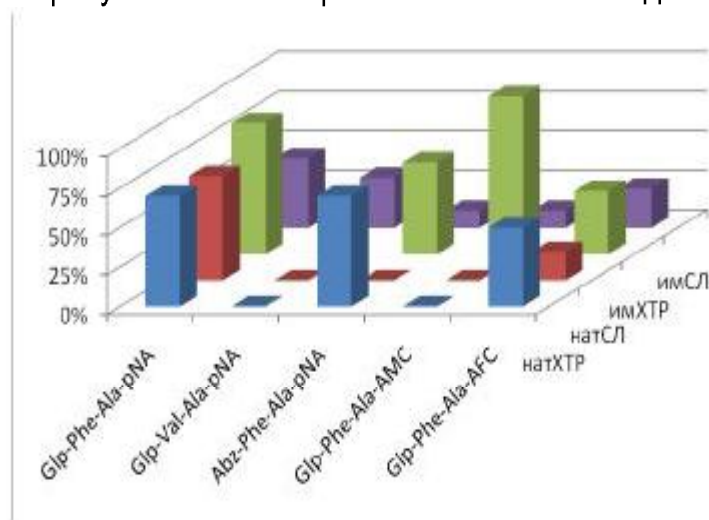


Рис.2. Ферментивный синтез субстратов (I)- (V) с использованием нативных и иммобилизованных ферментов.

Возможность повторного использования иммобилизованных биокатализаторов была показана на примере синтезов Glp-Phe-Ala-pNA (I) и Glp-Phe-Ala-AMC (IV) под действием ХТР, иммобилизованного на КПВС. Выход пептида (I) был достаточно высоким (70-80%) и практически не менялся даже после 6-кратного использования одного и того же образца биокатализатора. В случае Glp-Phe-Ala-AMC эффективность синтеза была одинаковой на протяжении двух циклов. За 4 ч выход (IV) составил 50 % и достиг количественного за 48 ч.

В целом, эффективность синтеза производных с Phe выше при использовании ХТР, а с Val – при использовании СЛ. Перспективным методом является получение целевых со-

КПВС ХТР и СЛ, поскольку в этом случае решается проблема растворимости гидрофобных компонентов.

Иммобилизация пептидаз в этом случае позволяет повысить устойчивость белков к денатурации и дает возможность повторного использования катализаторов. При проведении пептидного синтеза в водно-органических смесях под действием нативных ХТР и СЛ выход целевых продуктов, как правило, выше, синтез проходит быстрее и с меньшим количеством биокатализатора.

Все синтезированные пептиды представляют собой устойчивые кристаллические соединения. Все соединения охарактеризованы величинами хроматографической подвижности в нескольких системах (ТСХ), временами удерживания (ВЭЖХ), данными аминокислотного анализа, масс-спектрометрии и ЯМР (табл. 1). Получены спектры поглощения *p*-нитроанилидных производных, а также спектры возбуждения и испускания соединений, содержащих флуоресцентные маркерные группировки. Полученные физико-химические характеристики синтезированных соединений (I)-(V) свидетельствуют об их химической гомогенности и спектральной чистоте.

Таблица 1. Физико-химические характеристики синтезированных субстратов.

| Субстрат | АК анализ | ТСХ | ВЭЖХ ³ | Мг (расщ./обнар.) | ЯМР ¹ H, DMSO-D ₆ , δ, м.д. |
|-----------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------------|-------------------|---|
| Abz-Phe-Ala-pNA | Phe:Ala 1,04:1 | R _f = 0,32 ¹ | 23,5 мин | 475,1/ 475,1 | 1,32 д (3H, -CH ₃), 2,91 (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 3,09 д.д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 4,39 д.д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 4,65 м (1H, -CH-CH ₂), 6,20 с (2H, -NH ₂), 6,42 д.д (1H, - <i>m</i> -C ₆ (O)H ₄ -NH ₂), 6,57 д (1H, - <i>o</i> -C ₆ (O)H ₄ -NH ₂), 7,05 д.д (1H, - <i>m</i> -C ₆ (-NH ₂)H ₄ -O), 7,1-7,30 м (5H, -CH ₂ -C ₆ H ₅), 7,39 д (1H, - <i>o</i> -C ₆ (-NH ₂)H ₄ -O), 7,80 д (2H, - <i>m</i> -C ₆ (-NH ₂)H ₄ -NO ₂), 8,16 д (2H, - <i>o</i> -C ₆ (-NH ₂)H ₄ -NO ₂), 8,16 с (1H, -C(O)-NH-CH- в Ala), 8,49 с (1H, -C(O)-NH-CH- в Phe), 10,6 с (1H, -C(O)-NH-CH- в pNA) |
| Glp-Phe-Ala-pNA | Glu:Phe:Ala 1,02: 1:1,05 | R _f = 0,86 ¹ | 19,7 мин | 467,2/ 467,2 | 1,38 д (3H, -CH ₃), 1,73 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,02 м (2H, -C(O)-CH ₂ -CH ₂ -), 2,20 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,81 д.д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 3,09 д.д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 3,97 д.д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 4,44 м (1H, -CH-CH ₂), 4,58 м (1H, -NH-CH-CH ₂ -), 7,17-7,27 м - (5H, -C ₆ H ₅), 7,71 с (1H, -C(O)-NH-CH- в Glp), 7,88 д (2H, -NH-C ₆ H ₄ -NO ₂), 8,08 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Ala), 8,25 д (2H, -NH-C ₆ H ₄ -NO ₂), 8,46 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Phe), 10,61 с (1H, -C(O)-NH-CH- в pNA) |
| Glp-Phe-Ala-AMC | Glu:Phe:Ala 1,08:1:1 | R _f = 0,32 ¹ | 15,9 мин | 504,2/ 504,2 | 1,31 д (3H, -CH ₃ в Ala), 1,73 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,01 м (2H, -C(O)-CH ₂ -CH ₂ -), 2,20 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,39 с (3H, -CH ₃ в AMC), 2,73 м (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 2,87 м (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 3,95 д.д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 4,44 м (1H, -CH-CH ₂), 4,44 м (1H, -CH-CH ₂), 4,56 м (1H, -NH-CH-CH ₂ -), 6,27 с (1H, -CH-C-CF ₃), 7,27 м - (5H, -C ₆ H ₅), 7,48-7,73 м (2H, -NH- <i>o</i> -C ₆ H ₄ O ₂ F ₂), 7,75 (1H, -C(O)-NH-CH- в Glp), 7,77 (2H, -NH- <i>ar</i> -C ₆ H ₄ O ₂ F ₂), 8,07 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Ala), 8,43 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Phe), 10,44 с (1H, -C(O)-NH-CH- в AMC) |
| Glp-Phe-Ala-AFC | Glu:Phe:Ala 1,4:1:1,2 | R _f = 0,53 ¹ | 23,0 мин | 558,2/ 558,3 | 1,35 д (3H, -CH ₃), 1,71 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 1,99 м (2H, -C(O)-CH ₂ -CH ₂ -), 2,18 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,70 м (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 2,87 м (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 3,93 д.д (1H, -CH-CH ₂ -C ₆ H ₅), 4,39 м (1H, -CH-CH ₂), 4,54 м (1H, -NH-CH-CH ₂ -), 6,89 с (1H, -CH-C-CF ₃), 7,23 м - (5H, -C ₆ H ₅), 7,52-7,69 м (2H, -NH- <i>o</i> -C ₆ H ₄ O ₂ F ₂), 7,88 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Glp), 7,92 (2H, -NH- <i>ar</i> -C ₆ H ₄ O ₂ F ₂), 8,03 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Ala), 8,41 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Phe), 10,59 с (1H, -C(O)-NH-CH- в AFC) |
| Glp-Val-Ala-pNA | Glu:Phe:Ala 1:0,7:1,2 | R _f = 0,88 ² | 21,0 мин | 419,2/ 419,2 | 0,83 д.д (6H, -CH ₃ в Val), 1,15 м (1H, (CH ₃) ₂ CH-CH-), 1,30 д (3H, -CH ₃ в Ala), 1,87 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 2,09 м (2H, -C(O)-CH ₂ -CH ₂ -), 2,22 м (1H, -CH ₂ -CH ₂ -CH-), 4,13 м (1H, -CH-CH(CH ₃) ₂), 4,20 м (1H, -CH-CH ₂), 4,57 (1H, -NH-CH-CH-), 7,83 д (2H, -NH-C ₆ H ₄ -NO ₂), 7,91 с (1H, -C(O)-NH-CH- в Val), 7,93 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Ala), 8,22 д (2H, -NH-C ₆ H ₄ -NO ₂), 8,34 д (1H, -C(O)-NH-CH- в Glp), 10,59 с (1H, -C(O)-NH-CH- в pNA) |

¹ В системе бензол-ацетон-уксусная кислота (100:25:4) ² В системе *n*-бутанол-вода-пиридин-уксусная кислота (15:12:10:3)

³ 0,1% TFA в линейном градиенте MeCN (1 мл/мин) от 10 до 70% за 30 мин на колонке C₁₈ (4,6x250 мм)

4. Гидролиз субстратов цистеиновыми пептидазами семейства С1

Гидролиз полученных пептидомиметиков (I)-(V) изучали под действием цистеиновых пептидаз семейства С1 – растительных ферментов папаина, бромелаина, фицина, а также лизосомальных катепсинов млекопитающих и человека В и L. Для анализа субстратной специфичности вышеперечисленных пептидаз мы использовали также Z-Ala-Ala-Gln-

Все исследуемые субстраты расщеплялись цистеиновыми пептидазами семейства С1. Однозначность расщепления соединений (I)-(VI) по единственной связи между аминокислотным остатком в Р1-положении и соответствующей маркерной группировкой (pNA, AMC, AFC) была показана на примере гидролиза их папаином методом ВЭЖХ.

Субстраты (I)-(VI) сравнивались по двум характеристикам: (1) по эффективности гидролиза цистеиновыми пептидазами семейства С1, которая характеризуется скоростью гидролиза и оценивается коэффициентом специфичности ферментативной реакции k_{cat}/K_M и (2) по селективности, т.е. устойчивости субстратов к действию пептидаз других кланов.

4.1. Кинетика гидролиза субстратов цистеиновыми пептидазами семейства С1

Кинетические константы гидролиза синтезированных субстратов цистеиновыми пептидазами представлены на рис. 3. Видно, что флуорогенные субстраты по эффективности гидролиза, определяемой величиной k_{cat}/K_M , на порядок превосходят хромогенные субстраты, причем для всех изученных ферментов, за исключением катепсина L, Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC расщеплялись гораздо лучше, чем Abz-Ala-Phe-pNA. В случае флуорогенных субстратов k_{cat}/K_M была максимальной при гидролизе Abz-Phe-Ala-pNA катепсином L, а в случае хромогенных субстратов – при расщеплении Glp-Phe-Ala-pNA папаином. Наибольшая эффективность гидролиза всех хромогенных субстратов наблюдалась для папаина, а наименьшая – для катепсина L; в случае папаина, фицина и катепсина В наилучшим субстратом являлся Glp-Phe-Ala-pNA; бромелаин с сопоставимой эффективностью гидролизовал также Glp-Val-Ala-pNA; катепсин L лучше всего гидролизовал Z-Ala-Ala-Gln-pNA.

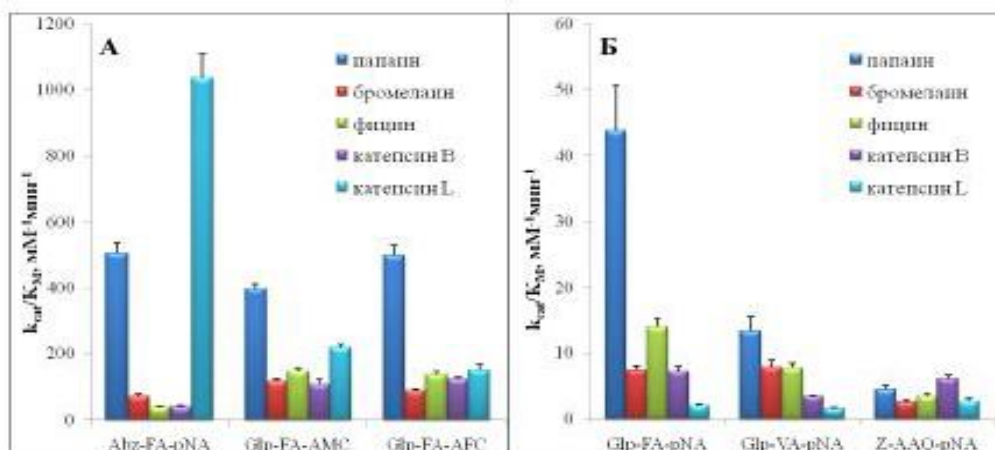


Рис.3. Эффективность гидролиза флуоренных (А) и хромогенных (Б) субстратов цитированных пептидаз семейства С1. Условий реакции: рН 5,6 1мМ DTT, 2,5% DMF, концентрация пептидаз 20-50 нМ, диапазон концентрации флуорогенных субстратов 1,25 – 75 мкМ, хромогенных субстратов 25-1000мкМ.

4.2. Селективность субстратов цистеиновых пептидаз семейства С1

Селективность синтезированных субстратов была исследована с использованием сериновых пептидаз – трипсина, α -химотрипсина, субтилизина Карлсберг; аспартильной – пепсина и металлопептидазы – термолизина. Активность фермент

в условиях, оптимальных для работы цистеиновых пептидаз: в слабокислой среде и в присутствии восстановителя дитиотреитола. Полученные данные представлены на рис. 4.

Синтезированные нами флуорогенные субстраты Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC были селективны для цистеиновых пептидаз семейства С1 и не гидролизывались пептидазами других кланов. Субстрат Abz-Phe-Ala-pNA расщеплялся химотрипсином с высокой скоростью и, следовательно, селективным не являлся (рис. 4, А-Б).

Среди хромогенных субстратов селективными являются Glp-Phe-Ala-pNA и Glp-Val-Ala-pNA. Субстрат Z-Ala-Ala-Gln-pNA расщеплялся субтилизином Карлсберг (рис. 4, В-Г).

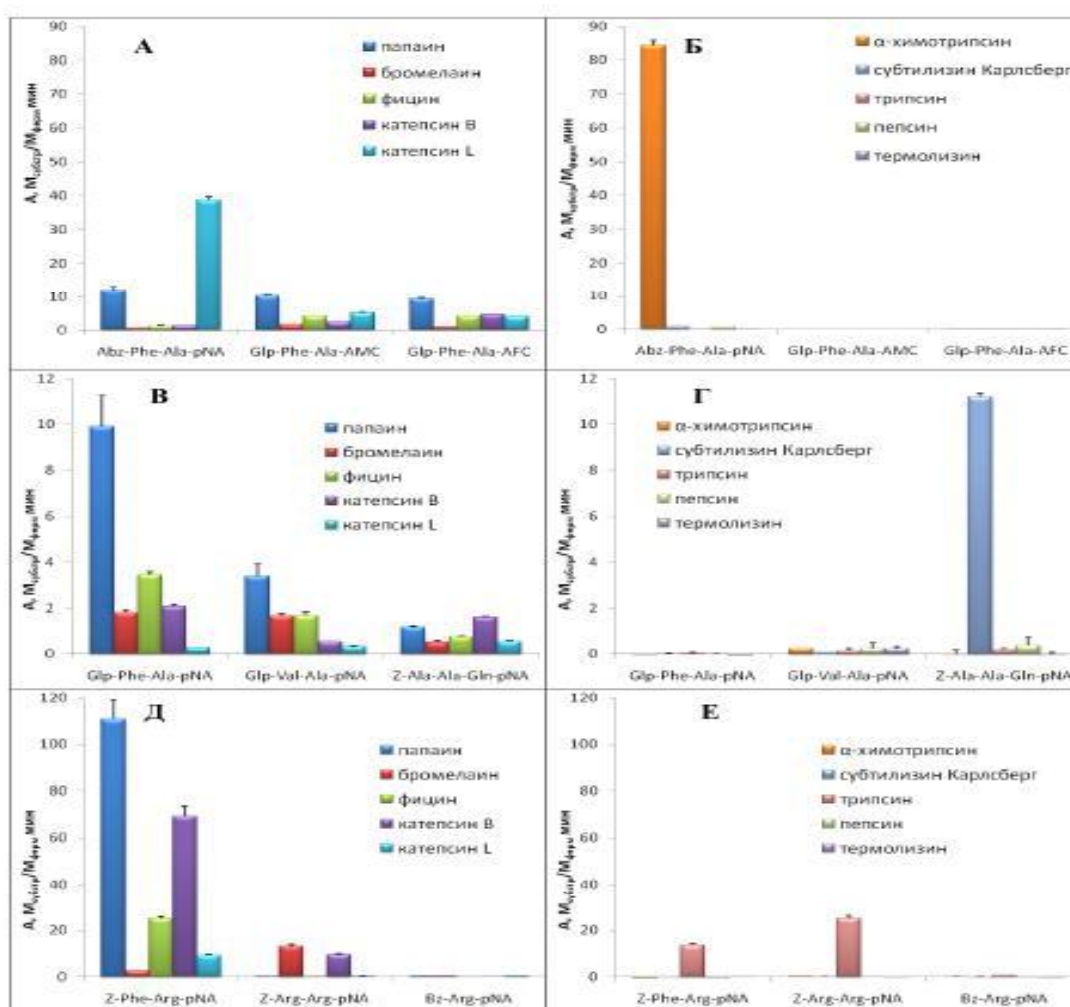


Рис.4. Активность цистеиновых пептидаз семейство С1 и пептидаз других каналов при гидролизе исследуемых субстратов. Условий реакции: pH 5,6 1mM DTT, 2.5% DMF, концентрация пептидаз 20-100 нМ, диапазон концентрации флуорогенных субстратов 25 мкМ, хромогенных субстратов 200мкМ

Была исследована также селективность распространенных коммерческих хромогенных субстратов Z-Phe-Arg-pNA (VII), Z-Arg-Arg-pNA (VIII), Bz-Arg-pNA (IX), которые в настоящее время широко используются для тестирования ферментативной активности цистеиновых пептидаз семейства С1. Z-Phe-Arg-pNA (VII) является специфичным субстратом для всего семейства цистеиновых пептидаз семейства С1, Z-Arg-Arg-

позволяет разделить по активности катепсины В и L, а Bz-Arg-pNA (IX) является самым распространенным субстратом для определения активности цистеиновых пептидаз семейства С1. Для сравнения проводили гидролиз коммерческих субстратов (VII)-(IX) использованными в работе цистеиновыми пептидазами и перечисленными выше пептидазами других кланов (рис. 4, Д-Е). Z-Phe-Arg-pNA хорошо расщеплялся всеми исследованными цистеиновыми пептидазами, причем наибольшую активность проявлял папаин. Субстрат Z-Arg-Arg-pNA расщеплялся бромелаином и катепсином В, а Bz-Arg-pNA гидролизировался всеми цистеиновыми пептидазами, но с низкой скоростью.

Таким образом, все коммерческие субстраты не являются селективными, т.к. с высокой скоростью расщепляются трипсином.

4.3. Постэлектрофоретическая детекция активности папаина с использованием синтезированных субстратов.

Выявленные преимущества синтезированных флуорогенных субстратов Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC позволили разработать высокочувствительный экспресс-метод детекции активности цистеиновых пептидаз после нативного электрофореза в ПААГ.

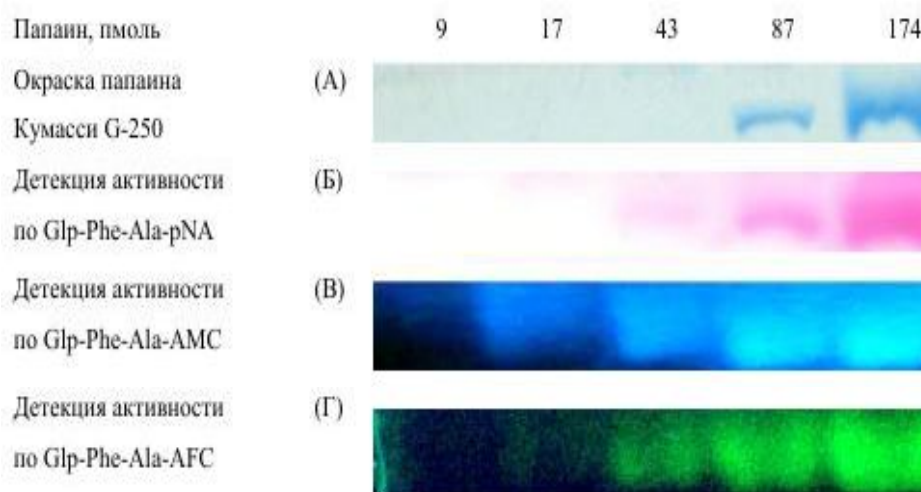


Рис.5. Различные способы детекции папаина после нативного электрофореза в ПААГ.

Активность пептидаз в геле детектировали визуально под УФ-светом. На рис. 5 представлены результаты детекции папаина в геле (в диапазоне 9 – 174 пмоль) с использованием предложенного подхода в сравнении с другими способами детекции. На полосе А показаны результаты визуализации фермента при окраске геля кумасси, ниже – детекция папаина с использованием хромогенного субстрата Glp-Phe-Ala-pNA (I). Этот метод обнаружения фермента – непрямой и включает наложение на гель мембраны, пропитанной субстратом, с последующим диазотированием выделяющегося п-нитроанилина. На полосах В и Г показаны результаты визуализации папаина с использованием синтезированных нами Glp-Phe-Ala-AMC (IV) и Glp-Phe-Ala-AFC (V). В отличие от использования хромогенного субстрата Glp-Phe-Ala-pNA, применение

непосредственно в геле без проведения дополнительных операций. Преимуществом этого подхода является также повышение чувствительности детекции и возможность безошибочной локализации в геле белковой полосы для дальнейшего анализа.

5. Идентификация и характеристика цистеиновых пептидаз *Tenebrio molitor*

5.1. Фракционирование пептидаз *Tenebrio molitor*

Синтезированные нами субстраты оказались незаменимы и очень эффективны при исследовании цистеиновых пептидаз личинок жука-вредителя зерновых и крупяных запасов большого мучного хрущака *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Отличительной чертой этих ферментов является их высокая нестабильность, обусловленная как их склонностью к автолизу, так и нахождением в составе многокомпонентного пищеварительного комплекса *T. molitor*. Представление о сложном составе пищеварительного комплекса этого насекомого иллюстрируют результаты хроматографического разделения методом гель-фильтрации экстракта пищеварительных ферментов (рис. 6). В составе комплекса выявлены цистеиновые пептидазы по субстратам Glp-Phe-Ala-pNA и Z-Ala-Ala-Gln-pNA, трипсиноподобные – по Bz-Arg-pNA, химотрипсиноподобные – по Glp-Ala-Ala-Leu-pNA, пролилкарбоксипептидаза по – Z-Ala-Pro-pNA, дипептидилпептидаза IV – по Ala-Pro-pNA, а также ряд других экзопептидаз.

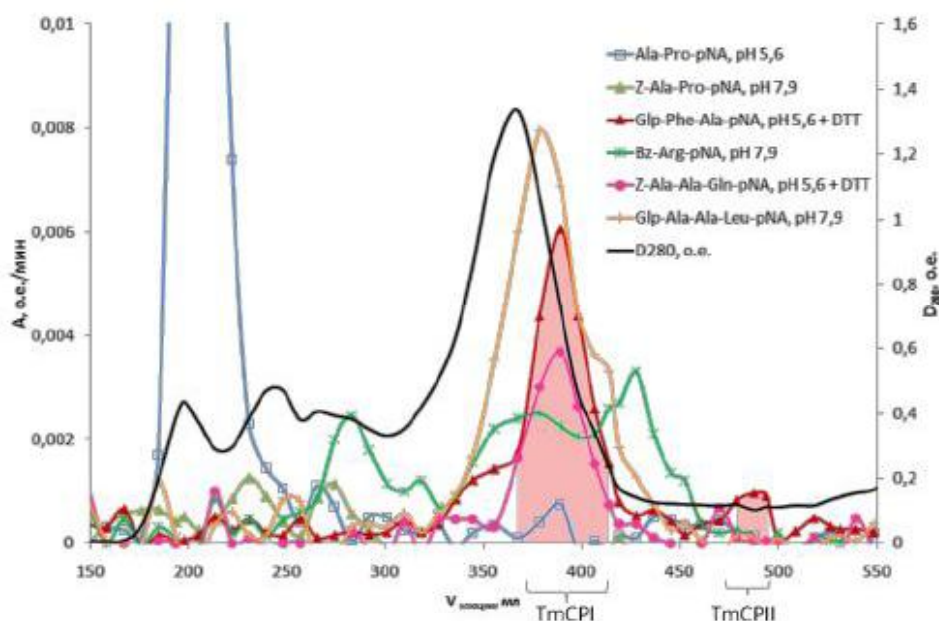


Рис. 6. Фракционирование экстракта пищеварительных пептидаз личинок *Tenebrio molitor* на колонке с Sephadex G-100, элюция 0,01 М фосфатным буфером, pH 5,6, содержащим 0,5 М NaCl.

В связи с этим использование синтезированных нами селективных субстратов являлось необходимым залогом успеха в детектировании и идентификации цистеиновых пищеварительных пептидаз *T. molitor*. На рис. 7 приведены профили элюции пептидаз, тестируемых по синтезированному нами Glp-Phe-Ala-pNA и коммерческому субстрату цистеиновых пептидаз Z-Phe-Arg-pNA в условиях, оптимальных для работы

DTT). Видно, что активность по субстрату Glp-Phe-Ala-pNA детектировалась только в условиях, оптимальных для работы цистеиновых пептидаз, в пиках TmCPI и TmCPII. Активность по субстрату Z-Phe-Arg-pNA проявлялась в обоих рассматриваемых условиях, а также в большем количестве фракций, которые соответствовали элюции не только цистеиновых, но и трипсиноподобных пептидаз. Таким образом, только использование предложенных в нашей работе селективных субстратов позволило однозначно выявить активность цистеиновых пептидаз в столь сложной природной смеси, как пищеварительный комплекс личинок *T. molitor*.

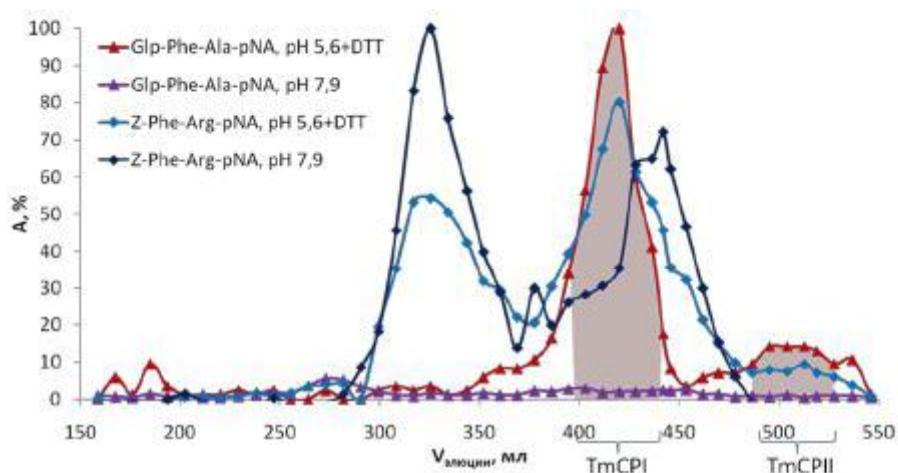


Рис.7. Использование синтезированного субстрата Glp-Phe-Ala-pNA в сравнении с коммерческим Z-Phe-Arg-pNA для выявления цистеиновых пептидаз при фракционировании экстракта пищеварительных ферментов личинок *T. Molitor* на колонке с Sephadex G-100. Условия эксперимента аналогично рис. 6.

5.2. Идентификация цистеиновых пептидаз *Tenebrio molitor*

Нами были предприняты многочисленные попытки очистить цистеиновые пептидазы TmCPI и TmCPII с помощью ионообменной и гидрофобной хроматографии, ковалентной хроматографии с пиридилдисульфидным сорбентом, а также аффинной хроматографии с использованием в качестве лиганда соевого ингибитора трипсина. Однако все способы и их различные комбинации оказались неэффективными ввиду значительной потери активности пептидаз и невозможности получить очищенные ферменты. В связи с этим мы разработали методику на основе предложенных нами селективных флуорогенных субстратов, позволившую идентифицировать пептидазы *T. molitor* после всего лишь одной хроматографической стадии очистки. Частично очищенные препараты TmCPI и TmCPII (рис. 6 и 7) подвергали дальнейшему фракционированию посредством нативного электрофореза, после чего непосредственно в геле детектировали активность цистеиновых пептидаз по расщеплению Glp-Phe-Ala-AMC (рис. 8). Флуоресцирующие полосы вырезали из геля и анализировали триптические гидролизаты TmCPI и TmCPII с помощью масс-спектрометрии.

Последовательности некоторых из полученных триптических пептидов были определены методом MS/MS. Чистота полученных ферментных препаратов была

аминокислотных последовательностей белков был проведен в базах данных NCBI и предоставленной д-ром Брендой Опперт (США) базой кДНК из кишечника личинок *T. molitor*. Таким образом, препарат TmCPI был идентифицирован как катепсин В-подобная пептидаза *T. molitor* (25 кДа).

Препарат TmCPII был идентифицирован как катепсин L-подобная пептидаза (25 кДа), присутствующая в виде близких изоформ, различающихся несколькими аминокислотными заменами.

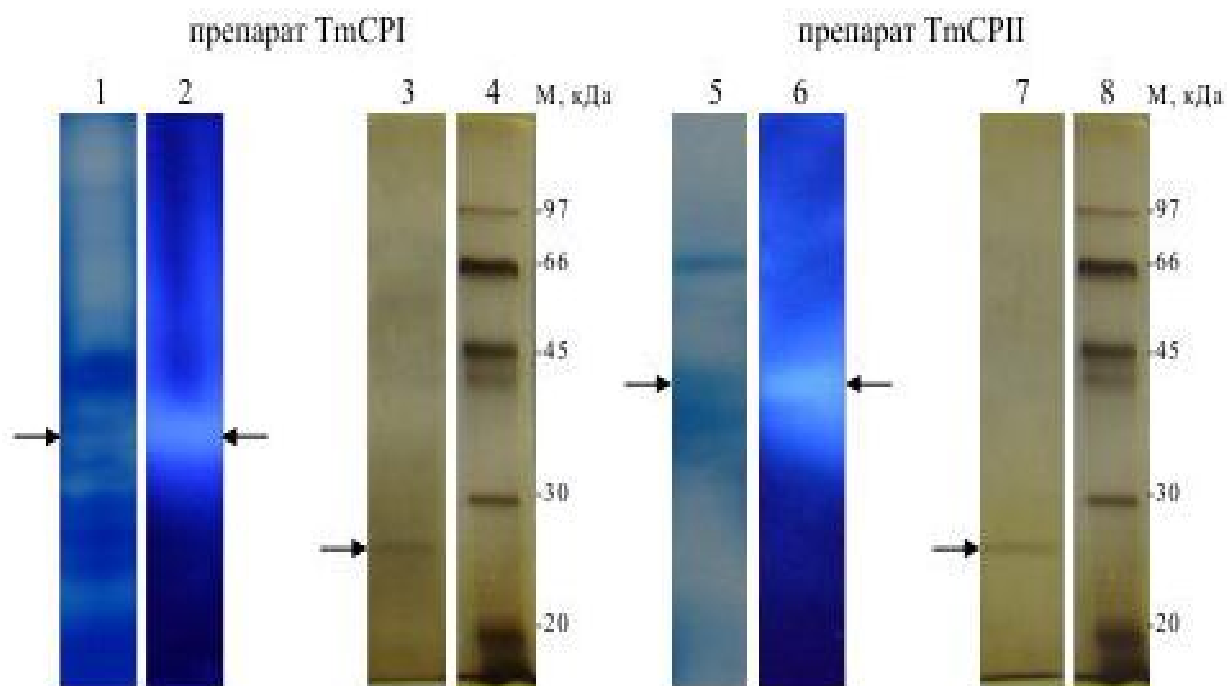


Рис.8. Электрофоретический анализ TmCPI и TmCPII (показаны стрелками). После нативного электрофореза дорожки 1 и 5 окрашивали Кумасси G-250 для визуализации белка. На дорожках 2 и 6 тестировали активность цистеиновых пептидаз с использованием Glp-Phe-Ala-AMC. На дорожках 3 и 7 представлены результаты электрофореза в денатурирующих условиях фракций TmCPI и TmCPII, изолированных из дорожек 2 и 6, соответственно. Дорожки 4 и 8 – маркеры молекулярной массы. Дорожки 3,4,7 и 8 окрашивали серебром.

5.3. Субстратная специфичность цистеиновых пептидаз *T. molitor*

Субстратную специфичность идентифицированных пептидаз *T. molitor* изучали с использованием синтезированных (I)-(VI) и коммерческих (VII)-(IX) субстратов.

Активность TmCPI и TmCPII была определена с учетом титрования активных центров ферментов специфическим необратимым ингибитором E-64 (L-транс-эпоксисукцинил-лейциламидо(4-гуанидино) бутаном) и измерена в присутствии ингибиторов сериновых пептидаз PMSF (фенилметилсульфонилфторида) и STI (соевого ингибитора трипсина Куница). Обе пептидазы расщепляли все исследуемые субстраты, но с разной эффективностью (рис. 8). Наибольшую активность пептидазы проявляли при гидролизе субстрата Z-Phe-Arg-pNA. С удовлетворительной скоростью расщеплялись хромогенный субстрат Glp-Phe-Ala-pNA и его флуорогенные аналоги Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC. Катепсин В-подобная пептидаза, как и ее гомолог из млекопитающих, также хорошо расщепляла Z-Arg-Arg-pNA. Специфичность катепсин L-

molitor не коррелирует со специфичностью катепсина L млекопитающих (см . рис. 4).

5.4. Гидролиз аналогов токсических пептидов глиадинов катепсинами из различных источников

В работе были использованы флуорогенные аналоги токсических пептидов глиадинов Abz-LPYPQQLPQ-EDDnp (X) и Abz-QPQQPFPQ-EDDnp (XI), любезно предоставленные д-ром Луисом Джулиано (Бразилия). Это пептидомиметики с внутримолекулярным тушением флуоресценции (Abz – флуорофор, EDDnp (этилендиамин 2,4-динитрофенил) – тушитель флуоресценции). Поскольку цистеиновые пептидазы TmCPI и TmCPII способны расщеплять пептидные связи после остатка Gln в субстрате Z-Ala-Ala-Gln-pNA (см. рис. 9), нами было предположено, что они могут расщеплять и токсические пептиды глиадинов. Активность цистеиновых пептидаз *T. molitor* по субстратам (X) и (XI) была измерена в присутствии ингибиторов сериновых пептидаз PMSF и STI. Для сравнения в этих же условиях был проведен также гидролиз этих субстратов гомологичными пептидазами млекопитающих – катепсинами B и L.

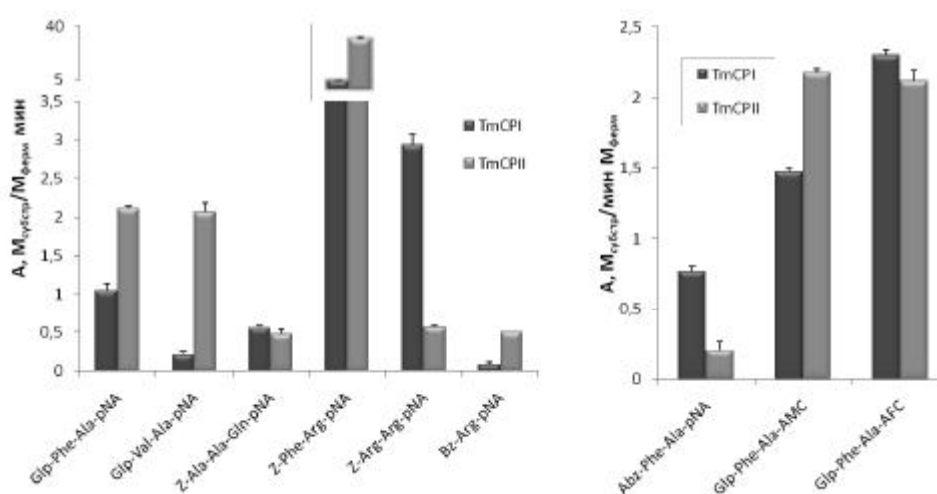


Рис.9. Субстанция специфичности цистеиновых пептидаз *T. molitor*. Условия реакции: pH 5,6, 1 mM DTT, 2,5 % DMF, концентрация хромогенных субстратов 200 мкМ, флуорогенных субстратов 25 мкМ.

Оказалось, что аналоги токсических пептидов расщеплялись катепсин L-подобными пептидазами и не гидролизировались катепсин B-подобными пептидазами из разных источников (рис. 10). Субстрат (XI) гидролизировался обоими катепсинами L с сопоставимой скоростью, в то время как субстрат (X) расщеплялся в 5 раз эффективнее пептидазой TmCPII. Таким образом, пищеварительная цистеиновая пептидаза TmCPII из личинок *T. molitor* может быть предложена в качестве кандидата для создания

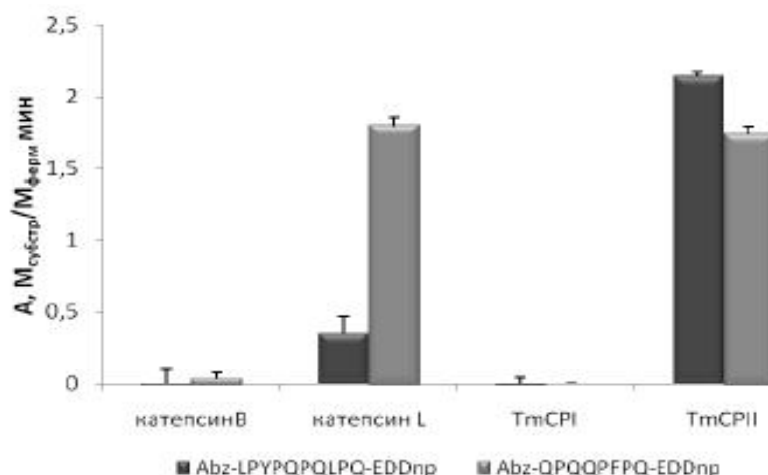


Рис. 10 Гидролиз аналогов токсических пептидов глиадинов катепсин-подобными цистеиновыми пептидазами. Условия реакции: pH5,6 1 мМ DTT, 2,5% DMF, концентрация субстратов 25 мкМ.

Как видно из проведенных научных исследований Семашко Т.А. можно сделать следующие выводы:

1. Проведен дизайн и осуществлен химико-энзиматический синтез ряда хромогенных и флуорогенных субстратов цистеиновых пептидаз семейства С1: Glp-Phe-Ala-pNA, Glp-Val-Ala-pNA, Abz-Phe-Ala-pNA, Glp-Phe-Ala-AMC, Glp-Phe-Ala-AFC.

2. Определены кинетические параметры гидролиза синтезированных субстратов пептидазами семейства С1 различного происхождения: растительными ферментами папаином, бромелаином и фицином, а также катепсинами В и L млекопитающих и человека. Показано, что эффективность гидролиза флуорогенных субстратов значительно выше, чем хромогенных.

3. Синтезированные пироглутамилпептиды Glp-Phe-Ala-pNA, Glp-Val-Ala-pNA, Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC селективны для цистеиновых пептидаз семейства С1 и, в отличие от коммерчески доступных субстратов, не расщепляются пептидазами других кланов.

4. Предложен высокочувствительный экспресс-метод детекции цистеиновых пептидаз семейства С1 после нативного электрофореза в ПААГ с использованием синтезированных флуорогенных субстратов Glp-Phe-Ala-AMC и Glp-Phe-Ala-AFC.

5. С использованием синтезированных субстратов идентифицированы и охарактеризованы катепсин В- и катепсин L-подобные пищеварительные цистеиновые пептидазы из личинок большого мучного хрущака *Tenebrio molitor*.

Более подробно результаты освещены в научных трудах [7-15,22]

II. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ДЫННОГО ДЕРЕВА

Фармакологические особенности. Папаин является протеолитическим ферментом, действие которого напоминает действие пепсина. Заместительная терапия папаином существенным образом улучшает процессы пищеварения в желудочно-кишечном тракте. Исследованиями J. L. Breeling установлено, что папаин проявляет локальное действие в желудочно-кишечном тракте и резорбируется в минимальных количествах, что предотвращает

ет негативное побочное действие на внутренние органы, особенно на печень. Папаин разрушает токсины многих возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе столбняка. Противомикробные свойства проявляет содержащийся в латексе дынного дерева лизоцим, который гидролизует Я-1,4-связи между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и 2-ацетамидо-2-дезоксид-глюкозы и таким образом разрушает пептидогликан (муреин) — основной компонент клеточной стенки бактерий. Наибольшей чувствительностью к лизоциму характеризуются грамположительные микроорганизмы.

Папаин проявляет антикоагулянтные (фибринолитические) свойства, обладает способностью активировать пламиноген (профибринолизин), вследствие чего последний превращается в плазмин (фибринолизин), расщепляющий фибрин. Фибринолитическое действие папаина более мягкое по сравнению с трипсином. Папаин ускоряет заживление ран, трофических язв, пролежней, способствуя их очищению от некротических масс. При лечении экспериментальных ран у морских свинок и мышей он сокращает продолжительность воспалительной фазы раневого процесса, ускоряет очищение раны от патогенной микрофлоры (стафилококков), создает оптимальные условия для репаративных процессов. Папаин стимулирует переваривание нежизнеспособных белковых масс, но вместе с тем является безопасным для жизнеспособных тканей в связи с присутствием в них ингибиторов протеаз. Тем не менее при самостоятельном применении папаин малоэффективен, поскольку для проявления переваривающей функции требуется активатор. Поэтому в препаратах, применяемых в хирургической практике, папаин часто сочетают с цистеином (донором сульфгидрильных групп) или мочевиной, которая обеспечивает активацию сульфгидрильных групп, находящихся в поврежденных нежизнеспособных тканях, но не всегда доступных. Кроме того, мочевина содействует денатурации нежизнеспособных белковых масс и таким образом делает их более чувствительными к ферментативному перевариванию. В эксперименте доказано, что комбинация папаина с мочевиной обеспечивает более сильное (почти вдвое) переваривание телятины в сравнении с чистым папаином. В экспериментальной травматологии продемонстрировано положительное влияние папаина на заживление травматических повреждений. Введение этого фермента в виде препарата **«Лекозим»** в зону перелома позвонка и лучевой кости кролей содействует лизису некротических структур и созданию условий для ангиогенеза и остеогенеза. При экспериментальных эрозиях роговицы у кроликов инстиляция 0,5–1% раствора папаина ускоряет процесс эпителизации. Действие на слизистую оболочку конъюнктивы кроликов и ротовой полости человека 10% раствора папаина (что в 10 раз превышает лечебные дозы) проявляется в кратковременном слущивании поверхностных пластов эпителия, которые быстро регенерируются без дальнейших последствий. Папаин и млечный сок папайи проявляют также противогельминтные свойства [23].

Папаин широко применяется в биологических и биомедицинских научных исследованиях и в биотехнологии, незаменим при исследовании рецепторного аппарата клеток, структуры белков, при химическом анализе и очистке различных биологически активных веществ. Классическими стали исследования структуры иммуноглобулинов путем их ограниченного протеолиза папаином, проведенные Нобелевскими лауреатами G. M. Edelman (нар. 1929) и R. R. Porter (1917–1985). С помощью папаина получают блокирующие F(ab)₂

фрагменты моноклональных антител, которые нашли применение как в экспериментальной, так и в клинической медицине [23].

Папаин входит в состав полиэнзимных препаратов, содержащих естественные ферменты растительного и животного происхождения. В последнее время они нашли широкое применение в клинической практике как лекарственные средства, влияющие на разные звенья метаболизма. Новым направлением клинического применения ферментных препаратов является метод системной энзимотерапии. Он базируется на комплексном влиянии на гомеостаз специально подобранных комбинаций гидролитических ферментов животного и растительного происхождения. Экспериментальные исследования свидетельствуют, что полиэнзимные препараты более эффективны в сравнении с моноэнзимными.

Фармакологические свойства полиэнзимных препаратов обусловлены их влиянием на разные процессы, обеспечивающие гомеостаз. Они улучшают реологические свойства крови, обладают противовоспалительным, некролитическим, обезболивающим, фибринолитическим и иммуномодулирующим действием, улучшают региональную микроциркуляцию и регенеративные процессы.

Гемореологическое действие полиэнзимных препаратов обусловлено угнетением агрегации тромбоцитов (антиагрегационный эффект), повышением фибринолитической активности, уменьшением временного периода спонтанного фибринолиза за счет активации плазминогена, увеличением эластичности (флексibility) эритроцитов, снижением адгезии форменных элементов крови к сосудистой стенке [2-5, 15-23].

Противовоспалительное действие энзимных препаратов обусловлено влиянием на иммунные и неиммунные механизмы воспаления. Ферменты разрушают медиаторы воспаления, в том числе простагландины, лизоцим, гаптоглобин, брадикинин, С-реактивный белок, а также влияют на разные звенья процесса воспаления (метаболизм арахидоновой кислоты, системы комплемента, кининов и факторы свертывания крови). Инактивация медиаторов воспаления предопределяет обезболивающий эффект. Энзимные препараты расщепляют плазматические белки, которые проникают при остром воспалении в соединительную ткань, облегчают элиминацию белкового детрита и депозитов фибрина из зоны воспаления, что обеспечивает улучшение микроциркуляции в зоне повреждения и уменьшение локального отека. Поддерживая физиологический процесс ликвидации воспаления, энзимные препараты препятствуют переходу его в хроническую форму. Кроме того, они повышают локальную концентрацию антибиотиков в тканях и содействуют их проникновению в очаг воспаления, способны потенцировать и пролонгировать действие антибиотиков. Доказана способность энзимных препаратов улучшать переносимость полихимиотерапии при онкологической патологии.

Полиэнзимные препараты проявляют иммуномодулирующее действие. Их влияние на иммунную систему заключается прежде всего в модификации иммунного ответа за счет стимуляции иммунокомпетентных клеток, регулирующего действия на молекулы межклеточной адгезии (ICAM-1, LFA и др.) и иммуносупрессивные механизмы, разрушении и противодействии образованию иммунных комплексов. Основными механизмами иммуномодулирующего действия энзимных препаратов является: стимуляция фагоцитоза, повышение цитотоксичности макрофагов, активация в 8–100 раз NK-клеток (естественных киллеров), индукция синтеза цитокинов (фактора некроза опухоли — TNF, интерлейкина

1), угнетение активации комплемента и уменьшение индуцированных ним повреждений, элиминация фиксированных в тканях иммунных комплексов, предотвращение образования новых иммунных комплексов, участие в разрушении циркулирующих иммунных комплексов, влияние на аутоиммунные процессы через систему Т-хелперов.

Подробно изучена фармакокинетика полиэнзимного препарата **«Вобэнзим»**, в состав которого входит папаин. После приема внутрь энзимы всасываются в тонком кишечнике в активной форме, сохраняя гидролитическую активность. Всасывание в тонком кишечнике некоторых ферментов достигает 20%. В крови макромолекулы энзимов связываются с антипротеазами α_1 -антитрипсином и α_2 -макроглобулином. Благодаря этому экранируются антигенные детерминанты протеаз, которые не вызывают сенсibilизацию организма. Максимальная концентрация компонентов полиэнзимных препаратов достигается через 2 часа, поддерживается на стабильном уровне в течение 4 часов, а потом снижается в течение 2 часов. Период полувыведения составляет 8 часов. Энзимы, циркулирующие в крови, частично захватываются звездчатыми ретикулоэндотелиоцитами печени и другими клетками системы мононуклеарных фагоцитов. Около 10% препарата выводится с мочой, около 45% — с калом. Препарат, не абсорбированный в кишечника, участвует в процессах пищеварения.

При экспериментальной алиментарной гиперхолестеринемии кроликов подтверждено, что препарат «Вобэнзим» проявляет выраженное гиполипидемическое и антиатерогенное действие. Наряду со снижением уровня холестерина сыворотки он тормозит в 2,8–3,2 раза интенсивность захвата липопротеидов плазмы культурой мышинных макрофагов. Предотвращение резкого повышения атерогенности плазмы связывают со снижением интенсивности процессов перекисного окисления липидов (замедлялось увеличение концентрации малонового диальдегида в плазме и моноцитах, повышалась скорость снижения индуцированной хемилюминесценции) при сохранении активности антиоксидантных ферментов (каталазы), снижением активности моноцитов.

В опытах *in vitro* полиферментный препарат «Вобэ-Мугос» нейтрализует инфекционную активность вирусов полиомиелита и осповакцины в культурах клеток мышей, HeLa и амниона человека, а также вируса табачной мозаики при экспериментальном инфицировании растений [2-5, 15-23].

Доказаны противоопухолевые свойства комбинированных энзимных препаратов. При общем культивировании эксплантатов нормальной и раковой ткани установлено, что препараты проявляют выборочное цитолитическое действие только на трансформированные клетки. На животных доказаны антиметастатические свойства препарата «Вобэ-Мугос».

Химопапаин гидролизует неколлагеновые полипептиды и белки, поддерживающие третичную структуру хондромукопротеина. Уменьшение осмотической активности и абсорбции жидкости приводит к снижению внутридискового давления, уменьшению компрессии, следовательно, и боли в пояснице. Этот механизм действия установлен в опытах на животных *in vitro* и *in vivo*. В экспериментах на взрослых собаках через 48 часов и 14 дней после введения химопапаина в поясничный межпозвоночный диск с помощью радиографии выявлено сужение межпозвоночного пространства. При патологоанатомическом исследовании собак на 14-й день эксперимента наблюдалась кавитация пульпозного ядра. Химопапаин растворяет пульпозное ядро собак и кроликов в дозе 100 и 50 пКат ед

диск соответственно. Опытами *in vitro* доказано, что химопапаин гидролизует белково-мукополисахаридный комплекс пульпозного ядра межпозвоночного диска человека, но не действует на его коллагеновые структуры.

Экстракты эпикарпа, эндокарпа и семян как незрелых, так и зрелых плодов папайи обладают выраженной бактериостатической и бактерицидной активностью в отношении *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae* (Emeruwa A. C., 1982; Osato J. A. etc., 1993). MIC для грамотрицательных бактерий составляет 0,2–0,3 мг/мл, для грамположительных — 1,5–4 мг/мл. Установлено, что антибактериальные вещества плодов папайи имеют белковую природу. Сведения о противомикробных свойствах экстракта листьев папайи довольно противоречивы: J. A. Osato etc. (1993) и С. А. Jimenez Misas etc. (1979) указывают на антибиотическую активность экстракта листьев, а А. С. Emeruwa (1982) — отрицает ее.

Экстракт зрелых семян папайи обладает противоамебными свойствами (MIC < 100 мкг/м) (Tona L. etc., 1998).

In vitro препарат папайи проявляет выраженную противогельминтную активность в отношении паразита птиц *Ascaridia galli*, причем активность превосходит действие пиперазина гексагидрата (Lal J. etc., 1976). Латекс папайи (2–8 г/кг в виде водной суспензии per os на протяжении 22 дней) проявляет дозозависимые антигельминтные свойства при естественном аскаридозе свиней (Satrija F. etc., 1994), оксиуридозе мышей (Mehta R. K. и Parashar G. C., 1966), экспериментальной инвазии мышей интестинальными нематодами *Heligmosomoides polygyrus* (Satrija F. etc., 1995).

Латекс папайи угнетает рост дрожжеподобных грибов *Candida albicans* при добавлении в культуру в экспоненциальной фазе роста. Полное угнетение роста грибов наблюдается при концентрации белка около 138 мкг/мл (Giordani R. etc., 1996). Из латекса выделено 2 фермента — α -D-маннозидаза и N-ацетил-b-D-глюкозаминидаза, которые, особенно первый, угнетают рост грибов *Candida*, а в комбинации их действие потенцируется. Фунги-

обработки ферментами латекса она теряет полисахариды в поверхностном слое (а при применении N-ацетил-b-D-глюкозаминидазы — и во внутреннем) (Giordani R. etc., 1991). В дозе 0,41 мг белка/мл латекс вдвое потенцирует противогрибковую активность флуконазола в отношении *Candida albicans* (Giordani R. etc., 1997). Как установлено с помощью электронной микроскопии, в основе этого синергического эффекта лежит частичное повреждение клеточной стенки грибов.

Экстракт латекса папайи обладает утеротоническими свойствами, максимально проявляющимися на поздних сроках беременности крыс, которая коррелирует с пиковым уровнем эстрогенов в плазме крови (Cherian T., 2000). Не беременная матка крыс также проявляет чувствительность к экстракту латекса. Предшествующая экспозиция ткани матки с феноксibenзаминном не конкурентно блокирует эффект экстракта, а блокада рецепторов 5-гидрокситриптамина метисергидом частично угнетает утеротоническую активность. Ингибитор циклооксигеназы индометацин на этот процесс не влияет. Эксперименты со стабилизатором тучных клеток кромогликатом исключают опосредованность утеротонического эффекта экстракта л

биогенными аминами, простагландинами). Очищенный папаин в небольших дозах вызывает кратковременное сокращение мускулатуры матки, а в высоких — его энзиматическое влияние испытывают рецепторные белки. Таким образом, утеротонические свойства экстракта латекса обуславливаются комплексом ферментов, алкалоидов и других веществ, влияющих на α -адренорецепторы матки.

Неспелые семена папайи при пероральном введении крысам в дозе 100 мг/кг на протяжении 8 недель вызывают дегенеративные изменения в герминативном эпителии яичек, уменьшение количества клеток Лейдига. Наблюдалось опустошение трубочек придатков яичек, обнаруживались дегенеративно измененные сперматозоиды (Udoh P. и Kehinde A., 1999). Аналогичное действие проявляет водный экстракт семени папайи при пероральном и внутримышечном введении (Chinoy N. J. и George S. M., 1983; Lohiya N. K. etc., 1994). Результаты исследований указывают на то, что вещества с антисперматогенными свойствами локализуются в хлороформном экстракте семени папайи, в частности в бензольной хроматографической фракции и этилацетатной субфракции (Lohiya N. K. etc., 1992, 1999, 2000). При пероральном введении кролям в дневной дозе 50 мг на животного в течение 150 дней бензольная фракция экстракта уже на 15-й день эксперимента индуцировала азооспермию, которая сохранялась на протяжении всего периода исследования. При этом гематологические параметры, концентрация тестостерона в крови, масса яичек, придатков яичек, семенных пузырьков, простаты и уровень фруктозы, глицерофосфохолина, кислой фосфатазы и лактатдегидрогеназы в плазме спермы оставались нормальными, не изменялось либидо животных, но они были бесплодными. У кролей наблюдалось угнетение подвижности сперматозоидов, олигоспермия и повышение процента аномальных сперматозоидов при минимальных изменениях пролиферативных процессов в яичках. На протяжении 60 дней после отмены препарата жизнеспособность спермы кролей восстанавливалась. Исследование *in vitro* подтверждают, что этилацетатная субфракция хлороформного экстракта семени папайи угнетает подвижность сперматозоидов животных и человека (Lohiya N. K. etc., 2000). При этом движение сперматозоидов человека через 20–25 минут экспозиции полностью прекращалось. С помощью сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии доказано, что биологически активные вещества экстракта семян папайи приводят к повреждению цитоплазматической мембраны в головке и шейке сперматозоидов. Тест на жизнеспособность и анализ числа аномальных сперматозоидов показывают, что после инкубации они становятся бесплодными. Эффект является спермицидным и необратимым. Водный экстракт семени контрацептивными свойствами не обладает. Таким образом, биологически активные вещества семян папайи могут рассматриваться как перспективное контрацептивное средство обратимого действия для мужчин, мишенью которого являются сперматозоиды.

Методом электронно-спиновой резонансной спектроскопии доказано, что экстракты эпикарпа, эндокарпа и семени плодов папайи действуют как эффективные сквенджеры радикалов супероксида (IC_{50} 2,1; 10,0 и 8,7 мг/мл соответственно); проявляют также супероксиддисмутазную активность (соответственно 32, 98 и 33 ЕД/мл). В качестве возможных антиоксидантных компонентов папайи рассматриваются витамин С, глюкоза, малатная и лимонная кислоты (Osato J. A. etc., 1993). Выраженные антиоксидантные свойства сохраня-

Bio-Normalizer (Bio-catalyzer № 11). Методом электронно-спинового резонанса доказано, что в концентрации 50 мг/мл продукты дрожжевой ферментации папайи поглощают 80% гидроксильных радикалов, образовавшихся в ходе реакции Фентона (IC50 12,5 мг/мл). Bio-Normalizer эффективно угнетает образование свободных радикалов кислорода в бесклеточной среде (в реакции Фентона, в системах ксантин/ксантиноксидаза, перекись водорода/пероксидаза хрена, перекись водорода/гидрохлорид/пероксидаза хрена), а также частично уменьшает спонтанную и стимулированную менадионом продукцию аниона супероксида в эритроцитах. Одновременно он усиливает безвредную внутриклеточную продукцию аниона супероксида как неактивированными, так и активированными нейтрофилами периферической крови человека и перитонеальными макрофагами крыс (Osato J. A. etc., 1995). Кроме того, он дозозависимо усиливает индуцированные интерфероном- γ (IFN- γ) продукцию оксида азота, фактора некроза опухолей β (TNF- β) и интерлейкина-1 β (IL-1 β) макрофагами мышей RAW 264.7 (Kobuchi H. и Packer L., 1997). Пероральное введение ферментированного препарата папайи крысам в течение 4 недель уменьшает накопление липидных перекисей в коре головного мозга и угнетает формирование эпилептиформных очагов под влиянием внутрицеребрального введения солей железа. При этом в коре мозга и гиппокампе повышалась активность супероксиддисмутазы (Santiago L. A. etc., 1991, Imao K. etc., 1998). В связи с этим препарат имеет перспективы для применения с целью профилактики неврологических нарушений, обусловленных старением и влиянием свободных радикалов.

Латекс незрелых плодов папайи проявляет терапевтический эффект при экспериментальной язве желудка крыс, значительно снижает желудочную секрецию, индуцированную внутривенной инфузией гистамина. Аналогичным эффектом обладает очищенный папаин (Chen C. F. etc., 1981). Экстракты папайи обладают терапевтическим эффектом при экспериментальной желтухе, вызванной у крыс введением сапонозидов *Brenan's brierleyi* (Boum V. etc., 1978). Карпаин, выделенный из листьев папайи, тонизирует сердечную деятельность.

Неочищенный этанольный экстракт незрелых плодов папайи проявляет выраженный гипотензивный эффект у крыс с гипертензией, вызванной дезоксикортикостероном и солевой нагрузкой. Вазорелаксирующие свойства этого экстракта подтвердили исследования *in vitro* на полосках аорты, почечных и мозговых артериях кролей (Ено А. Е. etc., 2000). Поскольку гипотензивное действие исследуемого экстракта не проявлялось на фоне предшествующего введения животным пропранолола, а вазорелаксирующему эффекту противодействует фентоламин, авторы делают вывод о α -адреноблокирующей активности компонентов этого экстракта.

III. Техничко-экономические показатели возделывания дынного дерева в Туркменистане

Протеолитические ферменты дынного дерева обладают высокой коммерческой стоимостью (См. таблица 1.). Например, по каталогу "Sigma" за 2015 год; 1 грамм высокоочищенного папаина стоил - 879.0 Евро (EUR), 250 UN химопапаина - 255.0 (EUR). В связи с этим остро стоит вопрос о решении этой проблемы своими силами и средствами.

Традиционное тепличное хозяйство является весьма энергоемким, затраты на технический обогрев составляют 40 - 65 % себестоимости продукции, поэтому при проектировании теплично -

наиболее рациональных источников технического обогрева, обосновывая его технико-экономическими расчетами.

Таблица 1. Стоимость высокоочищенных протеолитических ферментов дынного дерева по каталогу «Sigma» за 2015 год.

| Артикул-Пак Размер | Наличие | Цена (EUR) |
|----------------------------------|------------------------------------|------------|
| Высокоочищенного: папаина | | |
| P4762 - 50 мг | Расчетное 17.06.2015 Доставка - ОТ | 85.00 |
| P4762-100 мг | Расчетное 17.06.2015 Доставка - ОТ | 146.50 |
| P4762-1G | Расчетное 17.06.2015 Доставка - ОТ | 879.00 |
| химопапаина | | |
| C8526-1KU | Расчетное 17.06.2015 Доставка - ОТ | 721.00 |
| C8526-250UN | Расчетное 17.06.2015 Доставка - ОТ | 255.00 |

Теплую воду (30⁰ - 70⁰ С), получаемую в результате производственного процесса на заводах и тепловых электростанциях, приходится специально охлаждать в градирнях или брызгальных бассейнах, для того, чтобы ее можно было снова использовать. Огромное количество тепловой энергии, которая могла бы пойти на обогрев сооружения защищенного грунта, теряется при этом безвозвратно. На тепловых и атомных электростанциях около 50 - 55 %: теплоты уносятся охлаждающей водой конденсаторов турбин. Следовательно, для тепловой станции мощностью 1 млн. кВт потери теплоты в конденсаторах турбин составляют около 15 млн. ГДж в год, что эквивалентно 500 тыс. тонн условного топлива. Значительным источником тепловых сбросов являются тепловые электростанции, нефтеперерабатывающие, химические предприятия [2-5,15-21]. Анализ агрометеорологических факторов аридной экосистемы, влияющих на микроклимат солнечных теплиц для выращивания дынного дерева по регионам Туркменистана: северный – Конеургенч; восточный – Туркменабад; центральный – Ашгабат; юго - западный - Етрек, свидетельствует о том, что для поддержания комфортного температурного режима (18⁰ - 22⁰ С) зимой необходимо количество тепловой энергии по регионам страны; в Конеургенском 467.3 - 968.76 МДж; в Туркменабатском 131.4 - 342.0 МДж; в Ашгабатском 83.5 - 106.2 МДж; в Етрекском 21.1 - 0000 МДж [2-9].

Следовательно, с 1га можно добывать 45000 г или 45 кг млечного сока. В одном грамме млечного сока содержится: 10%-папина (45 кг); 16%-лизоцима (472 кг); 50%- химопапаина (225 кг); 24%-пептидазы (108 кг). Соответственно с ценами указанные в таблице 1 можно получить из: папина - 39 555 000 евро, химипапина - 162 225 евро; лизоцима – 24 827,2 евро; пептдазы – 2 310 336 евро. Итого получается: 42 052

Технико-экономические показатели теплицы Израильского производства площадью 1 га для выращивания дынного дерева и получения млечного сока приведены в таблице 2.

Таблица 2. Технико-экономические показатели теплицы для выращивания дынного дерева и получения млечного сока с площадью 1 га.

| № | Экономические показатели | Сумма в евро |
|----|--|---------------|
| 1. | Капиталовложения | 18 042 388,2 |
| 2. | Общее количество добываемого млечного сока в год из плодов в граммах | 450 000 |
| 3. | Общая выручка | 42 052 388,2 |
| 4. | Эксплуатационные расходы | 285 057,32 |
| | В том числе: | |
| | амортизационные отчисления | 108 259,2 |
| | текущий ремонт | 54 129,6 |
| | зарплата | 52 325,28 |
| | топливо на обогрев | 54 129,6 |
| | расходы на удобрение | 7578,44 |
| | прочие не предвиденные расходы | 8635,2 |
| | Итого: | 2089377,32 |
| 5. | Прибыль в год | 39 963 010,88 |
| 6. | Себестоимость 1 грамм | 2,21 |
| 7. | Срок окупаемости (год) | 2,5 |

Технико - экономические показатели, подтверждают возможность интродукции возделывания в аридной экосистеме, а также несомненную перспективность и экономическую рентабельность дынного дерева в условиях Туркменистана в условия защищенного грунта с использованием возобновляемых источников энергии и промышленных тепловых отходов при этом себестоимость 1 грамма продукта обходится - 2.21 евро.

Традиционное тепличное хозяйство является весьма энергоемким, затраты на технический обогрев составляют 40 - 65 % себестоимости продукции, поэтому при проектировании теплично - парникового хозяйства первостепенное внимание следует уделять выбору наиболее рациональных источников технического обогрева, обосновывая его технико - экономическими расчетами.

Теплую воду (30⁰ - 70⁰ С), получаемую в результате производственного процесса на заводах и тепловых электростанциях, приходится специально охлаждать в градирнях или брызгальных бассейнах, для того, чтобы ее можно было снова использовать. Огромное количество тепловой энергии, которая могла бы пойти на обогрев сооружения защищенного грунта, теряется при этом безвозвратно. На тепловых и атомных электростанциях около 50 - 55 %: теплоты уносятся охлаждающей водой конденсаторов турбин. Следовательно, для тепловой станции мощностью 1 млн. кВт потери теплоты в конденсаторах турбин составляют около 15 млн. ГДж в год, что эквивалентно 500 тыс. тонн условного топлива. Значительным источником тепловых сбросов являются тепловые электростанции, нефтеперерабатывающие, химические предприятия.

Исходя из научного аналитического анализа учитывая биологическую активность, физико-химическую свойство, фармакологическую особенность дынного дерева, а также те

нико-экономические показатели и природно - климатические условия аридной экосистемы, пришли **к выводу** о необходимости подбора конструкции гелиотеплиц для ее выращивания создания микроклимата с использованием возобновляемых источников энергии и промышленных тепловых отходов в Туркменистане.

Литература:

1. Бердымухаммедов Г. Лекарственные растения Туркменистана. Ашгабат, 2009. Том 1-3.
2. Абдуллаев А.К., Пенджиев А.М. Применение протеолитических ферментов папайи в лечении гнойных ран // Здоровоохранение Туркменистана. 1998. №4.
3. Абдуллаев А., Пенджиев А.М. . Средство и способ энтерального лечения гнойных инфекций: Автское свидетельство на изобретение патент Туркменистана № 529. 2012.
4. Абдуллаев А., Пенджиев А.М. Способ лечения воспаления железистых органов. Авторское свидетельство на изобретение патент Туркменистана № 529. 2012.
5. Абдуллаев А.К., Пенджиев А.М. Применение протеолитических ферментов папайи в лечении гнойных ран // Здоровоохранение Туркменистана. 1998. №4.
6. Аникина О.М., Семашко Т.А., Оксенойт Е.С., Лысогорская Е.Н., Филиппова И.Ю. Субтилизин Карлсберг, нативный и модифицированный, эффективный катализатор синтеза пептидной связи в органической среде // Биоорганическая химия. 2006. Т. 32. № 2. С. 116–121.
7. Семашко Т.А., Лысогорская Е.Н., Оксенойт Е.С., Бачева А.В., Филиппова И.Ю. Химико-энзиматический синтез новых флуорогенных субстратов цистеиновых протеиназ семейства папаина // Биоорганическая химия. 2008. Т. 34. № 3. С. 376-381.
8. Belyaeva A.V., Semashko T.A., Lysogorskaya E.N., Lozinsky V.I., Filippova I.Yu. Enzymatic synthesis of high specific substrate for cysteine proteases assay // Proceedings of the 29th European Peptide Symposium. Gdansk, 2006. p. 0319.
9. Semashko T., Popletaeva S., Oksenoit E., Lysogorskaya E., Filippova I. New selective substrates for detection of cysteine proteinases // Proceedings of the 30th European Peptide Symposium. Helsinki, 2008. p. 468-469.
10. Семашко Т.А., Лысогорская Е.Н., Филиппова И.Ю. Новые флуорогенные субстраты папаина // Четвертый московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Ч. 2. Москва, 2007. С. 303.
11. Semashko T.A., Lysogorskaya E.N., Filippova I.Yu. Synthesis of substrates for cysteine proteinases catalyzed by immobilized enzymes // 2nd International Conference "Biocatalysis in Non-Conventional Media". Moscow, 2008. p. 49.
12. Semashko T.A., Lysogorskaya E.N., Bacheva A.V., Lozinsky V.I., Filippova I.Yu. Stable Biocatalysts Based on Proteases Immobilized on Poly(vinyl alcohol) Cryogel for Peptide Bond Formation // 8th International Conference on Protein Stabilisation. Graz, 2009. p. 73.
13. Семашко Т.А., Оксенойт Е.С., Лысогорская Е.Н., Бачева А.В., Филиппова И.Ю. Биокаталитическая схема синтеза пептидных субстратов протеаз // Пятый Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». М.,

14. Семашко Т.А. Предсказание субстратной специфичности цистеиновых пептидаз семейства С1 // XVI Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов». М.: МАКС Пресс, 2009. С. 23.

15. Семашко Т.А., Поплетаева С.Б., Бабкин П.А., Гоптарь И.А., Филиппова И.Ю., Элпидина Е.Н. Поиск протеиназ, способных расщеплять трудногидролизуемые пептиды глиаина // IV Российский симпозиум «Белки и пептиды». Казань, 2009. С. 380.

16. Пенджиёв А.М. Агротехника выращивания дынного дерева (*Carica papaya* L.) в условиях защищенного грунта в Туркменистане: Автореф. дисс. ... докт. сельскохоз. наук. М., 2000. 54 с.

17. Пенджиёв А.М. Применение протеолитических энзимов папайи (*Carica papaya* L.) в медицинской практике // Химико-фармацевтический журнал. 2002. №6.

18. Пенджиёв А.М. Применение отечественных протеолитических энзимов растительного происхождения в медицинской практике // *Saglyk syýasaty- Serdar Sahawaty*. Ашхабат, 2000.

19. Пенджиёв А.М. Получение отечественных протеолитических ферментов из плодов папайи для применения в клинической медицине // *Здравоохранение Туркменистана*. 1997. №1. С. 27-30.

20. Penzhiev A.M. The technology of growing the papaya (*Carica papaya*) under conditions of arid zone // *Problems of desert development*. 1997. №2.

21. Penzhiev A.M. Ecoenergy resources of greenhouse facilities in the arid zone // *Problems of desert development*. 1998. №5.

22. Semashko T.A., Popletaeva S.B., Filippova I.Yu., Elpidina E.N. Digestive cysteine cathepsins against celiac disease // 9th Young Scientist Forum and 34th FEBS Congress. Prague: FEBS Journal, 2009. V.276, p. 388.

23. Лекарственные средства: Справочник / под редакцией М.А.Клюева, В.Я.Ермакова, Р.С.Скулкова, О.А.Волкова. Издание 8-е. М.: ООО «Книжный дом ЛОКУС», 2000.

References:

1. Berdymammedov G. *Lekarstvennyye rastenija Turkmenistana*. Ashgabat, 2009. Tom 1-3.

2. Abdullaev A.K., Pendzhiev A.M. *Primenenie proteoliticheskikh fermentov papaji v lechenii gnojnyh ran* // *Zdravooxranenie Turkmenistana*. 1998. №4.

3. Abdullaev A., Pendzhiev A.M. *Sredstvo i sposob jeneral'nogo lechenija gnojnyh infekcij: Avtrskoe svidetel'sto na izobretenie patent Turkmenistana № 529*. 2012.

4. Abdullaev A., Pendzhiev A.M. *Sposob lechenija vospalenija zhelezistyh organov. Avtorskoe svidetel'sto na izobretenie patent Turkmenistana № 529*. 2012.

5. Abdullaev A.K., Pendzhiev A.M. *Primenenie proteoliticheskikh fermentov papaji v lechenii gnojnyh ran* // *Zdravooxranenie Turkmenistana*. 1998. №4.

6. Anikina O.M., Semashko T.A., Oksenojt E.S., Lysogorskaja E.N., Filippova I.Ju. *Subtilizin Karlsberg, nativnyj i modifirovannyj, jeffektivnyj katalizator sinteza peptidnoj svjazi v organicheskoj srede* // *Bioorganicheskaja himija*. 2006. T. 32. № 2. S. 116–121.

7. Semashko T.A., Lysogorskaja E.N., Oksenojt E.S., Bacheva A.V., Filippova I.Ju. *Himiko*

jenzimatičeskij sintez novyh fluorogennyh substratov cisteinovyh proteinaz semejstva papaina // Bioorganičeskaja himija. 2008. T. 34. № 3. S. 376-381.

8. Belyaeva A.V., Semashko T.A., Lysogorskaya E.N., Lozinsky V.I., Filippova I.Yu. Enzymatic synthesis of high specific substrate for cysteine proteases assay // Proceedings of the 29th European Peptide Symposium. Gdansk, 2006. p. 0319.

9. Semashko T., Popletaeva S., Oksenoit E., Lysogorskaya E., Filippova I. New selective substrates for detection of cysteine proteinases // Proceedings of the 30th European Peptide Symposium. Helsinki, 2008. p. 468-469.

10. Semashko T.A., Lysogorskaja E.N., Filippova I.Ju. Novye fluorogennye sub-straty papaina // Četvertyj moskovskij mezhdunarodnyj kongress «Biotehnologija: sostojanie i perspektivy razvitija». Ch. 2. Moskva, 2007. S. 303.

11. Semashko T.A., Lysogorskaya E.N., Filippova I.Yu. Synthesis of substrates for cysteine proteinases catalyzed by immobilized enzymes // 2nd International Conference "Biocatalysis in Non-Conventional Media". Moscow, 2008. p. 49.

12. Semashko T.A., Lysogorskaya E.N., Bacheva A.V., Lozinsky V.I., Filippova I.Yu. Stable Biocatalysts Based on Proteases Immobilized on Poly(vinyl alcohol) Cryogel for Peptide Bond Formation // 8th International Conference on Protein Stabilisation. Graz, 2009. p. 73.

13. Semashko T.A., Oksenojt E.S., Lysogorskaja E.N., Bacheva A.V., Filippova I.Ju. Biokatalitičeskaja shema sinteza peptidnyh substratov proteaz // Pjatyj Moskovskij mezhdunarodnyj kongress «Biotehnologija: sostojanie i perspektivy razvitija». M., 2009. T. 2. S. 308.

14. Semashko T.A. Predskazanie substratnoj specifichnosti cisteinovyh peptidaz semejstva S1 // XVI Mezhdunarodnaja konferencija studentov, aspirantov i molodyh uchènyh «Lomonosov». M.: MAKS Press, 2009. S. 23.

15. Semashko T.A., Popletaeva S.B., Babkin P.A., Goptar' I.A., Filippova I.Ju., Jelpidina E.N. Poisk proteinaz, sposobnyh rasshhepljat' trudnogidrolizuemye peptidy gliadina // IV Rossijskij simpozium «Belki i peptidy». Kazan', 2009. S. 380.

16. Pendzhiev A.M. Agrotehnika vyrashhivanija dynnogo dereva (Carica papaya L.) v uslovijah zashhishhennogo grunta v Turkmenistane: Avtoref. diss. ... dokt. sel'skohozjajstv. Nauk. M, 2000. 54 s.

17. Pendzhiev A.M. Primenenie proteoliticheskih jenzimov papaji (Carica papaya L.) v medicinskoj praktike // Himiko-farmaceutičeskij zhurnal. 2002. №6.

18. Pendzhiev A.M. Primenenie otechestvennyh proteolitičeskich jenzimov rasti-tel'nogo prois- hozhdenija v medicinskoj praktik // Saglyk syýasaty- Serdar Sahawaty. Ash-habat, 2000.

19. Pendzhiev A.M. Poluchenie otechestvennyh proteoliticheskih fermentov iz plodov papaji dlja primenenija v kliničeskoj medicine // Zdravoohranenie Turkmenistana. 1997. №1. S. 27-

20. Penzhiev A.M. The technology of growing the papaya (Carica papaya) under conditions of arid zone // Problems of desert development. 1997. №2.

21. Penzhiev A.M. Ecoenergy resources of greenhouse facilities in the arid zone // Problems of desert development. 1998. №5.

22. Semashko T.A., Popletaeva S.B., Filippova I.Yu., Elpidina E.N. Digestive cysteine cathepsins against celiac disease // 9th Young Scientist Forum and 34th FEBS Congress.

23. Lekarstvennyye sredstva: Spravochnik / pod redakciej M.A.Kljueva, V.Ja.Ermakova, R.S.Skulkova, O.A.Volkova. Izdanie 8-e.