

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОТЕСТ-СИСТЕМЫ *IN VITRO* В ОЦЕНКЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ БИОМАССЫ КУЛЬТУР КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

В.А. Дубинская

к.б.н., вед. науч. сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: fova@dubinsky.in

В.А. Быков

академик РАН, гл. науч. сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Продемонстрированы возможности применения молекулярных биотест-систем, разработанных в НИЦ БМТ ВИЛАР, для оценки наличия биологически активных веществ, их предшественников и метаболитов как в нативных растениях, так и в культурах изолированных клеток. Показано, что метод, основанный на применении биотест-систем *in vitro* молекулярного уровня, является средством выявления качественной и количественной оценки наличия биологически активных веществ, их предшественников и спутников.

Ключевые слова: культуры клеток растений женьшеня, родиолы розовой, унгернии Виктора, арники горной, биотест-системы, глутатионредуктаза, каталаза.

Одной из задач биотехнологии является ферментационное получение биомассы изолированных клеток растений и оценка их прежде всего фармакологической активности. В длительно перерываемых клеточных культурах происходят изменения в интегрированной биорегуляции и синтезе вторичных метаболитов [1], поэтому становится актуальной оптимизация оценки итогов изменений с использованием биотест-систем молекулярного уровня.

Цель исследования – показать перспективность применения биотест-систем в актуализации процесса доклинического изучения фитосубстанций и собственно фитопрепаратов, а в перспективе совершенствования разрешительной системы.

Рассмотрены биотест-системы, разработанные во Всероссийском научно-исследовательском институте лекарственных и ароматических растений (ФГБНУ ВИЛАР) (патенты РФ №№ 2181890, 2181891, 2181892).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были выбраны клеточные линии, используемые в качестве сырья, и фитопрепараты на их основе, обладающие различной направленностью фармакологического действия: женьшень (штамм БИО – 2, линия БИО-3), родиола розовая, унгерния Виктора (штамм У-1) и

арники горная (линия АГ). Штаммы этих линий и технология их получения разработаны в НИЦ БМТ ФГБНУ ВИЛАР И.В. Александровой [2].

В качестве биотест-систем молекулярного уровня использованы ферменты глутатионредуктазы (ГР) и каталазы (КАТ). Активность ГР и КАТ определяли описанными ранее методами [3, 4] в модификации НИЦ БМТ ВИЛАР. Концентрация ГР в пробе составляла 1 мкг/мл. Реакцию запускали добавлением НАДФН, убыль которого регистрировали спектрометрически при 340 нм. Скорость ГР-реакции выражали в наномолях окисленного НАДФ в минуту на миллиграмм белка при 22 °С, используя коэффициент экстинкции 6,22 мМ⁻¹см⁻¹.

Концентрация КАТ в пробе – 0,5 мкг/мл. Ее активность определяли при длине волны 410 нм и выражали в микромолях H₂O₂/мин·мг белка с учетом коэффициента экстинкции, равного 22 М⁻¹см⁻¹.

Контроль без добавления изучаемого вещества принят за 100%. Изучаемые вещества вносили в пробу в конечной концентрации 0,01–1,0 мг/мл. На диаграммах представлены статистически обработанные пятикратные повторности и выведенные средние значения активности ферментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены сравнительные данные по влиянию препаратов, полученных из куль-

туры клеток женьшеня (штамм БИО-2 и БИО-3), фракции панаксазидов, выделенной из культуры



Рис. 1. Влияние препаратов из культуры ткани женьшеня на скорость реакции ферментов антиоксидантной защиты *in vitro*: 1 – контроль; 2 – БИО-2; 3 – БИО-3; 4 – сухой клеточный сок (СКС-2); 5 – настойка водно-спиртовая; 6 – упаренная настойка; 7 – панаксазиды; 8 – настойка из природного корня женьшеня



Рис. 2. Влияние продуктов из биомассы родиолы розовой на водно-спиртовой основе на активность ферментов КАТ и ГР: 1 – контроль; 2 – настойка сухой биомассы на 20%-ном этиловом спирте; 3 – густой экстракт на настойке 20%-ного этилового спирта; 4 – триандрин; 5 – полисахариды из шрота

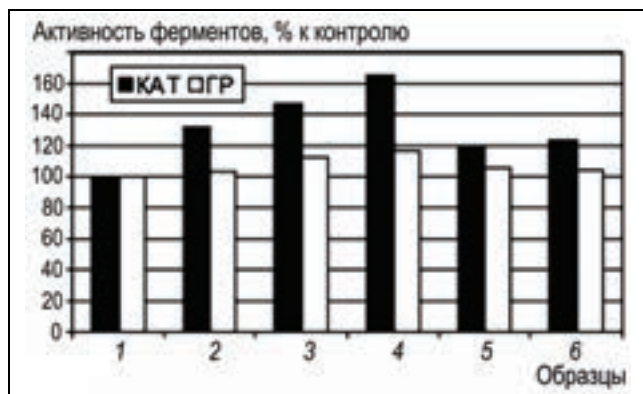


Рис. 3. Влияние продуктов из биомассы родиолы розовой на водной основе на активность ГР и КАТ: 1 – контроль; 2 – водный настой сырой биомассы; 3 – водный настой сухой биомассы; 4 – сухой клеточный сок; 5 – триандрин; 6 – полисахариды из шрота от настойки на 20%-ном этаноле

ткани женьшеня и 30%-ной спиртовой настойки корейского корня женьшеня на скорость реакций ферментов антиоксидантной защиты ГР и КАТ. Женьшень был выбран в связи с тем, что он имеется и в нативном растении, и в культуре клеток.

Все изученные препараты женьшеня являются активаторами ГР-реакции при одновременном ингибировании КАТ реакции. Сухой клеточный сок, не содержащий в своем составе клеточных мембран, также увеличивает скорость ГР-реакции, однако в несколько меньшей степени, чем гомогенат сырой биомассы. Активация фермента происходила и при добавлении в пробу спиртовой настойки природного корня женьшеня и полученного методом перколяции из биомассы культуры клеток. Как и предполагалось, наибольшей активностью обладает суммарная фракция панаксазидов. При концентрации 0,01 мг в 1 мл пробы панаксазиды увеличивают скорость ГР-реакции по сравнению с контролем на 148,5 %.

Каталаза, разрушающая H₂O₂ в клетке и являющаяся очень важным ферментом для поддержания клеточной целостности, в результате воздействия на нее препаратов из культуры клеток женьшеня ингибируется. Известно, что токсичность гидроперекиси для клетки вызывается либо истощением тиолов (преимущественно в пентозном цикле), либо блокированием восстановленного глутатиона, связанным с ингибированием ГР [5].

На рис. 2 представлены данные активности ГР и КАТ при действии препаратов родиолы розовой, водно-спиртовых настоек сухой биомассы и сухого клеточного сока, а также триандрина и полисахаридной фракции, выделенных из культуры клеток родиолы розовой.

Активирование ГР характерно для адаптогенов [3]. А повышение скорости КАТ-реакции свидетельствует о наличии антиоксидантных свойств [5], что особенно проявляется и при воздействии на инкубационную пробу продуктов родиолы розовой на водной основе (рис. 3).

Упомянутые препараты активируют главным образом каталазную реакцию, т.е. являются преимущественно активаторами антиоксидантных ферментов.

Наиболее активны в этой группе водный настой сухой биомассы, сухой клеточный сок и водный настой шрота от водной настойки на 20%-ном этаноле, которые в концентрации 0,15 мг/мл увеличивают скорость каталазной реакции на 53,1; 65,4 и 51,8% соответственно.

Главными действующими веществами в корневище родиолы розовой являются фенольные соединения, в частности, спирт тирозол и его глюкозид – салидрозид, а также фенилпропаноиды – розин, розавин и розарин [12]. Именно по наличию этих компонентов в препаратах из корневищ родиолы розовой судят об их качестве. Однако в исследуемой культуре биородиолы розовой отсутствовали эти компоненты. Исследование химического состава биомассы «биородиолы» показало, что состав биологически активных веществ (БАВ) в ней качественно отличается от состава интактного растения.

Из биомассы «биородиолы» было выделено и идентифицировано 13 соединений, из них 9 веществ относятся к фенилпропаноидам. Одним из основных компонентов биомассы является фенилпропаноид – триандрин. Были также выделены лигнаны, β-ситостерин и его гликозид – даукостерин. Однако, несмотря на существенные различия в составе БАВ «биородиолы» и нативных корневищ растения, доклинические испытания показали [6], что продукты из биомассы «биородиолы» повышали общую физическую выносливость, проявляли антигипоксическое действие и ускоряли процессы восстановления при физических и стрессорных нагрузках, т.е. обладали свойствами, характерными для адаптогенов.

На рис. 4 представлены диаграммы, соответствующие скорости реакций ГР и КАТ при воздействии препаратов из культуры клеток унгернии Виктора.

Все препараты в разной степени активируют фермент ГР: более чем на 34% по сравнению с контролем возрастает активность фермента при воздействии гомогената сырой биомассы, сильным активатором ГР является и сухая биомасса. Наибольшее возрастание скорости ГТ-реакции вызывает спиртовая и выпаренная настойки. Особенно это относится к фракции II, которая представляет собой продукт вторичной спиртовой экстракции исходной биомассы и содержит меньшее количество экстрактивных веществ. Сравнительное изучение биологической активности обеих фракций показывает, что фракция II в концентрации 0,01 мг/мл увеличивает скорость ферментативной реакции на 155%, в то время как наибольшая активность ГР при воздействии фракции I (120%) отмечается при концентрации 0,1 мг/мл.

Аналогично препаратам женьшеня и водно-спиртовым экстрактам биородиолы, препараты культуры ткани унгернии Виктора ингибируют

фермент КАТ, что в сочетании с активацией ГР служит показателем наличия свойств адаптогенов.

Активация фермента ГР при скрининге биологически активных веществ *in vitro* является показателем адаптогенного действия изучаемых веществ. Препараты из культуры ткани унгернии Виктора активируют ГР даже в большей степени, чем препараты из культуры ткани женьшеня – общепринятого адаптогена. На основании ГР-теста можно фиксировать у препаратов из культуры ткани унгернии Виктора наличие адаптогенной активности.

В отличие от вышеописанных культур препараты из арники горной ингибируют ГР и КАТ (рис. 5). Учитывая установленную ранее корреляцию ингибирования *in vitro* ферментов антиоксидантной защиты с противомикробным действием лекарственных средств, можно предположительно считать, что препараты из культуры клеток арники горной обладают противомикробными свойствами.

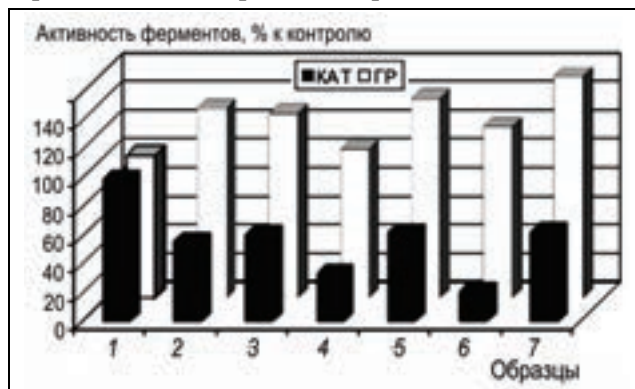


Рис. 4. Влияние препаратов из культуры ткани унгернии Виктора на скорость ферментов антиоксидантной защиты *in vitro*: 1 – контроль; 2 – сырая биомасса; 3 – сухая биомасса; 4 – настойка фракции I; 5 – настойка фракции II; 6 – упаренная настойка фракции I; 7 – упаренная настойка фракции II



Рис. 5. Ингибирование ГР и КАТ в условиях *in vitro* препаратами из культуры ткани арники горной: 1 – контроль; 2 – сырая биомасса; 3 – сухая биомасса; 4 – спиртовая настойка; 5 – упаренная настойка

Таким образом, изменение активности антиоксидантных ферментов ГР и КАТ может служить показателем антиоксидантных, адаптогенных и противомикробных свойств изучаемых препаратов различного происхождения и способных являться ориентировочной основой для дальнейшего изучения их с помощью методов, регламентированных Государственной фармакопеей.

ВЫВОДЫ

1. Молекулярные биотест-системы позволяют определить направленность фармакологической активности препаратов культур изолированных клеток, тканей и органов растений с высокой скоростью, достоверностью и экономичностью, а также прогнозировать в известной степени механизм действия и метаболизма.
2. В процессе эксперимента установлено наличие ранее не выявленной фармакологической активности в препаратах растений, а, следова-

тельно, и возможных предшественников БАВ, перспективных для фармацевтических целей.

3. Подтверждена перспективность биотест-систем для доклинического изучения субстанций и лекарств в интересах ее удешевления и сокращения сроков проведения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Plant metabolomics. Methods and protocols / N.W. Hardy, R.D. Hall (Ed.) 2012. Humana Press. 340 p.
2. Патент № 1735756 (РФ). Штамм культивируемых клеток растений *Rhodiola rosea* – продуцент фенольных соединений адаптогенов / И.В. Александрова, А.Н. Данилина. 1990.
3. Beutler E. Red cell metabolism / Ed. E. Beutler, C. Livingstone. 1986. P. 69–71.
4. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарева В.Е. // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16–19.
5. Collagete S.M., Molyneax R.J. Bioactive natural products. Detection, isolation and structural determination. Second edition. CRC Press, Taylor Francis Group. 2007. 624 p.
6. Куркин В.А., Заресочная Г.Г., Дубичева А.Г., Воронцов Е.Д., Александрова И.В., Панова Р.В. Фенилпропаноиды каллусной культуры *Rhodiola rosea* // Химия природных соединений. 1991. № 4. С. 481–490.

Поступила 24 октября 2017 г.

MOLECULAR TEST SYSTEMS *IN VITRO* IN EVALUATION OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF PLANT CELL BIOMASS

© V.A. Dubinskaya, V.A. Bykov, 2018

V.A. Dubinskaya

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: va@dubinsky.info

V.A. Bykov

Academician of RAS, Chief Research Scientist,
All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

Native herbs and cellular cultures, which were grown based on them and are in dedifferentiated state, often differ in synthesis of secondary metabolites, that causes a decrease or complete disappearance of the major active ingredients distinctive for native herbs. However, changing the metabolome of cellular cultures does not always mean the absence of the desired pharmacological activities inherent to a native herb. Cells of a transplanted culture could accumulate not less active isomers or different metabolites with the same direction of pharmacologic effect. The molecular test systems *in vitro* allows to detect the presence of active substances and to understand the difference between cellular and native bioregulation of herbs.

Key words: *plant cellular cultures, Panax, Rhodiola rosea, Ungernia victoris, Arnica montana, test systems in vitro, glutation reductase, catalase.*

REFERENCES

1. Plant metabolomics. Methods and protocols / N.W. Hardy, R.D. Hall (Ed.) 2012. Humana Press. 340 p.
2. Patent № 1735756 (RF). Shtamm kull'tiviruemykh kletok rastenij *Rhodiola rosea* – producent fenol'nyh soedinenij adaptogenov / I.V. Aleksandrova, A.N. Danilina. 1990.
3. Beutler E. Red cell metabolism / Ed. E. Beutler, C. Livingstone. 1986. P. 69–71.
4. Koroljuk M.A., Ivanova L.I., Majorova I.G., Tokareva V.E. // Laboratornoe delo. 1988. № 1. S. 16–19.
5. Collagete S.M., Molyneax R.J. Bioactive natural products. Detection, isolation and structural determination. Second edition. CRC Press, Taylor Francis Group. 2007. 624 p.
6. Kurkin V.A., Zapesochnaja G.G., Dubicheva A.G., Voroncov E.D., Aleksandrova I.V., Panova R.V. Fenilpropanoidy kallusnoj kultury *Rhodiola rosea* // Himija prirodnyh soedinenij. 1991. № 4. S. 481–490.