

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИНГИБИТОРОВ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ ИЗ ЭНДОФИТНЫХ ГРИБОВ *TARAXACUM OFFICINALE****М.М. Йулдошева**ПРЕПОДАВАТЕЛЬ КАФЕДРЫ МЕДИЦИНА**МЕДИЦИНСКОГО ФАКУЛЬТЕТА УНИВЕРСИТЕТА АЛЬФРАГАНУС**E-mail: [maftuna91\\_05@mail.ru](mailto:maftuna91_05@mail.ru)*

**Цель исследования.** Изучить ингибиторную активность вторичных метаболитов эндофитных грибов в отношении панкреатической липазы поджелудочной железы, гидролизующей жир в желудочно-кишечном тракте.

**Актуальность.** Ожирение - является растущей серьезной проблемой здравоохранения во всем мире. Это сложное многофакторное заболевание, характеризующееся избыточным накоплением жировой ткани в пересчете на соотношение индекса массы тела  $30 \text{ кг/м}^2$  и выше. Ожирение возникает из-за дисбаланса между потребляемыми и используемыми калориями. Двумя основными причинами избыточного веса и ожирения являются: а) повышенное потребление высококалорийных продуктов с высокой концентрацией жиров, солей и сахаров; б) снижение физической активности, сидячие формы работы и растущая урбанизация [1].

Глобальная тенденция увеличения числа людей, страдающих ожирением, вызывает тревогу. В 2005 году более 400 миллионов человек страдали ожирением, которое, как ожидается, к 2030 году достигнет миллиарда [2]. Во всем мире каждые шесть смертей из десяти происходят из-за ожирение, поэтому оно рассматривается как заболевание, требующее медикаментозной терапии.

Орлистат (тетрагидролипостатин (ТНЛ)) - первый и единственный препарат, представляет собой новый фармакологический класс, который ограничивает всасывание триглицеридов. У него много побочных эффектов, таких как стеаторея (жирный/жидкий стул), боль в животе, диарея, выделения из кала, вздутие живота и некоторые эффекты токсичности для печени [3].

Многие ингибиторы ферментов, включая ингибиторы липазы поджелудочной железы (PL), используемые в качестве лекарств от ожирения, также могут быть получены из природных источников.

Эндофитные грибы представляют собой чрезвычайно разнообразную группу микроорганизмов, повсеместно существующих в тканях растений, включая деревья, травы и травы, без каких-либо явных признаков их присутствия или существования. Считается, что эндофитные грибы играют значительную роль в ассоциации растений-хозяев при биотических и абиотических стрессах. Исследования, основанные на эндофитных природных продуктах, могут

оказаться ключевыми в разработке лекарств против такого рода проблем со здоровьем. [4,5].

Эндифиты вносят большой вклад в процесс открытия и разработки лекарственных средств, поскольку они продуцируют натуральные продукты, обладающие разнообразными новыми химическими структурами и биологической активностью[6].

**Материалы и методы. Выделение эндифитов грибов.** Выделение эндифитных грибов проводили по Nazalin et al. [7] из корней, стеблей, листьев и соцветий собранных растений. После предварительной обработки 70% этанолом в течение 1 минуты, затем на 3 минуты в 0,1% NaOCl, затем в 30% этанол на 30 секунд и промывали стерильной водой. Каждый сегмент растения асептически измельчали на кусочки размером не более 0,5 см и помещали на чашки Петри с агаризованной средой Чапека-Докса, содержащей хлортетрациклин в концентрации 50 мг/мл и сульфат стрептомицина в концентрации 250 мг/мл для подавления роста бактериальной микрофлоры. Чашки инкубировали в течении 7-14 дней при температуре 28<sup>0</sup>C. Отдельные колонии эндифитов, выросшие после инкубации, отбирали с помощью тонкой иглы, переносили в пробирки с агаром и инкубировали при 28<sup>0</sup>C в течение семи дней.

В качестве контроля использовали среду Чапека-Докса с антибиотиком. Хранение культур грибов - эндифитов осуществляется периодическим пересевом на косячки со средой Чапека-Докса. Все изоляты хранятся в холодильнике при температуре +4<sup>0</sup>C.

**Культивирование эндифитов.** Для накопления биомассы для дальнейшего извлечения и определения биологической активности эндифиты выращивали методом глубинной ферментации в колбах на орбитальном шейкере при 120 об/мин в течение 7 дней при 28<sup>0</sup>C. По истечении времени культивирования биомассу отделяли от ферментационной жидкости центрифугированием при 4000 об/мин в течение 15 минут.

**Экстракция вторичных метаболитов из биомассы грибов-эндифитов.** Экстракцию вторичных метаболитов из биомассы грибов-эндифитов проводили по Lang et al. с модификациями Nazalin et al [7]. Для этого 5 г биомассы гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера, переносили в коническую колбу, и дважды экстрагировали, согласно методике, этилацетатом, из расчета 25 мл экстрагента на 5 мг сырой гомогенизированной биомассы в течение 24 часов на круговой качалке при комнатной температуре. Затем смесь отфильтровывали через бумажный фильтр (ватман бумага №1) и добавляли Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> из расчета 40 мкг/мл для удаления водного слоя. Далее смесь упаривали досуха на роторном испарителе и добавляли 1 мл диметилсульфоксида. Полученный экстракт использовали как маточный раствор и хранили при температуре +4<sup>0</sup>C.

**Определение ингибирования ПЛ спектрофотометрическим методом.** 50 мг липазы поджелудочной железы свиньи суспендировали в 10 мл трис-NaCl буфера (содержащего 2,5 ммольтрис и 2,5 ммоль NaCl, pH доведен до 7,4 с помощью HCl). Раствор подвергали интенсивному встряхиванию в течение 15 мин с последующим центрифугированием (4000 об/мин, в течение 10 мин). Супернатант собирали и снова использовали в качестве раствора фермента. Исходные растворы экстрактов и Ксеникала готовили в ДМСО с концентрациями 10 мг/мл. Конечная реакционная смесь состояла из 875 мкл буфера, 100 мкл фермента и 20 мкл экстракта, предварительно инкубированных в течение 5 мин при 37 ° С с последующим добавлением 10 мкл субстрата (4-нитрофенилпальмитат 10 мМ в ацетонитриле). Оптическую плотность конечной смеси измеряли на спектрофотометре SPECOL - 1300 при длине волны 405 нм через 5 минут [8]. Анализ проводили в трех экземплярах и процент ингибирования рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ Ингибирование ПЛ} = [(A_e - A_t) / A_e] \times 100,$$

где  $A_e$  - это оптическая плотность ферментного контроля (без ингибитора),  $A_t$  - разница между оптической плотностью исследуемого образца с субстратом и без него.

**Результаты.** В настоящее время ряд растений, произрастающих в Узбекистане, уже исследован на предмет эндофитов, но это первое сообщение о потенциале местных штаммов эндофитных грибов против ожирения. Одуванчик лекарственный-употребляют для лечения гепатита, холецистита, жёлчнокаменной болезни, желтухи, гастрита, колита, цистита, для улучшения аппетита и пищеварения, при запоре, метеоризме, а также в качестве противоожиренная средства.

*Taraxacum officinale* произрастающих в Узбекистане, было выделено всего 19 эндофитных грибных изолятов. Так, из всех исследованных частей растений эндофитов выделено из корней – 6, из листьев получено - 6 изолятов и из соцветия – 7 соответственно. Экстракт каждого изолята был протестирован на ингибирование панкреатической липазы спектрофотометрическим методом с использованием р-нитрофенилпальмитата в качестве субстрата [9]. У этих экстрактов была обнаружена ингибирующая активность ПЛ в пределах 20%-73%. Только 4 экстрактов показали высокие результаты по ингибированию ПЛ и подтвердили  $IC_{50}$  ингибирующую активность с помощью ферментативного анализа спектроскопическим методом.

**Выводы.** Совокупный анализ полученных данных показывает, что метаболиты, обладающие способностью ингибировать панкреатическую липазу на уровне ксеникала (более 72%), синтезируют эндофиты выделенные из местных, лекарственных растений *Taraxacum officinale*.

Приведенные выше результаты ясно показывают, что ТО7L (IC<sub>50</sub>=10 мкг/мл) и ТО8L (IC<sub>50</sub>=5,7 мкг/мл), выделенный из листьев *Taraxacum officinale*, обладает потенциальной панкреатической ингибирующей активностью *in vitro*. Культуры ТО1R (IC<sub>50</sub>=940 мкг/мл), выделенные из корней и ТО12L (IC<sub>50</sub>=2420 мкг/мл) выделенные из листьев, *Taraxacum officinale*, также обладают ингибирующей активностью, но больше, чем ТО7L и ТО8L. По сравнению единственного одобренного FDA препарата Орлистат (IC<sub>50</sub>=36,7 мкг/мл). Таким образом, эти результаты явно подтверждают гипотезу о подражании свойствам растения-хозяина *Taraxacum officinale* против ожирения эндофитным видам *Aspergillus*. Следовательно, между хозяином и эндофитными грибами существуют симбиотические отношения.

### Список литературы

1. Всемирная организация здравоохранения (2021) Ожирение и избыточный вес
2. Kelly, T., Yang, W., Chen, C.S., Reynolds, K. and He, J. (2008) Global Burden of Obesity in 2005 and Projections to 2030. *International Journal of Obesity*, 32, 1431-1437.
3. Singh R, Gupta N, Goswami V, Gupta R (2006) A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Appl Microbiol Biotechnol* 6: 679–682
4. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P (2010) Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers* 41(1):1–16
5. Samanta S., Ghosh S., Mandal N.C. (2021) Endophytic Fungi: A Source of Novel Pharmaceutical Compounds. In: Patil R.H., Maheshwari V.L. (eds) *Endophytes*. Springer, Singapore.
6. Gupta S., Chaturvedi P., Kulkarni M., van Staden J. A critical review on exploiting [the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi](https://doi.org/10.1007/s12042-019-00000-0). *Biotechnol. Advances* 39:107462,2019
7. Hazalin, N.A., Ramasamy, K., Lim, S.M., Wahab, I.A., Cole, A.Lj, Majeed, A.A. 2009. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and alternative medicine*, 9: 46.
8. Bustanji Y, Al-Masri IM, Mohammad M, Hudaib M, Tawaha K, Tarazi H, AlKhatib HS. Pancreatic lipase inhibition activity of trilactone terpenes of *Ginkgo biloba*. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2011;26:453–9.
9. M. Katoch, A. Paul, G. Singh and S. N. C. Sridhar . Fungal endophytes associated with *Viola odorata* Linn. as bioresource for pancreatic lipase inhibitors. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2017) 17:385