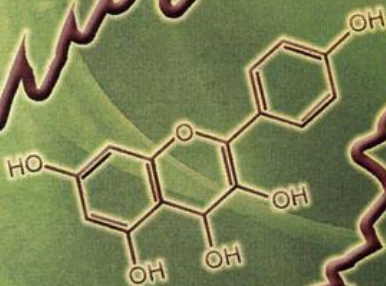


РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ:

**ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ**

**МАТЕРИАЛЫ ДОКЛАДОВ
VIII МЕЖДУНАРОДНОГО СИМПОЗИУМА**



Москва
2-5 октября
2012 года

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК

Отделение биологических наук РАН
Российский фонд фундаментальных исследований
Научный совет по физиологии растений и фотосинтезу РАН
Общество физиологов растений России
ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

МАТЕРИАЛЫ ДОКЛАДОВ VIII МЕЖДУНАРОДНОГО СИМПОЗИУМА

Москва, 2-5 октября 2012 года

Москва
2012

УДК 581.198; 542.943
ББК 28.072
Ф-42



*Издается по решению
Ученого совета ИФР РАН*

Проведение VIII Международного Симпозиума «
Фенольные соединения: фундаментальные и
прикладные аспекты» проводится при финансовой
поддержке Российского фонда фундаментальных
исследований (грант № 12-04-06091-г)

Редакционная коллегия:

Н.В. Загоскина, Н.А. Тюкавкина, Е.Б. Бурлакова, П.В. Лапшин

Ф-42 Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: [Текст]: материалы докладов VIII Международного симпозиума. Москва, 2-5 октября 2012 г.) / Отв. ред. Н.В.Загоскина – М. : ИФР РАН; РУДН, 2012 – 721 с.

В сборнике представлены материалы докладов VIII Международного Симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2-5 октября 2012 г.). Отражены основные достижения в области изучения фенольных соединений, их структуры, биологической активности, распространения и функциональной роли в высших растениях, биосинтеза различных соединений фенольной природы и его изменений при стрессовых воздействиях.

Рассматриваются вопросы по про- и антиоксидантной активности фенольных соединений, их участия в свободнорадикальных процессах, защите от окислительного стресса. Значительное внимание уделено практическому использованию фенольных соединений в фармакологии и медицине.

Для широкого круга специалистов в области биоорганической химии, физико-химической биологии, физиологии и биохимии растений, экологии и фармакогнозии.

Материалы публикуются в авторской редакции с согласия авторов.

ISBN 978-5-209-04571-7

УДК 581.198; 542.943
ББК 28.072

© Коллектив авторов, 2012 г.

© ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 2012 г.

© Российский университет дружбы народов, Издательство, 2012

ОРГАНИЗАЦИОННЫЙ КОМИТЕТ

- Загоскина Н.В.**, д.б.н., проф. (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва) – **председатель**
- Тюкавкина Н.А.**, д.х.н., проф. (Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва) – **сопредседатель**
- Булгаков В.П.**, д.б.н., член-корр. РАН (Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток)
- Бурлакова Е.Б.**, д.б.н., проф. (Институт биохимической физики им. Н.М. Эммануэля, Москва)
- Ванюшин Б.Ф.**, д.б.н., член-корр. РАН (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва)
- Куркин В.А.**, д.б.н., проф. (Самарский государственный медицинский университет, Самара)
- Ламан Н.А.**, д.б.н., академик НАН Беларуси (Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, Минск, Беларусь)
- Литвиненко В.И.**, д.х.н., проф. (Государственный научный центр лекарственных средств, Харьков, Украина)
- Лобакова Е.С.**, д.б.н., проф. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва)
- Маргна У.В.**, д.б.н., академик Эстонской АН (Таллинн, Эстония)
- Миронов В.Ф.**, д.б.н., член-корр. РАН (Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН, Казань)
- Мошков И.Е.**, д.б.н. (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва)
- Нифантьев Э.Е.**, д.х.н., член-корр. РАН (Московский государственный педагогический университет, Москва)
- Носов А.В.**, д.б.н. (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва)
- Носов А.М.**, д.б.н., проф. (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва)
- Осипов В.И.**, д.б.н. (Университет Турку, Турку, Финляндия)
- Шакирова Ф.М.**, д.б.н., проф. (Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа)
- Лапшин П.В.**, к.б.н. (Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва) – **ученый секретарь**

ПРОГРАММНЫЙ И ОРГАНИЗАЦИОННО-ТЕХНИЧЕСКИЙ КОМИТЕТ

Загоскина Н.В., д.б.н., проф.	Нечаева Т.Л.
Тюкавкина Н.А., д.х.н., проф.	Николаева Т.Н.
Бурлакова Е.Б., д.б.н., проф.	Прядехина Е.В.
Носов А.М., д.б.н., проф.	Гончарук Е.А., к.б.н.
Мошков И.Е., д.б.н.	Астахова Н.В.
Лапшин П.В., к.б.н.	Алиева Г.П.

Фенольные соединения являются уникальными вторичными метаболитами, синтезирующимися практически во всех растительных клетках, проявляющих высокую биологическую активность и благодаря своим свойствам находящих все более широкое практическое применение в фармакологии и медицине.

Важнейшим разделом современной физиологии и биохимии растений является изучение биохимических аспектов фенольного метаболизма. Именно фундаментальные исследования этого процесса позволили достичь значительных успехов в получении различных медицинских препаратов, в том числе столь широко и успешно используемого в России и за ее пределами дигидрокверцетина.

Несмотря на все эти успехи до сих пор остается «неразгаданной» функциональная значимость огромного разнообразия синтезируемых растениями фенольных соединений.

В настоящем сборнике представлены материалы докладов как ведущих, так и молодых ученых, аспирантов и студентов, по основным направлениям физиологии и биохимии фенольного метаболизма, химии фенольных соединений, биологической активности этих веществ, а также медико-биологическим и технологическим аспектам применения полифенолов.

Мы искренне надеемся, что эти материалы позволят оценить уровень и состояние фундаментальных и прикладных исследований в области фенольного метаболизма, а также определить наиболее значимые и перспективные направления для дальнейших исследований.

РАЗДЕЛ 1.

**ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ
АКТИВНОСТЬ
(СТРУКТУРА, РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ, ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА)**

**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД УСТАНОВЛЕНИЯ
СТРУКТУР НОВЫХ ЭЛЛАГОТАННИНОВ СЕМ.
*EUPHORBACEAE***

**Абдулладжанова Н.Г., Мавлянов С.М., Зиявитдинов Ж.Ф.,
Салихов Ш.И.**

Институт биоорганической химии Академии наук Республики Узбекистан,
Ташкент, Узбекистан, тел.: (8371) 262-35-40, e-mail: ibchem@uzsci.net

Среди важнейших классов природных соединений, обуславливающих лечебный эффект лекарственных растений, значительное место занимают полифенолы. Широкий спектр биологического действия и малая токсичность ставят их в ряд перспективных в этом плане соединений. Поэтому поиск растений, содержащих полифенолы, разработка методов их выделения, установление их химической структуры и изучение зависимости биологической активности от химической структуры с целью создания новых эффективных лекарственных средств является важной и актуальной проблемой современной биоорганической химии.

Эллаготаннины (сложные эфиры эллаговой кислоты и сахаров) - самые многочисленные растительные полифенолы среди гидролизуемых танинов. К настоящему времени выделено и установлено строение более 700 индивидуальных соединений. Эллаготаннины обладают широким спектром биологической активности, из которых самыми важными являются противовирусное, противоопухолевое и иммуномодулирующее. Фактически, развитие химии эллаготаннинов за прошлые десятилетия превращает их из самого недооцениваемого класса танинов растений в один из самых перспективных. За последние 50 лет выделено и установлено строение более чем 500 эллаготаннинов, многие из которых входили в состав традиционных травяных лекарств. Последние достижения в области ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии позволили идентифицировать смеси танинов с разной молекулярной массой и степенью галлоилизацией. Кроме того, эти методы идеально подходят для характеристики полидиссвязанных олигомеров [1] и считаются наиболее подходящими методами для анализа танинов, обладающих большой структурной неоднородностью [2].

Исследования, проводимые в Институте биоорганической химии АН РУз, показали перспективность использования природных фенольных соединений как противовирусных,

антиоксидантных, противоопухолевых агентов [3-4]. Оказалось, что эти соединения обладают высокой биологической активностью, которая проявляется в подавлении активности разных вирусных инфекций, окислительно-восстановительных ферментов и др. Кроме того, природные полифенолы обладают противоспидовым действием [5].

Исходя из этого, нами были изучены полифенолы 30 видов рода *Euphorbia* [6-8]. Из исследованных видов растений было выделено более 70 фенольных соединений и установлено их химическое строение, а также выявлена биологическая активность некоторых из них. В процессе изучения фенольных соединений рода *Euphorbia* установлено, что ряд из них являются новыми, ранее не описанными в литературе веществами. С помощью физико-химических и спектральных данных установлены структуры этих соединений. По ранее отработанной методике [6-7], высушенные подземные органы растений обрабатывали хлороформом, водным ацетоном, экстрагировали диэтиловым эфиром, этилацетатом. С помощью колоночной хроматографии в системах различных растворителей из этилацетатных экстрактов исследованных растений выделили ряд новых веществ, относящихся к классу элаготаннинов. В УФ-спектре новых элаготаннинов имеются полосы поглощения, характерные для фенольных соединений (λ_{max} 220, 280 нм).

Для определения мономерного состава, а также установления структуры этих веществ проведен ряд химических превращений [7-8].

Масс-спектрометрические исследования элаготаннинов проводили на приборе Q-TOF LC-MS Agilent Technologies (США) серии 6520B в следующих условиях: источник ионизации: ESI-, поток осушающего газа: 5 л/мин, температура осушающего газа: 300°C, напряжение на конуса скиммера: 20V, на фрагменторе 125V, диапазон масс: в режиме MS 100 – 2000 m/z, а в режиме Targeted MS/MS 25 – 2000 m/z, энергия столкновения (collision energy) - 65. Способ ионизации: отрицательный. Образцы фракционировали с помощью хроматографа фирмы Agilent Technologies серии 1200, на колонке Zorbax SB C18, 3 μm , 0.5x150 мм. Мобильная фаза: А - 0,1% раствор муравьиной кислоты, В – ацетонитрил + 0,1 % муравьиная кислота. Элюцию осуществляли на приборе Agilent Technologies серии 1260 Cap Pump при скорости потока 15 мкл/мин. Градиент концентрации раствора В – минуты: 0% - 5 мин, 25% - 20 мин, 50% - 35-40 мин, 0% - 43 мин. Растворы дегазировали на приборе Agilent Technologies 1260 μ -degasser. Образцы наносили в колонку с помощью прибора Agilent Technologies Micro WPS по 1

МКЛ.

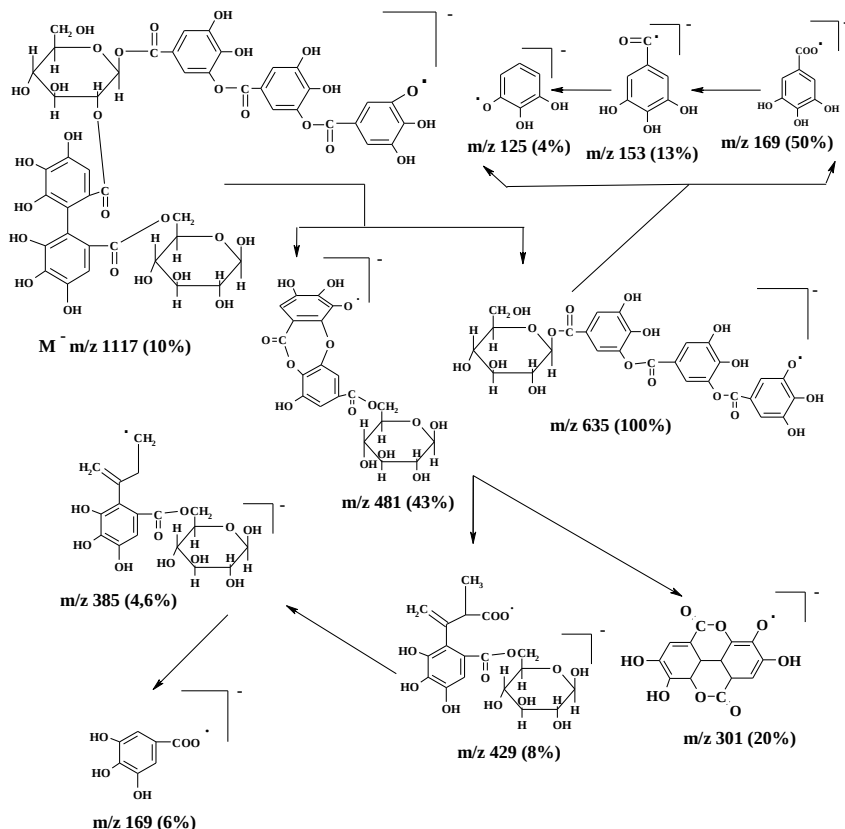


Схема 1. Возможные пути фрагментации зифурбина-1

На схеме 1, представлены все возможные пути фрагментации зифурбина -1. Сигнал молекулярного иона в масс-спектре зифурбина-1 с m/z 1117 ($[M-H]^-$) отвечает тригаллоил-гексагидроксидифеноил-дигликозиду эллаготаннина с молекулярной формулой $C_{47}H_{41}O_{32}$. Вторичные отрицательные ионы с m/z 301 и 153 соответствуют отрыву от молекулы гексагидроксидифеноильного и галлоильного фрагментов, а сигналы с m/z 481 и 429 -фрагментации эллаговой кислоты, связанной с глюкозой. Наличие в масс-спектре сигнала с m/z 636 свидетельствует об этерифицировании глюкозы тригалловой кислотой. Сигналы с m/z 169, 153, 125 соответствуют стандартному пути фрагментации галловой кислоты [2, 9].

На основании анализа химических продуктов и спектральных констант и сравнения их с литературными данными установили структуру эуфорбина-1.

Строение эуфорбина-2 также установлено на основании анализа химических превращений и спектральных данных (^{13}C ЯМР- и масс-спектры).

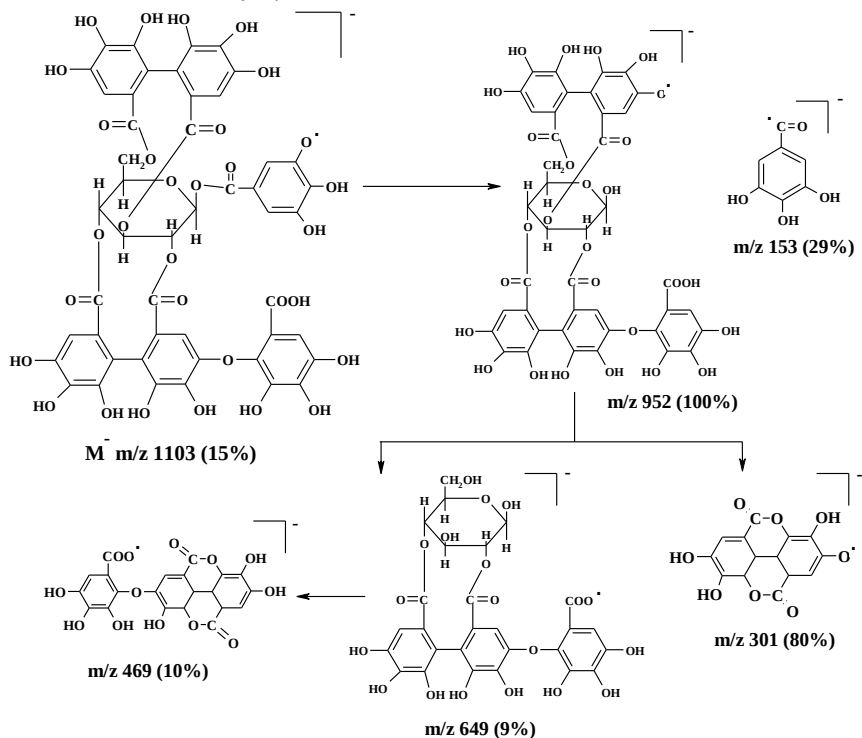


Схема 2. Возможные пути фрагментации эуфорбина-2

Масс-спектрометрические исследования эуфорбина-2 также проводили на масс-спектрометре Q-TOF LC-MS, в условиях отрицательной ионизации. Полученные результаты приведены на схеме 2. Как видно схемы, молекулярный ион эуфорбина-2 с m/z 1103, расщепляется два фрагмента с m/z 952 и 153. Это указывает на разрыв сложноэфирной связи между глюкозой и галлоильной группой, который и согласуется с литературными данными [2, 9]. Вторичный ион с m/z 952 далее расщепляется на фрагменты с m/z 649 и 301. Наличие в масс-спектре интенсивного осколочного

ионного сигнала с m/z 469, образованного при распаде вторичного иона с m/z 649 свидетельствует о том, что в составе эуфорбина-2 содержится валонеоильная группа, соответствующей молекулярной формуле $C_{21}H_{10}O_{13}$.

Обобщая все данные спектров и химических деструкций, а также определяя молекулярную массу, сравнивая их литературными данными мы установили химическое строение эуфорбин-2.

Аналогичным путем установили молекулярные массы остальных новых эллаготаннинов с MS m/z : 953 $[M-H]^-$; m/z : 1103 $[M-H]^-$; m/z : 801 $[M-H]^-$, выделенных из растений рода *Euphorbia*.

Выделенные соединения переданы в НИИ Вирусологии МЗ РУз, Республиканский Паталого-анатомический Центр МЗ РУз, Институт Кардиологии МЗ РУз, Институт Онкологии и Радиологии МЗ РУз и др. для скрининга на биологическую активность. Выявлено, что данные вещества обладают выраженным противовирусным, интерферониндуцирующим, антигипоксическим, противоопухолевым действием, и они рекомендованы для углубленного фармакологического изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chemistry and biology ellagitannins. // An Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols. Published by World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore 2009.
2. Karonen M., Parker J., Agrawal A., Salminen J-P. First evidence of hexameric and heptameric ellagitannins in plants detected by liquid chromatography/electrospray ionisation mass spectrometry //Rapid Commun. Mass Spectrom. 2010; V.24, pp. 3151–3156.
3. Salikhov Sh.I., Mavlyanov S.M., Abdulladjanova N.G., Pirniyazov A.J., Dalimov D.N., Salakhutdinov B.A., Kurmukov A.G. Polyphenols of some tannin containing plants and creation on their base drug remedies // New research on Biotechnology and Medicine. Nova Science – June 2006, New York. P. 109-117.
4. Салихов Ш.И., Ким Р.Ю., Мавлянов С.М., Абдулладжанова Н.Г., Земляничина И.В., Алланазарова З.Х. // Медицинский журнал Узбекистана 2007, №5, с.64-67.
5. Салихов Ш.И., Мавлянов С.М., Карамов Э.В., Абдулладжанова Н.Г., Корнилаева Г.В., Сидорович И.Г., Хаитов Р.М. «Средство, проявляющее анти-ВИЧ-активность»: Патент № IAP 2010 0392 от 11.04.2012. (Узбекистан)
6. Мавлянов С.М., Абдулладжанова Н.Г., Далимов Д.Н. Полифенолы некоторых растений сем.Euphorbiaceae // Химия природ. соедин.2003, с.322.
7. Абдулладжанова Н.Г., Мавлянов С.М., Салихов Ш.И., Камаев Ф.Г. Новые полифенольные соединения сем. Euphorbiaceae // Доклады АН РУз, 2011, №3, с.60-62.

-
8. Абдулладжанова Н.Г., Мавлянов С.М., Салихов Ш.И., Камаев Ф.Г. Гидролизуемые танины растений рода EUPHORBIA.//Биологические активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. 2011 г. 23-28 май, Новый Свет, АР Крым, Украина, с.235-236.
 9. Hager T.J., Howard L.R., Liyanage R., Lay J.o., Prior R.L. Ellagitannin composition of blackberry as determined by HPLC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS// J. Agric.Food Chem. 2008, V.56, pp. 661-669.
-

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ ФЛОРЫ ГРУЗИИ: СТРУКТУРА, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

**Алания М.Д., Шалашвили К.Г., Кавтарадзе Н.Ш., Сагареишвили
Т.Г., Сутиашвили М.Г.**

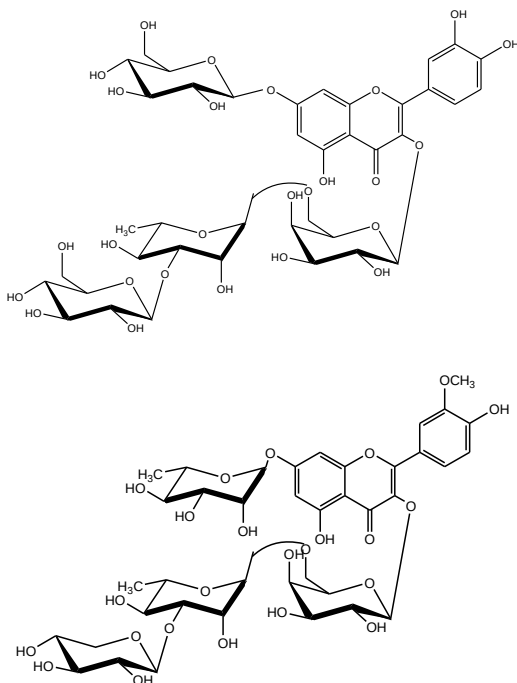
Тбилисский государственный медицинский университет
Институт фармакохимии им. И.Г.Кутателадзе, Тбилиси, Грузия, тел.: (+995
32) 595 28 03 31 e-mail: merialania@yahoo.com

Многолетние исследования растений флоры Грузии показали, что 80% изученных объектов являются богатыми по содержанию флавоноидов [1]. Некоторые из них стали сырьем лекарственных препаратов, созданных на основе суммарных или индивидуальных соединений. Продолжая изучение особо перспективных растений выделены 24 соединения, принадлежащие к разным группам флавоноидов.

Астрагал серпоплодный – *Astragalus falcatus* Lam. источник гликозида робинина, являющегося активной субстанцией гипоазотемического и диуретического препарата «Фларонин»-а. Очистка робинина от сопутствующих гликозидов представляла трудную задачу в связи их высокой гидрофильностью. Выделение этих олигозидов стало возможным путем сочетания препаративной хроматографии и ВЭЖХ. Они являются новыми флавоноидными олигозидами, названными как фалкозиды А, В, С, D и Е. Фалкозиды А, В и Е оказались тетра и пентаозидами кемпферола [2]. Полностью установлены строения фалкозидов С и D.

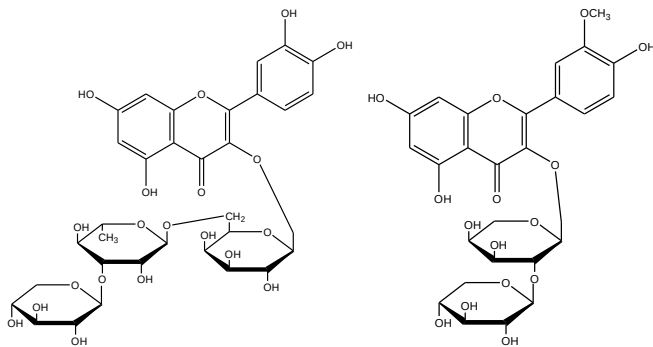
Astragalus galegiformis L. - астрагал галеговидный является сырьем двух высокоактивных флавоноидных гликозидов: диуретического – астрагалегозида и гипоазотемического – изоастрагалегозида [3, 4]. Из листьев данного растения изолированы астрагалин, кемпферол и новые гликозиды

производные кверцетина и изорамнетина – флагалозиды A-D [5]. Флагалозиды А и В являются тетра- и пентаозидами кверцетина. Полностью установлена строение гликозидов С и D.



Фалкозид С - $C_{39}H_{50}O_{26}$, М 934, **Фалкозид D** – $C_{39}H_{50}O_{24}$, М 902,
УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 360, 255; УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 375, 275;
ИК-Спектр (KBr, ν_{max} , cm^{-1}): 3600 (ОН), ИК-Спектр (KBr, ν_{max} , cm^{-1}): 3600(ОН);
2980(OCH_3);
1660-1650 (C=O), 1550 (C=C) 1660- 1655 (C=O); 1552(C=C)

Astragalus microcephalus Willd. – аналогично другим видам астрагала проявляет высокую лейкопоэтическую активность в опытах *in vivo*. Наряду с другими составными компонентами выделены флавоноиды: 7-гидроксифлаван; 7,4'-дигидроксифлаванон – ликвиритигенин; 7,3'-дигидрокси-4'-метокси-изофлаван – каликозин; кемпферол-3-О- α -L-рамно-ксилозид; 6,3',4'- тригидроксиаурон – сульфуретин [6] и 2',4,4'-тригидроксиалкон. Накопление флавона, флаванона, изофлавола, флавонола, аурона, халкона в *A. microcephalus* является ярким примером пути биосинтеза флавоноидов.



Флагалозид С - $C_{32}H_{38}O_{19}$, М 726.03, **Флагалозид D** - $C_{26}H_{28}O_{14}$, М 726.03,

УФ-спектр ($\lambda_{\max}$, нм): 350, 270; УФ-спектр ($\lambda_{\max}$, нм): 356, 255;

ИК-Спектр (KBr, $\nu_{\max}$, cm^{-1}): 3600(OH), 1650(C=O) ИК-Спектр (KBr, $\nu_{\max}$, cm^{-1}): 3350(OH), 2980(OCH_3), 650 (C=O)

Плющ колхидский - *Hedera colchica*, вечнозеленая лиана - источник галенового препарата бронхоспазмолитического действия «Кавсурон» [7]. Основными действующими веществами препарата являются сапонины и флавоноидный гликозид рутин [8]. Сырье собирают летом. Наблюдения, проведенные над *H. colchica* показали, что в зависимости от фазы вегетации растение в целом меняет окраску. Летом, при активной вегетации оно зеленое, а зимой приобретает красноватый оттенок. Сравнительное химическое изучение образцов собранных в оба сезона показало, что растение в летний период биосинтезирует рутин (0.57%), а в зимний – антоциановый пигмент – цианидин-3-О- β -D-рутинозид (0.52 %), представляющий собой восстановленную форму рутина. Полученные данные согласуются со сведениями литературы подтверждающими биогенетическое родство флавонолов и антоцианов, а также тот факт, что синтез антоцианов связан с защитной функцией растения [9, 10].

Культированное на черноморском побережье Грузии растение *Koelreuteria paniculata* оказалось богатым по содержанию тритерпеновых соединений [11]. При их изучении получены фракции фенольных соединений, разделением которых выделен ацилированный флавоноидный гексаозид [12].

Гликозид впервые выделен из *Koelreuteria paniculata*.

Суммарный препарат из видов рода *Trifolium* показал гонадотропную активность [13]. Основным компонентом суммы являются изофлавоны. Продолжая изучение других видов клевера

-
4. А.С. №1288963. 08.10.1986. Способ получения вещества, обладающего гипоазотемическим действием..Алания М.Д., Кемертелидзе Э.П., Комиссаренко Н.Ф., Васильченко Е.А., Измайлова И.К.
 5. Алания М.Д., Кавтарадзе Н.Ш., Bassarello С., Схиртладзе А.В., Pizza С.. Химия природ. соедин., 2006, № 6, с. 555.
 6. Кавтарадзе Н.Ш., Алания М.Д., Схиртладзе А.В., Мшвиладзе В.Д., Lavoie S., Pichette A., Химия природ. соедин., 2010, №6, с. 827.
 7. Патент U 1395 (Грузия) (01.12. 2006). Способ получения жидкого экстракта, бронхоспазмолитического действия. Деканосидзе Г.Е., Мшвиладзе В.Д..
 8. Алания М.Д., Комиссаренко Н.Ф., Кемертелидзе Э.П.. Химия природ. соедин. 1971, с. 531.
 9. Биохимия фенольных соединений. Под ред. Дж. Харборна. Перевод с английского, «Мир», Москва, 1968, 451с.
 10. Алания М.Д., Кавтарадзе Н.Ш., Схиртладзе А.В.. Химия природ. соедин., 2008, с.542.
 11. Сутиашвили М.Г.. Химия природ. соедин., 2000, № , с. 77.
 12. Сутиашвили М.Г., Алания М.Д.. Химия природ. соедин. (сдано в печать)
 13. Шалашвили К.Г., Польшин В.В., Кемертелидзе Э.П.. Тезисы III Всесоюзного симпозиума по фенольным соединениям, Тбилиси, 1976, с.165

СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ АНТИМУТАГЕННЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И АТИОКСИДАНТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Александрова В.А., Петросян А.С.

ФГБУН Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического
синтеза им А.В. Топчиева РАН, Москва, тел.: 8(495)-955-4-360, e-mail:
alexandrova@ips.ac.ru

Необходимость разработки новых подходов к созданию веществ, способных снизить уровень генетического повреждения клетки и уменьшить риск канцерогенеза, обусловлена глобальным радиационным загрязнением окружающей среды.

Известно, что фенольные антиоксиданты (АО) находят широкое применение в качестве лечебных средств при различных заболеваниях, в том числе, в случае свободнорадикальной патологии, вызванной радиационным поражением. Однако, существенным недостатком ряда фенольных АО является их

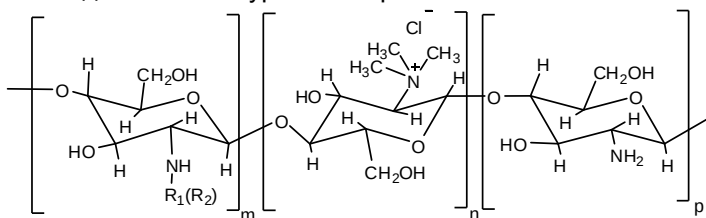
плохая растворимость в воде, быстрый метаболизм, малая биодоступность к ответственным мишеням и др., что снижает их защитную эффективность.

С целью преодоления указанных недостатков нами был разработан новый подход к конструированию водорастворимых (поли)фенольных АО пролонгированного действия. Для создания таких макромолекулярных систем использовали сочетание гидрофильной матрицы поликатионной природы и структурных антирадикальных фрагментов, включенных в боковую цепь полимера. В результате исследований, проводимых на протяжении ряда лет в ИНХС РАН совместно с ИОГЕН РАН, было подтверждено, что разрабатываемые макромолекулярные системы характеризуются высокой (до 93%) антимутагенной эффективностью, что было показано в тестах *in vitro* и *in vivo* [1-3]. Следует отметить, что синтетические поликатионы, используемые нами ранее в качестве модельных систем для разработки макромолекулярных антимутагенов, относятся к числу небiodeградируемых полимеров, что существенно ограничивает возможность их использования для защиты биологических объектов от ионизирующей радиации.

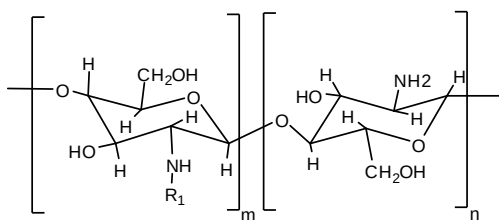
Данное исследование посвящено разработке новых водорастворимых антимутагенных систем пролонгированного действия на основе нетоксичного биodeградируемого поликатиона природного происхождения – хитозана и АО растительного происхождения.

С учетом выявленных закономерностей осуществлена направленная модификация хитозана. Получены новые водорастворимые макромолекулярные системы на основе частично квартенизованного хитозана (КХ), содержащие небольшое число (1-3 мас.%) структурных фрагментов кверцетина (Кв) или дигидрокверцетина (ДГКв) в боковой цепи полимера, - конъюгаты КХ-Кв и КХ-ДГКв соответственно. Следует отметить, что используемые в данном исследовании природные АО – Кв и ДГКв относятся к обширной группе полифенолов растительного происхождения – флавоноидам. Частичную квартенизацию хитозана на первой стадии синтеза конъюгатов проводили для усиления заряда макроиона, поскольку ранее на синтетических поликатионах ряда диаллилдиметиламмония было показано, что с ростом заряда полимера антимутагенная активность увеличивается [1]. Помимо этого, превращение части (30 мол.% и более) первичных аминогрупп хитозана в четвертичные аммониевые приводило к образованию растворимых КХ (в отличие от исходного хитозана).

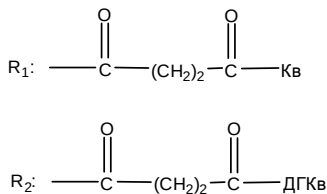
На второй стадии направленной модификации хитозана в структуру КХ (для усиления антирадикальной активности) вводили небольшое количество АО в качестве структурного фрагмента боковой цепи полимера. О наличии Кв и ДГКв в структуре конъюгатов судили по появлению полосы поглощения с максимумом при 340 и 290 нм соответственно. Отсутствие в конъюгатах примесей “несвязанных” АО было подтверждено с использованием метода гель-хроматографии на сефадексе G-75f. Наличие ковалентной связи АО с макромолекулой подтверждают также данные ИК-Фурье-спектроскопии.



КХ - Кв или КХ - ДГКв



X₃₀ - Кв



Оценку антимуtagenной эффективности конъюгатов хитозана с АО проводили, используя цитогенетический метод – анализ частоты хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови при гамма – облучении [4].

В результате проведенных исследований показано, что введение в боковую цепь хитозана небольшого количества АО растительного происхождения (2 мас.%) приводит к существенному (до 70-75%) усилению антимуtagenной активности конъюгатов по сравнению с исходным хитозаном (38%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Alexandrova V.A., Obukhova G.V., Topchiev D.A. Synthesis and antimutagenic properties of novel systems based on poly(quaternized ammonium) salts // J. Bioact. Compat. Polym. 2002. V. 17. P. 321-341.
2. Alexandrova V.A., Balabushevich N.G., Bondarenko G.N., Domnina N.S., Larionova N.I. Water soluble chitosan conjugates with plant antioxidants and polyelectrolyte complexes on their basis // J. Drug Del. Sci. Tech. 2006.

V. 16. P. 279-283.

3. Alexandrova V.A., Obukhova G.V., Domnina N.S., Topchiev D.A. Modification of chitosan for construction of efficient antioxidant biodegradable systems // Macromol. Symp. 1999. V. 144. P. 413-422.
4. Alexandrova V.A., Snigireva G.P. Development of the chitosan derivatives exhibiting antimutagenic activity // Advances in Chitin Science "9th International Conference of the European Chitin Society" / Venice, 2009. V. 11. P. 79-84.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИДРОФИЛЬНЫХ И ГИДРОФОБНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНОЗАНА С КЛЕТКАМИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Алексеева О.М., Вольева В.Б., Комиссарова Н.Л., Белостоцкая И.С., Домнина Н.С.¹, Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б.

Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, Москва, Россия.
119334 Москва ул. Косыгина, 4, тел.: (495) 9397409, e-mail:

olgavek@yandex.ru

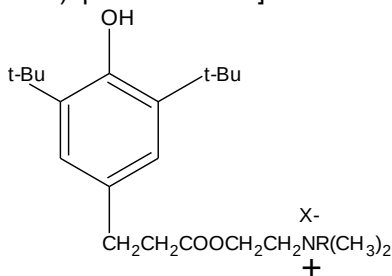
¹Химический факультет Санкт-Петербургского Государственного
Университета, Санкт-Петербург 198504, Ст. Петергоф, Университетский
пр., д.26, тел. (812) 4286840, e-mail domnin@id1042.spb.edu

β -(4-гидроксис-3,5-ди-трет-бутилфенил)пропионовая кислота, получившая название Фенозан (от «фенолы завода и Академии наук») является родоначальным соединением семейства фенольных антиоксидантов, технология производства которых разработана лабораторией химии антиоксидантов ИХФ (позднее ИБХФ) РАН в содружестве МНПЗ в 70-80-х годах [1]. В основе разработки лежит синтез метилового эфира Фенозан-кислоты (Фенозана-1) и его катализируемая основаниями переэтерификация спиртами, как низшими, так и полиолами, включая моно- и полисахариды. Варьирование природы спирта дает возможность варьировать свойства получаемого продукта в достаточно широких пределах, его совместимость со средами различной полярности, от органических растворителей (ацетон, бензол, хлороформ), до воды и водных растворов электролитов. Хорошей растворимостью в воде обладают щелочно-металлические соли Фенозан-кислоты, получаемые в результате щелочного гидролиза Фенозана-1.

Наибольшую известность из них получила К-соль, так

называемый Феноксан, антиоксидантная активность которого протестирована на большом числе биологических объектов [2]. Обнаружено, что Феноксан, являясь антиоксидантом неспецифического воздействия, обладает свойствами структурного эффектора на ферменты и биомембраны [3], действует как адаптоген. Так, было показано, что у инфузорий-спиростом улучшается двигательная активность, поведение, выживаемость и форма тела при концентрациях антиоксиданта в диапазоне 1×10^{-3} – 1×10^{-13} моль/л.

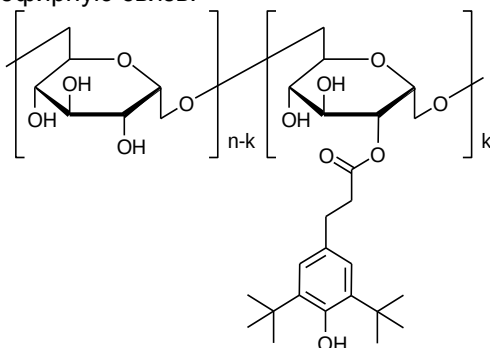
Положительные эффекты Фенозана в сверхмалых дозах обнаруживаются и на целом теплокровном животном [4]. В этих исследованиях отмечено, что Фенозан не имеет определенной мишени для воздействия в мембране. Как амфифильное вещество он действует во всей области поверхностных слоев биомембраны, как во внешнем, так и во внутреннем листке бислоя, по-видимому, проникая через дефекты биомембраны к внутренней поверхности бислойной плазматической мембраны. Это показано с помощью спин-меченных зондов на мембранах эритроцитов [5]. Для проникновения в более глубокие слои мембраны, была необходима гидрофобизация антиоксиданта. С этой целью и были синтезированы холиновые эфиры Фенозана, кватернизованные длинноцепочечными алкилгалогенидами с числом углеродных атомов от 8 до 16 – алкил-диметил- $[\beta$ -(4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилфенил)пропионилэтил]аммоний галогениды (ИХФАНЫ) [6].



При исследовании антиоксидантных свойств ИХФАНов в сравнении с Фенозаном [7] было обнаружено, что ИХФАНЫ обладают большей активностью. На метилолеатной модели при исследовании механизма распада гидропероксидов, наибольшая активность была зарегистрирована для производных С-10 и С-16 [8]. В результате встраивания алкильных заместителей в бислой ИХФАНЫ структурно укрепляют его, усиливая резистентность биомембран к различным воздействиям. Мультицелестные свойства ИХФАНов реализуются также и в ингибировании

ацетилхолинэстеразы, играющей большую роль в механизмах передачи нейрогуморального сигнала [9]. Особенностью Фенозанов, обнаруженной при исследовании их метаболизма в организме теплокровных животных (на примере кроликов), является образование в качестве метаболитов также редокс-активных соединений – метилового эфира 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричной кислоты (в результате дегидрирования карбоксэтильного фрагмента) и 2,6-ди-трет-бутил-п-бензохинона, образующегося при разрыве связи карбоксэтильного заместителя с фенольным кольцом [10]. В связи с этим 4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутилкоричная кислота прошла специальное тестирование как антиоксидант, в результате которого обнаружено, что она является эффективным гепатопротектором, превосходящим по активности такие известные гепатопротекторы как α -токоферол и Феноксан.

Высокую эффективность производных коричной кислоты, как гепатопротекторов, связывают с их гидрофильностью, обеспечивающей им высокую скорость транспорта и биологическую доступность [11]. Эти характеристики кислот – антиоксидантов, могут быть усилены за счет их химической прививки к макромолекулам гидрофильных био- и синтетических полимеров (декстран, гидроксизетилированный крахмал, ПВС, ПЭГ) через сложноэфирную связь.



Использование таких гибридных макромолекулярных антиоксидантов (ГМАО) позволяет равномерно распределять активное вещество на поверхности биомембраны, предупреждая его локальное концентрирование в бислое [12].

В результате проведенных в настоящей работе исследований выяснено, что тестируемые производные Фенозана и родственные соединения проявляют свойства веществ, которые как в больших концентрациях (10^{-4} - 10^{-6} М), так в малых (10^{-13} - 10^{-14} М) и сверхмалых дозах (10^{-18} М), способны вызывать в биосистеме

регистрируемый отклик. Структурные эксперименты проводились с лабильными, легко меняющими конформацию молекулами бычьего сывороточного альбумина (БСА) и с липосомами, сформированными из индивидуального нейтрального фосфолипида с насыщенными жирнокислотными остатками - димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ). В результате спектральных исследований при измерении тушения триптофановой флуоресценции установлено, что большие концентрации всех исследуемых антиоксидантов значительно тушат флуоресценцию, разрыхляя структуру молекулы БСА. Малые концентрации ИХФАНов защищают флуоресценцию от тушения водой в прямой зависимости от длины алкильного заместителя при аммонийном азоте, т. е., воздействие на объект зависит как от природы, так и от концентрации БАВ.

Обнаружено, что в мембранах теней эритроцитов, являющихся структурной моделью плазматической мембраны большинства клеток, Фенозан и ИХФАН-10 в больших концентрациях переформируют белковые микродомены. Микродомены ДМФХ подвергаются деструкции в присутствии Фенозана, 4-гидрокси-3,5-ди-третбутилкоричной кислоты и ИХФАНов в разных концентрационных диапазонах. В случае ИХФАН-16 наблюдается образование собственной фазы микродоменов антиоксиданта. Наиболее мягкое воздействие на структуры оказывают ГМАО. При функциональном тестировании обнаружено бимодальное влияние (большие и сверхмалые концентрации) ИХФАНа-10 на Ca^{2+} -зависимый выход K^+ из эритроцитов и незначительное влияние Фенозана. В клетках асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) ИХФАН, Фенозан и коричная кислота (в средних концентрациях) угнетают Ca^{2+} -сигнализацию, по-разному влияя на пуриновые рецепторы и CRAC-каналы (Ca^{2+} -регулируемые Ca^{2+} -каналы). Ингибирующего влияния ГМАО на Ca^{2+} -потoki не обнаружено.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А. «Пространственно-затруднённые фенолы.» М. Химия, 1972. 352 с.
2. Ершов В.В., Плеханова Л.Г. «Пространственно-затруднённые фенолы - биологически активные соединения» // Отчёт ИХФ РАН. 1988. с.1-7.
3. Бурлакова Е.Б., Голощапов А.Н., Трещенкова Ю.А. // Радиационная биология. Радиоэкология 2003. №3. с.320-323. «Действие малых доз фенозана на биохимические свойства лактатдегидрогеназы и микровязкость мембран микросом мозга мышей».
4. Бурлакова Е.Б., Лебедева Н.Е., Головкина Т.В., Горбатова Е.Н. // Радиационная биология Радиоэкология 2003. №3. с.282-286. «Метод

скрининга веществ, действующих в сверхмалых концентрациях».

5. Гендель Л.Я., Ким Л.В., Лунёва О.Г., Федин В.А., Круглякова К.Е. // Известия РАН, сер. Биол., 1996, №4, с.508-512. «Изменения поверхностной архитектуры эритроцитов под влиянием синтетического антиоксиданта фенозана-1».
6. Никифоров Г.А., Белостоцкая И.С., Вольева В.Б., Комиссарова Н.Л., Горбунов Д.Б. // 2003 сб. "Биоантиоксиданты", Научный вестник мед акад. Тюмень, с.50-51. «Биоантиоксиданты "поплавкового" типа на основе производных 2,6 дитретбутил-фенола».
7. Сторожок Н.М., Перевозкина М.Г., Никифоров А.Г., Русина И.Ф. // 2003 сб. "Биоантиоксиданты", Научный вестник мед акад. Тюмень, с.52-59. «Особенности ингибирующего действия антиоксидантов группы ИБХФАНов».
8. Перевозкина М.Г. // В сб.: Медицина и охрана здоровья. Тюмень. 2001. с.74. «Ингибирующая активность новых гибридных антиоксидантов».
9. Озерова И.Б. // Автореферат кандидатской диссертации. М. 2000. с.1-25. «Новые антиоксиданты экранированные фенолы как модуляторы активности ацетилхолинэстеразы *in vivo* и *in vitro*».
10. Прокопов А.А. Берлянд А.С. Шукиль Л.В. // Химико-фармацевтический журнал 2006. №2. с.3-4. «Изучение метаболизма фенозан-кислоты в организме кроликов».
11. Душкин М.И., Шварц Я.Ш., Дюбченко О.И., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Терах Е.И. // Химико-фармацевтический журнал, 2002. №1. с.13-15. «Антиокислительная и гепатопротекторная активность водорастворимых 4-пропилфенолов, содержащих гидрофильные группы в алкильной цепи».
12. Домнина Н.С, Хрусталева Р.С, Вольева В.Б., Белостоцкая И.С., Комиссарова Н.Л. // VII международная конференция «Биоантиоксидант» тезисы докладов 25-26 окт.2006 г. Москва, изд. РУДН 2006. с.30-31. «Гибридные макромолекулярные антиоксиданты на основе гидрофильных полимеров и пространственно-затрудненных фенолов».

АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ, СОДЕРЖАЩИХ КАРВАКРОЛ И ТИМОЛ

Алинкина Е.С., Мишарина Т.А., Фаткуллина Л.Д.

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва,
Россия, e-mail: tmish@rambler.ru

В течение ряда лет в нашем институте проводились эксперименты *in vivo*, целью которых было изучение влияния регулярного приема малых доз эфирных масел на

продолжительность жизни и показатели перекисного окисления липидов в мышцах. Было установлено, что прием масла чабера с едой или питьевой водой на 30% увеличивал продолжительность жизни мышей высокоракковой линии АКР и снижал частоту заболевания лейкозом [1]. Регулярный прием здоровыми мышами линии Balb малых доз эфирного масла орегано увеличивал среднюю продолжительность их жизни на 120 дней [2]. Оба эфирных масла действовали как биоантиоксиданты, значительно снижая в крови, печени и мозге мышей содержание продуктов перекисного окисления липидов и увеличивая их устойчивость к окислению. В мозге старых мышей (24 мес), принимавших эфирное масло орегано, сохранялся высоким уровень важнейших полиненасыщенных жирных кислот, тогда как в контрольной группе доля этих кислот уменьшалась на 20% [2]. Полученные *in vivo* биологические эффекты обусловили наш интерес к детальному изучению способности эфирных масел взаимодействовать со свободными радикалами, которые могут приводить к развитию окислительного стресса и всех сопутствующих ему нарушений в здоровье.

Целью работы являлось изучение антирадикальных свойств эфирных масел (ЭМ) тимьяна (*Thymus vulgare*), орегано (*Origanum vulgare*) и чабера (*Satureja hortensis*) и их сравнение с синтетическим антиоксидантом – ионолом.

Основными соединениями в изученных ЭМ были карвакрол и тимол - изомерные фенолы с метильным и изопропильным заместителями. Схожесть их структурного строения обуславливает наличие одинаковых видов биологической активности, в том числе антиоксидантной, которая была подтверждена в тестах *in vitro* и *in vivo* [2, 3]. Для определения антирадикальной активности (АРА) мы выбрали широко известную реакцию со стабильным 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил радикалом (ДФПГР) [4]. Сравнение антирадикальных свойств ЭМ и ионола проводили по величинам EC_{50} , которые эквивалентны количеству антиоксиданта (эфирного масла, ионола), необходимому для восстановления половины радикала. Из кинетических кривых восстановления радикала в модельных растворах с различными концентрациями масел или ионола были построены линейные зависимости степени восстановления радикала за 30 мин от концентрации ЭМ. По ним рассчитали концентрацию ЭМ, при которой степень восстановления радикала составляла 50% (EC_{50}). Величины EC_{50} были близки для ЭМ и составляли для орегано, тимьяна и чабера 0,223, 0,245 и 0,262 г/л, соответственно. Согласно данным ГЖХ анализа, исследованные ЭМ различались по содержанию и

соотношению тимола и карвакрола. Так, в ЭМ орегано суммарное содержание этих двух соединений было максимальным и составляло 67,5%, в масле тимьяна - 47,5% и чабера - 49,7%. При этом соотношение карвакрол : тимол также было разным: в масле орегано оно составляло 15 : 1, тимьяна - 1:19, чабера - 1,8 : 1.

Расчет кинетических характеристик реакции компонентов масел с радикалом проведен для кривых, полученных при концентрации ЭМ 300 мкг/мл и ионола – 10 мкг/мл. Восстановление радикала имело две стадии – первую быструю, вторую – медленную, обе стадии описывались линейными уравнениями псевдопервого порядка. Из уравнений определены скорости реакций первой и второй стадии. Скорости первой стадии реакций для ЭМ орегано была 0,0693, тимьяна – 0,0655 и чабера – 0,0602 нмоль/мл сек. Для ионола скорость первой стадии реакции была в два раза меньше, чем для эфирных масел. На второй стадии скорости реакций всех антиоксидантов были близки и варьировались в пределах от 0,0021 до 0,0029 нмоль/мл сек.

Из кинетических кривых определены время окончания первой стадии и концентрация восстановленного за этот период радикала, по которой рассчитали содержание активных антирадикальных компонентов, вступивших в первую стадию реакции. Эта величина в эквиваленте радикала составляла от 61 до 67 нмоль/мл и убывала в порядке: ЭМ орегано > ионол = ЭМ тимьяна > ЭМ чабера. С учетом того, что каждое масло содержало по два активных антирадикальных компонента - карвакрол и тимол с ММ 150 а.е.м., содержание этих фенолов, вступивших в реакцию составляло 10,1; 9,4 и 9,2 мкг/мл для ЭМ орегано, тимьяна и чабера, а ионола – 13,7 мкг/мл. В реакционные смеси было добавлено по 300 мкг/мл ЭМ и 10 мкг/мл ионола, реальное содержание суммы фенолов было меньше, оно уменьшалось в ряду ЭМ орегано > ЭМ чабера > ЭМ тимьяна и составляло 202, 149 и 142 мкг/мл, соответственно. Это означает, что в реакции участвовало только 5% фенолов из ЭМ орегано, 6,6% из ЭМ тимьяна и 6,1% из ЭМ чабера. Из этих результатов можно сделать два вывода. Во-первых, антирадикальные активности карвакрола и тимола различались, более активным был тимол. Действительно, в ЭМ тимьяна доля тимола была намного больше, чем карвакрола, при этом содержание фенолов было минимальным, но их расход в ЭМ тимьяна был больше, чем в других маслах. С другой стороны, мы не смогли количественно описать взаимное влияние тимола и карвакрола в проявлении их антирадикальной активности. Это говорит о том, что не следует количественное содержание антиоксидантных компонентов в образце отождествлять с его

общей антирадикальной активностью. Вероятно, для наличия антиоксидантных и антирадикальных свойств в эфирных маслах важно не только содержание отдельных компонентов с высокой активностью, но и их сочетание, а также присутствие других соединений [5]. Менее активные компоненты ЭМ также делают свой вклад в общую АРА, например, монотерпеновые углеводороды, терпинолен, α - и γ -терпинены, благодаря которым ЭМ, не содержащие фенолов, способны проявлять относительно высокую АОА [5,6]. В таких сложных многокомпонентных композициях, как эфирные масла, не исключена возможность как синергетического, так и антагонистического взаимодействия отдельных составляющих друг с другом, что, конечно же, может не изменить, но может повысить или понизить общую АРА исследуемых ЭМ.

Механизм реакции ионола был сложным. По нашим данным, даже в первой быстрой стадии реакции одна молекула ионола реагировала более, чем с одной молекулами радикала, так как «эффективный» расход фенолов в этой реакции был 137%. Детальное изучение показало, что механизм реакции ДФПГР с ионолом (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенолом) включал быструю реакцию фенольной группы с радикалом, процессы делокализации H^+ , димеризации, комплексообразования, протекающих между образующимися полупродуктами, за счет которых одна молекула ионола восстанавливала 2,8 молекул радикала [4]. Еще сложнее будут реакции радикала с компонентами эфирных масел, в которых одновременно протекает сразу несколько реакций с участием и компонентов ЭМ, и образующихся продуктов, способных как ускорять, так и замедлять процесс восстановления ДФПГР. Для описания таких систем мы использовали характеристику, связывающую время восстановления половины радикала (T_{EC50}) и необходимую для этого концентрацию субстрата (EC_{50}). Это величина антирадикальной эффективности (АЕ), которая рассчитывается по формуле, предложенной в [4].

$$AE = 1 / (EC_{50} \times T_{EC50})$$

Величины АЕ составляли: для ЭМ орегано – $4,15 \times 10^{-3}$, ЭМ тимьяна – $3,09 \times 10^{-3}$, ЭМ чабера – $2,77 \times 10^{-3}$, ионола – $2,65 \times 10^{-2}$ л/г сек. Для эфирных масел значения АЕ различались в 1,5 раза, а для ионола эта величина была больше, чем для масел в 5-10 раз. Однако стоит отметить, что T_{EC50} эфирных масел было в два раза меньше, чем для ионола, то есть «быстрые» антирадикальные компоненты ЭМ имели высокую реакционную способность.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что хотя АРА ЭМ очень сильно зависит от их состава, не всегда количественное содержание антиоксидантных компонентов в образце пропорционально его антирадикальной активности. Большое значение имеет соотношение компонентов, благодаря которому могут проявляться синергетические эффекты, обуславливающие более высокую АРА многокомпонентных смесей по сравнению с индивидуальными соединениями. Таким образом, все три ЭМ, несмотря на различия в количественном соотношении основных компонентов, близки по своим свойствам и практически не уступают синтетическому антиоксиданту ионолу. Полученные результаты позволяют рекомендовать эфирные масла орегано, тимьяна и чабера в качестве основных составляющих биологически активных добавок с широким спектром действия, в том числе как эффективных природных биоантиоксидантов. Определение кинетических характеристик и выяснение механизмов синергетического и антагонистического действия антиоксидантов очень важно, так как это позволяет расширять круг доступных и высоко эффективных препаратов для различных отраслей промышленности, включая пищевую, фармацевтическую, косметическую и др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б., Ерохин В.Н., Мишарина Т.А., Фаткуллина Л.Д., Семенов В.А., Теренина М.Б., Воробьева А.К., Голощапов А.Н. // Изв РАН. Сер. Биол. 2010. Т.37. № 6. С. 612-618.
2. Бурлакова Е.Б., Мишарина Т.А., Воробьева А.К., Алинкина Е.С., Фаткуллина Л.Д., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. // Доклады АН. 2012. Т. 444, № 6. С. 676–679.
3. Ruberto G., Baratta M.T. // Food Chemistry. 2000. V. 69. P. 167-174.
4. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. // Lebensmittel. Wissenschaft. Technologie. 1995. V. 28. № 1. P.25-30.
5. Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И. // Прикладная биохим. и микробиол. 2009.Т. 45. № 6. С. 710-716.
6. Wang H.F., Yih K.H., Huang K.F. // J. Food and Drug Analysis. 2010. V. 18. № 1. P. 24–33.

ПРОИЗВОДНЫЕ БЕНЗОЛДИКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ В КОРНЯХ *ADENOPHORA LILIFOLIA* (L.) A. DC.

Баширова Р.М., Кудашкина Н.В.¹, Грицаенко Д.И.², Галкин Е.Г.

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия

²Башкирский государственный медицинский университет,

³Институт химии РАН, г. Уфа, Россия

e-mail: BashirovaRM@mail.ru

В последние годы объектом пристального внимания экологов стали производные бензолдикарбоновой (БДК) или фталевой кислоты. Фталаты оказывают эстрогенное, антиандрогенное и в ряде случаев гепатотоксическое действие на человека. Вместе с тем, они широко распространены в лекарственных и пряно-ароматических растениях. Так, из листьев *Aloe vera* Linn.[1], из корней *Codonopsis pilosula* (Franch) Nannf, используемого в китайской и вьетнамской медицине в качестве тонизирующего средства, выделен бис-(2-этилгексил)-фталат (ВЕНР) [2]. Содержание ВЕНР в гексановом экстракте листьев и стеблей лаванды достигает 12,8 и 16,7% [3]. В эфирном масле *Ginkgo biloba* обнаружено 2,2% БДК и 2,16% дибутилфталата [4]. Разнообразен спектр фталатов в эфирном масле листьев базилика *Ocimum basilicum*: диэтилфталат (2,07%), бутил-гексилфталат (0,62%); дибутилфталат; бифенил-4,4-бензолдикарбонвая кислота. Их состав зависит от метода экстракции эфирных масел. Максимальное содержание БДК — 49,44% в эфирном масле *O. basilicum* отмечается при экстракции этилацетатом [5].

В то же время функции фталатов в растениях освещены недостаточно. Указанные соединения не вписываются в механизмы биосинтеза высших растений, поскольку, они синтезируются в основном эндофитными грибами и стрептомицетами из продуктов распада целлюлозы и лигнина [6].

Учитывая изложенное, нами проведено изучение содержания фталатов в лекарственном растении – бубенчике лилиелистом *Adenophora lilifolia* (сем. *Campanulaceae*). Это травянистый стержнекорневой многолетник с толстым веретеновидным корнем, напоминающим корень женьшеня, и полым олистевым стеблем. Бубенчик представляет интерес как микотрофное растение, метаболизм которого тесно связан с эндофитными грибами (*Glomus*, *Chaetomium* sp., *Rhizoctonia* и др.) и актиномицетами, обитающими в корневой системе, стеблях и листьях. Именно целлюлозолитические грибы *Chaetomium* sp. IFB-

E015, обитающие на листьях бубенчика *A. axilliflora* продуцируют цитотоксический алкалоид хетоминин [7], а *Streptomyces lavandulae* subsp. *trehalostaticus* синтезируют нойримицин – основу препаратов “Miglitol”, “Glyset”, “Zavesca”. Растение представляет интерес как источник антитоксических и противодиабетических средств [8].

Целью проведенных исследований является изучение содержания производных фталевой кислоты в корнях бубенчика *A. lilifolia* высокой степени микоризации.

МЕТОДИКА

Нами проведены фитохимические исследования спиртового экстракта корней, отобранных в фазу бутонизации. Место отбора проб находилось в экологически чистой зоне, удаленной от потенциальных антропогенных источников загрязнения окружающей среды фталатами, возле деревни Александровка Кармаскалинского района РБ.

От свежескопанных корней отделяли тонкие корешки диаметром 1-2 мм для проведения микологических исследований. Утолщенную веретеновидную часть корня (160 г) гомогенизировали в 120 мл 96° спирта и оставляли на сутки. Далее спиртовый экстракт декантировали и анализировали. Степень микоризации изучали после мацерации и окрашивания корней и стеблей бубенчика по методу J. M. Phillips и D.S. Hayman [9]. Учитывали встречаемость и интенсивность микоризной инфекции, обилие и наличие арбускул и везикул в фрагментах корней.

В работе использовали хромато-масс-спектрометр Termo Finnigan– хроматограф –Finnigan 800, масс-спектрометр высокого разрешения MAT-95XP ЭВМ “Delta” с системой обработки данных “Data Sistem” содержащей библиотеку (Database “NIST02”) в количестве 250 000 масс-спектров.

Идентификацию проводили по полным масс-спектрам “Data Sistem” Идентифицировано 18 соединений, у которых, индексы сходства библиотечных и зарегистрированных спектров составляли не ниже 80%.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлено, что корешки бубенчика лилиелистного отличались высокой степенью микоризации. В корнях отмечена везикулярно-арбускулярная микориза Arum-типа.

В спирторастворимой фракции корней бубенчика нами обнаружены продукты катаболизма гексоз и фенольных соединений: фурфураль, 2-фуранометанол, 5-(гидроксиметил)-2-фуранкарбоксияльдегид и производные БДК (диизобутил-фталат, дибутил-фталат, диизооктил-фталат- в сумме 3,68%).

Таблица 1

Результаты хромато-масс-спектрометрического анализа спиртовой фракции корней бубенчика лилиелистного

Компоненты	Кол-во, %	R _t ,* мин.
Фурфураль	1,66	4,65
2-фуранометанол	0,54	4,94
2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран	2,39	9,95
5-(гидроксиметил)-2-фуранкарбоксиальдегид	35,34	11,96
2,6-диметокси-фенол	0,62	12,86
2-метокси-4-(1-пропенил)-фенол (эвгенол)	0,07	14,22
Диизобутил –фталат	1,02	18,86
Дибутил –фталат	0,63	19,88
Этиловый эфир пальмитиновой кислоты	0,51	20,27
9,12-октадекадиеновая кислота (линолевая)	0,31	21,58
9,12,15-октадекатриеновая кислота (линоленовая)	0,27	21,64
Этиловый эфир линолевой кислоты	0,37	21,87
4,4-(1-метилэтилиден)бис-фенол	0,19	22,06
Лупанин	1,51	22,91
Диизооктил-фталат	2,26	25,00
Кампастерол	0,37	31,25
Бета-ситостерол	2,48	32,46
Лупенон	5,01	33,47

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы склонны считать, что производные БДК являются продуктами не самого растения, а его эндофитов, а, полученный нами спиртовой экстракт корней, по существу представляет смесь продуктов метаболизма *A. lilifolia* и его эндосимбионтов. Как известно, эндофиты повышают устойчивость растения-хозяина неблагоприятным факторам окружающей среды, в том числе и к биотическим. Судя по данным литературы, инокуляция растений бактериями рода *Pseudomonas* и *Azospirillum* или же грибами рода *Glomus* приводит к повышению общей массы и площади корней и к повышению концентрации диэтилфталата в корнях [10].

Обитающие в ризосфере [11] и эндофитные *Streptomyces* sp. [12, 13] защищают растения, синтезируя фталаты, обладающие репеллентной, ларвицидной и инсектицидной активностью. Благодаря этому производные БДК используют с начала XX века в качестве репеллентов. Так фталаты *Lantana camara* являются эффективными ларвицидами по отношению к личинкам переносчика желтой лихорадки *Aedes aegypti* и *Culex quinquefasciatus*, переносящего вирусы лихорадки Западного Нила и энцефалита Сент-Луиса [14].

Представляет интерес тот факт, что эндофиты *Phoma herbarum* корней *Campanula punctate* продуцируют наряду с фталатами и гиббереллины [15]. Производные БДК из корней *Oryza sativa* L. и *Fagopyrum esculentum* выступают в роли аллелопатических агентов, ингибирующих рост корней *Echinochloa crusgalli* и прорастание семян *Lactuca sativa* L., *Amaranthus lividus* L., *Digitaria sanguinalis* (L.)., *Echinochloa crusgalli* L., китайской капусты и редиса [16,17].

Таким образом, наличие производных бензолдикарбоновой кислоты в корнях бубенчика *Adenophora lilifolia* свидетельствует об активности эндофитных организмов, выполняющих функцию защиты хозяина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee, K. H., Kim, J. H., Lim, D. S. and Kim, C. H. 2000. Antileukaemic and anti-mutagenic effects of Di-(2-ethylhexyl) phthalate isolated from *Aloe vera* Linn.// J. Pharm. Pharmacol.2000 N52, p.593-598.
2. Trinh T. T., Tran V. S., L. Chemical constituents of the roots of *Codonopsis pilosula* //Vietnam J. of Chemistry 2003, 41 N 4, p.119 – 123
3. Shafaghat Ali, Salimi F., Amani-Hooshyar V. Phytochemical and antimicrobial activities of *Lavandula officinalis* leaves and stems against some pathogenic microorganisms// J. of Med. Plants Research 2012. V. 6(3), p. 455–460
4. Xiu-Yun J.U., You-Jian F., Chen Feng-Mei, et al. Volatile Constituents and their Fibrinolytic Activity of Endophytic Fungus *Fusarium* sp. GI024 from *Ginkgo biloba* //Microbiology, 2006, V.I.33(6):p.8-11
5. Dev N., Das A. K., Rahman M. A. Chemical Compositions of Different Extracts of *Ocimum basilicum* Leaves // J. Sci. Res. 2011. (1), p. 197-206
6. <http://www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00624.html>
7. Jiao Rui H., Xu Shu, Liu Jun Y. et al. Chaetominine, a cytotoxic alkaloid produced by endophytic *Chaetomium* sp. IFB-E015//Org Lett. 2006 № 7. p.5709-5712
8. Баширова Р.М., Грицаенко Д.И., Кудашкина Н.В., Тимербаева Г.Р., Зимин Ю.С. Бубенчик лилиевый *Adenophora lilifolia* (L.) A.DC как источник пектина //Вестник ОГУ. 2009.№6. с.67-69
9. Phillips J.M., Hayman D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection// Transact. British Mycor. Soc., 1970, 55: p.158-161
10. Walker V., Couillerot O., Von Felten A. et al.Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions//Plant and Soil. 2112. V. 356, №1-2, pp 151-163
11. Lyutskanova D., Ivanova V., Stoilova-Disheva M.et al. Isolation and Characterization of a psychrotolerant *Streptomyces* strain from permafrost soil in Spitsbergen, producing phthalic acid ester //Biotechnol. And Biotechnol. 2009. V.23 № 2. P.1220-1224

-
12. Smaoui S., Mathieu F., Elleuch L. et al. Taxonomy, purification and chemical characterization of four bioactive compounds from new *Streptomyces* sp. TN256 strain// World J. of Microbiol. and Biotechnol. 2011, V. 28 p. 793-804].
 13. Bari M.A., Abu Sayeed M., Rahman M.S et al. Characterization and antimicrobial activities of a phthalic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshiensis* a novel species collected in Bangladesh// Res J. Med Sci 2006. N 1. p.77–81
 14. Sathish Kumar M., Maneemegalai S. Evaluation of Larvicidal Effect of *Lantana Camara* Linn Against Mosquito Species *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* //Advances in Biological Research. 2008. №2. p. 39-43
 15. Lee O. J. H., Khan S. A., Lee I. J. et al. Isolation and identification of fungal strains producing gibberellins from the root of plants// Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 2007. 35. p. 357-363.
 16. Rimando A.M., Olofsdotter M., Dayan F.E. Duke S.O. Searching for Rice allelo-chemicals: an example of bioassay-guided isolation//Agronomy J. 2001.V.91. p.16-20
 17. Earn S. H., Kim M. J., Kang W. H., Rim Y. S., Yu C. Y. Bioassay of Allelochemical in Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench)// The proceeding of the 8th ISB 2001, p.57-62
-

УДК: 582.949.27

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ РАСТЕНИЙ РОДА ТИМЬЯН ФЛОРЫ ЦЕНТРАЛЬНОГО ЧЕРНОЗЕМЬЯ

Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А.

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск,
Россия, тел.: 58-07-39, e-mail: fg.ksmu@mail.ru

В научной медицине России официальными растениями из рода Тимьян являются тимьян ползучий *Thymus serpyllum* L. и тимьян обыкновенный *Thymus vulgaris* L. применяемые в качестве отхаркивающего средства [3]. Тимьян обыкновенный – растение стран Средиземноморья. Тимьян ползучий распространен на территории России, он произрастает в сосняках, на опушках, полянах, на песках каменистых склонах. Наряду с тимьяном ползучим на территории Европейской части России произрастает около 20 близких видов, которые в природных условиях не различаются и заготавливаются наравне с тимьяном ползучим. Однако, химический состав их изучен недостаточно. Установлено, что одной из групп действующих веществ растений рода тимьян являются фенольные соединения [4, 6].

Целью нашей работы явилось изучение фенольных соединений растений рода тимьян, произрастающих в областях Центрального Черноземья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Объектом исследования служили трава тимьяна мелового (*Thymus cretaceus* Klok. et Schost.), тимьяна блошиного (*Thymus pulegioides* L.), тимьяна Маршалла (*Thymus marchallianus* Willd), тимьяна двуликого (*Thymus dimorphus* Klok. Et Shost.), заготовленные в 2010 -2011 годах в Курской области в фазу цветения растений.

Выделение фенольных соединений осуществляли экстракцией 70% спиртом этиловым, растворитель отгоняли, очищали от липофильных примесей четыреххлористым углеродом. Учитывая разнообразие полярности сложной смеси флавоноидов, кумаринов и фенолкарбонновых кислот, очищенные водные экстракты фракционировали методом селективной экстракции диэтиловым эфиром, этилацетатом. Разделение смеси флавоноидов, оксикоричных кислот, кумаринов проводили методом препаративной хроматографии на колонках в сочетании с препаративной хроматографией на бумаге.

Структуру выделенных веществ устанавливали с использованием классических химических и физико-химических методов анализа на основании физико-химических свойств исходных соединений и продуктов их превращения, УФ- и ИК-спектров, величин R_f в различных системах растворителей, а также температур плавления проб смешения с достоверными образцами [1].

Для количественного определения флавоноидов использовали спектрофотометрический метод, основанный на реакции взаимодействия флавоноидов с алюминия хлоридом в среде 70 % спирта этилового и модифицированный нами. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного и просеянного сквозь сито с отверстиями диаметром 2мм, сухого сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл 70 % этилового спирта и взвешивают. Колбу присоединяют к обратному водяному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течении 60 минут периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым охлаждают, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы 70 % спиртом этиловым. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. 2,5 мл фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 5 % раствора алюминия хлорида в 70 % спирте этиловом и через 10

мин 1 мл 3 % кислоты уксусной. Объем раствора доводят 70 % спиртом этиловым до метки и оставляют на 30 мин.

Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 395 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2,5 мл исходного извлечения, 1 мл 3 % раствора кислоты уксусной и доведенный 70 % спиртом этиловым до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл [7].

Для качественного определения дубильных веществ готовили водные извлечения (1:10) на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Извлечение фильтровали и использовали для проведения реакций с 10% раствором желатина, с железо-аммонийными квасцами, с формальдегидом и концентрированной кислотой хлористоводородной [5].

Для количественного определения дубильных веществ использовали метод перманганатометрии, являющийся фармакопейным для определения дубильных веществ [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.

Установлено, что выделенные фенольные соединения растений рода тимьян представлены флавоноидными соединениями (7 веществ), фенолкарбоновыми кислотами (5 соединений), кумаринами (2 соединения), дубильными веществами.

Выделенные флавоноиды по результатам качественного анализа, хроматографии в различных системах растворителей, УФ-спектроскопии, продуктов количественного кислотного гидролиза, физико-химических свойств отнесены к агликонам флавонов и флавонолов, моногликозидам флавонов. Агликоны представлены: апигенином, лютеолином, акацетином, кверцетином. Углеводная часть у моногликозидов представлена глюкозой и глюкуроновой кислотой, присоединена она по 7 положению молекул гликозидов. В продуктах кислотного гидролиза исследуемых соединений идентифицировали лютеолин, апигенин и скутеллареин. Таким образом, исследуемые флавоноиды были идентифицированы как цинарозид (лютеолин-7-глюкозид), космоссин (апигенин-7-глюкозид), скутеллярин (скутелляреин-7-глюкуронозид).

Установление структуры выделенных фенолкарбоновых кислот и их производных проводили по флуоресценции пятен на хроматограммах, качественным цветным реакциям с железа хлоридом, диазотированной кислотой сульфаниловой и бромкрезоловым зеленым, УФ-спектрам, физическим константам, хроматографической подвижности. Они идентифицированы как хлорогеновая, кофейная, розмариновая, феруловая, п-кумаровая

кислоты.

Выделенные кумарины идентифицировали по флуоресценции пятна на хроматограмме в УФ-свете, хроматографической подвижности, данным УФ-, ИК-спектров. Кумариновая природа исследуемых соединений подтверждена также деструкцией кислотой йодистоводородной в среде жидкого фенола. В сравнении с достоверными образцами их охарактеризовали как скополетин и умбеллиферон.

Анализ результатов спектрофотометрического определения флавоноидов показал, что в траве исследуемых тимьянов содержание их колеблется от 1,11% (тимьян Маршалла) до 2,87 % (тимьян блошиный). В то время как в траве тимьяна ползучего содержание флавоноидов составляет около 1,50%.

Результаты качественного определения дубильных веществ показали, что в сырье исследуемых тимьянов содержатся дубильные вещества преимущественного конденсированной группы. Содержание дубильных веществ колеблется от 5,26 % до 14,82%.

Таким образом, в результате проведенных исследований изучены фенольные соединения растений рода тимьян флоры Центрального Черноземья. Установлено, что растения данного рода содержат фенольные соединения, представленные флавоноидами, фенолкарбоновыми кислотами, кумаринами, дубильными веществами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бубенчиков, Р.А. Изучение фенольных соединений и полисахаридов травы фиалки скальной / Р.А. Бубенчиков // Башкир. Хим. журн. - 2011, т. 18, № 1. – С. 128-130.
2. Государственная фармакопея СССР. – 11- изд. – М.: Медицина, 1987. – Вып. 1. –277с.
3. Государственная фармакопея СССР: Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. М.: Медицина, 1989. - 400 с.
4. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Том. 3: Покрывосеменные (двудольные: раздельнолепестные) / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров - Москва : Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований. 2004. – С.105.
5. Лекарственные растения Государственной фармакопеи (под. Ред. И.А. Самылиной, В.А. Северцева – М.: АНМИ-2003. -534 с.
6. Растительные ресурсы России. Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 4. Семейства Caprifoliaceae - Lobeliaceae. /Отв. ред. А.Л. Буданцев. - СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. - 630 с.
7. Смирнова, Л.П. Количественное определение суммы флавоноидов в

УДК 541.15

РАДИОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРИСУТСТВИИ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ

Валуева М.И.¹, Фёдорова А.В.², Фенин А.А.², Олтаржевская Н.Д.¹

¹Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского, Москва, Россия;

²Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия тел.: 8-916-323-00-98 e-mail: valigmashir@mail.ru

Альгинат натрия – природный полимер, получаемый из клеточных стенок бурых морских водорослей. Данный полисахарид имеет широкий спектр лечебных свойств и разрешен к применению в медицине, что позволяет использовать его при создании изделий медицинского назначения. Целью исследования является разработка на основе альгината натрия радиозащитных материалов для их применения при проведении лучевой терапии раковых опухолей. Актуальность работы заключается в необходимости защиты здоровых тканей, окружающих опухоль, от попадающего на них при облучении ионизирующего излучения. Для создания таких материалов используется гидрогель альгината натрия [1], в композицию с которым включены лекарственные препараты, обладающие радиопротекторной активностью. Сведений о радиопротекторных свойствах самого биополимера при внешнем облучении в настоящее время недостаточно.

Известно, что альгинат натрия обладает свойством хелатировать ионы металлов. Ранее [2], было показано, что разрушение металлокомплексов фенолов приводит к увеличению протекторной активности последних. В связи с этим представляет интерес изучение радиопротекторной активности альгината натрия и его влияния на радиопротекторную активность фенольных соединений при наличии ионов металлов.

Были исследованы следующие фенольные соединения: рутин, кверцетин, пирокатехин, морин, галловая кислота, 4-метилэскулетин; в качестве ионов металлов были выбраны такие микроэлементы как железо, медь, цинк. Для проверки радиопротекторной активности использовалась тест-система на

основе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* раса Феодосия – 7.

Исследования показали наличие у альгината натрия радиопротекторной активности, сопоставимая с радиорезистентными свойствами рассматриваемых фенольных соединений. Для большинства исследованных соединений наблюдалось усиление их протекторной активности. Таким образом, альгинат натрия не является индифферентным компонентом в защитных системах, и его применение актуально.

ЛИТЕРАТУРА

1. Валуева М.И., Олтаржевская Н.Д. Исследование проблемы повышения устойчивости полимеров-загустителей при их радиационной стерилизации // Вестник молодых ученых СПГУТД. Вып. 1. Естественные и технические науки. – СПб., 2012. – С.52-58.
2. Суворова А.А., Фенин А.А. Влияние ионов металлов на радиопротекторную активность флавоноидов по отношению к дрожжевым клеткам // Радиационная биология. Радиозкология. – 2010. – Т.50. – №2. – С.180-185.

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИИ ЧЕРНИКИ (*VACCINIUM MIRTILUS* L) В ПРОЦЕССЕ ПЕРЕРАБОТКИ

Ванидзе М., Каландия А., Джапаридзе И., Камададзе Е.

Батумский Государственный Университет им. Шота Руставели, г. Батуми
Грузия, тел.: +271780, aleko.kalandia@gmail.com

Черника (*Vaccinium myrtillus* L) в Грузии произрастает во всех горных регионах. Плоды созревают с августа по конец сентября. Плоды черники известны высокой антиоксидантной активностью, из-за содержания в них антоцианов, флавоноидных гликозидов, фенолкарбоновых кислот и других биологически активных веществ. Плоды черники употребляют в свежем виде или перерабатывают, в основном сушат естественным образом или с помощью конвекционной сушки. Во время сушки теряется множество биологически активных веществ (до 70%). Производство и потребитель теряет почти все. Для производства имеет огромное значение сохранение в сухом плоде антоцианов и других биоактивных веществ.

Целью нашей работы являлось исследование состава плодов черники в процессе переработки методом ВЭЖХ для создания технологии снижавшей потери биоактивных веществ.

Экстракцию проб проводили 40% этанолом, подкисленным

1% HCl, при температуре -18°C. Полученные экстракты фильтровали через фильтры (0,45 мкр) и вводили в количестве 20 µl в инжектор хроматографа - Waters (USA), uv/visible Detector 2489, Binary HPLC Pump1525, хроматографическая колонка Symmetry C18, детектирование для фенолкарбоновых кислот 280 нм, 360 нм для флавоноидных гликозидов и 510 нм для антоцианов. Подвижная фаза 5 %-ая муравьиная кислота (А) и метанол (В), линейный градиент, скорость 0,7 мл/мин, температура колонки 40°C.

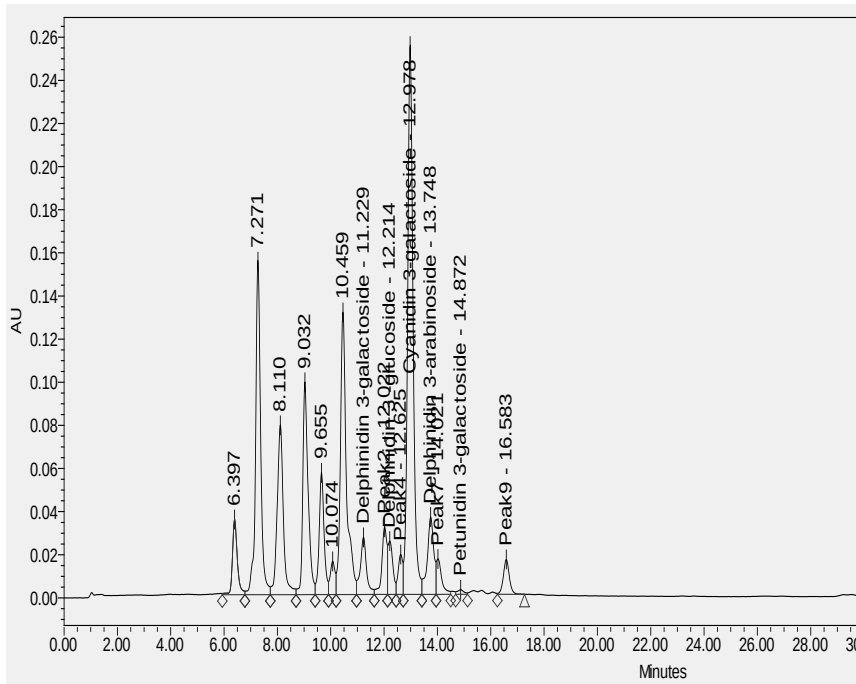


Рис. 1. Характерная хроматограмма антоцианов черники.

Для количественного анализа применили стандартный цианидин-3-О-глюкозид (в качестве внутреннего стандарта). Исследованы - свежие и замороженные плоды, сок, концентрат, отжим, сухой плод и отжим.

Свежие плоды и продукты переработки содержат значительное количество антоцианов и хлорогеновой кислоты (рис.1,2). Флавоноидных гликозидов на порядок меньше (рис.3). Замораживание плодов вызывает увеличение выхода антоцианов.

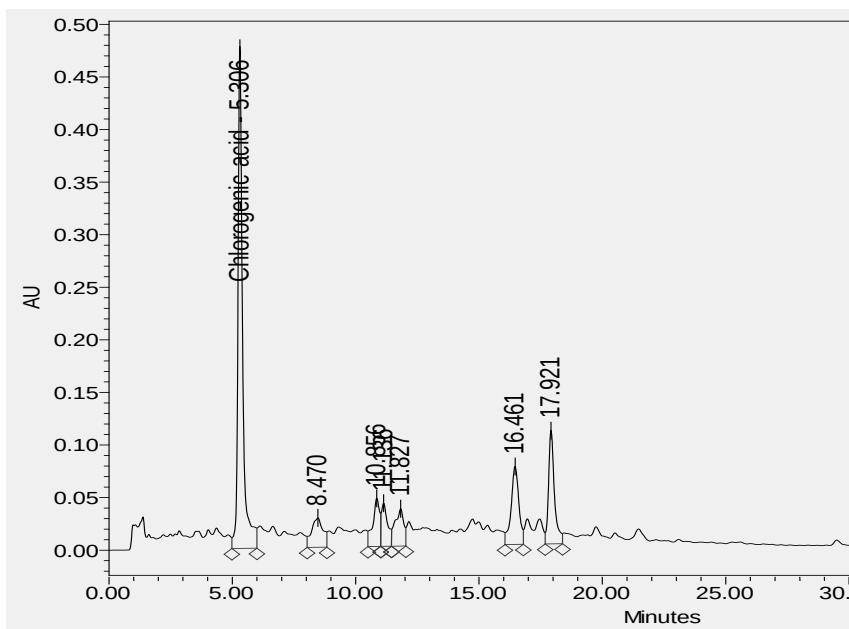


Рис. 2. Характерная хроматограмма фенолкарбоновых кислот черники.

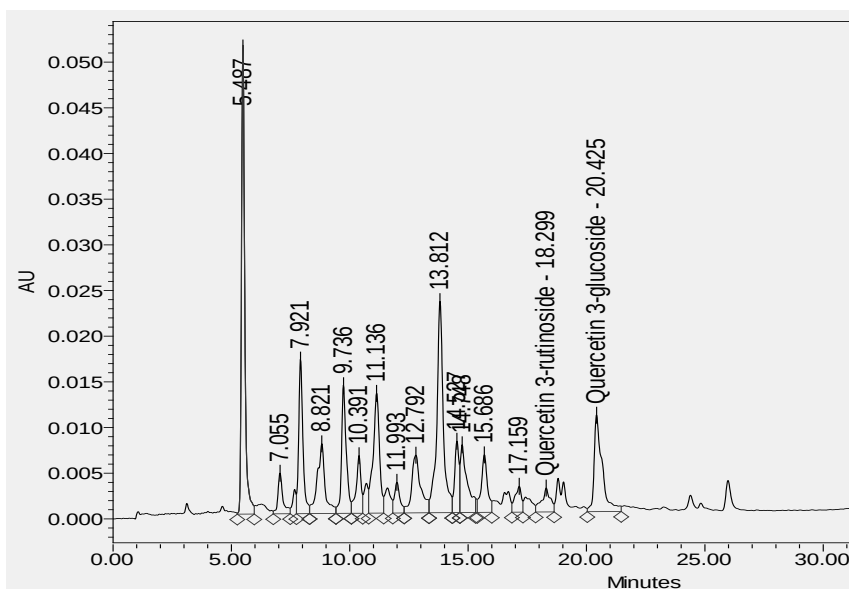


Рис. 3. Характерная хроматограмма флавоноидов черники.

Таблица 1.

Изменение содержания антоцианов во время переработки

Наименование продукта	Антоцианы, мг/кг	
	в пересчете на сырую массу	в пересчете на сухую массу
плоды черники 3% HCl в 40%-ом C ₂ H ₅ OH	1027,15	8151,98
Замороженные плоды (-20 ⁰ С) 3% HCl в 40%-ом C ₂ H ₅ OH	1376,01	8390,38
свежий сок черники	271,56	6171,8
отжим 0,1n HCl в 40%-ом C ₂ H ₅ OH	2387,56	8948,87
Высушенный отжим 0,1n HCl в 40%-ом C ₂ H ₅ OH	5526,95	7302,3
Концентрат 50%-ий	11075	22150
Высушенные плоды 0,1n HCl в 40%-ом C ₂ H ₅ OH	5336,74	6263,78

Созданная технология способствует получению продукта с содержанием антоцианов всего на 15 % ниже, чем в свежем (таб.). С другой стороны, из сока можно получить концентрат, где почти полностью сохранено содержание антоцианов, тогда как при прямой сушке плода теряется почти 25-30 %.

В заключение можно отметить, что избранная нами технология способствует получению продукта с высоким содержанием биоактивных веществ.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЬНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ПРИ АНАЛИЗЕ АНТИОКСИДАНТОВ В ВИНОГРАДНЫХ ВИНАХ

Волков В.А., Сажина Н.Н., Евтеева Н.М., Лапина Г.П.¹, Мисин В.М.

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

¹ФГБУ ВПО «Тверской государственный университет», Тверь, Россия
тел.: (915) 738-45-83, e-mail: vl.volkov@mail.ru

Фенольные соединения вносят определяющий вклад в антиоксидантную активность многих пищевых продуктов растительного происхождения, в том числе виноградных вин [1]. Польза этих веществ для организма человека неоспорима, поскольку свободнорадикальные процессы, ингибируемые антиоксидантами (АО), лежат в основе патогенеза многих распространенных заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых, онкологических, нейродегенеративных и др. На примере «французского парадокса» доказано, что регулярное употребление в пищу высококачественного красного виноградного вина весьма значительно снижает риск развития инфаркта миокарда [2]. Таким образом, содержание антиоксидантов является важным критерием пищевой ценности виноградного вина. Включение такой информации в перечень сведений, публикуемых на этикетках винных бутылок, могло бы оказать большую помощь потребителю в выборе наиболее полезного товара. Однако, разработка ГОСТа на определение содержания антиоксидантов в вине сдерживается недостаточным объемом и малой систематизированностью экспериментальных данных, характеризующих соотношение показателей, получаемых при помощи различных тест-систем между собой, а также с реальной способностью компонентов исследуемых объектов ингибировать свободнорадикальные цепные процессы в организме человека. При этом преимущество прямых методов определения АОА перед непрямыми не является очевидным как по экономическим соображениям, так и в силу того, что в основе прямых методов лежат сложные модельные системы, в которых одновременно протекает большое число химических реакций. Отдельные компоненты вводимых анализируемых образцов, а также продукты этих реакций, могут мешать проведению анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были выбраны 8

образцов красных (Buenos Aires, le Rose de Mouton Cadet, Каберне Массандра, Rune's Wine Merlot, Luis Felipe Edwards, Maison Francois Rouge, Isla Negra, Кадарка) и 5 образцов белых (Canepa Chardonnay, Алиготе Крымское, Maitre de Chai, Marquis de Salvary, Altas Cumbres) сухих столовых виноградных вин различных предприятий-производителей. Количество антиоксидантов в винах определяли с помощью методов, характеристика которых дана в таблице 1.

Таблица 1.

Краткая характеристика использованных методов количественного анализа АО

№ п/п	Тип метода	Модельная система	Тип детектирования	Литературная ссылка
1	непрямой	Отрыв атома водорода фенольного АО стабильным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ)	Спектрофотометрический	[3; 4]
2	непрямой	Окисление АО на аноде из стеклоглерода при потенциале 1,3 В (аппарат «ЦветЯуза-01-АА», НПО «Химавтоматика»)	Амперометрический	[5]
3	непрямой	Электровосстановление кислорода на ртутно-пленочном электроде (аппарат «Анализатор АОА», НПП «Полиант»)	Вольтамперометрический	[6]
4	прямой	Ингибирование иницированного цепного свободнорадикального жидкофазного окисления кумола	Волюмометрический	[7]

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистограммы, демонстрирующие результаты количественного анализа содержания антиоксидантов в белых и красных винах, рассчитанные с использованием галловой кислоты в качестве вещества сравнения, приведены на рис. 1 и 2.

Методы ДФПГ и амперометрии при анализе АО в красных винах показывают очень близкие по значениям результаты. В случае белых вин, результаты спектрофотометрического ДФПГ-метода в среднем в 5,9 раза ниже, чем амперометрического, однако корреляция сохраняется. Эти методы также хорошо коррелируют с данными вольтамперометрии (табл. 2).

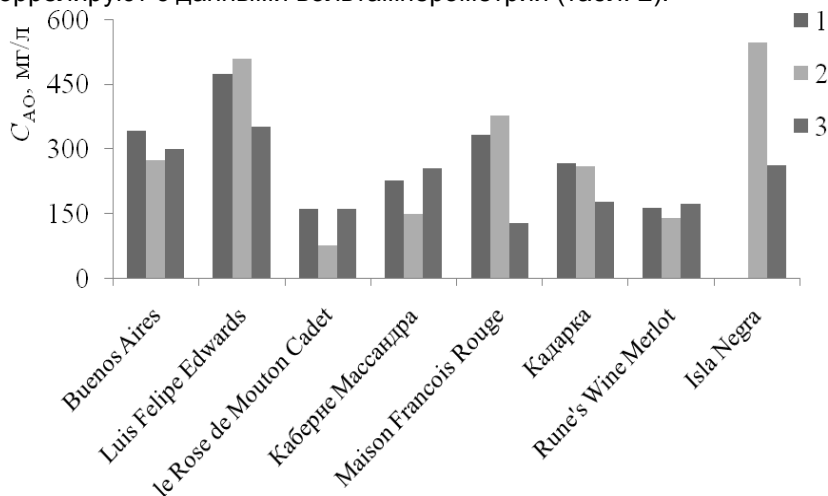


Рис. 1. Результаты количественного анализа АО в красных винах (в пересчете на галловую кислоту) по методу амперометрии (1), ДФПГ-методу (2), тесту окисления кумола (3).

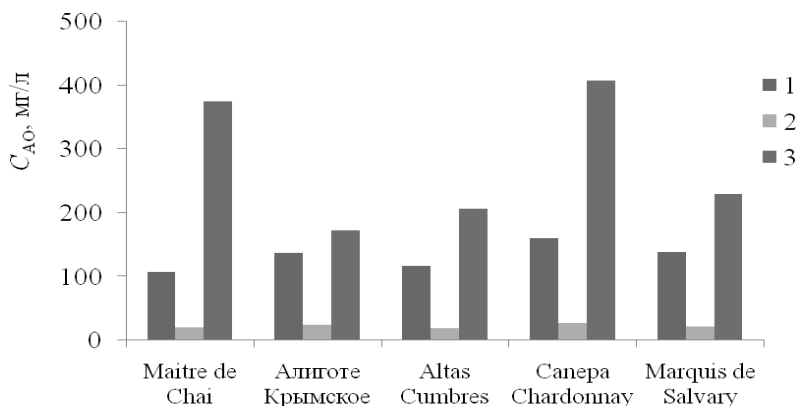


Рис. 2. Результаты количественного анализа АО в белых винах (в пересчете на галловую кислоту) по методу амперометрии (1), ДФПГ-методу (2), тесту окисления кумола (3).

Таблица 2.

Коэффициенты парной корреляции результатов анализа АО в винах,
полученных с помощью различных методов

	ДФПГ	амперометрия	вольтамперометрия
амперометрия	0,97		
вольтамперометрия	0,78	0,8	
инициированное окисление кумола	0,016	0,12	0,19

Однако, при сопоставлении полученных результатов с данными теста окисления кумола (прямой метод), получается более сложная картина. В случае красных вин для 4 образцов (*Buenos Aires, le Rose de Mouton Cadet, Каберне Массандра, Rune's Wine Merlot*) результаты получаются примерно одинаковыми; в случае же других образцов (*Luis Felipe Edwards, Maison Francois Rouge, Кадарка*) данные амперометрии и ДФПГ существенно выше. При анализе белых вин получается противоположная картина: данные прямого метода во всех случаях превышают данные непрямых.

Поскольку при изготовлении белого вина подвергается брожению только виноградный сок, а при производстве красного – сок вместе с мякотью и кожурой, то очевидно, что количество антиоксидантов в красном вине должно быть значительно больше, чем в белом, что подтверждается данными различных исследований. Так, в [8] на примере теста ингибированного окисления холестерина (прямой метод) показано 10-кратное превышение содержания АО в красных винах по сравнению с белыми винами. В проведенных нами исследованиях спектрофотометрический метод показывает заметно большую разницу между показателями количества АО в красных и белых винах (в среднем в 13 раз) по сравнению с амперометрией (в 2,1 раза) и вольтамперометрией (в 4 раза), что ближе к данным, имеющимся в литературе. Эксперименты на основе модельной реакции ингибированного жидкофазного окисления кумола не выявили разницы в содержании АО между красными и белыми винами, что требует дополнительных исследований с целью выяснения причин подобного результата и факторов, мешающих корректному определению антиоксидантов виноградных вин в этой системе. Представляет также интерес для дальнейших исследований выяснение, к каким веществам чувствителен амперометрический метод и малочувствителен метод ДФПГ-теста, что поможет делать между этими методами более корректный выбор.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и влияние их на здоровье и старение человека. М.: ТрансЛит, 2009. 212 с.
2. Harbome J. B., Williams C. A. Advances in flavonoid research since 1992 // Phytochemistry. 2000. V. 55. P. 481-504.
3. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity // Lebensm.-Wiss. u.-Techol. 1995. V. 28. P. 25-30.
4. Волков В.А., Сажина Н.Н., Мисин В.М. Сравнительные испытания спектрофотометрического и амперометрического методов количественного анализа антиоксидантов в объектах растительного происхождения // Прикладная аналитическая химия. 2011. Т. II, № 3. С. 26-32.
5. Яшин А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках // Рос. хим. журн. 2008. Т. LII, № 2. – С. 130-135.
6. Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Avramchik O.A. Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biological-active substances by voltammetry. // Anal. and Bioanal. Chem. 2003. V. 375, №. 1-3. P. 465-468.
7. Харитонов А.А., Козлова З.Г., Цепалов В.Ф., Гладышев Г.П. Кинетический анализ свойств антиоксидантов в сложных композициях с помощью модельной цепной реакции // Кинетика и катализ. 1979. Т. XX, вып. 3. С. 593-599.
8. Tian L., Wang H., Abdallah A.M., Prinyawiwatkul W., Xu Z. Red and White Wines Inhibit Cholesterol Oxidation Induced by Free Radicals // J. Agric. Food Chem. 2011. V. 59. P. 6453–6458.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ В СРЕДЕ СУБКРИТИЧЕСКОЙ ВОДЫ И МЕТОДОМ МАЦЕРАЦИИ

Володченко И.И., Лесишина Ю.О., Дмитрук А.Ф.

Донецкий национальный университет экономики и торговли имени
Михаила Туган-Барановского, Донецк, Украина, e-mail:
iravolodchenko@mail.ru

В работе представлены результаты оценки антирадикальной активности сухих водных экстрактов следующих лекарственных растений: листьев и цветков боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.), цветков липы сердцевидной (*Tilia cordata* Mill.), бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium*

L.), ромашки аптечной (*Matricaria recutita* L.) и травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.). Растительные экстракты, получали двумя способами: в среде субкритической воды (температура 120°C, давление 0,2 МПа, продолжительность экстракции – 10 минут), а также методом мацерации при температуре 25 °С в течение 48 часов. Соотношение растительное сырье : вода во всех случаях было одинаковым и составляло 1:10.

Качественный и количественный анализ группового химического состава полученных экстрактов показал присутствие в них фенольных соединений (около 5 %), в том числе флавоноидов, что позволило прогнозировать антиокислительную активность экстрактов. Причем количество фенольных соединений и флавоноидов, извлеченных водой в субкритическом состоянии, на порядок (в 7-12 раз) выше по сравнению с количеством фенолов, извлеченных традиционным методом.

Антиокислительную активность растительных экстрактов оценивали, изучая кинетику реакции их взаимодействия со свободным стабильным хромоген-радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ). Изменение концентрации ДФПГ определяли спектрофотометрическим методом при температуре 290 К. Молярный коэффициент поглощения этанольного раствора ДФПГ при длине волны 518 нм равен 5719 л/моль·см. Концентрация растворов сухих водных экстрактов в каждом отдельном случае составляла 0,2-0,3 г/л. Сухие экстракты предварительно растворяли в воде, а затем смешивали с этанольным раствором ДФПГ концентрацией 0,0197 г/л (или $0,5 \times 10^{-4}$ моль/л) непосредственно в кювете спектрофотометра и регистрировали изменение оптической плотности раствора ДФПГ.

Кинетические кривые расходования ДФПГ в реакции с экстрактами представлены на рисунке 1, где t – время реакции, сек.

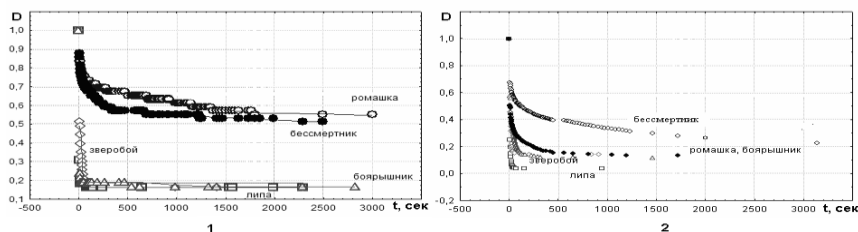


Рис. 1. Кинетические кривые изменения приведенной оптической лотности (D) ДФПГ в реакции с растительными экстрактами: 1 – с экстрактами, полученными методом мацерации; 2 – с экстрактами, полученными в среде субкритической воды.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что все исследуемые экстракты обладают антирадикальной активностью. Анализ кинетических кривых показал, что кинетика реакции взаимодействия ДФПГ с фенольными соединениями, входящими в состав экстрактов, в интервале 0 – 200 секунд в случае избытка экстракта подчиняется кинетике обратимой реакции первого порядка по ДФПГ:

$$D = k_{-}/(k_{+} + k_{-}) + (k_{+}/(k_{+} + k_{-})) \cdot \exp(-(k_{+} + k_{-}) \cdot t) \quad (1)$$

где k_{+} и k_{-} - константы скорости прямой и обратной реакции ДФПГ с растительными экстрактами, сек⁻¹.

Поэтому реакцию способность экстрактов оценивали по величине константы равновесия ($K_p = k_{+}/k_{-}$) реакции ДФПГ с растительными экстрактами. Величины констант равновесия реакции ДФПГ с экстрактами, рассчитанные в соответствии с уравнением (1), представлены в таблице 1.

Таблица 1.
Величины констант равновесия реакции ДФПГ с различными экстрактами

экстракт	K_p (для экстрактов, полученных методом мацерации)	K_p (для экстрактов, полученных в среде субкритической воды)
бессмертник	0,9	-
боярышник	4,7	5,9
зверобой	4,2	7,8
липа	4,9	29,6
ромашка	0,8	-

Как видно из таблицы 1, наибольшей антирадикальной активностью обладают экстракты, полученные в среде субкритической воды, причем реакционная способность экстрактов увеличивается в ряду боярышник < зверобой < липа. Экстракты тех же растений, но полученные методом мацерации, характеризуются сравнительно одинаковой реакционной способностью ($K_p \sim 4-5$).

Таким образом, антирадикальная активность экстрактов, полученных в среде субкритической воды, выше активности экстрактов, полученных традиционным методом. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что методика экстракции в среде субкритической воды является весьма перспективной для создания фитопрепаратов, обладающих высокой антирадикальной активностью.

СОЕДИНЕНИЯ, ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫЕ В РАСТЕНИЯХ *LIMONIUM MYRIANTHUM*

Гадецкая А.В., Жусупова Г.Е., Абилов Ж.А.

Казахский Национальный Университет имени аль-Фараби, Алматы,
Казахстан, e-mail: avg01.08@mail.ru

В связи с постоянно растущими потребностями фитохимических производств Республики в растительном сырье, необходимо комплексное изучение растений, произрастающих на территории Казахстана и имеющих достаточную сырьевую базу. Род *Limonium* Mill имеет вполне значительные перспективы для исследований в этом направлении. В Казахстане насчитывается 19 видов кермека, с 3 эндемиками [1]. Из двух промышленно значимых на территории Казахстана видов растений рода *Limonium* Mill (*L. gmelinii*, *L. myrianthum*) наиболее полно изучены корни *L. gmelinii*. Они введенны в ГФ РК. На их основе получен ряд лекарственных средств (настойка, сироп, мазь, таблетки, суппозитории, стоматологические пленки), которые рекомендованы к применению в медицинской практике в качестве препаратов, обладающих противовоспалительным, противовирусным, противомикробным действием [2,3,4]. Исследования качественного и количественного состава растений вида *L. myrianthum* указывают на высокое содержание различных классов биологически активных веществ полифенольной природы. Фенольные соединения определяют лечебное действие лекарственных растений. Они встречаются в растениях в виде мономеров, димеров и олигомеров в свободном виде или в виде гликозидов и активно участвуют в процессах обмена веществ. Поэтому целесообразно провести разделение и более глубокое изучение соединений, входящий в состав исследуемых растений. А также необходимо установить различные виды активности выделенных индивидуальных веществ.

Для этого, первоначально проводилась избирательная экстракция исследуемых объектов разнополярными растворителями, с целью удаления липофильных компонентов и балластных веществ растений, а также для достижения предварительного частичного разделения различных групп БАВ. 180 г воздушно-сухой надземной массы растений *Limonium myrianthum* экстрагировали 300 мл гексана дважды (300 мл x 2). Объединенные экстракты фильтровали и концентрировали в мягких условиях для удаления гексана. Далее сырье последовательно и исчерпывающе экстрагировали вначале ацетоном, а затем метанолом и 50% раствором метанола в воде.

Полученные фракции также фильтровали и затем концентрировали под вакуумом в мягких условиях. В итоге было получено 1.517 г сухого гексанового экстракта, 1.513 г ацетонового экстракта, 8.678 г метанольного экстракта и 8.415 г 50%-ного метанольного экстракта соответственно. Такую же процедуру по вышеописанной методике проводили и с корнями растений *Limonium myrianthum*, однако масса сырья составила 300 г, учитывая степень набухания измельченных растений, для надземной части потребовалось большее количество растворителя. Итак, соответственно из корней получили 0.222 г сухого гексанового экстракта, 23.40 г ацетонового экстракта, 38.421 г метанольного экстракта и 17.85 г 50%-ного метанольного экстракта. Далее исследовали полученный ацетоновый экстракт, который проявил наиболее высокую антиоксидантную активность, фракционировали на колонке, заполненной силикагелем, элюирование проводили смесью растворителей метиленхлорида и метанола в различных концентрациях с увеличением полярности системы. При этом получили 14 фракций (1-14). Каждая из выделенных фракций концентрировалась в мягких условиях. В результате было получено: 1 фракция массой 33 мг (элюент метиленхлорид), 2 фракция – 17,2 мг (элюент 5 % раствор метанола в метиленхлориде), 3 фракция – 64 мг (элюент 10 % раствор метанола в метиленхлориде), 4 фракция – 220 мг (элюент 15 % раствор метанола в метиленхлориде), 5 фракция – 1,19 г (элюент 20 % раствор метанола в метиленхлориде), 6 фракция – 3,2 г (элюент 25 % раствор метанола в метиленхлориде), 7 фракция – 3,9 г (элюент 30 % раствор метанола в метиленхлориде), 8 фракция – 2.08 г (элюент 30 % раствор метанола в метиленхлориде), 9 фракция – 2 г (элюент 35 % раствор метанола в метиленхлориде), фракция 10 – 1.22 г (элюент 40 % раствор метанола в метиленхлориде), 11 фракция – 1.98 г (элюент 50 % раствор метанола в метиленхлориде), 12 фракция – 1.66 г (элюент 60 % раствор метанола в метиленхлориде), 13 фракция – 787 мг (элюент 60 % раствор метанола в метиленхлориде), 14 фракция – 1.02 г (элюент - метанол).

Фракцию 4 очищали методом flash-хроматографии на силикагеле с использованием в качестве элюентов систему растворителей CH_2Cl_2 -MeOH в соотношении (от 100:0 до 0:100). При этом получено 38 фракций В₁-В₃₈. Из объединенных фракций В₂₅-В₂₆ было выделено вещество 1, которое на основании физико-химических констант и данных кислотного гидролиза вещество 1 идентифицировано как 3-О- α -L-рамнопиранозид мирицетина. Хроматографически одинаковые фракции В₁₆-В₁₈ объединяли и

подвергали дальнейшему разделению на колонке, заполненной сеффадексом, элюирование проводили метанолом. Получили 96 фракций C₁-C₉₆. Из фракции C₆₃-C₇₀ выделили вещество 2, и из фракции C₈₃-C₉₆ – вещество 3. А фракции C₂₃-C₅₃ были также идентифицированы как вещество 1 (3-О-α-L-рамнопиранозид мирицетина). Вещество 2 представляет собой аморфный порошок желтого цвета.

В ¹H-ЯМР-спектре имеется 2-х протонный дуплетный сигнал при 3.235 м.д. и 4 однопротонных сигнала, характерных для арабинозы. Аномерный протон этого же углевода резонирует в области 5.174 м.д., что указывает на α-связь арабинозы и его пиранозную форму. Два дублетных сигнала в области 6.141 и 6.322 м.д. с константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) J=1.6 Гц, характеризуют сигналы кольца А флавонола и указывают на 5,7-тип его замещения. Наличие двухпротонного синглета в области 7.140 м.д. (2'-H и 6'-H) подтверждает 3',4',5'-гидроксильное замещение кольца В. В масс-спектрах исследуемого вещества прописаны пики молекулярных ионов с m/z 450, который соответствует формуле C₂₀H₁₈O₁₂. На основании вышеизложенного, вещество 2 идентифицировано как 3-О-α-L-арабинопиранозил-5,7,3',4',5'-пентагидроксифлаван (3-О-α-L-арабинопиранозид мирицетина). Вещество 3 отнесено к мономерным формам флаван-3-олов по качественной реакции с ванилином (красное окрашивание), характерной для флаванов. Образование с солями железа комплексов синего цвета свидетельствует о наличии ароматического кольца с тремя вицинальными гидроксильными группами.

При нагревании с 2 М раствором хлороводородной кислоты не образуется антоцианидиновый краситель, что подтверждает мономерность структуры. При щелочной деструкции образуются флороглюцин и галловая кислота, что указывает на наличие метарасположенных фенольных гидроксильных групп кольца А и трех вицинальных фенольных гидроксильных групп в боковом ароматическом кольце В флаван-3-олов. Исследуемый флаван является галлоильным производным эпигаллокатехина, так как при его кислотном гидролизе образуются эпигаллокатехин и галловая кислота, поэтому вещество 3 идентифицировано как эпигаллокатехин-3-О-галлат. При хроматографическом разделении фракции 9 на сеффадексе марки LH-20, получили 160 фракций D₁-D₁₆₀. Из объединенных хроматографически одинаковых фракций D₇₄-D₈₅ и D₁₅₀-D₁₅₈ получены вещества 4 и 5 соответственно.

Вещество 4 отнесено к флавоноловому гликозиду с замещенной 3-ОН группой на основании УФ-спектра, качественных

реакций и хроматографического поведения. В ^1H ЯМР-спектре вещества 4 двухпротонный синглет в области 7,08 м.д. соответствует галловой кислоте, однопротонный дублет в области 5,17 м.д. с КССВ, равной 6,6 Гц, принадлежит H-1"-протону α -L-арабинозы. С-3 место присоединения галлоил-арабинозы определено при помощи спектров ^{13}C ЯМР – DEPT и HMBС. В спектре ^{13}C ЯМР прописаны 27 углеродных атомов. Расположение сигналов колец А и В полностью соответствует литературным данным для мирицетина, арабинозы и галловой кислоты. Таким образом вещество 4 идентифицировано как 3-О- α -L-(2"-О-галлоил)-арабинопиранозил-5,7,3',4',5'-пентагидроксифлавонол или 3-О- α -L-(2"-галлоил)-арабинопиранозид мирицетина.

Вещество 5 на основании качественных реакций и хроматографического поведения отнесено к флавонолу со свободной 3-ОН группой. При щелочной деструкции образуется флороглюцин, что указывает на наличие мета-расположенных фенольных гидроксиллов в кольце А флавонола. В кислотном гидролизате вещества 5 не обнаружены ни галловая, ни протокатеховая кислоты, что свидетельствовало об иной степени гидроксирования бокового ароматического кольца В, отличного от кверцетина и мирицетина. В ^{13}C ЯМР-спектре вещества 5 присутствуют сигналы 15 углеродных атомов. Сдвиг сигнала С-6' в кольце В составляет 26,0 м.д., что свидетельствует о наличии 6'-ОН группы. На основании физико-химических данных вещество 5 идентифицировано как 3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлавонол. Наличие гидроксильной группы именно в положении 6' вещества согласуется с данными его щелочного плава, качественными реакциями, положением на хроматограмме и подтверждает его структуру. Таким образом, из исследуемых растений был выделен ряд веществ различной полифенольной природы, причем следующие соединения: 3-О- α -L-арабинопиранозид мирицетина и 3-О- α -L-(2"-галлоил)-арабинопиранозид мирицетина, выделены из исследуемого вида растения впервые.

Все фитопрепараты, полученные в качестве сухих экстрактов из корней и надземной части изучаемых растений были исследованы на антибактериальную, противогрибковую, антималярийную и противомикробную активности. К сожалению, ни один препарат не показал антималярийную активность. Это может быть связано с отсутствием определенного класса веществ (N-содержащие), отвечающих за проявление этой активности в составе растений данного вида. Однако, шесть фитопрепаратов из растений *L. myrianthum* показали хорошую противогрибковую

активность по отношению к микроорганизмам *Candida Glabrata*, *Candida krusei*, а метанольный и ацетоновый экстракты – к организмам *Candida albicans*. Выявлена антибактериальная активность по отношению к *P. aeruginosa*. А выделенное индивидуальное соединение – эпигаллокатехин-3-О-галлат, помимо противогрибковой и антибактериальной активностей, имеет высокие показатели противомикробной активности при минимальной концентрации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кукунов М.К. Лекарственные растения Казахстана и их использование - Алматы, 1996. - С. 71-72.
2. Батырбеков Е.О., Зейнелова А.А., Жусупова Г.Е., Зазулевская Л.Я. Диффузия лимонида из поливинилспиртовых пленок// Известия НТО «КАХАК» - 2008. - №2(21). - С. 41-45.
3. Жусупова Г.Е. Новое лекарственное средство на основе растительной субстанции, выделяемой из корней кермека Гмелина// Поиск. - 2006. - № 1. - С. 25-27.
4. Производство субстанции Лимонидин и 5% мази «Санжар»// Матер. Междунар. науч.-практич. конф. «Индустриально-инновационное развитие Республики Казахстан: опыт, задачи и перспективы» - Алматы, 2004. - С. 376-380.

УДК 577.1;547.7

КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА С В-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

Дейнека В.И., Лапшова М.С., Макаревич С.Л., Проворная Т.В., Дейнека Л.А.

ФГБОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия, тел.: 8-961-170-18-76, e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Дигидрокверцетин (ДГК), - 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлаванон или таксифолин, обладает экспериментально подтвержденной высокой биологической активностью [1]. Однако, как и большинство флавоноидов, он не отличается высокой растворимостью в воде. Один из способов увеличения растворимости состоит в том, что получают комплексы включения целевых соединений с циклодекстринами (ЦД) за счет внедрения гидрофобных соединений в считающуюся гидрофобной полость молекулы «хозяина». К настоящему времени известна работа [2], в которой исследовали комплексообразование между

ДГК и различными ЦД несколькими физико-химическими методами, определив рост константы устойчивости комплексов ($K_{уст.}$) от α - до γ -ЦД (от 1872 до 2908) в спиртово-водном (1:4) растворе. Это удивительно, поскольку по нашим данным такие растворители как ацетонитрил, метанол и (тем более) этанол конкурируют за право занять полость молекулы «хозяина», существенно уменьшая $K_{уст.}$ даже при умеренных концентрациях органических растворителей в воде. Можно отметить также работу [3], в которой утверждалось, что добавка β -ЦД в подвижную фазу позволяет разделить одну из двух пар энантиомеров: (-)-2S,3S и (+)-2R,3R-изомеров ДГК в методе обращенно-фазовой ВЭЖХ. Впрочем, представленные в работе хроматограммы не отличаются высокой эффективностью, из-за чего отсутствуют два остальных изомера, один из которых (присутствующий в небольших количествах даже в природном ДГК) по нашим данным легко детектируется в соответствующих условиях элюирования.

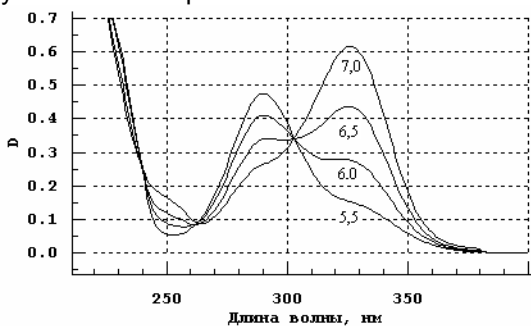


Рис.1. Спектры ДГК в фосфатных буферных растворах при pH 5,5-7.

В настоящей работе для исследований использовали очищенный дигидрокверцетин производства ООО «Таксифолия», г. Белгород. Концентрацию дигидрокверцетина в исследуемых растворах определяли методом ВЭЖХ. При этом было установлено, что растворимость ДГК почти линейно возрастает от 0.00158 моль/л при 2°C до 0,00426 моль/л при 30°C; в дальнейшем наблюдается более интенсивный рост растворимости (до 0.0313 моль/л при 60°C). Следует отметить, что УФ-определение дигидрокверцетина имеет особенность: дело в том, что в УФ-спектре раствора ДГК обнаруживается две полосы – интенсивная ($\lambda_{max} = 290$ нм) и слабая ($\lambda_{max} = 320$ нм). Запись спектров при различных pH (фосфатных буферных растворах) показала, что это - две полосы, относящиеся к двум различным состояниям ДГК,

поскольку на рис.1 четко обозначается изобестическая точка, координаты которой могут быть использованы для беспроblemного количественного определения ДГК. Возникновение этой точки мы объясняем диссоциацией самой кислой ОН-группы в положении 5, что было подтверждено квантово-химическими расчетами в среде HyperChem 8.0.

Комплексообразование ДГК с β -ЦД контролировали двумя методами. По первому методу исследовали изменение растворимости дигидрохверцетина в растворах с различной концентрацией β -ЦД при температурах от 20°C до 30°C, рис.2.

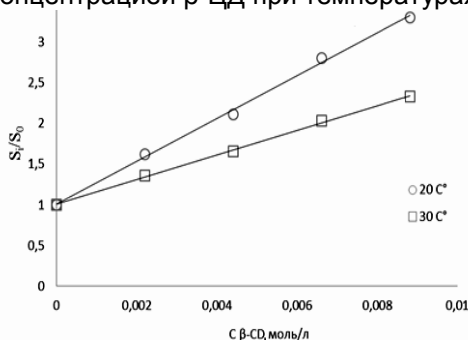


Рис.2. Определение констант комплексообразования ДГК и β -циклодекстрина S – площади пиков ДГК на хроматограммах соответствующих насыщенных растворов.

В результате были рассчитаны $K_{уст.}$, оказавшиеся на порядок ниже приведенных в работе [2]: от 270 моль/л при 273 К до 156 моль/л при 303 К; изменения энтальпии и энтропии при комплексообразовании (в вакууме) составили -40.9 кДж/моль и -93.1 Дж/(моль·К), соответственно. Т.е. образование комплекса - экзотермический процесс, что указывает на лучшую сольватацию ДГК гидрофобной внутренней поверхностью ЦД по сравнению с водой; отрицательное изменение энтропии соответствует упорядочению в системе.

При изучении комплекса ДГК с β -ЦД методом молекулярной механики в программной среде Hyperchem 8.0 были найдены 2 локальных минимума для комплексов в котором молекула ДГК внедряется с энергией -52,31 ккал/моль в полость β -циклодекстрина кольцом В и кольцами А + С с энергией лишь не намного меньшей -46,35 ккал/моль, рис.3, что сопоставимо с экспериментально полученными результатами.

Второй метод, использованный в настоящей работе для определения $K_{уст.}$ – метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с добавками

β -ЦД в подвижную фазу. Образование комплексов включения приводит к уменьшению доли свободного ДГК в подвижной фазе и, как следствие, – к уменьшению его времени удерживания.

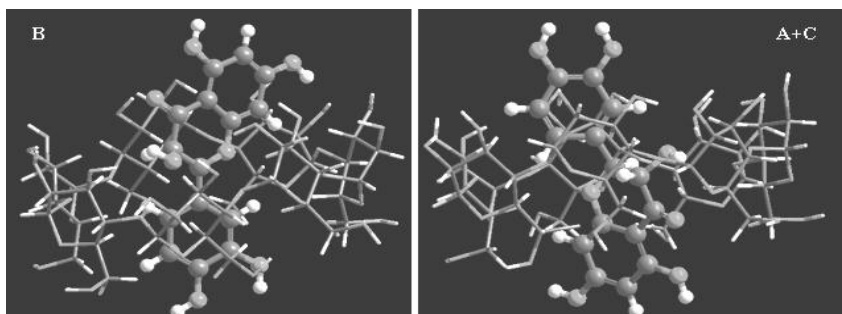


Рис.3. Комплекс включения дигидрокверцетина с β -циклодекстрином.

Особенности метода – возможность сорбции β ЦД (которая подтверждена в работе экспериментально) на привитых радикалах обращенной фазы и соответствующее модифицирование стационарной фазы, и необходимость введения органических модификаторов для достижения приемлемых времен удерживания и для получения симметричных пиков с достаточно эффективностью. Влияние сорбционного модифицирования стационарной фазы может быть устранено или уменьшено заменой традиционных октадецилсилановых фаз (C18) на другие (C1 – C4) – с меньшей длиной привитого радикала. Вторую проблему полностью решить нельзя.

$K_{уст.}$ комплексов ДГК с β -циклодекстрином в подвижных фазах, содержащих 2 об.% муравьиной кислоты и ацетонитрил

Температура, К	К, л/моль в элюентах, содержащих ацетонитрил с об. %		
	12,5	15,0	17,5
308	44.1 ± 2.2	24.0 ± 1.2	19.8 ± 1.3
313	35.0 ± 2.2	22.1 ± 2.1	18.3 ± 1.4
318	31.2 ± 2.0	18.6 ± 1.4	16.7 ± 1.8

Как следует из представленных данных, введение ацетонитрила и муравьиной кислоты заметно уменьшают кажущуюся константу устойчивости комплексов, что свидетельствует о конкуренции компонентов подвижной фазы и ДГК за место в полости ЦД. Это подтверждается и тем, что энтальпия комплексообразования снижается вдвое (по модулю): от

-28 кДж/моль до -14 кДж/моль при росте концентрации ацетонитрила с 12.5 до 17.5 об. %.

Следовательно, β -циклодекстрин позволяет увеличить растворимость (а с ним и биодоступность) ДГК в водных растворах, что может быть использовано для создания лекарственных средств с большей (как утверждается в патенте [4]) эффективностью.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ «Государственное задание вузу на 2012 г, проект № 3.1785.2011».

ЛИТЕРАТУРА

1. Плотников М.Б., Тюкавкина Н.А., Плотникова Т.М. Лекарственные препараты на основе дигидрокверцетина. Томск: Изд-во Том ун-та, 2005, 228 с.
2. Yang L.-J., Chen W., Ma S.-X., Gao Y.-T., Huang R., Yan S.-J., Lin J. Host-guest system of taxifolin and native cyclodextrin or its derivative: Preparation, characterization, inclusion mode, and solubilization // Carbohydrate Polymers. 2011. V.85. P. 629–637.
3. Ещенко А.Ю., Зенкевич И.Г. Разделение энантиомеров дигидрокверцетина и катехинов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ с хиральной модификацией подвижной фазы // Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер.4. 2007. Вып.3. С. 143-148.
4. Коротеев А.М., Казиев Г.З., Коротеев М.П., Нифантьев Э.Е., Шутов В.М. Водорастворимое комплексное соединение включения дигидрокверцетино- β -циклодекстрин и способ его получения: Патент РФ № 2396077 / <http://bd.patent.su/2396000-2396999/pat/servlet/servletf52f.html>

БЕНЗАЛЬДЕГИДЫ ВАНИЛИНОВОГО РЯДА В КАЧЕСТВЕ ЛИНКЕРОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОКОНЫЮГАТОВ НА ОСНОВЕ МАЛЕОПИМАРОВОЙ КИСЛОТЫ И ФАРМАКОФОРНЫХ АМИНОВ

**Дикусар Е.А.^{1,2}, Поткин В.И.¹, Петкевич С.К.¹, Ювченко А.П.²,
Лосев В.О.², Бей М.П.²**

¹Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь, тел.: 8(017)-2841600, e-mail: dikusar@ifoch.bas-net.by

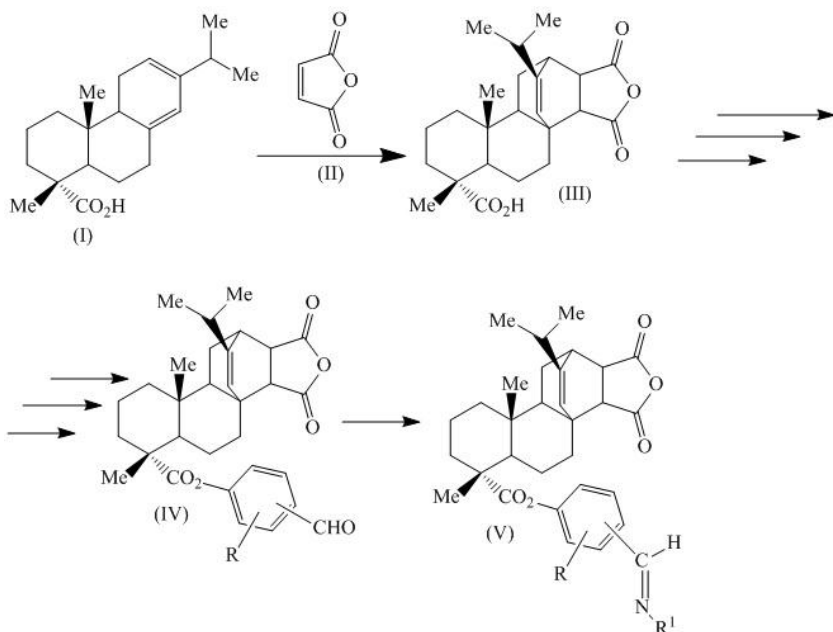
²Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь, тел.: 8(017)-2671311, e-mail: aspirin55@ya.ru

Ванилин и его ближайшие гомологи и аналоги: ваниаль, *изо*-ванилин и *орто*-ванилин, 4-гидроксibenзальдегид, благодаря присутствию в их молекулах гидроксильной и альдегидной групп,

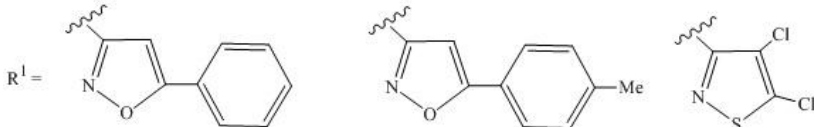
могут служить удобными и доступными исходными соединениями для получения на их основе целого ряда новых химических веществ, обладающих ценными и полезными свойствами [1, 2]. Использование сложноэфирной (RCO_2R^1) и азометиновой ($\text{RHC}=\text{NR}^1$) связей в качестве линкеров для ковалентного присоединения к альдегидам ванилинового ряда различных функциональных и фармакофорных групп: алифатических, циклоалифатических, каркасных полициклических, ароматических, конденсированных ароматических фрагментов структур как природного, так и синтетического происхождения, может служить примером молекулярного дизайна. Достаточно высокая химическая устойчивость сложноэфирной группы к гидролизу, алкоголизу и аммонолизу при нейтральных значениях pH, а также к воздействию биологических сред, позволяет считать ее удобным инструментом при получении биологически активных соединений.

На основе сложных эфиров бензальдегидов ванилинового ряда, содержащих фармакофорные фрагменты 1-адамантан-, карборан-, изоксазол- и 4,5-дихлоризотиазолкарбоновых кислот, были разработаны оригинальные методики синтеза новых производных потенциально биологически активных 1,3-диоксоланов и 1,3-диоксанов, азометинов, конденсированных гетероциклических азотсодержащих соединений, обладающих комплексом полезных свойств [1, 2]. У некоторых из синтезированных на их основе новых органических соединений, была выявлена противоопухолевая, антитуберкулезная, фунгицидная и инсектицидная активность.

Малеопимаровая кислота (III) является диеновым аддуктом, получаемым по реакции Дильса-Альдера из левопимаровой кислоты (I) и малеинового ангидрида (II) [3-5]. Малеопимаровая кислота (III) служит удобным и легкодоступным синтоном для получения соединений, обладающих широким спектром биологической, в частности, противовоспалительной, нематоцидной и фунгицидной активности [6-11], а также для синтеза мономеров [12,13]. Высокая биологическая активность производных малеопимаровой кислоты (III) обусловлена стереохимическими особенностями их 13 α -конфигурации, напоминающими по своему строению стереохимию А, В и С колец стероидных гормонов [5,14].



IV, R = H, 4-(CHO); R = 3-(OMe), 2-(CHO); R = 4-(OMe), 3-(CHO); R = 3-(OMe), 4-(CHO); R = 3-(OEt), 4-(CHO); V, R¹ = *n*-C₁₆H₃₃, *n*-C₁₈H₃₇, *цикло*-C₆H₁₁, CH(1-Ad)Me, CH₂CO₂Me, *L*-CH(CHMe₂)CO₂Me, *L*-CH(CHCH₂Me₂)CO₂Me, *L*-CH(CHMeEt)CO₂Me, C₆H₅, 4-MeC₆H₄, 2-бифенил, 4-бифенил, 1-нафтил, 2-нафтил, 4-FC₆H₄, 2-ClC₆H₄, 4-ClC₆H₄, 2,6-Cl₂C₆H₃, 3-BrC₆H₄, 4-BrC₆H₄, 4-IC₆H₄, 3-(O₂N)C₆H₄, 4-(O₂N)C₆H₄, 2,5-(O₂N)₂C₆H₃, 1-бром-2-нафтил, 2-гидроксифенил, 4-феноксифенил, 4-MeC(O)C₆H₄, 4-EtC(O)C₆H₄, 3-HO₂CC₆H₄, 4-HO₂CC₆H₄, 4-EtO₂CC₆H₄, 4-BuO₂CC₆H₄;



Малеопимаровая кислота (III) при взаимодействии с SOCl₂ образует соответствующий реакционноспособный хлорангидрид maleopimaric acid, способный давать сложные эфиры (IV) с 4-гидроксibenзальдегидом, ванилином, ванилалем, *изо*-ванилином и *орто*-ванилином с препаративными выходами 75-80%.

Сложные эфиры maleopimaric acid (IV) содержат в своем составе реакционноспособные альдегидные группы и могут служить удобными и доступными линкерами, при взаимодействии с

функционально-замещенными фармакофорными аминами, они образуют соответствующие биоконъюгаты (V) с выходами 75-85%, содержащие богатый и разнообразный ассортимент потенциально биологически активных фармакофорных групп.

Синтезированные производные малеопимаровой кислоты, особенно содержащие в своем составе фрагменты гетероциклических соединений, представляют интерес в качестве потенциальных лигандов для получения металлокомплексов и их биотестирования [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Дикусар Е.А., Поткин В.И., Козлов Н.Г. Бензальдегиды ванилинового ряда. Синтез производных, применение и биологическая активность. Saarbrücken, Germany: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, 2012. – 612 с.
2. Дикусар Е.А., Поткин В.И., Козлов Н.Г., Тлегинов Р.Т. Функционально-замещенные производные ванилина. Весці НАН Б. Сер. хім. навук. 2011. № 4 С. 105-120.
3. Никитин В.М. Химия терпенов и смоляных кислот. М.-Л.: Гослесбумиздат, 1952. С. 326-328.
4. Gonis G., Slezak F.B., Lawson N.E. // Ind. and Engl. Chem. Prod. Res. and Develop. 1973. Vol. 12. N. 4. P. 326-327.
5. Ayer A., McDonald C.E., Stothers J.B. // Canad. J. Chem. 1963. Vol. 41. N 5. P. 1113-1126.
6. Scebacher W., Hufner A., Haslinger E., Weis R. // Monatsh. Chem. 1998. Vol. 129. N 6-7. P. 697-703.
7. Бей М.П., Ювченко А.П., Пучкова Н.В., Желдакова Р.А. // Химические реактивы, реагенты и процессы малотоннажной химии: сб. науч. тр. Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т химии новых материалов; науч. ред. Агабеков В.Е., Королева Е.В., Гусак К.Н. Минск: Беларус. навука, 2011. С. 265-271.
8. Pakhushinda P., Himadri P. // Pesticides. 1988. Vol. 22. N 1. P. 38-40.
9. Заявка 57-88102 (1982). Япония. // РЖХим. 1983. 22 О 277П.
10. Пат. 1400481 (1975). Великобритания. // РЖХим. 1976. 8 О 130П.
11. Schuller W.H., Lawrence R.V. // J. Chem. and Engineer. Data. 1967. Vol. 12. N 2. P. 267-269.
12. Penczek P. // Roczn. Chem. 1970. Vol. 44. N 9. P. 1815-1819.
13. Lewis J.B., Lloyd W.D., Hedrick G.W. // J. Organ. Chem. 1960. Vol. 25. N 7. P. 1206-1208.
14. Физер Л., Физер М. Стероиды. М.: Мир, 1964. С. 19-26.
15. Дикусар Е. А., Поткин В. И., Степин С. Г. // Вестн. Витебск. Гос. Технол. Универ. 2011. Вып. 20. С. 132-137.

ГИБРИДНЫЕ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ НА ОСНОВЕ КВЕРЦЕТИНА

Домнина Н.С., Завьялова М.С., Власов П.С., Сергеева О.Ю.
Санкт-Петербургский государственный университет, СПб, Россия, тел.:
(812)428-6840, e-mail: ninadomnina@mail.ru

На Химическом факультете Санкт-Петербургского государственного университета разработана методология синтеза гибридных макромолекулярных антиоксидантов (ГМАО), которые представляют собой конъюгаты гидрофильных полимеров и низкомолекулярных фенольных антиоксидантов. Предложены методы, позволяющие создавать ГМАО, различающиеся по молекулярной массе, по содержанию в основной цепи антиоксидантных фрагментов, по природе ковалентной связи полимер-антиоксидант и др. Основой конъюгатов служили как природные, так и синтетические гидрофильные полимеры, а в качестве антиоксидантов использовали синтетические антиоксиданты из класса пространственно-затрудненных фенолов. Установлено, что полимерные формы антиоксидантов обеспечивают пролонгацию антиоксидантного действия, высокую растворимость в воде, показывают повышенную антиоксидантную активность (в 10-100 раз) по сравнению с низкомолекулярными аналогами [1].

Среди природных фенольных антиоксидантов наибольший интерес представляют флавоноиды, в частности, кверцетин, зарекомендовавший себя как ценное биологически активное соединение широкого спектра действия и как эффективный малотоксичный антиоксидант [2]. Главным недостатком, ограничивающим применение этого флавоноида в медицине, является его низкая растворимость в воде и нестабильность в водных растворах [3,4]. Одним из возможных путей устранения указанных недостатков кверцетина может стать создание на его основе ГМАО.

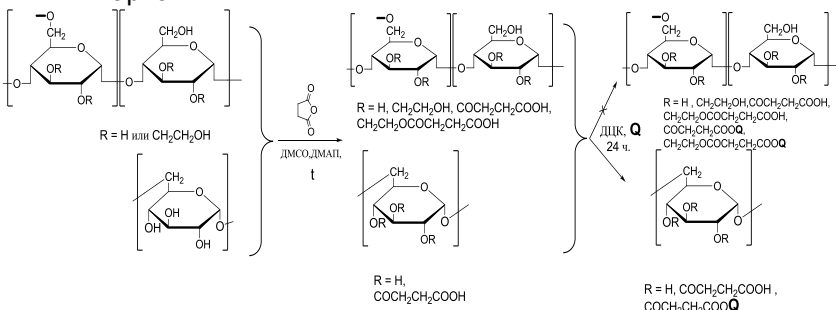
Данная работа посвящена созданию гибридных макромолекулярных антиоксидантов на основе полисахаридов и кверцетина.

В качестве полимерной основы для создания ГМАО выбраны полисахариды декстран и гидроксипропилированный крахмал, которые широко используются в медицине в качестве основы плазмозаменителей.

Введение кверцетина в полимерную цепь полисахаридов осуществляли через сложноэфирную связь, которая достаточно

устойчива в физиологических условиях. С этой целью предварительно либо в полимере (вариант 1), либо в кверцетине (вариант 2) создавались карбоксильные группы, по которым далее проводилась модификация.

Вариант 1



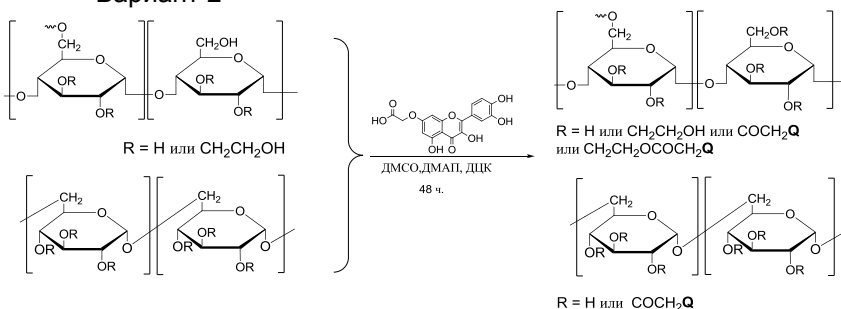
Q- кверцетин

Введение карбоксильных групп в полисахариды (вариант 1) осуществляли с использованием янтарного ангидрида. Несмотря на варьирование условий модификации, содержание введенного кверцетина в декстране составило не более 2 % мольных, тогда как для гидроксиэтилированного крахмала наблюдалось образование сшитых продуктов, что, по-видимому, связано с разветвленной структурой этого полимера. В модельных опытах методом ЯМР-спектроскопии установлено, что при взаимодействии кверцетина с карбоксильными группами его замещение проходит на 50% по положению C3', на 20% по положению C4', на 12% - по положению 3 кольца C. Таким образом, реализация этого варианта приводит к получению смеси полимерных продуктов, в которых кверцетин присутствует в полимерной цепи, присоединенный по одному из трех указанных выше положений. Это затрудняет использование таких продуктов в качестве полимерных антиоксидантов.

С учетом структурных особенностей кверцетина [5,6] для реализации варианта 2 синтезировано в несколько стадий его новое производное с карбоксильной группой в положении 7, которое далее использовано для модификации полисахаридов.

Структура модификатора 2-(2-(3,4-дигидроксифенил)-3,5-дигидрокси-4-оксо-4Н-хромен-7-илокси)уксусной кислоты и конъюгатов на его основе подтверждена спектральными методами. Установлено, что количество присоединенного функционализированного кверцетина в полученных полимерных продуктах составило от 2 до 9 % мольных.

Вариант 2



Антирадикальная активность полученных конъюгатов оценена путем определения степени ингибирования катион-радикалов ABTS•+ в солевом фосфатном буфере при 20° С и последующего расчета универсальной характеристики – TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) [7]. Если для кверцетина значение TEAC составило 5.0, то для полученных ГМАО эта величина находится в пределах 1.3 - 1.5, а для α-токоферола и аскорбиновой кислоты 0.8 и 0.7 соответственно.

Таким образом, результатом реализации варианта 2 является создание водорастворимых гибридных макромолекулярных антиоксидантов, имеющих в своем составе введенный по положению 7 кверцетин. Установлено, что ГМАО проявляют достаточную антирадикальную активность в 1.5-2 раза большую, чем известные антиоксиданты α-токоферол и аскорбиновая кислота. Особо следует отметить, что в воде и водном этаноле полученные ГМАО хорошо растворимы и устойчивы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арефьев Д.В., Белостоцкая И.С., Вольева В.Б., Домнина Н.С., Комиссарова Н.Л., Сергеева О.Ю., Хрусталёва Р.С. Гибридные макромолекулярные антиоксиданты на основе гидрофильных полимеров и пространственно-затруднённых фенолов // Изв. Акад. наук. Сер. Хим., № 4, 2007, с. 751-760.
2. Formica J.V., Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids // Food Chem. Toxicol. Vol. 33, № 12, 1995 pp. 1061 -1080.
3. Роговский В. С., Матюшин А. И., Шимановский Н. Л. Перспективы применения препаратов кверцетина для профилактики и лечения атеросклероза // Международный медицинский журнал, № 3, 2011, с. 114-118.
4. Kim M.K., Park K.-S., Lee C., Park H.R. et al. Enhanced stability and intracellular accumulation of quercetin by protection of the chemically or metabolically susceptible hydroxyl groups with a pivaloxymethyl (POM) promoiety // J. Med. Chem., Vol. 33, 2010, p. 8597-8607.

-
5. Зенкевич И. Г., Ещенко А. Ю., Макарова С. В., Утсаль В. А. Продукты окисления кверцетина кислородом воздуха при комнатной температуре и их идентификация // Растительные ресурсы, Т. 43, № 2, 2007, с. 111–124.
 6. Kim M.K., Park K.-S., Chong Y. Remarkable stability and cytostatic effect of a quercetin conjugate 3,7-bis-o-pivaloxymethyl (POM) quercetin. // ChemMedChem., №7, 2012, p.229 – 232.
 7. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // Free Radical Biology & Medicine, Vol. 26, 1999, pp. 1231–1237.
-

БИОСИНТЕЗ РЕЗВЕРАТРОЛА, ЦЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО ПОЛИФЕНОЛА В *ESCHERICHIA COLI* С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Дубровина А.С.¹, Шкопоров А.Н.², Маняхин А.Ю.³, Христенко В.С.⁴, Киселев К.В.¹

¹ФГБУН Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, тел.: 8-924-242-16-80, e-mail: dubrovina@biosoil.ru

²ГОУ ВПО «Московская медицинская академия им. И. М. Сеченова» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, Москва, Россия

³Горнотаежная станция им. В.Л. Комарова ДВО РАН, Приморский край, Уссурийский р-н, с. Горнотаежное

⁴Школа естественных наук, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

Резвератрол (3,4',5 - тригидрокси-*транс*-стильбен) – это ценное биологически активное вещество, известный антиоксидант, который синтезируется некоторыми таксономически отдаленными видами растений, такими как виноград, клюква или арахис (Jeandet et al., 2002; Chong et al., 2009). Виноград, в том числе и дикий виноград *Vitis amurensis* Rupr., относят к основным источникам резвератрола. Установлено, что резвератрол способен предупреждать возникновение и развитие онкологических и сердечнососудистых заболеваний, оказывает антиаллергическое действие и замедляет процесс старения (Shankar et al., 2007; Pezzuto, 2011). Резвератрол имеет большой потенциал для создания на его основе биологически активных добавок к пище, лекарственных средств и косметических препаратов. Проблема промышленного получения резвератрола – это недостаток быстро

восполняемых сырьевых источников, вызванный низким содержанием этого фенольного соединения в растениях и длительностью их роста, а также трудоемкостью синтеза химических аналогов резвератрола, не содержащих токсичных примесей.

Опыт получения клеточных культур растений показывает, что содержание в них целевых веществ чаще всего ниже, чем необходимо для эффективного промышленного производства, поэтому разработка подходов, позволяющих использовать микроорганизмы в качестве альтернативного источника ценных вторичных метаболитов растений является актуальной задачей. Микроорганизмы – популярная биологическая система для продукции разнообразных интересных для биотехнологии молекул, в том числе и вторичных метаболитов растений (Chemler and Koffas, 2008). Преимуществами переноса генов биосинтеза целевых веществ из растений в бактерии является возможность контроля над каждым шагом биосинтетических реакций, высокая скорость наработки целевого продукта и более низкая стоимость поддержания бактериальных культур по сравнению с клеточными культурами растений. Цель настоящей работы – разработка технологии получения рекомбинантных штаммов бактерий, продуцирующих резвератрол в объемах достаточных для экономически выгодного производства. Нами применялись методы геной инженерии для переноса части *метаболического пути биосинтеза* резвератрола, действующего в клетках растений, в штаммы кишечной палочки *Escherichia coli*.

Биосинтез стильбенов, в том числе и резвератрола, идет фенилпропаноидным путем (Langcake, Pryce, 1977). Ключевыми ферментами этого пути синтеза вторичных метаболитов являются фенилаланин-аммиак-лиаза (PAL; E.C. 4.3.1.5), циннамат-4-гидроксилаза (C4H, E.C. 1.14.13.11), кумарат-КоА-4-лигаза (4CL, E.C. 6.2.1.12), а также стильбен синтаза (STS, EC 2.3.1.95). 4CL катализирует формирование тиоэфирной связи между карбоксильной группой 4-кумаровой кислоты и коэнзимом А. STS – это фермент, который непосредственно синтезирует резвератрол (Austin et al. 2004). Известно, что STS представлены мультигенным семейством в геноме растений сем. Vitaceae (около 43 генов). Функциональная значимость большого количества генов в семействе STS остается невыясненной. Ранее нами была изучена экспрессия генов *STS* в культурах клеток *V. amurensis* с различным содержанием резвератрола (Kiselev et al., 2009; Dubrovina et al., 2010). В данной работе нами было сделано предположение, что белковые продукты генов этого семейства могут обладать

различной активностью в биосинтезе резвератрола. Для проверки этого предположения нами была поставлена задача сравнить способность рекомбинантных штаммов *E. coli*, содержащих различные гены STS из *V. amurensis*, к биосинтезу резвератрола.

Известно, что для обеспечения биосинтеза резвератрола в *E. coli* необходимо перенести в геном этих бактерий не только ген STS, но и ген 4CL, поскольку наличие данных ферментов необходимо бактериям, для конвертации 4-кумаровой кислоты в резвератрол. Согласно данным Watts с соавторами (2006), 4-кумаровая кислота, добавляемая в питательные среды, может служить непосредственным предшественником для синтеза резвератрола в *E. coli*. В своей работе мы использовали стратегию близкую подходу, разработанному Watts с коллегами.

Нами секвенированы и клонированы последовательности белок-кодирующих частей генов *VaSTS2*, *VaSTS6* и *VaSTS7*. Полученные последовательности были перенесены в плазмидный вектор pET28a(+) под контроль T7 промотора, куда ранее мы также перенесли белок-кодирующую последовательность гена 4CL9 *A. thaliana*, полученную с помощью химического синтеза. Мы использовали ген 4CL9 из *A. thaliana*, поскольку именно эта изоформа 4CL была успешно применена для синтеза резвератрола в *E. coli* (Watts et al., 2006). Для получения резвератрола использовали штамм *E. coli* Rosetta pLysS, содержащий гены tРНК для кодонов, редко используемых в *E. coli*, но часто присутствующих в эукариотических мРНК. Синтез рекомбинантных белков STS и 4CL полученными штаммами Rosetta доказывали с помощью SDS-PAGE электрофореза. Ночные бактериальные культуры штаммов (1) Rosetta+pET28a(+)-4CL-STС2, (2) Rosetta+pET28a(+)-4CL-STС6; (3) Rosetta+pET28a(+)-4CL-STС7, выращенные в среде LB в присутствии необходимых антибиотиков при +37°C, инокулировали в свежие среды LB объемом 15 мл, добавляя 0,5% глицерина и ИПТГ в концентрации 1 мМ. Далее штаммы культивировали при +30°C при постоянном перемешивании 170 об/мин. После 5 часов культивирования добавляли 4-кумаровую кислоту в концентрации 1 мМ. Резвератрол экстрагировали после 6, 12, 24, 36 и 48 часов культивирования. Для экстракции резвератрола бактериальную суспензию центрифугировали в течении 0,5-1 мин при 13200 об/мин, отбирали надосадочную жидкость и понижали рН, добавляя 1N HCl до 5%, и замораживали полученные экстракты. На следующий день экстрагировали резвератрол этилацетатом дважды. Резвератрол определяли с помощью высоко-эффективной жидкостной хроматографии и тонкослойной хроматографии.

Штаммы бактерий *Rosetta* pLysS, в которых были перенесены плазмиды pET28a(+) с конструкциями 4CL+STS2, 4CL+STS6 и 4CL+STS7 показали способность синтезировать резвератрол. Полученные штаммы значительно отличались по способности к синтезу этого вещества. Концентрация резвератрола в питательной среде была наибольшей при использовании штамма pET-28a(+)-4Cl-STS6 и достигала 65 мг/л после 48 часов культивирования. Продукция резвератрола штаммами *Rosetta* pET-28a(+)-4Cl-STS2 и *Rosetta* pET-28a(+)-4Cl-STS7 была значительно меньше и достигала 16 мг/л и 12 мг/л, соответственно. Данный уровень продукции резвератрола несколько меньше, чем в описанных ранее разработках японских и американских коллег (Watts et al. 2006; Katsuyama et al. 2007), где продукция резвератрола достигала 100 мг/л полученным бактериальным штаммом. Однако необходимо отметить, что нами еще не завершены эксперименты по оптимизации условий культивирования полученных штаммов и проводится получение штаммов, содержащих гены *VaSTS3* и *VaSTS5*, которые активно экспрессируются в культурах клеток *V. amurensis*, активно синтезирующих и накапливающих резвератрол в больших количествах (Kiselev et al., 2009; Dubrovina et al., 2010). Таким образом, нами получен штамм *E. coli* (pET-28a(+)-4Cl-STS6), активно синтезирующий резвератрол и впервые установлено, что различные гены *STS* из одного растения обладают неодинаковой способностью к синтезу резвератрола *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Austin M.B., Bowman M.E., Ferrer J.L., Schroder J., Noel J.P. (2004) An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases // *Chem Biol* 11:1179-1194
2. Chong J.L., Poutaraud A., Hugueney P. (2009) Metabolism and roles of stilbenes in plants // *Plant Science* 177:143-155
3. Dubrovina A.S., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N., Kiselev K.V. (2010) Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in rolC transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* // *Appl Microbiol Biotechnol* 88:727-736
4. Jeandet P., Bessis R., Gautheron B. (1991) The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages // *Am J Enol Vitic* 42:41-46
5. Katsuyama Y., Funa N., Miyahisa I., Horinouchi S. (2007) Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli* // *Chem Biol* 14:613-621
6. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Bulgakov V.P. (2009) Phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in *rolB* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* // *Appl Microbiol Biotechnol* 82:647-655

-
7. Chemler J.A., Koffas (2008) MA Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes // *Curr Opin Biotechnol* 19:597-605
 8. Langcake P., Pryce R.J. (1977) A new class of phytoalexins from grapevines // *Experientia* 33:151-152
 9. Pezzuto J.M. (2011) The phenomenon of resveratrol: redefining the virtues of promiscuity. // *Ann N Y Acad Sci* 1215:123-30
 10. Watts K.T., Lee P.C., Schmidt-Dannert C. (2006) Biosynthesis of plant-specific stilbene polyketides in metabolically engineered *Escherichia coli* // *BMC Biotechnol* 6:22
 11. Shankar S., Singh G., Srivastava R.K. (2007) Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential // *Front Biosci* 12:4839-4854
-

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЯКОНА (*POLYMNIA SONCHIFOLIA* РОЕПП. & ENDL.) УКРАИНСКОЙ ИНТРОДУКЦИИ

**Дунич А.А.¹, Дашенко А.В.², Середа А.В.³, Филенко С.В.³,
Мищенко Л.Т.¹**

¹Киевский национальный университет имени Т. Шевченко, Киев, Украина,

²Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев,

³Опытная станция лекарственных растений, Березоточа Полтавской обл., Украина тел. +3 8044 258 32 40, e-mail: lmishchenko@ukr.net

Аннотация. С помощью ВЭЖХ изучены фенольные соединения якона (*Polymnia sonchifolia*) интродуцированного в Украине. Анализ спиртовых экстрактов из листьев и корневых клубней якона показал наличие в составе фенольных соединений доминирующего количества производных гидроксикоричных кислот. Показано различие в составе для спиртового экстракта свежих и сухих корневых клубней. УФ-спектры спиртовых экстрактов листьев якона имеют спектр, характерный для производных кофейной кислоты. Методом прямой спектрофотометрии спиртовых экстрактов в пересчете на хлорогеновую кислоту и абсолютно сухой вес установлено содержание от 2,8 % до 4,3 % суммы гидроксикоричных кислот в листьях различных ярусов растения.

Введение

Якон (*Polymnia sonchifolia* Роепп. & Endl. - синоним *Smallanthus sonchifolia*) – многолетнее растение из семейства Asteraceae. Основной ареал распространения якона — средние широты Южной Америки. К настоящему времени якон интродуцирован в США, Новой Зеландии, южной Европе, Иране,

Японии, Молдавии, Чехии и Узбекистане. Исследования по интродукции якона в странах СНГ были начаты во ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур РФ, а также Центральной части России [1].

Известно, что якон является ценной лекарственной культурой, так как его корневые клубни содержат высокий процент инулина – полисахарида, который легко усваивается организмом и служит заменителем сахарозы в диетическом питании больных сахарным диабетом. В последнее время учеными из многих стран доказано, гипогликемические свойства якона [2-4]. На сегодняшний день основное количество работ по изучению лекарственных свойств якона направлено на исследование его подземной части, хотя рядом авторов показано, что кроме корневых клубней применение экстрактов из листьев также снижает уровень сахара в крови [5-7]. Благодаря содержанию хлорогеновой, кофейной кислот и других фенольных соединений листья якона обладают также антиоксидантными свойствами [8,9].

Недавно растения якона были интродуцированы нами и в Украине [10, 11]. Содержание биологически активных веществ (БАВ) при перенесении растения из мест естественного произрастания в другие климатические условия может изменяться. Но, несмотря на это, всего лишь несколько работ посвящены изучению содержания фенолов, олигофруктанов и других БАВ в яконе, а также условий выращивания и хранения этих растений [8, 12, 13]. Поэтому актуальным было изучить биохимический состав растений якона украинской интродукции. Целью данной работы было изучить экстракты из листьев и корневых клубней растений якона на наличие фенольных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Жидкостную хроматографию проводили на приборе Agilent 1100, оснащенном диодматричным детектором и колонкой Zorbax Eclipse XDB-C18 размером 150 x 4,6 мм, с размером частиц сорбента 5 мкм. Элюирование – градиентное в системе ацетонитрил: раствор фосфорной кислоты. В качестве вещества-сравнения в количественном спектрофотометрическом определении использовалась хлорогеновая кислота, в пересчете на безводную субстанцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографический анализ спиртовых экстрактов из листьев и корневых клубней якона показал наличие в составе фенольных соединений доминирующего количества производных гидроксикоричных кислот (ГОКК). УФ-спектры этих соединений имеют характерные максимум при 325-330 нм и «плечо» при 300 –

305 нм. (Рис.1.3)

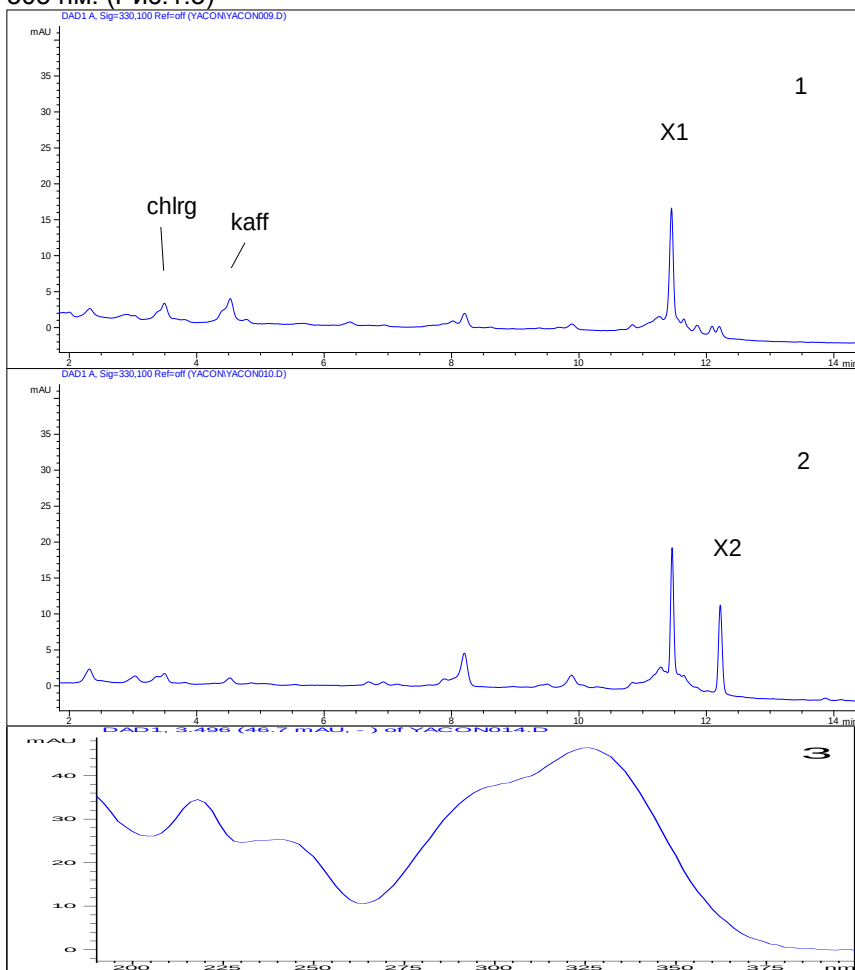


Рис. 1. Хроматограммы спиртовых экстрактов сухих (1) и свежих (2) корневых клубней якона и УФ-спектр пиков производных гидроксикоричных кислот (3)

На хроматограмме спиртового экстракта сухого корневого клубня производные ГОКК представлены основным неидентифицированным пиком (X1) с временем удерживания 11,45 мин, обнаружены также хлорогеновая и кофейная кислоты (рис.1.1).

Основным фенольным компонентом спиртового экстракта свежего корневого клубня является вещество с временем

удерживания 12,21 мин. (X2), которое отсутствует на хроматограммах сухого корневого клубня и также представляющее собой производное кофейной кислоты (Рис. 1.2). Относительное содержание кофейной и хлорогеновой кислот в экстрактах нативного корневого клубня больше, чем в экстрактах сухого корневого клубня, что также свидетельствует о наличии лабильных производных ГОКК, изменяющихся при сушке. Аналогичные результаты были получены и другими авторами, которые показали, что в корневых клубнях якона содержится хлорогеновая, кофейная и другие кислоты, а также кверцетин и еще 2 флавоноида [14].

Были проанализированы также хроматограммы спиртовых экстрактов цельного корневого клубня и его корки, качественных и количественных отличий в содержании ГОКК в этих частях растения нами не обнаружено.

В листьях якона производные ГОКК как качественно, так и количественно представлены в гораздо большем количестве. На хроматограммах спиртового экстракта листьев якона подавляющее большинство (не менее 18) пиков имеют характерный для ГОКК УФ-спектр. Три компонента (время удерживания 7,1-7,6) по характеру УФ-спектра можно отнести к флавонолам (рис. 2).

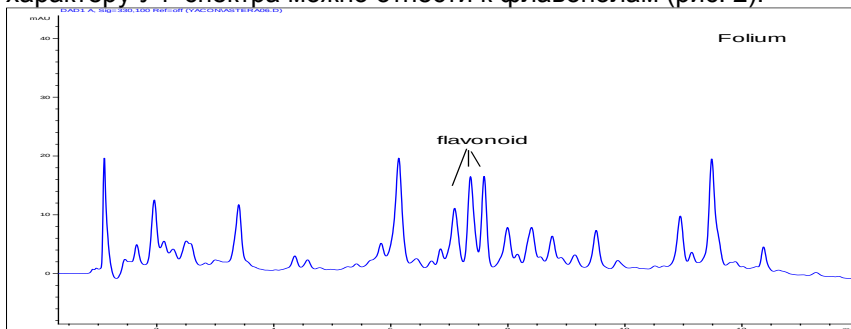


Рис. 2 Хроматограмма спиртового экстракта сухих листьев якона

Наши данные согласуются с результатами чешских ученых, которые, помимо производных ГОКК, выявили в листьях якона также неизвестный дериват хлорогеновой кислоты ($M_r=562$) и 1 неидентифицированный флавоноид [14].

УФ-спектры спиртовых экстрактов листьев якона имеют спектр, совпадающий со спектром хлорогеновой кислоты, исходя из чего, нами были произведено определение суммы ГОКК методом прямой спектрофотометрии спиртовых экстрактов в пересчете на хлорогеновую кислоту и абсолютно сухой вес. Результаты показали, что в листьях 1-4 яруса содержится от 2,78% до 3,92%

ГОКК (в зависимости от региона выращивания), а в листьях 2 яруса сверху – 3,36-4,32 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колесникова Е.О. Биологический потенциал и методы создания исходного материала якона (*Polymnia sonchifolia* Poepp. & Endl.) при интродукции в ЦЧР. – Автореф. дис. канд. биол. наук, специальность 06.01.05 – селекция и семеноводство. – Рамонь. – 2009. – 23 с.
2. Miura T. Antidiabetic activity of *Fuscoporia oblique* and *Smallanthus sonchifolius* in genetically type 2 diabetic mice // *Journal of Traditional Medicines. (Japan)*. - 2007. - 24(2). –P. 47-50.
3. Мищенко Л.Т., Остапченко Л.И., Ховака В.В., Весельский С.П., Тороп В.В. Апробация лекарственных растений в качестве антидиабетических препаратов //Сб. материалов Всероссийской конференции: «Современная фармацевтическая наука и практика: традиции, инновации, приоритеты» (24-26 мая 2011 г., Самара, РФ). – Офорт, Самара, 2011. С. 76-77.
4. Мищенко Л.Т., Дунич А.А., Весельский С.П., Середа А.В. Сахаропонижающее действие экстрактов лекарственных растений и их сборов при аллоксан-индуцированном сахарном диабете //Вестник Луганского национального университета имени Тараса Шевченко. Биологические науки. – 2012 – в печати.
5. Baroni S. Suzuki-Kemmelmeier F., Caparroz-Assef S. M., Cuman R.K.N., Bersani-Amado C.A. Effect of crude extracts of leaves of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) on glycemia in diabetic rats // *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas*. - 2008. - 44(3). – P. 521-530.
6. Volpato G.T., Vieira F.L., Almeida F.C.G., Camara F., Lemonica I.P. Study of the hypoglycemic effects of *Polymnia sonchifolia* leaf extracts in rats // *Abstracts of the second WOCMAP. Pt 2: Pharmacognosy, pharmacology, phytomedicine, toxicology*. – 1999. -Wageningen (Netherlands). - P. 319.
7. Genta S.B., Cabrera W.M., Mercado M.I., Grau A., Catalan C.A, Sanchez S.S. Hypoglycemic activity of leaf organic extracts from *Smallanthus sonchifolius*: Constituents of the most active fractions // *Chem. Biol. Interact.*- 2010. - 185(2). - P. 143-152.
8. Lachman J., Fernandez E. C., Viehmannova I., Sulc M., Eepkova P. Total phenolic content of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) rhizomes, leaves, and roots affected by genotype // *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. -2007. - 35:1. – P. 117-123;
9. Valentova K., Moncion A., de Waziers I., Ulrichova J. The effect of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts on rat hepatic metabolism // *Cell Biol. Toxicol.* – 2005. – 20. – P. 109-120.
10. Дунич А.А., Дашенко А.В., Ляшук Н.И., Крысько И.В., Мищенко Л.Т. Влияние вирусов на содержание биологически активных соединений в растениях, обладающих сахароснижающими свойствами //Международная научно-практическая конференция «Молодежь и наука: модернизация и инновационное развитие страны» (15 - 16 сентября 2011 г., Пенза). – Пенза, 2011. – Т.1, С. 321-323.

-
11. Міщенко Л.Т., Дуніч А.А. Інтродукція нової лікарської рослини в Україні // Вісник аграрної науки. – 2012, № 8– (в печаті).
 12. Valentova K., Lebeda A., Dolezalova I., Jirovsky D., Simonovska B., Vovk I., Kosina P., Gasmanova N., Dzierchciarkova M., Ulrichova J. The biological and chemical variability of yacon // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. - Vol. 54. – P.1347-1352.
 13. Milella L., Salava J., Martelli G., Greco I., Fernandez C.E., Viehmannova I. Genetic diversity between yacon landraces from different countries based on random amplified polymorphic DNAs. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. – 2005. – Vol. 41. – P. 73-78.
 14. Valentova K., Ulrichova J. Smallanthus sonchifolius and Lepidium meyenii - prospective andean crops for the prevention of chronic disease // Biomed Papers. – 2003. – Vol. 147(2). – P. 119-130.
-

ПРОСТРАНСТВЕННО-ЗАТРУДНЕННЫЕ ФЕНОЛЫ КАК АДАПТОГЕНЫ К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

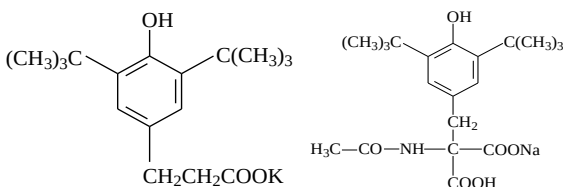
Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Голощанов А.Н.

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва,
тел.: (495)-939-74-09, e-mail: zhigacheva@mail.ru

Митохондрии, являясь «энергетическими станциями» клеток, играют одну из основных ролей в ответе организма на действие стрессовых факторов. Приблизительно 1-3% потребляемого митохондриями кислорода в результате 1-2-электронного восстановления образует активные формы кислорода (АФК) [1]. В норме стационарный уровень АФК в органах и тканях весьма низок (порядка 10^{-10} - 10^{-11} М) за счет наличия в них ферментативной и неферментативной систем регуляции накопления и устранения АФК [2]. Сдвиг антиоксидантно - прооксидантного равновесия в сторону увеличения продукции АФК приводит к развитию окислительного стресса, лежащего в основе развития патологических состояний [3,4]. В связи с этим одной из важнейших задач является поиск препаратов и методов, позволяющих осуществить защиту организма от окислительного стресса. Мы предположили, что препараты, обладающие антиоксидантной активностью, вероятно, будут предупреждать дисфункцию митохондрий при стрессовых воздействиях.

Известно, что пространственно-затрудненные фенолы в большинстве случаев обладают антиоксидантными свойствами [5]. В связи с этим в качестве объектов исследования были выбраны препараты, являющиеся пространственно-затрудненными

фенолами: фенозан калия (калиевая соль 2,6-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил-пропионовой кислоты) и «Анфен» (1-ацетиламидо)-1-(3,5-ди-третбутил-4-гидроксibenзил)-малонат натрия) [6,7].



Фенозан калия Анфен

Для активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) была разработана модель «старения» митохондрий – 25 минутная инкубация митохондрий в солевой среде при комнатной температуре.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение митохондрий печени проводили методом дифференциального центрифугирования [8].

Скорости дыхания митохондрий из печени крыс, регистрировали электродом типа Кларка, используя полярограф LP-7 (Чехия). Среда инкубации митохондрий содержала : 0.25 М сахарозу, 10 мМ трис-HCl, 2 мМ MgSO₄, 2 мМ KH₂PO₄, 10 мМ KCl (pH 7.5) (28°C).

Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [9].

Модель острой гипобарической гипоксии - в барокамере создавали разрежение, соответствующее высоте 9,0 тысяч метров над уровнем моря. «Подъем» проводили в первую минут до 5 тыс. м., а в каждую последующую еще на одну тысячу метров (Время нахождения крыс «на высоте» 9,0 тысяч метров над уровнем моря –10,0 минут).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация митохондрий в гипотоническом растворе KCl вызывает 2-кратное увеличение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий. Введение фенозана калия в среду инкубации митохондрий приводит к снижению флуоресценции продуктов ПОЛ, и это снижение зависит от концентрации препарата в среде инкубации. Наиболее эффективными были концентрации 10⁻⁸ - 10⁻¹⁶ и 10⁻¹⁸ - 10⁻²² М. В этих концентрациях фенозан калия снижает интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ до контрольного уровня. На

основании этих данных мы пришли к заключению, что наиболее эффективное использование препарата возможно в концентрационном интервале 10^{-9} - 10^{-14} М.

В следующей серии опытов исследовали влияние фенозана калия на энергетику митохондрий печени крыс, находящихся в условиях острой гипобарической гипоксии. Острая гипобарическая гипоксия (ОГГ) приводит к 25% снижению максимальных скоростей окисления NAD-зависимых субстратов. При этом уменьшается и эффективность окислительного фосфорилирования: дыхательный контроль по Чансу снижается с $3,51 \pm 0,04$ до $2,27 \pm 0,03$. Введение крысам 10^{-14} М фенозана калия за 45 минут до воздействия предотвращает изменения в функциональных характеристиках митохондрий печени (таблица 1)

Таблица 1.

Влияние острой гипобарической гипоксии и фенозана калия на скорости окисления NAD-зависимых субстратов (Скорости окисления представлены в нг молях O_2 /мг. белка мин). (Число экспериментов – 10).

Группа	V_0	V_3	V_4	V_3/V_4	FCCP
Контроль	$6,5 \pm 1,4$	$28,1 \pm 1,1$	$8,0 \pm 0,4$	$3,51 \pm 0,04$	$27,5 \pm 1,0$
ГГ	$7,3 \pm 1,2$	$21,2 \pm 1,6$	$9,3 \pm 0,2$	$2,27 \pm 0,03$	$19,4 \pm 2,0$
ГГ+ Фенозан калия	$8,3 \pm 1,6$	$28,4 \pm 1,3$	$7,8 \pm 0,7$	$3,62 \pm 0,07$	$32,4 \pm 2,5$

Среда инкубации: содержала 0.25 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl, 2 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ $MgSO_4$, 10 мМ KCl, pH 7.5. Дополнительные добавки: 200 мкМ ADP, 10^{-6} М FCCP (карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразон), 4 мМ глутамат, 1 мМ малат.

Изменения функциональных характеристик митохондрий отражается и на физиологических показателях. Введение мышам препарата в этой дозе в 3,5-4,5 раз увеличивает продолжительность жизни и на 20-30% повышает выживаемость животных в условиях гипоксии и низкотемпературного стресса. Аналогичные результаты получены для другого синтетического антиоксиданта Анфена. Введение 10^{-6} М и 10^{-13} М Анфена в солевую среду инкубации митохондрий приводит к снижению интенсивности перекисного окисления липидов. При этом препарат в концентрации 10^{-13} М оказался даже более эффективным, чем в концентрации 10^{-6} М. Протекторные свойства препарата изучали используя в качестве стрессового воздействия модель острого алкогольного отравления, которое в 1,4 раза увеличивает интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени. Введение животным 10^{-6} М и 10^{-13} М Анфена за 45 минут до спирта снижает флуоресценцию продуктов ПОЛ в 1,35

и 1,5 раза соответственно. В этом случае интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ не отличается от контрольных значений. Отметим, что инъекция 10^{-13} М препарата животным приводит к изменениям в характеристиках дыхания и энергетического сопряжения митохондрий (таблица 2). При этом на 16% возрастают максимальные скорости окисления NAD-зависимых субстратов и растет эффективность окислительного фосфорилирования: дыхательный контроль по Чансу увеличивается с $2,30 \pm 0,10$ до $2,83 \pm 0,02$

Таблица 2.

Влияние анфена на скорости окисления NAD-зависимых субстратов
(Скорости дыхания, нмоль O_2 /мг белка мин) (Число экспериментов -10)

Группа	V_0	V_3	V_4	V_3/V_4	FCCP
Контроль	$7,9 \pm 2,1$	$25,8 \pm 1,4$	$11,2 \pm 0,8$	$2,30 \pm 0,10$	$23,4 \pm 0,9$
Время после введения анфена, час					
0,5	$6,2 \pm 1,9$	$29,4 \pm 2,5$	$10,5 \pm 0,6$	$2,80 \pm 0,02$	$30,6 \pm 3,7$
1	$10,5 \pm 1,4$	$22,8 \pm 1,0$	$12,0 \pm 0,3$	$1,90 \pm 0,10$	$29,0 \pm 2,0$
1,5	$8,4 \pm 1,7$	$31,0 \pm 0,7$	$10,6 \pm 1,0$	$2,83 \pm 0,02$	$30,5 \pm 1,9$
3	$7,8 \pm 1,8$	$27,6 \pm 1,7$	$11,1 \pm 0,9$	$2,49 \pm 0,20$	$33,7 \pm 2,0$

Среда инкубации: содержала 0,25 М сахарозы, 10 мМ трис-HCl, 2 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ $MgSO_4$, 10 мМ KCl, pH 7,5. Дополнительные добавки: 200 мкМ ADP, 10^{-6} М FCCP (карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразон), 4 мМ глутамат, 1 мМ малат.

Кроме того, Анфен в концентрациях 10^{-6} М и 10^{-13} М повышает выживаемость животных в условиях гипоксии и острого алкогольного отравления. При этом продолжительность жизни животных в условиях гипоксии возрастает в 1,8-4,5 раза и в 3,9 раза – в условиях острого алкогольного отравления, а выживаемость животных увеличивается на 12-40%

Таким образом, проведенные испытания подтверждают наше предположение о том, что препараты в концентрациях снижающих интенсивность перекисного окисления липидов обладают адаптогенными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boveris A., Oshino N., Chance B.// Biochem. J. 1972. Vol. 128. P. 617–630.
2. Taylor N.L, Heazlewood J.L, Day D.A, Millar A.H.// Mol. Cell Proteomics, 2005, V. 4, P. 1122–1133
3. Kirkinezos I., G., Moraes C.// Cell & Developmental Biology, 2001, V. 12, P. 449–457
4. Тодоров И.Н.// Рос. Хим. Журнал, 2007, Т.51, С. 93-106
5. Эмануэль Н.М., Липчина Л.П.// Докл. АН СССР. 1958, Т. 121, - С. 141-144
6. Володькин А.А., Заиков Г.Е.// Известия Академии наук. Серия

химическая, 2006, 12, С.2138-2143

7. Ершов В.В., Володькин А.А., Прокофьев А.И., Солодовников С.П.// Успехи химии 1973, Т. 42(9), С. 1622–1649
 8. Mokhova E.N., Skulachev V.P., Zhigacheva I.V. // BBA, 1977, V. 501, P. 415-423
 9. Fletcher B.I., Dillard C.D., Tappel A.L. // Anal. Biochem. 1973, V. 52, P. 1–9.
-

УДК 615.01:547.587.1(574)

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ УРОВНЕМ ПОЛИФЕНОЛОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ ТИМЬЯНА, РАСПРОСТРАНЕННОГО НА ТЕРРИТОРИИ КАЗАХСТАНА

**Казбекова А.Т.¹, Атажанова Г.А.², Сейтембетова А.Ж.¹,
Сейтембетов Т.С.¹, Ниязова Р.Е.¹, Адекенов С.М.²**

¹АО «Медицинский университет Астана», Астана, Казахстан, e-mail:
raiguln@mail.ru

²АО «МНПХ «Фитохимия», Караганда, Казахстан, e-mail: arglabin@phyto.kz

Одним из важных направлений в современной медицине является поиск высокоэффективных лекарственных средств направленного действия на основе знания механизма эффекта на молекулярном уровне [1]. В этом плане перспективен путь изучения относительно доступного растительного сырья, в частности, эфирных масел, их количественного состава, установления химической природы мажорных компонентов, в частности полифенольных соединений, и их биологической активности. Также актуальна проблема адекватности метода определения биоактивности потенциального объекта исследования, например, антиоксидантного эффекта эфирного масла, поэтому широко применяются различные способы оценки антиоксидантной активности (АОА) *in vitro*.

Целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи между содержанием полифенолов и АОА эфирных масел тимьяна *Thymus marschallianus* (Mar), *Thymus roseus* (Ros), *Thymus rasiatus* (Ras), *Thymus lavrenkoanus* (Lav), *Thymus petraeus* (Pet), *Thymus crebrifolius* (Cre) и *Thymus serphullum* (Ser), широко распространенных на территории Республики Казахстан.

Эксперименты выполнены с образцами, разработанными в АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия» (г.Караганда), по следующим методикам:

определение общего количества полифенолов реактивом Фолина-Чокальтеу, АОА объектов орто-фенантролиновым способом, с помощью 2-дезоксирибозы и определением железо-восстанавливающего потенциала (FRAP-метод).

Анализ количественного содержания полифенольных соединений в эфирных маслах указанных видов тимьяна показал, что наибольшее количество полифенолов имеет место в маслах *Thymus lavrenkoanus*, *Thymus petraeus* и *Thymus roseus*. Вместе с тем, для эфирных масел *Thymus crebrifolius* и *Thymus serphullum* выявлены пониженные количества полифенолов (Таблица 1). В литературе имеются указания на изменение содержания терпеноидов в зависимости от природы растения и соответственно влияние этого фактора на биологическую активность [2,3]. Содержание полифенолов отражено в эквиваленте таких индивидуальных веществ как галловая, кофейная, протокатехиновая кислоты, рутин и тимол [4].

Таблица 1.

Содержание полифенолов в эфирных маслах по эквиваленту галловой (а), кофейной (б) и протокатеховой (в) кислот, а так же рутина (г) и тимола (д)

Эфирное масло	Метод Фолина-Чокальтеу				
	Содержание полифенолов (мг/мл)				
	а	б	в	г	д
Mar	0,04763	0,07277	0,2703	0,19692	0,08855
Lav	0,17102	0,21453	0,669433	0,5724	0,285
Cre	0,0	0,04622	0,10271	0,0393	0,006102
Ros	0,1684	0,20963	0,66091	0,5644	0,28079
Ras	0,090353	0,10851	0,4085	0,0327	0,1566
Ser	0,0	0,0473	0,11123	0,0473	0,0103
Pet	0,16234	0,1988	0,64135	0,546	0,27116

С целью сравнительного анализа и повышения достоверности определения, нами также выполнено изучение взаимосвязи между величинами оптической плотности и концентрациями спиртовых растворов исследованных масел (Таблица 2). Графически указанные зависимости отражены на рисунке.

Также представляет определенный интерес изучение взаимосвязи между содержанием полифенольных соединений и их антирадикальной активностью, в частности, по отношению к гидроксильным радикалам [5].

Таблица 2.

Величины оптической плотности и концентрации эфирных масел (мг/мл)

Эфирное масло	0,25	0,5	0,75	1
Ser	0,29897	0,3297	0,4246	0,396
Ras	0,7774	0,8838	0,9214	0,939
Lav	0,751	0,8403	0,8632	0,8975
Pet	0,7757	0,8395	0,8641	0,8758
Cre	0,5515	0,5764	0,6325	0,6391
Mar	0,6039	0,6738	0,663	0,6611
Ros	0,6164	0,7939	0,8351	0,8683
Тимол (Tim)	0,5344	0,6738	0,7681	0,7814
Рутин (Ru)	0,909	0,99695	1,0849	1,17285

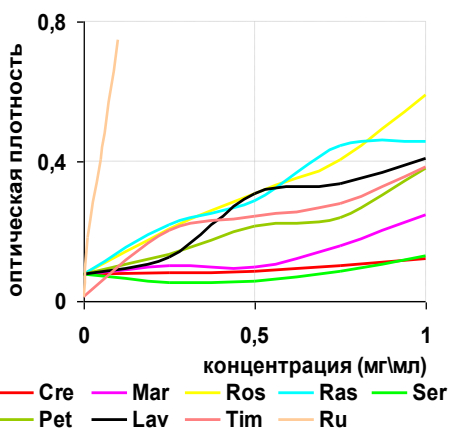


Рис. - Динамика АОА в соответствии с FRAP-методом.

Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод, что исследованные эфирные масла различных видов тимьяна оказывают пониженное антиоксидантное действие по сравнению с рутином и близки к показателям тимола. Установленные величины коэффициента ингибирования антиоксидантного эффекта с применением о-фенантролина указывают на существование концентрационной зависимости между содержанием полифенолов в эфирных маслах и их АОА. Также наблюдается наличие прямо пропорциональной зависимости между полифенольным составом масел и их АОА. Определение антирадикального эффекта на основе данных по методике с применением 2-дезоксирiboзы показало наличие взаимосвязи между величинами коэффициента ингибирования

свободнорадикальных реакций и уровнем полифенольных соединений. Установлено, что эфирное масло тимьяна каменного *Thymus petraeus*, содержащее наибольшее количество полифенольных соединений, проявляет выраженную АОА *in vitro*, что подтверждает вывод о взаимосвязи между содержанием полифенолов и антиоксидантным эффектом суммарного растительного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Толстикова Т.Г., Толстиков А.Г., Толстиков Г.А. На пути к низкодозным лекарствам // Вестник РАН.- 2007.- Том 77.- №10.-С.867-874.
2. Атажанова Г.А. Терпеноиды эфирных масел растений, Москва: ICSPF.- 2008.- 288с.
3. S.N.Ebrahimi, J.Hadian, M.H.Mirjalili et al. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages // Food Chemistry.- 2008.- 110.- P.927-931.
4. Машенцева А.А., Казбекова А.Т., Сейтембетов Т.С. Оптические методы исследования АОА полифенольных соединений и экстрактов на основе растительного сырья *in vitro* и *in vivo* // Вестник КарГУ.- №1(53).-2009.-С.26-34.
5. M. Rama Prabha, K.Vasantha. Antioxidant, Citotoxicity and Poliphenolic Content of *Calotropis procera* Ait. R. Br. Flowers // Journal of Applied Pharmaceutical Science.-2011.- 01(07).-P.136-140.

УДК 66-971+547.972

ОЦЕНКА ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЯДА ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ – ФЛАВОНОИДОВ

Касенова Ш.Б.¹, Абильдаева А.Ж.¹, Касенов Б.К.¹, Рахимова Б.Б.², Сагинтаева Ж.И.¹, Давренбеков С.Ж.¹, Адекенов С.М.²

¹Химико - металлургический институт им. Ж. Абишева, Караганда, Казахстан, тел.: 8(7212)433161 e-mail: hmi2009@mail.ru;

²АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Казахстан.

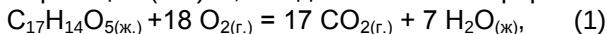
Флавоноиды являются одним из важнейших классов природных фенольных соединений. Большой интерес представляет их широкий спектр биологического и фармакологического действия. На их основе разработаны лекарственные препараты, которые применяются в практической медицине. Следует отметить, что до настоящего времени недостаточно исследованы термодинамические и термохимические характеристики ряда флавоноидов. Данные свойства являются

ценными для физико-химического моделирования направленного синтеза биологически активных соединений.

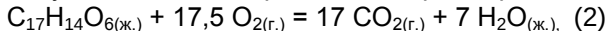
Целью работы является расчет термодинамических свойств ряда полифенольных соединений – флавоноидов и их производных.

Методами Караша и Фроста [1] оценены энтальпии сгорания исследуемых флавоноидов и их производных в жидких состояниях. Вышеуказанные методы предназначены для оценки $\Delta H^0_{\text{сгор.}}$ сложных органических веществ. По методу Караша учитываются наличие лактонного цикла, различных функциональных групп, а по способу Фроста - наличие ароматических колец, цикленов, двойных связей в кольце цикленов и в их боковых цепях, число связей между арильными и алкильными группами. В таблице приведены рассчитанные двумя способами значения теплот сгорания соединений, а также их усредненные величины.

Зная усредненные значения $\Delta H^0_{\text{сгор.}}$ исследуемых биологически активных соединений, по циклу Гесса вычислили их стандартные энтальпии образования в жидком состоянии (табл.), исходя из реакций (1-4) 7', 4' – диметилового эфира апигенина:



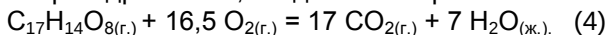
велутина, пектолинаригенина, цирсимаритина:



зупалитина, яцеозидина, 3, 3' – диметилового эфира кверцетина:



аксиларина, зупатолитина, 3,5 – диметилового эфира мирицетина, 5,7,2',4'-тетрагидрокси – 6,5' – диметоксифлавона, 5,7,3',4'-тетрагидрокси – 6,5' – диметоксифлавона:



Необходимые для расчета энтальпии образования вышеуказанных соединений значения ΔH^0 (298,15) $\text{CO}_{2(\text{г.})}$ и $\text{H}_2\text{O}_{(\text{ж.})}$ заимствованы из [2].

Следует подчеркнуть, что некоторые флавоноиды имеют, как указано выше, одинаковые брутто-формулы, но они имеют различия в структурных формулах.

Исследуемые полифенольные соединения при $T=298,15 \text{ K}$ находятся в кристаллическом состоянии, следовательно необходимо оценить их стандартную энтальпию образования ΔH^0 (298,15) в твердой модификации. Для этого проведена оценка $\Delta H^0_{\text{пл.}}$ вышеуказанных флавоноидов и их производных по уравнению Гамбилла [3]:

$$\Delta H^0_{\text{пл.}} / T_{\text{пл.}} = 20,72 \cdot 10^{0,00324 \cdot M}, \quad (5)$$

где M – молекулярный вес соединения, $T_{\text{пл.}}$ – температура

плавления соединения [4].

Результаты $\Delta H^0_{\text{пл.}}$ флавоноидов и их производных приведены в таблице.

По уравнению:

$$\Delta_f H^0 (298,15) \text{ C}_a\text{H}_b\text{O}_c (\text{тв.}) = \Delta_f H^0 (298,15) \text{ C}_a\text{H}_b\text{O}_{c(\text{ж})} - \Delta H^0_{\text{пл.}} \quad (6)$$

рассчитаны стандартные энтальпии образования исследуемых флавоноидов в твердом состоянии (табл.).

Таблица

Термодинамические характеристики флавоноидов и их производных

Соединение	$-\Delta H^0_{\text{сгор.}},$ кДж·моль ⁻¹			$\Delta H^0_{\text{пл.}},$ кДж·моль ⁻¹	$-\Delta_f H^0(298,15),$ кДж·моль ⁻¹	
					жид.	тверд.
Аксилярин	7715	8935	8325±610	131,3	371,3	502,6
Велутин	8121	8935	8528±407	108,3	168,4	276,6
Пектолинаригенин	8121	8935	8528±407	103,7	168,4	272,1
Эупалитин	7918	8936	8427±509	135,9	269,4	405,3
Эупатолитин	7715	8935	8325±610	152,3	371,3	523,6
Цирсимаритин	8121	8935	8528±407	114,0	168,4	282,4
Яцеозидин	7918	8936	8427±509	121,8	269,4	391,2
3,3'-диметиловый эфир кверцетина	7918	8936	8427±509	121,0	269,4	390,4
3,5' – диметиловый эфир мирицетина	7715	8935	8325±610	147,8	371,3	519,1
7,4'- диметиловый эфир апигенина	8325	8935	8630±305	84,6	66,4	151,0
5,7,2',4'- тетрагидрокси- 6,5'- диметоксифлаво	7715	8935	8325±610	155,2	371,3	526,5
5,7,3',4'- тетрагидрокси- 6,5'- диметоксифлаво	7715	8935	8325±610	148,4	371,3	519,7

ЛИТЕРАТУРА

1. Казанская А.С., Скобло В.А. Расчеты химических равновесий. М.: Высш. школа, 1974. 288с.
2. Рябин В.А., Остроумов М.А., Свит Т.Ф. Термодинамические свойства веществ: Справ. Л.: Химия, 1977. 329с.
3. Викторов В.В. Методы вычисления физико-химических величин и прикладные расчеты. М.: Химия, 1977. 360с.
4. Прибыткова Л.Н., Адекенов С.М. Флавоноиды растений рода Artemisia. Алматы: Гылым, 1999. 180с.

УДК: 544.146.5:547.56

АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ГЕТЕРОФАЗНОМ ОКИСЛЕНИИ

Книга О.П., Николаевский А.Н.

Донецкий национальный университет, Донецк, Украина, тел.: +38-050-218-00-72, e-mail: knigaolga@yandex.ru

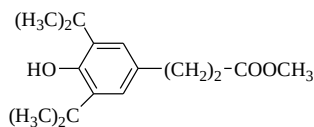
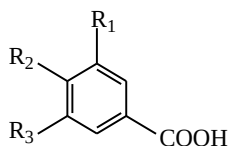
Торможение радикально-цепных процессов окисления органических веществ и материалов на их основе добавками антиоксидантов является актуальной современной проблемой, решение которой способствует ресурсосбережению во многих отраслях хозяйства. Исходя из концепции о ключевой роли окислительных процессов в патогенезе ряда распространенных заболеваний, не ослабевает интерес к их регулированию путем использования биоантиоксидантов, тем более что терапевтическое действие многих лекарственных препаратов коррелирует с антиоксидантной активностью (АОА).

Одними из наиболее распространенных веществ, используемых в качестве антиоксидантов, являются фенольные соединения (ФС) различного строения. При исследовании их действия в процессе окисления молекулярным кислородом водных дисперсий органических веществ, служащих моделями природных пищевых и биологических объектов, часто получают результаты, необъяснимые с точки зрения классических представлений об ингибировании цепных процессов. В ряде случаев соединения – эффективные антиоксиданты в гомогенных системах, в гетерогенных условиях изменяют свою активность вплоть до проявления прооксидантного действия [1], особенно в комплексе с металлами [2].

В данной работе обобщены результаты исследования АОА фенольных соединений (рис. 1) при окислении модельных систем разной сложности: этилбензола (ЭТБ) [3], эмульсий ЭТБ-вода [4] и кумол-вода [5], водно-липидных дисперсий в присутствии соли двухвалентного железа [6]).

Этилбензол и в массе, и в эмульсии окисляли при 70°C, инициатор – азодиизобутиронитрил (АИБН). Эффективность антиоксидантов в гомогенном процессе характеризует константа скорости взаимодействия ФС с пероксильными радикалами ЭТБ (k_7). Кумол в эмульсии окисляли в режиме автоокисления: 110°C, давление 8 атм. (автоклавная установка), t/t_0 . Иницирование в этом процессе происходит за счет реакции разветвления (распада

промежуточного продукта окисления гидропероксида на радикалы).

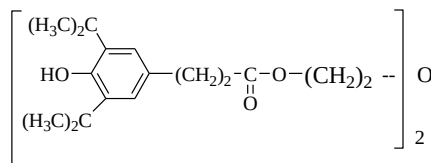


Фенолкарбоновые кислоты:

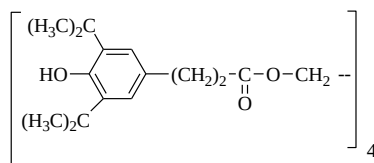
$R_1=R_2=R_3=OH$ – галловая (ГК)

$R_1=R_3=OCH_3$, $R_2=OH$ – сиреневая (СК) Фенозан-1 (Ф-1)

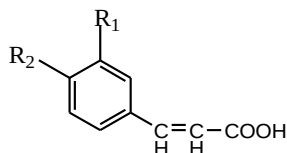
$R_1=OCH_3$, $R_2=OH$, $R_3=H$ – ванилиновая (ВК)



Фенозан-28 (Ф-28)



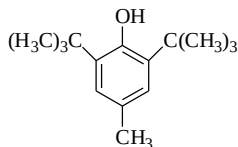
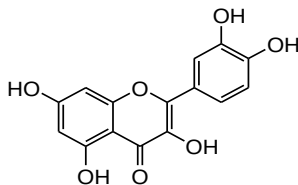
Фенозан-23 (Ф-23)



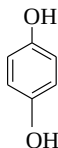
Гидроксикоричные кислоты:

$R_1=R_2=OH$ –кофейная (КК)

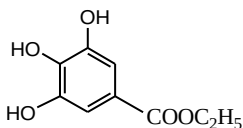
$R_1=OCH_3$, $R_2=OH$ –феруловая (ФК) Кверцетин (Кв)



Ионол



Гидрохинон (ГХ)



Этиловый эфир галловой кислоты
(ЭЭГК)

Рис. 1. Строение исследуемых соединений.

Эмульсии углеводород-вода – прямого типа (соотношение фаз 1:3), стабилизатор – додецилсульфат натрия (DsNa) в концентрации $(3.0 \cdot 10^{-2} \text{ моль/л})$, на порядок превышающей его ККМ. Кинетику процесса контролировали по накоплению пероксидов йодометрически. Параметр АОА в эмульсиях – величина t/t_0 (отношение периодов индукции в присутствии соединения и без него). В последнем случае $t/t_0 = 1$ (ноль).

Окисление водно-липидных систем (стабилизированные DsNa дисперсии линолевой кислоты и фосфатидилхолина) проводили в условиях, приближенных к физиологическим: фосфатный буфер $\text{pH} = 7.4$, 37°C , $W(\text{ЛК}) = 2\% \text{ мас.}$, $W(\text{ФХ}) = 1\% \text{ мас.}$, инициатор – сульфат железа (II). Метод исследования – газовольюметрия, определяемый параметр АОА – $C_{50\%}$ (концентрация ингибитора, снижающая вдвое объем поглощенного кислорода) [6]. Поскольку эффективность соединения тем выше, чем меньше $C_{50\%}$, для наглядности использованы обратные величины – $1/C_{50\%}$.

Параметры АОА производных фенолов при окислении модельных систем схематически представлены на гистограммах (рис. 2 и 3). Сразу необходимо отметить, что соединения с катехольной структурой в водно-липидных системах при иницировании процесса солью двухвалентного железа не исследовались, поскольку они связывают ионы Fe^{2+} в неактивные комплексы, т. е. исходно являются очень эффективными антиоксидантами-хелаторами.

В моделях углеводород-вода, как видно из рис. 2, при близкой антирадикальной активности в масляной фазе (например, в ряду СК ÷ ВК) эффективность действия соединений различна – АОА выше у пространственно-экранированных фенолов. Более того, феруловая и сиреневая кислоты при автоокислении кумола в эмульсии проявляют прооксидантные свойства ($t/t_0 < 1$), а ванилиновая – еще и в системе ЭТБ-вода.

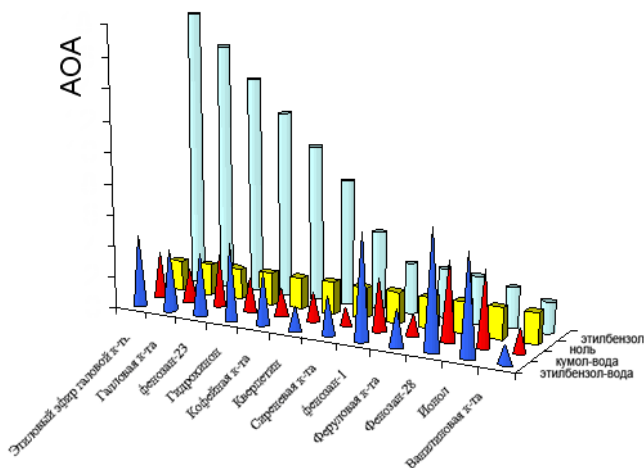


Рис. 2. АОА фенольных соединений при окислении ЭТБ и водно-органических эмульсий.

Известно о большой роли локализации антиоксиданта в эффективности ингибирования гетерофазного окисления [7], поэтому были определены коэффициенты распределения этих ФС между ЭТБ и водой $P_{o/w}$ [4]. Данные представлены в таблице.

Таблица.
Коэффициенты межфазного распределения фенольных соединений [4].

ФС	ГК	ЭЭГК	БК	ГХ	КК	Кв	СК	ФК	Ф-1	Инол	Ф-28	Ф-23
$P_{o/w}$	0.006	0.016	0.013	0.008	0.10	0.011	0.013	0.23	5.7	9.6	218	920

Действительно, как видно из гистограмм, в эмульсиях гидрофобные ФС эффективнее гидрофильных, но лишь распределение не определяет АОА фенолов, тем более не объясняет инверсию ингибирующего действия.

В водно-липидных системах (рис. 3) АОА соединений также не коррелирует с антирадикальной активностью при гомогенном окислении и зависит от природы субстрата. Определяющим фактором различия АОА в случае ЛК и ФХ может быть строение дисперсий, структура которых с коллоидно-химической точки зрения неодинакова. Линолевая кислота-вода – это прямая эмульсия (м/в), ЛК образует капли дискретной фазы и смешанные с ПАВ мицеллы, ФХ-вода – это мицеллярная система. Последняя

имеет на порядок большую площадь межфазной поверхности по сравнению с эмульсией. Поскольку при иницировании окисления ионами Fe^{2+} процесс протекает в приповерхностных слоях масляной фазы [8], более эффективным является АО, способный лучше адсорбироваться на этой поверхности.

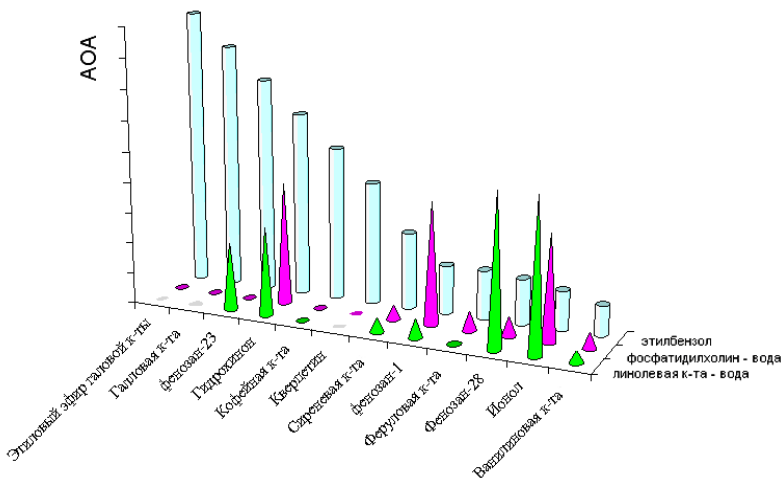


Рис. 3. АОA фенольных соединений при окислении водно-липидных систем и ЭТБ.

В модели ФХ-вода интересно отметить действие фенозана-23 – самого гидрофобного разветвленного производного ионола и очень эффективного ингибитора в гомогенных условиях. Это соединение при низких концентрациях не замедляет окисление липида, а при более высоких ускоряет процесс, что может быть связано с особенностью его локализации в липосомной дисперсии и протеканием побочных процессов.

Еще один влияющий на АОA фактор – реакции с молекулярными окислителями – кислородом воздуха и гидропероксидами. Для взаимодействия с кислородом необходимо образование фенолят-аниона. Как было определено, в условиях эксперимента заметно подвергаются окислительным превращениям лишь производные *о*- и *п*-полифенолов при $\text{pH} > 7.0$ [9], поэтому проокислительные свойства кислот не связаны с этим фактором.

Наличие полярной водной фазы интенсифицирует разложение гидропероксидов фенолами, механизм этой реакции играет особую важную роль при автоокислении органических веществ. Образование при распаде молекулярных продуктов

повышает эффективность ингибирования, а радикальный распад вызывает ускорение процесса окисления, что и является причиной прооксидантного действия.

Гистограммы позволяют наглядно продемонстрировать действие одного и того же соединения в различных условиях окисления. Отчетливо видно, что корреляция параметров АОО гомогенного и гетерофазного окисления, когда реакция протекает как в одной из фаз, так и на поверхности раздела, отсутствует. В отличие от гомогенных систем в присутствии воды АОО фенолов, кроме скорости взаимодействия с пероксильными радикалами субстрата в дискретной фазе, определяется рядом факторов, в том числе, коллоидно-химических.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Palanga G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids // *Free Radical Biology & Medicine*. 1996. Vol. 20, №7. P. 933-956.
2. Кочетова М.В., Семенистая Е.Н., Ларионов О.Г., Ревина А.А. Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии // *Успехи химии*. 2007. Т. 76. С. 88-100.
3. Белая Н.И., Овчарова О.Ю., Николаевский А.Н., Филиппенко Т.А., Заец В.А. Влияние строения фенолов на их активность в реакции с пероксирадикалами этилбензола // *Теорет. и эксперим. химия*. 2004. Т. 40. №4. С. 227.
4. Ивлева Т.Н., Николаевский А.Н., Филиппенко Т.А., Тихонова Г.А., Клыпа К.И. Антиоксидантное действие фенольных соединений при окислении этилбензола в эмульсии // *Вестник Донецкого ун-ва*. Сер. А. 2009. Вип.1. С. 301-307.
5. Івлєва Т.М., Моренко В.В., Ніколаєвський А.М. Вплив фенольних антиоксидантів на окиснення кумолу в емульсії // *Укр. хим. журн*. 2010. Т.76, №6. С. 120-124.
6. Книга О.П., Тихонова Г.А., Хижан Е.И., Николаевский А.Н. Действие фенольных соединений при окислении веществ в модельных водно-липидных системах // *Бутлеровские сообщения*. 2011. Т. 27, №13. С. 57-62.
7. Schwarz K, Frankel E.N., German J.B. Partition behavior of antioxidative phenolic compounds in heterophasic systems // *Fett/Lipid*. 1996. V. 98, №3. P. 115-121.
8. Владимиров Ю.А. Свободнорадикальное окисление липидов и физические основы липидного слоя биологических мембран // *Биофизика*. 1987. Т. 32, №5. С. 830-844.
9. Книга О.П., Івлєва Т.М., Ніколаєвський А.М., Філіппенко Т.А., Хижан О.І. Окиснення фенольних сполук у водних дисперсіях // *Укр. хим. журн*. 2009. Т. 75, №10. С. 39-42.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ФЕНОЛОВ В ДИКОРАСТУЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

Козлова З.Г.

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия,
тел.: (495) 331-28-13, e-mail: Yevgeniya-s@inbox.ru

Растительный мир земного шара богат фенольными соединениями, к которым относятся функционально замещенные фенолы и полифенолы, флавоноиды, токоферолы, производные оксикоричных кислот и т. д. [1]. Как следует из многочисленных современных исследований, многие из фенольных соединений обладают антиоксидантными свойствами и биологической активностью, которая обусловлена их способностью принимать участие в регуляции окислительных процессов в организме человека.

Свободнорадикальное окисление является одним из важнейших механизмов поддержания гомеостаза организма человека, при этом большое значение имеют пищевые рационы, используемые человеком. Разнообразные компоненты пищи могут обладать прооксидантными или антиоксидантными свойствами.

В настоящее время изучен широкий спектр растительной продукции, обладающей антиокислительной активностью. Одной из самых интересных групп, обладающих высокой биоантиоксидантной активностью являются изученные нами ранее пряно-ароматические и лекарственные растения [2].

Объектом исследования стали легко доступные дикорастущие лекарственные растения. В народной медицине их издавна использовали как полезные биологические системы. В данной работе был проведен скрининг потенциальных наиболее эффективных растений с точки зрения содержания в них антиоксидантов (АО). Надо заметить, что одни АО являются жирорастворимыми, другие – водорастворимыми. Количественный анализ жирорастворимых АО можно осуществлять с помощью модельной реакции окисления углеводорода (кумола). Для исследования водорастворимых АО анализ проводили в смеси полярных и неполярных растворителей – углеводов: к кумолу добавляли смеси н-гексана, диметилсульфоксида и воды [3].

Исследовано 12 дикорастущих лекарственных растений: крапива (лист), валериана (корневище), расторопша, подорожник (лист), мелисса (травя), левзея, аир (корневище), череда (травя),

элеутерококк, лопух (корень), одуванчик (корень), петрушка (корень).

При этом надо отметить, что каждое из этих растений обладает специфическим оздоравливающим действием [4].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования являлось высушенное сырье 12 вышеназванных дикорастущих растений. Материал экстрагировали изопропилбензолом (кумолем) в течение суток.

Методика анализа

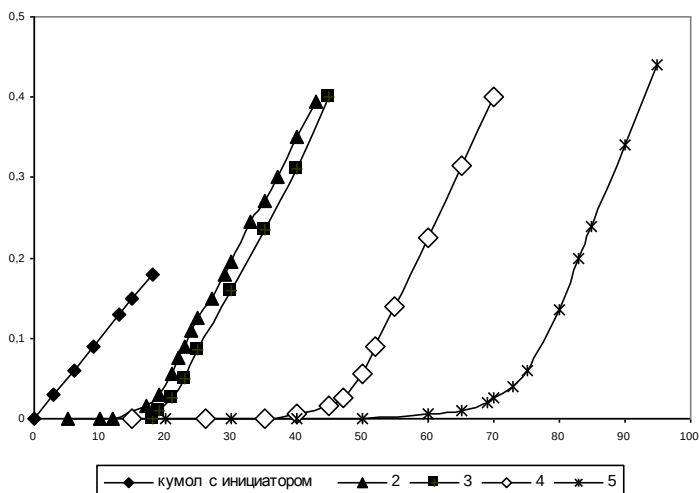
Метод определения антиоксидантной активности (АОА) – прямой и основан на изучении кинетики цепного окисления модельного углеводорода изопропилбензола (кумола), инициированного динитрилом азо-изо-масляной кислоты. Наиболее универсальным показателем является скорость поглощения кислорода окисляющимся веществом (скорость окисления), она отражает суммарный результат протекания основных реакций в системе. АОА препарата характеризуется снижением скорости окисления и определяется периодом индукции. Характер кинетической кривой инициированного окисления кумола в присутствии АО определяется концентрацией АО и константой скорости ингибирования k_7 , которая является качественной характеристикой АО. Метод высокочувствителен, точен и информативен, не нуждается в калибровке, прост в применении и не требует сложного оборудования [5,6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис.1 представлены кинетические зависимости поглощения кислорода в реакции инициированного окисления кумола и в присутствии лопуха, подорожника, аира, элеутерококка.

В отсутствие добавки окисление углеводорода протекает с постоянной скоростью (прямая 1). При введении препарата в модельную реакцию окисления ее скорость падает, а по мере расходования АО скорость окисления возрастает до начального уровня, что указывает на присутствие АО в добавке.

С помощью предложенного метода найдены количественные значения АО в вышеперечисленных образцах (таблица). Впервые получены количественные данные по жиро- и водорастворимым АО. Эти данные колеблются для жирорастворимых АО – в пределах от $1,0 \cdot 10^{-3}$ М/кг до $9,9 \cdot 10^{-3}$ М/кг, для водорастворимых АО – в пределах от $1,0 \cdot 10^{-3}$ М/кг до $8,5 \cdot 10^{-3}$ М/кг.



t, мин

Рис.1. Кинетические кривые поглощения кислорода в реакции инициированного окисления кумола $[\Delta O_2]$, мл
 1 – кумол с инициатором (динитрил азо-изо-масляной кислоты, 1 мг);
 2- лопух (17,5 мг), $\tau = 18$ мин;
 3 – подорожник (6,3 мг), $\tau = 20$ мин;
 4 – аир (30,1 мг), $\tau = 47$ мин;
 5 – элеутерококк (16 мг), $\tau = 74$ мин.

Жирорастворимые АО (токоферол, β - каротин, полифенолы, убихинон и др.) локализованы в липидных структурах – мембранах, липопротеинах и их АО защищают от свободных радикалов. Водорастворимые АО – аскорбиновая кислота, глутатион, эрготионеин, антиперекисные и протеолитические ферменты функционируют внутри клетки. Во внеклеточном пространстве находятся различные металлопротеины (церулоплазмин, трансферрин, лактоферрин, гемоглобин, альбумин), а также мочевиная и аскорбиновая кислоты. Таким образом, все клеточные структуры, а также внеклеточная среда, находятся под контролем физиологической антиоксидантной системы. Основным представителем липидных АО – токоферол – обладает высокой АОА и в модельных смесях липидов природного происхождения токоферол обеспечивает до 60 – 85% ингибирующего эффекта по сравнению с другими природными антиокислителями.

Таблица

Биоантиоксидантная активность исследованных дикорастущих
лекарственных растений

№ п/п	Наименование препарата	Содержание АО (М/кг)		
		Жирорастворимые АО	Водорастворимые АО	Суммарное содержание АО
1	ОДУВАНЧИК (корень)	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$
2	ПЕТРУШКА (корень)	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$2,7 \cdot 10^{-3}$
3	ЛОПУХ (корень)	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$
4	ЛЕВЗЕЯ	$3,3 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$4,3 \cdot 10^{-3}$
5	ЧЕРЕДА (травя)	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$5,7 \cdot 10^{-3}$
6	МЕЛИССА (травя)	$3,5 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$6,6 \cdot 10^{-3}$
7	ПОДРОЖНИК (лист)	$6,5 \cdot 10^{-3}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$8,4 \cdot 10^{-3}$
8	АИР (корневище)	$3,2 \cdot 10^{-3}$	$7,5 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$
9	ЭЛЕУТЕРОКОКК	$9,4 \cdot 10^{-3}$	$3,4 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$
10	РАСТОРОПША	$7,7 \cdot 10^{-3}$	$5,7 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$
11	ВАЛЕРИАНА (корневище)	$7,7 \cdot 10^{-3}$	$5,9 \cdot 10^{-3}$	$1,4 \cdot 10^{-2}$
12	КРАПИВА (лист)	$9,9 \cdot 10^{-3}$	$8,5 \cdot 10^{-3}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$

Суммарное содержание жиро- и водорастворимых АО в допустимых пределах от $2,5 \cdot 10^{-3}$ М/кг до $1,8 \cdot 10^{-2}$ М/кг поднимает статус Дикорастущих трав до разряда Лекарственных растений, известных издавна.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запрометнов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука, 1993. С. 17.
2. Козлова З.Г., Харитонов А.А., Цепалов В.Ф. Антиоксиданты фенольного типа // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Научный мир, 2010. С. 73 – 77.
3. Цепалов В.Ф. Метод количественного анализа антиоксидантов с помощью модельной реакции инициированного окисления // Исследование синтетических и природных антиоксидантов in vitro и in vivo. М., 1992. С. 16-26.
4. Справочник по лекарственным растениям. М.: Лесная промышленность, 1988.
5. Цепалов В.Ф. Автоматическая установка для измерения поглощения

малых количеств газа // Заводская лаборатория. 1964. Т. 30. № 1. С. 1-8.

6. Харитонов А.А., Козлова З.Г., Цепалов В.Ф. и др. Кинетический анализ свойств антиоксидантов в сложных композициях с помощью модельной цепной реакции // Кинетика и катализ. 1979. Т. XX. №3. С.593 -599.
-

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ И ГИБРИДНЫХ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

Комарова Е.А., Сахно А.Б., Домнина Н.С., Попова Э.В.¹

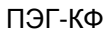
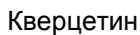
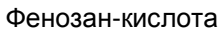
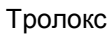
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия,

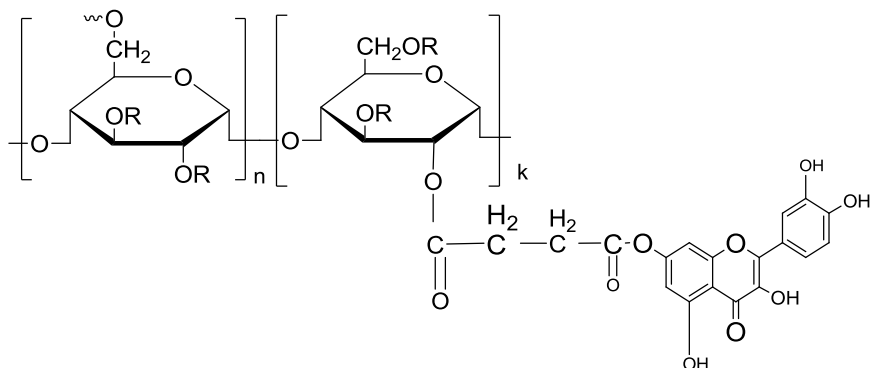
¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия тел.: (812)428-6840, e-mail: elalkom@mail.ru

Многообразие процессов, протекающих в живой клетке в норме, и тем более в стрессовых ситуациях, затрудняет создание универсального метода определения антиоксидантного статуса растений. Тем не менее, возможна модификация известных методов определения антиоксидантной активности и их использование для решения конкретных задач, в частности, для адекватной оценки антиоксидантных свойств различных БАВ и растительных экстрактов. Особенно остро эта проблема стоит при тестировании вновь созданных биологически активных соединений, которые предназначаются для повышения устойчивости растений к стрессам различной природы.

В настоящей работе для оценки антиоксидантной активности биологически активных соединений использован метод сенсibilизированного рибофлавином окисления о-дианизидина.

Объектами исследования служили природный антиоксидант кверцетин (Кв) и синтетическая фенозан-кислота (КФ), а также гибридные макромолекулярные антиоксиданты (ГМАО) на их основе, представляющие собой ковалентные конъюгаты гидрофильных полимеров (декстрана Д, гидроксипропилированного крахмала ГЭК, полиэтиленгликоля ПЭГ) и соответствующих антиоксидантов. Эталонным антиоксидантом служил Тролокс (Тр).





ГЭК-Кв

Изучение сравнительной активности антиоксидантов проводили по методике [1], концентрацию антиоксидантов варьировали в пределах $1 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ М. Установлено, что активность низкомолекулярных антиоксидантов растет в ряду: КФ < Тр < Кв. Для ГМАО способность ингибировать окисление субстрата определяется не только концентрацией, но и природой их полимерной основы. Так, наиболее эффективным ГМАО на основе КФ является ПЭГ-КФ, ингибирующий окисление даже при концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М, при которой Тролокс еще не работает. Среди ГМАО, полученных с использованием кверцетина, лучшим является Д-Кв, превосходящий низкомолекулярный аналог во всем исследуемом диапазоне концентраций. Следует отметить, что при большой концентрации ($1 \cdot 10^{-4}$ М) продукт ГЭК-Кв также проявляет достаточную активность, сравнимую по величине с Тролоксом.

Известно, что в растениях функционирует многоуровневая антиоксидантная система, включающая антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные антиоксиданты (аскорбиновая кислота, токоферол, каротиноиды, полифенолы, глутатион и др.) [2]. При взаимодействии растительного экстракта с экзогенным антиоксидантом возможно проявление, как эффекта синергизма, так и антагонизма. Проведено исследование активности выбранных антиоксидантов в присутствии растительного экстракта (с добавлением в тестируемую среду определенного объема экстракта растений пшеницы - сорт Саратовская 29). Установлено, что в этих условиях активность как низкомолекулярного антиоксиданта Фенозан-кислоты, так и полимерного на ее основе больше активности, полученной для них в отсутствии экстракта. Для природного антиоксиданта Кверцетина и соответствующего ГМАО (ГЭК-Кв) наблюдается более сложная картина. Присутствие

растительного экстракта существенно увеличивает активность системы для ГМАО, тогда как для Кверцетина активность уменьшается.

Таким образом, проведено сравнение активности природных и синтетических антиоксидантов, а также их полимерных аналогов (ГМАО) и показана возможность применения данной методики для оценки влияния экзогенных антиоксидантов на активность растительных экстрактов, что важно для контроля антиоксидантного статуса растений в условиях стресса. Однако наблюдаемая сложная зависимость изменения прооксидантно-антиоксидантного равновесия под действием этих антиоксидантов требует более глубокого изучения и накопления экспериментальных данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Chopra, N. Scott, J. McMurray, J. McLay, A. Bridges, W. E. Smith & J. J. F. Belch (1988). Captopril: a free radical scavenger. Br. J. clin. Pharmac 396-399
2. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: КДУ, 2007. 137 с.

НАПРАВЛЕННЫЕ ТРАНСФОРМАЦИИ ПРИРОДНЫХ ОКСИАНТРАХИНОНОВ

Корулькин Д.Ю., Музычкина Р.А.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан,
тел.: (727) 3871751, e-mail: Dmitriy.Korulkin@kaznu.kz

Создание высокоэффективных лекарственных препаратов с низкой токсичностью является одной из важнейших проблем медицины, фармакологии и органической химии.

На примерах наиболее широко распространенных в природе окси-производных антрахинона, осуществлена программа исследований, включающая разработку технологичных методов их выделения из растительного сырья и получения на их основе разнообразных продуктов химической трансформации структур.

В ряду производных оксиантрахинона впервые выявлены рострегулирующая, гормональная, радиосенсибилизирующая и радиопротекторная, микоцидная, инсектицидная, антиокислительная активности, избирательность действия в отношении некоторых видов опухолей и микроорганизмов и низкая токсичность.

Показана возможность и эффективность использования ряда производных оксиантрахинонов для противолучевой защиты животных и растений при воздействии γ -квантами цезия-137 в пролонгированном режиме, в качестве противоопухолевых средств в комбинации с облучением, в сельском хозяйстве для селекции растений, в борьбе с сорняками и возбудителями болезней растений, для защиты картофеля от сухой гнили при хранении. Отобрано более 50 соединений, перспективных для внедрения и комплексного использования.

Анализ величины и характера биологической активности, позволил выявить некоторые взаимосвязи со структурой молекул, что может способствовать разработке схем целенаправленных синтезов веществ с заданными свойствами.

В литературе не найдено сведений, например, о роли галогенов, фосфора, серы, ацил- или арил-, алкил-, алкокси- групп, связей $C=C$, $C\equiv C$, $C=N$, $N=N$, $C=S$, $C-P$, $P=O$, $O-$ и N -виниловых эфиров, оксимов, гидразонов и т.д. на характер и, тем более, величину биологической активности. Это объясняется тем, что ещё очень малое число производных антрахинона изучено на различные виды биологической активности, отсутствием обобщений и систематических исследований по выявлению взаимосвязи строения и активности. В связи с этим, осуществлены различные трансформации структур оксиантрахинонов и выявлен вклад отдельных фрагментов в характер биоактивности.

Например, изучены реакции химического и каталитического гидрирования хризофанола, эмодина, фисциона и их производных, отработаны условия селективного восстановления $C=O$ групп до антронов и антронолей; предложены новые катализаторы для получения α -сульфокислот, изучены реакции сульфитирования, конденсации с ацетиленом по $C=O$ и OH -группам, сочетания, реакции с реактивами Гриньяра, синтеза нового типа антрацклиненов.

Разработаны способы синтеза: виниловых, винилфениловых, аллиловых, пропаргиловых эфиров, $O-$, $N-$, $S-$, C -алкил (алкен, алкин, арил)-производных; димерных структур с различным характером $C-C$ связи, в том числе аналогов природных димеров; фосфорилированных и тиофосфорилированных, уреидо- и тиоуреидопроизводных, пиримидиноантронов, продуктов взаимодействия с аминокислотами, C -гликозидов. Подобраны условия: селективных процессов обмена и присоединения с участием $C=O$ и OH -групп, электрохимического окисления группы CH_3 , инициированного и фотобромирования, гидролиза α - и β -бромидов, расщепления, гидроксилирования или конденсации в

присутствии трет-бутоксидка калия.

Выявлены новые направления в проведении реакций: винилирование при взаимодействии всех оксиантрахинонов с ацетиленом, фенилацетиленом и пропаргиловым спиртом, С-гликозидирование в боковой цепи, сульфитирование и др.

Более 460 соединений изучено на различные виды биологической активности. Создан препарат антидерматического действия. Все вышесказанное позволяет считать производные антрахинона перспективным классом биологически активных соединений с комплексом полезных свойств.

АНТРАЦЕНПРОИЗВОДНЫЕ ТРАВЫ ЗВЕРБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО

Куркин В.А., Правдивцева О.Е.

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения и социального развития Российской
Федерации, Самара, Россия, тел.: 8-(846)-260-33-59, e-mail:
vakur@samaramail.ru

Трава зверобоя широко используется в медицинской практике для получения антимикробных, противовоспалительных и антидепрессантных лекарственных средств [1, 2]. В химическом составе травы зверобоя доминируют фенольные соединения, прежде всего флавоноиды (рутин, гиперозид, бисапигенин) [1-5]. Кроме того, отмечается содержание флороглюцинов (гиперфорин), дубильных и др. веществ [1-3]. Однако наиболее характерными и уникальными компонентами травы зверобоя являются антраценпроизводные [1-5]. Вместе с тем именно эта группа веществ является, на наш взгляд, недостаточно изученной группой биологически активных веществ травы зверобоя. Литературные источники свидетельствуют, что главными антраценпроизводными зверобоя являются гиперипин, псевдогиперипин [1-5]. При этом все авторы отмечают, что содержание в сырье гиперипина и псевдогиперипина невелико и уступает по содержанию ведущей группе – флавоноидам [2-4, 6].

Следует отметить, что до сих пор не существует единого мнения о химической структуре псевдогиперипина. В литературе встречаются, как минимум, три варианта изображения формулы псевдогиперипина [1, 3, 4, 7] (рис. 1). Данный факт можно объяснить тем, что в РФ не проводили исследования по

целенаправленному выделению этой уникальной группы биологически активных веществ из травы зверобоя. Возможно, это связано с тем, что процесс выделения антраценпроизводных из сырья достаточно трудоемок.

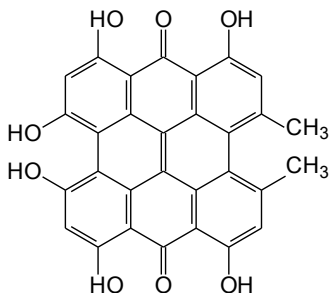
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Изучение свойств антаценпроизводных травы зверобоя, на наш взгляд, является важной и актуальной задачей. Свойства данной редкой группы биологически активных веществ до сих пор остается изученными не в полной мере. Прежде всего, содержание гиперина и псевдогиперина обуславливает фотосенсибилизирующее действие препаратов зверобоя. Это свойство объясняет опыт применения зверобоя для лечения витилиго [1, 2]. Некоторые авторы объясняют антидепрессантный эффект сырья именно этой группой веществ, другие ученые ставят этот факт под сомнение [2, 3]. Наши исследования показывают, что ведущая роль в развитии антидепрессантного эффекта принадлежит флавоноидам (гиперозид и бисапинин), однако, возможно, и антраценпроизводные вносят свой вклад [2, 8]. Антраценпроизводным травы зверобоя также присуще антимикробное и противовоспалительное действие [3].

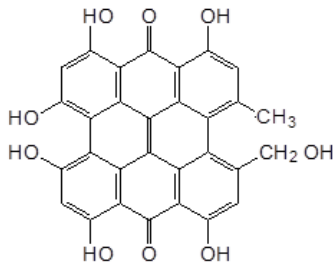
Отмечают, что для антрахиноновых производных травы зверобоя характерно слабительное действие [9]. Вместе с тем препараты зверобоя обладают вяжущим эффектом из-за высокого содержания дубильных веществ [2]. Указывают также на противовирусные свойства антраценпроизводных зверобоя [3, 9]. Предполагается, что гиперин воздействует на сборку, размножение и высвобождение вирусов из клеток. Для гиперина и псевдогиперина обнаружена антиканцерогенная активность [3, 9]. Учитывая столь важные фармакологические свойства, присущие антраценпроизводным травы зверобоя, становится очевидным необходимость анализа данной группы веществ. К этому мнению склоняются многие авторы [2, 5, 4, 9, 11]. Поэтому анализ сырья и препаратов целесообразно проводить не только по флавоноидам, но и по сумме антраценпроизводных [2, 8, 10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

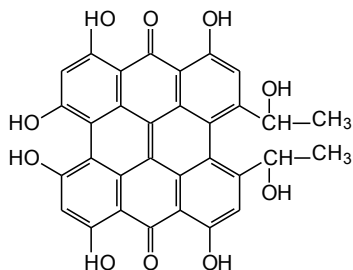
Результаты фитохимического анализа антраценпроизводных, приведенные в литературе также неоднозначны [2, 4, 5, 6, 10, 11]. Большинство источников в качестве метода качественного анализа сырья и препаратов предлагает использовать метод тонкослойной хроматографии [2, 11, 12].



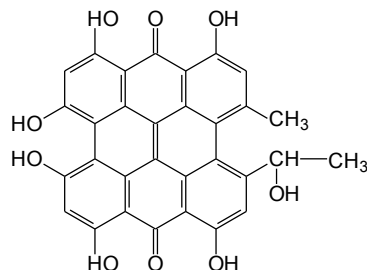
$C_{30}H_{16}O_8$
Гиперицин



$C_{30}H_{16}O_9$
Псевдогиперицин (вариант 1) [3, 4]



$C_{32}H_{20}O_{10}$
Псевдогиперицин (вариант 2) [1]



$C_{31}H_{18}O_9$
Псевдогиперицин (вариант 3) [7]

Рис. 1. Химические формулы антраценпроизводных зверобоя

В случае количественного определения антраценпроизводных используются методы фотоэлектроколориметрии и спектрофотометрии [2, 5, 6, 8, 10-14]. При этом следует отметить, что удельный показатель поглощения в методиках различных авторов существенно отличается. Удельный показатель поглощения для 1% раствора в кювете с толщиной 1 см в данном источнике приводится в виде значения 718 [12]. Так, в одних случаях удельного показателя поглощения для 1% раствора гипериксина имеет значение 71,8 [13], в других - 870 [11, 14]. Видимо, это несоответствие связано с тем обстоятельством, что субстанцию гипериксина в чистом виде при анализе не использовали. В качестве стандарта это вещество также не фигурирует. Анализируя имеющиеся методики, можно отметить, что аналитическая длина волны для антраценпроизводных тоже разная. Так, одни авторы отмечают значение максимума поглощения антраценпроизводных 591 нм [2, 4], другие - 590 нм [5, 12, 13, 14]. Показатели количественного содержания

антраценпроизводных в сырье зверобоя также лежат в очень широких пределах - от 0,03 – 0,17%. Возможно на накопление антраценпроизводных влияет большое количество факторов окружающей среды [2, 3, 4, 6]. Однако не исключается, что при вычислении вносятся факторы, о которых говорилось выше.

Следует отметить, что в настоящее время анализ сырья и препаратов (Зверобоя настойка) в РФ проводится методом дифференциальной спектрофотометрии лишь по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на рутин [1, 2]. На наш взгляд, целесообразно проводить сочетанное определение суммы флавоноидов и суммы антраценпроизводных как в случае сырья, так и препаратов зверобоя травы. С этой целью нами разработан анализ суммы антраценпроизводных в пересчете на гиперин методом прямой спектрофотометрии [2, 10]. Однако работа в плане выделения и очистки антаценпроизводных из травы зверобоя прерывленного должна быть продолжена.

Работа выполнена при поддержке проекта 02.740.11.0650 ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник. - 2-е изд., перераб. и доп. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2007. С. 794-799.
2. Куркин В.А., Правдивцева О.Е. Зверобой: итоги и перспективы создания лекарственных средств. Самара: ГОУ ВПО «СамГМУ»; ООО «Офорт», 2008. 127 с.
3. Беленовская Л.М., Буданцев Л.М. Продукты вторичного метаболизма *Hypericum perforatum* L. и их биологическая активность // Растительные ресурсы. 2004. Т. 40, вып. 3. С. 131-153.
4. Китанов Г.М., Блинова К.Ф. Современное состояние химического изучения видов рода *Hypericum* // Химия природных соединений. 1987. № 2. С. 185-203.
5. Беликов В.В., Точкова Т.В., Шатунова Л.В., Колесник Н.Т., Баяндина И.И. Количественное определение основных действующих веществ у видов *Hypericum* L. // Растительные ресурсы. 1990. Т. 26, вып. 4. С. 571-578.
6. Раал А., Пихлик У., Паавер У., Волмер Д., Меос А. Влияние густоты посадки *Hypericum perforatum* L. на развитие и содержание действующих веществ // Растительные ресурсы. 2004. Т. 40, вып. 3. С. 36-42.
7. Muzychkina R. A. Natural anthraquinones biological properties and physicochemical characteristics. Moscow: Phasis, 1998. P. 668.
8. Зими́на Л.Н. Фармакогностическое исследование по обоснованию создания антидепрессантных препаратов на основе травы зверобоя: Автореф. дисс... канд. фармац. наук. Самара: ООО «Офорт», 2011. 24

с.

9. Ломаченко Н.В., Баширова Р.М. Фармакологические свойства гиперцина // Итоги биологических исследований Башкирского университета за 1998 год. Уфа, 1998. С. 105-108.
 10. Правдивцева О.Е., Куркин В.А. Исследования по обоснованию новых подходов к стандартизации сырья и препаратов зверобоя продырявленного // Химия растительного сырья. 2008. № 1. С. 81-86.
 11. Кудашкина Н.В. Лекарственная форма из травы зверобоя для применения в гинекологии // Фармация. 2004. Т. 52, № 3. С. 36-37.
 12. НД 42-7136-97. Деприм таблетки, покрытые оболочкой. 8 с.
 13. НД 42-12050-01. Негрустин. 6 с.
 14. European Pharmacopoeia 4. Р. 1353-1354.
-

УДК 577.15

УЧАСТИЕ АЛКИЛОКСИБЕНЗОЛОВ В МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ФЕРМЕНТНЫХ БЕЛКОВ

Лойко Н.Г.¹, Крупянский Ю.Ф.², Эль-Регистан Г.И.¹

¹ФГБУН Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, г. Москва,
Россия, тел.: 8-(499)- 135-10-89, e-mail: loikonat@mail.ru

² ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва,
Россия

Ферменты – биологические катализаторы, широко используются в различных областях хозяйственной деятельности человека. Одной из отрицательных сторон использования ферментов является свойственная им нестабильность, обусловленная необратимым нарушением их нативной структуры физическими, химическими и биологическими воздействиями. Добавление стабилизирующих веществ в растворы ферментных белков является наиболее простым и эффективным способом сохранения их активности в денатурирующих условиях [1]. Способностью корректировать структурно-динамическое состояние белков обладают синтезируемые микроорганизмами и растениями алкилоксибензолы (АОБ), имеющие функции универсальных адаптогенов и протекторов, повышающих устойчивость микроорганизмов к неблагоприятным условиям, а в высоких концентрациях индуцирующих переход клеток микроорганизмов в покоящееся анабиотическое состояние [2]. Механизм действия АОБ основан на их способности формировать водородные связи,

гидрофобные и электростатические взаимодействия с соответствующими группами и доменами биополимеров, в том числе, ферментных белков [3].

Целью исследования было изучить эффекты взаимодействия АОБ с простыми и сложными ферментными белками в составе ферментных препаратов и живых организмов, включая модуляцию каталитической активности, изменение субстратной специфичности и повышение стабильности ферментов.

Объектами исследования являлись лизоцим яичного белка (Sigma) – простой ферментный белок класса гидролаз, и пероксидаза хрена (Sigma) – гемсодержащий двухкомпонентный гликопротеид класса оксидоредуктаз. В качестве структурных модификаторов ферментов использовали два алкилоксибензола С7- и С12-АОБ, различающиеся длиной алкильного радикала и гидрофобностью.

В работе была обнаружена способность С7- и С12-АОБ дозозависимо модифицировать ферменты лизоцим и пероксидазу. Модифицирующие эффекты АОБ проявлялись как: (1) изменение каталитической активности ферментов (рис. 1); (2) повышение их функциональной и операционной стабильности (рис. 2, 3); (3) изменение “субстратной специфичности” фермента. Например, при гидролизе коллоидного хитина модифицированным С7-АОБ лизоцимом наблюдалась стимуляция каталитической активности до 575% от контроля (рис. 1а), а при гидролизе о-дианизидина модифицированной С7-АОБ пероксидазой – до 180 % от контроля (рис. 1б). Модифицирующие эффекты зависели от природы субстрата и проявлялись в наибольшей степени при использовании соединения, по отношению к которому активность нативного фермента была наиболее низка. Сравнительный анализ модификации различными гомологами и изомерами простых и сложных ферментов выявил, что если для моносубъединичных белков решающее значение в происходящих процессах имеют структура и концентрация АОБ, то для сложных ферментов – время их взаимодействия при сравнительно узком диапазоне концентраций модификатора. Это объясняется тем, что в последнем случае АОБ действуют не только на третичную структуру апофермента, но и на взаимодействия компонентов сложных белков.

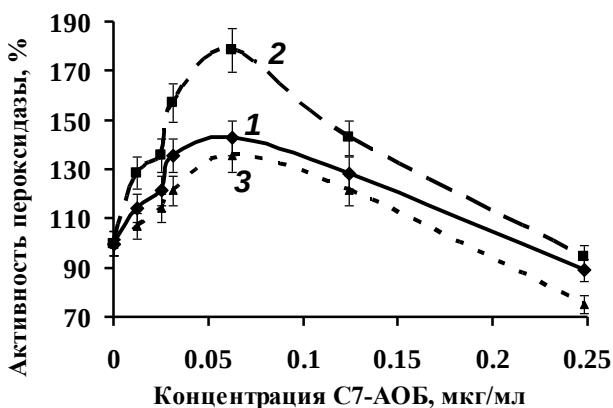
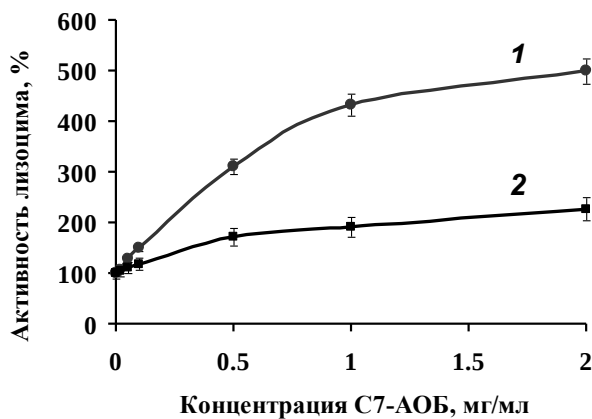


Рис. 1. Концентрационная зависимость действия С7-АОБ на ферментативную активность: (а) лизоцима при гидролизе коллоидного хитина (условия реакции: 1 – $t = 37^{\circ}\text{C}$; 2 – $t = 55^{\circ}\text{C}$; рН 5.5; время – 48 часов); (б) пероксидазы при окислении субстрата о-данизидина (время прединкубации: 1 – без прединкубации, 2 – 10 мин, 3 – 20 мин).

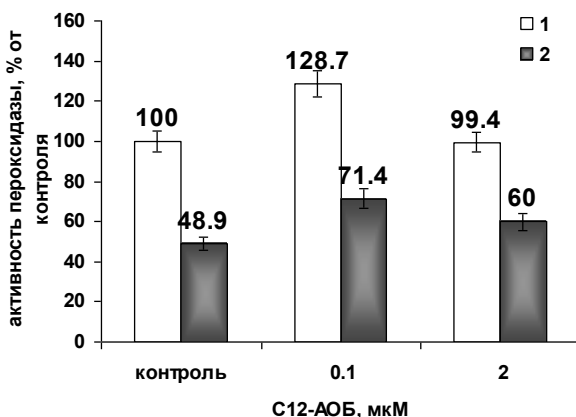


Рис.2. Функциональная термостабильность модифицированной C12-АОБ пероксидазы при окислении субстрата о-дианизидина. 1 – до термообработки; 2 – после 15 минутной экспозиции при температуре 70°C.

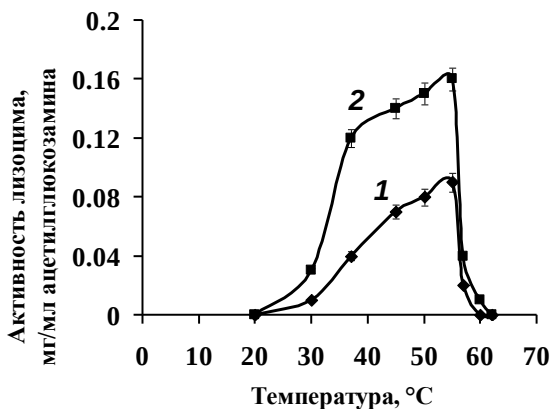


Рис. 3. Операционная термостабильность нативного (1) и модифицированного (2) лизоцима. Условия реакции: концентрация C7-АОБ – 1 мг/мл; субстрат – коллоидный хитин.

Результаты исследований участия АОБ в модификации ферментных белков могут быть использованы в различных биотехнологических практиках. Например, лизоцим, модифицированный C7-АОБ, оказался активен как в отношении хитина и, следовательно, грибов, так и интактных дрожжевых клеток *S. cerevisiae*, максимальный выход редуцирующих сахаров в

обоих вариантах опытов наблюдался при концентрации С7-АОБ 2 мг/мл. Также, возможность направленной регуляции активности ферментов алкилоксибензолами позволяет решить в технологии солода комплексную задачу обеспечения необходимых изменений в прорастающем зерне с его одновременной деконтаминацией. Внесение в замочную воду С7- и С12-АОБ (3 и 0,3 мкг/мл, соответственно) при проращивании ячменя увеличивало активность пероксидазы, выделенной из зерна, в опытных образцах до 185 и 175 ед/мин против 112 ед/мин в контрольных. При повторной (через 4 сут) обработке ячменя С7- или С12-АОБ (50 и 3 мкг/мл, соответственно) (рис. 4) как активность ферментов, так и рост вегетативных органов в зерне ингибировались. Сочетание приемов стимуляции прорастания ячменя с последующим ингибированием ростовых процессов эффективно в технологии солодоращения для сокращения сроков получения солода и повышения в нем экстрактивных веществ.

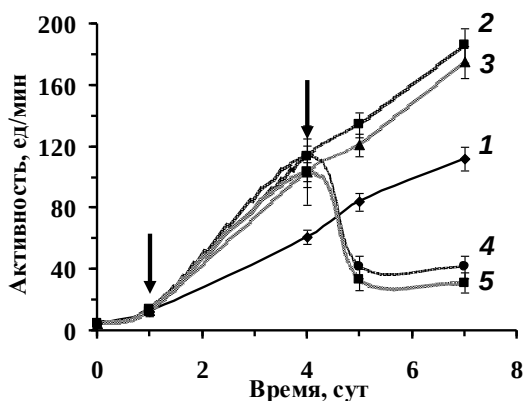


Рис. 4. Влияние АОБ на активность пероксидазы ячменя: 1 – контроль; 2 – 3 мкг/мл С7-АОБ; 3 – 0,3 мкг/мл С12-АОБ; 4 – внесение через 4 сут 50 мкг/мл С7-АОБ; 5 – внесение через 4 сут 3 мкг/мл С12-АОБ.

Обобщенный анализ результатов настоящего исследования демонстрирует роль АОБ в стабилизации и модуляции активности как простых, так и сложных ферментных белков. Варьируя параметры процесса модификации биополимеров: структуру гомологов АОБ, их концентрации, время взаимодействия с белком, можно направленно регулировать эффективность ферментативных реакций. Продемонстрированная схожесть в действии АОБ на простые и сложные белки предполагает универсальность их

регуляторной функции в биологических системах. Изменение каталитической активности белков в их комплексах с АОБ коррелирует с изменением физико-химических свойств биополимеров. Описанные модификационные эффекты АОБ объясняют их широкие адаптационные возможности для защиты микро- и макроорганизмов от стрессорных воздействий. В области биотехнологии использование АОБ перспективно для повышения эффективности производств, основанных на использовании ферментных препаратов или направленной регуляции энзиматических процессов в живых организмах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований грант № 11-04-12057-офи-м-2011.

ЛИТЕРАТУРА

1. Welch W.J., Brown C.R. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress Chaperones*. 1996. V. 1 (2). P. 109-115.
2. Эль-Регистан Г.И., Мулюкин А.Л., Николаев Ю.А., Сузина Н.Е., Гальченко В.Ф., Дуда В.И. Адаптогенные функции внеклеточных ауторегуляторов микроорганизмов // *Микробиология*. 2006. Т. 75. № 4. С. 446-456.
3. Stasiuk M., Kozubek A. Biological activity of phenolic lipids. // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010. Т. 67. P. 841–860.

КОНЬЮГАТЫ 2-ИЗОБОРНИЛФЕНОЛА И ПОРФИРИНОВ В РЕАКЦИИ С ПЕРОКСИРАДИКАЛАМИ

**Мазалецкая Л.И.¹, Шелудченко Н.И.¹, Тарабукина И.С.²,
Буравлёв Е.В.², Чукичева И.Ю.²**

¹Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, Москва

²Институт химии Коми научного центра Уральского отделения РАН, 167982, Республика Коми, Сыктывкар, Россия, тел.: (495)939-71-71
e-mail:lim@sky.chph.ras.ru

Терпенофенолы, синтезированные с использованием природных монотерпеноидов, а также хлорофилла а и его производных, представляют собой малотоксичные соединения и входят в состав различных препаратов, обладающих широким спектром биологической активности и, в частности, антиоксидантным действием. В зависимости от строения терпеновых заместителей, их расположения в ароматическом кольце по отношению к ОН-группе терпенофенолы различаются по антирадикальной активности, которая обуславливает

антиоксидантные свойства фенолов. В качестве биологически активных веществ наряду с индивидуальными терпенофенолами и производными хлорофилла а представляют интерес новые соединения, сочетающие в своей молекуле фрагменты терпенофенолов и хлоринов а-ряда.

Целью настоящей работы является изучение влияния порфириновых заместителей на антирадикальную активность изоборнилзамещенного фенола.

Ингибирующее действие антиоксидантов (АО) изучали в модельной реакции окисления этилбензола (333 К), инициированного динитрилом азоизомасляной кислоты (скорость инициирования $W_i = 5 \times 10^{-8}$ моль/л с) с использованием волюмометрического метода поглощения кислорода. Этилбензол с растворенным антиоксидантом предварительно термостатировали, после чего вводили добавку инициатора. Из кинетических кривых определяли начальную скорость поглощения кислорода (рис.1). Расчет параметра ингибирования fk_7 , который характеризует антирадикальную активность, где f – стехиометрический коэффициент ингибирования, k_7 – константа скорости взаимодействия антиоксидантов с пероксирадикалами этилбензола, проводили с использованием уравнения

$$W_0/W - W/W_0 = f k_7 [AO]_0 / k_6^{0.5} W_i^{0.5},$$

где W_0 и W – скорости окисления в отсутствие и в присутствии добавок соответственно, W_i – скорость инициирования, k_6 – константа скорости квадратичной рекомбинации пероксирадикалов.

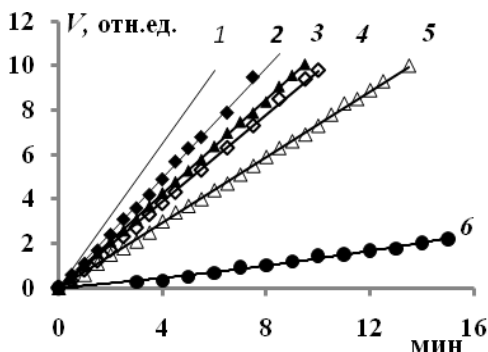
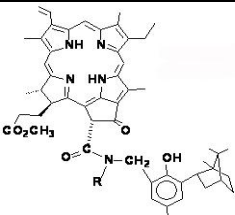
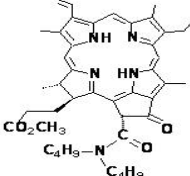
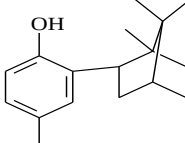


Рис. 1. Начальные участки кинетических кривых поглощения кислорода при окислении этилбензола без добавок (1) и в присутствии (в моль/л): 2 - 1×10^{-4} I; 3 - 5×10^{-4} V; 4 - 2×10^{-4} I; 5 - 1×10^{-3} V; 6 - 1×10^{-4} VI. Температура 333 К, $W_i = 5 \times 10^{-8}$ моль/л с

Структурные формулы и значения параметра fk_7 конъюгатов I-IV, порфирина V и 2-изоборнилзамещенного фенола VI представлены в таблице.

Таблица

Антиоксидант	Обозначение	$fk_7 \times 10^{-4}$, л/моль с
	R = <i>n</i> -бутил (I) R = <i>n</i> -гексил (II) R = <i>n</i> -октил (III) R = бензил (IV)	0.53 0.58 0.58 0.73
	V	0.18
	VI	11.6 [2]

Как видно из данных представленных на рис.1 и в таблице, введение в *o*-положение 2-изоборнил-4-метилфенола порфиринового макроцикла приводит к снижению параметра ингибирования fk_7 в 16 и более раз по сравнению с исходным 2-изоборнил-4-метилфенолом (VI), несмотря на то, что соединение V, содержащее только порфириновый макроцикл, также проявляет антирадикальную активность. Таким образом, объединение в одной молекуле двух фрагментов не приводит к суммированию их антирадикальной активности.

Снижение антирадикальной активности конъюгатов I – IV по сравнению с VI может быть связано с рядом причин. Во-первых, введение в *o*-положение объемного заместителя может обуславливать стерические затруднения при взаимодействии OH-группы с пероксирадикалами. Во вторых, поскольку в состав заместителя входит амидная группа, которая характеризуется электроноакцепторными свойствами, ее расположение в *o*-положении по отношению к OH-группе фенола также может

способствовать уменьшению величины fk_7 . К такому же результату может привести образование внутримолекулярной водородной связи атома азота *о*-заместителя с атомом водорода гидроксильной группы [1,2].

Для выяснения возможного влияния стерических затруднений на реакционную способность конъюгатов проводили сравнение реакционной способности двух фенольных антиоксидантов – 2-изоборнил-4-метил-6-*трет*-бутилфенола и 2-изоборнил-4,6-диметилфенола. Установлено, что замена метильного на объемный *трет*-бутильный заместитель приводит к снижению величины $fk_7 \sim$ менее чем в 1.2 раза. Полученный результат согласуется с литературными данными. Так, сравнение антирадикальной активности 2,4,6-триметилфенола и 2-метил-4,6-ди-*трет*-бутилфенола показывает, что при взаимодействии с пероксирадикалами *n*-декана (50° С) их константы [3] различаются всего лишь в 1.05 раз. Таким образом, существенное уменьшение антирадикальной активности замещенных фенолов I-IV, по-видимому, не может быть объяснено стерическими затруднениями за счет введения объемного заместителя в *о*-положение к ОН-группе.

На основе имеющихся литературных данных можно провести анализ влияния электроноакцепторных групп на реакционную способность фенольных антиоксидантов. Так, при взаимодействии с пероксирадикалами этилбензола происходит снижение с величины $k_7 \sim$ в 4.3 раза для 4-нитрофенола по сравнению с незамещенным фенолом. Подобная картина наблюдается для 2,6-ди-*трет*-бутил-4-замещенных фенолов: при введении в *п*-положение нитро- или цианогруппы величина k_7 снижается в 5 и 2.9 раза соответственно при взаимодействии с растущими пероксирадикалами полистирола [3]. Таким образом, введение в молекулу фенолов сильных электроноакцепторных групп хотя и приводит к уменьшению величин k_7 , однако различия оказываются не столь значительными как в случае конъюгатов I-IV.

Возможность снижения величины fk_7 за счет образования внутримолекулярной водородной связи между атомом водорода гидроксильной группы и атомом азота *о*-заместителя подтверждается данными ИК спектроскопии. Так, соединение I характеризуется полосой валентных колебаний ОН-групп, связанных внутримолекулярной водородной связью, при $\nu = 3396 \text{ см}^{-1}$ (рис.), в то время как полоса валентных колебаний несвязанных ОН-групп фенола VI наблюдается при $\nu = 3621 \text{ см}^{-1}$.

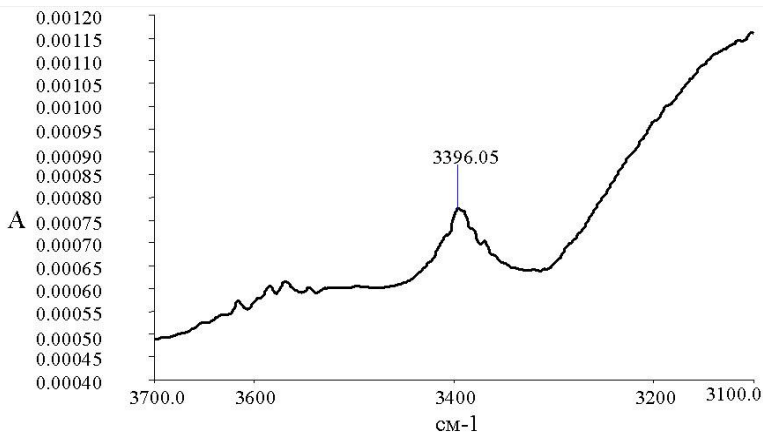


Рис. ИК-спектр соединения I в *n*-гексане

Ранее, снижение реакционной способности за счет образования внутримолекулярной водородной связи $O\cdots H-O$ и $N\cdots H-O$ было установлено для изоборнилзамещенных фенолов с *o*-алкокси- и *o*-метиламиноалкильными заместителями. Так, для *o*-изоборнилоксифенола величина fk_7 уменьшалась в 6.5 по сравнению с *o*-изоборнилфенолом [2]. Введение в молекулу изоборнилзамещенных фенолов *o*-метиламиноалкильных заместителей приводит к снижению реакционной способности ~100 раз. Из данных, представленных в таблице, следует, что соединения I – IV занимают промежуточное положение по потере активности между *o*-алкокси- и *o*-метиламиноалкилзамещенными фенолами.

Таким образом, введение в *o*-положение к 2-изоборнилфенолу порфиринового заместителя приводит к снижению антирадикальной активности исходного 2-изоборнилфенола. Основной причиной снижения реакционной способности конъюгатов, по сравнению с исходной молекулой замещенного фенола является, по-видимому, образование внутримолекулярной водородной связи между атомом водорода гидроксильной группы и атомом азота *o*-заместителя. Более высокая антирадикальная активность конъюгатов по сравнению со свободными порфиринами показывает, что несмотря на значительную потерю активности, фенольная группа тем не менее сохраняет способность взаимодействовать со свободными радикалами. На основании полученных значений fk_7 конъюгатов и свободного порфирина можно предположить, что антирадикальная активность конъюгатов обеспечивается реакцией свободных

радикалов не только с гидроксильной группой фенола, но также и с хлориновым фрагментом молекулы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Цепалов В.Ф., Харитонов А.А., Гладышев Г.П.// Кинетика и катализ. 1977. Т. 18. № 5. С. 1261.
2. Мазалецкая Л. И., Шелудченко Н. И., Шишкина Л. Н., Кучин А. В., Федорова И. В., Чукичева И. Ю. // Нефтехимия. 2011. т. 51. № 5. с.354.
3. Денисов Е.Т. Константы скорости гомолитических жидкофазных реакций. М.: Изд-во «Наука», 1971. 771 с.

РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ ТЕРПЕНОФЕНОЛОВ В РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Мазалецкая Л.И.¹, Шелудченко Н.И.¹, Шишкина Л.Н.¹, Дудник Л.Б.¹, Буравлёв Е.В.², Кучин А.В.², Федорова И.В., Чукичева И.Ю.²

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва

²Институт химии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
Республика Коми, Сыктывкар, Россия, тел.: (495)939-71-71 e-
mail:lim@sky.chph.ras.ru

Большинство известных антиоксидантов представляют собой соединения класса замещенных фенолов. Фенолы с бициклическими изоборнильными и изокамфильными заместителями, относящиеся к терпенофенолам (ТФ), являются биологически активными веществами, проявляют противоинфекционную [1], антиагрегантную активность, обладают гемореологическими свойствами и улучшают мозговой кровоток [2–4]. Фенолы, включающие наряду с терпеновыми алкильные, алкоксильные, а также аминотетильные заместители характеризуются относительно низкой токсичностью ($LD_{50} > 500$ мг/кг) [5] и могут быть перспективными для использования в составе лекарственных препаратов, биологически активных добавок, а также ингибиторов цепных окислительных процессов.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния природы и расположения заместителей в бензольном кольце на реакционную способность ТФ при взаимодействии с пероксирадикалами и 1,1-дифенил-2-пикрилгидразилом (ДФПГ) в зависимости от полярности растворителя.

Реакцию ТФ различного строения с пероксирадикалами изучали методом поглощения кислорода в процессе

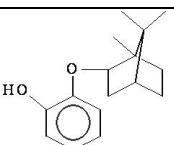
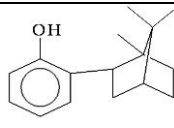
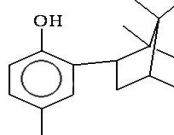
инициированного динитрилом азоизомасляной кислоты окисления этилбензола при 333 К. Из кинетических кривых поглощения кислорода определяли стехиометрический коэффициент ингибирования $f = \tau W_i / [T\Phi]_0$, где τ – период индукции, W_i – скорость инициирования свободных радикалов, а также константу скорости реакции фенолов с радикалами $RO_2^{\cdot}$ (k_7) с использованием уравнения $W_0/W - W/W_0 = f k_7 [T\Phi]_0 / k_6^{0.5} W_i^{0.5}$, где W_0 и W – скорости окисления в отсутствие и в присутствии добавок ТФ соответственно, k_6 – константа скорости квадратичной рекомбинации пероксирадикалов. Реакцию ТФ с ДФПГ проводили при комнатной температуре в среде этанола и толуола. Антирадикальную активность ТФ в этой реакции оценивали по начальным скоростям расходования ДФПГ.

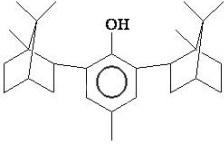
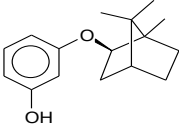
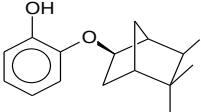
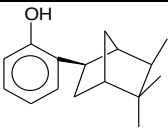
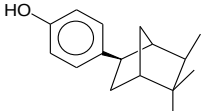
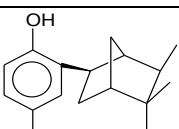
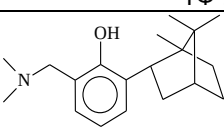
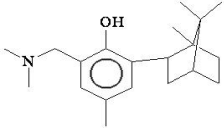
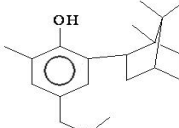
ИК спектры растворов ТФ в концентрации 1×10^{-2} моль/л в *n*-гексане регистрировали на ИК-Фурье спектрометре «Spectrum 100» (Perkin Elmer, Germany).

Структурные формулы ТФ представлены в табл. 1.

Таблица 1

Структурные формулы ТФ, значения констант k_7 , стехиометрических коэффициентов ингибирования f и частот валентных колебаний гидроксильных групп

ТФ	$k_7 \times 10^{-4}$, л/(моль с)	f	ν , см ⁻¹
 ТФ-1	0.4*	-	3561,6
 ТФ-6	2.5	2.1	3618,8
 ТФ-5	6.3	1.9	3620,8

 ТФ-7	11.5	1.8	3612,5
 ТФ-29	2.6	1.8	-
 ТФ-28	0.53*	-	3560,3
 ТФ-26	2.2	1.9	3622,6
 ТФ-27	1.9	2.0	-
 ТФ-14	8.8	1.1	-
 АМТФ-24	0.006*	-	-
 АМТФ-1	0,013*	-	-
 АМТФ-10	7,9	1.7	3621.5

*в предположении $f = 2$

Из таблицы 1 видно, что для *о*-изоборнил- (ТФ-6) и *о*-изокамфил- (ТФ-26) замещенных фенолов величины констант k_7 практически одинаковы. Дополнительное введение алкильных заместителей к 2-изоборнилфенолу (ТФ-6) и 2-изокамфилфенолу (ТФ-26) в *о*- и *п*-положение приводит к закономерному росту антирадикальной активности (ТФ-5, ТФ-7 и ТФ-14) [6,7], при этом реакционная способность изоборнил- и изокамфилзамещенных аналогов (ТФ-5 и ТФ-14) также различается весьма незначительно.

По сравнению с *о*-алкилзамещенными фенолами ТФ-6 и ТФ-26 для *о*-алкоксизамещенных фенолов ТФ-1 и ТФ-28 наблюдается заметная потеря активности при взаимодействии с пероксирадикалами этилбензола, которая обусловлена образованием внутримолекулярной водородной связи между атомом кислорода *о*-алкоксизаместителя и атомом водорода гидроксильной группы. Образование водородной связи зарегистрировано с помощью ИК-спектров: полосы валентных колебаний свободных ОН-групп ТФ-6 и ТФ-26 (табл. 1) смещаются в случае ТФ-1 и ТФ-28 в область с более низкой частотой колебаний, которая характерна для ОН-групп, связанных внутримолекулярной водородной связью. Известно, что образование водородной связи с участием Н-атома ОН-группы приводит к снижению ее реакционной способности [8]: величины k_7 ТФ-1 и ТФ-28 оказывается ниже, чем у ТФ-6 и ТФ-26 (табл. 1). Следует отметить, что, несмотря на потерю активности за счет образования внутримолекулярной водородной связи, реакционная способность ТФ-1 и ТФ-28 ~ в 3 раза выше, чем фенола, не содержащего *о*-алкоксизаместителей, для которого $k_7 = 3 \times 10^3$ л/моль с [9].

Снижение реакционной способности наблюдается также для ТФ, в *о*-положение которых введены заместители, содержащие атомы азота (АМТФ-1 и АМТФ-24), при этом величины k_7 фенолов с *о*-аминометильными заместителями значительно ниже констант k_7 ТФ-1 и ТФ-28. Реакционная способность АМТФ-1 и АМТФ-24, в отличие от *о*-алкоксизамещенных фенолов, оказывается существенно ниже, чем у базовых фенолов – ТФ-5 и ТФ-6 соответственно (табл. 1). Изменение положения электронодонорного третичного аминометильного заместителя с *о*- (АМТФ-1) на *п*-положение (АМТФ-10) приводит к увеличению антирадикальной активности ~ в 600 раз (табл. 1). При этом в ИК-спектре АМТФ-10 зарегистрирована полоса поглощения в области валентных колебаний свободных ОН-групп, отсутствующая в спектрах АМТФ-1 и АМТФ-24. Полученные результаты

свидетельствуют о том, что в молекулах АМТФ-1 и АМТФ-24 образуется водородная связь $N\cdots H-O$, которая, по-видимому, является более прочной по сравнению со $O\cdots H-O$ связью, что способствует столь существенному снижению активности гидроксильных групп в реакции с пероксирадикалами.

Таблица 2
Начальная скорость (W_0) расходования ДФПГ в реакции с ТФ.
Этанол, 295 К, $[ДФПГ]_0 = 1.1 \times 10^{-4}$ моль/л

ТФ	$[ТФ]_0 \times 10^4$, моль/л	$W_p \times 10^8$, моль/л с	ТФ	$[ТФ]_0 \times 10^4$, моль/л	$W_p \times 10^8$, моль/л с
ТФ-1	0.5	2.5	ТФ-7	0.5	4.5
	1.0	3.9		1.0	7.9
	2.0	7.5		1.5	11.8
ТФ-5	0.5	4.3	ТФ-6	0.5	1.6
	1.0	7.0		1.0	3.3
АМТФ-1	1.0	0.8	АМТФ-10	0.5	10.9
	2.0	1.8		1.0	34.6

Реакционная способность изученных ТФ зависит и от природы свободного радикала. Так, при взаимодействии со стабильным радикалом ДФПГ в среде полярного растворителя – этанола наблюдается снижение реакционной способности ТФ по сравнению с их взаимодействием с пероксирадикалами этилбензола. Для ТФ с алкильными заместителями ряд активности, полученный в этилбензоле, сохраняется. В случае ТФ, о-заместители которых образуют водородные связи с ОН-группой, относительная активность в ряду изученных антиоксидантов увеличивается (табл. 2), а для ТФ-1 и ТФ-6 имеет место обращение активности, т.е. ТФ-1 оказывается более активным, чем ТФ-6. Этот результат обусловлен тем, что в результате взаимодействия ОН-группы как ТФ-6, так и ТФ-1 образуют с молекулами полярного растворителя межмолекулярные водородные связи. Действительно, в ИК-спектре ТФ-1 исчезает полоса при 3561.51 см^{-1} , характерная для валентных колебаний связанных внутримолекулярной водородной связью ОН-групп, и появляется широкая полоса валентных колебаний в области $\nu = 3260\text{ см}^{-1}$, характерная для ОН-групп, атомы водорода которых связаны межмолекулярными водородными связями с молекулами растворителя (рис. 1, кривая 1). Аналогичный спектр зарегистрирован для ТФ-6 (рис. 1, кривая 2).

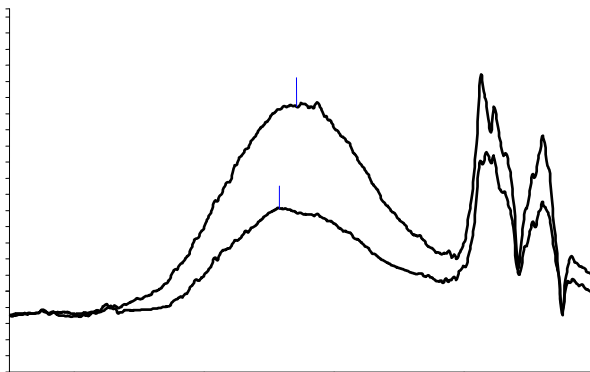


Рис. 1. ИК-спектры в этаноле:
нижняя кривая – ТФ-1, *верхняя кривая* – ТФ-6.
 $[ТФ]_0 = 1 \times 10^{-2}$ моль/л.

Для подтверждения того, что обращение активности ТФ-1 и ТФ-6 в реакции с ДФПГ в среде полярного растворителя этанола связано преимущественно с разрушением внутримолекулярной водородной связи в молекуле ТФ-6, а не только с природой радикала ДФПГ, реакцию этих ТФ с ДФПГ проводили в среде толуола, полярность которого близка к этилбензолу. Оказалось, что в слабо полярном толуоле, в отличие от полярного этанола, при взаимодействии с ДФПГ активность ТФ-6 превышает ТФ-1 в 2.2 раза. Следовательно, именно разрушение внутримолекулярной водородной связи в полярном растворителе этаноле приводит к тому, что реакционная способность ТФ-1 становится выше, чем ТФ-6 (табл. 2.), что согласуется с электронодонорными характеристиками входящих в их состав заместителей.

Таким образом, природа радикала и физико-химические свойства среды оказывают существенное влияние, как на абсолютную, так и относительную антирадикальную активность с фенольных антиоксидантов, различающихся составом, положением и природой заместителей. Полученные данные позволяют предположить, что низкая относительная эффективность ТФ, обусловленная образованием внутримолекулярных водородных связей в неполярных средах, может увеличиваться в биологических системах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cirri M., Mura P., Corvi Mora P. // Int. J. Pharm. 2007. V. 30. P. 84.
2. Плотников М.Б., Краснов Е.А., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин

-
- А.В., Чукичева И.Ю., Буравлёв Е.В. Пат. 2347561 (2007). РФ. // Б.И. 2009. № 8.
3. Плотников М.Б., Краснов Е.А., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю. Пат. 2351321 (2007). РФ. // Б.И. 2009. № 10.
 4. Плотников М.Б., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Буравлев Е.В., Краснов Е.А. // Хим.-фарм. ж. 2010. Т. 44. № 10. С. 9.
 5. Чукичева И.Ю., Федорова И.В., Буравлев Е.В., Лумпов А.Е., Вихарев Ю.Б., Аникина Л.В., Гришко В.В., Кучин А.В. // ХПС. 2010. № 3. С. 402.
 6. Мазалецкая Л. И., Шелудченко Н. И., Шишкина Л. Н., Кучин А. В., Федорова И. В., Чукичева И. Ю. // Нефтехимия. 2011. Т. 51. № 5. С. 354.
 7. Мазалецкая Л. И., Шелудченко Н. И., Шишкина Л. Н., Кучин А. В., Федорова И. В., Чукичева И. Ю. // Ж. физ. химии. 2012. Т. 86. № 6. С. 1035.
 8. Цепалов В.Ф., Харитонов А.А., Гладышев Г.П.// Кинетика и катализ. 1977. Т. 18. № 5. С. 1261.
 9. Денисов Е.Т. Константы скорости гомолитических жидкофазных реакций. М.: Наука, 1971, 711 с.
-

РОЛЬ СТРУКТУРЫ ИЗОБОРНИЛФЕНОЛОВ И ПОЛЯРНОСТИ РАСТВОРИТЕЛЯ В КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИИ С ЛЕЦИТИНОМ

Маракулина К.М.¹, Луканина Ю.К.¹, Крамор Р.В.¹, Чукичева И.Ю.², Кучин А.В.², Шишкина Л.Н.¹

¹ФГБУН Институт Биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва,
Россия тел.: 8(495)9397186

²ФГБУН Институт Химии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, e-mail:
maksmy@mail.ru

В настоящее время, по-прежнему, актуальным остается поиск новых малотоксичных антиоксидантов, синтезированных на основе природного сырья. Среди них активно изучаются замещенные фенолы, содержащие в качестве алкильного заместителя изоборнильные группы, так называемые изоборнилфенолы (ИБФ). Для некоторых соединений данного ряда показана высокая биологическая активность в системах *in vivo*, которую ассоциируют с их антиоксидантным действием [1, 2]. Действительно, ИБФ характеризуются высокой константой скорости взаимодействия с пероксильными радикалами в реакциях инициированного окисления этилбензола [3]. Однако в

биологических модельных системах ИБФ в зависимости от структуры, концентрации и исходных характеристик эритроцитов могут оказывать как мембранотропное, так и мембранопротекторное действия [4]. Следовательно, биологическая активность данных соединений зависит от их способности не только участвовать в регуляции процессов перекисного окисления липидов, но и встраиваться в мембраны, стабилизируя или разрушая их. Как известно, фосфатидилхолин является основным компонентом фосфолипидов внешнего слоя биологической мембраны [5] и основной фракцией соевого лецитина [6].

Целью работы было изучение влияния структуры изоборнилфенолов на параметры комплексообразования их с лецитином в растворителях с различной полярностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали 10%-й спиртовый раствор соевого лецитина (Л), фракционный состав различных партий которого контролировали методом тонкослойной хроматографии [7]. В качестве подвижной фазы использовали смесь хлороформ : метанол : ледяная уксусная кислота : дистиллированная вода в объемном соотношении 12,5 : 7,5 : 2 : 1. Пятна отдельных фракций ФЛ проявляли в парах йода, собирали и сжигали их в отдельных пробирках в присутствии концентрированной хлорной кислоты до неорганического фосфата, количество которого затем определяли спектрофотометрически (КФК-3) при $\lambda=800$ нм по образованию окрашенного фосфорно-молибденового комплекса в присутствие аскорбиновой кислоты [7].

В качестве фенольных антиоксидантов исследовали ИБФ, структурные формулы которых приведены на рисунке. Данные соединения синтезированы на основе отходов лесопромышленного комплекса по методикам, описанным в [8-10].

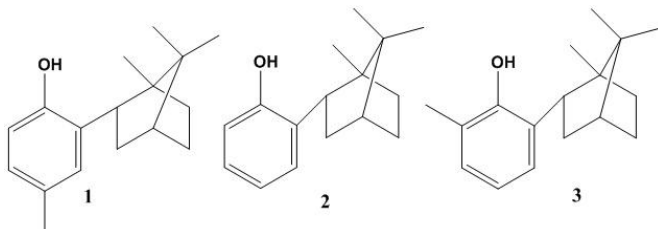


Рис. Структурные формулы изоборнилфенолов: 1 – 4-метил-2-изоборнилфенол (ТФ-5); 2 – 2-изоборнилфенол (ТФ-6); 3– 2-метил-6-изоборнилфенол (ТФ-8)

Явление комплексообразования между молекулами фосфолипидов и ИБФ исследовали и подтверждали методом УФ-спектроскопии гексановых растворов, как отдельных компонентов, так и их эквимольных смесей ($[Л]=[ИБФ]=4,4 \times 10^{-5}$ моль/л). Запись спектров в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм проводили на спектрофотометре UNICO 2800 (США).

Функциональные группировки, участвующие в комплексообразовании, определяли методом ИК-спектроскопии растворов индивидуальных компонентов и их смесей по изменению параметров характеристических полос поглощения в различных растворителях: гексане, хлороформе и этаноле. Запись спектров проводили на ИК-Фурье спектрометре Spectrum 100 (Perkin-Elmer, Германия), оптический материал – селенид цинка.

Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики [11], используя программный пакет MO Excel. Достоверность различий рассчитывали по t – критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как уже отмечалось, лецитин является смесью природных липидов, основной фракцией которой является фосфатидилхолин. Все исследованные партии лецитина, по данным тонкослойной хроматографии, характеризуются высоким содержанием фосфолипидов в общих липидах, при этом доля фосфатидилхолина была выше 82 %.

Явление комплексообразования, установленное ранее для смесей природных фенольных антиоксидантов и лецитина [12-14], подтверждено и для смесей ИБФ с лецитином по отклонению оптической плотности спектра смеси (ΔA) от суммы поглощений отдельных компонентов в тех же концентрациях. Измерения проводили при $\lambda=275$ нм, поскольку для растворов и лецитина, и исследованных ИБФ выполнялся закон Бугера-Ламберта-Бееера в широком диапазоне концентраций с коэффициентом линейной корреляции $\geq 0,99$. Отклонения оптической плотности спектров смеси от оптической плотности аддитивного спектра составляли 0,039, 0,086 и 0,029 для ТФ-5, ТФ-6 и ТФ-8 соответственно.

Функциональные группировки, участвующие в комплексообразовании, определяли методом ИК-спектроскопии. Величины изменений интенсивностей (ΔI) колебаний исследованных групп в растворителях с различным дипольным моментом обобщены в таблице. Ик-спектры сняты в гексане ($\mu=0,08$), хлороформе ($\mu=1,15$) и этаноле ($\mu=1,69$).

Таблица

Изменение интенсивности колебаний группировок в различных растворителях

ΔI	ТФ-5	ТФ-6	ТФ-8
ОН-группы фенолов в гексане	0,0004	0,0002	0,0002
ОН-группы фенолов в хлороформе	0,001	0,0011	0,0015
ОН-группы фенолов в этаноле	0,100	0,070	0,030
С=О группы лецитина в гексане	0,0095	0,0027	0,0019
С=О группы лецитина в хлороформе	0,017	0,005	0,011
С=О группы лецитина в этаноле	0,090	0,060	0,025
холиновой группы лецитина в гексане	0,0075	0,0007	0,001
холиновой группы лецитина в хлороформе	0,011	0,004	0,008
холиновой группы лецитина в этаноле	0,033	0,025	0,010

ОБСУЖДЕНИЕ

ТФ-5 и ТФ-8 отличаются от ТФ-6 наличием дополнительной метильной группы в местах прямого сопряжения с гидроксиллом, что, очевидно, должно приводить к увеличению подвижности атома водорода при ОН-группе, следовательно, увеличению активности при взаимодействии с радикалами. Действительно, значения $k_{\text{г}} \times 10^{-4}$, измеренные для ИБФ при инициированном окислении этилбензола, равны $11,6 \pm 0,8$, $5,2 \pm 0,07$ и $10,0 \pm 0,9$ л/(моль·с) для ТФ-5, ТФ-6 и ТФ-8 соответственно [3]. Таким образом, наличие электронодонорной CH_3 -группы увеличивает активность препаратов, независимо от того в *орто*- или *пара*-положении она находится. Это свидетельствует о том, что метильная группа не оказывает существенного влияния на активность изоборнилфенолов в данной модельной системе вследствие стерических препятствий. Однако, максимальное отклонения смеси от суммарного поглощения индивидуальных компонентов выявлено для ТФ-6, т.е. фенола, не имеющего дополнительных электронодонорных групп в местах прямого сопряжения с ОН-группой. Полоса поглощения фенолов при $\lambda = 275$ нм характерна для $\pi \rightarrow \pi^*$ переходов 6- π -электронной системы бензольного кольца фенолов [15, 16]. Отклонение оптической плотности спектра смеси от аддитивной величины, возможно, обусловлено взаимодействием гидроксильной группы фенолов с лецитином, приведшее к перераспределению электронной плотности в их молекулах.

В ИК-спектрах, однако, наблюдается иная картина. При увеличении полярности растворителя зафиксировано увеличение

отклонения интенсивности колебания всех исследованных групп (таблица), что может быть связано с тем, что этанол, являясь более полярным растворителем, эффективнее взаимодействует и с ИБФ, и с лецитином.

Совокупность представленных данных и анализ литературы свидетельствуют об образовании комплексов изученных ИБФ с лецитином. Анализ ИК-спектров смесей ИБФ с лецитином относительно аналогичных отдельных компонентов показал, что в комплексообразовании независимо от природы растворителя участвуют ОН-группы ИБФ, сложноэфирная и холиновая группы фосфатидилхолина. Однако масштаб взаимодействия зависит от полярности растворителя и наличия CH_3 -группы в структуре молекулы. Так, наименьшие изменения интенсивности колебаний всех участвующих в комплексообразовании группировок обнаружены в гексане, а самые выраженные изменения интенсивностей колебаний всех групп выявлены для растворов в этаноле, при этом величина отклонений уменьшается для смесей лецитина с ИБФ в ряду $\text{ТФ-5ТФ-6} > \text{ТФ-8}$ во всех случаях. В хлороформе изменения интенсивности валентных колебаний ОН-групп фенолов практически одинаковы, независимо от структуры, тогда как на интенсивность колебаний сложноэфирной C=O и холиновой групп лецитина более выраженное влияние оказывают ТФ-5 и ТФ-8, т.е. соединения, в структуре которых есть дополнительная электронодонорная группировка в положении прямого сопряжения с ОН-группой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Плотников М.Б., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Краснов Е.А. // Бюлл. Эксп. Биол. и мед. 2008. 145. № 3. С. 296 – 299.
2. Плотников М.Б., Чернышова Г.А., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Краснов Е.А. // Вестник Росс. АМН. 2009. № 11. С. 12-17.
3. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н., Кучин А.В., Федорова И.В., Чукичева И.Ю.// Нефтехимия. 2011. 51. № 5. С. 348-353.
4. Shishkina L.N., Shivchenko O.G., Plyusnina S.N., Chukicheva I.Yu., Kutchin A.V.// Abstract book of 1st International symposium on Secondary metabolites: chemical, biological and biotechnological properties. 2011. P. 8.
5. Геннис. Р.Ю.Иомембраны: Молекулярная структура и функции. М.:Мир. 1977. 633 с.
6. Klimovich M.A., Paramonov D.V., Trofimov V.I., Kozlov M.V., Shishkina L.N. // Modern problem of biochemical physics: New horizons / Eds. Zaikov G.E., Varfolomeev S.D., Burlakova E.B., Popov A.A. New York: Nova science

-
- publishers, Inc. 2012. P. 255-262.
7. Биологические мембраны. Методы./ Под ред. Финдлея Дж.Б., Эванза У.Г. М.: Мир. 1990. 424с.
 8. Чукичева И.Ю., Кучин А.В. // Российский химический журнал. 2004. XLVIII. № 3. С. 21-38.
 9. Чукичева И.Ю., Кучин А.В., Спирихин Л.В., Борбулевич О.Я., Чураков А.В., Белоконов А.И. // Бутлеровские сообщения. 2003. № 1. С. 9-13.
 10. Chukicheva I.Yu., Timusheva I.V., Spirikhin L.V., Kutchin A.V. // Chemistry of natural compounds. 2007. V. 43. № 3. P. 245-249.
 11. Лакин Г.Ф. Биометрия. 3-е изд. М.:Высш.Шк. 1980. 293 с.
 12. Шарафутдинова Р.Р., Насибуллин Р.С., Фахретдинова Е.Р.// Химическая физика и мезоскопия. 2008. 10. № 4. С.510-513.
 13. Keyong Xu, Benguo Liu, Yuxiang Ma, Jiquan Du, Guanglei Li, Han Gao, Yuan Zhang, Zhengxiang Ning // Molecules. 2009. №14. P.3486-3493.
 14. Мазалецкая Л. И., Шелудченко Н. И., Шишкина Л. Н. // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. 46. № 2. С. 148-152.
 15. Эндрюс Л., Кифер Р. Молекулярные спектры в органической химии. М.Мир. 1967.
 16. Колычев В.Б., Парамонова В.И. Спектроскопические методы в химии комплексных соединений. под ред. В.М. Вдовенко. М.:Химия, 1964.
-

УДК 544.431. 7.544.733.32

ВЛИЯНИЕ pH ВОДНОЙ ФАЗЫ НА АКТИВНОСТЬ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЭМУЛЬСИИ

**Маслова В.Ю., Николаевский А.Н., Тихонова Г.А., Ивлева Т.Н.,
Хижан Е.И.**

Донецкий национальный университет, Донецк, Украина, тел.:
+380501760740, e-mail: antioxidant106@yandex.ua

Наиболее эффективными и относительно экологически безопасными ингибиторами радикально-цепных процессов окисления являются фенольные соединения (ФС). Достаточно хорошо изучено их поведение в гомогенных системах [1]. Однако, как показывает практика, торможение нежелательных окислительных превращений в гетерогенных водно-органических системах является довольно сложной проблемой. Поскольку вода является одним из основных компонентов эмульсии, можно предположить, что такие свойства водной фазы как активная кислотность, ионная сила, во многом будут определять антиоксидантную активность (АОА) ФС в таких системах.

Поэтому целью данной работы стало изучение влияния pH

водной фазы на закономерности окисления этилбензола и антиоксидантную активность фенольных соединений в эмульсии.

Реакция окисления этилбензола (ЭТБ) широко используется для оценки ингибирующей способности ФС в гомогенных системах, поэтому для сравнения поведения антиоксидантов (АО) в гомогенных и гетерогенных системах именно эмульсию ЭТБ-вода использовали в качестве тестовой.

Окисление этилбензола кислородом воздуха проводили в реакторе барботажного типа в присутствии жирорастворимого инициатора окисления – азодиизобутиронитрила (АИБН) в эмульсии прямого типа при соотношении фаз 1:3. Требуемое значение pH водной фазы задавали с помощью универсального буфера ($\text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_3\text{BO}_4 + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{NaOH}$). Для коллоидной стабилизации эмульсии применили додецилсульфат натрия (ДДС). За кинетикой окисления наблюдали по накоплению гидропероксида ЭТБ, концентрацию которого определяли методом йодометрического титрования.

Предварительно было изучено влияние pH водной фазы на закономерности инициированного окисления этилбензола. Установлено, что изменение pH водной фазы в пределах от 2,5 до 7,5 не влияет на скорость окисления этилбензола [2].

Добавление к эмульсии жирорастворимых антиоксидантов – ионола (рис. 1а) и фенозана-28 приводит к снижению скорости накопления перекисных соединений (ПС) и не обеспечивает чётко выраженного периода индукции. Поэтому за период индукции принимали тот промежуток времени, при котором концентрация ПС в эмульсии достигает $0,7 \cdot 10^{-2}$ моль/л. В качестве параметра, характеризующего эффективность ФС, было выбрано отношение периодов индукции в присутствии антиоксиданта (τ) к периоду индукции в его отсутствие (τ_0). Эффективность ионола (рис.1а) и фенозана-28 в эмульсии не зависела от значения pH водной фазы. В случае же с галловой (рис.1б) и кофейной кислотами их эффективность увеличивалась с уменьшением pH водной фазы.

Для объяснения полученных результатов был определён коэффициент распределения фенольных соединений в данных условиях [3]. Установлено, что для галловой и кофейной кислот наблюдается значительное увеличение коэффициента распределения с уменьшением pH водной фазы, тогда как коэффициент распределения гидрохинона, ионола и фенозана-28 не зависит от pH водного раствора.

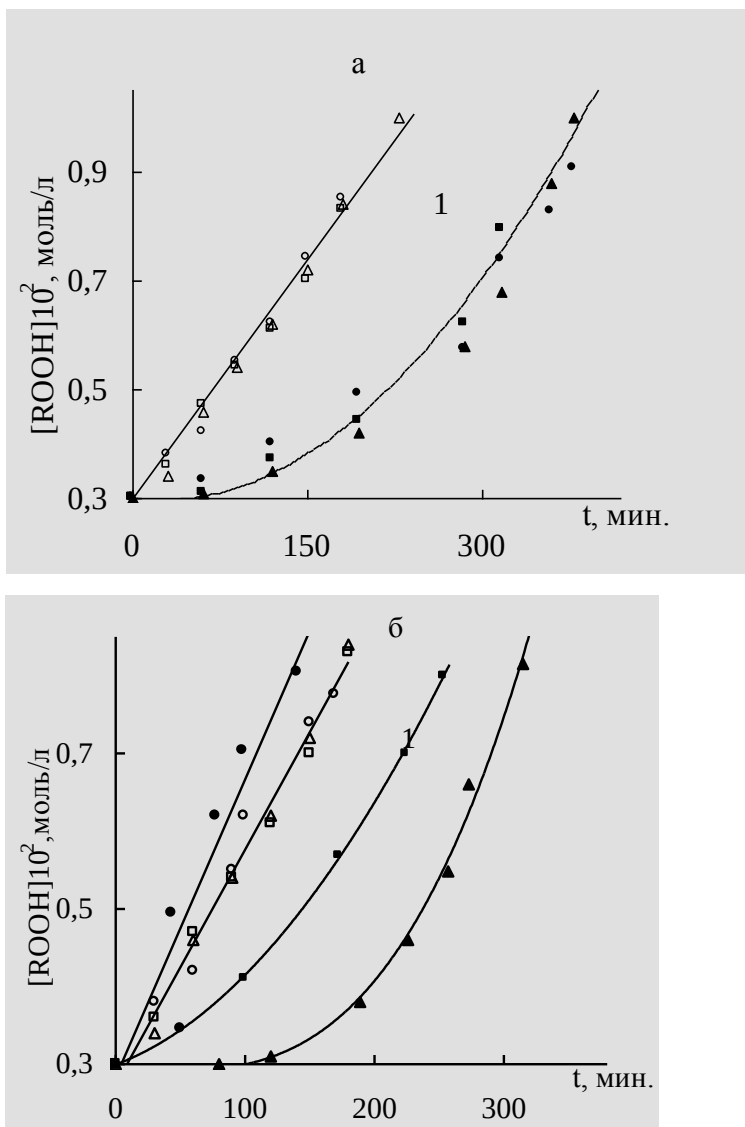
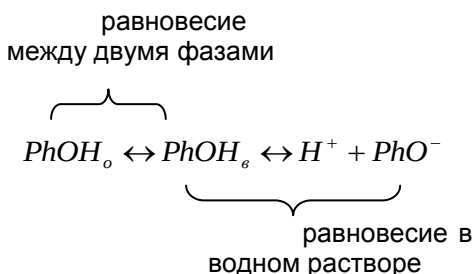


Рис. 1. Кинетические кривые накопления гидропероксида ЭТБ при инициированном окислении в эмульсии в зависимости от pH водной фазы без ингибитора – кр. 1 (pH=2,0 (Δ); pH=5,0 ($\square$); pH=7,5 ($\circ$);) и в присутствии $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л ионора (а) и галловой кислоты (б) – (pH 2,0 ($\blacktriangle$); pH 5 ($\blacksquare$); pH 7,5 ($\bullet$)). $T = 333K$, $[АИБН] = 2 \cdot 10^{-2}$ моль/л, $[ДДС] = 0,5$ моль/л.

Экранированные антиоксиданты (ионол и его производные), вследствие наличия объемных трет-бутильных заместителей практически нерастворимы в воде и относительно хорошо растворимы в неполярных органических растворителях и имеют высокие коэффициенты распределения, которые не зависят от pH водной фазы. Для гидрофильных фенольных соединений, имеющих в своем составе несколько –ОН групп или –COOH группу, характерны низкие значения коэффициентов распределения.

При контакте водного раствора фенола с органическим растворителем устанавливается следующая система равновесий:



Гидрофильные фенольные соединения диссоциируют в водной фазе с образованием заряженных ионов, которые сольватируются молекулами воды, вследствие чего затрудняется переход вещества из водной фазы в органическую. Чем выше константа диссоциации слабой кислоты (pK_{a1}), тем сильнее она диссоциирует в водном растворе при данном pH и тем сильнее сольватируется молекулами воды. Повышение кислотности водной фазы приводит к подавлению диссоциации фенольного соединения. Следовательно, количество антиоксиданта, перешедшего в органическую фазу, в значительной степени будет зависеть от pH водного раствора, что и наблюдается для галловой и кофейной кислот.

Из таблицы видно, что антиоксидантное действие фенольных соединений в эмульсии, согласуется с закономерностями их распределения между фазами системы – чем выше коэффициент распределения между этилбензолом и водной фазой, тем сильнее ингибитор тормозит процессы окисления в эмульсии. С увеличением концентрации антиоксидантов коэффициент распределения остаётся постоянным, т.е. при увеличении содержания антиоксиданта в эмульсии, пропорционально коэффициенту распределения будет увеличиваться и его концентрация в органической фазе.

Таблица.

Влияние pH на антиоксидантную активность (t/t_0) фенольных соединений при окислении этилбензола в эмульсии, $T=333K$, $C_{ддс}=0,5$ моль/л.

Фенольный антиоксидант	$C_{АО} \cdot 10^4$ моль/л	pH	t/t_0	$P_{o/v}$	pK_{a1}
Галловая кислота	5,0	2,0	2,3	0,018	4.41
		5,0	1,1	0,010	
		7,5	1,0	0	
Кофейная кислота	5,0	2,0	2,4	0,042	4,9
		5,0	2,0	0,035	
		7,5	1,5	0,005	
Гидрохинон	5,0	2,0	2,2	0,015	10,35
		5,0	2,2	0,015	
		7,5	2,3	0,014	
Ионол	2,5	2,0	2,1	9,60	-
		5,0	2,2	9,60	
		7,5	2,1	9,60	

С увеличением концентрации липофильного антиоксиданта ионола его АОА увеличивается линейно, что свидетельствует о преимущественном его взаимодействии с пероксильными радикалами.

Концентрационная зависимость антиоксидантной активности галловой кислоты имеет нелинейный характер при всех pH (рис. 2). Это, по-видимому, связано с её участием в нескольких конкурирующих процессах. Так, ФС, поступая в органическую фазу, взаимодействуют с пероксильными радикалами и тормозят процесс окисления. Часть антиоксиданта, оставшаяся в водной фазе, может принимать участие в реакциях окисления кислородом воздуха и с накапливающимися в системе перекисными соединениями, что приводит к дополнительному генерированию радикалов. Такие процессы [4] значительно ускоряются в водной фазе и, особенно, в щелочной среде.

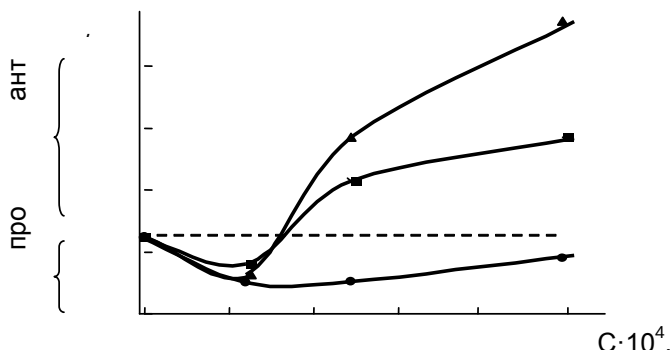


Рис. 2. Зависимость антиоксидантной активности галловой кислоты от концентрации при окислении этилбензола в эмульсии и разных pH: 1 – 7.5; 2 – 5.0; 3 – 2.0.

Следовательно, при низких концентрациях галловой кислоты, преобладают реакции, в результате которых происходит накопление новых радикалов и наблюдается прооксидантное действие, с ростом концентрации галловой кислоты доминирующими становятся антирадикальные процессы и усиливается тормозящий эффект. Дальнейший рост концентрации антиоксиданта в эмульсии, по видимому, вновь приводит к увеличению вклада процессов его непродуктивного расходования в реакциях с кислородом и перекисными соединениями.

Таким образом, исследовано влияние pH водной фазы на антиоксидантную активность фенольных соединений в эмульсии. Показано, что эффективность антиоксидантов в эмульсии изменяется в зависимости от природы фенольного соединения и pH водной фазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. М.: Наука, 1988. 247 с.
2. Ивлева Т.Н., Николаевский А.Н., Тихонова Г.А. Кинетические закономерности окисления этилбензола в эмульсии // Вестник Донецкого университета. Сер.А. 2008. Вып. 1. С.295-299.
3. Николаевский А.Н., Ивлева Т.Н. Виноградов В.В. Закономерности распределения фенольных соединений между органической и водной фазами // Укр. хим. журн.. 2012. Т. 78, С.124-128
4. Азатян В.В. Ингибирование цепных реакций. М.: Черноголовка, 1997. 267 с.

ФЕНОЛЫ КАК АКТИВАТОРЫ РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ KEAP1/NRF2/ARE: ГЕРОНТОЛОГИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

**Меньщикова Е.Б.¹, Зенков Н.К.¹, Дубровина Н.И.², Олейник А.С.³,
Кандалинцева Н.В.³**

¹ФГБУН "Научный центр клинической и экспериментальной медицины" СО
РАМН, Новосибирск, тел.: +7-913-764-3387, e-mail: lemen@soramn.ru;

²ФГБУН "Научно-исследовательский институт физиологии" СО РАМН,
Новосибирск

³ГОУ ВПО Новосибирский государственный педагогический университет,
Новосибирск

Активация процессов свободнорадикального окисления и развитие окислительного стресса показано в этиопатогенезе более чем 200 заболеваний и патологических состояний, многие из них связаны с неблагоприятным воздействием внешней среды (экологические патологии) или жёстко ассоциируются с возрастом (атеросклероз, диабет, нейродегенеративные патологии). Закономерно, что профилактика и терапия таких заболеваний требует применения антиоксидантных препаратов, среди которых ведущее место занимают природные фенольные соединения (токоферолы, стильбены, куркуминоиды, флавоноиды и др.). Действительно, многочисленные эпидемиологические исследования показывают, что употребление продуктов и напитков с высоким содержанием фенольных соединений (зелёный чай, красное виноградное вино, оливковое масло, фрукты и ягоды) снижает риск развития сердечно-сосудистых, онкологических и нейродегенеративных заболеваний [1]. Однако целенаправленное применение препаратов с высокой антиоксидантной активностью часто не приносит желаемого успеха. Поэтому в последние годы появилось новое направление "непрямых" антиоксидантных воздействий посредством активации эндогенных редокс-чувствительных сигнальных систем, и прежде всего системы Keap1/Nrf2/ARE, контролирующей широкий спектр эндогенных антиоксидантов и ферментов детоксикации ксенобиотиков и токсических метаболитов [2].

Среди редокс-чувствительных факторов транскрипции млекопитающих особое место занимает Nrf2, регулирующий экспрессию генов, содержащих в своих промоторах антиоксидант-респонсивный элемент ARE; Nrf2 находится под постоянным контролем репрессорного белка Keap1. Главным назначением

редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE является поддержание внутреннего гомеостаза при апоптоз-индуцирующих, канцерогенных и стрессовых воздействиях. Этим определяется биологическая важность системы Keap1/Nrf2/ARE, регулирующей внутриклеточный редокс-баланс, и как следствие, активность целого ряда других редокс-чувствительных факторов транскрипции, а также метаболических процессов с участием фосфатаз и киназ [3].

Исследования показали, что многие легкоокисляющиеся фенолы и хиноны активируют редокс-чувствительную сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE. В растениях синтезируются разнообразные полифенольные соединения, индуцирующие ARE – катехины, флавоноиды и теафлавины в чайных листьях, куркумин в корнях куркумы, ресвератрол в кожуре и семенах винограда и многие другие.

Высокой ARE-индуцирующей активностью обладают также синтетические фенолы: *трет*-бутилгидрохинон, *трет*-бутилгидроксианизол и *трет*-бутилгидрокситолуол (ионол), которые широко применяются в качестве пищевых консервантов (E319, E320 и E321 соответственно). В клетках *трет*-бутилгидроксианизол метаболизируется в *трет*-бутилгидрохинон, в процессе аутоокисления которого в хинонную форму возникают O_2^- и H_2O_2 , активирующие систему Keap1/Nrf2/ARE [4]. Кроме того, *трет*-бутилбензохинон может модифицировать цистеиновые остатки Keap1 (C273 и C288) и тем самым индуцировать высвобождение Nrf2, а также действовать через киназные механизмы. Часто ARE-индуцирующими свойствами обладают не сами фенольные антиоксиданты, а продукты их окисления [4]. Это показывает, что на основе природных и синтетических фенольных соединений могут быть созданы эффективные активаторы редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE.

Согласно свободнорадикальной теории старения, в результате действия продуктов неполного восстановления кислорода, преимущественно радикальной природы, с возрастом в клетках организма происходит накопление повреждений ДНК и окислительно модифицированных белков, нарушающих нормальные метаболические процессы, что способствует снижению продолжительности жизни [5]. Главной причиной критики свободнорадикальной теории служит неоднозначность действия антиоксидантов в разных экспериментальных системах. Так, например, *трет*-бутилгидроксианизол и *трет*-бутилгидрокситолуол в исследованиях на животных увеличивают

продолжительность жизни, однако одновременно способствуют образованию опухолей [6]. Объяснение двойственности проявлений эффектов антиоксидантов в разных экспериментальных системах, очевидно, кроется в необходимости детального понимания влияния экзогенных соединений на активность эндогенных механизмов антиоксидантной защиты, прежде всего гомеостатирующей системы Keap1/Nrf2/ARE [7].

Путем введения в структуру бромзамещенных алкилфенолов серосодержащих ионогенных фрагментов нами были синтезированы структурно взаимосвязанные ряды соединений с разной степенью экранирования ОН-группы, содержащие в *пара*-положении алкильные заместители с сульфонатными или тиосульфонатными группами. Данные соединения обладают высокой гидрофильностью и бифункциональным антиоксидантным действием, так как в их структуру, помимо фенольной ОН-группы, входят серосодержащие фрагменты, проявляющие антипероксидную активность. В разных экспериментальных системах были изучены антирадикальные и антиокислительные свойства синтезированных соединений [8]. Исследования *in vitro* и *in vivo* выявили высокую противовоспалительную активность 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфоната натрия (ТС-13), который помимо прямого антиоксидантного действия обладает способностью активировать редокс-чувствительную сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE [9].

Основываясь на не противоречащих друг другу воспалительной ("inflamm-aging" [10]) и свободнорадикальной теориях старения, а также предполагая необходимость воздействия на редокс-чувствительные сигнальные системы при разработке геропротекторов, в том числе для профилактики и терапии ассоциированных с возрастом заболеваний, мы провели модельные эксперименты *in vivo* по влиянию ТС-13 на продолжительность жизни и развитие нейродегенеративной патологии.

Обнаружено, что введение в диету 1% ТС-13 повышало продолжительность жизни самок и самцов долгоживущей плодовых мух *Drosophila melanogaster* линии Canton S и не влияло на продолжительность жизни короткоживущей линии Oregon R [11].

Для моделирования болезни Паркинсона, одного из наиболее частых нейродегенеративных заболеваний, использовали хорошо изученную модель с введением МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрапиридин), который в организме окисляется до иона 1-метил-4-фенилпиридиiniuma, вызывающего

избирательную дегенерацию дофаминергических нейронов. 3,5-месячным мышам-гибридам (C57Bl6 × CBA)F1 вводили подкожно раствор МФТП (30 мг/кг; нейротоксин синтезирован в Новосибирском НИИ органической химии СО РАН и любезно предоставлен заведующий лабораторией фармакологических исследований проф., д.б.н. Толстикова Т.Г.) однократно либо по одной инъекции в течение 5 дней. Животным опытной группы (n = 10) в течение 45 дней до этого давали раствор ТС-13 в питьевой воде из расчёта 100 мг/кг, мышам контрольной группы (n = 10) давали воду без добавок. За сутки до введения нейротоксина и через 1 час (острая токсичность) либо через 4 и 8 суток после первой инъекции (хроническая токсичность) выполняли поведенческие тесты: локомоторная активность в "открытом поле" (San Diego Instruments, США), вынужденное плавание по Порсолту, поведение в приподнятом крестообразном лабиринте.

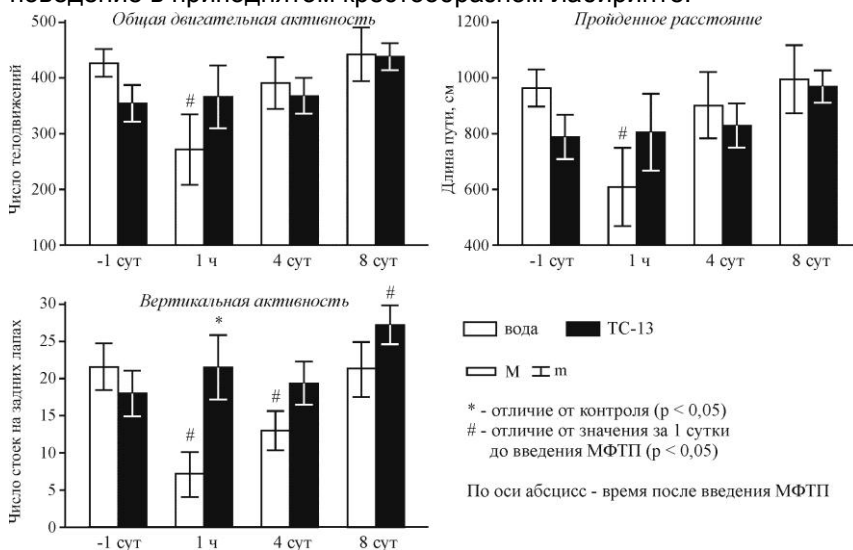


Рис. Влияние длительного употребления ТС-13 на локомоторную активность мышей в тесте "открытое поле" при моделировании паркинсонического синдрома введением МФТП.

Обнаружено, что хроническое и в особенности острое введение МФТП вызывает существенное нарушение двигательной и поведенческой активности: уменьшается общая подвижность, число вставаний на задние лапы в тесте "открытое поле" (рис.), повышается тревожность (после хронического введения время пассивного дрейфа в тесте Порсолта увеличивается с $10,7 \pm 4,4$ до

40,3 ± 10,6 с, время нахождения в открытых рукавах и в центре приподнятого крестообразного лабиринта снижается соответственно с 10,3 ± 5,5 до 0,0 ± 0,0 секунды и с 30,3 ± 7,2 до 13,0 ± 7,3 секунды). Длительное неинвазивное введение ТС-13 существенно улучшало локомоторную активность по всем анализируемым параметрам теста "открытое поле" при остром введении нейротоксина и повышало вертикальную активность мышей после хронического введения (рис.). В отношении тестов на тревожность результат был парадоксальным: ТС-13 увеличивал время пассивного дрейфа до 75,4 ± 18,2 с и отчасти снижал время нахождения в центре лабиринта (до 4,4 ± 2,2 с).

Таким образом, показано, что синтетический водорастворимый фенол ТС-13, индуцирующий сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE, может служить эффективным профилактическим геропротекторным средством, в комплексе с антидепрессивными препаратами предотвращающим развитие нейродегенеративных патологий.

Работа выполнена при поддержке муниципального гранта мэрии г. Новосибирска молодым ученым и специалистам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health // Nat. Prod. Rep. 2009. Vol. 26. P. 1001–1043.
2. Hybertson B.M., Gao B., Bose S.K., McCord J.M. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation // Mol Aspects Med. 2011. Vol. 32. P. 234–246.
3. Brigelius-Flohe R., Flohe L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors // Antioxid. Redox Signal. 2011. Vol. 15. P. 2335–2381.
4. Dinkova-Kostova A.T., Wang X.J. Induction of the Keap1/Nrf2/ARE pathway by oxidizable diphenols // Chem. Biol. Interact. 2011. Vol. 192. P. 101–106.
5. Harman D. Aging: overview // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001. Vol. 928. P. 1–21.
6. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука, 2008. Т. 2.
7. Tomobe K., Shinozuka T., Kuroiwa M., Nomura Y. Age-related changes of Nrf2 and phosphorylated GSK-3β in a mouse model of accelerated aging (SAMP8) // Arch. Gerontol. Geriatr. 2012. Vol. 54. P. e1–e7.
8. Олейник А.С., Куприна Т.С., Певнева Н.Ю., Марков А.Ф., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Григорьев И.А. Синтез и антирадикальная активность гидроксиарилпропил-тиосульфонов и сульфонов натрия // Изв. АН. Сер. хим. 2007. № 6. С. 1094–1101.
9. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Кандалинцева Н.В., Олейник А.С.,

-
- Просенко А.Е., Гусаченко О.Н., Шкляева О.А., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений // Биохимия. 2007. Т. 72, вып. 6. С. 790–798.
10. Cannizzo E.S., Clement C.C., Sahu R. et al. Oxidative stress, inflammation and immunosenescence // J. Proteomics. 2011. Vol. 74. P. 2313–2323.
11. Вайсман Н.Я., Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Кандалинцева Н.В., Голубовский М.Д. Влияние индуцирующего антиоксидант-респонсивный элемент фенола на продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* // Успехи геронтологии. 2011. Т. 24, № 4. С. 591–600.
-

УДК 006.91

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ И АМБИОЛ ГИДРОХЛОРИДА С ЦЕЛЬЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИХ В КАЧЕСТВЕ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ СОСТАВА АНТИОКСИДАНТА

Мисин В.М., Клименко И.В.

ФГБУН Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эмануэля, Москва,
тел.: (495) 9397197, e-mail: inna@deom.chph.ras.ru

Одним из современных направлений исследования антиоксидантов является получение достоверных количественных данных, необходимых для определения содержания антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках, а также для создания банка данных. Поиск веществ, которые могут служить стандартным образцом состава при разработке надежных методик определения антиоксидантов, а также установление на их основе показателей качества выпускаемой продукции, является главной задачей стандартизации в химико-фармацевтической и пищевой промышленности. Федеральный Закон «О Техническом регулировании» [1] регулирует отношения в области установления, применения и исполнения обязательных требований к продукции, а также в области оценки соответствия стандартным образцам состава. Стандартные образцы должны отвечать ряду требований, определяемых в [2]. При этом основными характеристиками стандартного образца состава являются стабильность и однородность.

К сожалению, в настоящее время в России полностью

отсутствуют аттестованные стандартные образцы антиоксидантов. В литературе также отсутствуют данные по стабильности, однородности и содержанию основного компонента в конкретных образцах антиоксидантов, что не позволяет использовать их в качестве образцов сравнения.

При выборе водорастворимого стандартного образца состава антиоксиданта перспективным представляется использование галловой кислоты (3,4,5-тригидроксибензойная кислота, рис.1), и амбиол гидрохлорида (рис. 2). Галловая кислота обладает определенными преимуществами перед другими антиоксидантами фенольного типа. Она легко растворяется в воде и является достаточно чистым веществом ($\approx 98\%$ у различных производителей). В природе встречается в чае, дубовой коре, дубильных экстрактах. Ее стоимость в несколько раз меньше по сравнению с другими АО, которые используются в качестве рабочих образцов сравнения. Амбиол гидрохлорид впервые был синтезирован в ИБХФ РАН, по классификации антиоксидантов (происхождение, растворимость, природа ядра) относится к синтетическим и водорастворимым и является гидроксипроизводным гетероциклов. Амбиол гидрохлорид способен ингибировать процесс перекисного окисления липидов, что предотвращает разрушение биомембран клеток. Применение амбиола в сельском хозяйстве повышает всхожесть семян, морозо- и засухоустойчивость, устойчивость к болезням и обеспечивает прирост урожая на 10-50%.

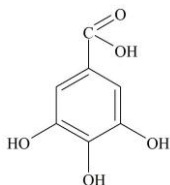


Рисунок 1. Структурная формула галловой кислоты

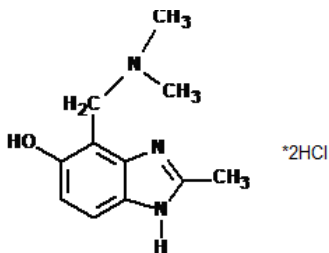


Рисунок 2. Структурная формула амбиол гидрохлорида.

Были исследованы растворы галловой кислоты и амбиол гидрохлорида в дистиллированной воде при хранении на воздухе при комнатной температуре и на воздухе в холодильнике. Стабильность водных растворов галловой кислоты и амбиол гидрохлорида изучали с помощью спектрофотометрического метода, который в настоящее время является наиболее точным,

эффективным и не требующим больших затрат времени [3, 4]. Электронные спектры поглощения растворов регистрировали при комнатной температуре с помощью UV-VIS спектрофотометра TU 1901 фирмы «ЛЮМЭКС» в диапазоне 190-800 нм; используя стандартные кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см.

Спектрофотометрический анализ веществ проводился на основе закона Бугера-Ламберта-Бера, который устанавливает количественную взаимосвязь между величиной поглощения света на определенной длине волны исследуемым веществом и концентрацией вещества:

$$D = \ln(I_0 / I) = \varepsilon \cdot C \cdot l, \quad (1),$$

где D - оптическая плотность; I_0 и I - интенсивность падающего и вышедшего из образца пучка света соответственно; C - концентрация поглощающего вещества, выраженная в моль/л; l - толщина образца, см; ε - молярный коэффициент экстинкции, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$. В данной работе коэффициент экстинкции был определен экспериментально из 5 измерений растворов галловой кислоты и растворов амбиол гидрохлорида с концентрацией 20 мг/л.

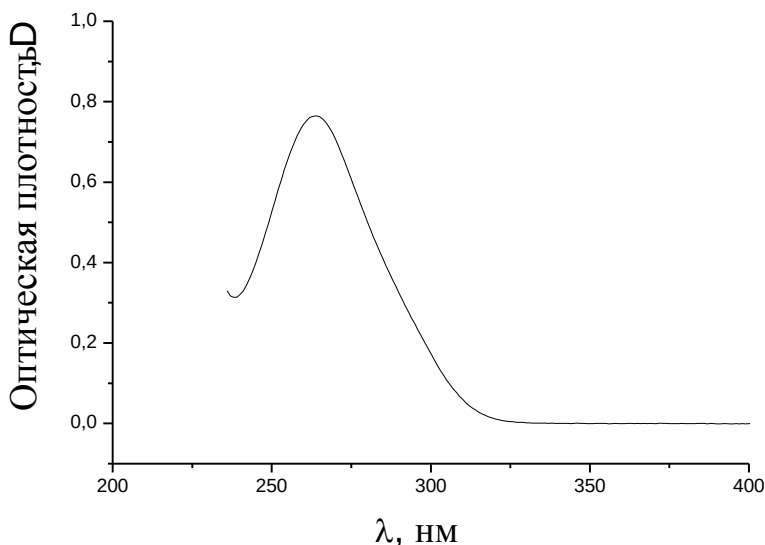


Рис. 3. Спектр поглощения исходного раствора галловой кислоты в дистиллированной воде ($C=20$ мг/л) (хранение при комнатной температуре).

Порошки амбиол гидрохлорид и галловой кислоты хранили в холодильнике, перед взвешиванием выдерживали при комнатной температуре в течение часа в темноте. В день выполнения измерений строили градуировочный график на свежеприготовленных растворах. Оптическую плотность измеряли при комнатной температуре при максимумах поглощения на длине волны $\lambda=294\text{нм}$ для амбиол гидрохлорида и $\lambda=263\text{ нм}$ для галловой кислоты.

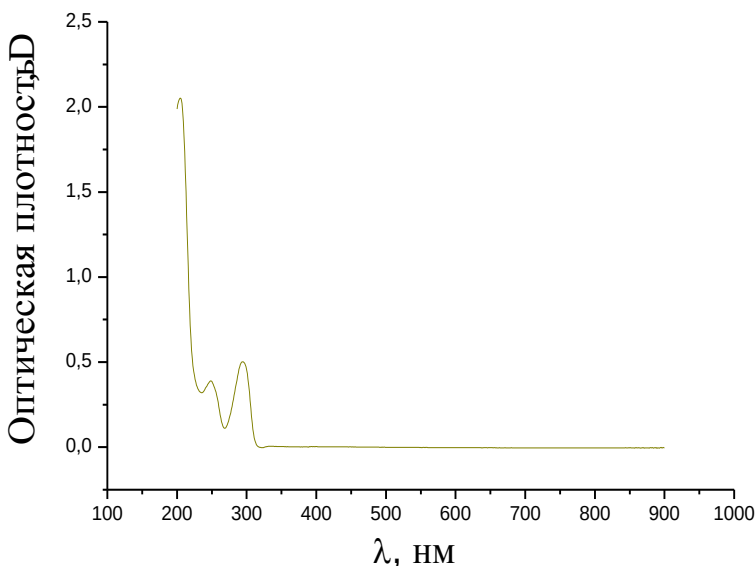


Рис. 4. Спектр поглощения раствора амбиол гидрохлорида в дистиллированной воде ($C=20\text{мг/л}$) (хранение при комнатной температуре).

На рис. 3 и 4. представлены электронные спектры поглощения растворов галловой кислоты и амбиол гидрохлорида в дистиллированной воде на воздухе при комнатной температуре.

В результате обработки электронных спектров поглощения растворов галловой кислоты и амбиол гидрохлорида согласно формуле (1) получены зависимости изменения концентраций растворов галловой кислоты от времени хранения в различных условиях, статистическую обработку которых проводили в соответствии с рекомендациями Р 50.2.031-2003 [5].

В табл. 1 приведены для примера показатели стабильности

исследуемых растворов галловой кислоты, где

a - коэффициент линейной зависимости погрешности от нестабильности;

S_u - стандартное отклонение сглаженных оценок, вычисляемое по среднему размаху R_{cp} по формуле $S_u = 0,89 R_{cp}$;

S_a - стандартное отклонение коэффициента a ;

$t_{таб}$ – квантиль распределения Стьюдента;

T - срок годности раствора галловой кислоты.

Таблица 1.

Результаты исследования стабильности раствора галловой кислоты.

Параметры	Единицы измерения	Раствор галловой кислоты (хранение при комн. температуре)	Раствор галловой кислоты (хранение в холодильнике))
a	-	0,00533	-0,00431
S_u	мг/л	0,04725	0,02737
S_a	-	0,00124	0,00072
t	-	4,29567	5,993797
T	сутки	44	59

В результате исследований установлено, что растворы галловой кислоты и амбиол гидрохлорида достаточно стабильны и могут быть использованы в качестве материала для стандартного образца состава антиоксиданта, причем такой фактор как снижение температуры увеличивает их стабильность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный Закон «О техническом регулировании».-М.: Изд-во «Омега-Л», 2007
2. ГОСТ 8.315-97 «Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения» - М., ИПК Изд-во стандартов, 1997
3. Данилова Н.А, Попов Д.М.. Количественное определение дубильных веществ в корнях щавеля конского методом спектрофотометрии в сравнении с методом перманганатометрии // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2004. №2. С. 179-182.
4. Берштейн И.Я., Каминский Ю.Л. Спектрофотометрический анализ в органической химии. М.: Изд-во Химия, 1975.
5. Р 50.2.031-2003. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Методика оценивания характеристики стабильности // www.consultant.ru / сайт фирмы “Консультант Плюс”, 2010 (дата обращения: 20.07.2010)

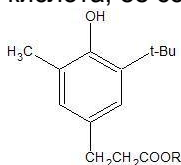
АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕНОЛЬНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ

**Овсянникова М.Н., Вольева В.Б., Белостоцкая И.С.,
Комиссарова Н.Л., Малкова А.В., Курковская Л.Н.**

Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля Российской Академии
Наук, Москва, Россия; тел.: 8(495)9397353; e-mail:
kommisarova@polymer.chph.ras.ru

Фенольные антиоксиданты известны как фармакологически активные соединения, способные к коррекции различных патологических состояний, в том числе вызванных инфекционным поражением организма. Основную функцию антиоксидантов связывают, главным образом, с нормализацией процессов перекисного окисления липидов клеточных мембран, разбалансированных у больного организма. Однако к настоящему времени получены данные, свидетельствующие о возможности воздействия антиоксиданта на ультраструктурную организацию инфекционного агента. Так, нами совместно с группой из НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи [1] методом трансмиссионной электронной микроскопии было показано, что инкубированная с антиоксидантом бактериальная культура клинического изолята золотистого стафилококка претерпевает изменение структурно-функциональной организации, прямо связанное с нарушением практически всех обменных процессов в клетке, включая мембраностеночный комплекс, мезосомы, перегородки деления. В цитоплазме бактерий отсутствовали рибосомы, уменьшалась ее плотность. Под влиянием антиоксиданта наблюдался эффект склеивания бактерий и нарушение нормального процесса деления. Эти эффекты усиливались с увеличением времени воздействия препарата. Полученный результат явился отправной точкой для более широкого исследования антибактериальной активности нескольких групп замещенных одно- и двухатомных фенолов и их производных с различными структурными параметрами, что позволяет соотнести наблюдаемый эффект с определенными элементами структуры. В работе использовали модифицированный метод определения антимикробной активности, основанный на прямом воздействии испытуемого вещества на клетки тест-микроба. В качестве тестов использовали *Escherichia coli* 1157 (госпитальный штамм раневых инфекций) и *Staphylococcus albus* (соответственно грамотрицательный и грамположительный). Используемое соединение дозированно наносили на засеянный тест-микробом газон из агаризованной питательной среды,

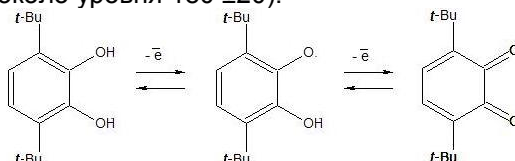
помещали в термостат на двое суток. Если при диффузном распространении вещество проявляет антимикробную активность, то вокруг точки его нанесения образуется стерильная зона, площадь которой (S , мм²) зависит от интенсивности воздействия. Для разграничения бактерицидного и бактериостатического действия образцы оставляли при комнатной температуре еще на 2-3 суток. При бактерицидном действии зона отсутствия роста культуры оставалась прозрачной, при бактериостатическом (задержка роста) постепенно зарастала и выравнивалась с плотностью газона. В качестве реперных соединений, позволяющих сопоставить данные обоих методов и подтвердить полученные ранее результаты, использованы так называемые ИХФАНы – N-алкил-диметил-(4-гидрокси-3,5-ди-трет.бутилфенил)пропионилэтиламмоний бромиды. Подтверждена также зависимость антибактериальной активности ИХФАНов от длины кватернизирующего алкильного заместителя. Наибольшая активность зарегистрирована для ИХФАНов -8 и 16. Это также высший результат в ряду карбоксизамещенных фенолов, включающем базовую 4-гидрокси-3,5-ди-трет.бутилфенилпропионовую кислоту, известную как Фенозан-кислота, ее соли и алкиловые эфиры, в том числе холиновый эфир.



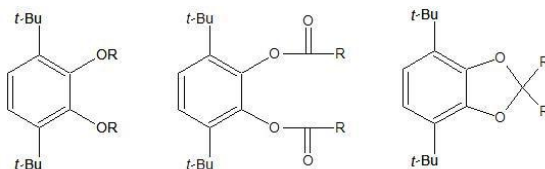
R	Площадь стерильной зоны, S , мм ²	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus albus</i>
- H	32	35
- K	50	64
- CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	10	10
- CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂ C ₁₀ H ₂₁	50	79
Br ⁻		
- CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂ C ₈ H ₁₇	214	214
Br ⁻		

Гомолог Фенозан-кислоты – 4-гидрокси-3,5-ди-трет.бутилфенилуксусная кислота и ее родственные производные обнаруживают близкий уровень активности ($S = 28 \pm 5$) для обоих микроорганизмов. Таким образом, определяющим элементом

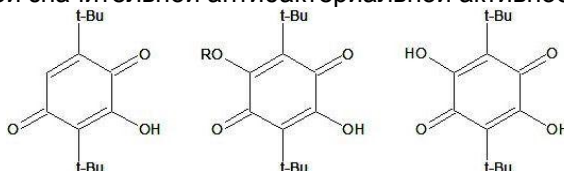
структуры для карбокси-замещенных фенолов является наличие ионной группировки и липофильного фрагмента нужной длины, то есть, структуры типа «якорь – поплавков». Исключением является гироксисалициловая кислота ($S = 123$ *E.coli* и 165 *St.albus*), однако ее целесообразно рассматривать в ряду двухатомных фенолов, включающем 3,5- и 3,6-ди-трет.бутилпирокатехины и их редокс-сопряженные производные. Триада фенол – семихинон – хинон, соответствующая обратимому постадийному переносу двух электронов, по-видимому, является структурным фактором высокой антибактериальной активности этого ряда соединений (значения S колеблются около уровня 180 ± 20).



Это дополняется высокой координирующей способностью каждого из членов редокс-триады. Комплексообразование с ионами металлов может существенно влиять на электронный и ионный транспорт в клеточных структурах микроорганизмов. О справедливости такого предположения говорит полная потеря антибактериальной активности при блокировании гидроксильных групп в результате алкилирования, ацилирования или конденсации с карбонильными соединениями с образованием циклических эфиров.



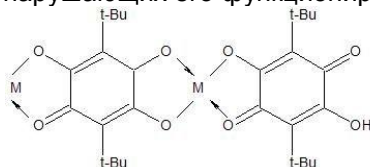
При окислении двухатомных фенолов в гидрофильной биосреде процесс не останавливается на стадии хинона. Возможными промежуточными соединениями при дальнейших превращениях являются гидрокси- и алкоксифенолы, обладающие собственной значительной антибактериальной активностью.



Для

дигидрокси-ди-трет.бутил-пара-бензохинона

зарегистрирован рекордный уровень активности (S = 330 E.coli и 298 St. albus). Наиболее вероятно, что это связано со способностью 2,5-ди-трет.бутил-3,6-дигидрокси-п-бензохинона к образованию полимерных металлокомплексов, блокирующих клетки микроорганизма и нарушающих его функционирование.



В массиве протестированных фенолов обнаружены два соединения с бактериостатическими свойствами – 4-метил-2-трет.бутил-фенол и 2-метокси-4,6-ди-трет.бутил-фенол. Это важное свойство при антисептической терапии раневых инфекций, позволяющее задерживать рост патогенной флоры без угнетения полезной. Полученный результат определяет направление поиска новых бактериостатиков среди модифицированных 2,4-диалкилфенолов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Константинова Н. Д., Диденко Л. В., Шустрова Н. М., Белостоцкая И. С., Комиссарова Н. Л., Вольева В. Б., XX Российская конференция по электронной микроскопии, Черноголовка 2004, тезисы докладов, стр. 236.

УДК 541.62:547.972:543.42

ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ ФЛАВОНОЛОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ УГЛЕВОДОВ

Погодаева Н.Н.¹, Медведева С.А.², Сухов Б.Г.¹, Ларина Л.И.¹

¹Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН. 664033, Иркутск, Россия, тел.:(3952) 42-69-11, e-mail: nat_pogodaeva@irioch.irk.ru

²ФГБОУ ВПО Иркутский государственный технический университет, Иркутск, Россия.

Интерес к флавоноидным соединениям велик ввиду присущей им антиоксидантной активности и широкого спектра биологического действия. Однако разработка препаратов на основе флавоноидов осложнена их высокой гидрофобностью [1]. Нами установлено, что повысить растворимость флавонолов в водных растворах можно за счет получения их молекулярных комплексов с природным полисахаридом арабиногалактаном.

Использование УФ-, ИК- ^1H - и ^{13}C - ЯМР- спектроскопии позволило установить, что в процессе сольватации 3-гидроксифлавона (Рис. 1, 1A) молекулы воды ослабляют внутримолекулярную водородную связь, образуя конкурирующую с ней, межмолекулярную. Это способствует появлению его таутомерной дикетоформы. В водных растворах арабиногалактана возникают водородные связи между карбонильными группами дикетона и гидроксильными группами углевода, что способствует стабилизации дикетоформы за счет образования молекулярных комплексов (1B) и сопровождается появлением полосы поглощения в области 410 нм.

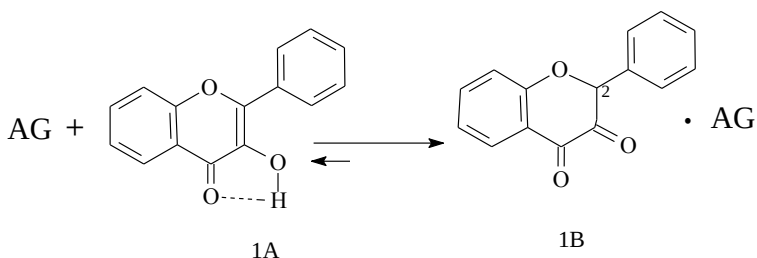


Рис. 1. Схема образования молекулярного комплекса 3-гидроксифлавона с арабиногалактаном (AG)

Комплексообразование способствует улучшению растворимости 3-гидроксифлавона в воде, то есть арабиногалактан проявляет гидротропные свойства.

Аналогично взаимодействуют с арабиногалактаном и другие производные 3-гидроксифлавона (3-гидрокси-5-метокси-, 3-гидрокси-4'-метоксифлавоны, кверцетин).

Известно, что многие углеводы участвуют в различных биохимических процессах, связанных с образованием межмолекулярных комплексов [2], поэтому мы исследовали возможность комплексообразования 3-гидроксифлавона с некоторыми распространенными моносахаридами, в том числе, моделирующими молекулу арабиногалактана, выбрав L-арабинозу, D-галактозу и D-глюкозу.

Для изучения процессов, происходящих в водных растворах между 3-гидроксифлавоном и углеводами, использовали УФ-спектроскопию. Как и в случае с арабиногалактаном, комплексообразование приводит к сдвигу таутомерного равновесия 3-гидроксифлавона в сторону дикетона и появлению новой полосы поглощения при 410 нм, характерной для комплекса (рис. 2). Следовательно, все исследованные углеводы проявляют по

отношению к 3-гидроксифлавану гидротропные свойства.

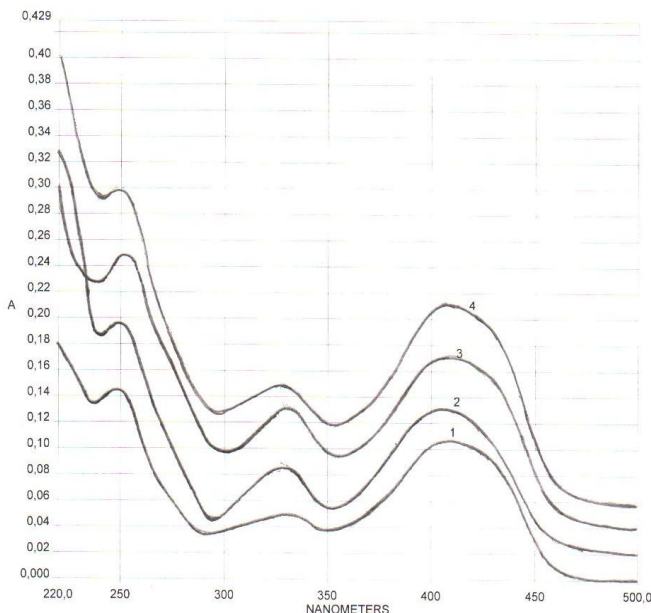


Рис. 2. УФ-спектры молекулярных комплексов 3-гидроксифлавана с углеводами в водных растворах: 1 - D-галактоза, 2 - L-арабиноза, 3 - арабиногалактан, 4 - D-глюкоза

Для оценки оптимальных условий комплексообразования использовали метод молярных отношений [3]. О степени участия сахаров в комплексообразовании судили по концентрации углевода, при которой начинается взаимодействие с 3-гидроксифлавоном, и интенсивности поглощения комплекса. Реакционная способность моносахаридов к комплексообразованию возрастает в следующем порядке: D-галактоза < L-арабиноза < D-глюкоза.

Способность 3-гидроксифлавонов к кето-енольной таутомерии и комплексообразованию с углеводами, приводящая к увеличению их растворимости в водных растворах, может иметь большое значение для понимания механизмов биологического действия этих соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Погодаева Н. Н., Медведева С. А. Гидрофобные свойства некоторых монозамещенных производных флавона и флавонона // Журн. физич. химии. 2005. Т.79. С. 751-754.
2. Парфенюк Е. В., Давыдова О. И. Молекулярные комплексы моно- и

-
- олигосахаридов в растворах // Научные основы химической технологии углеводов / Под. ред. А. Г. Захарова, ЛКИ. Москва. 2008, 528 с.
3. *Россоти Ф., Россоти Х. Определение констант устойчивости и других констант равновесия в растворе.* М., 1965, 564 с.
 4. Rossotti F. J. C , Rossotti H. The Determination of Stability Constants and Other Equilibrium Constants in Solution, (1961).
-

НОВЫЕ ГЕРМАНИЙОРГАНИЧЕСКИЕ КОМПЛЕКСЫ С ПОЛИКАРБОНОВЫМИ КИСЛОТАМИ: ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ

Ревина А.А.¹, Башкирова С.А.¹, Зайцев П.М.²

¹ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина
РАН, Москва

²Научно-исследовательский институт по удобрениям и инсектофунгицидам
им. Я.В. Самойлова, Москва, Россия, тел.: +7 (495) 995 40 17. e-mail:
alex_revina@mail.ru

В последние годы в биологии и медицине отмечается повышенный интерес к органическим соединениям германия (Ge), который играет важную роль биомикроэлемента. По данным ВОЗ (1998г.) микродозы Ge оказываются эссенциальными для нормального функционирования иммунной системы живых организмов. Более того, дефицит этого микроэлемента в продуктах питания связывают с проявлением детских заболеваний [1].

С целью снижения дефицита Ge наиболее перспективными представляются недавно синтезированные водорастворимые комплексы германия с поликарбонowymi кислотами – кислотами цикла Кребса (лимонной, янтарной, α -кетоглутаровой, фумаровой, яблочной, щавелево-уксусной) – карбоксилаты 1-гидроксигерматрана [2,3]. Из них наиболее изучено производное лимонной кислоты, зарегистрированное как «Эниогерм».

Проведенные клинические исследования (97 добровольцев в возрасте от 21 до 66 лет) показали наличие выраженных терапевтических эффектов в течение полутора месяцев после 5-дневного приема. Отмечалось значительное улучшение общего состояния у всех пациентов; у 95% - страдающих гипертонией, были уменьшены дозы лекарственных препаратов на ~ 25%; 85% испытуемых ощущали легкость при ходьбе, повышение выносливости к нагрузкам. За время наблюдения ни один из испытуемых не заболел простудными заболеваниями

(исследования проводились в осенне-зимний период).

Введение в организм германийорганического комплекса «Эниогерм», очевидно, ускоряет синтез и увеличивает активность митохондриальных ферментов дыхания и скорость окислительного фосфорилирования, ответственных за синтез АТФ, улучшает энергообеспечение клеток, стимулируя процесс их регенерации и омоложения. Сделано предположение об антигипоксантажной активности Ge – комплексов,.

Для изучения механизма протекторных свойств и антигипоксантажной активности германиевых комплексов с карбоновыми кислотами, [Ge...ROOH] в стрессовых условиях были использованы физико-химические методы, моделирующие протекание реакций, в которых генерируются активные промежуточные частицы, включая АФК, ответственные за окислительно-восстановительные процессы в живых организмах в норме и при патологии. Так, метод инверсионной полярографии (ИП) позволил проследить специфические стадии реакций восстановления O_2 до супероксид анион-радикала, пероксид-иона и молекул воды в буферных растворах за счет присутствия германийорганических комплексов [4].

На основании результатов исследований радиационно-химических превращений в растворах комплексов [Ge...ROOH] под действием γ -лучей ^{60}Co был сделан вывод о влиянии природы лиганда на радиопротекторные свойства комплексов. В отличие от 1-гидрокси-герматрана его цитратный комплекс обладает более ярко выраженной антиоксидантной активностью. Вероятно, это можно связать с уникальной способностью последнего в аэробных условиях образовывать лабильный оксокомплекс с частичным переносом заряда и активированием молекулы O_2 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Исаев А.Д., Поткин А.В., Башкирова С.А., Трохаченкова О.П., *Тр. Конференции «Профессиональное долголетие и качество жизни»*, Россия, ЦВКС «Архангельское» МО РФ, 2007., стр.93.
2. Патент РФ 2293086 (10.02.07).
3. Решение о выдаче Патента от 14.02.08 по заявке на изобретение N 2006146303.
4. Ревина А.А., Зайцев П.М.. Роль ранних стадий активирования молекулярного кислорода в биологической и каталитической активности природных антиоксидантов фенольной природы// *Электрохимия*. 2012. Т.48. № 3. С. 1-6.

УДК: 547.656:561.123

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ ГОССИПОЛА - РАСТИТЕЛЬНОГО ПОЛИФЕНОЛА

**Режепов К.Ж., Зияев Х.Л., Казанцева Д.С., Эрматов А.М.,
Исмаилов А.И.**

Институт биоорганической химии имени академика А.С. Садыкова АН РУз
Ташкент, Узбекистан. тел.: 998(71) 2623540, e-mail: rcuralus@mail.ru

Аннотация. Получены данные о противопаразитарной активности индуктора интерферона Рометина, водорастворимого производного противовирусного, иммуномоделирующего и интерферониндуцирующего препарата Мегосина. Рометин эффективно элиминирует лямблии из организма.

Ключевые слова: Индукторы интерферона – Госсипол – Мегосин – Рометин - лямблиоз.

ВВЕДЕНИЕ

Паразитарными заболеваниями, в этиологической структуре которых значительный удельный вес занимают лямблиоз, поражено 25% населения Земли. По данным экспертов ВОЗ, клинические формы лямблиоза ежегодно выявляются у 500 тысяч человек [1, 2]. В последние годы появились сведения о резистентности паразитов к традиционным антипаразитарным препаратам (метронидазол, фуразолидон, тинидазол, фенасал, цистицид и др.), причём эта тенденция постоянно прогрессирует [3 – 5]. В идеале противопаразитарный препарат должен сочетать антипаразитарную активность и корректировать отклонения в иммунном статусе.

За последние годы сформировалась интерферонология, в которой, в частности, определено понятие о системе интерферона и её прямых и обратных связях с иммунной системой и предлагаются пути использования интерферона и индукторов интерферона при широком спектре инфекционных заболеваний [6, 7]. Система интерферона существует в каждой клетке, т.к. каждая клетка может быть заражена и должна иметь систему распознавания и элиминации чужеродной генетической информации [8].

Первым индуктором интерферона растительного происхождения, описанным в литературе, был госсипол – полифенольное соединение, выделяемое из хлопчатника [9]. Поскольку госсипол высокотоксичное соединение, плохо растворимое в воде и являющееся клеточным ядом, была

поставлена задача получить менее токсичное соединение, но обладающее широким спектром антипаразитарной активности. Химическая модификация госсипола позволила получить на его основе целый ряд производных, интерферониндуцирующая активность которых была выше, чем активность самого госсипола. Первым индуктором интерферона, полученным на основе госсипола и внедрённым в практику здравоохранения, был Мегосин, для которого показана противовирусная, иммуномодулирующая и интерферониндуцирующая активности [10, 11].

В данной статье приводим материалы по изучению противопаразитарного действия Мегосина и Рометина при лямблиозе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение госсипола [12]. Высокогоссипольное хлопковое масло обрабатывают раствором щелочи, отделяют нижний щелочной раствор, нейтрализуют серной кислотой и выпавший сырой технический госсипол отделяют фильтрованием и сушат. Технический госсипол обезжиривают экстракционным бензином и сушат, обрабатывают ацетоном, ацетоновый раствор сгущают и госсипол осаждают уксусной кислотой. Полученную госсиполуксусную кислоту (ГУК-1) промывают и сушат. Очистку ГУК-1 производят переосаждением и получают ГУК-2 и ГУК-3. Для получения госсипола, ГУК-3 растворяют в диэтиловом эфире, обрабатывают водой до нейтральной реакции водного слоя, эфирный слой сушат сульфатом натрия, сгущают эфирный раствор и добавляют два объема гексана. Выпавший осадок госсипола отделяют на воронке Бюхнера, промывают гексаном и сушат.

Синтез Мегосина [13, 14]. К раствору едкого натра в этаноле добавляют β -амино-этилсерной кислоты и кипятят до полного растворения. К полученному раствору добавляют раствор госсипола в этаноле и продолжают кипятить. После охлаждения, выпавший осадок отфильтровывают, промывают этанолом, диэтиловым эфиром и высушивают.

Получение Рометина [15]. К раствору Мегосина в смеси ацетон-вода (3:1) добавляют раствор N-поливинилпирролидона (М.м. 8000 ± 2000) в смеси ацетон-вода (3:1), (соотношение Мегосина и N-поливинилпирролидона - 1:9) и перемешивают при температуре $28-30^{\circ}\text{C}$. Затем реакционную смесь фильтруют, из фильтрата исчерпывающе отгоняют ацетон, оставшийся водный раствор лиофилизируют.

Тестирование Мегосина на противопаразитарную

активность проводили на модели паразита – лямблии у спонтанно заражённых белых беспородных мышей. С этой целью был проведён скрининг беспородных белых 100 мышей на заражение лямблиями и стабильность инфекции (чтобы исключить спонтанную элиминацию паразита). Каждую мышь, трёхкратно, методом копроскопии обследовали на паразиты, а стабильность инфекции проверяли методом ежедневной копроскопии в течение 7 дней. В опыт отбирали животных, у которых ежедневно выявлялись цисты лямблий, что свидетельствует о хронической инфекции. Стабильная лямблиозная инфекция была обнаружена у 22% животных. Мегосин вводили подопытным мышам per os в 0,8 мл 5% раствора ДМСО в следующих дозах: 250 мг/кг; 125 мг/кг; 62,5 мг/кг; 12,5 мг/кг; 6,25 мг/кг; 3,125 мг/кг. Контроль включал две группы животных: 1) интактные мыши получавшие 0,8 мл 5% раствора ДМСО без мегосина в течение 7 дней; 2) заражённые лямблиями мыши.

Тестирование Рометина на противопаразитарную активность проводили на модели лямблиоза у спонтанно заражённых белых беспородных мышах. С этой целью, как и в первой серии экспериментов, был проведён скрининг беспородных белых 50 мышей на заражение лямблиями и стабильность инфекции (чтобы исключить спонтанную элиминацию паразита). В опыт отбирали животных, у которых ежедневно на протяжении 7 дней выявлялись лямблии, что свидетельствует о хронической инфекции. Рометин вводили подопытным мышам per os в 0,5 мл физиологического раствора в дозах: 50 мг/кг; 75 мг/кг; 100 мг/кг. Контроль включал две группы животных: 1) интактные мыши, получавшие 0,5 мл физиологического раствора без Рометина в течение 7 дней; 2) спонтанно заражённые лямблиозом мыши, получавшие по 0,5 мл физиологического раствора на протяжении такого же срока.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты изучения влияния Мегосина на течение лямблиоза у лабораторных животных приведены в таблице 1.

В таблице 1 приведены результаты исследования возможной антилямблиозной активности Мегосина. Учитывая, что дозы 62,5-250 мг/кг вызывали гибель животных, в этом эксперименте мы использовали как самую большую дозу 12,5 мг/кг.

Таблица 1 показывает, что, как и в первом эксперименте, Мегосин вызывал гибель животных и количество выживших среди мышей, получавших 1,5625 мг/кг, на 7-й день в обоих опытах было практически одинаково. Введение Мегосина не вызвало элиминации лямблий, на 7-й день эксперимента у всех выживших

животных выявлялись цисты *Giardia muris*.

Таблица 1

Влияние Мегосина на лямблиоз у мышей

Доза Мегосина, мг/кг	Число мышей получающих дозу	Число погибших мышей / число мышей с паразитами/ число мышей без паразитов						
		1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7 день
12,5	5	-/5/-	-/5/-	-/5/-	1/4/-	1/2/1	-/3/-	1/2/-
6,25	5	-/5/-	-/5/-	1/4/-	-/3/1	1/3/-	1/2/-	1/1/-
3,125	5	-/5/-	-/5/-	-/4/1	1/4/-	1/3/-	2/1/-	-/1/-
1,5625	5	-/5/-	-/5/-	-/5/-	-/5/-	2/3/-	-/3/-	1/2/-

Таким образом, апробация Мегосина в качестве противопаразитарного средства на модели лямблиоза мышей в дозах 1,5625-12,5 мг/кг не выявила их способности элиминировать паразиты. Учитывая гибель мышей при всех исследуемых дозах, нельзя исключить, что отсутствие элиминации паразитов может быть в какой-то мере обусловлено токсическим влиянием протестированных доз Мегосина на макроорганизм.

Для уменьшения токсичности дозы Мегосина, а также для увеличения растворимости Мегосина в воде и, соответственно, в других биологических жидкостях было получено малотоксичное водорастворимое производное Мегосина, названное Рометином. В контрольных группах гибели животных не было, спонтанной элиминации лямблии не наблюдали. Результаты 7-дневного курса Рометина приведены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние Рометина на лямблиоз у мышей

Доза Рометина, мг/кг	Число мышей получающих дозу	Число погибших мышей/ число мышей с паразитами/ число мышей без паразитов						
		1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	6 день	7 день
100	10	- /10/-	2/8/-	2/6/-	-/6/-	-/4/2	-/4/2	-/4/2
75	10	- /10/-	4/6/-	-/6/-	-/6/-	-/4/2	-/4/2	-/4/2
50	10	- /10/-	2/8/-	2/6/-	-/6/-	-/4/2	-/4/2	-/2/4

Из таблицы 2 видно, что, несмотря на более низкую токсичность Рометина, использованные дозы были несколько высоки, т.к. все они вызывали гибель части животных. Тем не менее, в отличие от Мегосина, все дозы вызывали элиминацию лямблий, носящую стабильный характер. Из таблицы видно, что

она отмечалась в течение 5, 6 и 7 дней эксперимента, в течение которого животные ежедневно получали препарат. Лямблии не определялись у этих животных и в течение 3-дневного наблюдения после окончания введения препарата.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты показали, что по антилямблиозному действию Рометин более эффективен, чем Мегосин. Сравнивая данные по влиянию Мегосина и Рометина на элиминацию лямблий при различных дозах, необходимо отметить, что токсичность водорастворимой формы Мегосина – Рометина резко уменьшается, о чем можно судить по числу погибших животных. Кроме этого увеличивается биодоступность препарата Рометин, что проявляется в стабильной элиминации паразитов таких, как лямблии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малеев В.В., Покровский В.И. Инфекционные болезни в России: проблемы и пути их решения // Терапевтический архив. 2004. №4. Т. 76. С. 5-9.
2. Николаева Т.Н., Макарова Г.Л., Смирнова Е.Ю., Шухова Т.П. Иммуноферментная диагностика лямблиоза у детей // Новости «Вектор-Бест». 2004. Вып.2 (32).
3. Borst P., Owellette M. New mechanism of drug resistance in parasitic protozoa // Annu. Rev. Microbiol. 1995. V. 49. P. 427-460.
4. Wright I.M., Dunn L.A., Upcroft P. Efficacy of anti giardial drugs // Expert. Opin. Drugs Sat. 2003. 2(6). P. 529-541.
5. Озерецковская Н.Н. Подходы отечественной школы паразитологов-иммунологов к терапии паразитарных болезней // Мед. паразитол. 1988. №2. С. 12-15.
6. Лебедева М.Н., Малышев Н.С., Федяник Л.В. Подходы к комбинированной терапии гельминтозов лейкоинфероном и этиотропными препаратами // Мед. паразитол. 1998. №1. С. 15-18.
7. Чахирева Н.Е., Луканов А. Полиоксидоний в комплексной терапии паразитарных заболеваний // Иммунология. 2003. №1. С. 46-48.
8. Ершов Ф.И. Интерферон // Вопр. Вирусол. 1998. №6. С. 247-252.
9. Сайиткулов А.М., Виноград И.Н., Зияев Х.Л., Биктимиров Л., Барам Н.И., Исмаилов А.И. Индукторы интерферона на основе госсипола // Сб. научных трудов. Интерферон-92. Москва. 1992. С. 149-153.
10. Барам Н.И., Зияев Х.Л., Исмаилова Г.А., Биктимиров Л., Исмаилов А.И. Иммуномодулирующая активность производных госсипола // Химия природ. соедин. Ташкент. 1988. №5. С. 647-650.
11. Ершов Ф.И., Тазулахова Э.Б. Индукторы интерферона – новое поколение иммуномодуляторов // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. Москва. Медицина. 1999. №4. С. 52-56.
12. Технические условия получения Госсиполуксусной кислоты. TSh 88.06-20:2009. Ташкент. 2009. С. 10.

-
13. Хаитбаев Х.Х., Зияев Х.Л., Грешных Р.Д., Трофимова Н.П. Контроль качества мегосина // Фармация. Москва. 1988. №3. С. 76-77.
 14. Исмаилов А.И., Саидахмедов У.А., Отаргалиев Т., Набиев А.Х., Цой Р.В., Рахимов Н.В., Шодмонов Э.Г., Зияев Х.Л., Биктимиров Л., Шодиева Д.М. Способ получения динатриевой соли 2,2'-динафталин-1,1',6,6'-тетраокси-5,5'-диизопропил-3,3'-диметил-7,7'-диоксо-8,8'-диметилиминоэтансульфонокислоты: Патент №305 (РУз) // Расмий ахборотнома. 1993. №2. С. 47-48.
 15. Ismailov A.I., Sakhibov A.D., Baram N.I., Biktimirov L., Ziyaev Kh.L., Ismailova G.A., Urazmetov K.G. Plant Polyphenol Based immunomodulators // International J. Immunorehabilitation. Moscow. 1994. №1. P. 144-145.
-

УДК 579.6

МИКРОБНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ АНТИОКСИДАНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛИФЕНОЛСОДЕРЖАЩИХ БИОСУБСТРАТОВ

Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского
отделения РАН, Пермь, Россия, тел.: (342)212-20-86, e-mail: samzu@mail.ru

В данной работе представлены результаты комплексного исследования антиоксидантной активности полифенолов и ряда экстрактов лекарственных растений с использованием микробных тест-систем. Установлено, что некоторые полифенолсодержащие биосубстраты могут активировать антиоксидантные системы бактерий *Escherichia coli* и тем самым защищать их от окислительного стресса. Полученные результаты указывают на возможное положительное влияние полифенолов на макроорганизм посредством антиоксидантного действия на кишечную микрофлору.

Ключевые слова – *Escherichia coli*, полифенолы, экстракты растений, антиоксидантные системы, активные формы кислорода

ВВЕДЕНИЕ

Полифенолы (ПФ) – обширный класс вторичных метаболитов растений, привлекающий все большее внимание исследователей. Накоплены многочисленные данные о положительном влиянии диеты, обогащенной ПФ, на здоровье человека. По своей природе, ПФ являются редуцирующими агентами и, вследствие этого, могут выполнять роль антиоксидантов. Предполагается, что в этом качестве ПФ,

поступающие в организм, главным образом, в составе овощей и фруктов, участвуют в предотвращении патологий, связанных прямо или косвенно с окислительным стрессом (сердечно-сосудистые заболевания, канцерогенез, воспалительные процессы). В последние годы происходит существенный пересмотр взглядов на механизм действия ПФ в организме человека и животных. Применение чувствительных методов показало, что концентрация ПФ в плазме и других органах чрезвычайно мала, и это исключает прямое действие ПФ как антиоксидантов. В то же время, подавляющее число исследований, показывающих антиоксидантное действие ПФ, было выполнено *in vitro* с культурами тканей при концентрациях, намного превышающих те, которые были обнаружены *in vivo*. Выдвинуто предположение о том, что ПФ, присутствуя в организме в небольших концентрациях, могут вызывать физиологические эффекты, не путем прямого взаимодействия с оксидантами, а косвенно, через индукцию антиоксидантных ферментов, регуляцию сигнальных путей и т.д. [1]. Накопление данных, подтверждающих это предположение, находится далеко от завершающей стадии, поскольку предполагает применение иных подходов и методов, чем те, которые применялись в экспериментах *in vitro*.

Недавно выдвинуто радикальное предположение о том, что основной сайт антиоксидантного действия ПФ находится в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), где, с одной стороны, концентрация ПФ достаточно высока для их прямого антиоксидантного действия, а, с другой – происходит постоянная продукция активных форм кислорода (АФК) [2]. Одна из проблем, вытекающих из выдвинутой концепции, связана с изучением влияния ПФ на активность кишечных бактерий. Хотя к настоящему времени опубликован ряд данных о влиянии ПФ на рост и выживаемость кишечных бактерий и их участие в метаболизме ПФ, влияние ПФ на антиоксидантную активность (АОА) кишечной микрофлоры до недавнего времени практически не изучалось. Целью данной работы явилось комплексное исследование механизмов антиоксидантного действия полифенолов и экстрактов растений на кишечные бактерии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе применен комплексный подход, включающий изучение как прямого антиоксидантного действия ПФ с использованием физико-химических методов, традиционных для этого направления, так и исследование косвенного действия через возможную активацию антиоксидантных генов бактерий. Во втором случае применен набор генно-инженерных штаммов *E. coli* с

мутациями по различным антиоксидантным генам и с генными слияниями, позволяющими определять уровень экспрессии таких генов. Показано, что ряд полифенолов, известных ранее высокой АОА в бесклеточной системе, могут активировать антиоксидантные гены бактерий, в первую очередь, гены, ответственные за деструкцию пероксида. Важно, что этот эффект являлся результатом прооксидантного действия ПФ. Используя высокочувствительные спектрофлуориметрические методы, показано, что в клетках бактерий ПФ продуцируют небольшие концентрации пероксида, достаточные для активации транскрипционного фактора OxyR, контролирующего ответ бактерий на пероксидный стресс. Другой результат работы: бактерии, обработанные ПФ, не только становятся устойчивыми к высоким уровням пероксида, но и разрушают экстраклеточный пероксид с более высокой скоростью, чем необработанные клетки [3]. Этот эффект может иметь важное значение для жизнедеятельности бактерий в ЖКТ хозяина. Благодаря высокой проницаемости пероксида через бактериальные мембраны, активированные полифенолами бактерии могут эффективно разрушать пероксид, образующийся в ЖКТ хозяина. Примечательно, что активация АОА бактерий наблюдается в широком диапазоне концентраций ПФ, в то время как для проявления прямого антиоксидантного действия необходимы их высокие уровни. Полученные результаты указывают на один из механизмов, благодаря которым ПФ, находясь в ЖКТ, могут оказывать положительное влияние на здоровье человека.

Логическим продолжением исследований, связанных с изучением действия чистых полифенолов, являются работы посвященные изучению действия экстрактов медицинских растений на антиоксидантную активность бактерий. Применяя указанный выше комплексный подход, были исследованы экстракты, полученные из нескольких десятков лекарственных растений Урала и Сибири. Были выявлены растения, проявляющие высокую АОА, которая коррелировала с содержанием полифенолов в испытуемых экстрактах [4]. Показано, что как и в случае с чистыми ПФ, экстракты могли оказывать антиоксидантное действие на бактерии одновременно несколькими разными путями, включая прямое ингибирование АФК, хелатирование ионов железа и индукцию антиоксидантных генов [5, 6].

В последние годы показано, что ряд антибиотиков оказывают токсическое действие на бактерии, не только посредством воздействия на специфические мишени, но и неспецифически, индуцируя окислительный стресс [7]. Поскольку

полифенолсодержащие биосубстраты обладают редокс-активностью, то становится актуальным изучение их способности влиять на чувствительность бактерий к антибиотикам и противомикробным препаратам. Нами было установлено, что полифенол кверцетин защищал *E. coli* от токсического действия антибиотика фторхинолонового ряда ципрофлоксацина [8]. Выявлена определенная связь между защитными эффектами кверцетина и экспрессией антиоксидантных генов. Полученные результаты свидетельствуют еще раз о положительном влиянии полифенолов на активность нормальной микрофлоры человека. Одновременно эти данные указывают на потенциальную опасность снижения токсического действия антибиотиков при лечении инфекционных заболеваний за счет активации антиоксидантных систем патогенных микроорганизмов.

В совокупности, полученные результаты вносят существенный вклад в новое понимание молекулярных механизмов, посредством которых полифенолы могут оказывать влияние на здоровье макроорганизма через модуляцию антиоксидантной активности кишечной микрофлоры.

Работа поддержана грантами Президента РФ МК1763.2012.4, РФФИ-Урал № 10-04-96017, а также грантом Президиума УрО РАН для молодых ученых 11-4-ИП-181.

ЛИТЕРАТУРА

1. Koltover V.K. Bioantioxidants: The Systems Reliability Standpoint // Toxicol. Ind. Health. 2009. V. 25. P. 295-299.
2. Halliwell B., Rafter J., Jenner A. Health Promotion by Flavonoids, Tocopherols, Tocotrienols, and Other Phenols: Direct or Indirect Effects? Antioxidants or Not? // Am. J. Clin. Nutr. 2005. V. 81(suppl.). P. 268S-276S.
3. Smirnova G.V., Samoylova Z.Y., Muzyka N.G., Oktyabrsky O.N. Influence of Polyphenols on *Escherichia coli* Resistance to Oxidative Stress // Free Radic. Biol. Med. 2009. V. 46. P. 759-768.
4. Смирнова Г.В., Высочина Г.И., Музыка Н.Г., Самойлова З.Ю., Кукушкина Т.А., Октябрьский О.Н. Исследование in vivo и in vitro антиоксидантных свойств экстрактов лекарственных растений Западной Сибири // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. С. 705-709.
5. Oktyabrsky O., Vysochina G., Muzyka N., Samoilova Z., Kukushkina T., Smirnova G. Assessment of Antioxidant Activity of Plant Extracts Using Microbial Test Systems // J. Appl. Microbiol. 2009. V. 106. P. 1175-1183.
6. Smirnova G.V., G.I. Vysochina, N.G. Muzyka, Z.Y. Samoylova, T.A. Kukushkina, O.N. Oktyabrsky. Evaluation of Antioxidant Properties of Medicinal Plants Using Microbial Test Systems // World J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 26. P. 2269-2276.
7. Wang X., Zhao X. Contribution of Oxidative Damage to Antimicrobial

-
- Lethality // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. V. 53. P. 1395-1402.
8. Smirnova G., Samoilova Z., Muzyka N., Oktyabrsky O. Influence of Plant Polyphenols and Medicinal Plant Extracts on Antibiotic Susceptibility of *Escherichia coli* // J. Appl. Microbiol. 2012. V. 113. P.192-199.
-

СОСТАВ ФЛАВОЛИГНАНОВ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ОБРАЗЦОВ РАСТОРОПШИ

Середа А.В., Середа Л.А., Билык В.В.

Опытная станция лекарственных растений, Лубны, Украина, e-mail:
berezotocha@yandex.ru

Препараты на основе плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L) Gaertn.) относятся к наиболее известным растительным гепатопротекторным средствам.

Сложный компонентный состав силимарина – природного комплекса фенольных соединений – предъявляет особые требования к выбору направления селекции расторопши по химическим признакам.

Основными компонентами силимарина, используемого в фармацевтическом производстве, являются флаволигнаны силикрестин, силидианин, силибинин (А и В) и изосилибинин (А и В). На хроматограммах, полученных методом обращено-фазовой ВЭЖХ, при количественном определении обсчитываются площади этих 6 пиков (рис. 1). Содержание суммы флаволигнанов в пересчете на силибинин в плодах расторопши регламентируется не ниже 1,5 % по Европейской фармакопее (EP) и не менее 2 % по Американской фармакопее (USP). Содержание флаволигнанов в составе силимарина по EP и USP должно находиться в следующих пределах: суммы силикрестина и силидианина – 20 - 45 %, силибинина (А+В) – 40 - 65 %, изосилибинина (А+В) – 10 - 20 %.

Из литературных данных известно существование нескольких хеморас расторопши. Так называемая белоцветковая хеморасса, в отличие от обычной, пурпурноцветковой расторопши, содержит дезокси-аналоги силибинина, изосилибинина, силикрестина и силидианина [1]. В свою очередь внутри пурпурноцветковой формы можно выделить силибининовую и силидианиновую хеморассы [2].

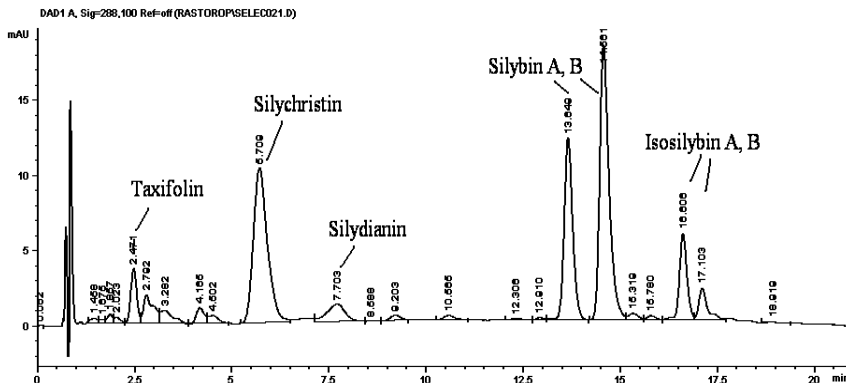


Рис.1. Типичная хроматограмма силибининовой хеморассы расторопши пятнистой

Нами была изучена коллекция образцов расторопши пятнистой по качественному и количественному составу флаволигнанов плодов. Коллекция собрана в 2007 - 2011 гг. как исходный материал для селекции и состоит из 26 образцов различного происхождения. Исследования проводились методом высокоэффективной жидкостной хроматографии по методике ЕР, в качестве стандарта использовался очищенный силимарин с известным содержанием силибинина. Для идентификации таксифолина использовался стандартный образец дигидрокверцитина, идентификация флаволигнанов проводилась сравнением хроматограмм с хроматограммой стандартизированного экстракта расторопши [3]. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы Microsoft Excel.

В результате исследований среди исследованных образцов по составу флаволигнанов были выделены несколько групп и подгрупп (Рис. 2).

В целом, все образцы могут быть разделены на 2 большие группы: силибининую и силидианиновую. У типичных представителей этих групп в составе флаволигнанового комплекса преобладают в первом случае силибинин и силикристин (рис. 2.1.), во втором – силидианин и изосилибинин (рис.2.4.). Более уравновешенные по составу представители этих групп на фоне доминирования силибинина или силидианина имеют выравненное соотношение трех остальных флаволигнанов (рис. 2.3 и 2.6). Между ними располагаются промежуточные формы.

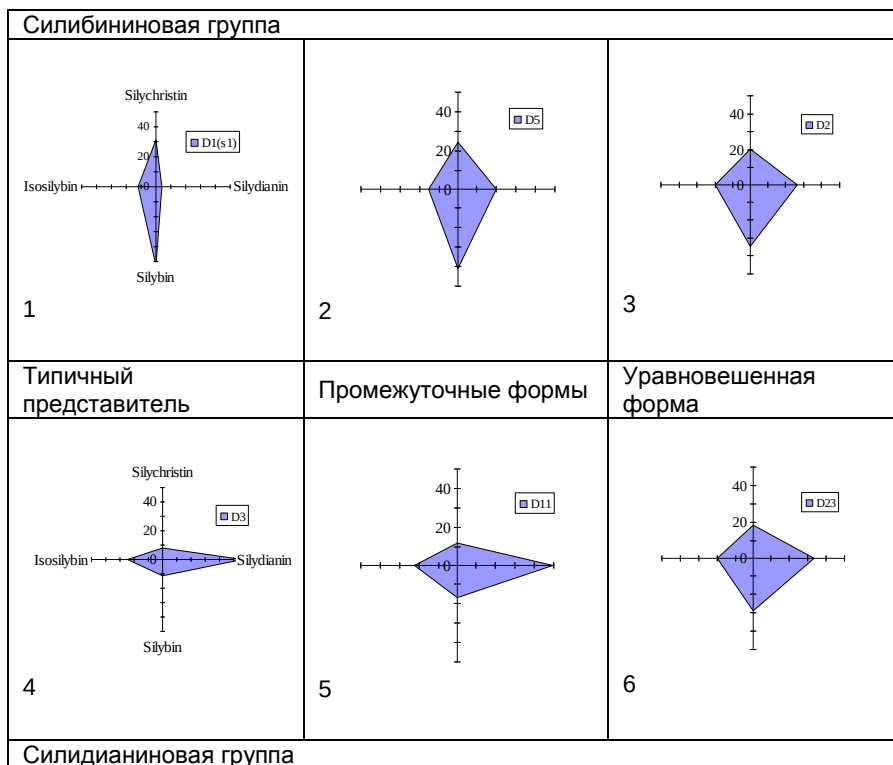


Рис.2. Типы расторопши по соотношению флаволигнанов (% от суммы флаволигнанов)

Один из образцов расторопши по соотношению флаволигнанов не относится ни к одной из этих групп и выделен в изосилибининовую группу из-за явного его преобладания. Представителей белоцветковой хеморассы, содержащей дезоксипроизводные флаволигнанов, в коллекции не обнаружено.

Среди выделенных хемотипов расторопши требованиям ЕР и USP к силимарину соответствуют только образцы первой силибининовой группы (рис.2.1).

Анализ промышленных образцов расторопши, выращиваемой в разных областях Украины, показал подавляющее преобладание силидианинового хемотипа. В обзоре [2] приведены данные, что некоторые препараты расторопши, выпускаемые в Украине и России производятся также на основе силимарина с силидианиновым соотношением флаволигнанов.

Нами был проведен корреляционный анализ абсолютного

содержания 6 флаволигнанов и таксифолина. В результате обсчета хроматограмм 54 коллекционных и промышленных образцов семян расторопши выявлена четкая положительная корреляция между содержанием силибинина и силикристина, силидианина и изосилибинина, таксифолина и изосилибинина, а также отрицательная корреляция в парах: силидианин – силибинин, силидианин – силикристин (табл.). Обращает на себя внимание различия в корреляционных связях для диастереоизомеров изосилибинина по сравнению с силибининами А и В.

Таблица

Коэффициенты корреляции между содержанием флаволигнанов
расторопши

(n=54)	Tax	SCH	SD	S-A	S-B	Σ S	IS-A	IS-B	Σ IS	Total
Taxifolin (Tax)	1									
Silychristin (SCH)	0,33	1								
Silydianin (SD)	0,31	-0,5	1							
Silybin A (S-A)	0,24	0,99	-0,55	1						
Silybin B (S-B)	0,21	0,99	-0,56	1	1					
Σ Silybin (Σ S)	0,23	0,99	-0,56	1	1	1				
Isosilyb A (ISA)	0,72	0,48	0,36	0,43	0,42	0,42	1			
Isosilyb B (ISB)	0,57	-0,2	0,73	-0,27	-0,29	-0,3	0,73	1		
Σ Isosilyb (Σ IS)	0,7	0,14	0,58	0,09	0,07	0,08	0,93	0,93	1	
Total	0,56	0,84	0,03	0,81	0,80	0,81	0,81	0,25	0,57	1

Интересно, что содержание суммы флаволигнанов положительно коррелирует с содержанием силибинина и силикристина, в то время как такая зависимость отсутствует для силидианина. Так, в двух выборках с относительным содержанием силибинина или силидианина более 40% содержание силимарина составляло в среднем 2,55 и 1,85 %, соответственно. Таким образом, представители силибининовой хеморасы расторопши содержат в плодах в среднем больше силимарина, чем силидианиновой. Возможно, это послужило причиной того, что именно силибининовые популяции расторопши стали первым и наиболее изученным объектом исследований, как химиков, так и фармакологов.

Биосинтез флаволигнанов расторопши по общепринятому мнению протекает по механизму окислительного сочетания между

таксифолином и канифериловым спиртом [4,5]. В результате свободнорадикального сочетания первоначально образуются аддукты 1 - 4 по двойной связи каниферилового спирта и В-кольцу таксифолина, последующая циклизация которых приводит к 4 основным флаволигнанам расторопши.

Наличие функциональной зависимости ($r = 0,99$) между содержанием силикрстина и обоими диастереоизомерами силибинина может быть объяснено существованием общего промежуточного соединения – радикала $O4'/C-5'$, реакция одной из двух резонансных форм которого приводит либо к силибинину, либо к силикрстину. Окисление таксифолина по $3'$ -ОН группе с образованием резонансного радикала $O3'/C-2'$ приводит к образованию пары силидианин – изосилибин, а также к изосиликрстину, с которым также должна наблюдаться положительная корреляция (Рис. 3).

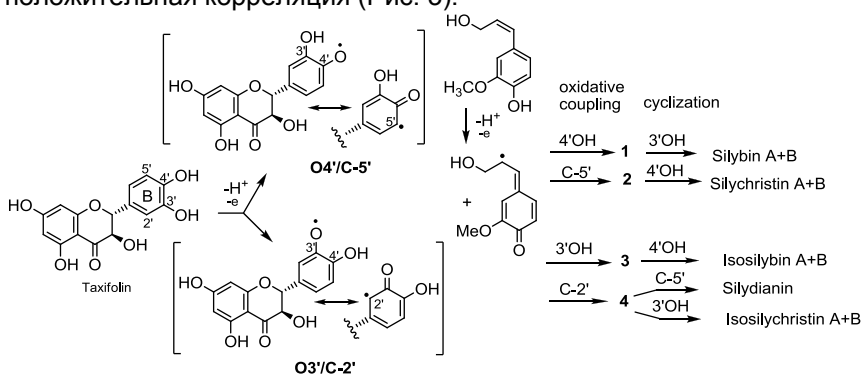


Рис.3. Схема биогенеза основных флаволигнанов расторопши

Установленный факт более сильной корреляционной зависимости силидианина с изосилибинином В, чем с изосилибинином А требует дальнейших исследований для объяснения связано ли это с особенностями биогенеза этих флаволигнанов, или зависимость носит статистический характер.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nyiredy, Sz., Szucs Z., Antus S., Samu S. New components from *Silybum marianum* L. fruits: a theory comes true/ *Chromatographia*. Supplement – 2008. Vol. 68. – P. 5-11.
2. Щекатихина А.С. Гепатопротекторные свойства флаволигнанов (обзор)/ Тр. Белорусского Государственного ун-та. - <http://www.bio.bsu.by/proceedings/?act=7&id=2>
3. Milk thistle standardized dry extract CRS / Ph. Eur. Reference Standard - Leaflet//

http://crs.edqm.eu/db/4DCGI/db/4DCGI/leaflet?leaflet=Y0000539_3

4. Corchete P. *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the source of silymarin / Bioactive molecules and medicinal plants / K.G. Ramawat, J.M. Merillon. – Springer, 2008. – P. 123-148.
5. Begum S.A., Sahai M., Ray A.B. Non-conventional lignans/ Progress in the chemistry of organic natural products/ Eds: A.D.Kinghorn, H.Falk., J.Kobayashi – Vol. 93. – 2010. – P. 1-70.

УДК 547.972

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ *ARTEMISIA UMBROSA*

**Сүлеймен Е.М.¹, Ташенов Е.О.¹, Смагулова Ф.М.^{1,2},
Джалмаханбетова Р.И.¹, Дудкин Р.В.³, Горовой П.Г.³, Ross S.A.⁴**

¹Евразийский национальный университет им. Л.Н.Гумилева, Астана, Казахстан, +77172353806(5614), suleimen_em@enu.kz

²Медицинский университет г. Астаны, Казахстан, +77003009436, sfati@mail.ru

³Тихоокеанский институт биоорганической химии, г. Владивосток, Россия

⁴National Center for Natural Products Research and Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, The University of Mississippi, Oxford, USA, sross@olemiss.edu

Род *Artemisia* L. - один из крупнейших родов семейства *Asteraceae*, который объединяет более 300 видов.

Artemisia umbrosa (Besser) Pamp. (полынь тенистая) – многолетнее травянистое растение высотой 60-100 см. Корневище короткое, нетолстое, деревянистое. Стебель прямой, ребристо-бороздчатый, олиственный. Листья сверху зеленые, снизу белополосчатые. В народной медицине используют при ревматизме, респираторных инфекциях [1].

Ранее компонентный состав данного вида растения не изучали.

580 г сухого мелкоизмельченного сырья (листья, цветочные корзинки, бутоны) *A. umbrosa* (Besser) Pamp., собранного на Дальнем Востоке, трижды экстрагировали хлороформом. Хлороформные экстракты объединяли, осаждали водно-спиртовой смесью и получили 15,2 г экстракта. Сумму экстрактивных веществ смешали с силикагелем марки КСК, в соотношении 1:20 (сумма веществ:сорбент) и элюировали на колонке смесью петролейный эфир-этилацетат с повышением объемного содержания последнего.

Элюированием системой петролейный эфир - этилацетат (4:1) из фракций 67-73 выделена кристаллическая масса бесцветного цвета (**1**).

В масс-спектре (**1**) наблюдается молекулярный ион с m/z 221.0478 $[M+H]^+$, а также 463.0669 $[2M+Na]^+$.

В ИК-спектре (**1**) имеется интенсивный пик 1730 см^{-1} соответствующий карбонилу.

В спектре ПМР (400 МГц), записанного в ДМСО, наблюдается два дублета при 7.9 и 6.3 м.д. соответственно ($J=9.6$ Гц), два синглета при 7.0 и 6.2 м.д., причем последний содержит 2 протона, а также трехпротонный синглет метокси-группы при 3.8 м.д. (таблица 1)

Таблица 1.

Данные спектров ПМР (**1**)

№ атома	δ (мультиплетность, J, Гц)	№ атома	δ (мультиплетность, J, Гц)
H-3	7.912 (d, 9.6)	H-12	6.192 (s)
H-4	6.247 (d, 9.6)	-OCH ₃	3.830 (s)
H-8	7.014 (s)		

В спектре ЯМР C^{13} (с экспериментом DEPT), наблюдается синглет карбонила при 159.6 м.д., три дублета метиновых атомов углерода, триплет CH_2 -группы и синглет метокси группы при 57 м.д. (таблица 2). Положение отдельных атомов углеродов определяли с помощью двумерного эксперимента HMBC (рисунок 1).



Рис.1. HMBC-корреляция (**1**)

Таблица 2

Данные спектров ЯМР ^{13}C (**1**)

№ атома	δ	№ атома	δ
C-2	159.61 (s)	C-8	104.0 (s)
C-3	113.89 (d)	C-9	134.59 (s)
C-4	145.19 (d)	C-10	114.67 (s)
C-5	141.0 (s)	C-11	56.94 (q)
C-6	139.75 (s)	C-12	106.27 (t)
C-7	133.5 (s)		

Анализ полученных данных в сравнении их с литературными [2-6] приводит к структуре 5-метокси-6,7-(метилendioкси)-кумарина (**1**), выделенному ранее из *Pterocaulon redolens* (Forst.f) F. Vill. (Asteraceae) [5]. Соединение (**1**), представляющее интерес в лечении лейкемии [2, 4, 6], было также недавно синтезировано [3].

При элюировании хроматографической колонки системой петролейный эфир - этилацетат (65:35) из фракций 91-97 выделено кристаллическое вещество желтого цвета (**2**).

В масс-спектре (**2**) наблюдается молекулярный ион с m/z 345.0953[M+H], 711.1622 [2M+Na], а также 343.0713 [M-H].

В ИК-спектре (**2**) имеется пик 1656 см^{-1} соответствующий карбонилу и 3386 см^{-1} , соответствующий гидроксигруппе.

В спектре ПМР (400 МГц), записанного в ДМСО, наблюдается два синглета ароматических протонов, три синглета метокси-групп, два дублета метиновых ароматических протонов, а также дублет дублетов (таблица 3). Положение отдельных атомов углеродов определяли с помощью двумерного эксперимента НМВС (рисунок 2).

Таблица 3.

Данные спектров ПМР (**2**)

№ атома	δ (мультиплетность, J, Гц)	№ атома	δ (мультиплетность, J, Гц)
H-3	6.92 (s)	6-OCH ₃	3.73 (s)
H-8	6.6 (s)	7-OCH ₃	3.82 (s)
H-2'	7.515 (d, 2.4)	3'-OCH ₃	3.85 (s)
H-5'	7.07 (d, 8.8)	5-OH	13.01 (s)
H-6'	7.631 (dd, 2.4, 8.8)	4'-OH	10.68 (s)

Таблица 4

Данные спектров ЯМР ^{13}C (**2**)

№ атома	δ	№ атома	δ
C-2	163.81 (s)	C-1'	123.3 (s)
C-3	103.8 (d)	C-2'	120.4 (d)
C-4	182.8 (s)	C-3'	149.4 (s)
C-5	152.9 (s)	C-4'	152.5 (s)
C-6	131.8 (s)	C-5'	112.0 (d)
C-7	153.2 (s)	C-6'	109.7 (d)
C-8	94.8 (d)	6-OCH ₃	60.4 (q)
C-9	157.8 (s)	7-OCH ₃	56.1 (q)
C-10	104.5 (s)	3'-OCH ₃	56.2 (q)

В спектре ЯМР C^{13} наблюдается синглет карбонила при 182.8 м.д., пять дублетов метиновых атомов углерода и три синглета метокси-групп (таблица 4).

Анализ полученных данных в сравнении их с литературными [7-14] приводит к структуре флавона (2), выделенному ранее из *Hyptis fasciculata* [7], *Thymus vulgaris* [8] и *T. carnosus* (Labiatae) [9], *Lantana montevidensis* BRIQ. (Verbenaceae) [10], *Anisomeles malabarica* R. Br. [11], *Centaurea napifolia* [12], *Artemisia vestita* Wall. [13], *A. herba-alba* [14] и *A. monosperma* (Compositae) [15]. Соединение представляет интерес как имеющий выраженную антибактериальную [7], противоопухолевую [10, 13] и антиоксидантную активность [16].

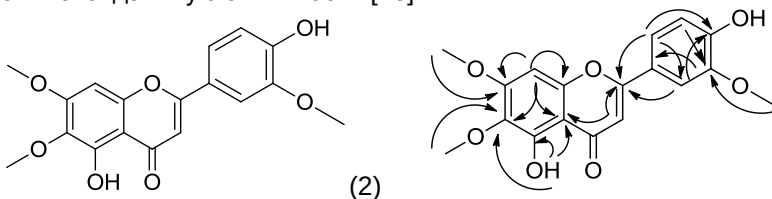


Рисунок 2. HMBC-корреляция (2)

Данные соединения (1-2) выделены из *A. umbrosa* впервые. Изучение химического состава *A. umbrosa* продолжается.

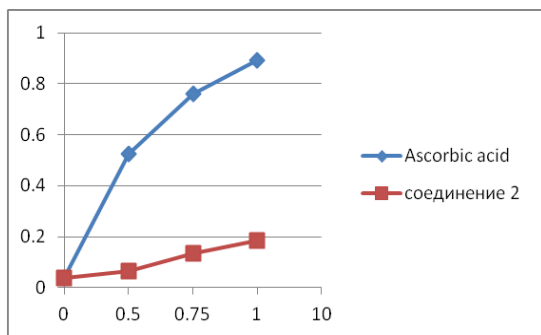


Рис. 1. Динамика оптической плотности в зависимости от концентрации соединения (2)

Определение антиоксидантной активности

Антиоксидантную активность соединения (2) определяли методом FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) в соответствии с работой Aswatha Ram H.N et al. [17]. При определении антиоксидантной активности на рисунке 1 (таблица 5) в случае аскорбиновой кислоты имеет место выраженная зависимость

между значениями оптической плотности аскорбиновой кислоты и ее концентрацией, что указывает на увеличение антиоксидантной активности. В образце, также имеет место прямо пропорциональная зависимость, но менее выраженная по сравнению с индивидуальным антиоксидантом как аскорбиновая кислота.

Таблица 5

Изменение оптической плотности

Соединение	0	0,25	0,5	1
Ascorbic acid	0,038	0,524	0,761	0,894
Соединение (2)	0,038	0,066	0,135	0,185

Определение цитостатической активности

Цитотоксическую активность проводили по методике, описанной в [18].

Таблица 6.

Результаты определения цитотоксической активности.

Параллель	К-во личинок в контроле (ср)		К-во личинок в образце (ср)		% выживших личинок в контроле	% выживших личинок в образце	
	выж.	погиб.	выж.	пог.			
Соединение (1) 5 мкг/мл	24	3	14	2	90	89	1
Соединение (2) 5 мкг/мл	24	3	19	9	90	68	24
Соединение (2) 1 мкг/мл	24	3	18	6	90	75	16,6

В результате испытаний установлено, что соединения (1), (2) в исследуемых дозировках не обладают цитотоксичностью.

Экспериментальная часть

Растительное сырьё *A. umbrosa* (Besser) Pamp. (семейство Asteraceae) собирали в сентябре 2011 г. в окрестностях с. Новолитовск Партизанского района Приморского края.

Колоночная хроматография проведена на силикагеле марки КСК, соотношение вещества и сорбента ~ 1:20. Для ТСХ применены пластинки Sorbfil, проявление – в насыщенном растворе KMnO_4 .

ИК-спектры получены на приборе «Brucker Tensor».

Спектры ЯМР записаны на спектрометре "Varian AS" (рабочая частота – 400 МГц для ^1H , 100 МГц для ^{13}C) с использованием стандартных программ для регистрации двумерных спектров HSQC, HMBC.

Масс-спектры высокого разрешения получены на приборе "Brucker Bioapex FTMS".

ТСХ проводили на силикагелевых пластинках Sorbfil, проявление насыщенным раствором KMnO_4 .

5-Метокси-6,7-(метилендиокси)кумарин (кубрева лактон) (1):

ЯМР ^1H (400 МГц): таблица 1;

ЯМР ^{13}C (100 МГц): таблица 2;

HRESIMC: m/z 221.0478 [M+H], 463.0669 [2M+Na]

указывающий на степень ненасыщенности равной 8;

ИК (NaCl , $\square$, cm^{-1}): 1730 (C=O), 1594 (Ar).

4',5-Дигидроксис-3',6,7-триметоксифлавоны (6-метоксильтеолина 3',7-диметилэфиры; анизомелин; цирсилинол; эупатрин; фастигенин) (2):

ЯМР ^1H (400 МГц): таблица 3;

ЯМР ^{13}C (100 МГц): таблица 4;

HRESIMC: m/z 345.0953[M+H], 711.1622 [2M+Na], 343.0713

[M-H];

ИК (NaCl , $\square$, cm^{-1}): 1656 (C=O), 3386 (OH).

Благодарность

Работа выполнена по гранту Министерства образования и науки Республик Казахстан «Целевое развитие университетской науки, ориентированной на инновационный результат» по бюджетной программе 055 «Фундаментальные и прикладные научные исследования» по теме «Фитохимическое изучение растений Казахстана и Сибири. Создание модифицированных производных на основе моно- и сесквитерпеноидов, флаваноидов и их биоскрининг», а также по гранту АО «Центр международных программ» (договор №476).

ЛИТЕРАТУРА

1. Флора Сибири. / Под редакцией И.М. Красноборова. М: Наука: 1997. Т. 13. 472 с.
2. Franca C.A. Theoretical study and vibrational spectroscopy of two 5,6,7-trioxygenated coumarins // Journal of Molecular Structure. 2007. V. 843(1-3). P.57-65.
3. Maes D. Synthesis and structural revision of naturally occurring ayapin derivatives // Tetrahedron. 2005. V. 61(9). P. 2505-2511.
4. Riveiro M.E. Induction of cell differentiation in human leukemia U-937 cells by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxycoumarins from Pterocaulon

-
- polystachyum // Cancer Letters (Amsterdam, Netherlands). 2004. V. 210(2). P. 179-188.
5. Kanlayavattanukul M. Chemical constituents of *Pterocaulon redolens* // Heterocycles. 2003, V. 61. P. 183-187.
 6. Riveiro M.E. Toward establishing structure-activity relationships for oxygenated coumarins as differentiation inducers of promonocytic leukemic cells // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2009. V. 17(18). P. 6547-6559.
 7. Isobe T. The anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones // Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2006. V. 29(5). P. 1039-1041.
 8. Bazylo A. Isolation of cirsilioneol and 8-methoxycirsilioneol from *Thymi extractum fluidum* // Herba Polonica. 2002. V. 48(3). P. 130-135.
 9. Marhuenda E. Flavones isolated from *Thymus carnosus* Boiss // Annales Pharmaceutiques Francaises. 1988. V. 45(6). P. 467-70.
 10. Nagao T. Antiproliferative constituents in plants 10. Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship // Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2002. V. 25(7). P. 875-879.
 11. Devi G. 4',5-Dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Anisomeles malabarica* R. Br // Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry. 1979. V. 17B(1). P. 84-5.
 12. Akkal S. Flavonoid aglycones from *Centaurea napifolia* // Chemistry of Natural Compounds. 2003. V. 39(2), P. 219-220.
 13. Sheng X. Cirsilioneol inhibits proliferation of cancer cells by inducing apoptosis via mitochondrial pathway // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2008. V. 60(11). P. 1523-1529.
 14. Segal R. New flavone from *Artemisia herba-alba* // Lloydia. 1973. V. 36(1). P. 103-5.
 15. Hifnawy M.S. Phytochemical and pesticidal activity of *Tanacetum santolinoides* and *Artemisia monosperma* (family Asteraceae) // Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University). 2003. V.41(3). P. 203-212.
 16. Miura K. Antioxidative activity of flavonoids from thyme (*Thymus vulgaris* L.) // Agricultural and Biological Chemistry. 1989. V. 53(11). P. 3043-5.
 17. Aswatha R.H.N. et al. In vitro free radical scavenging potential of methanol extract of entire plant of *Phyllanthus Reticulatus* Poir // Pharmacologyonline. 2008. V. 2. P. 440-451.
 18. Suleimenov E.M. Jose R.A., Rakhmadieva S.B., De Borggraeve W., Dehaen W. Flavanoids of *Senecio viscosus* // Chemistry of Natural Compounds. 2009. V. 45(5). P. 731-732.
-

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА КВЕРЦЕТИН:ЖЕЛЕЗО НА ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В БИСЛОЙНЫХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

**Тараховский Ю.С.^{1,2} Ягольник Е.А.³, Кузнецова С.М.¹,
Тулеуханов С.Т.⁴, Музафаров Е.Н.⁵, Ким Ю.А.⁶**

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино,
Московской обл., e-mail: tarahov@rambler.ru

² Научно-образовательный центр «Нанобиофизика», Московский физико-
технический институт, Москва, Долгопрудный, Россия

³ Тульский государственный университет, Тула, Россия

⁴ Казахский национальный университет им. Аль-Фараби, Алматы, РК.

⁵ Институт фундаментальных проблем биологии РАН, Пущино, Московской
обл., Россия

⁶ Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московской обл., Россия

Известно, что флавоноиды способны хелатировать катионы металлов переменной валентности, что имеет большое биологическое значение, поскольку в свободном состоянии эти металлы могут служить инициаторами перекисного окисления. Связывание катионов железа и меди является важным вкладом флавоноидов в защиту организмов от окислительного стресса /1/. Благодаря способности комплексов флавоноидов с железом проявлять активность в отношении супероксид радикала аналогично ферменту супероксид дисмутаза такие комплексы способны удалять свободные радикалы более эффективно, чем исходные флавоноиды /2/. Кроме того, нами было показано, что некоторые комплексы флавоноидов с железом более гидрофобны, чем свободные флавоноиды, и способны сильнее взаимодействовать с фосфолипидным бислоем /3/. Спектроскопический анализ показывает, что образование комплекса кверцетина с железом может быть обнаружено по сдвигу максимума поглощения с 372 к 425 нм. Спектры показывают, что в присутствии липосом из яичного лецитина максимум при 425 нм сохраняется, что свидетельствует о сохранении комплекса в условиях, когда он, по данным дифференциальной сканирующей калориметрии, взаимодействует с фосфолипидным бислоем.

Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия (ДСК) показывает, что молекулы железа в концентрациях 10^{-6} М, характерных для крови человека /4/, не оказывает существенного влияния на плавление димиристоил-фосфатидилхолина (DMPC)

(рис.1). В то же время, комплекс кверцетина с железом влияет на плавление липидов в липосомах из DMPC иначе, чем свободный кверцетин. Эти различия проявляются в том, что производимый кверцетином сдвиг максимумов α и β в низкотемпературную область существенно уменьшается в присутствии катионов железа.

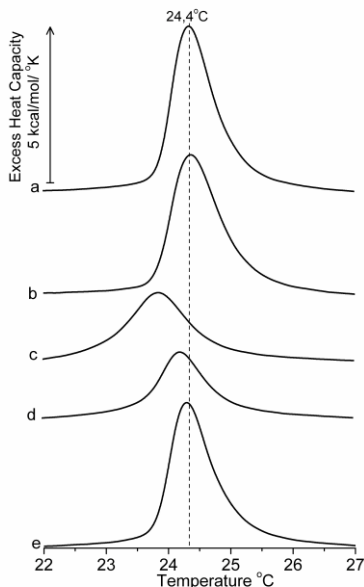


Рис. 1. Влияние кверцетина и его комплексов с железом на термограмму плавления липосом из DMPC в 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4. В эксперименте использовалась концентрация липида $2,95 \cdot 10^{-4}$ М (0,2 мг/мл), кверцетина – $4 \cdot 10^{-5}$ М, FeSO_4 – $4 \cdot 10^{-6}$ М. Представлены термограммы исходных липосом – а, липосом, в присутствии FeSO_4 – б, липосом, после добавления кверцетина – с, после добавления кверцетина и, через 30 мин после этого, добавления FeSO_4 – д, после добавления предварительно сформированного комплекса кверцетина и FeSO_4 – е. Измерения проводили на калориметре ДАСМ-4

Это изменение можно наблюдать только в том случае, если в начале к суспензии липосом был добавлен кверцетин, и после выдерживания в течении нескольких десятков минут при комнатной температуре, был добавлен раствор сернокислого железа. При добавлении компонентов в противоположном порядке или при добавлении к липосомам уже сформированного комплекса кверцетина и железа мы не наблюдали изменений в плавлении липида по сравнению с контрольным препаратом липосом (Сравните Рис.1а и 1е).

Этот эффект связан с тем, что комплекс кверцетина с железом плохо растворим в воде и образует частицы, что препятствует взаимодействию комплекса с липосомами. Присутствие нерастворимых частиц комплекса размером 10 – 15 нм, а также частиц 1 – 5 мкм может быть обнаружено фотонно-корреляционной спектроскопией (рис.2).

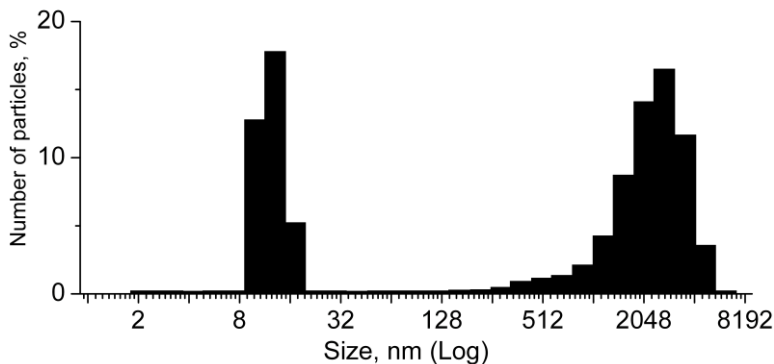


Рис. 2. Анализ размеров частиц в 10 mM Tris-HCl методом фотоно-корреляционной спектроскопии после смешивания растворов кварцетина и двухвалентного железа в эквимольных соотношениях и в концентрациях, используемых в эксперименте с липосомами. Для измерений использовали анализатор размеров субмикронных частиц N4 PLUS (Beckman Coulter, USA)

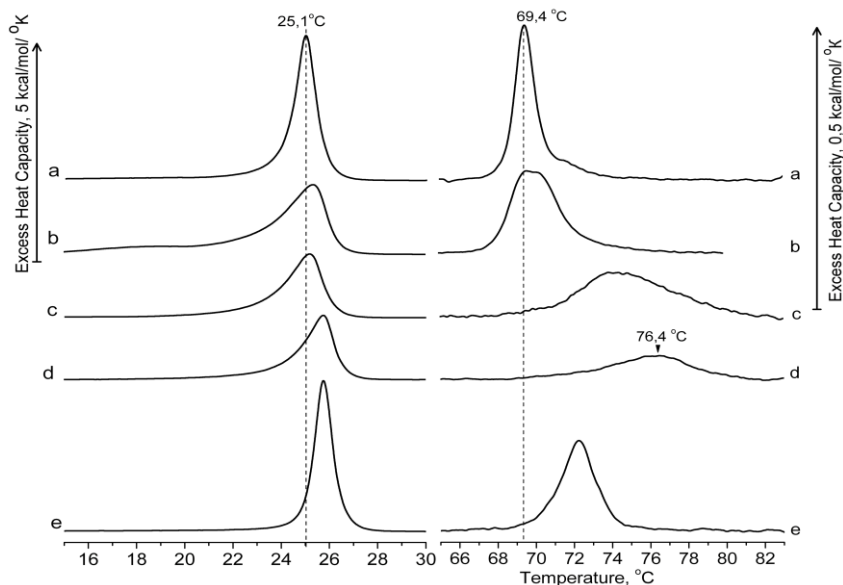


Рис. 3. Влияние кварцетина и его комплекса с железом на термограмму плавления липосом из POPE. Концентрация липида была $2,95 \cdot 10^{-3}$ М (2 мг/мл), кварцетина – $4 \cdot 10^{-4}$ М, FeSO_4 – $4 \cdot 10^{-5}$ М. На панелях представлена высоко- и низкотемпературная области фазовых переходов исходных

липосом – а, липосом, после добавления кверцетина – с, после добавления кверцетина и затем, через 30 мин, добавления FeSO_4 – d, после добавления предварительно сформированного комплекса кверцетина и FeSO_4 (10:1 моль/моль) – е.

Действие двухвалентного железа на плавление пальмитоил-олеоил-фосфатидилэтаноламина (POPE), происходящее при 25 °C, мало отличается от действия кверцетина. Похожая термограмма получается также при последовательном добавлении к липосомам кверцетина, а потом железа (рис. 3).

Примечательно, что предварительно сформированный комплекс кверцетина и железа также способен оказывать некоторое влияние на фазовые переходы липосом из POPE, чего не наблюдалось в случае липосом из DMPC. Таким образом, несмотря на плохую растворимость комплекса, о чем упоминалось выше, предварительно сформированный комплекс все же способен оказывать влияние на плавление липосом из POPE, хотя в значительно меньшей степени, чем при последовательном добавлении сначала кверцетина, а затем железа. Термограмма фазового перехода POPE, в контроле наблюдающегося при 69°C, в присутствии катионов двухвалентного железа существенно изменяется, сдвигаясь в область высоких температур более чем на 5°C, что сопровождается увеличением ширины и уменьшением высоты пика кривой.

Еще большие изменения наблюдаются при последовательном действии кверцетина и катионов железа. Напротив, так же как и в предыдущем случае, при действии предварительно сформированного комплекса кверцетина и железа, изменения термограммы были значительно меньшими.

Таким образом, нами было установлено, что комплексы флавоноидов с железом, оказывают еще большее влияние на данный фазовый переход фосфатидилэтаноламина, чем свободные флавоноиды, что вероятно, связано с их большей гидрофобностью /3/.

ЛИТЕРАТУРА

1. Perron, N. R., and J. L. Brumaghim, 2009, A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding: *Cell Biochem. Biophys.*, v. 53, no. 2, p. 75-100.
2. Kostyuk, V. A., A. I. Potapovich, T. V. Kostyuk, and M. G. Cherian, 2007, Metal complexes of dietary flavonoids: evaluation of radical scavenger properties and protective activity against oxidative stress in vivo: *Cell Mol. Biol.*, v. 53, no. 1, p. 62-69.
3. Tarahovsky, Y. S., E. A. Yagolnik, E. N. Muzafarov, B. S. Abdrasilov, and Y. A. Kim, 2012b, Calcium-dependent aggregation and fusion of

-
- phosphatidylcholine liposomes induced by complexes of flavonoids with divalent iron: *Biochim.Biophys.Acta*, v. 1818, no. 3, p. 695-702.
4. Kasvosve, I., and J. Delanghe, 2002, Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status: *Clin.Chem.Lab Med.*, v. 40, no. 10, p. 1014-1018.
-

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ АЛЬДОЛАЗЫ И МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАН КЛЕТОК МОЗГА К МАЛЫМ ДОЗАМ ФЕНОЗАНА И ОБЛУЧЕНИЯ

**Трещенкова Ю.А., Голощапов А.Н., Шишкина Л.Н., Бурлакова
Е.Б.**

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334,
Москва, Россия, ул. Косыгина 4. e-mail: tresch@sky.chph.ras.ru

В настоящее время интерес к изучению влияния малых доз биологически активных веществ и ионизирующего излучения на уровне макромолекул и клеток живых организмов достаточно актуален. Выявлены общие закономерности и общие механизмы действия малых и сверхмалых доз (СМД) [1, 2]. Немногочисленны данные по изучению действия СМД на отдельные ферменты метаболических путей и структурное состояние мембран клеток в условиях *in vivo*. Известно, что антиоксиданты могут регулировать экспрессию генов ферментов [3], влиять на структурное состояние мембран в клетке [4]. В работе использовали синтетический антиоксидант фенозан калия, который обладает широким спектром действия, не связанным с его антиоксидантными свойствами. Ранее нами было показано влияние малых доз хронического γ -облучения на альдолазу цитоплазмы [5] и фенозана в СМД на альдолазу и микровязкость мембран микросом клеток мозга [6]. В данной работе изучали действие малых доз фенозана и облучения на альдолазу цитоплазмы, микросом и микровязкость мембран клеток мозга..

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали мышей линии SHK, самцов, массой 20-24 г. Проведено 2 серии опытов, каждая состояла из 4 групп (по 10 мышей в каждой группе): 1- контроль, 2- вводили фенозана-К в малой дозе 10^{-5} или дозе 10^{-15} моль/кг (СМД), 3- облучение, 4- фенозан+облучение. Мышей облучали в малой дозе 0,15 Гр малой мощности (0,01 рад/мин). Растворы фенозана готовили методом последовательного разбавления дистиллированной водой. Разные

дозы фенозана вводили внутривенно (0,2 мл) за сутки до облучения. Контрольным мышам вводили дистиллированную воду. Через сутки после облучения у мышей извлекали мозг, готовили 10% гомогенаты в 0,32 М сахарозе. С помощью дифференциального центрифугирования получали фракции цитоплазмы и микросом при 105000g в течение часа на центрифуге Beckman.

Активность альдолазы определяли спектрофотометрически при 540 нм [5]. Субстратом служил фруктозо-1,6-дифосфат (ФДФ) фирмы ВДН (Англия) в различных концентрациях ($0,1-1,0 \times 10^{-4}$ М). Кинетические параметры ($V_{\max}$, K_m) рассчитывали из начальных скоростей реакций, катализируемых ферментом, методом Корнш-Боудена [7] и вычисляли отношение $V_{\max}/K_m$, характеризующее «эффективность» фермента. Белок определяли по методу Лоури [8]. Микровязкость в мембранах микросом оценивали по времени вращательной корреляции (τ_c), включенных в мембрану стабильных спиновых зондов: 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилокси-пиперидин-1-оксила (1) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- γ -карболин-3-оксила (2), которые различались по своим гидрофобным свойствам и локализацией в мембране. Регистрацию спектров ЭПР проводили на ЭПР-спектрометре фирмы “Brucker” (Германия) модели ER-200D [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В цитоплазме фенозан в малой дозе 10^{-5} моль/ кг (рис.1А) увеличивал как $V_{\max}$ / мг белка (на 16 %), так и $V_{\max}/K_m$ (на 56 %) альдолазы относительно контрольных значений. Фенозан в СМД (рис. 1 Б) в большей степени увеличивал $V_{\max}$ / мг белка (на 25 %), но эффективность фермента падала (на 30%). В группе фенозан СМД+облучение сохранялось высокое значение $V_{\max}$ / мг белка, а эффективность альдолазы снижалась. Фенозан в СМД значительно ухудшал сродство фермента к субстрату (увеличение значений K_m). Облучение (0,15 Гр) повышало $V_{\max}$ / мг белка (на 14 и 40%) и снижало $V_{\max}/K_m$ (на 30 и 15 %) по сравнению с контролем (рис. 1 А,Б). Наблюдаемые различия, возможно, связаны с исходным уровнем этих параметров, как было показано при действии хронического облучения на альдолазу [5]. Одним из способов регуляции активности ферментов гликолиза является их обратимое связывание с мембранами субклеточных структур в клетке.

В микросомах (рис. 2 А) малые дозы фенозана значительно уменьшали $V_{\max}$ / мг белка (на 40%) и $V_{\max}/K_m$ (на 20%) альдолазы, в то же время СМД (рис. Б) практически не влияли на эти параметры. В группах фенозан+облучение для обеих доз

отмечали значительное падение эффективности (на 44-45%) альдолазы. Следует отметить, что для малой дозы фенозана изменения обоих параметров фермента, а для СМД изменения $V_{\max}$ / мг белка имели обратную направленность между цитоплазмой и микросомами. Облучение (0,15 Гр) снижало эффективность (30-40%) альдолазы, как и в цитоплазме, и незначительно влияло на изменение $V_{\max}$ / мг белка фермента.

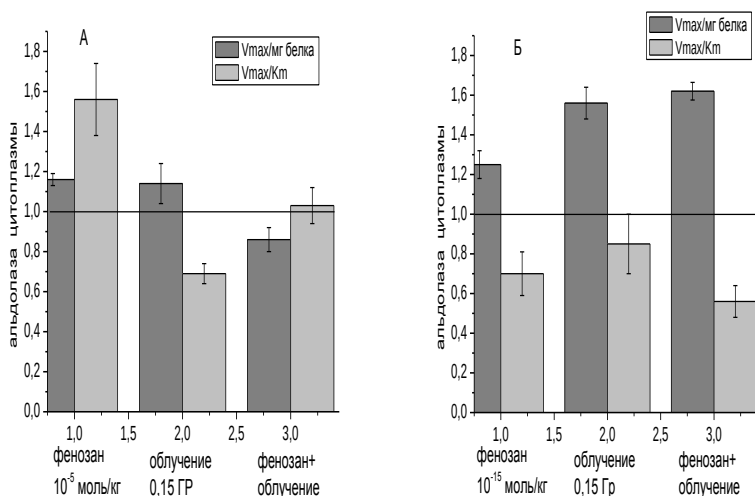


Рис. 1. Влияние фенозана в дозе 10^{-5} моль/кг, облучения (0,15 Гр), фенозана+облучение (рис. А) и в СМД (рис. Б) на $V_{\max}$ / мг белка и эффективность ($V_{\max}/K_m$) альдолазы цитоплазмы на 2-е сутки после введения фенозана и на 1-е сутки после облучения. Представлены средние значения 3-х измерений ($M \pm s$). 1- контрольные значения $V_{\max}$ (ммоль субстрата/мин·мг белка), K_m ($\times 10^{-4}$ М).

Обе дозы фенозана (табл.) значительно увеличивали микровязкость (τ_c) в области липидного бислоя мембран (зонд 1) и практически не влияли в области липид-белковых контактов бислоя (зонд 2). В группах фенозан+облучение уменьшение микровязкости в области липидного бислоя (зонд 1) получено для малой дозы, а увеличение для СМД фенозана. В области липид-белковых контактов (зонд 2) наблюдали увеличение (τ_c) для обеих доз фенозана. Различия изменений (τ_c) в ответ на облучение могут зависеть от исходного уровня (τ_c) в опытах.

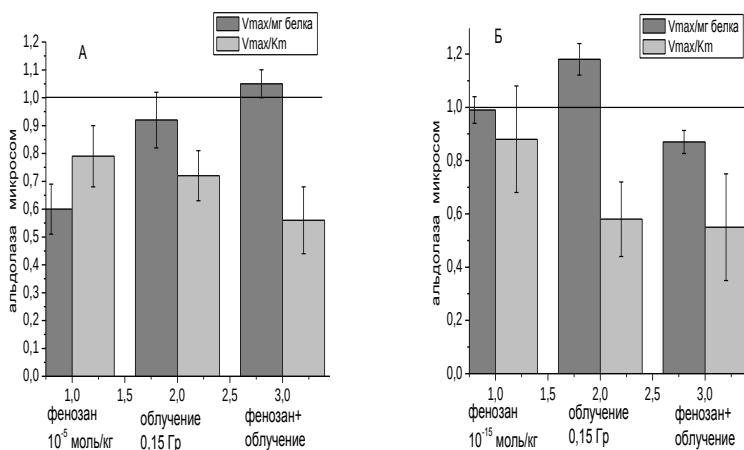


Рис. 2. Влияние фенозана в малой дозе 10^{-5} моль/кг (рис.А) или в СМД (рис. Б), облучения (0,15 Гр), фенозана+облучение на $V_{\max}$ / мг белка и эффективность ($V_{\max}/K_m$) альдолазы микросом на 2-е сутки после введения фенозана и на 1-е сутки после облучения. (даны средние значения 3-х измерений, $M \pm s$). 1- контрольные значения $V_{\max}$ (ммоль субстрата/мин·мг белка), K_m ($\times 10^{-4}$ М).

Таблица

Влияние фенозана, облучения и фенозана+облучение на микровязкость мембран микросом (относительные ед., $M \pm s$)

	Микровязкость ($\tau \cdot 10^{-10}$ с)	
	Зонд 1	
	доза 10^{-5} моль/кг	СМД
фенозан	1,25± 0,065	1,36±0,08
облучение	0,96±0,05	1,35±0,07
фенозан+ облучение	0,87 ±0,045	1,22±0,063
	Зонд 2	
фенозан	0,99±0,055	1,06±0,056
облучение	0,99±0,05	0,7 ±0,035
фенозан+облучение	1,1±0,065	1,2±0,067

На модельных системах показано взаимодействие альдолазы с фосфолипидами липосом, имеющее электростатическую природу [10]. Облучение и фенозан могут вызывать изменения в структуре мембран и, таким образом, влиять на связывание ферментов с мембранами. Нашли обратную

взаимосвязь между $V_{\max}$ / мг белка альдолазы и (t_c) мембран с зондом 1 ($p=0,036$) для малой дозы фенозана.

Таким образом, обнаружили различную чувствительность параметров альдолазы и микровязкости мембран к действию СМД, малых доз фенозана и облучения. Полученные данные могут свидетельствовать о существенном влиянии фенозана и облучения на метаболическое состояние клеток и структуру мембран клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Биофизика. 2004. Т. 49. С. 551-564.
2. Подколзин А.А., Гуревич К.Г. Действие биологически активных веществ в малых дозах. М.: Изд-во КМК. 2002. С.170
3. Allen R.G., Tresini M. Oxidative stress and gene regulation//Free Radic. Biol. Med. 2000. V.28. P. 463-499
4. Пальмина Н.П., Часовская Т. Е., Белов В.В., Мальцева Е.Л. Дозовые зависимости изменения микровязкости липидов биологических мембран, индуцированные синтетическим антиоксидантом фенозаном калия. // Докл. Акад. Наук. 2012. Т. 443. С. 511-515.
5. Трещенкова Ю.А., Бурлакова Е.Б. Изменение кинетических свойств альдолазы и лактатдегидрогеназы цитоплазмы мозга мышей после хронического γ -облучения в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. 1997. Т. 37. С. 3-12.
6. Трещенкова Ю.А., Голощапов А.А., Бурлакова Е.Б. Действие малых доз фенозана на кинетические свойства альдолазы и микровязкость мембран микросом клеток мозга мышей //VII Международная конференция «Биоантиоксидант» / Москва. 2006. С.260-262.
7. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики // М.: Мир. 1979. С. 280
8. Lowry O., Rosenbrouch N., Barr A., Randall R. Protein measurement with the Folin Phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
9. Голощапов А. А., Бурлакова Е. Б. //Биофизика. 1975. Т. 20. С. 816-821.
10. Gutowicz J., Terlecki G. The association of glycolytic enzymes with cellular and model membrane. //Cell. Mol. Biol. Lett. 2003. V. 8. P. 667-680.

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ ДОЗ ФЕНОЗАНА, ОБЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАН КЛЕТОК МОЗГА

Трещенкова Ю.А., Голощапов А.Н., Шишкина Л.Н., Бурлакова Е.Б.

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, Россия, ул. Косыгина 4. e-mail: tresch@sky.chph.ras.ru

В настоящее время интерес к изучению влияния малых доз биологически активных веществ и ионизирующего излучения на уровне макромолекул и клеток живых организмов достаточно актуален. Выявлены общие закономерности и общие механизмы действия малых и сверхмалых доз (СМД) [1]. Немногочисленные данные по изучению действия СМД на отдельные ферменты метаболических путей и структурное состояние мембран клеток в условиях *in vivo*. Известно, что антиоксиданты могут регулировать экспрессию генов ферментов [2], влиять на структурное состояние мембран в клетке [3]. В работе использовали синтетический антиоксидант фенозан калия, который обладает широким спектром действия, не связанным с его антиоксидантными свойствами. Ранее нами было показано влияние малых доз хронического γ -облучения на лактатдегидрогеназу (ЛДГ) цитоплазмы [4], разных доз фенозана на ЛДГ и микровязкость мембран микросом клеток мозга [5]. В данной работе изучали действие малых доз фенозана и облучения на параметры (V_{max} , K_m) ЛДГ цитоплазмы, микросом и микровязкость мембран клеток мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В работе использовали мышей линии SHK, самцов, массой 20-24 г. Проведено 2 серии опытов, каждый состоял из 4 групп (по 10 мышей в каждой группе): 1- контроль, 2- вводили раствор фенозана-К в малой дозе 10^{-5} или дозе 10^{-15} моль/кг (СМД), 3- облучение, 4- фенозан+облучение. Мышей облучали в малой дозе 0,15 Гр малой мощности (0,01 рад/мин). Растворы фенозана готовили методом последовательного разбавления дистиллированной водой. Фенозан вводили внутрибрюшинно (0,2 мл) за сутки до облучения. Контрольным мышам вводили дистиллированную воду. Мозг извлекали через 24 часа после облучения, готовили 10% гомогенаты в 0,32 М сахарозе. С помощью дифференциального центрифугирования получали фракции цитоплазмы и микросом при 105000g в течение часа на центрифуге Beckman (Германия). Микросомы замораживали до использования.

Активность ЛДГ определяли спектрофотометрически при 340 нм. Субстратом служил пируват натрия ("Merk", Германия) в интервале концентраций $(0,4-11,0 \cdot 10^{-4} \text{ М})$ [4]. Кинетические параметры (V_{max} , K_m) рассчитывали из начальных скоростей реакций, катализируемых ЛДГ, методом Корниш-Боудена [6] и вычисляли отношение V_{max}/K_m , характеризующее «эффективность» фермента. Белок определяли по методу Лоури [7]. Микровязкость в мембранах микросом оценивали по времени вращательной корреляции (τ_c), включенных в мембрану стабильных спиновых зондов, которые различались по своим гидрофобным свойствам и локализацией в мембране. Регистрацию спектров ЭПР проводили на ЭПР- спектрометре модели ER-200D (Brucker) [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

В цитоплазме (рис. 1А, Б) фенозан в малой дозе (10^{-5} моль/кг) увеличивал, а в СМД (10^{-15} моль/кг) уменьшал параметры $V_{\text{max}}/\text{мг белка}$ и V_{max}/K_m (эффективность) ЛДГ. После облучения (0,15 Гр) противоположные изменения $V_{\text{max}}/\text{мг белка}$ ЛДГ (в 2-х сериях опытов) зависели от исходного уровня параметров, как показано нами ранее [4] при действии хронического облучения в малых дозах на параметры ЛДГ цитоплазмы. Введенный до облучения фенозан в малой дозе (рис. А) понижал, а в СМД (рис. Б) повышал параметры ЛДГ до контрольного уровня, то есть оказывал модулирующее действие. Следует отметить сравнимое действие малой дозы и различное действие СМД фенозана на параметры альдолазы и ЛДГ в цитоплазме (фенозан в СМД не возвращал параметры альдолазы к контрольному уровню).

В микросомах (рис 2) малые дозы (А) и СМД (Б) фенозана не влияли на $V_{\text{max}}/\text{мг белка}$ и значительно повышали V_{max}/K_m ЛДГ.

После облучения повышались значения обоих параметров ЛДГ. Введенный до облучения фенозан в малой дозе и СМД снижал $V_{\text{max}}/\text{мг белка}$ до контрольного уровня, а эффективность ЛДГ сохранялась выше нормы и в большей степени для СМД фенозана. Показано, что ЛДГ связывалась с фосфолипидами мембран [9] и изменение структуры мембран может влиять на ее связывание с мембранами.

Микровязкость (τ_c) мембран микросом (рис.3) значительно возрастает в области липидной компоненты бислюа (зонд 1) при действии фенозана и в большей степени для СМД. В группе фенозан+облучение СМД увеличивала τ_c (текучесть уменьшалась) с зондом 1 и зондом 2, а малая доза фенозана понижала τ_c с зондом 1 и повышала - с зондом 2.

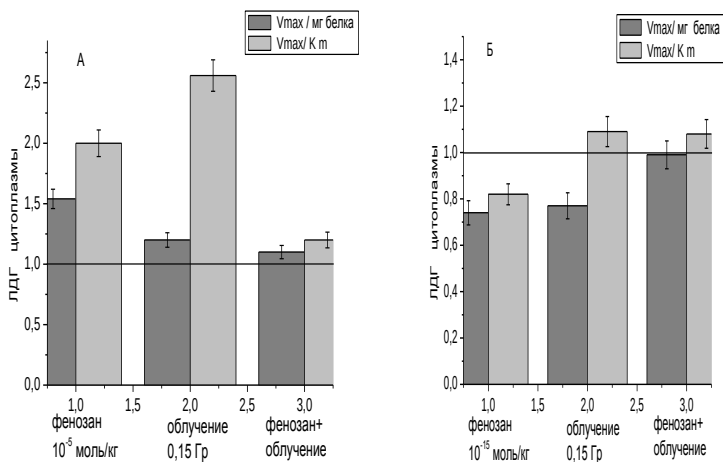


Рис. 1(А, Б) Влияние фенозана в дозе 10^{-5} моль/кг (А) и в СМД (Б), облучения (0,15 Гр), фенозана+облучение на $V_{max} / \text{мг белка}$ и V_{max} / K_m (эффективность) ЛДГ цитоплазмы на 1-е сутки после облучения и на 2-е сутки после введения фенозана. Даны средние значения 3-х измерений ($M \pm s$). 1- контрольные значения V_{max} (ммоль субстрата/мин·мг белка) и V_{max} / K_m .

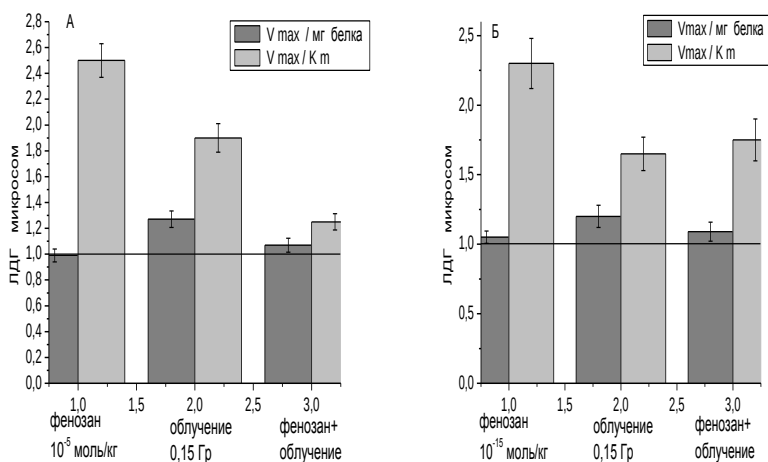


Рис.2 (А, Б) Влияние фенозана в дозе 10^{-5} моль/кг (А) и в СМД (Б), облучения (0,15 Гр), фенозана+облучение на $V_{max} / \text{мг белка}$ и V_{max} / K_m

ЛДГ микросом на 1-е сутки после облучения и на 2-е сутки после введения фенозана. Даны средние значения 3-х измерений ($M \pm s$). 1- контрольные значения V_{max} (ммоль субстрата/мин·мг белка) и V_{max}/K_m .

При облучении противоположная направленность изменений τ_c в разных областях липидного бислоя мембран, возможно, зависела от исходного уровня микровязкости (τ_c), как показано нами ранее при действии разных доз фенозана [5]. С увеличением жесткости мембран (увеличение τ_c) отмечали уменьшение V_{max} / мг белка ЛДГ мембран.

Таким образом, выявлены различия в действии малых доз и СМД фенозана, облучения на кинетические параметры ЛДГ и структурное состояние мембран микросом.

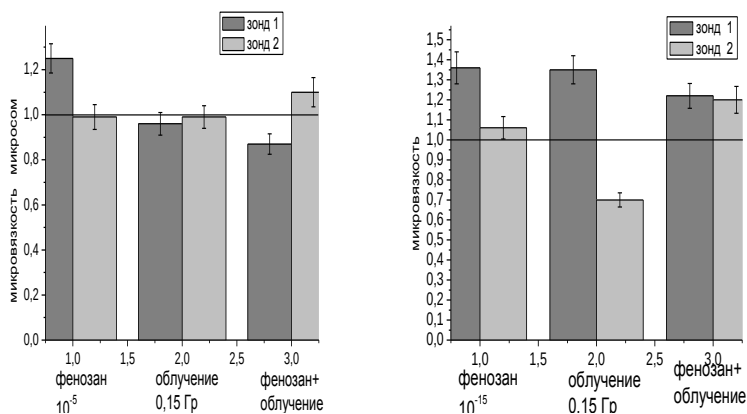


Рис. 3. Влияние фенозана в дозе 10^{-5} моль/кг или СМД (10^{-15}), облучения (0,15 Гр) и фенозана+облучения на микровязкость мембран с использованием спиновых зондов, различающихся по локализации в липидном бислое мембран. 1- значения микровязкости в контроле с зондом 1 (область липидной компоненты бислоя) и зондом 2 (область белок липидных контактов бислоя).

Предполагается, что наблюдаемые изменения важны для понимания механизма действия малых доз фенозана и облучения на ферменты (такие как альдолаза и ЛДГ), участвующие в метаболических процессах и структуру мембран клеток мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б., Конрадов А.А., Мальцева Е.Л. Действие сверхмалых доз биологически активных веществ и низкоинтенсивных физических факторов // Биофизика. 2004. Т. 49. С. 551-564.
2. Allen R.G., Tresini M. Oxidative stress and gene regulation//Free Radic.

-
- Biol. Med. 2000. V.28. P. 463-499
3. Белов В.В., Мальцева Е.Л., Пальмина Н.П., Структурные изменения в мембранах эндоплазматического ретикулума клеток печени при действии α -токоферола в широком интервале концентраций *in vitro*. // Биофизика. 2007. Т. 52. С. 75-84.
 4. Трещенкова Ю.А., Бурлакова Е.Б. Изменение кинетических свойств альдолазы и лактатдегидрогеназы цитоплазмы мозга мышей после хронического γ -облучения в малых дозах // Радиационная биология. Радиоэкология. 1997. Т. 37. С. 3-12.
 5. Трещенкова Ю.А., Голощапов А.А., Бурлакова Е.Б. Действие малых доз фенозана на биохимические свойства лактатдегидрогеназы и микровязкость мембран микросом клеток мозга мышей // Радиационная биология. Радиоэкология. 2003. Т. 43 С. 320-323.
 6. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики // М.: Мир. 1979. С. 280
 7. Lowry O., Rosenbrouch N., Barr A., Randall R. Protein measurement with the Folin Phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
 8. Голощапов А.А., Бурлакова Е.Б. //Биофизика. 1975. Т. 20. С. 816-821.
 9. Terlecki G., Czapinska E., Gutowicz J. The association of glycolytic enzymes with cellular and model membrane. //Cell. Mol. Biol. Lett. 2002. V. 7. P. 895-903.
-

УДК 581.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ АНТИОКСИДАНТА ИХФАНА НА СТРУКТУРНУЮ ОРГАНИЗАЦИЮ ГЕМОГЛОБИНА В ЭРИТРОЦИТАХ

**Фаткуллина Л.Д., Кривандин А.В., Шаталова О.В., Голощапов
А.Н., Бурлакова Е.Б.**

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва,
Россия, тел.: 84959397181, e-mail fatkullina@sky.chph.ras.ru

Одним из перспективных и практически важных направлений современной химии биоантиоксидантов является синтез «гибридных» соединений, молекулы которых содержат фрагменты, обеспечивающие этим соединениям помимо антиоксидантной активности ряд других специфических функций [1]. К таким соединениям относится группа фенольных антиоксидантов, синтезированных в ИБХФ РАН и получивших название ИХФАНЫ [1–3]. ИХФАНЫ являются производными фенозана-1 – 3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионовой кислоты. Молекулы ИХФАНов содержат экранированный фенол,

обладающий антиоксидантными свойствами, фрагмент триметиламиноэтанола, обеспечивающий антихолинэстеразную активность, и алкильный заместитель, содержащий в алифатической цепи 1, 8, 10, 12 или 16 атомов углерода, придающий ИХФАНам гидрофобные свойства. Такое сочетание свойств позволяет рассматривать ИХФАНЫ как перспективные соединения для разработки на их основе новых эффективных лекарственных средств лечения болезни Альцгеймера – главной причиной деменции у пожилых людей. Оптимальным сочетанием антиоксидантной и антихолинэстеразной активностей по данным исследований, проведенных *in vitro* [4], обладает ИХФАН-10-С-10 (обозначение, использованное в [3]), у которого алкильный заместитель содержит 10 атомов углерода (рис. 1).

В работах [5, 6] методом сканирующей электронной микроскопии было показано, что ИХФАНЫ, у которых алкильный заместитель содержит 10 или 12 атомов углерода, способны эффективно модифицировать морфологию эритроцитов, что авторы объяснили встраиванием ИХФАНов в плазматические мембраны эритроцитов. Не исключено, что ИХФАНЫ могут оказывать действие и на структурную организацию гемоглобина в эритроцитах (структуру самих молекул гемоглобина или параметры их надмолекулярной упорядоченности).

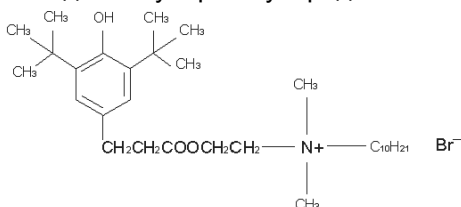
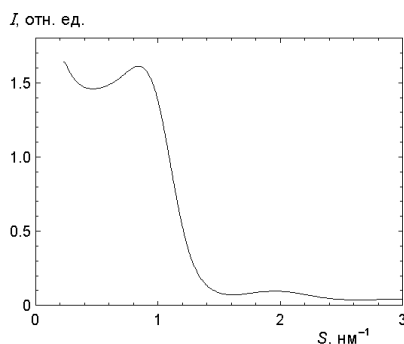


Рис. 1. Структурная формула ИХФАНа-10-С-10.

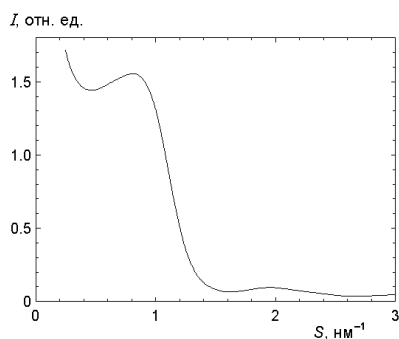
В этой работе мы провели исследование действия ИХФАНа-10-С-10 на структурную организацию гемоглобина в эритроцитах при помощи метода малоуглового рентгеновского рассеяния. Возможность исследования гемоглобина в эритроцитах этим методом и его чувствительность к изменениям ближнего порядка гемоглобина в эритроцитах была продемонстрирована раньше [7, стр. 173].

ИХФАН-10-С-10, синтезированный в ИБХФ РАН, вводили мышам в конечной концентрации 10^{-14} и 10^{-5} М/кг веса животных. Суспензию эритроцитов в физиологическом растворе выделяли через 4 и 14 дней после введения ИХФАНа. Измерение интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния

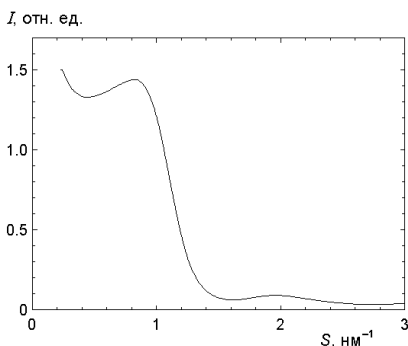
суспензиями эритроцитов проводили при комнатной температуре ($\sim 22^\circ\text{C}$) на автоматизированном дифрактометре с линейным координатным детектором (излучение CuK_α , $\lambda=0.154$ нм). Минимальное значение модуля дифракционного вектора $S=4\pi(\sin\theta)/\lambda$ составляло 0.174 нм^{-1} , шаг по S был равен 0.0093 нм^{-1} (θ – половина угла рассеяния, λ – длина волны рентгеновского излучения). Из интенсивности рассеяния суспензией эритроцитов вычитали интенсивность рассеяния капилляром с физиологическим раствором, проводили сглаживание данных и вводили коллимационную поправку на высоту рентгеновского пучка и окна детектора.



а



б



в

Рис. 2. Кривые малоуглового рентгеновского рассеяния суспензиями эритроцитов, выделенных через 4 суток после введения ИХФАна: **а** – контроль (без введения ИХФАна), **б** – введение ИХФАна в количестве 10^{-5} М/кг, **в** – введения ИХФАна в количестве 10^{-14} М/кг.

Кривые малоуглового рентгеновского рассеяния, полученные для суспензий эритроцитов, выделенных через 4 суток после введения ИХФАна в количестве 10^{-5} и 10^{-14} М/кг веса животных, и для контрольной суспензии эритроцитов, приведены на рис. 2. Все эти кривые очень похожи между собой. Они имеют

два диффузных дифракционных максимума вблизи $S \approx 0.9$ и 2 нм^{-1} . Максимум при $S \approx 0.9 \text{ нм}^{-1}$ обусловлен ближним порядком молекул гемоглобина в эритроцитах (см. [7], стр. 139 и 173, [8]). Этот максимум возникает в результате межмолекулярной интерференции излучения, рассеянного на молекулах гемоглобина, который содержится в эритроцитах в очень высокой концентрации (32-36 мг/мл). Дифракционный максимум при $S \approx 2 \text{ нм}^{-1}$ присутствует также и на кривых малоуглового рентгеновского рассеяния для разбавленных растворов гемоглобина [9]. Это показывает, что происхождение максимума при $S \approx 2 \text{ нм}^{-1}$ связано со структурой самих молекул гемоглобина.

Гемоглобин составляет более 90% сухого веса эритроцитов. Поэтому не удивительно, что основной вклад в интенсивность рентгеновского рассеяния суспензиями эритроцитов дает рассеяние на гемоглобине. Это было подтверждено нами экспериментально при исследовании плазматических мембран (теней) эритроцитов. Форма кривой малоуглового рассеяния суспензией теней эритроцитов существенно отличалась от формы кривых, представленных на рис. 2. Дифракционные максимумы при $S \approx 0.9$ и 2 нм^{-1} для теней эритроцитов не наблюдались.

Для концентрированной белковой системы, которой является гемоглобин в эритроцитах, форма кривой малоуглового рентгеновского рассеяния зависит как от структуры самих белковых молекул, так и от характера их взаимного расположения в пространстве (ближнего порядка). Поскольку форма кривых малоуглового рентгеновского рассеяния для суспензий эритроцитов, полученных после введения ИХФАНа, практически совпадает с формой кривой, полученной для контрольной суспензии, можно сделать вывод, что ИХФАН не оказывает существенного действия ни на структуру молекул гемоглобина, ни на параметры их ближнего порядка в эритроцитах. Сохранение параметров ближнего порядка молекул гемоглобина в эритроцитах после введения ИХФАНа, в частности, означает, что концентрация гемоглобина в эритроцитах при этом не меняется. Вывод о неизменности структуры молекул гемоглобина, конечно, подразумевает структуру низкого разрешения, к которой чувствителен метод малоуглового рентгеновского рассеяния.

Аналогичные результаты (сохранение формы кривой малоуглового рентгеновского рассеяния) были получены нами также в опыте, в котором выделение суспензий эритроцитов проводилось через 14 дней после введения животным ИХФАНа в количестве 10^{-14} М/кг веса животных.

Прямое сравнение результатов нашего исследования с данными об изменении под действием ИХФАНов морфологии эритроцитов [5, 6] является затруднительным в силу различных условий эксперимента. Можно предположить, что изменение морфологии эритроцитов под действием ИХФАНа не отражается на структурной организации гемоглобина в эритроцитах. Возможно также, что в наших условиях эксперимента, при введении ИХФАНа *in vivo*, модификация морфологии эритроцитов или не происходила, или происходила, но затрагивала лишь незначительную долю эритроцитов.

Итак, проведенное нами исследование показывает, что введение в организм животных ИХФАНа, как в терапевтической, так и в сверхмалой дозах (10^{-5} и 10^{-14} М/кг веса животных соответственно), не оказывает существенного влияния на структурную организацию гемоглобина в эритроцитах. Это является положительным фактором для потенциального применения ИХФАНов в медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burlakova E.B., Molochkina E.M., Nikiforov G.A. Hybrid Antioxidants // Chemical and biochemical physics, kinetics, and thermodynamics: new perspectives / Ed. Stott P.E., Zaikov G.E., Kablov V.F. N.Y.: Nova Science Publishers, Inc., 2007. P. 1-18.
2. Никифоров Г.А., Брагинская Ф.И., Ершов В.В., Бурлакова Е.Б. Соли N,N-диметиламиноэтил-β-(4-гидрокси-3,5-ди-третбутилфенил)пропионата в качестве ингибитора холинэстеразы: Патент № 2029760 (РФ) // Б.И. 1995. № 6.
3. Сторожок Н.М., Перевозкина М.Г., Никифоров Г.А. Взаимосвязь химической структуры и ингибирующего действия стерически затрудненных фенолов при окислении метилолеата в гомогенной и микрогетерогенной системах // Известия Академии наук. Серия химическая. 2005. № 2. С. 323-328.
4. Озерова И.Б. Новые антиоксиданты – экранированные фенолы как модуляторы активности ацетилхолинэстеразы *in vitro* и *in vivo*: Автореф. дисс. канд. биол. наук. М.: ИБХФ РАН, 2000.
5. Паршина Е.Ю., Гендель Л.Я., Рубин А.Б. Влияние новых гибридных антиоксидантов - ихфанов - на морфологию эритроцитов // Биофизика. 2004. Т. 49. № 6. С. 1094-1098.
6. Паршина Е.Ю., Гендель Л.Я., Рубин А.Б. Влияние ихфанов на структурные особенности мембраны эритроцитов // Известия РАН. Серия биологическая. 2007. №6. С. 645-649.
7. Guinier A., Fournet G. Small-angle scattering of X-rays. N.Y.: Wiley & Sons, 1955.
8. Krueger S., Nossalt R. SANS studies of interacting hemoglobin in intact erythrocytes // Biophys. J. 1988. V. 53. P. 97-105.

-
9. Svergun D.I., Ekstrom F., Vandegriff K.D., Malavalli A., Baker D.A., Nilsson C., Winslow R.M. Solution Structure of Poly(ethylene) Glycol-Conjugated Hemoglobin Revealed by Small-Angle X-Ray Scattering: Implications for a New Oxygen Therapeutic // Biophys. J. 2008. V. 94. P. 173-181.
-

УДК 541.15

АКТИВНОСТЬ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Фенин А.А.

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Москва, Россия, тел.: (495)948-54-64, e-mail: fmkfenin@rctu.ru

Окислительные процессы являются неотъемлемой частью жизни биологических объектов. Активные формы кислорода, которыми являются продукты неполного восстановления кислорода и кислород в синглетном состоянии, находясь в норме, играют огромную положительную роль, однако превышение допустимого уровня приводит к неконтролируемым цепным процессам окисления биологически важных молекул. Повышением содержания АФК сопровождается большое количество стрессовых состояний организма и в этих условиях необходимыми становятся антиоксиданты в связи с чем интерес исследователей к ним значительно возрос. В литературе антиоксидантная активность фенольных соединений объясняется за счет трех процессов: взаимодействие со свободными радикалами и прерывание цепных процессов окисления; хелатирование ионов металлов являющихся катализаторами распада перекисных соединений; модификация функций и активности структурных единиц клетки (мембран, белков и др.)

Ионы металлов входят в состав большого числа активных центров клетки и без них существование клетки не представляется возможным и поэтому их возможное влияние на активность фенольных соединений необходимо учитывать. В комплексообразовании участвуют те же гидроксильные группы, что участвуют во взаимодействии со свободными радикалами. Таким образом ионы металлов могут снижать антирадикальную активность, что делает актуальным исследование влияния ионов металлов на протекторную активность фенольных соединений. И одним из возможных методов анализа влияния ионов металлов

является оценка по радиопротекторной активности этих соединений в присутствии ионов металлов, поскольку в процессе радиолиза генерируется большой спектр свободных радикалов и их выход не зависит от добавок тестируемых веществ. В работе исследована радиопротекторная активность флавоноидов и кумаринов при наличии ионов металлов.

Радиопротекторную активность оценивали по относительному изменению выхода ионов калия из облученных дрожжевых клеток в питательную среду.

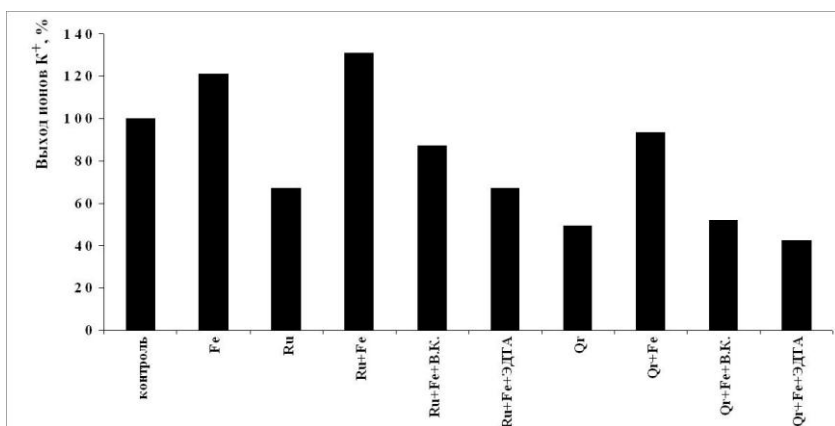


Рис. 1. Изменение выхода калия из облученных дрожжей при введении добавок: рутина — Ru, кверцетина — Qr, винной кислоты — B.K., диэтилтриаминтетрауксусной кислоты — ЭДА и железа(II) — Fe. Вещества вводились в концентрации 10^{-5} моль/л.

Дрожжи выращивали в течении двух дней при температуре 27-29°C на глюкозо-аммонийной среде. Использованная синтетическая среда не содержала ионов Fe^{2+} , что позволило оценить их влияние на протекторную активноть исследуемых соединений. Выраженную биомассу дрожжей переносили в стерильный раствор глюкозы, для этого ампулы с суспензированными дрожжами троекратно очищали центрифугированием с последующим ресуспендированием в растворе глюкозы с концентрацией 20 г/л. Концентрация дрожжей составляла $\sim 10^5$ КОЕ/мл. После очистки в суспензию вводили исследуемые вещества в концентрации $0.5-4 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Дрожжи подвергали воздействию $\square$ -излучения ^{60}Co на установке РХМ-γ-20, облучали в дозе 0.5 кГр при мощности дозы 0.11 Гр/с и измеряли, через сутки после облучения, концентрацию K^+ с помощью калий-

селективного электрода. Концентрацию K^+ в растворе дрожжей облученных без добавок принимали за 100%. Снижение концентрации K^+ характеризует наличие протекторной активности, а увеличение соответствует снижению протекторной активности.

На рис. 1 показано типичное изменение выхода калия при введении ионов металлов (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) и комплексонов: винной кислоты и ЭДТА.

Как следует из полученных данных введение ионов металлов снижает активность фенольных соединений, причем данное снижение не обусловлено наличием проокислительной активности у металлов, поскольку при разрушении комплекса фенол-металл происходит частичное восстановление активности фенольного соединения.

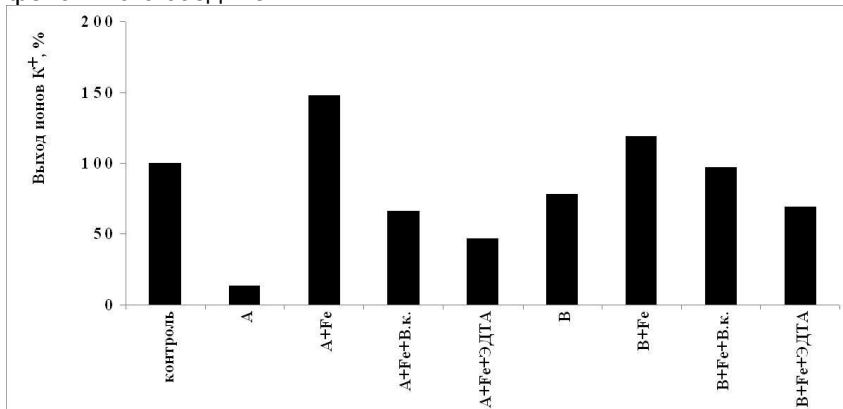


Рис. 2. Изменение выхода калия из облученных дрожжей при введении добавок: 6,7-дигидрокси-4-метил кумарин — А, 7-гидрокси-4-метил кумарин — В, винной кислоты — В.К., динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты — ЭДТА и железа(II) — Fe. Вещества вводились в концентрации 10^{-5} моль/л.

Сравнение активности фенольных соединений содержащих один фенольный гидроксил, с веществом содержащим пирокатехиновую группировку (7-гидрокси-4-метил кумарина с 6,7-дигидрокси-4-метил кумарином) показывает, что, как и следовало ожидать, активность дигидрокси фенола в опытах без ионов металлов оказалась выше. Однако в опытах с ионами железа большую активность проявил моногидроксильное производное, что объясняется меньшей устойчивостью его комплекса с ионом железа рис.2. Таким образом можно предполагать, что моногидроксил производные природных фенольных соединений

могут оказаться более ценными чем дигидроксипроизводные.

Кроме того эти результаты показывают, что разделение хелатирующей и антирадикальной активности является перспективным способом усиления антиоксидантной активности при наличии свободных ионов металлов. Произведен синтез 3,5 - замещенных производных N-(4-гидрокси-бензил) иминодиуксусной кислоты, где хелатирующей группой выступает остаток иминодиуксусной кислоты, а за антиоксидантную активность отвечает фенольный гидроксил. Радиопротекторная активность данных соединений при наличии ионов металлов выше чем у родственных соединений содержащих вместо остатка иминодиуксусной кислоты фрагменты диэтиламина и диэтаноламина.

УДК 582.28:57.083

ПАРА-ГИДРОКСИЭТИЛФЕНОЛ - АУТОРЕГУЛЯТОРНЫЙ МЕТАБОЛИТ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР

Цивилева О.М., Макаров О.Е., Никитина В.Е.

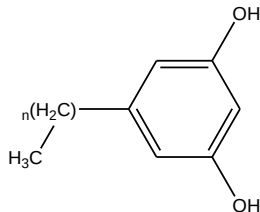
Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Саратов, Россия, тел.: (8452)970444, e-mail: tsivileva@ibppm.sgu.ru

Идентифицированные внеклеточные соединения, участвующие в адаптации микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды, по химической природе относятся к разным типам. Они представлены белками, углеводородами, органическими кислотами, нуклеотидами, аминокислотами, липопептидами, летучими соединениями [1]. Однако большая часть таких соединений в настоящее время не идентифицирована. Снижение уровня энергетического и конструктивного метаболизма и выход из неповрежденных клеток компонентов внутриклеточного пула являются характерными для защитных метаболических реакций (напр., [2]). Модуляции в лектиновой компоненте внеклеточных белков глубинной культуры базидиомицета, возможно, являются одним из механизмов, регулирующих метаболизм грибных клеток под влиянием внешних факторов. В подобном аспекте микологических культуры не изучались. Опираясь на данные литературы по бактериальным внеклеточным факторам адаптации [1], необходимо также учитывать, что факторы адаптации протекторного типа могут быть и, как правило, являются долгоживущими. А сигнальные молекулы, молекулы-зонды, для

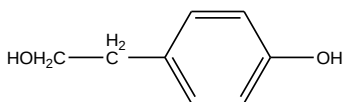
которых изучена динамика их появления и исчезновения из культуральной жидкости, относительно короткоживущие, они быстро накапливаются в среде до активной концентрации и быстро элиминируются.

Известно, что соединения - ауторегуляторы, *d*-факторы, синтезируются микроорганизмами различных таксономических групп. Факторы d_1 фенольной природы с функцией аутоиндукторов анабиоза играют немаловажную сигнальную роль в изменении количественного (скорость роста) и качественного (дифференцировка) состояния культуры. Эти фенольные метаболиты влияют на стадийность развития культуры, зависящую от их концентрации [3].

Примерами аутоиндукторов могут служить такие вещества, как алкилксибензолы (АОБ): 5-метилрезорцин ($\text{Alk} = \text{CH}_3$), 5-гексилрезорцин ($\text{Alk} = n\text{-C}_6\text{H}_{13}$) и др. (Alk с числом атомов углерода 7-12), - АОБ характерны для бактерий; а также тирозол (*p*-гидроксиэтилфенол, или 2-(4-гидроксифенил)этан-1-ол), исследованный в культуре пекарских дрожжей. Сведения о подобных регуляторных соединениях базидиальных ксилотрофных грибов отсутствуют.



5-Алкилрезорцины



Тирозол

Нами выявлена продукция тирозола в культурах высших грибов *Lentinula edodes* (гриб шиитакэ) и *Grifola umbellata* (грифола зонтичная).

На клеточном уровне эффект взаимодействия антибиотических факторов (в том числе тирозола) с ферментами проявляется в ингибировании метаболизма и переходе культуры в состояние анабиоза, характеризующееся повышением стрессоустойчивости. В свою очередь, усиление выработки лектинов микроорганизмами является ответом на стрессовые воздействия. В этой связи одна из задач работы заключалась в исследовании влияния тирозола как вероятного фактора анабиоза шиитакэ на изменение активности внеклеточных лектинов. Действительно, при включении тирозола в исходный состав сред

культивирования обнаруживаются значительные изменения лектиновой активности в культуральной жидкости гриба. Эксперименты, проведенные в динамике с целью выявления зависимости титра гемагглютинации от возраста культуры, показали неодинаково выраженное для разной добавочной концентрации влияние тирозола, зависящее от продолжительности выращивания. Если представить данные в виде отношения титра гемагглютинации в присутствии тирозола к титру в его отсутствие ($TGA_{\text{тирозол}}/TGA$), можно наблюдать, что указанное отношение не меньше единицы при всех вариациях экспериментальных условий, что говорит о положительном в целом влиянии тирозола на активность внеклеточных лектинов культуры гриба и существовании определенных периодов роста, когда добавки тирозола оказывают наибольший эффект в отношении этой активности. Так, при внесении добавки тирозола при посеве для большинства концентраций максимальный эффект наблюдается при возрасте культуры 20 суток.

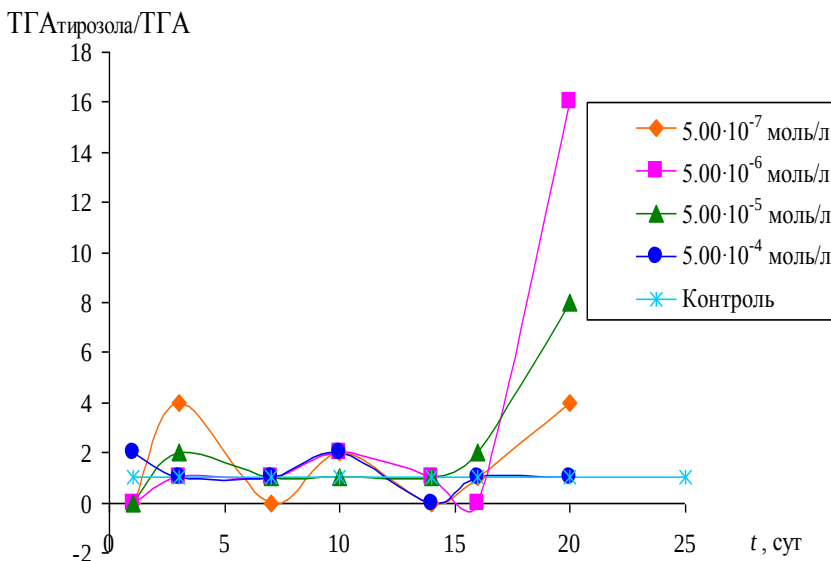


Рис. 1. Гемагглютинирующая активность культуры шиитаке с добавкой тирозола в различной концентрации при посеве

Максимальный эффект составляет $TGA_{\text{тирозол}}/TGA = 16$ при возрасте культуры 20 сут для добавки тирозола при посеве в концентрации $5.00 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Для концентрации $5.00 \cdot 10^{-7}$ и

$5.00 \cdot 10^{-5}$ моль/л этот возраст также будет оптимальным. Для концентрации $5.00 \cdot 10^{-4}$ моль/л лектиновая активность всегда выше в присутствии тирозола по сравнению с контрольным экспериментом, за исключением 14-суточной культуры (это период наиболее активного роста мицелия).

В случае добавки тирозола на 14-е сутки выращивания (завершение фазы активного роста глубинной культуры) максимальный эффект различен для разной концентрации тирозола, четкой зависимости не наблюдается. Самая низкая концентрация тирозола в среде (порядка 10^{-7} моль/л), вероятно, характеризуется «эффектом низких концентраций». Подобное действие тирозола в отношении культур высших грибов - предмет наших дальнейших исследований.

При дополнительном введении тирозола в среду культивирования в составе внутриклеточных метаболитов липидной природы отмечается повышенное содержание 9,12-октадекадиеновой (линолевой) кислоты, что не противоречит нашему предположению о роли тирозола как аутоиндуктора замедления ростовых процессов и перехода к генеративной стадии развития, необходимым условием чего служит увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот в мицелии. Кроме того, при наличии экзогенного тирозола повышение в целом лектиновой активности культуральной жидкости шиитаке, являющейся индикатором отклика культуры на стрессовое воздействие, указывает на роль тирозола как имитатора стресса для указанного базидиомицета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Николаев Ю.А. Внеклеточные факторы адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40, № 4. С. 387-397.
2. Андреев В.С., Попов В.Г., Дронова Н.В. Электробиохимический механизм регуляции физиологической деятельности микроорганизмов на популяционном уровне // Биотехнология. 1988. Т. 4, № 1. С. 32-36.
3. Эль-Регистан Г.И., Хохлова Ю.М., Дужа М.В., Козлова А.Н., Поплаухина О.Г., Дуда В.И. Выявление и характеристика специфических ауторегуляторных факторов, синтезируемых про- и эукариотными микроорганизмами // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1979, № 6. С. 869-877.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ, МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНЫЕ И МЕМБРАНОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ТЕРПЕНОФЕНОЛ- ХЛОРИНОВЫХ КОНЪЮГАТОВ

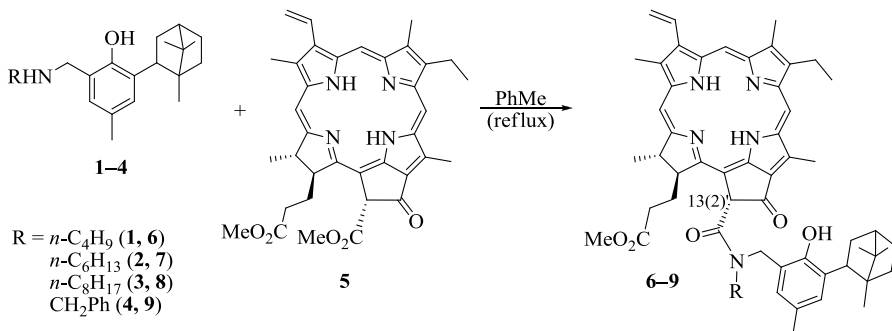
**Шевченко О.Г.¹, Плюснина С.Н.¹, Белых Д.В.², Буравлёв Е.В.²,
Чукичева И.Ю.², Тарабукина И.С.²**

¹ФГБУН Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия, тел.:
(8212) 43-04-78, e-mail: shevchenko@ib.komisc.ru

²ФГБУН Институт химии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, Россия, тел.:
(8212) 21-99-16

Одним из подходов в создании новых эффективных антиоксидантов является сочетание в одной молекуле нескольких фармакофорных групп [1]. В качестве подобных соединений могут выступать нетоксичные производные хлорофилла а [2–4], в состав молекул которых входят антиоксидантные группы, такие как фрагменты *орто*-изоборнилфенолов [5–8]. Удобным объектом для исследования биологической активности веществ и скрининга эффективных мембранопротекторов в условиях окислительного стресса, индуцируемого различными химическими соединениями, являются эритроциты крови млекопитающих [9–13]. Соединения, обладающие антиоксидантными свойствами и способные взаимодействовать с мембранными структурами, могут вызывать морфологическую трансформацию нормальных эритроцитов в сторону увеличения доли аномальных форм, связанную с интеркаляцией экзогенного вещества в мембрану [14, 15]. Характер этой трансформации указывает на особенности распределения соединения во внутримембранном пространстве. Влияние на морфологию эритроцитов показано не только для экстрактов растений, содержащих антиоксиданты фенольной природы [10, 12], но и для синтетических антиоксидантов [9, 16–18]. Ценная информация об особенностях взаимодействия органических незлектролитов с эритроцитарной мембраной и их распределении в ней может быть получена методом сканирующей электронной микроскопии [14, 15, 17].

В настоящей работе исследовали биологическую активность соединений (**6–9**), имеющих различный размер заместителя при атоме азота. Конъюгаты (**6–9**) получали из вторичных аминотетильных производных на основе 2-изоборнил-4-метилфенола (**1–4**) и метилфеофорбида а (**5**) (схема). Строение полученных конъюгатов установлено на основании данных ИК- и ¹H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии MALDI.



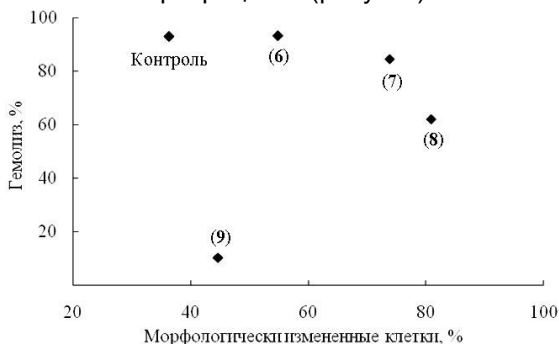
В экспериментах использовали 1% суспензию эритроцитов крови лабораторных мышей в фосфатно-солевом буфере. Раствор исследуемого вещества в этаноле вносили в суспензию эритроцитов в конечной концентрации 10 мкМ и инкубировали при 37°C в течение 5 ч. Инициирование гемолиза проводили раствором H_2O_2 . Степень гемолиза оценивали по выходу гемоглобина в инкубационную среду [9]. Содержание вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП), определяли спектрофотометрически [19]. Для изучения поверхностной структуры эритроциты фиксировали в глutarовом альдегиде, образцы высушивали, напыляли золотом и изучали под электронным микроскопом.

Инкубация эритроцитов с соединениями (**6–9**) в концентрации 10 мкМ не выявила существенного цитотоксического эффекта данных препаратов.

Изучение поверхностной структуры эритроцитов методом сканирующей электронной микроскопии подтвердило способность исследуемых соединений взаимодействовать с мембранами эритроцитов, что свидетельствует о наличии мембранотропности у конъюгатов (**6–9**). Количественная оценка распределения морфологических форм красных клеток крови показала, что введение в суспензию эритроцитов растворов исследуемых соединений приводит к уменьшению содержания дискоцитов и увеличению доли эхиноцитов и переходных кренированных форм (клетки с неровными краями, выростами и гребнями). Согласно гипотезе сопряженного бислоя [15], соединения, приводящие к образованию эхиноцитов, встраиваются во внешний монослой эритроцитарной мембраны, вызывая непропорциональное увеличение его площади. Полученные результаты позволяют предположить, что исследуемые нами вещества интеркалируют во

внешний монослой эритроцитарной мембраны.

Исследование параметров H_2O_2 -индуцированного гемолиза эритроцитов крови показало, что по величине мембранопротекторной активности исследованные соединения располагаются в ряду (9)>(8)>(7)>(6). При этом конъюгат (9) почти полностью ингибировал гемолиз в течение всего периода инкубации; препараты (7, 8) увеличивали период индукции, а соединение (6) не оказывало статистически значимого эффекта на параметры гемолиза. Кроме того, соединения, характеризующиеся наибольшей мембранопротекторной активностью, также существенно снижали интенсивность ПОЛ. Об этом свидетельствует наличие статистически значимой корреляции ($R_s = 0.90$, $p = 0.037$) между величиной индуцированного гемолиза и содержанием ТБК-АП в суспензии эритроцитов. Способность исследуемых конъюгатов предотвращать H_2O_2 -индуцированный гемолиз эритроцитов и тормозить накопление вторичных продуктов ПОЛ свидетельствует о наличии у них выраженной антиоксидантной и мембранотропной активности. Вместе с тем, отсутствует прямая зависимость между мембранотропной активностью соединений и величиной их мембранопротекторного и антиоксидантного эффекта. Наибольшая мембранопротекторная активность выявлена у конъюгата (9), молекула которого содержит бензильный фрагмент при атоме азота. Однако именно это соединение в наименьшей степени вызывало морфологические изменения эритроцитов (рисунок).



Таким образом, анализ полученных данных позволяет заключить, что мембранопротекторная и антиоксидантная активность синтезированных конъюгатов (6–9) существенным образом зависит от их способности интеркалировать в эритроцитарную мембрану, что в значительной степени определяется природой заместителя амидной группы в положении

13(2). Вместе с тем нельзя исключить влияние на указанные характеристики других свойств исследованных соединений (антирадикальная активность и др.), что также может быть обусловлено различной структурой амидного заместителя.

Авторы выражают искреннюю признательность ведущему инженеру-электронике отдела лесобиологических проблем Севера Института биологии Коми НЦ УрО РАН

А.И. Патову за содействие в работе со сканирующим электронным микроскопом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (Интеграционный проект фундаментальных исследований Президиума РАН «Биомедицинская и молекулярная химия», № 12-Т-3-1020).

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б. (ред.). Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. М.:Химия, 2005. Т.2. С.10.
2. Nyman E.S., Hynninen P.H. // J. Photochem. Photobiol., B. 2004. V. 73. P. 1–28.
3. Pandey R.K. // J. Porphyrins Phthalocyanines. 2000. V. 4. P. 368–373.
4. DeRosa M.C., Crutchley R.J. // Coord. Chem. Rev. 2002. V. 233–234. P. 351–371.
5. Buravlev E.V., Chukicheva I.Y., Suponitsky K.Y., Vikharev Y.B., Grishko V.V., Kutchin A.V. // Lett. Org. Chem. 2011. V. 8. P. 301–308.
6. Буравлев Е.В., Чукичева И.Ю., Шевченко О.Г., Супоницкий К.Ю., Кучин А.В. // Биоорган. химия. 2011. Т. 37. С. 685–689.
7. Плотников М.Б., Смольякова В.И., Иванов И.С., Кучин А.В., Чукичева И.Ю., Буравлев Е.В., Краснов Е.А. // Хим.-фарм. ж. 2010. Т. 44. С. 9–12.
8. Чукичева И.Ю., Буравлев Е.В., Федорова И.В., Борисенков М.Ф., Кучин А.В. // Изв. АН. Сер. хим. 2010. С. 2220–2224.
9. Ajila C.M., Prasada Rao U.J.S. // Food Chem. Toxicol. 2008. V. 46. P. 303–309.
10. Battistelli M., De Sanctis R., De Bellis R., Cucchiari L., Dachà M., Gobbi P. // Eur. J. Histochem. 2005. V. 49. P. 243–254.
11. Dai F., Miao Q., Zhou B., Yang L., Liu Z.-L. // Life Sci. 2006. V. 78. P. 2488–2493.
12. Suwalsky M., Vargas P., Avello M., Villena F., Sotomayor C.P. // Int. J. Pharm. 2008. V. 363. P. 85–90.
13. Takebayashi J., Chen J., Tai A. // Advanced Protocols in Oxidative Stress II, Methods in Molecular Biology / Ed. Armstrong D. New York; Dordrecht; Heidelberg; London: Humana Press, 2010. V. 594. P. 287–296.
14. Гендель Л.Я., Ким Л.В., Лунева О.Г., Федин В.А., Круглякова К.Е. // Изв. АН. Сер. биол. 1996. № 4. С. 508–512.
15. Sheetz M.P., Singer S.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1974. V. 71. P. 4457–4461.

-
16. Luneva O.G., Gendel' L.Ya., Kuznetsov Yu.V., Smirnov L.D. // Biophysics. 2005. V. 50. P. 294–298.
 17. Паршина Е.Ю., Гендель Л.Я., Рубин А.Б. // Биофизика. 2004. Т. 49. С. 1094–1098.
 18. Parshina E.Yu., Gendel' L.Ya., A.B. Rubin. // Biol. Bull. 2007. V. 34. P. 537–541.
 19. Asakawa T., Matsushita S. // Lipids. 1980. V. 15. P. 137–140.
-

ИНГИБИРУЮЩАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Шишкина Л.Н.

ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН, Москва,
Россия, тел.: 8(495)9397186; e-mail: shishkina@sky.chph.ras.ru

Поиск эффективных средств защиты жиров и масел от окислительной деградации, разработка стратегии и тактики профилактики и терапии различных заболеваний связаны с синтезом и отбором наиболее эффективных и нетоксичных для организма регуляторов свободнорадикальных процессов окисления. Среди биологически активных веществ (БАВ), используемых на практике для торможения окислительных процессов, наиболее широко применяются различные природные и синтетические антиоксиданты (АО). При этом необходимо отметить, что большинство природных БАВ, обладающих АО свойствами, являются фенольными соединениями [1, 2]. Однако изучение механизма их действия в системах разной степени сложности позволило выявить целый ряд особенностей, которые необходимо учитывать при отборе наиболее перспективных для использования в различных областях жизнедеятельности человека в зависимости от цели и задач практики.

Ингибирующая эффективность фенольных соединений в модельных системах

Механизм окисления органических веществ и ингибирование реакций окисления индивидуальными фенольными АО подробно рассмотрен в обзорах и монографиях [1 - 7]. Для оценки АО свойств соединений часто используют различные варианты хемилюминесцентных и фотохемилюминесцентных методов и модельные системы с применением инициаторов, метод ЭПР, а также реакции автоокисления жирных кислот или их эфиров [1, 5, 7 - 11]. Однако необходимо иметь ввиду, что механизмы

модельных реакций различны, что обуславливает определение разных параметров ингибирующей эффективности соединений. Реакции инициированного окисления протекают по механизму цепной неразветвленной реакции [5, 10], их период индукции определяется концентрацией ингибитора (InH), его ингибирующей емкостью и скоростью инициирования, но не зависит от эффективности InH [5]. Таким образом, при инициированном окислении определяется лишь суммарная антирадикальная активность (АРА) изучаемых БАВ и АО. Автоокисление, являясь цепной реакцией с вырожденным разветвлением [1, 9, 11], представляет собой автоиницированный процесс с положительной обратной связью, которая осуществляется через гидропероксид [5]. Как полагают [5], именно эти кинетические особенности автоокисления обуславливают проявление таких черт ингибирования, как зависимость длительности тормозящего действия InH от его эффективности, существование критических явлений при ингибировании процесса автоокисления [12], торможение процесса соединениями, реагирующими с ведущими цепь радикалами или разрушающими гидропероксиды на молекулярные продукты [13], торможение окисления веществами, образующими с ионами металлов переменной валентности малоактивные комплексы [1, 5, 7, 11]. Использование модельных реакций автоокисления жирных кислот и их эфиров позволяет определять истинное значение антиокислительной активности (АОА) соединений, которая далеко не во всех случаях совпадает с их АРА [9]. Однако необходимо отметить, что процессы окислительной порчи протекают преимущественно в режиме автоокисления [1], при этом величина общей АОА является одним из основных факторов, определяющих не только срок хранения индивидуального БАВ или многокомпонентной системы, но и их устойчивость к действию повреждающих факторов [9, 14]. Поэтому оценка значения общей АОА соединений именно в реакциях автоокисления, несмотря на длительность и трудоемкость экспериментов, не утратила своей актуальности и в настоящее время.

Среди природных фенольных АО наиболее изучен механизм ингибирования реакций окисления в модельных системах α -токоферолом и его гомологами [15, 16], а также флавоноидами и родственными соединениями [17, 18]. Анализ этих данных показывает, что реакционная способность природных АО существенно зависит от ненасыщенности субстрата окисления; структуры радикалов, ведущих цепь окисления; скорости зарождения радикалов в системе и участия АО в побочных

реакциях.

Наличие в модельной системе фосфолипидов (ФЛ), являющихся одними из основных компонентов клеточных мембран, оказывает существенное влияние на ингибирующую эффективность АО, масштаб которого зависит от скорости зарождения радикалов, степени окисленности субстрата и полярности среды [19 - 24]. В соответствии с влиянием ФЛ на продолжительность периода индукции (τ) инициированного окисления метилолеата, InH были разделены на три группы [23]:

- АО, для которых наблюдается увеличение τ (α -токоферол, 4-метоксифенол, этоксихин);
- АО, для которых не обнаружено изменение τ (ионол);
- АО, для которых выявлено уменьшение τ (кверцетин, дигидрокверцетин).

Необходимо отметить, что лецитин, широко используемый в качестве пищевой добавки, уменьшал АО эффективность флавоноидов и при инициированном, и при автоокислении, в то время как при инициированном окислении метилолеата данный ФЛ либо не влиял на АО эффективность α -токоферола (аддитивность), либо приводил к увеличению эффективности ингибирования (синергизм) [22]. Добавки лецитина в зависимости от природы субстрата, режима окисления и вклада побочных реакций снижают, увеличивают или практически не влияют на эффективность ингибирования и изоборнилфенолов – нового класса АО, синтезированных на основе природного сырья [24].

Одним из факторов, вызывающих изменение ингибирующей эффективности АО в присутствии ФЛ, является образование комплексов между молекулами InH и ФЛ, отличающихся по реакционной способности от исходных АО как в реакциях ингибирования, так и в побочных реакциях [19, 20, 22 - 24]. Наличие комплексов ФЛ с природными и синтетическими АО показано и в работах [25 - 27].

Ингибирующая эффективность фенольных соединений *in vivo*

Как известно, процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) протекают в норме на уровне мембран, клеток и органов всех биологических объектов [7, 9, 11, 14], поэтому биологическая активность большинства соединений обусловлена не только их способностью влиять на регуляцию процессов ПОЛ, но и воздействовать на структурное состояние мембран [7, 9, 28]. Кроме того, такие факторы, как различия ингибирующей эффективности БАВ в гомогенной и гетерогенной среде, возможность появления

синергизма и антагонизма, масштабы которых сильно колеблются в зависимости от соотношения концентраций фосфолипидов (ФЛ) и InH , степени ненасыщенности липидов или физико-химических характеристик АО [9, 11, 23, 28 - 32], обуславливают различия АОО соединений, определенной как в разных модельных системах, так и с их способностью ингибировать ПОЛ при введении в организм млекопитающих [4, 7, 9, 32, 33]. На биологическую активность оказывают влияние и липофильность соединений, определяющая их способность встраиваться в мембрану и взаимодействовать с компонентами клетки, а также их фармакокинетические характеристики [11, 33 - 35]. Необходимо подчеркнуть, что при введении животным именно для синтетических АО впервые было обнаружено отсутствие линейной зависимости их биологической активности от концентраций, существенно далеких от МПД препаратов [7, 9].

Оценку ингибирующей эффективности БАВ в системах *in vivo* проводят, анализируя их влияние на различные показатели системы регуляции ПОЛ после воздействия на организм по сравнению с аналогичными величинами в контроле. Интенсивность ПОЛ в сложных биологических системах обычно оценивают по содержанию продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП) [36], а также по изменению содержания различных продуктов окисления липидов (пероксиды, диеновые конъюгаты или кетодиены) [11, 36]. Для определения общей ингибирующей активности фенольных АО в компонентах клеток или тканей животных используются те же методы и модельные системы, которые перечислены выше.

Заключение

Таким образом, при анализе ингибирующей эффективности различных фенольных АО необходимо учитывать следующие факторы:

- отсутствие линейной зависимости ингибирующей эффективности от концентрации АО, которое было выявлено и в модельных экспериментах, и при введении их в организм животных;
- зависимость ингибирующей эффективности и биологической активности от химической структуры и физико-химических характеристик АО;
- степень сложности системы и ненасыщенность субстрата окисления;
- скорость зарождения свободных радикалов в окислительных процессах;
- взаимодействие с компонентами клетки и воздействие на

структурное состояние клеточных мембран, активно участвующих в регуляции метаболизма в организме;

- отсутствие корреляционных зависимостей между антирадикальной активностью АО и их ингибирующей эффективностью при сопоставлении результатов, выполненных как в разных модельных системах, так и в модельных экспериментах и на биологических объектах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Эмануэль Н.М., Лясковская Ю.Н. Торможение процессов окисления жиров. М.: Пищепромиздат, 1961. 355 с.
2. Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты / Отв. ред. Н.В. Загоскина, Е.Б. Бурлакова. М.: Научный мир, 2010. 400 с.
3. Emanuel N.M., Zaikov G.E., Maizus Z.K. Oxidation of Organic Compounds. Effect of Medium. Oxford: Pergamon Press, 1984. 650 p.
4. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты. Эффективность и реакционная способность. М.: Наука, 1988. 248 с.
5. Денисов Е.Т., Азатян В.В. Ингибирование цепных реакций. Черноголовка, 1997. 268 с.
6. Denisov E.T., Denisova T.G. Handbook of Antioxidants. Bond Dissociation Energy, Rate Constants, Activation Energy and Enthalpies of Reactions (2nd ed.). Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press, 2000. 290 p.
7. Панорама современной химии в России. Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. Том.2. Биологическая кинетика. М.: Химия. 2005. 600 с.
8. Шляпинтох В.Я., Карпухин О.Н., Постников Л.М., Захаров И.В., Вичутинский А.А., Цепалов В.Ф. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М.: Наука, 1966. 300 с.
9. Бурлакова Е.Б., Алесенко А.В., Молочкина Е.М., Пальмина Н.П., Храпова Н.Г. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте. М.: Наука, 1975. 214 с.
10. Эмануэль Н.М., Гал Д. Окисление этилбензола (модельная реакция) / Отв. ред. И.В. Березин. М.: Наука, 1984. 376 с.
11. Исследование синтетических и природных антиоксидантов *in vitro* и *in vivo* / Отв. ред. Е.Б. Бурлакова. М.: Наука, 1991. 110 с.
12. Эмануэль Н.М., Гагарина А.Б. // Успехи химии. 1966. Т. 35. № 4. С. 619-656.
13. Atmospheric Oxidation and Antioxidants / Ed. G. Scott. Amsterdam – L. – N.Y. – Tokyo: ELSEVIER, 1993. V. Ш. 528 p.
14. Шишкина Л.Н. Особенности функционирования физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов в биологических объектах разной степени сложности в норме и при действии повреждающих факторов. Автореф. дис. ... д.х.н., М., 2003. 45 с.
15. Burton G.W., Ingold K.U. // Acc. Chem. Rev. 1986. Vol. 19. P. 194-201.

-
16. Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г. // Хим. физика. 1095. Т. 14. № 10. С. 151-182.
 17. Cody V., Middleton E., Harborne J.B. Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationships. New York: Liss, 1986. 330 p.
 18. V.A. Belyakov, V.A. Roginsky and W. Bors // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1995. No 2. P. 2319-2326.
 19. Бурлакова Е.Б., Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. // Изв. РАН. Сер. химич. 1995. № 6. С. 1053-1059.
 20. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. // Нефтехимия. 2008. Т. 48. № 2. С. 105-111.
 21. Dwiecki K., Neunert G., Polewski P., Polewski K. // J. Photochem. Photobiol. B. Biology. 2009. Vol. 96. P. 242-248.
 22. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46, № 2. С. 148-152.
 23. Mazaletskaia L.I., Sheludchenko N.I., Shishkina L.N. // Chemistry & Chem. Technology. 2012. Vol. 6. No 1. P. 35-41.
 24. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н., Кучин А.В., Федорова И.В., Чукичева И.Ю. // ЖФХ. 2012. Т. 86. № 9. С. 1532-1538.
 25. Шарафутдинова Р.Р., Насибуллин Р.С., Фахретдинова Е.Р. // Хим. физика и мезоскопия. 2008. Т. 10. № 4. С. 510-513.
 26. Keyong Xu, Benguo Liu, Yuxiang Ma, Jiquan Du, Guanglei Li, Han Gao, Yuang Zhang, Zhengxiang Ning // Molecules. 2009. No 14. P. 3486-3489.
 27. Marakulina K.M., Kramor R.V., Lukanina Yu.K., Shishkina L.N. // In : Modern Problems in Biochemical Physics. New Horizons. New York: Nova Science Publishers, 2012. P. 294-301.
 28. Atkinson J., Epand R.F., Epand R.M. // Free Radic. Biol. & Med. 2008. Vol. 44. P. 739-764.
 29. Niki E. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1987. Vol. 60. P. 155-157.
 30. Богуславская Л.В., Бурлакова Е.Б., Кольцова Е.А., Максимов О.В., Храпова Н.Г. // Биофизика. 1990. Т. 35. С. 928-932.
 31. Barclay R.L.C., Vinqvist M.R., Antunes F., Pinto R.E., // J/ Am. Chem. Soc. 1997. Vol. 119. P. 5764-5765.
 32. Nili E. // Free Radic. Biol. & Med. 2010. Vol. 49. P. 503-515.
 33. Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J.-O., Dommes J. // Food Chemistry. 2009. Vol. 113. P. 1226-1233.
 34. Паршина Е.Ю., Гендель Л.Я., Рубин А.Б. // Биофизика. 2009. Т. 54. Вып. 6. С. 1051-1054.
 35. Chen Y., Deuster P. // Chemico-Biology Interactions. 2009. Vol. 182. P. 7-12.
 36. Каган В.Е., Орлов О.Н., Прилипко Л.Л. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов / Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. Биофизика. М., 1986. Т.18. 136 с.
-

УДК 577.3

ДЕЙСТВИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ НА ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПИДНОГО СЛОЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

**Ягольник Е.А.¹, Тараховский Ю.С.², Кузнецова С.М.²,
Тулеуханов С.Т.³, Музафаров Е.Н.¹, Ким Ю.А.⁴**

¹Тульский государственный университет, Тула, Россия

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино,
Московской обл., Россия

³Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, РК.

⁴Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московской обл., Россия e-mail:
yea_88@mail.ru

Флавоноиды представляют большой интерес как вещества, являющиеся не только активными антиоксидантами, но также важными биорегуляторами, необходимыми для поддержания здоровья и профилактики различных заболеваний, включая канцерогенные, сердечнососудистые, аутоиммунные, воспалительные, и др. /1,2/. Поскольку полифенольные соединения в несвязанной форме (или в форме агликонов) обычно гидрофобны, они предпочтительно взаимодействуют с биологическими мембранами /3/. Мишенями для флавоноидов могут быть, например, липидные рафты плазматических мембран, в которых предположительно находятся некоторые белковые рецепторы клеточной сигнализации /4/.

Мы исследовали влияние ряда флавоноидов (кверцетин, таксифолин, катехин, флоритин) на фазовое поведение двух наиболее важных фосфолипидов биологических мембран, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в норме располагающихся во внешнем и внутреннем монослоях плазматической мембраны соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Термограммы, полученные в процессе нагревания липосом сформированных из димристоил-фосфатидилхолина (ДМФХ) (рис. 1), обнаруживают типичный для этого липида рост теплопоглощения с максимумом при 24 °С, который соответствует процессу плавления указанного липида. Известно, что в данной области температур плавление липидов в липосомах из ДМФХ сопровождается фазовым переходом фосфолипидного бислоя из геля в жидкий кристалл, который можно охарактеризовать, как процесс плавления углеводородных цепей фосфолипидного

бислая /5/.

Исходные липосомы – а, липосомы в присутствии катехина – b, таксифолина – с, кверцетина – d, флоретина – e. На этом и последующих рисунках пунктиром обозначены результаты деконволюции термограмм на 2 или 3 кривых Гаусса. Сумма кривых, полученных при деконволюции, совпадала с исходной кривой термограммы ($R \geq 0,996$).

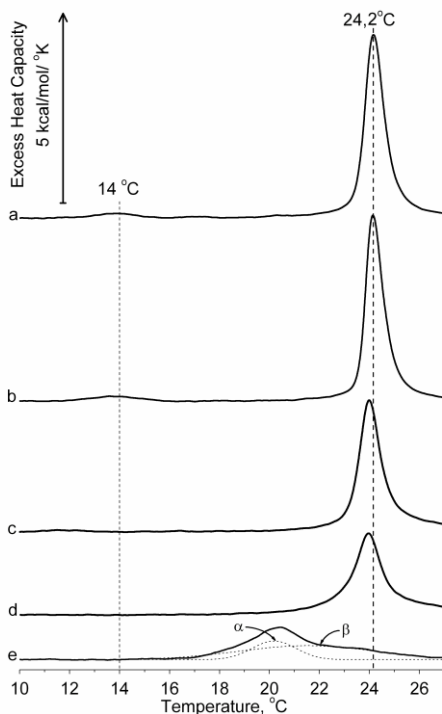


Рис. 1. Термограммы плавления липидов в липосомах из ДМФХ 0,2 мг/мл ($2,95 \cdot 10^{-4}$ М) в присутствии флавоноидов ($4 \cdot 10^{-5}$ М).

Флавоноиды, добавленные к липосомам в соотношении флавоноид:липид = 1:10 в различной степени способны влиять на процесс плавления липида. Так, катехин в указанной концентрации, оказывал незначительное влияние на плавление липидов (термограмма на рис. 2b). Большие изменения формы кривой плавления наблюдались при действии таких же количеств таксифолина, кверцетина и, особенно, флоретина (рис.1 с – e). Увеличивались ширина переходов и произошел сдвиг максимума

переходов в область более низких температур. Так, в присутствии катехина, таксифолина и кверцетина сдвиг положения максимума переходов составлял менее одного градуса, но происходило существенное уменьшение высоты пика кривых. Наибольшие изменения наблюдаются в присутствии флоретина, который сдвигал положение температуры максимума перехода приблизительно на 4 градуса в низкотемпературную область, значительно увеличивал ширину и уменьшал высоту перехода (рис.1 е).

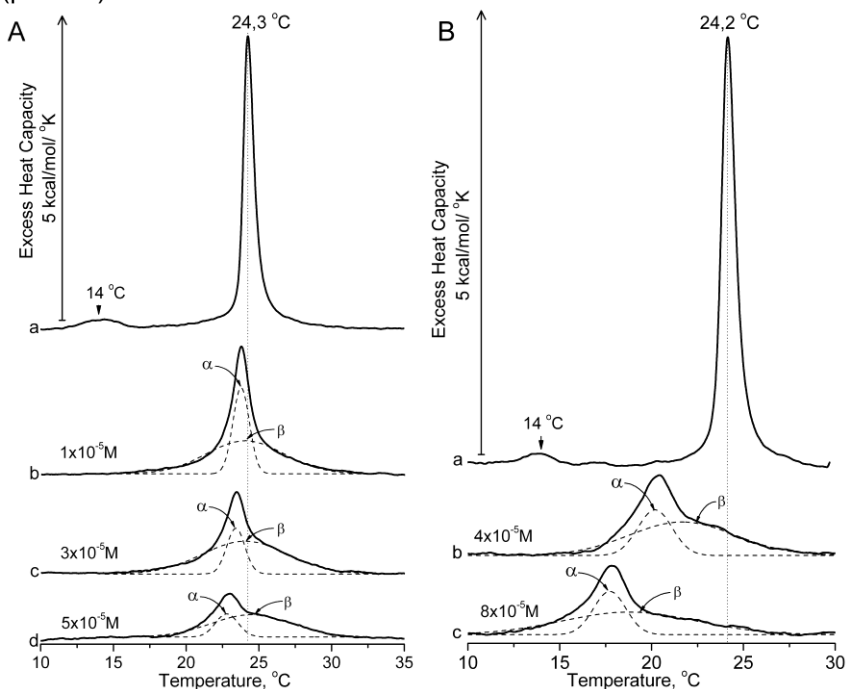


Рис. 2. Сравнение действия кверцетина (А) и флоретина (В) на фазовые переходы в липидах ДМФХ. Концентрация липида - 0,2 мг/мл ($2,95 \times 10^{-4}$ M). Концентрация флавоноидов указана на рисунке. Показана деконволюция термограмм b – d на две кривые Гаусса. Сумма кривых Гаусса хорошо совпадает с исходной кривой термограммы ($R > 0,995$)

Более детально различия в действии кверцетина и флоретина можно наблюдать при действии возрастающих концентраций этих флавоноидов на липосомы из ДМФХ (рис. 2). При этом термограммы приобретают сложную форму, которую можно анализировать путем деконволюции на две кривые Гаусса. Под действием кверцетина наблюдается сильное снижение высоты

компоненты α главного фазового перехода липида. При этом положение максимума компоненты α снижается на 1,5 град. Появляется также широкая компонента β . Примечательно, что параметры компоненты β мало зависели от концентрации кверцетина. При увеличении концентрации кверцетина происходило, прежде всего, снижение высоты термограмм.

Под действием флоретина происходило не только снижение высоты и увеличение фазового перехода, но, прежде всего, наблюдался сдвиг максимума на несколько градусов в область более низких температур. При увеличении концентрации флоретина сдвиг в низкотемпературную область увеличивался, а форма кривых не менялась. Как и при действии кверцетина термограммы содержали две компоненты, которые можно было разделить посредством деконволюции на две кривые Гаусса.

При всех указанных концентрациях флавоноидов наблюдалось также исчезновение предперехода, который наблюдается при 14 – 15 °С. Известно, что в области температур, находящихся между предпереходом и главным фазовым переходом липосомы из фосфатидилхолина образуют периодическую волнистую структуру, называемую риппл-фазой. Ранее нами было показано на примере действия таксифолина, что исчезновение предперехода на термограмме сопровождалось также исчезновением риппл-фазы в бислое из ДМФХ /4/.

Фосфатидилэтаноламины обычно имеют два термотропных фазовых перехода. Так, пальмитоил-фосфатидилэтаноламин (ПОФЭ) имеет главный фазовый переход приблизительно при 25 °С (рис. 3 а). При этой температуре, как и в случае ДМФХ, происходит плавление углеводородных цепей липидов. При температуре около 70 °С наблюдается еще одна область избыточного теплопоглощения липида, которая сопровождается переходом из бислойной структуры в гексагональную Н_{II} фазу (наиболее распространенная небислойная структура), в которой липид образует пучки инвертированных трубочек, имеющих на поперечном срезе гексагональную упаковку. Форма кривой плавления этого липида может зависеть от температурного режима хранения препарата липосом перед сканированием на калориметре, максимум перехода, наблюдающийся при 71,3 °С в первом прогреве препарата, сдвигался к 69,4 °С при последующих процессах сканирования, что возможно связано с медленными процессами гидратации липида после приготовления липосом. Поэтому мы представляем термограммы вторых сканов суспензии липосом (рис. 3).

Действие флавоноидов на процесс плавления ПОФЭ,

происходящий в температурном интервале около 25 °С (рис.3), обнаруживает некоторое сходство с процессом плавления липидов в липосомах из ДМФХ, представленном нами выше. Так, катехин оказывал наименьшее влияние на характеристики термограммы, тогда как таксифолин и кверцетин более существенно подавляли высоту перехода α , а также в различной степени сдвигали максимумы переходов α и β в сторону более низких температур. Наибольшее влияние оказывал флоретин, который сильно снижал высоту пика и увеличивал ширину перехода. Деконволюция этой сложной кривой требовала использования трех кривых Гаусса: α , β и γ .

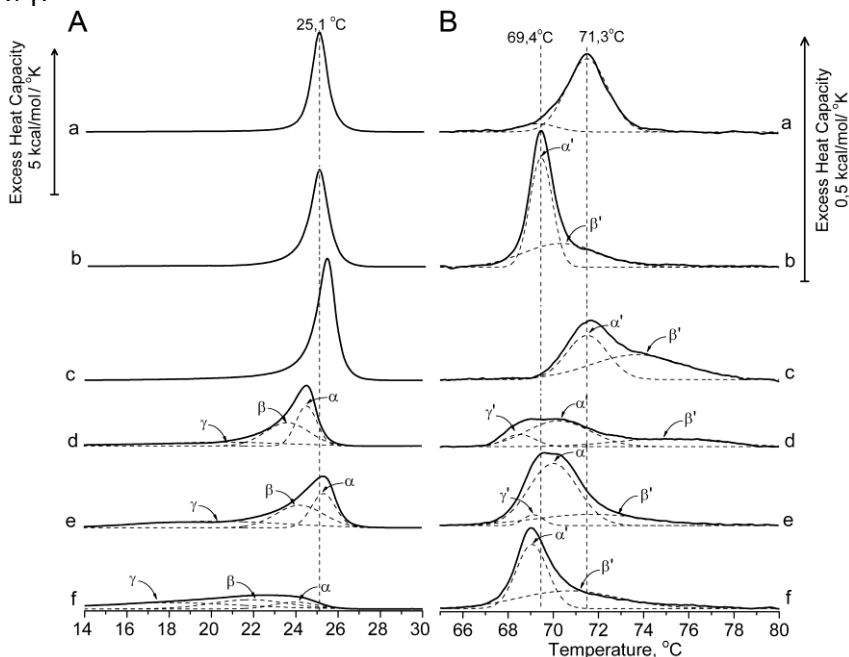


Рис. 3. Термограммы плавления липосом из ПОФЭ (2 мг/мл или $2,95 \cdot 10^{-3} \text{M}$) в присутствии флавоноидов ($4 \cdot 10^{-4} \text{M}$). Даны два температурных диапазона, в которых наблюдаются фазовые переходы (А и В).

Действие флавоноидов на переход из бислоя в гексагональную H_{II} фазу, происходящий при температуре около 69 °С, существенно отличалось от того, что мы наблюдали в температурной области плавления этого липида. Здесь флоретин оказывал наименьшее влияние на плавление липида (термограмма

Зс, панель А).

Исходные липосомы (первое сканирование) – а, тех же липосом (второе сканирование) – b, вторые сканирования липосом с добавленными флавоноидами: катехином – с, кверцетином – d, таксифолином – е, флоретином – f. Пунктирной линией проведены кривые Гаусса, полученные путем деконволюции термограмм. Сумма кривых Гаусса совпадает с исходными термограммами ($R > 0,995$). Шкалы правой и левой панелей отличаются.

Для большей наглядности мы разделили сложную кривую этого перехода на две составляющие кривые Гаусса α' и β' . Действие флоретина заключалось только в значительном снижении высоты, а также некотором сдвиге и уширении перехода α . При этом сдвиг температуры максимума перехода был менее 1 градуса. Напротив, действие катехина было более существенным, поскольку, кроме снижения высоты перехода, наблюдался сдвиг положения максимумов α и β на несколько градусов в область более высоких температур. Таксифолин и кверцетин также существенно изменяли форму термограммы, вследствие чего, для ее деконволюции требовалось использовать три кривых Гаусса: α' , β' и γ' .

Таким образом, в представленной работе показано, что растительные полифенольные соединения различным образом влияют на фазовые переходы липидов. Так, флавоноиды: кверцетин, таксифолин и катехин снижают температуру плавления ДМФХ и ПОФЭ, в нормальном состоянии для которых характерна температура 24 – 25 °С, в меньшей степени, чем дигидрохалкон — флоретин. Только катехин сильнее остальных исследованных полифенолов, повышает температуру перехода ПОФЭ из бислоя в гексагональную H_{II} фазу, наблюдающуюся для этого липида при 69 °С. Флавоноиды также способны инициировать гетерогенность фосфолипидного бислоя в липосомах и способствовать возникновению доменов в мембранах клеток. Полученные нами данные об изменении формы и температуры кривых плавления липидов после добавления растительных полифенолов свидетельствуют о том, что эти агенты могут влиять на фазовое поведение липидов и их способность образовывать домены, среди которых наиболее известными являются липидные рафты /4/.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bisht, K., K. H. Wagner, and A. C. Bulmer, 2010, Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds: Toxicology, v. 278, no. 1, p. 88-100.
2. Nishiumi et al., 2011 Nishiumi, S., S. Miyamoto, K. Kawabata, K. Ohnishi, R. Mukai, A. Murakami, H. Ashida, and J. Terao, 2011, Dietary flavonoids

-
- as cancer-preventive and therapeutic biofactors: Front Biosci.(Schol.Ed), v. 3, p. 1332-1362.
3. Hendrich, A. B., 2006, Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds: Acta Pharmacol.Sin., v. 27, no. 1, p. 27-40.
 4. Tarahovsky, Y. S., E. N. Muzafarov, and Y. A. Kim, 2008c, Rafts making and rafts braking: how plant flavonoids may control membrane heterogeneity: Mol.Cell Biochem., v. 314, no. 1-2, p. 65-71.
 5. Barcelo, F., J. Prades, J. A. Encinar, S. S. Funari, O. Vogler, J. M. Gonzalez-Ros, and P. V. Escriba, 2007b, Interaction of the C-terminal region of the Ggamma protein with model membranes: Biophys.J., v. 93, no. 7, p. 2530-2541.
-

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ МЕТОДОМ ВЭЖХ С АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

Яшин А.Я., Яшин Я.И.

НТЦ «Хроматография», ОАО НПО «Химвтоматика», Москва, Россия, e-mail: yashinchrom@mail.ru

Интерес к полифенолам, особенно к природным полифенолам – антиоксидантам сильно возрос в последнее десятилетие.

Самыми сильными антиоксидантами являются флавоноиды и фенольные кислоты. В настоящее время идентифицировано более 8 тысяч флавоноидов в разных растениях. Фенольные кислоты – это в основном производные бензойной, коричной и хлорогеновых кислот.

Для разделения флавоноидов и ароматических фенольных кислот чаще всего применяется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для детектирования используют следующие детекторы: УФ, масс-спектрометрические и амперометрические.

Амперометрический детектор (АД) идеален для определения полифенолов, т.к. обладает высокой чувствительностью и селективностью. В окислительном режиме при постоянном потенциале от гидроксильной группы, присоединенной к ароматическому кольцу, легко отделяется H^+ и свободный электрон, что приводит к росту электрического тока. Предел детектирования может достигать 10^{-9} – 10^{-12} г (нано, пикограммов), при этом АД будет определять в сложной смеси только соединения, имеющие гидроксильные группы в бензольном

кольце, т.е. полифенолы-антиоксиданты. Определены пределы детектирования наиболее известных флавоноидов, фенольных ароматических кислот, исследована связь пределов детектирования со структурой полифенолов. Нами выбраны оптимальные условия разделения и разработаны методики или методические рекомендации определения полифенолов – антиоксидантов в чае, кофе, какао, винах, коньяках, некоторых лекарственных травах, в злаках. Следует особо выделить полное разделение и определение катехинов в зеленом чае, транс- и цис-ресвератролов в красных, розовых и белых винах, сиреневого и ванилинового альдегидов в коньяках, фенольных кислот в злаках, хлорогеновых кислот в кофе, серотонина в облепихе и др.

В докладе будут продемонстрированы и другие важные применения ВЭЖХ с амперометрическим детектором (жидкостного хроматографа ЦветЯуза) для определения полифенолов-антиоксидантов в растительном сырье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яшин А.Я. Амперометрическое детектирование в ВЭЖХ и Проточно-инжекционных системах. Зав.Лаб. 2012, №2. с.
2. А.Я.Яшин, Я.И.Яшин. ВЭЖХ антиоксидантов. Антиоксиданты в профилактике опасных болезней и старения. В книге «Хроматография на благо России». Под редакцией А.А.Курганова, «Граница», Москва, 2007, с. 421-452.

РАЗДЕЛ 2.
УЧАСТИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЖИЗНИ
РАСТЕНИЙ

ECOLOGICAL ROLES OF LICHEN SECONDARY METABOLITES

Beckett R.P.¹, Minibayeva F.V.²

¹School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, South Africa, +27332605141, rpbeckett@gmail.com; ²Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia, +7(843)2319045, fminibayeva@gmail.com

Lichens are a symbiosis between an acomycete fungus and one or two photosynthetic partners, which can be cyanobacterial and/or green algae. Lichens produce a diverse range of phenolic secondary metabolites or “lichen substances” that usually accumulate on the outer surfaces of the hyphae. The first reports of lichen substances date back to the 19th century, and since then about 1050 different secondary metabolites have been identified. In addition to their role in chemotaxonomy and systematics, lichen secondary compounds probably play many different biological roles. These include acting as sun-screens, anti-grazing agents, anti-fungal or antibacterial chemicals, allelochemicals, and antioxidants. These compounds also appear to be important in metal homeostasis and the pollution tolerance of lichen thalli. The range of bioactivities identified to date suggest that further research that eventually may result in the commercial production and exploitation of pharmaceutically interesting lichen substances.

VARIATION OF FLAVONOID AND COUMARINS CONTENT IN TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM CULTIVATED IN FINLAND

Kosman V.M.¹, Faustova N.M.¹, Shikov A.N.¹, Pozharitskaya O.N.¹, Makarov V.G.¹, Galambosi B.²

¹Saint-Petersburg Institute of Pharmacy, St-Petersburg, Russia, +7-812-322-56-05, kosmanvm@mail.ru; ²MTT Agrifood Research Finland, Mikkeli, Finland

The annual fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) is well known useful plants from the *Fabaceae* family. The aerial part of *T. foenum-graecum* contain approximately 4-8% of saponins, phenolic compounds and about 1% of alkaloids, contributing to bitterness, gastric stimulation, increased acidity, and increased appetite. The plant is known as anti-inflammatory, immunomodulatory, analgesic,

chemoprotective herb and may be used in complementary therapy of cancer patients. Efficacy of fenugreek as a hypoglycemic and anti-diabetic herb has been proven in clinic.

In our preliminary experiment, anticoagulant properties for *T. foenum-graecum* leaves have been demonstrated [1]. Pharmacological activity of aerial part of these plants may be associated with flavonoids and coumarins.

Table 1.
Characteristics of *T. foenum-graecum* plant samples.

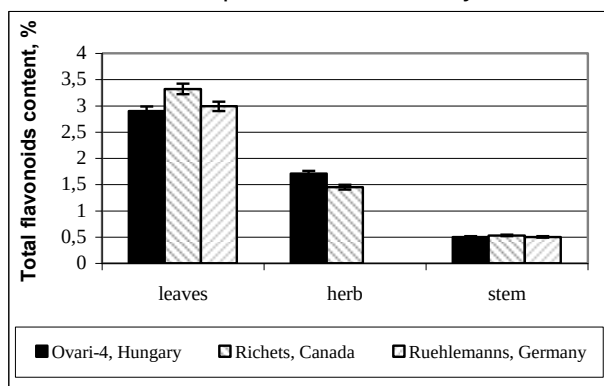
Sample	Variety/Origin	Time of harvest	Part of the plant	Loss on drying, %
1	'Aduki', Finland	I harvest – 28.07.2006	Leaves	15.2±0.4
			Herb	16.2±0.5
			Stem	13.7±0.3
		II harvest - 29.08.2006	Leaves	15.4±0.1
2	'Ovari-4', Hungary	I harvest – 28.07.2006	Leaves	17.2±0.2
			Herb	15.5±0.1
			Stem	14.1±0.1
		II harvest – 29.08.2006	Leaves	14.8±0.1
3	'Richters', Canada	I harvest – 28.07.2006	Leaves	15.7±0.1
			Stem	14.9±0.1
		II harvest – 29.08.2006	Leaves	14.9±0.1
4	'Ruehlemanns', Germany	I harvest – 28.07.2006	Leaves	16.7±0.1
		II harvest – 29.08.2006	Leaves	15.0±0.1
5	'Italia 12/78'	I harvest – 28.07.2006	Leaves	13.8±0.4
6	'Italia 13/99'	I harvest – 28.07.2006	Leaves	15.0±0.1
7	'Italia 85/98'	I harvest – 28.07.2006	Leaves	15.4±0.1
8	'Tunisia 102/02'	I harvest – 28.07.2006	Leaves	15.3±0.1
9	'Tunisia 112/98'	I harvest – 28.07.2006	Leaves	14.6±0.1
10	'Libya 56/02'	I harvest – 28.07.2006	Leaves	14.7±0.3
11	'Ethiopia 20/84'	I harvest – 28.07.2006	Leaves	15.7±0.1
12	'Egypt 35/79'	I harvest – 28.07.2006	Leaves	15.8±0.1
13	'Uzbekistan 113/99'	I harvest – 28.07.2006	Leaves	16.0±0.1
14	'Unknown 106/95'	I harvest – 28.07.2006	Leaves	12.0±0.1

It is known that accumulation of biologically active compounds depends on the variety and the cultivation conditions of plants. The aim of present study was comparison of quality of *T. foenum-graecum* plant material from different varieties, which have been cultivated in Finland (Mikkeli) during 2006.

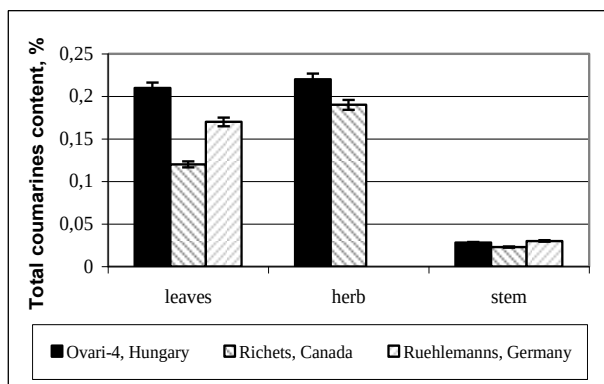
Seeds of four varieties of *T. foenum-graecum* were obtained

from commercial sources and 10 accessions were obtained from the Geenebank Gatersleben, Germany. Plant samples were collected by MTT Agrifood Research Finland, Mikkeli.

The aerial parts of fenugreek were harvested twice in 2006. The samples were dried up at 40C° in an air-forced dryer. After separation of leaves and stems the dry leaves were packed into paper packets and stored at room temperature before analysis.



A



B

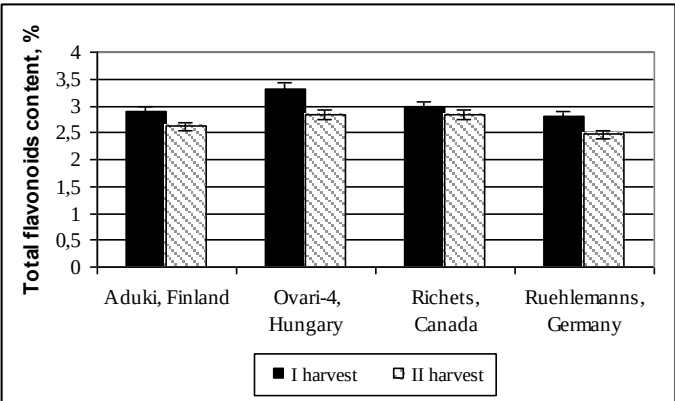
Fig. 1. Diagrams of total flavonoids (A) and total coumarines (B) content in different parts of *T. foenum-graecum* plant material samples.

Plant material samples were ground in a coffee-grinding machine. Loss on drying was determined gravimetrically [2]. The total flavonoid content was estimated as rutin equivalents [mg rutin/g raw material] according to the method described in a USSR State Pharmacopoeia [2]. The total coumarins content was estimated as

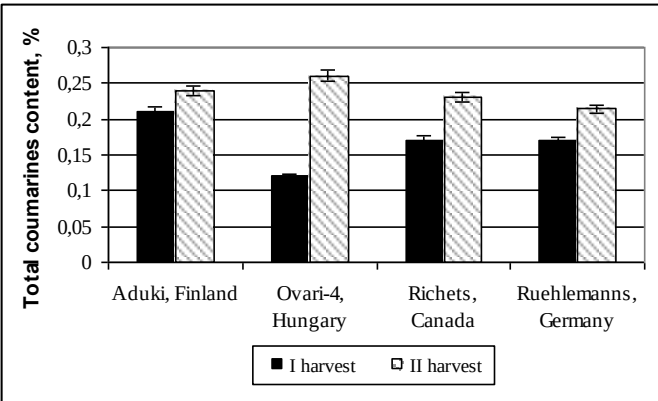
coumarin equivalents [g coumarin/g raw plant material (dry weight)] according to the method described [3]. Rutin (95%) and coumarin (99%) were purchased from Sigma (Steinheim, Germany).

The data were presented as mean values $\pm$ standard deviation.

In Table 1 some characteristics of all samples are listed: variety, time of the harvest and loss on drying. The last parameter ranged approximately from 12 to 17%. All samples had satisfactory appearance, corresponded to morphological attributes of a plant.



A



B

Fig. 2. Diagrams of total flavonoids (A) and total coumarines (B) content in *T. foenum-graecum* different varieties leaves samples of harvest I and II

The total coumarins and flavonoids contents in different parts of the plant (herb, leaves and stem) are shown in Fig. 1.

The higher concentration of flavonoids were observed in leaves,

concentration of flavonoids in herbs were lower in about 1.5-2 times, in stems samples in about 6 times. The higher concentration of coumarins were observed in leaves and herbs. In stems it was lower in about 5-10 times. Thus, it is estimated that leaves are the best quality plant material.

Total flavonoids content for *T. foenum-graecum* leaves samples was higher in harvest I, total coumarins content was higher in harvest II (Fig. 2).

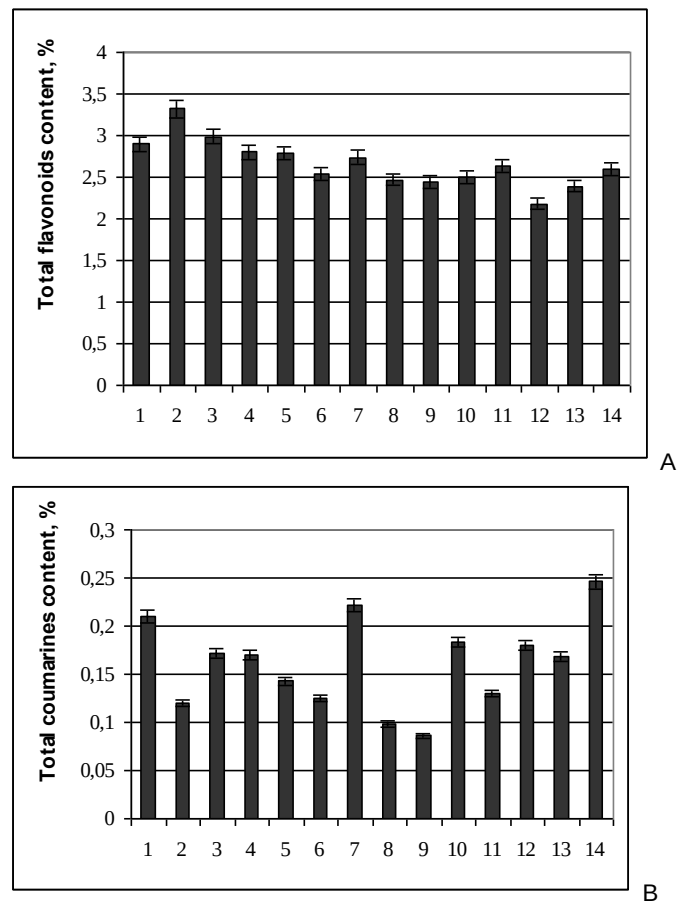


Fig. 3. Diagrams of total flavonoids (A) and total coumarins (B) content in *T. foenum-graecum* different varieties leaves samples for I harvest (Number of the sample according to the Table 1)

The difference in flavonoids content was not very significant: 2.90-3.32% in harvest I and 2.47-2.83% in harvest II, but concentration of flavonoids in second harvest was lower. The difference on coumarins content between varieties was more significant in first harvest (0.12-0.21%) and insignificant after harvest II (0.23-0.26%). Coumarins were accumulated on laret stage of vegetation while level of flavonoids was not charged significantly. It was shown that it is possible to harvest fenugreek twice per season for collecting of plant material with high concentration of flavonoids. In case of extraction of coumarins it is recommended to harvest fenugreek in August.

Content of main groups of biologically active compounds for the leaves samples from different varieties of fenugreek in harvest I were analyzed (Fig. 3). The range of total flavonoids content in leaves samples in harvest I was 2.44-3.32%; the maximum values (3.32-2.90%) were determined in samples 2, 3 and 1 ('Ovari-4', 'Richters', 'Aduki'); the minimum (2.44-2.47%) in samples 9 and 8 ('Tunisia 112/98' and 'Tunisia 102/02'). Range of total coumarins content in leaves samples in harvest I was 0.086-0.22%; the maximum values (0.22-0.18%) were determined in samples 7, 1 and 10 ('Italia 85/98'; 'Aduki', 'Libya 56/02'); the minimum (0.086-0.098%) in samples 9 and 8 ('Tunisia 112/98' and 'Tunisia 102/02'). Thus, the best quality of plant material was obtained from variety 'Aduki', Finland.

In this experiment we have selected the varieties of *T. foenum-graecum* that give the best quality of the plant material cultivated in Finland. The accumulation of biologically active substances during a season of cultivation was studied and optimum harvest times of raw material were found. The higher amount of flavonoids and coumarins in *T. foenum-graecum* were observed in leaves.

The study was supported by the regional Council of South Karelia, Interreg III A South-East Finland - Russia program (project "Development of herb processing in South-East Finland (YKE)).

REFERENCES

1. Kosman V.M., Melikhova M.V., Galambosi B., Ryzhenkov V.E., Makarov V.G. (2006) Anticoagulant activity of some medical plants. In: Proceedings of 10-th International Congress "Phytopharm 2006". St.-Petersburg, Russia, pp 463-469
2. State Pharmacopoeia of USSR, 11 edn, vol 1 (1987) Medizina, Moscow.
3. Chemesova I.I., Chubarova S.L., Sakanyan E.I., Kotovskii B.K., Chizhikov D.V. (2000) Spectrophotometric method for polyphenols quantification in dry extract from *Melilotus officinalis* (L.) Pall. aerial parts. *Rastitelnye resursy* 36: 86-91

WALNUT TREES DURING SOIL HYPOXIA AND INVOLVEMENT OF PHENOLIC COMPOUNDS AS STRESS FACTOR AND TREE RESISTANCE

Mapelli S., Bertani A.

Institute of Agricultural Biology and Biotechnology, CNR, Milan, Italy,
mapelli@ibba.cnr.it

Polyphenol contents gave indication of possible their utilisation for identification of tree genotypes (Jay-Allemand and Drouet, 1989). The major polyphenol in walnut trees is the naphthoquinone juglone and its biochemical related compounds. Juglone is well known for its inhibitory effect in many plants (Hejl *et al.*, 1993, Li *et al.*, 1993).

Walnut trees have been shown to be very sensitive to stress environmental condition especially to soil hypoxia consequence to soil waterlogging. Different walnut genotypes have shown different degree of resistance, from few days to weeks. The aim of this study has been to detect the presence of polyphenols and to correlate their presence with different tolerance to waterlogging stress shown by different walnut genotypes.

MATERIAL AND METHODS

Two-three years old walnut trees, *Juglans regia*, *J. nigra* and interspecific hybrids, grown in pots were subjected to waterlogging in summer at full leaves expansion, with water two-three cm above the soil level.

Net photosynthetic rate, transpiration rate, stomatal conductivity were measured with an open system LCA3 (ADC, England). Measurements were made daily, during the period of water treatment and the week later, to follow the plants recovery.

Leaflets collected at different length of stress treatment were used for analysis of polyphenols. Polyphenols were extracted from freeze-dried leaves in acetone during 30 min by sonication, and after partial purification analysed by mean of HPLC using procedure previously described (Jay-Allemand *et al.*, 1988).

RESULTS AND DISCUSSION

Comparing different walnut genotypes is possible to have indication of different resistance capacity to root anaerobiosis. In *J. regia* trees, when flooded, the CO₂ assimilation rapidly decreased and after 3-4 days of flooding the plants did not recover the photosynthetic capacity when transferred to drain conditions. When interspecific hybrid (*J. nigra* x *J. regia*) were subjected to waterlogging a higher resistance capacity

was observed. Also in these plants a decrease of CO₂ assimilation was recorded but after 13 days of treatment leaves were again green and plants recovered to normal photosynthesis level when drained. *J. nigra* when waterlogged reduced the net photosynthetic rate but they maintain leaves without damages and the capacity to recovered CO₂ assimilation to the control plant level.

The analyses of polyphenols in leaves showed a modification of the pattern of such compounds during the stress. The plants less tolerant to hypoxia have higher content of polyphenol distributed in a lot of compounds as separated by HPLC. Trees more tolerant, *J. nigra*, showed a very simple HPLC pattern. All leaf samples contained juglone, more in less tolerant species. Hydrojuglone glucoside was detectable in all genotypes, but it was only in trace or low quantity in leaves of tolerant plants and it increased in sample from trees with increased resistance to hypoxia and decrease in *J. regia*.

The data show the higher resistance for *J. nigra* and hybrid trees. Less waterlogged tolerant *J. regia* genotypes have higher total polyphenol and juglone content in leaves, the later decreases during stress condition. In *J. nigra* and hybrid trees the glucosilation of juglone could be a mechanism of detoxification of juglone during the hypoxia stress. In walnut polyphenol compounds have been reported to be associated to rejuvenation and clonal variability (Jay-Allemand and Drouet, 1989). Polyphenol components should take more attention in the future investigations on responses to stresses and to identify more resistant genotypes and the relationship to phenological stages or genetic background.

REFERENCES

1. Hejl, A.M., Einhelling, F.A. and Rasmussen, J.A., Effects of juglone on growth, photosynthesis and respiration. *J. Chem. Ecol.* 1993, vol. 19, pp. 559-568.
2. Jay-Allemand, C., Cornu, D. and Macheix, J.J., Biochemical attributes associated with rejuvenation of walnut tree. *Plant Physiol. Biochem.* 1988, vol. 26, pp. 139-144.
3. Jay-Allemand, C. and Drouet, A., Polyphenole und Enzyme als biochemische Verjuüngung bei Walnuß. *Erwerbsotsbau* 1989, vol. 31, pp. 63-69.
4. Li, H-H., Nishimura, H., Hasegawa, K. and Mizutani J., Some physiological effects and the possible mechanism of action of juglone in plants. *Weed Res.* 1993, vol. 38, pp. 214-222.

УДК: 581.1

ВЛИЯНИЕ CuSO_4 НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОЛИНА В ПРОРОСТКАХ ОГУРЦА, ПРЕАДАПТИРОВАННЫХ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

Абилова Г.А.

Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия, 8-8722-636884 gulyaraabilova@mail.ru

Тяжелые металлы (ТМ), накапливающиеся в растениях в высоких концентрациях, инициируют развитие окислительного стресса. Подавление активности ферментов антиоксидантной защиты активными формами кислорода делают невозможным эффективное поддержание окислительного баланса в клетках растений. При этом функцию антиоксидантной защиты принимают на себя низкомолекулярные метаболиты-антиоксиданты, в том числе пролин и салициловая кислота (СК). Повышение уровня пролина в растениях наблюдается при действии многих стрессовых факторов: ТМ (Шевякова и др., 2003), ультрафиолета (Радюкина и др., 2008), пониженной температуры (Шиленков и др., 2008) и др. Противодействие накоплению в клетках АФК пролин осуществляет путем «тушения» синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) и гидроксил радикала ($\text{OH}^\cdot$), образующихся в первые часы действия стрессора (Smirnoff, 1998). Являясь важным компонентом сигнальной системы и эндогенным регулятором роста, СК обеспечивает защиту растительных организмов в условиях окислительного стресса.

Функциональная взаимосвязь пролина и СК в растительных объектах при токсической нагрузке ТМ изучена недостаточно. В этой связи целью наших исследований было изучение влияния СК на интенсивность образования пролина в условиях засоления среды растворами CuSO_4 .

Объектом исследования служили проростки огурца (*Cucumis sativus* L) сорта «Феникс», выращенные в условиях лаборатории при поливе дистиллированной водой (контроль) и раствором СК (0,5мМ и 1,0мМ) в течение 12 суток. Затем контрольные и опытные образцы переносили в растворы CuSO_4 (10^{-5} - 10^{-3} М) на 24 часа. Содержание пролина определяли в семядольных листьях, гипокотильях и корнях. Показано, что при выращивании проростков на дистиллированной воде наибольшее образование пролина наблюдается в семядольных листьях (табл.1) В присутствии CuSO_4 (10^{-3} М) содержание пролина в корнях и

гипокотиллях снижается в 2,1 раза и 1,7 раза соответственно. Экзогенное воздействие СК оказывает модулирующее действие на содержание пролина в семядольных листьях и гипокотиллях и увеличивает на 38% его содержание в корнях. В условиях солевого стресса, вызванного CuSO_4 (10^{-3}M) после предварительного культивирования проростков в среде, содержащей СК (1 мМ), уровень пролина снижается во всех структурах проростка огурца. Это свидетельствует о негативном влиянии сочетанного действия CuSO_4 и СК, что подтверждается снижением массы и недоразвитием корневой системы проростков.

Таблица 1

Влияние CuSO_4 (10^{-3}M) на содержание пролина (мкМ/г сырой массы) в разных структурах проростков огурца ($M \pm m$, $n=4$)

Варианты опыта	Дистиллированная вода		1мМ СК	
	дист. вода	CuSO_4	дист вода	CuSO_4
Семядольные листья	$6,17 \pm 0,36$	$5,40 \pm 0,16$	$5,20 \pm 0,80$	$3,85 \pm 0,70^*$
Гипокотили	$1,49 \pm 0,04$	$0,87 \pm 0,01^*$	$1,47 \pm 0,15$	$0,68 \pm 0,09^*$
Корни	$0,79 \pm 0,03$	$0,38 \pm 0,03^*$	$1,09 \pm 0,01^*$	$0,44 \pm 0,04^*$

Примечание к таблицам 1 и 2: Уровень значимости различий $P < 0,05$

Учитывая возможную токсичность высоких концентраций CuSO_4 и СК, в последующих опытах были использованы растворы СК с концентрацией 0,5 мМ (табл.2). Показано, что при концентрации CuSO_4 10^{-5}M у проростков, выращенных на дистиллированной воде, содержание пролина достоверно снизилось на 19%, при концентрации CuSO_4 10^{-4}M содержание пролина не изменилось по сравнению с контролем. Это подтверждает данные о том, что медь является эссенциальным тяжелым металлом, который в следовых количествах необходим для метаболизма, роста и развития растений. Накопление пролина имеет место при солевой нагрузке CuSO_4 в концентрации 10^{-3}M , что очевидно является результатом стресса. Предварительное культивирование проростков в среде, содержащей СК, усиливает адаптационный потенциал проростков, повышая содержание пролина при всех концентрациях CuSO_4 .

С целью исключить влияние корневой системы на способность надземных органов к аккумуляции растениями ТМ изучали влияние CuSO_4 на накопление пролина изолированными семядольными листьями. Обнаружено, что при концентрации CuSO_4

10^{-3} М имеет место накопление пролина (в отличие от концентрации 10^{-5} М). Использование при поливе проростков огурца раствора СК (0,5мМ) способствовало накоплению пролина при всех концентрациях CuSO_4 .

Таблица 2

Влияние CuSO_4 на содержание пролина (мкМоль/г сырой массы) в семядольных листьях 12-дневных проростков огурца сорта «Феникс» ($M \pm m$, $n=4$)

Варианты опытов	Условия опыта			
	Дистиллированная вода	Концентрация CuSO_4		
		10^{-5} М	10^{-4} М	10^{-3} М
<u>Семядольные листья</u> Дистил. вода СК 0,5 мМ	4,79 $\pm$ 0,21 4,83 $\pm$ 0,23	3,86 $\pm$ 0,10* 4,52 $\pm$ 0,19	4,37 $\pm$ 0,15 4,97 $\pm$ 0,42	5,46 $\pm$ 0,11* 5,65 $\pm$ 0,35
<u>Изолированные семядольные листья</u> Дистил. вода СК 0,5 мМ	2,77 $\pm$ 0,16 3,05 $\pm$ 0,60	2,16 $\pm$ 0,04* 3,38 $\pm$ 0,15	2,48 $\pm$ 0,15 5,50 $\pm$ 0,22*	3,94 $\pm$ 0,18* 7,72 $\pm$ 0,15*

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что образование пролина при солевой нагрузке зависит от концентрации СК. Концентрация СК 1 мМ оказалась критической, так как в этих условиях резко снизился уровень эндогенного пролина в гипокотиле и корнях. Потеря тургора в семядольных листьях и гипокотиле проростков, значительное уменьшение массы корня, а также достоверное снижение аккумуляции пролина свидетельствуют о неспособности проростков адаптироваться к тяжелым металлам. Концентрация СК 0,5 мМ вызывала стойкое увеличение содержания пролина в семядольных листьях проростков при действии CuSO_4 в диапазоне концентраций 10^{-5} - 10^{-3} М. В опыте с изолированными семядольными листьями, где исключено влияние корневой системы на распределение CuSO_4 , пролина образуется значительно больше.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бакулина Е.А. Исследование антиоксидантной роли пролина у галофитов и участия АФК в регуляции его биосинтеза: Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва, 2010, 28 с.
2. Шиленков А.В., Мазей И.Г., Нефедьева Е.Г., Хрянин В.Н. Содержание пролина в прорастающих семенах гречихи и их качество при действии

-
- импульсного давления и пониженных температур // Сельскохозяйственная биология, 2008, №5, С.70-77
3. Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Макарова С.С., Кузнецов В.В. Эндогенный пролин модифицирует дифференциальную экспрессию генов супероксиддисмутазы в растениях шалфея при UV-B облучении // Физиология растений, 2011, Т.58.№1. С.49-57
 4. Рахманкулова З.Ф., Федяев В.В., Рахматуллина С.Р., Иванов С.П., Гильванова И.Р., Усманов И.Ю. Влияние предпосевной обработки семян пшеницы салициловой кислотой на ее эндогенное содержание, активность дыхательных путей и антиоксидантный баланс растений // Физиология растений, 2010, т.57, №6, С.835-840
 5. Smirnoff N. Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes // Phytochemistry. 1989. V.28. P.1057-1060
-

УДК 633.11.581.1

УЧАСТИЕ ФЕНОЛОВ В РЕГУЛЯЦИИ ТЕМПОВ РАЗВИТИЯ ИЗОГЕННЫХ ПО ГЕНАМ *VRN* ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ *TRITICUM AESTIVUM* L.

Авксентьева О.А., Жмурко В.В.

Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина,
биологический факультет, кафедра физиологии и биохимии растений,
Харьков, Украина, e-mail: avksentyeva@univer.kharkov.ua

Фенольные соединения - класс самых распространенных веществ вторичного метаболизма растений, проявляют высокую биологическую активность, их функции в растениях очень разнообразны и все еще далеко до конца не расшифрованы [1]. Известно, что фенолы, также как и фитогормоны, принимают участие в регуляции процессов роста, развития и цветения растений [2]. Общепринятой считается точка зрения, согласно которой, фенолы рассматриваются как ингибиторы ростовых процессов [1]. Ферменты, участвующие в метаболизме фенольных соединений: пероксидаза (ПО) и полифенолоксидаза (ПФО), также задействованы и в катаболизме основного ростстимулирующего фитогормона – индолилуксусной кислоты (ИУК) [3]. Следовательно, фенолы, с одной стороны, могут непосредственно влиять на регуляцию цветения растений как биологически активные вещества, и с другой стороны, могут оказывать опосредованное влияние на эти процессы, регулируя метаболизм ИУК и, тем самым определяя фитогормональный баланс растительного организма.

Скорость и тип развития пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L. зависит от присутствия генов *Vrn* (1-3) в рецессивном или доминантном состоянии [4]. Озимый тип развития детерминирован рецессивным состоянием всех генов *Vrn*, если же в генотипе присутствует хотя бы один из генов *Vrn* в доминантном состоянии, то растения развиваются по яровому пути [5].

В физиологии растений использование почти изогенных линий (NILs) в качестве объектов исследования позволяет наиболее адекватно проводить изучение физиолого-биохимических механизмов регуляции темпов развития. Изогенные линии, как наиболее полно отвечающие правилу единственного различия, имеют минимальные различия по всем признакам кроме маркированных [6]. Поэтому, исходя из результатов исследования, проводимых на почти изогенных линиях, можно сделать вывод о влиянии того или иного гена на процессы, происходящие в растительных организмах. Возможно, что экспрессия генов *Vrn* опосредованно влияет на метаболизм фенолов, что обуславливает разную скорость развития изогенных линий.

Целью данного исследования было изучить эффекты генов *Vrn* на содержание фенолов и ауксинов, а также активность окислительно-восстановительных ферментов, участвующих в их обмене, в листьях изогенных линий пшеницы в период перехода от вегетативного этапа развития к генеративному.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования использовались моногеннодоминантные почти изогенные линии пшеницы по системе генов *Vrn*, созданные в генофоне сорта Ольвия [7]. Изогенные линии были предоставлены для исследования кафедре физиологии и биохимии растений Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина сотрудниками Селекционно-генетического института НААН Украины в рамках договора о сотрудничестве. Растения выращивали в условиях вегетационного опыта в факторостатной камере в почвенной культуре при освещенности 15 кЛк, температурном режиме 20-22 °C/16-18 °C (день/ночь) и 16-часовом фотопериоде. Суммарное содержание фенольных соединений определяли по методу Запрометова [4], содержание свободных ауксинов методом биотестирования с пересчетом по ростконцентрационной кривой, активность пероксидазы (ПО) и полифенолоксидазы (ПФО) по Бояркину, β -ИУКоксидазы (β -ИУКО) – с реактивом Сальковского [4]. Повторность экспериментов биологическая 3-4 краткая, аналитическая – 6 кратная. Результаты обработаны статистически

методом однофакторного дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты фенологических наблюдений показали, что гены *Vrn* детерминируют не только потребность в яровизации, но и скорость темпов развития растений пшеницы. Среди исследуемых изолиний все были представлены яровыми формами, а скорости перехода к генеративному развитию (колошению) можно выделить две группы – быстроразвивающиеся изолинии *Vrn A1a* и *Vrn D1a* и медленноразвивающуюся изолинию *Vrn B1a*.

Исследование суммарного содержания фенольных соединений в листьях опытных растений показали (табл.1), что минимальное их количество обнаружено у растений медленноразвивающейся изолинии *Vrn B1a*, а значительно большее их содержание - в листьях быстроразвивающихся изолиний. Причем у изолинии *Vrn A1a*, которая первой среди быстроразвивающихся линий переходит к колошению, содержание фенолов было максимально. Известно, что фенолы могут выступать в качестве ингибиторов процессов роста, и возможно, изменение их содержания может выступать в качестве маркера перехода растений от одного этапа онтогенеза к другому.

Таблица 1.

Содержание фенолов и ауксинов в листьях изогенных по генам *Vrn* линий пшеницы сорта Ольвия

Генотип изолинии	Сумма фенолов, мг/г сырой массы	Ауксины, мкг/г сухой массы
<i>Vrn A1a B1b D1b</i>	184,6	9,14
<i>Vrn A1b B1a D1b</i>	132,6	11,74
<i>Vrn A1b B1b D1a</i>	169,9	10,02
HCP _{0,5}	2,34	0,09

Сведения о роли ИУК в регуляции перехода к генеративному развитию противоречивы. Результаты исследования содержания свободных ауксинов показали, что их количество максимально в листьях медленноразвивающейся изолинии *Vrn B1a*, а минимально – у быстроразвивающейся изолинии *Vrn A1a*. Таким образом, содержание суммы фенолов и свободных ауксинов в листьях растений пшеницы в период перехода от вегетативного этапа развития к генеративному связано обратно пропорциональной зависимостью. Быстроразвивающиеся изолинии характеризуются максимальным количеством фенолов и минимальным содержанием ауксинов, а медленноразвивающаяся изолиния – наоборот.

Изучение активности оксидаз, принимающих участие в метаболизме фенолов и ауксинов, показало, что в листьях медленноразвивающейся изолинии *Vrn B1a* активность всех исследованных ферментов ПО, ПФО и β -ИУКО всегда минимальна в сравнении с быстроразвивающимися изолиниями (табл.2). У быстроразвивающихся изолиний с яровым типом развития синтез фенолов, по-видимому, осуществляется с участием и пероксидазы и полифенолоксидазы.

Таблица 2.

Активность оксидаз в листьях изогенных по генам *Vrn* линий пшеницы сорта Ольвия

Генотип изолинии	Активность ферментов, Е / сек $\times$ г сырой массы		
	ПО	ПФО	β -ИУКО
<i>Vrn A1a B1b D1b</i>	25,65	14,05	18,90
<i>Vrn A1b B1a D1b</i>	24,04	13,46	13,14
<i>Vrn A1b B1b D1a</i>	25,77	16,23	18,36
НСР _{0,5}	0,10	0,09	0,15

Наивысшая активность этих ферментов коррелирует с максимальным содержанием фенолов.

Активность β -ИУКО – фермента, осуществляющего специфическое расщепление ИУК, также коррелировала с содержанием фитогормона. В листьях быстроразвивающихся изолиний показана максимальная активность фермента и минимальное содержание свободных ауксинов.

Таким образом, при переходе растений мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. от вегетативного развития к генеративному, в листьях изогенных линий происходят противоположные изменения в содержании фенольных соединений и ауксинов, обусловленные изменениями в активности их оксидаз, что может свидетельствовать об антагонистическом физиологическом действии данных соединений в процессах регуляции темпов развития пшеницы. Поскольку данные изменения четко коррелируют с темпами развития изогенных линий, возможно использование таких показателей как суммарное содержание фенолов и активность β -ИУКО в качестве маркера состояния развития растений пшеницы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растений. 56-е Тимирязевское чтение. – М.: Наука, 1996. – 45 с.
2. Беляева Р.Г., Евдокимова Л.И. Изменчивость содержания флавонолов во флоральном морфогенезе растений // Онтогенез. – 2004. – 35, №1. – С.16-22.

-
3. Носов А. М. Вторичный метаболизм // Физиология растений. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – С. 588-620.
 4. Preston Jill C., Kellogg Elizabeth A. Discrete Developmental Roles for Temperate Cereal Grass VERNALIZATION1/FRUITFULL-Like Genes in Flowering Competency and the Transition to Flowering // Plant Physiol. January 2008 146: 265-276.
 5. Trevaskis B. The central role of the VERNALIZATION1 gene in the vernalization response of cereals // Funct. Plant Biol. 2010. V. 37. P. 479–487.
 6. Коваль С. Ф., Коваль В. Н., Шаманин В. С. Изогенные линии пшеницы. – Омск, 2001. – 152 с.
 7. Стельмах А.Ф., Файт В.И., Мартынюк В.Р. Генетические системы типа и контроля скорости развития пшеницы // Цитология и генетика. – 2000. – Т.34, №2. – С.39-45. 1.
 8. Методы определения фитогормонов и фенолов в семенах. – Л.: Наука, 1979. – 120 с.
 9. Методы биохимического анализа растений / Под ред. А.И. Ермакова. – Л.: Агропромиздат, 1989. – 434 с.
-

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ В ЛИСТЬЯХ КАПУСТЫ ПЕКИНСКОЙ НА РАННИХ ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ

Байков А.А., Гинс М.С., Гинс В.К.

Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур, пос. ВНИИССОК, Россия, тел +7(906)7027959, lab308@vniissok.ru

В опытах использовали 1, 6, 15, 20, 25 и 30 суточные растения пекинской капусты (*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.) гибрида Ника F1, которые выращивали в открытом грунте на дерново-подзолистой почве (ВНИИССОК, Одинцовский район, Московская область). Семена капусты пекинской характеризовались высокой энергией прорастания и давали дружные всходы на 3-5 сутки в открытом грунте. Для определения суммарного содержания антиоксидантов использовали амперометрический метод. Измерения проводили на приборе «Цвет-Яуза-01-АА» в постоянно-токовом режиме при потенциале стеклоуглеродного рабочего электрода +1,3 В, что позволило эффективно селектировать фенольные соединения, обладающие высокой восстановительной способностью, а, следовательно,

эффективные как антиоксиданты [1-3].

В процессе роста листовой пластины семядольных листьев капусты пекинской и их старения наблюдали резкое снижение содержания антиоксидантов (АО) в единицах мг. экв. галловой кислоты / г. сырой массы в пятисуточных растениях по сравнению с односуточными (рис. 1). При этом по содержанию АО различие между первым и вторым семядольным листом было не столь значительное. У односуточных растений между семядольными листьями удельное суммарное содержание АО варьировало в широком диапазоне. С увеличением возраста листа снижалась не только удельное содержание АО, но диапазон варьирования этого параметра от образца к образцу.

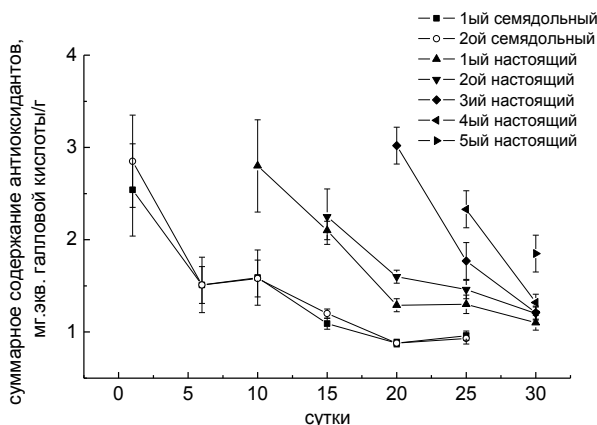


Рис. 1. Динамика удельного суммарного содержания гидрофильных низкомолекулярных антиоксидантов в листьях капусты пекинской гибрида F₁ Ника на ранних этапах развития растений

По мере появления и нарастания настоящих листьев наблюдали более медленное снижение суммарного содержания антиоксидантов в стареющих семядольных листьях и более высокое содержание антиоксидантов в растущих 1 и 2^{ой} настоящих листовых пластинках. Каждый появляющийся более молодой лист с меньшей массой (и соответственно площадью) отличался большим удельным количеством водорастворимых антиоксидантов по сравнению с другими листьями в данный момент, при этом с увеличением возраста листа наблюдалась аналогичная тенденция к снижению удельного содержания АО в стареющем листе. В 25-30

суточных растениях разница между удельным содержанием АО в листьях разного возраста уменьшалась.

Определенный интерес представляет вопрос о том, как распределены антиоксиданты по площади листа – равномерно или они аккумулируются в определенных частях листа. С этой целью листовая пластинка была поделена на три части: верхнюю, среднюю и нижнюю (около черешка) части листа (рис. 2). Определение удельного суммарного содержания антиоксидантов выявило тенденцию снижения этого показателя в зависимости от части листа. В верхней части листа аккумулируется большее количество антиоксидантов.

Зависимость удельного содержания АО в надземной части растения (листья, hypocotyl) от его возраста выражена слабее (рис. 3).

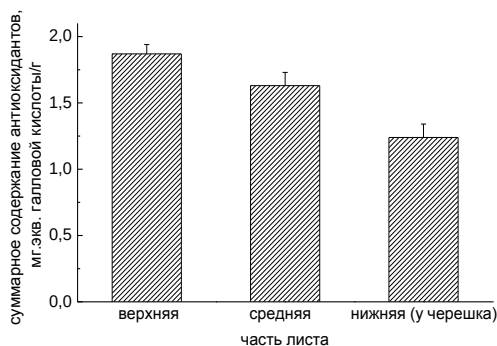


Рис. 2. Распределение суммарного содержания антиоксидантов по площади 1^{го} настоящего листа капусты пекинской гибрида F₁ Ника

Резкое снижение пула антиоксидантов в растущих листьях на начальном этапе роста, т.е. увеличение массы листа с возрастом при снижении удельного суммарного содержания антиоксидантов может быть обусловлено рядом причин: эффектом разбавления, связанным с быстрым ростом количества структурных соединений углерода (белков, аминокислот, углеводов, нуклеиновых кислот), а не снижением содержания антиоксидантов в листе; в развивающемся растении, начиная с семядольных листьев, при достижении зрелого возраста листовой пластинки листья выполняют функцию доноров антиоксидантов для развивающихся молодых листьев, транспортируя их по черешкам в вышележащие листья или, возможно, в корни; по мере увеличения

возраста листа в нем начинают преобладать окислительные процессы, в связи с уменьшением числа более восстановленных фенольных соединений и снижением эффективности регенерационных восстановительных процессов, что приводит к изменению состава антиоксидантов и их окислительно-восстановительных свойств, меняется отношение проантиоксидантов-антиоксидантов.

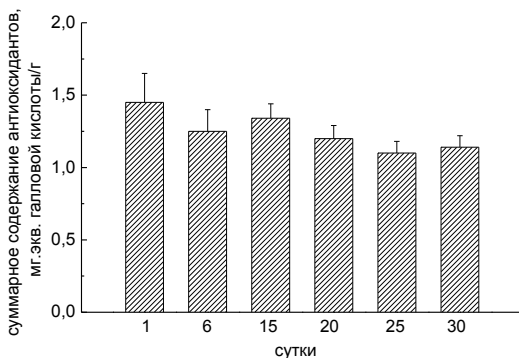


Рис. 3. Суммарное содержание антиоксидантов на ранних этапах развития (в онтогенезе) в наземной части растений капусты пекинской гибрида F₁ Ника

Выводы

1). С увеличением возраста каждого отдельного листа у растений капусты пекинской обнаружили последовательное уменьшение удельного суммарного содержания антиоксидантов на ранней стадии развития растения (до 25-30 суток).

2). С увеличением возраста растения наблюдается тенденция к уменьшению удельного суммарного содержания гидрофильных низкомолекулярных антиоксидантов в надземной части растения, которая, однако, выражена слабее, чем в отдельных листьях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cosio M.S., Buratti S., Mannino S., Benedetti S., Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family // Food Chemistry. 2006. V. 97(4). P. 725-731.
2. Yashin A.Y., A flow-injection system with amperometric detection for selective determination of antioxidants in foodstuffs and drinks // Russian Journal of General Chemistry. 2008. V. 78(12). P. 2566-2571.

-
3. Мисин В.М., Сажина Н.Н., Завьялов А.Ю., Яшин Я.И. Измерение содержания фенолов в экстрактах лекарственных трав и их смесях амперометрическим методом // Химия растительного сырья. 2009. №4. С. 127–132.
-

УДК 577.13+582.734.4

**ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ В САБЕЛЬНИКЕ БОЛОТНОМ (*COMARUM
PALUSTRE* L.) ОТ ЭКОЛОГО-ЦЕНОТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ
И ОБРАБОТОК РЕГУЛЯТОРАМИ РОСТА**

Бахтенко Е.Ю., Булатова С.В.

ФГБОУ ВПО «Вологодский государственный педагогический университет»,
Вологда, Россия, тел.: (8172)725251, e-mail bakhtenko@yandex.ru

Сабельник болотный является лекарственным растением и широко применяется в народной и официальной медицине многих стран. По количественному содержанию доминирующей группой веществ в растительном сырье сабельника являются фенольные соединения [1]. Целью работы являлось изучение влияния эколого-ценотических факторов и регуляторов роста на ростовые процессы и накопление фенольных соединений в органах сабельника болотного (*Comarum palustre* L.).

Растительный материал собирали в двух ценопопуляциях. Ценопопуляция 1 (ЦП 1): вахтово-сабельниково-осоковое болото, место расположения низинное болото (кислотность почвы 5,5-6,1; освещенность 13000-20000 лк). Ценопопуляция 2 (ЦП 2): сосняк сабельниково-бруснично-черничный, место расположения сосняк сфагновый (кислотность почвы 5,1-5,5; освещенность 2000-5000 лк).

Определение содержания растворимых фенольных соединений (ФС) осуществляли спектрофотометрическим методом [2]. Суммарное содержание растворимых полифенолов определяли с реактивом Фолина-Дениса (поглощение при 725 нм), флаванов – с раствором ванилина в 70% серной кислоте (поглощение при 500 нм). Калибровочные кривые в обоих случаях строили по эпикатехину. Содержание хлорофилла а и b определяли спектрофотометрическим методом (поглощение при 661,6 и 644,8 нм соответственно). Определение содержания свободных форм фитогормонов: абсцизовой кислоты (АБК), индолилуксусной кислоты (ИУК), цитокининов (зеатина, зеатин-рибозид) проводили

иммуноферментным методом [3]. Оптическую плотность измеряли на автоматическом сканере Titertek-Uniskan (Eflab, Финляндия) при длине волны 492 нм. В качестве стандарта использовали известные количества зеатина ("Serva", США) и метилизированных АБК и ИУК ("Serva", США).

В отдельных опытах в фазу бутонизации проводили обработку 2-хлорэтилфосфоновой кислотой (0,05 %, 0,1 %), хлорхолинхлоридом (0,1 %, 0,4 %), гиббереллином (5, 50, 100 мг/л).

Установлены различия в росте растений двух ценопопуляций. Растения ЦП 1 отличались наличием вторичных побегов, крупными листьями, большим количеством листьев и листочков в сложном листе. Для растений ЦП 2 отмечено отсутствие вторичных и генеративных побегов, меньшее количество листочков в сложном листе.

Таблица 1

Характеристика побегов сабельника болотного двух ценопопуляций

Показатели	Ценопопуляция 1	Ценопопуляция 2
Число листьев на вегетативном побеге, шт.	5,0±0,4	4,0±0,3
Число сложных листьев на генеративном побеге, шт.	4,4±0,2	Нет генеративных побегов
Число листочков в сложном листе, шт.	7±1	5±1
Длина/ширина листовых пластинок, см	6,9±0,33/2,7±0,09	4,6±0,22/1,85±0,13
Диаметр стебля, см	0,36±0,02	0,27±0,01
Число вторичных побегов, шт.	2,0±0,5	Нет вторичных побегов
Хлорофилл <i>a</i> , мг/г сухой массы	2,50±0,12	1,28±0,11
Хлорофилл <i>b</i> , мг/г сухой массы	1,27±0,09	0,73±0,07

Отличия в темпах роста сабельника двух популяций проявились в более раннем отрастании побегов и интенсивном росте растений ЦП 1. Различия в высоте побегов отмечались через месяц после отрастания и сохранялись до конца наблюдений. Так, через 2 месяца после отрастания высота вегетативного побега растений ЦП 1 была почти в 2 раза больше высоты побегов растений ЦП 2.

Полученные данные свидетельствуют о наличии взаимосвязи между уровнем накопления пигментов в фотосинтезирующих тканях и интенсивностью роста побегов. В листьях сабельника ЦП 1

по сравнению с листьями растений ЦП 2 было выше содержание хлорофилла *a* и хлорофилла *b*.

Рост и развитие растений находятся под гормональным контролем. Листья и стебли сабельника болотного ЦП 1 содержали больше ИУК и цитокининов, что соответствует более активному росту (табл. 2). В растениях сабельника ЦП 2 было меньше содержание ауксинов, цитокининов и АБК, что подтверждается низким ростом растений. Проявились отличия в содержании фитогормонов между органами сабельника. Так, в листьях по сравнению со стеблями выше содержание ИУК, а АБК и цитокининов ниже.

Растения двух ценопопуляций различались по содержанию фенольных соединений (табл. 3). В растениях сабельника ЦП 1 в фазу вегетации было больше фенольных соединений и флаванов по сравнению с растениями ЦП 2. В листьях сабельника содержание суммы фенольных соединений больше, чем в корнях, а флаванов меньше. Данная закономерность проявилась на растениях двух ценопопуляций.

Таблица 2
Содержание фитогормонов в органах сабельника болотного

	Ценопопуляция 1		Ценопопуляция 2	
	листья	стебли	листья	стебли
АБК	15,44±0,58	57,18±0,46	12,65±0,47	29,16±0,47
ИУК	35,66±2,49	26,23±2,68	20,09±1,5	10,2±2,16
Зеатин	1,91±0,17	2,31±0,54	1,29±0,08	1,35±0,07
Зеатинрибозид	0,89±0,14	13,17±2,15	0,70±0,06	5,76±1,26

Таблица 3
Содержание суммы фенольных соединений и флаванов (мг/г сухого вещества)

	Ценопопуляция 1		Ценопопуляция 2	
	ФС	ФЛ	ФС	ФЛ
Листья	119,56±4,39	10,08±0,41	94,27±1,42	9,6±0,25
Стебли	50,81±2,23	45,33±3,16	47,61±1,16	42,31±0,69
Корневища с корнями	70,79±1,30	61,44±1,08	65,59±1,78	61,85±1,85

Динамика накопления суммы фенольных соединений в процессе вегетации сабельника болотного соотносится с динамикой роста побегов. Максимальный уровень фенольных соединений у растений двух ценопопуляций отмечается в период быстрого роста (июнь), когда длина побега увеличивается более чем в 3,5 раза.

Сравнение динамики фенольных соединений и ростовых процессов растений двух ценопопуляций позволяет судить о влиянии условий произрастания на накопление фенолов и рост. Растения ЦП I, произрастающие при более высоком уровне, освещенности (13000-20000 лк) отличались большим содержанием фенольных соединений и фитогормонов (ИУК и цитокининов) в листьях и стеблях, активным ростом побегов, высоким уровнем хлорофилла *a* и *b*. Для растений ценопопуляции II (освещенность 2000-5000 лк) характерно меньшее количество фенольных соединений и хлорофилла, снижение длины побегов, низкое содержание ИУК и цитокининов в листьях и стеблях.

Таблица 4
Содержание флаванов и суммы фенольных соединений в органах сабельника болотного

	Контроль	2-ХЭФК 0,1 %	ССС 0,4 %	ГБ 100 мг/л
Сухая масса, г/растение	2,52±0,05	2,15±0,06	1,22±0,2	3,01±0,06
Длина побегов, см	18,87±1,1	13,8±0,83	12,0±1,2	22,25±1,2
Содержание СФС, мг/г сухого вещества				
Листья	66,9±0,68	68,99±1,33	60,33±0,48	91,68±0,43
Стебли	48,19±0,54	47,53±0,97	43,63±1,0	66,07±0,45
Корневища с корнями	90,45±1,27	91,04±1,12	82,85±0,59	127,62±1,57
Содержание флаванов, мг/г сухого вещества				
Листья	8,88±0,26	8,7±0,21	7,99±0,12	9,79±0,09
Стебли	45,88±0,87	46,43±0,94	42,71±0,44	55,72±0,86
Корневища с корнями	87,95±0,8	90,08±0,75	81,61±1,20	110,35±1,04

Для обоснования взаимосвязи интенсивности ростовых процессов и накопления фенольных соединений проводилась обработка растений ценопопуляций регуляторами роста: 2-хлорэтилфосфоновой кислотой (0,05 %, 0,1 %), хлорхолинхлоридом (0,1 %, 0,4 %), гиббереллином (5, 50, 100 мг/л). Хлорхолинхлорид оказал сильное ингибирующее действие на рост растений и содержание ФС (табл.4). В присутствии гиббереллина в концентрации 100 мг/л увеличивался рост, масса надземной части и накопление фенольных соединений. 2-хлорэтилфосфоновая кислота ингибировала ростовые процессы, но несколько увеличивала содержание фенольных соединений.

Таким образом, полученные данные дают основание судить о связи синтеза фенольных соединений с интенсивностью ростовых процессов. Наибольшее накопление фенольных соединений происходит в интенсивно растущих тканях, отличающихся повышенным содержанием фитогормонов. Стимуляция роста под действием экзогенного гиббереллина приводит к возрастанию содержания фенольных соединений, а ингибирование роста при внесении ретардантов – к снижению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жукова О.Л., Абрамов А.А., Даргаева Т.Д., Маркарян А.А. Изучение фенольного состава подземных органов сабельника болотного //Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2006. Т. 47. № 5. - С. 342-345.
2. Запрометов М. Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.:Высш.школа, 1974.-214 с.
3. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И. и др. Иммуноферментное определение индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител //Физиология растений. -1986. -Т.33. - №6. С.1221-1227.

УДК: 581.192 : 58.01/.07

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ *HYPERICUM PERFORATUM* ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Баяндина И.И.¹, Загурская Ю.В.², Васильев В.Г.³, Богатырев А.И.⁴, Казанцева Л.М.⁵

¹ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, bayandina@ngs.ru; ²ФГБОУ Институт экологии человека Сибирского отделения РАН, Кемерово, sytil@ngs.ru; ³ФГБОУ Новосибирский институт органической химии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, vgvasil@niich.nsc.ru; ⁴ФГБОУ ВПО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, ⁵Алтайский филиал Центрального сибирского ботанического сада СО РАН «Горно-Алтайский ботанический сад», с. Камлак, Шибалинский район, Республика Алтай, gabs@ngs.ru

Hypericum perforatum L. (зверобой продырявленный) – травянистое многолетнее лекарственное растение официальной медицины. Среди биологически активных веществ зверобоя особое место занимают полифенольные соединения: нафтодиантроны

(гиперицин, псевдогиперицин, протогиперицин и протопсевдогиперицин), флавоноиды (кверцетин, кверцитрин, изокверцитрин, гиперозид, астильбин, микуелианин, биапигенин) и фенольные кислоты [1, 2].

Проанализированы почвенно-климатические условия и степень загрязнения окружающей среды в регионах проведения исследований: Кемеровская область, Новосибирская область и Республика Алтай (с. Камлак). По суммарной степени загрязнения воздушной и водной среды наивысшие показатели характеризуют Кемеровскую область, средние значения принадлежат Новосибирской области, а загрязнение окружающей среды в Республике Алтай минимально (<http://www.priroda.ru>).

Для исследования брали растения, выращенные рассадным способом из генетически однородных семян в трех регионах Западной Сибири: Кемеровской (г. Кемерово), Новосибирской (г. Новосибирск) областях и Республике Алтай (с. Камлак). Проанализировано содержание нескольких классов фенольных соединений в сырье *Hypericum perforatum* L. второго года жизни (2011 г.). Сбор и сушка образцов производились по правилам, изложенным в Государственной фармакопее [3]. Качество сырья, полученного нами, соответствует требованиям, предъявляемым к лекарственному растительному сырью. Содержание фенольных соединений определяли общепринятыми спектрофотометрическими методами: флавоноидов по образованию окрашенных комплексов с $AlCl_3$ [4]; гиперичинов – прямой спектрофотометрией при определенных длинах волн; гидроксикоричных кислот – прямой спектрофотометрией [5]. Полученные водно-спиртовые экстракты анализировали методом ВЭЖХ-МС в системе жидкостного хроматографа Agilent 1200 SL (с диодно-матричным детектором) и гибридного квадруполь - времяпролетного масс-спектрометра Bruker micrOTOFQ. Использован обращено-фазовый режим элюирования.

Одним из показателей качества лекарственного сырья зверобоя является содержание в нем гиперичинов, при этом содержание должно составлять не менее 0,05 % [6]. В образцах, собранных нами, количество гиперичинов даже в растениях из Кемерово соответствует этому требованию, а образцы из Новосибирска и с Алтая превосходят вышеназванную норму (0,073 и 0,070% соответственно).

Среднее содержание суммы флавоноидов было максимально в Новосибирске (3,86%) и отличалось от алтайских образцов (3,45%). Минимальное содержание флавоноидов характеризовало

растения, выращенные в Кемерово (2,78%). Сумма фенольных соединений также максимальна в образцах из Новосибирска (29,9%), при этом кемеровские и алтайские пробы между собой практически не различаются (21,7 и 22,9%). По количеству гидроксикоричных кислот новосибирские и алтайские растения практически не различались между собой (1,67 и 1,63% в пересчете на кофейную кислоту), а растения из Кемерово обладали даже несколько более высокими показателями (1,92 %).

Сравнением данных, полученных с помощью ВЭЖХ-МС для экстрактов и смеси стандартов, удалось идентифицировать два вещества – хлорогеновую кислоту (16.9 мин) и рутин (24.2 мин). Остальные пики хроматограммы экстракта идентифицировали по полученным УФ- и масс-спектрам. В экстракте зверобоя продырявленного было обнаружено шесть основных соединений, относящихся к классу флавоноидов, и несколько минорных компонентов - веществ, представляющих собой производные кофейной кислоты (Табл. 1).

Таблица 1.

Соотношение основных фенольных компонентов в сырьевой части *H. perforatum*, культивируемых в различных регионах Западной Сибири (в пересчете на минимальную площадь пика)

Соединение / Образец	Камлак	Новосибирск	Кемерово
Производные кофейной кислоты	1,0	1,5	1,8
Стильбин	1,0	1,9	2,3
Смесь гиперозида, изокверцитрина, микуелианина	1,0	1,2	1,4
Рутин	1,1	1,0	1,9
Кверцитрин	1,0	2,2	1,7
Кверцетин	2,4	3,4	1,8
Биапигенин	1,6	2,1	1,0
Сумма	1,0	1,5	1,4

Масс-хроматограмма и УФ-хроматограмма для раствора стандартов, записанные в аналогичных экстракту зверобоя условиях, дали информацию о масс-спектрах и временах удерживания стандартов хлорогеновой кислоты, рутина, кверцитрина, кверцетина, апигенина и лютеолина. Соответствие пиков на хроматограмме экстракта и пиков хроматограммы смеси использованных стандартных соединений было установлено по совпадению спектров поглощения каждого пика и спектров из имеющейся базы данных. Полученные данные позволили

идентифицировать в экстракте зверобоя следующие соединения:

Рутин (3-О-рамнозо-глюкозид кверцетина): $C_{27}H_{30}O_{16}$; MW=610.153; t_R =25.9 мин; λ_{max} =255 и 355 нм; отрицательные ионы: m/z = 609.137 ($[M-H]^-$), 463.077 ($[M-C_6H_{11}O_4]^-$), 301.031 ($[C_{15}H_9O_7]^-$); положительные ионы: m/z = 303.059 ($[C_{15}H_{11}O_7]^+$), 465.118 ($[M-C_6H_{10}O_4+H]^+$), 487.095 ($[M-C_6H_{10}O_4+Na]^+$).

Кверцитрин (3-О-рамнозид кверцетина): $C_{21}H_{20}O_{11}$; MW=448.100; t_R =27.7 мин; λ_{max} =256 и 350 нм; отрицательные ионы: m/z = 447.083 ($[M-H]^-$), 301.031 ($[C_{15}H_9O_7]^-$); положительные ионы: m/z = 303.059 ($[C_{15}H_{11}O_7]^+$), 471.100 ($[M+Na]^+$).

Кверцетин: $C_{15}H_{10}O_7$; MW=302.043; t_R =30.7 мин; λ_{max} =254 и 370 нм; отрицательные ионы: m/z = 301.031 ($[M-H]^-$); положительные ионы: m/z = 303.059 ($[M+H]^+$).

Минорные компоненты - производные кофейной кислоты, в том числе хлорогеновая кислота (сложный эфир кофейной и хинной кислот), имеющие одинаковые спектры поглощения (λ_{max} =326 нм + плечо на 302 нм), но разные времена выхода (t_R = 8.8, 9.9, 17.0 и 17.8 мин). Идентифицировать их удалось также по характерным m/z ионов: отрицательные ионы с m/z 179.032 – анион кофейной кислоты, 191.051 – анион хинной кислоты, 353.080 – анион хлорогеновой кислоты; положительные ионы с m/z 163.045 – фрагмент кофейной кислоты с формулой $C_9H_7O_3$, 377.097 – аддукт хлорогеновой кислоты с натрием.

Три оставшихся основных пика пришлось идентифицировать только по масс- и УФ-спектрам:

Пик с t_R =24.8 мин имеет УФ-спектр, схожий со спектром дигидрокверцетина. Масс-данные: отрицательные ионы с m/z = 449.099 ($[M-H]^-$), 303.045 ($[C_{15}H_{11}O_7]^-$); положительные ионы с m/z = 305.076 ($[C_{15}H_{13}O_7]^+$), 473.108 ($[M+Na]^+$). Полученные данные соответствуют флавоноиду астильбину (3-О-рамнозид дигидрокверцетина, $C_{21}H_{22}O_{11}$). Других производных дигидрокверцетина с такой же молекулярной массой ранее в экстрактах зверобоя продырявленного не обнаруживали.

Пик с t_R =25.7 мин однороден с точки зрения спектров оптического поглощения и имеет спектр, схожий со спектром гиперозида. Согласно масс-спектрам пик содержит два различных соединения с ММ = 464.085 и 478.065, но с общим фрагментом массой 302.040, соответствующей массе кверцетина. Одно из двух составляющих пика с t_R =25.7 мин было идентифицировано как гиперозид (3-О-галактозид кверцетина, $C_{21}H_{20}O_{12}$, ММ = 464.085, λ_{max} =254 и 370 нм) по совпадению УФ-спектра с базой данных, а также молекулярных весов неизвестного соединения и гиперозида.

Такой вывод нельзя считать однозначным, т.к. подобными характеристиками обладает также изокверцетрин – 3-О-гликозид кверцетина, так как они отличаются только изомерами сахарной части. Данные, полученные для второго компонента, подходят для флавоноида микуелианина ($C_{21}H_{18}O_{13}$, ММ = 478.065, $\lambda_{\max}$ =254 и 370 нм). Согласно результатам, полученным китайскими учеными при изучении флавоноидного состава экстрактов зверобоя продырявленного [7], почти невозможно разделить смесь трех флавоноидов – гиперозида, микуелианина и изокверцетрина, поэтому было решено, что пик с t_R =25.7 мин состоит из смеси трех флавоноидов – гиперозида, микуелианина и изокверцетрина.

Пик с t_R =33.5 мин имеет спектр поглощения, подобный апигенину. Масс-данные: отрицательные ионы с m/z = 537.073 ($[M-H]^-$); положительные ионы с m/z = 539.111 ($[M+H]^+$), 561.097 ($[M+Na]^+$). Отсутствие фрагментных ионов исключает предположение, что это соединение – флавоноидный гликозид. Полученная нейтральная масса 538.090 соответствует формуле $(C_{15}H_9O_5)_2$. На основе полученных результатов можно отнести пик с t_R =33.5 мин к флавоноиду биапигенину.

Суммарное количество гликозидов кверцетина одинаково для растений, выращенных в Новосибирске и на Алтае, меняется только соотношение разных сахаров в растении в зависимости от территории произрастания. В Новосибирской области рамноза превалирует по содержанию, отношение рамноза/глюкоза почти в два раза больше, чем в образце с Алтая. Содержание производных кофейной кислоты, стильбина и смеси флавоноидных компонентов (гиперозид, изокверцетрин, микуелианин) возрастает прямо пропорционально степени загрязненности водной и воздушной среды в регионах исследования, возможно, эти компоненты участвуют в защитных механизмах растений зверобоя при промышленном загрязнении.

Таким образом, в исследованных нами образцах максимальное содержание фенольных веществ всех изученных классов принадлежит растениям, выращенным на территории Новосибирска. Растения, собранные на Алтае, также обладают достаточно высокими показателями содержания фенольных веществ.

Работа поддержана РФФИ (грант №10-04-98011-р_сибирь).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tatsis E. C., Boeren S., Exarchou V., Troganis A. N., Vervoot J., Gerathanassis I. P. Identification of the major constituents of *Hypericum*

-
- perforatum by LC/SPE/NMR and/or LC/MS // *Phytochemistry*. 2007. V. 68 (3). P. 383-393.
2. Merken H.M., Beecher G.R. Analysis of flavonoids in botanicals: A review // *Quality Management of Nutraceuticals (ACS Symposium Series, V. 803)*. American Chemical Society, Washington, 2002. P. 21-41.
 3. 3.Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. / 11-е изд. М., 1990. 400 с.
 4. Беликов В.В., Точкова Т.В., Шатунова Л.В., Колесник Н.Т., Баяндина И.И. Количественное определение основных действующих веществ у видов *Hypericum L.* // Растит. ресурсы. 1990. Т.26. Вып.4. С.541-578.
 5. Куркин В.А., Авдеева О.И., Авдеева Е.В., Мизина П.Г. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea (L.) Moench* // Растит. ресурсы. 1998. Т. 34. Вып. 2. С. 81 - 85.
 6. DAC. Deutsche Arzneimittel-Codex, 1986.
 7. Yun Wei Y., Xie Q., Dong W., Ito Y. Separation of epigallocatechin and flavonoids from *Hypericum perforatum L.* by high-speed counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216 (19). P. 4313 – 4318.
-

УДК 577.122:633.11

УЧАСТИЕ ЛЕКТИНА ПШЕНИЦЫ В УКРЕПЛЕНИИ БАРЬЕРНЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК В ОТВЕТ НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ИОНОВ КАДМИЯ

Безрукова М.В., Фатхутдинова Р.А., Мурзабаев А.Р., Шакирова Ф.М.

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
Уфа, Россия, тел./факс +7 347 2356088, e-mail: lectin@anrb.ru

К числу универсальных ответных реакций растений на стрессовые факторы, вызывающие нарушение водного режима, включая воздействие тяжелых металлов, можно отнести накопление АБК, которой отводится ключевая роль в индукции экспрессии генов широкого ряда стрессовых, а также присущих норме белков, задействованных в формировании стресс-устойчивости. К АБК-контролируемым белкам относится, в частности, лектин агглютинин зародыша пшеницы (АЗП), который можно рассматривать в качестве маркера развития неспецифической устойчивости растений пшеницы. Нами

выявлено, что воздействие токсических ионов кадмия вызывает обратимое увеличение содержания АБК, предшествующее накоплению уровня АЗП в корнях 4-суточных проростков, которое сопровождается экскрецией этого лектина в окружающую среду. Кроме того, продемонстрирован защитный эффект экзогенного АЗП на растения пшеницы, подвергнутые воздействию ацетата кадмия, который проявлялся в уменьшении амплитуды стресс-индуцированных сдвигов в состоянии гормональной системы, снижении рост-ингибирующего эффекта токсических ионов на деление клеток кончиков корней и рост проростков в целом, а также торможении поступления ионов кадмия во внутренние ткани корней. Известно, что важный вклад в формирование устойчивости к кадмию вносит отложение лигнина и суберина в оболочках клеток корней, способствующих укреплению их барьерных свойств. Нами показано ускорение отложения лигнина, выявленного с использованием флуоресцентной и световой (с применением флуороглЮцина) микроскопии в клеточных стенках базальной части предобработанных 1 мг/л АЗП корней проростков и дополнительное усиление этого процесса при воздействии кадмия. Важно отметить, что сама обработка АЗП вызывает в корнях проростков пшеницы транзитное накопление сначала АБК, а затем и существенное увеличение уровня эндогенных цитокининов, которые, как известно, задействованы в регуляции формирования лигнина. Качественное окрашивание срезов живых тканей корня суданом III и анализ автофлуоресценции позволили выявить активацию отложения суберина и существенное расширение зоны автофлуоресценции суберина в оболочках клеток корней в ответ на обработку АЗП и усиление интенсивности этих процессов в корнях проростков при последующем воздействии кадмиевого стресса. Полученные сведения указывают на вовлечение АЗП в укрепление барьерных свойств клеточных стенок и ограничение поступления токсических ионов во внутренние ткани корней и в побеги проростков пшеницы и расширяют спектр проявлений антистрессового действия этого лектина в растениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 11-04-01642-а.

УДК 584.10:547.56:668.535

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ АМБРОЗИИ ПОЛЫННОЛИСТНОЙ – СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО

Бекузарова С.А., Гишкаева Л.С.

ФГБОУ ВПО «Горский государственный аграрный университет»,
Владикавказ, Россия, тел. 8(8672) 53-01-42; E-mail: becos37@mail.ru
Чеченский НИИСХ, с. Гикало, Грозненский р-н, Россия

Изучение новых растений с набором биологически активных веществ является актуальной проблемой.

Одним из таких растений является карантинный сорняк амброзия полыннолистная (*Ambrosia artemisifolia*). Это растение имеет широкое распространение не только на Северном Кавказе, но и в ряде областей России (1,2). Кроме сесквитерпеновых лактонов (1,6%), эфирных масел (0,5-2%), кумаринов (22,9%) амброзия содержит несколько соединений полифенолов. Химический состав эфирных масел содержит пиненцимол, лимонен, терпинен, парацимол, борнеол, камфору, гумулен и другие компоненты. Нетерпеновые соединения в эфирных маслах содержат алифатические кислоты, сложные эфиры, спирты, флавоноиды (кверцетин, изорамнетин, гликозиды) и кумарин. Все эти вещества являются нетоксичными, а, наоборот, стимуляторами роста растений и безвредны для почвенной фауны (3,4). В наших исследованиях измельчённые растения амброзии в фазе бутонизации скашивали, выдавливая из них сок и растворяя в воде в концентрации 0,1%. В таком же количестве готовили водный раствор ПАБК (предварительно растворяя её в горячей воде при $t_{ре}$ 60-80⁰С). Смешивая два раствора, осуществляли подкормку посевов клевера лугового после 1-го укоса.

Совместно с парааминобензойной кислотой (ПАБК) наблюдается высокий синергизм с амброзией полыннолистной. ПАБК воздействует на увеличение ассимиляционного аппарата растений, повышает активность ферментов амброзии и обрабатываемых растений клевера, стимулируя активность клубеньковых бактерий после укоса.

Результаты исследований показали, что подкормка травостоя клевера после укоса обеспечивает увеличение кормовой массы до 312 ц/га, что выше контроля (без подкормки) на 126 ц/га. При этом повышается облиственность на 10,5%, а количество клубеньковых

бактерий возрастает до 86 шт. на одном растении (на контроле – 32 шт.).

Использование растений с высоким содержанием флавоноидов в качестве подкормки снижает затраты на обработку посевов, повышая продуктивность и качество возделываемой культуры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пархоменко А.Ю. «Изучение химического состава амброзии полыннолистной с целью получения фармакологически активных веществ», автореферат канд. диссертации. Пятигорск, 2004.
2. Клышев Л.К., Алюкина Л.С., Бандюкова В.А. Флавоноиды растений. Алма-Ата, Наука, 1978 г, 220 с.
3. Рыбалко К.С. О лактонах *Ambrosia artemisifolia*// Химия природных соединений – 1979. - № 4, с. 578-579.
4. Бекузарова С.А., Фарниев А.Т., Басиева Э.Б. и др. Патент на изобретение «Способ стимуляции роста и развития растений клевера». № 2416186 от 20.04.2011 г. МПК А 01 С 21/00, А 01 С 1/00.

УДК 581.1

ДВУХЛЕТНЯЯ ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛИСТЬЯХ БРУСНИКИ И КЛЮКВЫ

Березина Е.В., Носкова Ю.С., Павлова Е.Е., Брилкина А.А.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Россия, тел (831)4656112, berezina_ek@52.ru

Фенольные соединения во многом определяют пищевые и фармакологические свойства представителей семейства Вересковые, в частности брусники и клюквы. Так, антимикробное действие связано с наличием в них арбутина и флавоноидов [1, 2], Р-витаминное – с галловой кислотой, флавоноидами и таннинами [1, 3]. При этом и в организме растения фенолы выполняют ряд важных функций, как, например, защитную при биотическом и абиотическом стрессах [4].

Выяснение особенностей накопления вторичных метаболитов фенольной природы в зависимости от фазы вегетации позволяет, с одной стороны, выявить их роль в растительном организме, а с другой – рекомендовать сроки сбора ценного лекарственного сырья.

Цель настоящей работы – сравнение динамики накопления фенольных соединений в листьях брусники и клюквы в течение

2010 и 2011 гг.

Объектами исследования являлись листья растений брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L.) и клюквы болотной (*Oxycoccus palustris* Pers.), которые собирали в лесах Арзамасского района Нижегородской области в периоды набухания почек, цветения и плодоношения.

Количественное определение суммы растворимых фенольных соединений (СРФС) и флавоноидов проводили спектрофотометрически (UV-1700 (Shimadzu)) в 80% этанольных вытяжках. Анализ содержания суммы растворимых фенольных соединений проводили согласно методике, описанной М.Н. Запрометовым [5], флавоноидов – G. Gunes, R.H. Liu и C.B. Watkins [6].

В 2010 г. в период цветения содержание СРФС в листьях брусники и клюквы составило соответственно 86 и 28 мг/г сырой массы. В этом же году переход к плодоношению сопровождался увеличением накопления исследуемых соединений: в 1.5 раза у брусники и в 3.4 раза у клюквы до 131 и 95 мг/г сырой массы соответственно. Весной 2011 г., в период набухания почек, содержание суммы фенолов осталось на том же уровне, что и в период плодоношения. В течение всего 2011 г. вегетации статистически значимых ($p < 0.05$) различий между фенологическими фазами в накоплении СРФС не обнаружено, однако имелась тенденция к накоплению большего количества фенолов при плодоношении, чем при цветении.

Динамика содержания флавоноидов в рассматриваемые периоды, в целом, совпадала с динамикой содержания СРФС; в частности, наблюдалось большее различие между цветением и плодоношением в 2010 г. (мг/г сырой массы): 39 и 93 (брусника), 9 и 61 (клюква). Однако, в отличие от суммы фенолов, в случае клюквы болотной в 2011 г. отмечена двукратная разница содержания флавоноидов в старых (перезимовавших) и молодых листьях: 51 и 25 мг/г сырой массы соответственно; осенью этот показатель составил 37 мг/г сырой массы.

Доля флавоноидов в фенольном комплексе листьев брусники в 2010 г. увеличилась с 45% (цветение) до 71% (плодоношение) и в течение 2011 г. не менялась. В листьях клюквы доля флавоноидов в 2010 г. увеличилась с 32% (цветение) до 64% (плодоношение), затем к периоду набухания почек снизилась до 57%; в период цветения в 2011 г. составила 27%, а в период плодоношения – 36%.

Брусника и клюква имеют сходную динамику накопления

исследуемых вторичных метаболитов, причем для клюквы различия между периодами вегетации выражены более ярко. Уровень фенольных соединений в листьях брусники выше, чем в листьях клюквы. Так, максимальное различие зафиксировано в июне 2010 г.: 3.1 раза – СРФС, 4.3 раза – флавоноиды, причем разница в содержании СРФС в другие периоды была не столь велика и составляла 1.3-1.5 раза, тогда как минимальное различие в содержании флавоноидов было отмечено в 2010 г. в период плодоношения (1.5 раза) и к цветению 2011 г. вновь возросло (до 3.6 раз).

В ходе проведенного анализа было продемонстрировано, что максимальное содержание фенолов характерно для осенних и весенних листьев брусники и клюквы. По утверждению Г.И. Высочиной [7], максимальное количество флавоноидов у древесных отмечается именно весной и осенью. Дело в том, что осенью с наступлением холодов при переходе растения в состояние покоя происходит накопление ингибиторов роста фенольной природы – так подавляется распускание почек, растяжение стеблей, рост побегов [3], а высокое содержание растворимых фенольных соединений весной может быть связано с повышением концентрации галловой, *p*-кумаровой, феруловой, синаповой, кофейной, ванилиновой кислот и ванилина, являющихся продуктами деградацией лигнинов [8, 9]. Пониженное количество флавоноидов в период цветения по сравнению с другими периодами объясняется расходом этих соединений в процессах опыления и оплодотворения [7].

Нами также выявлено, что накопление фенолов в немалой степени зависит от условий окружающей среды. Наиболее показательными в этом отношении явились флавоноидные соединения, разница в содержании которых в периоды цветения и плодоношения в 2010 г. составила 2.4 раза у брусники и 6.8 раза у клюквы. Необходимо отметить, что по погодным условиям лето 2010 г. отличалось и перепадами температур в июне (период цветения исследуемых видов), и сухой и жаркой погодой в июле-августе (период созревания ягод). Следовательно, фенолы, и особенно флавоноиды, брусники и клюквы имеют ярко выраженную экологическую функцию, т.к. синтез их как ингибиторов роста и УФ-фильтров резко увеличивается в стрессовых условиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Носов А.М. Лекарственные растения. М.: ЭКСМО-Пресс, 2001. 350 с.
2. Pehkonen T., Koskimäki J., Riihinen K., Pirttilä A.M., Hohtola A., Jaakola L., Tolvanen A. Artificial Infection of *Vaccinium vitis-idaea* L. and Defence

-
- Responses to Exobasidium Species // Physiological and Molecular Plant Pathology. 2008. №72. P. 146-150.
3. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. М.: Наука, 1984. 160 с.
 4. Jaakola L., Koskimäki J.J., Riihinen K. R., Tolvanen A., Hohtola A. Effect of Wounding on Chalcone Synthase and Pathogenesis Related PR-10 Gene Expression and Content of Phenolic Compounds in Bilberry Leaves // Biologia Plantarum. 2008. Vol. 52, №2. P. 391-395.
 5. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений / Под. ред. О.А. Павлиновой М.: Наука, 1971. С. 185-197.
 6. Gunes G., Liu R.H., Watkins C.B. Controlled-Atmosphere Effects on Postharvest Quality and Antioxidant Activity of Cranberry Fruits // J. Agric. Food Chem. 2002. Vol. 50, №21. P. 5932-5938.
 7. Высочина Г.И. Проблемы изменчивости в хемотаксономических исследованиях растений // Сибирский ботанический вестник. 2007. Т. 2, вып. 1. С. 101-110.
 8. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 271 с.
 9. Артемина Н.А., Горбачева Т.Т. Содержание фенолов в коре ели на разных стадиях техногенной сукцессии биогеоценозов Кольского полуострова // Химия растительного сырья. 2009. №2. С. 111-116.
-

УДК 581.19:582.973:543.544.5.068.7:58.05

ИЗМЕНЧИВОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ *LONICERA* *CAERULEA* В СВЯЗИ С УСЛОВИЯМИ ПРОИЗРАСТАНИЯ

Боярских И.Г.¹, Васильев В.Г.², Кукушкина Т.А.¹

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия,
тел (383)334-45-25, irina_2305@mail.ru

²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН,
г. Новосибирск

Результаты аналитических исследований, число которых за последние годы значительно возросло в различных странах, показывают, что жимолость синяя (*Lonicera caerulea* L.) является потенциальной коммерческой ягодной культурой. Жимолость синяя может быть использована как источник природных антиоксидантов, природных красителей и функциональный компонент продуктов питания. Она также представляет собой полезное дополнение для профилактики ряда хронических заболеваний, например, рака,

сахарного диабета, опухолей, и сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний. Известно, что состав и функции биологически активных веществ, содержащихся в пищевых и лекарственных растениях, в большой степени определяются условиями их произрастания [1].

Целью настоящей работы было изучение изменения содержания фенилпропаноидов (флавоноидов и гидроксикоричных кислот) в различных органах жимолости синей в природных популяциях Горного Алтая.

Исследования проводили на Катунском, Северо-Чуйском, Курайском и Южно-Чуйском хребтах Горного Алтая. На каждом участке выбирались площадки геоботанически сходные, но различающиеся по геоэкологическим показателям. Объектами исследования служили листья и плоды *L. caerulea*, собранные в фазе созревания плодов на пробных площадках. Готовили среднюю пробу из 20-30-ти растений с каждой площадки.

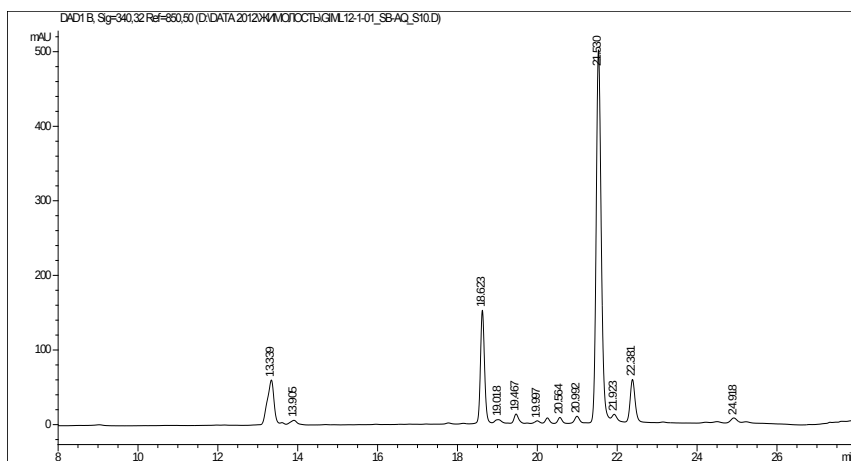


Рис. 1. Хроматографический профиль фенилпропаноидов *L. caerulea* subsp. *pallasii*, λ 340/32 нм. Хлорогеновая к-та (RT=13.3); изомер хлорогеновой к-ты (RT=13.9); гликозиды кверцетина (RT=18.6 – рутин; 19.45); гликозиды лютеолина (RT=17.7; 19.0; 19.7; 19.95; 20.25 – рутинозид; 20.55); дикофеилхинные к-ты (RT=21.0; 21.5; 22.4; 24.9).

Содержание фенилпропаноидов в листьях и плодах жимолости определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Идентификация отдельных компонентов анализируемых экстрактов и оценка их относительного содержания

проводилась с помощью ВЭЖХ-МС анализа [2]. Сравнительный анализ содержания индивидуально-группового состава фенольных соединений растений из разных популяций Горного Алтая проводили по площадям хроматографических пиков при длине волны для антоцианов – 460/80 нм, гидроксикоричных кислот, флавонолов и флавонов – 340/32 нм.

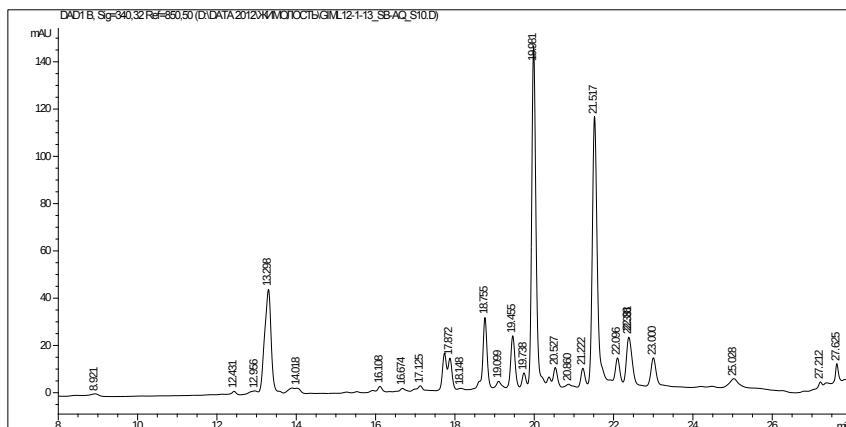


Рис. 2. Хроматографический профиль фенольных соединений листьев *L. caerulea* subsp. *altaica* λ 340/32 нм. Хлорогеновая к-та (RT=13.3); изомер хлорогеновой к-ты (RT=13.9); гликозиды кверцетина (RT=16.1; 16.65; 17.85; 18.6 – рутин; 19.45); гликозиды лютеолина (RT=17.7; 18.75; 19.1; 19.7; 19.97; 20.1 – рутинозид; 21.2; 22.99); дикофеилхинные к-ты (RT=21.5; 22.4); гликозид апигенина (RT=22.1); лютеолин (RT=27.6); неидентифицированный флавоноид (RT=20.5).

На основании данных сравнительного анализа времени удерживания пиков вещества на хроматограммах анализируемых и стандартных образцов, а также компьютерного сравнения спектров поглощения, полученных при хроматографировании пиков, с имеющейся у нас библиотекой, выявлено наличие в экстрактах листьев жимолости хлорогеновой и дикофеилхинной кислот, рутина, присутствие в большом количестве производных лютеолина, апигенина и кверцетина. Причем разные подвиды жимолости алтайского происхождения *L. caerulea* subsp. *altaica* и *L. caerulea* subsp. *pallasii* отличались по индивидуальному составу и по количественному содержанию отдельных компонентов фенолпропаноидов в листьях.

В изученных популяциях *L. caerulea* subsp. *pallasii*, а также у

растений этого подвида из интродукционной популяции в растворах экстрактов листьев не обнаружены гликозид лютеолина с М.м.=462.11 и лютеолин (рис. 1). Большинство гликозидов кверцетина и лютеолина у *L. caerulea* subsp. *pallasii* присутствовали лишь в отдельных популяциях как минорные компоненты. Характерной особенностью хроматографического профиля *L. caerulea* subsp. *pallasii* является наличие большого количества рутина, в отличие от *L. caerulea* subsp. *altaica*, который хорошо идентифицируется по выходу пика гликозида лютеолина (RT=19.9), а рутин здесь отмечается в минорных концентрациях (рис. 2).

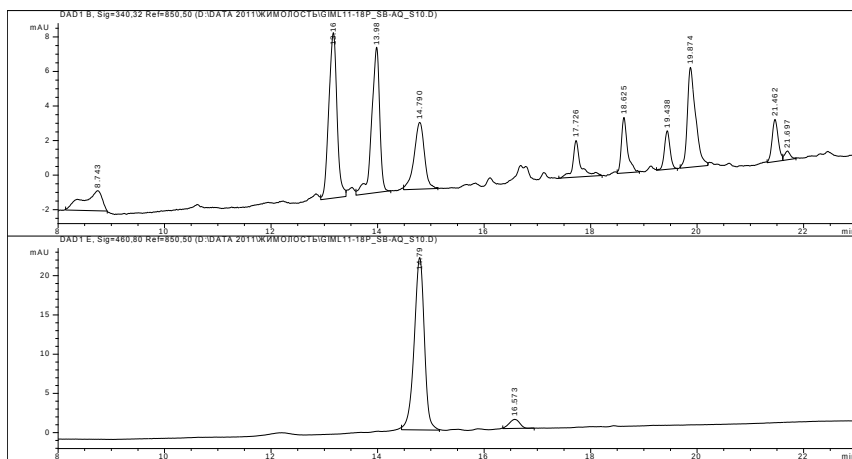


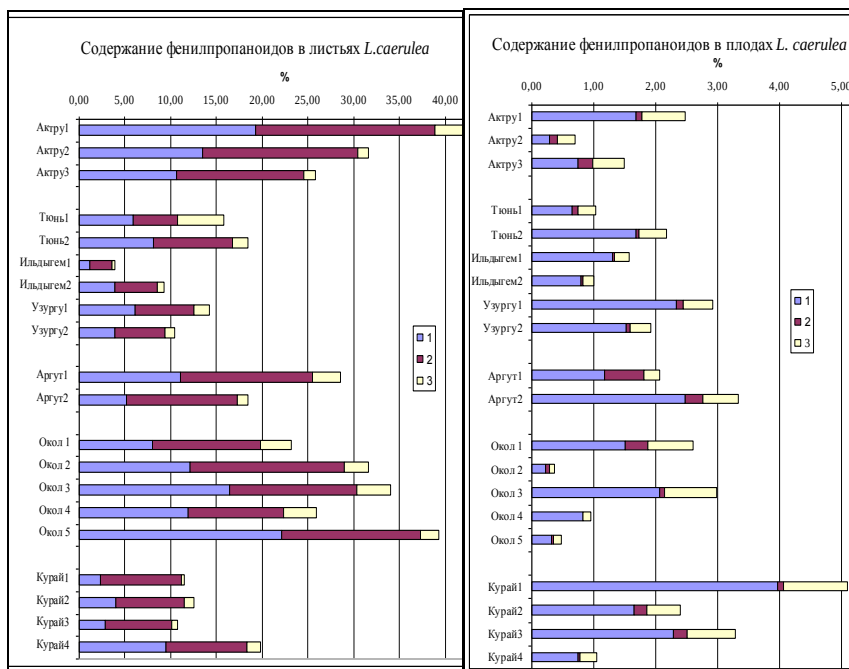
Рис. 3. Хроматографические профили фенолпропаноидов плодов *L. caerulea* subsp. *altaica* λ 340/32 и λ 460/80 нм. Неохлорогеновая (RT=8.7); хлорогеновая к-та (RT=13.15); изомер хлорогеновой к-ты (RT=13.76); псевдооснование антоциана (RT=13.97); цианидина глюкозид (RT=14.64); пеонидина глюкозид (RT=16.49); псевдооснование антоциана (RT=16.7); гликозиды лютеолина (RT=17.6; 19.9); гликозиды кверцетина (RT=17.8; 18.56 – рутин; 19.36); дикофеилхинные к-ты (RT=21.38; 22.2).

Основными компонентами плодов жимолости являются антоцианы, флавонолы, флавоны, гидроксикоричные кислоты и катехины. В группе антоцианов основным является цианидин-3-глюкозид, в группе флавонолов и флавонов – рутинозид кверцетина (рутин), гликозиды кверцетина и лютеолина, в группе гидроксикоричных кислот – хлорогеновая, неохлорогеновая и дикофеилхинная кислоты (рис. 3), что в основном согласуется с исследованиями проведенными ранее [1]. В отдельных популяциях в минорных концентрациях отмечается апигенин и его гликозид. По

содержанию рутина и гликозида лютеолина (RT=19.9) в экстрактах плодов между подвидами также как и в листьях существует разница, но в плодах она значительно меньше.

Сравнительный анализ хроматограмм экстрактов листьев и плодов *L. caerulea*, отобранных из разных популяций, показал сходный качественный состав по основным индивидуальным компонентам фенолпропаноидов. В экстрактах плодов апигенин в минорном количестве присутствовал только в одной из 30-ти изученных популяций жимолости и в шести отмечен его гликозид. В экстрактах листьев лютеолин отмечен в 10 средних пробах.

Количественные показатели индивидуально-группового состава биологически активных веществ имели значительные различия в зависимости от места произрастания растений (рис. 4). По содержанию отдельных компонентов, а также классов фенольных соединений в экстрактах из плодов и листьев *L. caerulea* различия наблюдались как между удаленными участками, так и между площадками, находящимися в 20-200 м друг от друга в сходных геоботанических условиях.



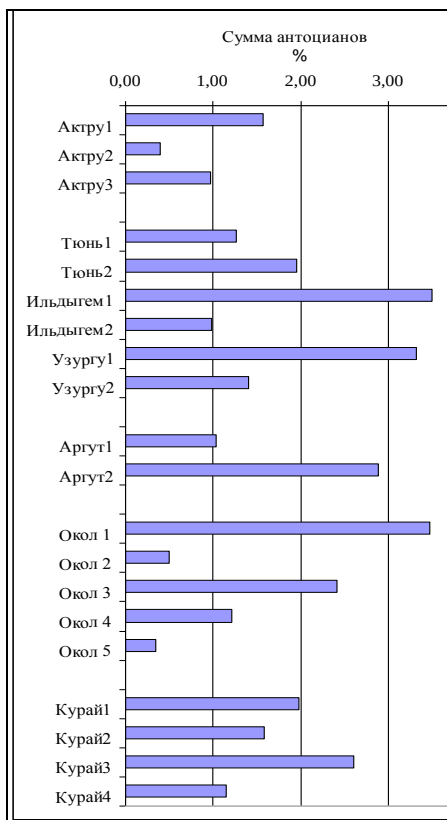


Рис. 4. Содержание отдельных классов фенольных соединений в плодах (а, б) и листьях (в) растений *L. caerulea* из разных по геоэкологическим характеристикам участков (площадь хроматографических пиков в %). 1- сумма гидроксикоричных кислот, 2- сумма флавонов, 3- сумма флавонолов

Анализ соотношений между отдельными классами фенольных соединений показал, что между суммарным содержанием антоцианов и гидроксикоричных кислот в плодах жимолости существует тесная положительная высокая значимая корреляционная связь.

Средняя положительная значимая корреляция наблюдалась между суммой антоцианов и флавонолов. На всех изученных участках отмечалось значительное (в 3 и более раз) увеличение содержания антоцианов и гидроксикоричных кислот в плодах *L. caerulea*, собранных на площадках находящихсяся, в локальных зонах дизъюнктивных нарушений геологических структур. Проведенные ранее геоэкологические исследования показали, что эти зоны характеризуются комплексом геофизических и геохимических аномалий – повышенной концентрацией ртути в приземном и

почвенном воздухе, изменением элементного и изотопного состава почв, а также величины индукции магнитного поля по сравнению с контрольными площадками [3].

В листьях жимолости наблюдалось как увеличение, так и уменьшение накопления в первую очередь гидроксикоричных кислот в локальных геологически активных зонах. Связано это с тем, что различные комплексы геофизических и геохимических аномалий оказывают разное влияние на процессы метаболизма в листьях растений. Поскольку листья и плоды – это органы, выполняющие разные функции в организме растений, гомеостатические реакции, в которых принимают участие и фенольные соединения, входящие в их состав также могут отличаться в зависимости от фоновой экологической обстановки и баланса негативных и позитивных воздействий, связанных с геологической активностью.

Оценка популяционной изменчивости содержания фенольных соединений в органах *L. caerulea* в условиях Горного Алтая показала, что эндогенные геофизические и геохимические аномалии могут оказывать выраженное влияние на накопление отдельных групп фенолпропаноидов в локальных геоактивных зонах. Это проявляется в появлении популяций с высоким полиморфизмом биохимических признаков. Выделенные популяции могут быть источником для отбора ценных для введения в культуру форм и сбора пищевого и лекарственного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jurikova T., Rop O., Mlcek J., Sochor J., Balla S., Szekeres L., Hegedusova A., Hubalek J., Adam V., Kizek R. Phenolic Profile of Edible Honeysuckle Berries (Genus *Lonicera*) and Their Biological Effects // *Molecules*. 2012.V. 17(1), p. 61-79.
2. Шинкаренко Ю.В. Васильев В.Г. Фенолкарбоновые кислоты *Myosotis krylovii* and *M. palustris* // *Химия природных соединений*. 2008, №5. С. 512-513.
3. Боярских И.Г., Сысо А.И., Худяев С.А., Колотухин С.П., Бакиянов А.И., Шитов А.В., Васильев В.Г., Чанкина О.В. Реакция растений на изменения геофизических и почвенно-геохимических показателей среды в локальных геоактивных зонах Горного Алтая Система «Планета Земля» Русский путь: Рублев-Ломоносов-Гагарин. М.:ЛЕНАНД, 2011. С. 262-281.

СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В РАСТЕНИЯХ РОДА *VACCINIUM* В ПЕРИОДЫ ЦВЕТЕНИЯ, ПЛОДОНОШЕНИЯ И ПОЛУПОКОЯ

Брилкина А.А., Павлова Е.Е., Агеева М.Н., Березина Е.В.

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Россия, тел (831)465612, annbril@mail.ru

Известно, что растения рода *Vaccinium*, такие как голубика и черника, обладают высоким содержанием фенольных соединений (ФС). Роль фенолов в жизни растений весьма разнообразна: участвуют в фотосинтезе и дыхании, в половом процессе, в различных взаимосвязях между растениями и средой, выполняют структурную и защитную функцию, выступают в роли регуляторов роста. Одним из наиболее значительных свойств ФС является их антиоксидантная (АО) способность. Другим важным антиоксидантом растительной клетки является аскорбиновая кислота. Несомненно, ее участие в процессах роста, цветения, в водном обмене, регуляции ферментативной активности, в защитных реакциях. На уровень фенольных соединений и аскорбиновой кислоты влияют как условия окружающей среды, так и генотип растения.

Целью настоящей работы явилось сравнение содержания фенольных соединений и аскорбиновой кислоты у представителей рода *Vaccinium* за три периода вегетации в 2010 и 2011 годах.

Объектами исследования: голубика щитковая (*Vaccinium corimbosum* L.), голубика черноплодная (*V. artroccum* L.), выращиваемые в Ботаническом саду ННГУ им. Н.И. Лобачевского и голубика обыкновенная (*V. uliginosum* L.), черника обыкновенная (*V. myrtillus* L.) произрастающие в лесах Нижегородской области.

В листьях и ягодах определяли содержание суммы растворимых фенолов, флавоноидов, катехинов, антоцианов, аскорбиновой кислоты и пигментов спектрофотометрически (UV-1700 (Shimadzu)). Исследования проводили 2 года, образцы листьев собирали в периоды цветения, плодоношения и полупокоя. Ягоды исследовали у трех представителей – голубики щитковой, голубики обыкновенной и черники обыкновенной.

Согласно полученным нами результатам происходило повышение уровня суммы растворимых фенольных соединений

при переходе растения от фазы цветения к плодоношению и полупокою: максимальные значения наблюдались в фазу полупокоя (50,3-158,9 мг/г сыр.м. в зависимости от вида), минимальные при цветении. Концентрация флавоноидов в процессе вегетационного периода так же возрастала от фазы цветения к фазе полупокоя (до 38,3-116,7 мг/г сыр.м.). При плодоношении уровень катехинов повышался для всех растений – в 2-5 раз. Осенью количество катехинов так же возрастало на 15-100%, по сравнению с плодоношением.

В отличие от фенольных соединений нельзя выявить общей закономерности в накоплении аскорбиновой кислоты в листьях исследуемых нами растений от фазы цветения к фазе плодоношения. Хотя в большинстве случаев можно отметить значительное снижение уровня аскорбата в осенний период, что возможно, свидетельствует о активизации окислительных процессов.

Таким образом, к периоду плодоношения в листьях исследованных растений накапливаются флавонолы, катехины и аскорбат, обеспечивая тем самым максимальную защиту растений. У всех растений в этот период выявлено максимальное содержание фотосинтетических пигментов. Кроме того, в более сухое и жаркое лето 2010 года накопление фенолов происходило более интенсивно.

Самое высокое содержание растворимых фенольных соединений и флавоноидов отмечено в ягодах голубики щитковой до 29 и 5 мг/г сыр.м. соответственно. В 1,5-2 раза ниже содержание фенольных соединений в ягодах голубики обыкновенной. Минимальное содержание флавоноидов в ягодах голубики обыкновенной. Наименьшее количество катехинов обнаружено в 2010 в ягодах черники обыкновенной, а в 2011 году у черники отмечено максимальная концентрация катехинов в ягодах, которая в 9 раз выше по сравнению с 2010 годом. Содержание катехинов в ягодах голубики щитковой и голубики обыкновенной одинаково. Самое высокое содержание антоцианов в ягодах черники отмечено в 2010 и 2011 годах. В ягодах голубики обыкновенной содержится в 2-5 раз меньше антоцианов. Наибольшим уровнем аскорбиновой кислоты обладают ягоды голубик щитковой в 2010 и обыкновенной.

Таким образом, уровень накопления суммы растворимых фенолов, флавонолов, катехинов и аскорбиновой кислоты в ягодах ниже такового в листьях в 2-11 раз. При этом сложно выявить вид, ягоды которого превосходили бы остальные по исследуемым показателям.

В целом в ходе работы нами было выявлено, что исследованные растения относятся к фенолнакапливающим видам, как в листьях, так и в ягодах. Высокое содержание аскорбата в периоды цветения и плодоношения в листьях у голубик и накопление исследуемыми растениями фенолов и антоцианов к периоду полупокоя, позволяет сделать вывод о том, что в периоды цветения и плодоношения основная антиоксидантная роль принадлежит аскорбиновой кислоте, а в фазу полупокоя – фенольным соединениям. Также накопление фенольных соединений к периоду полупокоя позволяет растению останавливать свой рост.

УДК 577.15.086.83

СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ КАЛЛИЗИИ ДУШИСТОЙ В РОСТОВОМ ЦИКЛЕ

Булатова А.А., Шапчиц М.П.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
bulatovan84@mail.ru

Последние достижения в области исследования метаболизма клеточных культур растений способствуют более рентабельному коммерческому производству ценных физиологически активных веществ из редких или экзотических растений [1]. В настоящее время собрана большая коллекция растительных клеточных культур из различных семейств, синтезирующих вторичные метаболиты, широко используемые в промышленности [2]. Однако необходимо и далее развивать и расширять сырьевую базу на основе культуры клеток и тканей растений. В настоящее время большой интерес для исследования представляет растение Каллизия душистая (*Callisia fragrans*, «золотой ус», сем. – *Commelinaceae*). *Callisia fragrans* очень широко используется в народной медицине и обладает разнообразным спектром лечебного действия. Лекарственные свойства каллизии обусловлены присутствием в ней биологически активных соединений: фенольной природы – фенолокислот (салициловой, ванилиновой, галловой), представителей фенилпропаноидов: оксикоричных кислот (феруловой, цикориевой, кофейной,

хлорогеновой) и кумаринов (умбеллиферона, скополетина); антрахинононов (алоэ-эмодина), соединений из группы флавоноидов: флавонолов (кверцетина и кемпферола), антоцианов; изопреноидной природы – дитерпеновых соединений (биформена), тритерпеновых: лупеола и бетулина, предшественника стеролов сквалена, β -ситостерола; углеводов (полисахаридов и свободной глюкозы) а также холина, аскорбиновой кислоты и микроэлементов [3]. Поскольку данное растение не имеет естественного ареала произрастания на территории Беларуси, то большой практический интерес представляет возможность его культивирования в искусственных условиях *in vitro*.

В этой связи целью настоящей работы явилось изучение суммарного содержания соединений фенольной природы в каллусной и суспензионной культурах каллизии душистой в ростовом цикле.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили каллусная и суспензионная культуры каллизии душистой, ранее полученные из горизонтальных побегов данного растения и культивируемые в течение 4-х лет на кафедре физиологии и биохимии растений Белорусского государственного университета (фото 1) [4].

В работе использовалась основная питательная среда Мурасиге и Скуга (МС) [5] с добавлением фитогормонов (2 мг/л 2,4 Д и 0,2 мг/л кинетина), 30 г/л сахарозы и 8 г/л агар. Культивирование каллусов каллизии проводили в темноте в термостате при температуре $26 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 32 суток. Культивирование суспензионной культуры проводили в темноте в термостате при температуре $26 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 23 суток.

Фенольные соединения (ФС) извлекали из высушенного при 60°C материала (каллусная и суспензионная культуры) 70 % этанолом. В экстрактах спектрофотометрически определяли суммарное содержание растворимых ФС с реактивом Фолина-Дениса, поглощение при 720 нм [6]. Калибровочную кривую строили по хлорогеновой кислоте.

Оценка роста каллусной и суспензионной культур проводилась путем измерения прироста сырой или сухой биомассы клеток и вычисления индекса роста на протяжении их культивирования. По результатам измерений были построены ростовые кривые для каллусных и суспензионных культур каллизии душистой. Индекс роста определяли по формуле: $I = (M_k - M_0) / M_0$, где M_0 - начальная сырая или сухая масса клеток, г; M_k –

сырая или сухая масса клеток, г [7]. На рисунках представлены среднеарифметические значения и стандартные ошибки средней величины.

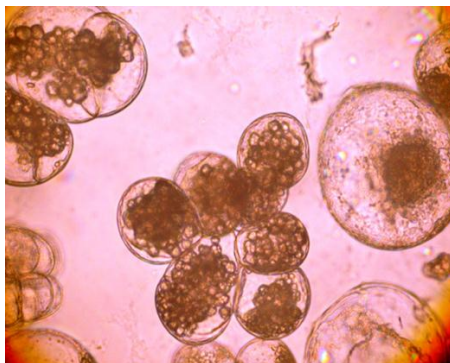
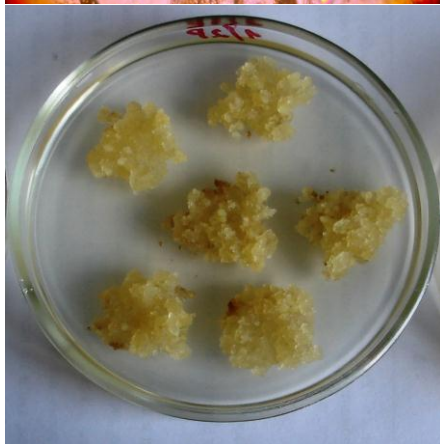


Фото 1. Фотографии каллусной и суспензионной культур каллизии душистой. Микрофотография суспензионных клеток каллизии.



РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования взаимосвязи между ростовыми процессами и накоплением ФС в культуре клеток и тканей каллизии душистой определялось содержание данных веществ в клетках на разных фазах роста (рис.1,2). Полученные данные свидетельствуют о том, что наименьшее содержание ФС в клетках каллусной культуры наблюдалось в период лаг-фазы и в среднем составляло 11,3 мг/г сухой массы. Далее количество ФС в каллусных клетках постепенно увеличивалось и достигало максимума к стационарной фазе – на 28 сутки культивирования

клетки содержали фенольных веществ в среднем 20,4 мг/г сухой массы клеток.

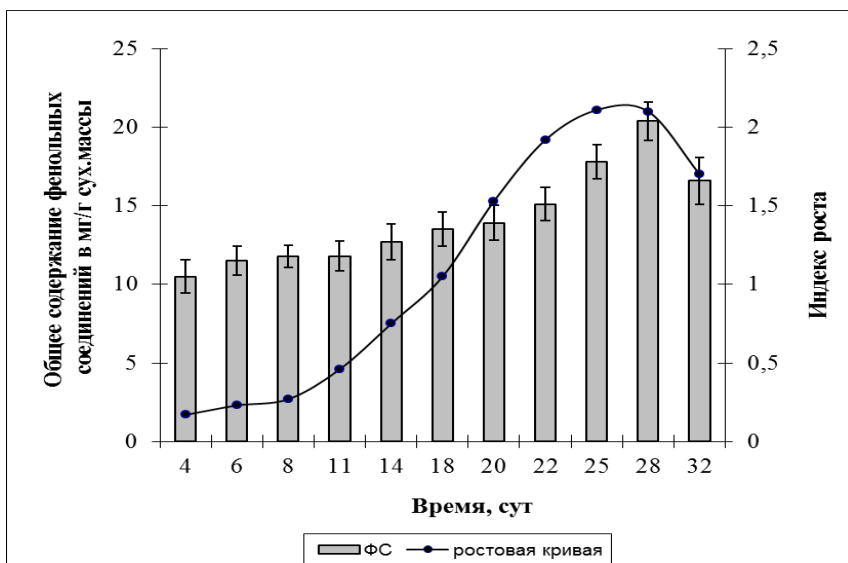


Рис 1. Суммарное содержание фенольных соединений в ростовом цикле каллусной культуры *Callisia fragrans*

Подобный характер изменения содержания ФС в ростовом цикле наблюдался в каллусной культуре *Theobroma cacao*: наименьшее содержание фенолов наблюдалось в лаг-фазу и в начале лог-фазы, а затем увеличивалось и достигало максимальных значений к стационарной фазе [8]. В отношении суспензионной культуры каллизии душистой количественное содержание ФС на протяжении короткой лаг-фазы до 2 суток и в течение длительной логарифмической фазы до 10 суток существенного сдвига не имело — 14,1 мг/г и 14,8 мг/г сухой массы клеток соответственно. Начиная с 12 суток (конец лог-фазы) содержание ФС увеличивалось до 17,8 мг/г сухой массы и достигало максимума к стационарной фазе (15-17 суток) в среднем составило 20,3 мг/г сухой массы клеток.

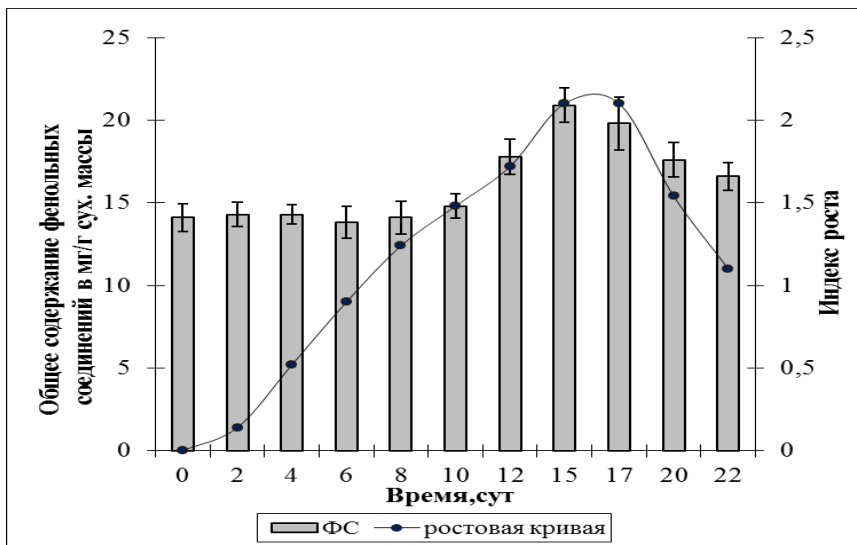


Рис 2. Суммарное содержание фенольных соединений в ростовом цикле суспензионной культуры *Callisia fragrans*

Согласно литературным данным деление клеток, приводящее к увеличению клеточной биомассы, и синтез вторичных метаболитов часто разобщены во времени. Накопление вторичных метаболитов возрастает в фазе замедленного роста клеточной популяции и достигает максимума в стационарной фазе [9]. Для культур клеток и тканей каллизии душистой также наблюдалось максимальное содержание ФС в стационарной фазе роста, причем количественно уровень ФС в каллусных и суспензионной культурах был практически одинаков 20,4 и 20,3 мг/г сухой массы клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balandrin, M.J. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants / M.J. Balandrin and J.A. Klocke // Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plant. - V. 4. – P. 1-36.
2. Бутенко, Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология/ Р.Г. Бутенко – Москва: Наука, 1986, 127 с.
3. Оленников, Д.Н. Химический состав сока Каллизии душистой (*Callisia fragrans* wood.) и его антиоксидантная активность (in vitro) / Д.Н. Оленников, И.Н. Зилфикаров, А.А. Торопова, Т.А. Ибрагимов // Химия растительного сырья. – 2008. - № 4. - С. 95-100.
4. Булатова А.А. Шапчиц М.П. Юрин В.М. Получение клеточной культуры in vitro и оптимизация состава среды для активного роста Каллизии душистой. Труды БГУ, Серия «Физиологические, биохимические и

-
- молекулярные основы функционирования биосистем». Том 4. 2009
5. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1968. – Vol. 15, №13. – P. 473–497.
 6. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений / под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука 1971 С. 185-197
 7. Загребельный, С.Н. Биотехнология. Часть 1. Культивирование продуцентов и очистка продуктов / С.Н. Загребельный. – Новосибирск: Новосиб. гос. ун-т, 2000. – 108 с.
 8. Jalal M.A.F. and H.A. Collin Secondary metabolism in tissue cultures of *Theobroma cacao* New Phytol. 1979 Vol. 83 P. 343-349
 9. Endress, R. *Plant Cell Biotechnology* / R. Endress. – Berlin ; New York : Springer-Verlag, 1994. – 353 p. 56.
-

УДК 581.1

РАЗОБЩАЮЩЕЕ И ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ЛЮПИНА ЖЕЛТОГО (*LUPINUS LUTEUS*)

Буцанец П.А., Шугаев А.Г.

ФГБУН Институт физиологии растений РАН, Москва, Россия, тел
(499)2318340, email: p.corbeau@list.ru

За последние десятилетия накоплено большое количество данных о физиологическом эффекте салициловой кислоты (СК) – фитогормона фенольной природы.

Известно, что СК играет существенную роль в регуляции системной устойчивости растений при инфицировании, а также реакциях адаптации при абиотическом стрессе (УФ-радиация, экстремальные температуры, водный дефицит и т.д.) [1, 2, 3]. Рядом авторов показано, что СК является модулятором синтеза активных форм кислорода (АФК) и участвует в цепи передачи сигналов устойчивости, в том числе через АФК. СК ингибирует активность гемсодержащих ферментов, компонентов антиоксидантной системы растений – каталазы и пероксидазы [4, 5]. Это приводит к увеличению внутриклеточного уровня АФК [6], что запускает биосинтез фитоалексинов, лигнификацию клеточных стенок, экспрессию защитных PR-генов растений [1, 7, 8].

Существуют разрозненные данные о влиянии СК на дыхание

и процессы трансформации энергии в митохондриях растений. Обладая свойствами протонофора, СК может воздействовать на генерацию электрического потенциала ($\Delta\Psi$) и разобщать процесс окислительного фосфорилирования митохондрий [9]. Кроме того, при добавлении СК в низких концентрациях (0.01-0.1 мМ) в суспензионную культуру клеток табака происходило усиление, а при более высоких концентрациях ингибирование клеточного дыхания. Сходные результаты были получены в работе с изолированными митохондриями Арабидопсиса (*Arabidopsis*) [10]. Подобно ингибиторам цитохромного пути переноса электронов (антимицин А), СК приводит к увеличению уровня АФК в митохондриях, что является следствием перевосстановленности компонентов дыхательной цепи [4].

Тем не менее, вопрос о механизме действия СК на митохондрии растений остаётся открытым. Имеющихся в литературе данных пока явно недостаточно для выяснения механизма действия СК на метаболизм митохондрий растений. Практически неизученным остается вопрос о ее влиянии на генерацию мембранного потенциала ($\Delta\Psi$) на внутренней мембране митохондрий.

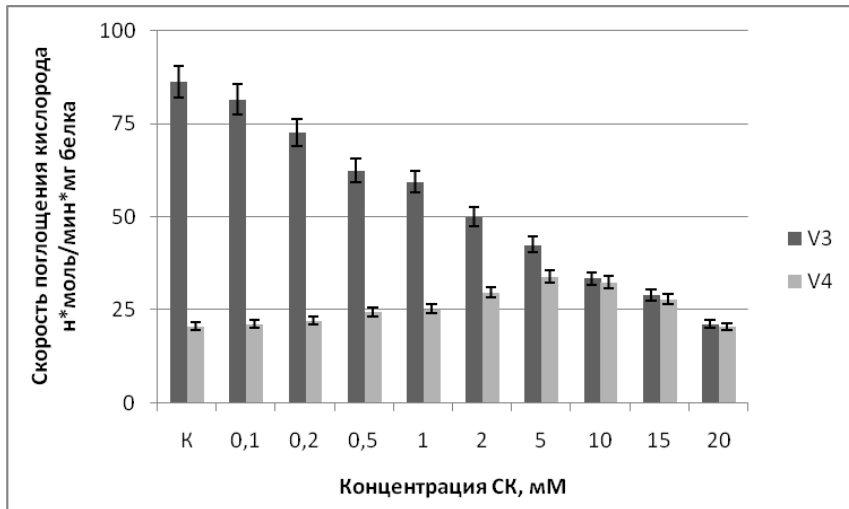


Рис.1. Влияние салициловой кислоты на скорость поглощения кислорода при окислении малата в присутствии глутамата митохондриями люпина желтого в состояниях 3 (V3) и 4 (V4).

Объектом исследования были 4-дневные этиолированные проростки люпина желтого (*Lupinus luteus* L., сорта «Дружный»), выращенные в камере фитотрона при температуре 24-26°C. Эксперименты проводились на свежем препарате митохондрий, выделенных из семядолей проростков по методу Neuburger [11] с небольшими модификациями. Дыхание митохондрий регистрировали на полярографе с кислородным электродом закрытого типа (*Oxytherm, Hansatech instruments*). Мембранный потенциал изучали на двухлучевом спектрофотометре (*Hitachi*) с использованием сафранина О [12]. Измерения проводили в 3-кратной биологической и аналитической повторностях.

Изолированные митохондрии люпина желтого характеризовались высокой степенью сопряжения процессов дыхания и фосфорилирования. В частности, при окислении малата в присутствии глутамата величина дыхательного контроля по Чансу (ДК) составляла 4.0-4.3, а отношения АДФ/О варьировала в диапазоне 2.5-2.8.

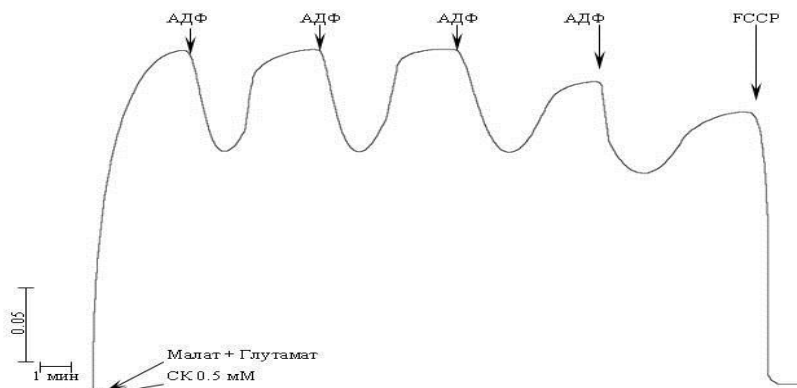


Рис.2. Влияние СК на генерацию мембранного потенциала в митохондриях люпина желтого при окислении малата в присутствии глутамата.

В наших экспериментах было показано, что добавление СК в концентрациях 0.1-1.0 мМ оказывало разобщающее действие на дыхание митохондрий. Это заключалось в ускорении поглощения кислорода в состоянии 4 (в отсутствие АДФ) и снижении величины ДК и АДФ/О. Например, при добавлении СК в полярографическую ячейку, до конечной концентрации 0.5 мМ, скорость окисления малата в присутствии глутамата ускорялось на 20% (рис. 1), а

отношение АДФ/О снижалось на 30%. В концентрациях значительно превышающие физиологическую (выше 2.0 мМ) СК ингибировала дыхание митохондрий, что характеризовалось снижением скорости поглощения кислорода как в состоянии 3 (в присутствии АДФ), так и в состоянии 4 (рис. 1).

Разобщающий эффект СК, взятой в низких концентрациях, подтвердился при изучении влияния на генерацию $\Delta\Psi$. На рис. 2 показано, что в присутствии 0.5 мМ СК величина $\Delta\Psi$ снижалась и увеличивалось время фосфорилирования АДФ. При увеличении концентрации СК наблюдалась практически полная диссипация мембранного потенциала на внутренней мембране митохондрий люпина (рис. 3), что коррелировало с торможением окислительной активности митохондрий (рис.1).

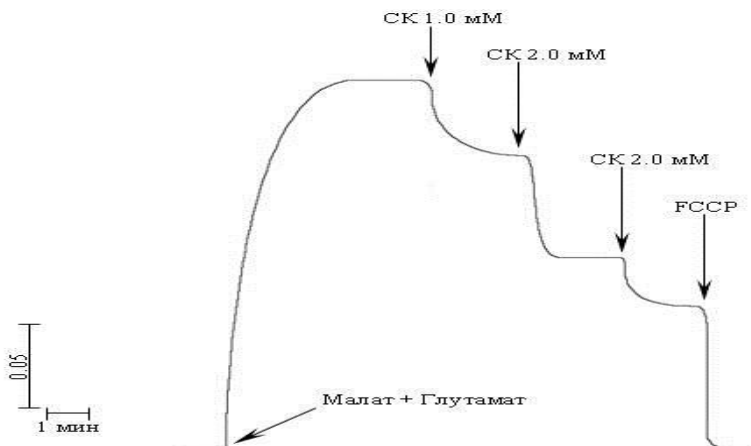


Рис.3. Диссипация мембранного потенциала в митохондриях люпина желтого при увеличении концентрации СК при окислении малата в присутствии глутамата.

Таким образом, исходя из анализа литературы, а также на основе полученных нами данных можно заключить, что СК может оказывать двойное действие на метаболическую активность митохондрий. В широком диапазоне концентраций (до 1 мМ) СК разобщает процесс окислительного фосфорилирования и уменьшает величину $\Delta\Psi$, что в соответствии с теорией окислительного стресса должно снижать вероятность избыточного образования АФК в митохондриях. Это, вероятно, является одной из причин адаптогенного действия СК на растения. Но, при

накоплении СК (при стрессовых воздействиях) оказывает ингибирующее действие на окислительную и фосфорилирующую активности митохондрий, что может являться причиной избыточной генерации АФК и индукции запрограммированной гибели клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lamb C.J., Lawton M.A. et al. Signals and transduction mechanism for activation of plant defense against microbial attack // *Cell*. 1989. 56: 215-224.
2. Lennon AM, Neuenschwander UH, Rabis-Carbo M, Giles L, Ryals JA, Siedow JN (1997) The effects of salicylic acid and tobacco mosaic virus infection on the alternative oxidase of tobacco // *Plant Physiol*. 115: 783-791.
3. Malamy J., Klessig D.F. Salicylic Acid and Plant Disease Resistance // *Plant J*. 1992. V. 2. P. 643-654.
4. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid // *Science*. 1993. 162. 12:1883-1886.
5. Chen Z., Malamy J. et al. Induction, modification and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses // *Proc. Nat. Acad. Sci*. 1995. 92: 4134-4137.
6. Martinez C., Baccou J-C. et al. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* // *Plant Physiology*. 2000. 122. 3:757-766.
7. Dat J.F., Lopez-Delgado H. et al. Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings // *Plant Physiol*. 1998. 116: 1351-1357.
8. Desican R., Maskerness S. A-H. et al. Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress // *Plant Physiol*. 2001. 127. 1: 159-172.
9. Norman C., Katharine H.A., Millar H.A., Whelan J.M. Salicylic Acid Is an Uncoupler and Inhibitor of Mitochondrial Electron Transport // *Plant Physiol*. 2004. V. 134. P. 492-501.
10. Xie Z., Chen Z. Salicylic acid induces rapid inhibition of mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation in tobacco cells // *Plant Physiol*. 1999. 120: 217-226.
11. Neurburger M., DA Day, R. Douce The regulation of malate oxidation in plant mitochondria by the redox state of endogenous pyridine nucleotides // *Physiol*. 1984. V. 22: 571-580.
12. Moore A.L., Bonner W.D. Measurement of membrane potentials in Plant mitochondria with safranin method // *Plant Physiol*. 1982. V. 70. P. 415-420.

СОДЕРЖАНИЕ РУТИНА, АНТОЦИАНОВ И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ У ГАЗОННЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА БОБОВЫЕ

Головина Е.Ю., Яременко Ю.В.

Калининградский институт экономики, Калининград, Россия,
golowina@mail.ru

Автомобильный транспорт является основным источником загрязнения окружающей среды городов. Ежегодно автотранспортными средствами выбрасывается более 12 миллионов тонн различных загрязняющих веществ: окиси углерода, окислов азота и серы, углеводородов, сажи, тяжелых металлов и других [1]. Присутствие в среде этих веществ в опасных количествах отражается на течении целого ряда процессов в растениях [2]. Одним из опасных последствий таких воздействий на растения является усиленное образование активных форм кислорода (АФК), которые, как правило, повреждают клетки, в том числе на уровне мембран, нуклеиновых кислот и пигментов хлоропластов [3]. Растения обладают разными системами защиты от негативного воздействия окружающей среды: увеличивается содержание таких антиоксидантов, как аскорбиновая кислота (АК), рутин, флавоны, полифенольные соединения [4]. Однако до сих пор механизмы функционирования систем антиоксидантов у растений изучены недостаточно. Целью данной работы явилось исследование содержания рутина, антоцианов и аскорбиновой кислоты у некоторых газонных растений семейства бобовые, произрастающих в разных районах города Калининграда.

Объектами исследования служили газонные растения - представители семейства бобовые (Fabaceae): клевер гибридный (*Trifolium hybridus* L.), клевер ползучий (*Trifolium repens* L.), люцерна хмелевидная (*Medicago lupulina* L.). Эти виды отличаются чувствительностью к газообразным загрязняющим атмосферный воздух веществам: по классификации Николаевского [5] клевер гибридный, клевер ползучий и люцерна хмелевидная относятся к неустойчивым видам. Исследования проводились на территории г. Калининграда в трёх районах: Ленинградский, Центральный и Московский. В качестве контроля пробы отбирались в условно чистой зоне – окрестности поселка Победино Краснознаменского

района. Содержание АК и рутина определяли методом титрования, антоцианов – спектрофотометрически [6].

Показано, что содержание АК, антоцианов и рутина в листьях газонных растений (*Trifolium hybridus* L., *Trifolium repens* L., *Medicago lupulina* L.) семейства бобовые (Fabaceae), произрастающих в разных районах г. Калининграда видоспецифично: максимальный уровень (АК - 69,81 мкг/г, рутина - 2,9 мкг/г, антоцианов - 4,3 мг/г) отмечен у *Trifolium hybridus* L., а минимальный (АК - 24,09 мкг/г, рутина - 0,4 мкг/г, антоцианов - 1,3 мг/г) – у *Medicago lupulina* L. Повышенный пул исследуемых антиоксидантов был отмечен у растений, произрастающих вблизи центральных автомагистралей города с большим объемом транспортных выбросов (Московский проспект, Ленинский проспект, Гвардейский проспект, площадь Василевского и т.д.). Выхлопные газы и соли тяжелых металлов (железа, меди, кобальта, никеля, кадмия, ртути, цинка), которые содержатся в выхлопах, наносят значительный вред растениям [7], цинк значительно изменяет содержание антиоксидантов в растениях, повышая их концентрацию [8]. Растения, произрастающие в близости от центральной автомобильной артерии города, находились в худших экологических условиях и накапливали наибольшее количество антиоксиданта АК. По мере усиления антропогенного загрязнения окружающей среды происходит увеличение содержания антиоксидантов [9], что может являться одним из физиологических механизмов адаптации к неблагоприятным условиям, в которых они вынуждены существовать.

Таким образом, максимумы накопления рутина, антоцианов и аскорбиновой кислоты наблюдались в листьях газонных растений, произрастающих на улицах, являющихся основными транспортными артериями города Калининграда. Высокий уровень компонентов антиоксидантной защиты можно использовать как тест – индикатор на загрязнение различными поллютантами. Повышенное содержание антиоксидантов может определять степень адаптационных способностей растений и позволяет выделить зоны с разным уровнем загрязнения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительных клеток // Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений. Москва: ВИНТИ, 1989. Т. 6. - С. 1-168.
2. Schmieden U., Wild A. Changes in Levels of α -Tocopherol and Ascorbate in Spruce Needles at Tree Low Mountain Sites Exposed to Mg^{2+} -Deficiency and Ozone // Z. Naturforsch. 1994. V. 49. -P. 171-180.

-
3. Hodges D.M., Andrews Ch. J., Johnson D.A., Hamilton R.J. Antioxidant Compound Responses to Chilling Stress in Differentially Sensitive Inbred Maize Lines // *Physiol. Plant.* 1996. V. 98. -P. 685-692.
 4. Verhoeven A.S., Adams W.W., Demming B. Xanthophyll Cycle Pigment Localization and Dynamics during Exposure to Low Temperatures and Light Stress in *Vinca major* // *Plant Physiol.* 1999. V. 120. - P. 727-760.
 5. Николаевский В.С. Биологические основы газоустойчивости растений. Новосибирск: Наука, 1979. - 278 с.
 6. Чупахина Г. Н., Масленников П. В. Методы анализа витаминов: практикум. – Изд-во КГУ, 2004. – С. 15-18.
 7. Gadallah M. A. A. Effect of Cd and Kinetin on Chlorofyll Content, Saccharides and Dry Matter Accumulation in Sunflower Plants // *Biol. Plant.* 1995. V. 37. - P. 233-240.
 8. К. Х. Юан, Ж. К. Ши, Ж. Жао, Х. Жань, К. С. Ху. Физиологический и протеомный анализ *Alternanthera philoxeroides* в условиях цинкового стресса // *Физиология растений*, 2009, Т. 56, №4. - С. 546-554.
 9. Половникова М. Г., Воскресенская О. Л. Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды // *Физиология растений*, 2008, Т. 55, №5. - С. 777-785.
-

АНТОЦИАНЫ – ВНЕПЛАСТИДНЫЕ ПИГМЕНТЫ ФЛАВОНОИДНОЙ ПРИРОДЫ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ БОРЕАЛЬНОЙ ЗОНЫ

Дымова О.В., Головки Т.К.

ФГБУН Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения
РАН, Сыктывкар, Россия, тел.:(8212)24-96-87; e-mail: dymovao@ib.komisc.ru

Обширный класс фенольных соединений – флавоноидов включает свыше 4500 различных соединений [1]. Антоцианы – наиболее распространенная группа окрашенных водорастворимых флавоноидов. Их присутствие придает окраску различным органам растений – листьям, стеблям, жилкам, цветкам, семенам, плодам. У высших растений эти пигменты представлены преимущественно синтезируемым в цитоплазме цианидин-3-О-глюкозидом, который путем активного транспорта поступает в вакуоль, где условия pH способствуют проявлению окраски. Наиболее полно изучены состав, содержание, пути и регуляция синтеза флавоноидов в цветках.

В листьях антоцианы локализованы, главным образом, в

вакуолях клеток верхнего и нижнего эпидермиса, а также в прилежащих клетках мезофилла. На их долю приходится до 30% общей радиации, поглощенной листьями антоцианосодержащих растений. Флавоноиды, в том числе антоцианы, имеют два максимума поглощения, один между 270-290 нм и другой в видимой области спектра 500-550 нм, пропускают свет синей и красной части спектра [2]. Функциональная роль антоцианов листьев до сих пор остается дискуссионной. Считается, что они способны защищать растения от неблагоприятных воздействий абиотических и биотических факторов среды и участвовать в нейтрализации образующихся при стрессе избыточных количеств активных форм кислорода [3-5]. Вместе с другими водорастворимыми флавоноидами, антоцианы поглощают УФ-радиацию и усиливают диссипацию энергии [6]. У многих видов растений они накапливались в ответ на экспозицию к УФ-В. Изогенные линии кукурузы с недостающими регуляторными генами биосинтеза антоцианов были более чувствительны к повреждающему действию УФ-В.

Целью работы было исследовать распространение антоциановых пигментов в листьях дикорастущих видов природной флоры бореальной зоны европейского Северо-Востока и выявить их возможную роль в устойчивости фотосинтетического аппарата модельных видов растений.

Образцы функционально зрелых листьев собирали с 20-25 растений, преимущественно в период бутонизация – цветение. Антоцианы экстрагировали из трех независимых проб листьев (0.3 г сырой массы) 1% раствором соляной кислоты при 45°C в течение 20 мин. и определяли на спектрофотометре UV- 1700 (Shimadzu, Япония) при 510 нм [7]. Накопление антоцианов в листьях рассчитывали в абсолютных (мг/г сухой массы) и относительных единицах (% от содержания хлорофиллов). Содержание хлорофиллов определяли в ацетоновых вытяжках из листьев.

Нами изучено около 40 видов сосудистых растений, принадлежащих к разным группам жизненных форм, в большинстве – к травам (свыше 70%). Как видно из табл. 1, концентрация антоцианов в листьях исследованных растений варьировала в широком диапазоне, от 0.01 до 1.9 мг/г сухой массы. Наименьшим содержанием антоцианов характеризовались листостебельные мхи и голосеменные. Концентрация антоцианов в листьях высших цветковых растений была на порядок больше. Не выявили связи ($r = 0.23$) между содержанием пластидных пигментов – хлорофиллов и внепластидных – антоцианов.

На модельных объектах показано влияние световых условий произрастания на накопление антоциановых пигментов. У затененных растений *Hylotelephium triphyllum* содержание антоцианов было вдвое меньше, чем у световых (2.1 мг/г). Основная часть антоцианов локализовалась в клетках верхней эпидермы листьев и придавала им красноватый оттенок. Накопление антоцианов происходило на фоне значительного уменьшения количества хлорофиллов. К фазе плодоношения относительное содержание антоцианов у теневых растений было в 5 раз меньше, чем у световых растений. Отмечено, что листья с высоким содержанием антоцианов быстрее старели и отмирали. Не исключено, что предшественниками антоцианов в данном случае могли служить продукты катаболизма белка [8].

Сезонная динамика содержания антоциановых пигментов была сильнее выражена в листьях *Ajuga reptans* под пологом леса, по сравнению с растениями, пересаженными из леса на открытый участок. Максимум накопления антоцианов в сформировавшихся к концу июня летне-зеленых листьях отмечали у световых растений в июле, теневых – в августе. Относительное содержание антоцианов в листьях световых растений было в 1.5-3 раза выше, чем у теневых. Весной (май) у перезимовавших листьев различия были не столь существенны.

Таблица 1

Содержание антоцианов и хлорофиллов (мг/ г сухой массы) в растениях природной флоры бореальной зоны

Виды	Хлорофиллы	Антоцианы	Антоцианы/ хлорофиллы, %
<i>Abies sibirica</i>	3.59 ± 0.18	0.040 ± 0.002	1.1
<i>Ajuga reptans</i>	8.78 ± 0.06	1.10 ± 0.10	12.5
<i>Arctous alpina</i>	2.30 ± 0.05	0.27 ± 0.02	11.7
<i>Astragalus norvegicus</i>	11.80 ± 0.70	0.49 ± 0.01	4.1
<i>Astragalus frigidus</i>	13.90 ± 0.50	0.55 ± 0.07	4.0
<i>Bartsia alpina</i>	4.00 ± 0.22	0.86 ± 0.10	21.5
<i>Betula nana</i>	5.10 ± 0.20	0.12 ± 0.01	2.4
<i>Climacium dendroides</i>	3.57 ± 0.29	0.011 ± 0.004	0.3
<i>Diapensia lapponica</i>	1.60 ± 0.05	0.26 ± 0.02	16.2
<i>Equisetum sylvaticum</i>	7.39 ± 0.31	0.03 ± 0.01	0.4
<i>Empetrum hermaphroditum</i>	2.50 ± 0.09	0.60 ± 0.06	24.0
<i>Gymnadenia conopsea</i>	5.41 ± 0.15	1.10 ± 0.20	20.3
<i>Hedysarum arcticum</i>	9.80 ± 0.40	0.06 ± 0.01	0.6
<i>Hylotelephium</i>	4.54 ± 0.13	1.70 ± 0.10	37.8

triphyllum			
Juniperus communis	3.40 ± 0.10	0.06 ± 0.01	1.8
Larix sibirica	1.90 ± 0.06	0.06 ± 0.01	3.2
Ledum decumbens	3.50 ± 0.13	1.11 ± 0.06	31.7
Pedicularis verticillata	8.20 ± 0.41	1.90 ± 0.06	23.2
Pentstemon fruticosus	4.70 ± 0.18	0.19 ± 0.03	4.0
Phyllodoce caerulea	2.67 ± 0.04	0.30 ± 0.01	11.2
Picea obovata	2.54 ± 0.02	0.010 ± 0.001	0.4
Pinus sibirica	2.40 ± 0.12	0.010 ± 0.001	0.4
Plagiomnium medium	4.08 ± 0.13	0.023 ± 0.006	0.6
Polytrichum commune	3.06 ± 0.08	0.019 ± 0.004	0.6
Pyrola rotundifolia	5.80 ± 0.28	0.25 ± 0.03	4.3
Pulmonaria obscura	3.48 ± 0.04	0.20 ± 0.03	5.7
Rhytidadelphus triquetrus	2.66 ± 0.13	0.024 ± 0.004	0.9
Rodiola rosea	6.70 ± 0.10	0.50 ± 0.05	7.5
Rubus chamaemorus	8.55 ± 0.43	0.24 ± 0.02	2.8
Rumex acetosa	0.31 ± 0.08	0.30 ± 0.03	96.8
Salix reticulata	4.90 ± 0.19	0.27 ± 0.03	5.5
Sedum acre	2.07 ± 0.11	1.40 ± 0.20	67.6
Sphagnum girgensonii	1.46 ± 0.06	0.014 ± 0.005	1.0
Trientalis europaea	5.69 ± 0.21	1.13 ± 0.05	19.8
Vaccinium uliginosum	2.71 ± 0.11	0.15 ± 0.01	5.5
Vaccinium myrtillus	4.30 ± 0.20	0.30 ± 0.02	7.0
Veratrum lobelianum	—	0.39 ± 0.09	—

Выявлено влияние условий произрастания на накопление антоциановых пигментов в листьях *Gymnadenia conopsea*, обитающего на известняковых обнажениях Южного Тимана (табл. 2). На юго-западном склоне (ЦП 2) растения содержали больше антоцианов как в абсолютном, так и в относительном выражении. На северо-западном склоне (ЦП 3) концентрация антоцианов в листьях растений была в среднем вдвое меньше. Растения луговой ценопопуляции (ЦП 1) занимали промежуточную позицию. Эти данные показывают, что в лучше освещенных и прогреваемых местообитаниях листья растений накапливали больше антоцианов. По степени благоприятности (свето- и теплообеспеченность, стабильность условий увлажнения, низкая подвижность грунта) среди всех местообитаний кокушника выделяется луг. В благоприятных условиях произрастания межгодовые различия в накоплении антоцианов проявлялись в меньшей степени.

Таблица 2

Содержание антоцианов (мг/г сухой массы) и их соотношение с хлорофиллами (%) в листьях *Gymnadenia conopsea* из разных ценопопуляций (ЦП) на Южном Тимане

ЦП	2003 г.		2004 г.		2005 г.	
	Антоцианы	Ант/Хл	Антоцианы	Ант/Хл	Антоцианы	Ант/Хл
1	1.1 ± 0.2	24.4	1.3 ± 0.2	22.1	1.3 ± 0.1	21.6
2	3.1 ± 0.1	54.7	1.5 ± 0.2	30.3	1.1 ± 0.1	22.3
3	0.9 ± 0.1	18.2	1.2 ± 0.2	17.4	0.6 ± 0.1	9.9

В экспериментах с *Plantago media* нами показано, что фотосинтетический аппарат листьев световых растений был более устойчив к воздействию УФ-С радиации. Подавление нетто-фотосинтеза и ингибирование ФС 2 теневых листьев наблюдали при более коротких экспозициях, что коррелировало с меньшим содержанием веществ фенольной природы.

Таким образом, количественный анализ выявил высокую видовую вариабельность содержания антоцианов в листьях растений. По сравнению с сосудистыми цветковыми видами концентрация антоцианов у листостебельных бриофитов и голосеменных была в 10-100 раз меньше. На модельных видах показано, что листья световых растений характеризовались повышенным относительным содержанием антоцианов. У теневых растений величина данного показателя была существенно больше. Это согласуется с представлениями о том, что антоцианы могут выступать как экранирующие агенты и участвовать в защите фотосинтетического аппарата от избыточной инсоляции, особенно в стрессовых условиях. Низкое содержание антоцианов у мхов, по-видимому, обусловлено их обитанием в затененных местах с повышенным увлажнением и способностью переносить без особого вреда длительное пересыхание.

Работа выполнена при поддержке гранта УрО РАН №12-С-4-1015 и частично грантов РФФИ № 07-04-00436 и №12-04-00554.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schwinn K.E., Davies K.M. Flavonoids // Plant pigments and their manipulation / Ed. Davies K. Oxford: Blackwell, 2004. P. 92-149.
2. Gitelson A.A., Merzlyak M.N., Chivkunova O.B. Optical Properties and Non-destructive Estimation of Anthocyanin Content in Plant Leaves // Photochem. Photobiol. 2001. V.74. P.38-45.
3. Gould K.S., Markham K.R., Smith R.H., Goris J.J. Functional Role of Anthocyanins in the Leaves of *Quintinia serrata* A.Cunn. // Journal of Experimental Botany. 2000. V.51. P.1107-1115.

-
4. Hoch W., Singaas E., McCown B. Resorption Protection. Anthocyanins Facilitate Nutrient Recovery in Autumn by Shielding Leaves from Potentially Damaging Light Leaves // Plant. Physiol. 2003. V.133. P.1296-1305.
 5. Hughes N.M., Neufeld H.S., Burkey K.O. Functional Role of Anthocyanins in High-light Winter Leaves of the Evergreen Herb *Calax urceolata* // New Phytologist. 2005. V.168. P.575-587.
 6. Jordan B.R. Plant pigments and protection against UV-B radiation // Plant pigments and their manipulation / Ed. Davies K. Oxford: Blackwell, 2004. P. 275-292.
 7. Муравьева Д.А., Бубенчикова В.Н., Беликов В.В. Спектрофотометрическое определение суммы антоцианов в цветках василька синего // Фармакология. 1987. Т.36. С.28-29.
 8. Маргна У.В. Взаимосвязь биосинтеза флавоноидов с первичным метаболизмом растений // Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия. 1990. Т. 33. 176 с.
-

РОЛЬ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА В РЕГУЛЯЦИИ СИМБИОТИЧЕСКОЙ АЗОТФИКСАЦИИ У БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ НА ПОЧВАХ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Заболотный А.И.¹, Будкевич Т.А.¹, Хрипач В.А.², Завадская М.И.², Бажанов Д.П.³

¹ Институт экспериментальной ботаники им.В.Ф.Купревича НАН Беларуси, Минск, тел. +375 17 284 20 50, e-mail: recology@biobel.bas-net.by

² Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, тел./факс: +375 17 267 86 47

³ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: D.Bazhanov@igc.bas-net.by

При решении проблемы ослабления токсического действия тяжелых металлов (ТМ) на рост и метаболизм растений на первый план для бобовых культур выдвигается задача защиты от токсикантов симбиотического аппарата, осуществляющего важнейшую функцию бобовых – фиксацию из воздуха молекулярного азота, который, метаболизируясь в растительном организме, играет существенную роль в азотном питании растений и обогащении ризосферы азотом. Как известно, основным условием при разработке средств минимизации повреждающего воздействия ТМ является сочетание у этих соединений свойств ростостимуляторов и металлопротекторов при отсутствии

отрицательного влияния на продуктивность растений. В этом отношении к настоящему времени успешно зарекомендовали себя brassinостероиды (гомо- и 24-эпибрассинолид) – полиоксигенированные стероидные фитогормоны, показавшие широкий спектр физиологического действия на сельскохозяйственные и дикорастущие растения, включая повышение жизнеспособности семян, контроль за процессами роста и развития, индукцию устойчивости к таким неблагоприятным факторам среды как осмотический, солевой, температурный, радиационный стрессы и воздействие патогенной микрофлоры [1-2].

Цель настоящей работы заключалась в изучении потенциальной возможности использования brassinостероидных препаратов в качестве экзогенного регулятора деятельности азотфиксирующей системы бобовых культур, подвергающейся ингибирующему воздействию ТМ на техногенно загрязненных территориях. Объектами исследования служили однолетние и многолетние высокобелковые бобовые культуры, широко используемые в сельскохозяйственном кормопроизводстве, но одновременно известные как биологические аккумуляторы ТМ – три вида люпина (узколистный, желтый и белый), клевер луговой, люцerneц рогатый [3]. Ранее нами было показано, что в корневых системах двух последних видов накапливаются преимущественно Ni и Cd, оказывающие повреждающее действие на структуры инфицированных клеток, в частности, тонопласта и мембран симбиосом [3,4]. В настоящих исследованиях основное внимание было сосредоточено на наиболее распространенных и токсичных металлах – Ni, Cd и Pb. В этот ряд был включен также Sr, малотоксичный элемент, радиоактивный изотоп которого в то же время является объектом пристального внимания практиков сельского хозяйства как загрязнитель кормовой продукции на землях, подвергшихся воздействию чернобыльских эмиссий. Для приближения условий проведения экспериментов к реально существующим уровням загрязнения почв ТМ в вегетационных опытах с почвенной культурой их вносили в субстрат в виде солей в составе смеси (Ni+Cd+Pb+Sr) и в дозах, превышающих кларки содержания этих элементов в почвах дерново-подзолистого типа не более, чем 2-3-кратно. В полевых опытах на территориях, прилегающих к авто- и железнодорожным магистралям, растения культивировали на почве с фоновым содержанием ТМ без дополнительного их внесения.

Эффективность воздействия обработки растений

препаратом «Эпин», содержащим в качестве активного действующего вещества 24-эпибрасинолид (ЭБ), на азотфиксирующую активность бобово-ризобиального комплекса изучали в двух вариантах экзогенной обработки растений: 1) 2-кратное опрыскивание вегетирующих растений в фазах бутонизации и начала цветения водным раствором ЭБ (10^{-7} М); 2) обработка семян перед посевом путем намачивания их в течение суток в водном растворе ЭБ (10^{-7} М) в объеме, затрачиваемом на обработку фотосинтезирующих органов растений при опрыскивании.

Активность азотфиксации оценивали по нитрогеназной активности корневых симбиотических клубеньков, которую анализировали в фазе полного цветения растений ацетилен-этиленовым методом Харди [5] в собственной модификации с использованием газового хроматографа «Chrom-5», снабженного колонкой «Селипор 600». С учетом морфологических особенностей корней и клубеньков разных видов растений показатели активности в $\mu\text{моль } \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ч}^{-1}$ рассчитывали у люпина на 1 г сырой массы клубеньков, у клевера и лядвенца – на 1 г сырой массы корней с клубеньками. Повторность в опыте по каждому варианту 6-8-кратная.

Сравнительный анализ показателей нитрогеназной активности исследуемых бобовых культур выявил существенные видовые различия не только в уровнях азотфиксации, но и чувствительности азотфиксирующего аппарата как к воздействию ТМ, их содержанию в почве ризосферы и корневых системах, так и к обработке растений фитогормональным препаратом. В условиях вегетационных опытов наиболее чувствительная реакция на действие каждого из этих факторов отмечена у лядвенца рогатого, более слабая – у клевера лугового. На супесчаной дерново-подзолистой почве, содержащей после внесения смеси ТМ Ni – 20,0 мг/кг, Cd – 6,0 мг/кг, Pb – 23,6 мг/кг, Sr – 17,6 мг/кг, нитрогеназная активность корневых клубеньков снижалась относительно контроля у лядвенца на 25-30 %, у клевера – на 15-20 %. 2-кратное опрыскивание растений водным раствором ЭБ (10^{-7} М) в начале репродуктивного периода восстанавливало активность азотфиксации у клевера до уровня контроля, у лядвенца – стимулировало до 1,5 раз (рис.).

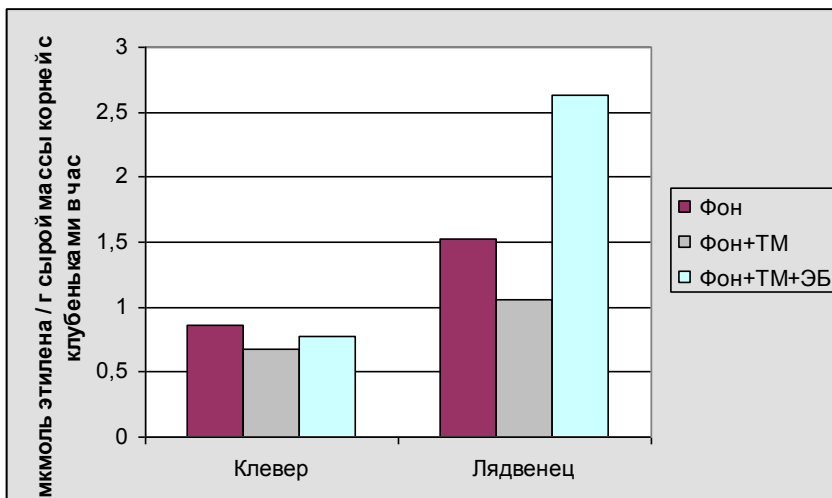


Рис. Влияние обработки надземных органов клевера лугового и лядвенца рогатого 24-эпибрасинолидом на нитрогеназную активность корневых клубеньков растений в условиях вегетационных опытов (средние данные за 2007-2008 гг.).

В полевом опыте, где пахотный слой почвы характеризовался более низким содержанием ТМ, чем в вегетационном эксперименте – Ni 5,8 мг/кг, Cd 0,60 мг/кг, Pb 11,5 мг/кг, также установлена зависимость уровней азотфиксирующей активности растений и чувствительности их к обработке фитогормональным препаратом от видовой принадлежности бобовых культур (табл.).

В ряду исследуемых видов люпина наиболее чувствительная реакция на обработку ЭБ наблюдалась у люпина желтого – при опрыскивании растений нитрогеназная активность корневых клубеньков возрастала в среднем в 1,7 , у люпина узколистного в 1,3 раза. Предпосевная обработка ЭБ семян люпина, испытанная в следующем вегетационном сезоне как один из способов применения препарата, была менее эффективной, однако у люпинов желтого и узколистного, при сохранении видовых различий в уровнях азотфиксации, отмечалась достаточно устойчивая тенденция к повышению нитрогеназной активности корневых клубеньков в вариантах с обработкой. (табл.). Воздействие ЭБ на нитрогеназную активность корневых клубеньков люпина белого при данном способе обработки практически не

проявилось. В определенной степени различия в эффективности способов обработки растений препаратом могут быть связаны с климатическими особенностями вегетационных сезонов - засушливого 2007 года и влажного, с высоким уровнем осадков 2008 года. С учетом информации об индуцировании ЭБ адаптивных механизмов растений на воздействие стресс-факторов [6], перспективным направлением дальнейших исследований представляется разработка для хозяйственно ценных видов бобовых культур диапазонов абиотических факторов среды, в пределах которых защитное действие 24-эпибрассинолида, связанное в первую очередь с активацией в структурах симбиотической системы (корнях и клубеньках) ферментов окислительного стресса, проявится наиболее эффективно.

Таблица 1.

Воздействие предпосевной обработки семян 24-эпибрассинолидом на нитрогеназную активность корневых клубеньков у различных видов люпина, выращиваемых в условиях полевого опыта

Вид, сорт	Вариант опыта	Нитрогеназная активность, $\text{мкмоль } \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{г}^{-1} \text{ клубеньков}$	
		2007 (2-кратное опрыскивание)	2008 (предпосевная обработка семян)
Люпин белый сорта Гамма	без обработки + ЭБ (10^{-7}M)	-	$40,3 \pm 11,3$ $38,1 \pm 11,6$
Люпин желтый сорта Жемчуг	без обработки + ЭБ (10^{-7}M)	$5,18 \pm 2,48$ $8,72 \pm 3,54$	$14,7 \pm 4,5$ $17,3 \pm 5,4$
Люпин узколистый сорта Хвалько	без обработки + ЭБ (10^{-7}M)	$3,56 \pm 0,21$ $4,79 \pm 1,00$	-
Люпин узколистый сорта Владлен	без обработки + ЭБ (10^{-7}M)	-	$9,6 \pm 2,9$ $10,6 \pm 4,5$

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы ориентированных фундаментальных исследований НАН Беларуси «Биорациональные пестициды» (2005-2008 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Хрипач В.А., Лахвич Ф.А., Жабинский В.Н. Брассинолиды. Минск: Наука и техника, 1993.
2. Заболотный А.И. Эпибрассинолид: рострегулирующее и радиопротекторное действие на растения люпина // Брассиностероиды – биорациональные, экологически безопасные регуляторы роста и продуктивности растений: Тез. 4-й научно-практ. конф. - Минск, 1995. С.19-20.
3. Заболотный А.И., Будкевич Т.А. Видовые особенности аккумуляции и распределения тяжелых металлов в бобовых растениях // Ботаника (исследования). Сб. научн. тр. Минск: Право и экономика, 2009. Вып.37. С. 343-357.
4. Цыганов В.Е., Заболотный А.И., Будкевич Т.А., Жернаков А.И., Ким В.И., Кулаева О.А., Демченко К.Е. Влияние кадмия на развитие и функционирование клубеньков у лядвенца рогастого (*Lotus corniculatus* L.) и лядвенца японского (*Lotus japonicus* (Regel.) K.Larsen) // Ботаника (исследования). Сб. научн. тр. Минск: Право и экономика, 2010. С. 343-357.
5. Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for N_2 -fixation: Laboratory and field evaluation // Plant Physiol. 1968. 43, N 8. P. 1185-1207.
6. Деревянчук М.В., Драч С.В., Литвиновская Р.П., Хрипач В.А., Кравец В.С. Влияние брассиностероидов на активность ферментативных антиоксидантов при действии осмотического стресса // Растение и стресс: Тез. докл. Всероссийского симпозиума (9-12 ноября 2010 г., Москва). Москва, 2010. С.126-127.

РАСТВОРИМЫЕ ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ПОЧВООБРАЗОВАНИЕ

Заварзина А.Г.¹, Заварзин А.А.², Гончарук Е.А.³, Загоскина Н.В.³

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова факультет почвоведения

²С-Петербургский государственный университет, биолого-почвенный факультет

³ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, e-mail: phenolic@ippas.ru

Фенольные соединения (ФС) широко распространены в растительном царстве и участвуют во многих физиологических процессах [1]. Им принадлежит важная роль и в окружающей среде, куда они поступают в виде метаболитов или продуктов деструкции

биомассы. Одним из важнейших биосферных процессов, идущих при непосредственном участии ФС, является образование почв - того субстрата, который составляет основу наземной жизни и жизни растений в частности. Обладая высокой реакционной способностью, ФС участвуют в формировании как минеральной, так и органической части почв.

Роль ФС в формировании минеральной части почв сводится в основном к выветриванию поверхности первичных минералов за счет образования растворимых комплексов, а также адсорбционному взаимодействию с высокодисперсными минералами с образованием нерастворимых органо-минеральных соединений. Известно, что многие ФС очень быстро и прочно сорбируются глинистыми минералами, время взаимодействия составляет минуты [2]. За счет необменной адсорбции и дальнейшего окисления общее содержание экстрагируемых низкомолекулярных ФС в почвах обычно не превышает 1%, значительно снижаясь от верхних (органогенных) горизонтов к нижним (минеральным) [3].

Важнейшей функцией ФС в формировании органической части почв является их участие в образовании гуминовых веществ (ГВ) - специфических для почв соединений, составляющих основу почвенного гумуса. ГВ и их ОМС являются характерными компонентами почв, отличающими почвы от других рыхлых минеральных отложений (грунтов, кор выветривания), они обуславливают благоприятные водно-физические свойства почв, удерживают элементы питания в доступном для растений состоянии, т.е. определяют плодородие почв и их функции в биосфере. Ключевой реакцией синтеза ГВ является окисление ФС грибными фенолоксидазами или почвенными минералами до фенокси-радикалов и хинонов. Они вступают далее в спонтанные реакции конденсации друг с другом, азотсодержащими соединениями, углеводами, липидами и др. с образованием темноокрашенных макромолекул – фульвокислот (ФК, ММ 0,5-5 лДа) и гуминовых кислот (ГК, ММ 5-100 кДа). Гумусовые кислоты могут образовываться 1) при конденсации растворимых ФС или 2) при окислительной трансформации полимеров (в основном лигнина, в меньшей степени меланинов) [4]. В первом случае синтез ГВ идет на/у поверхности минеральной фазы, обладающей каталитической активностью с образованием гумусовых пленок на поверхности минералов. Во втором случае частичная окислительная трансформация фенольных полимеров с включением в их структуру азотистых соединений и др. приводит к

образованию нерастворимых и высокомолекулярных ГК. Деструкция же лигнина, меланинов или ГК до растворимых продуктов приводит к образованию ФК, которые могут вымываться из почвенного профиля в природные воды, составляя основу водного гумуса.

Большинство современных почв развито под высшей растительностью и основным источником ФС, в том числе растворимых, является лигнин и продукты его трансформации и деструкции. Однако, в почвах суровых местообитаний (приполярных областях, мохово-лишайниковых тундрах, высокогорьях) высшие растения не образуют значительной биомассы, а в напочвенном покрове доминируют альго-микробактериальные сообщества и лишайники, относящиеся к пионерной литофильной микрофлоре. Считается, что эти сообщества, в том числе и симбиотические, господствовали в растительном покрове суши в течение около 1 млрд. лет до появления высших растений в раннем девоне [5, 6, что предполагает ведущую роль этих организмов в формировании первичного растительного и почвенного покрова и становлении наземных экосистем. Низшие растения не содержат лигнина, поэтому первоочередное значение для процессов гумификации и органо-минерального взаимодействия приобретают ФС иного происхождения, в особенности, обладающие хорошей растворимостью.

Роль ФС низших растений в процессах органо-минерального взаимодействия и гумификации практически не изучена. Известно, что у водорослей и бактерий ФС крайне мало. Фенольные полимеры – меланины, а также растворимые ФС продуцируют грибы, но грибы не образуют биомассы, значимой для накопления ГВ и ОМС. В связи с этим особый интерес приобретают лишенизированные грибы (лишайники) - симбиотические ассоциации гриба (обычно аскомицета) и фотобионта (зеленой водоросли и/или цианобактерии). Несмотря на медленный рост, лишайники могут образовывать сплошной напочвенный покров, в особенности кустистые и листоватые виды. Для многих лишайников характерна продукция так называемых лишайниковых веществ – сборной группы соединений преимущественно фенольной природы, среди которых наиболее распространены депсиды, депсидоны и антрахиноны. Существуют данные, что лишайниковые вещества участвуют в выветривании (разрушении) минералов [7].

Будут рассмотрены вопросы участия растворимых фенольных соединений, а также ферментов (в частности лакказы), в процессе почвообразования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 09-04-00570) и программ №15 и №28 Президиума РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука. 1993. 285 с.
2. Заварзина А.Г., Заварзин А.А. Лакказная и тирозиназная активности у лишайников // Микробиология. 2006. Т. 75. №5. С. 630-641.
3. Заварзина А.Г., Гончарук Е.А., Алявина А.К., Загоскина Н.В. Изменения в содержании растворимых фенольных соединений при деструкции растительного опада // сб. тезисов VI симпозиума по фенольным соединениям М.: ИФР РАН. 2009. С.33-34.
4. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во МГУ, 1990. 325 с.
5. Заварзин Г.А. Эволюция прокариотной биосферы: "Микробы в круговороте жизни". 120 лет спустя. Чтение им. С.Н.Виноградского. М.: МАКС Пресс, 2011. 144 с.
6. Соколов Б.А., Федонкин М.А. Ранние этапы развития жизни на Земле // Современная палеонтология. 1988. Т.2. М.: Недра. С.118-142.
7. Chen J., Blume H.-P., Beyer L. Weathering of rocks induced by lichen colonization – a review // Catena. 2000. V.39. P.121-146.

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ ВЕЩЕСТВ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В ЛИСТЬЯХ *RUBUS CHAMAEMORUS L.*

Захожий И.Г., Табаленкова Г.Н., Дымова О.В.

ФГБУН Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения
РАН, Сыктывкар, тел.: (8212) 24-96-87, e-mail: zakhozhii@ib.komisc.ru

Биосинтез и накопление фенольных соединений в онтогенезе растений является результатом реализации генетической программы и зависит от воздействия факторов внешней среды. Известно, что уровень накопления фенолов повышается при адаптации растений к неблагоприятным условиям обитания – высокой облученности, низкой температуре, недостатку влаги и элементов минерального питания. Причиной изменения качественного и количественного состава полифенолов при прохождении растительным организмом различных стадий развития является изменение интенсивности и направленности первичного и специализированного обмена веществ.

Фенольные соединения, содержащиеся в фотосинтетических тканях растений выполняют достаточно широкий круг функций,

одной из которых является защитная. Избыточный солнечный свет может вызывать фотодеструкцию пигмент-белковых комплексов фотосистем за счет генерации активных форм кислорода в электрон-транспортных цепях хлоропластов и прямого воздействия высокоэнергетического УФ излучения на биополимеры клеток. Фенольные соединения за счет эффективного поглощения части видимого и УФ излучения, способности дезактивировать активные формы кислорода, предотвращают развитие окислительного стресса и повреждение фотосинтетического аппарата.

Полифенолы, накапливающиеся в вегетативной массе растений, представляют огромный интерес и с практической точки зрения, как вещества, обладающие высокой биологической активностью. Продукты комплексной переработки растений, содержащих различные классы фенолов, нашли широкое применение в пищевой, фармацевтической и косметологической промышленности.

Морошка приземистая *Rubus chamaemorus* L. – многолетнее травянистое растение из семейства Rosaceae. Гипоарктический циркумполярный вид, широко распространен на болотах таежной и тундровой зоны. Морошка приземистая является ценным ресурсным видом. Имеются данные свидетельствующие о перспективности применения плодов данного вида как элемента функционального питания и при профилактике авитаминозов. Сведения о содержании биологически активных веществ в листьях растений менее многочисленны.

Целью работы было изучение сезонной динамики накопления фенольных соединений в листьях морошки приземистой и оценка антирадикальной активности выделенных из них экстрактивных веществ.

Изученные нами растения произрастали на открытом, хорошо освещенном участке мезоолиготрофного кустарничково-сфагнового болота вблизи г. Сыктывкара (61°57' с. ш. 50°11' в.д.). Сбор листьев осуществляли в начале активной вегетации, в период цветения, плодоношения и в конце вегетации. Растительные образцы высушивали до воздушно-сухого состояния и измельчали. Определение суммарного содержания растворимых фенольных соединений проводили по общепринятой методике с использованием реактива Фолина-Дениса [1]. Количественную оценку содержания флавонолов и антоцианов осуществляли по методике [2]. Для построения градуировочных кривых в качестве стандартов применяли катехин и рутин для суммы фенолов и флавонолов соответственно. Антирадикальную активность

метанольных экстрактов растительных образцов определяли методом спектрофотометрии стабильного свободного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) [3]. На основании полученных данных рассчитывали величину EC_{50} - величину «эффективного содержания» исследуемого образца, которая необходима для уменьшения количества свободных радикалов ДФПГ в 2 раза.

Полученные данные (табл.) показывают, что суммарное содержание фенольных соединений (в пересчете на катехин) в листьях *Rubus chamaemorus* варьирует от 65 до 200 мг/г сухой массы. Накопление фенолов в листьях морошки сильно изменялось в течение вегетации, достигая максимума в период плодоношения. В период весеннего отрастания побегов молодые листья содержали в 2-3 раза меньше фенолов по сравнению с периодом генеративного развития растений и плодоношения.

Таблица

Содержание фенольных соединений в листьях *Rubus chamaemorus* L., мг/г сухой массы, данные 2011 г.

Сроки отбора образцов	Сумма фенольных соединений	Флавонолы	Антоцианы	Антирадикальная активность, мг сухого в-ва/г ДФПГ
1 июня (отрастание побегов)	65.0±8.4	18.4±3.6	0.28±0.03	1614±68
15 июня (цветение)	141.1±8.7	24.9±0.5	0.23±0.02	775±9
19 июля (плодоношение)	197.4±2.4	27.1±0.3	0.49±0.02	685±17
19 августа (завершение активной вегетации, переход в состояние покоя)	116.5±3.6	18.6±5.1	0.72±0.04	1000±93

Содержание флавонолов в листьях растений (в пересчете на рутин) в течение вегетационного периода изменялось от 18 до 27 мг/г сухой массы. Флавонолы составляли от 15 до 28% суммы фенольных соединений. Их вклад в общую сумму был наибольшим у молодых листьев. Интересно отметить, что концентрация флавонолов была одинаковой у молодых и стареющих листьев.

Антоцианы составляли небольшую долю (менее 1%) от суммы фенольных соединений. Их максимальное содержание отмечали в стареющих листьях. Увеличение накопления антоцианов в стареющих листьях связано, по всей видимости, с катаболизмом белков и утилизацией выделяющихся при этом ароматических аминокислот. У молодых функционально активных листьев (начало цветения) концентрация антоцианов была вдвое меньше, чем у стареющих.

Известно, что фенольные соединения растительного происхождения обладают способностью нейтрализовать свободные радикалы, активные формы кислорода и продукты их взаимодействия с органическими молекулами. При изучении экстрактивных веществ листьев морошки приземистой установлено, что их антирадикальная активность изменялась пропорционально содержанию фенольных соединений и была наибольшей у листьев, отобранных в период плодоношения.

Исследование химического состава плодов и чашелистиков морошки свидетельствует о достаточно высоком – 100 и 162 мг/г сухой массы, соответственно, содержании в них суммы фенольных соединений. При этом, экстрактивные вещества, выделенные из чашелистиков, характеризовались высоким значением антирадикальной активности – 743 мг сухого в-ва/г ДФПГ, в то время как для плодов этот показатель составлял лишь 4423 мг сухого в-ва/г ДФПГ.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами выявлены закономерности сезонного изменения суммы фенольных веществ и отдельных классов фенолов в листьях морошки. Показана связь антирадикальной активности экстрактивных веществ листьев с накоплением в них фенолов.

Работа выполнена в рамках проекта Президиума РАН: «Видовое, ценоотическое и экосистемное разнообразие ландшафтов территории объекта Всемирного наследия ЮНЕСКО «Девственные леса Коми» № 12-П-4-1018.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методы биохимического исследования растений / под ред. Ермакова А.И. СПб.: Колос, 1972.
2. Государственная фармакопея СССР. вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. М.: Медицина, 1990.
3. Molyneux P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity // Songklanakarin J. Sci. Technol. 2004. V. 26. № 2. P. 211-219.

УДК 581.1

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ПОЛ, ОБРАЗОВАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ ПО МЕРЕ РОСТА КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ СТЕБЛЯ ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ

**Зубова М.В.¹, Нечаева Т.Л.², Гончарук Е.А.², Клейменова Ю.³,
Живухина Е.А.¹, Назаренко Л.В.³**

¹ Московский государственный педагогический университет, Москва

² ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва

³ Московский городской педагогический университет

Фенольные соединения являются одними из наиболее распространенных вторичных метаболитов, образование которых свойственно практически всем растительным клеткам [1]. Они принимают участие в самых разнообразных физиологических процессах, таких как фотосинтез, дыхание, формирование клеточных стенок, защите растений от различных патогенов и стрессовых факторов [2].

При проведении фундаментальных исследований по физиологии, генетике, молекулярной биологии и цитологии растений успешно используются клеточные культуры растений [3]. Характерной их особенностью является сохранение многих свойств интактных клеток. Это относится и к синтезу полифенолов, образование которых происходит в культурах *in vitro*. Именно в этой системе были изучены многие аспекты метаболизма этих веществ и его регуляции [4].

Одним из наиболее удобных объектов для исследования биосинтеза полифенолов являются ткани и клетки чайного растения, в том числе и культивируемые в условиях *in vitro* [5]. Это связано с тем, что для них характерна высокая способность к накоплению разнообразных соединений фенольной природы.

Известно, что в процессе жизнедеятельности растений всегда образуются активные формы кислорода, которые в стрессовых условиях приводят к развитию окислительного стресса – достаточно пагубного для них [6].

Важным показателем является уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ), свидетельствующий об изменениях в мембранах клеток и их ответа на окислительный стресс. Считается, что причиной окислительного стресса является не столько

продукция АФК, сколько нарушение баланса между их генерацией и удалением [7]. Последнее осуществляется системой антиоксидантной (или противooksидительной) защиты, включающей многочисленные антиоксиданты, классификация которых чрезвычайно разнообразна [8]. Наиболее часто их подразделяют на высокомолекулярные и низкомолекулярные компоненты [9]. К первым относятся различные ферменты, в том числе супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидазы и др., характеризующиеся высокой специфичностью действия по отношению к определенным формам АФК. Ко вторым - низкомолекулярные вещества, такие как аскорбиновая кислота, глутатион, каротиноиды, фенольные соединения и др., которые взаимодействуют с АФК и «нейтрализуют» их. Все эти компоненты антиоксидантной системы находятся в постоянном взаимодействии и поддержание их баланса важно для сохранения жизнеспособности растений. Следует также подчеркнуть, что изменения в антиоксидантной системе растительных клеток зависят от продолжительности и типа стрессового воздействия, а также от устойчивости самого растительного организма [6, 9].

Целью нашего исследования являлось изучение изменений в уровне ПОЛ, содержании низко- и высоко-молекулярных антиоксидантов (на примере, соответственно, фенольных соединений и пероксидазы) в процессе цикла культивирования каллусной культуры чайного растения.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлась гетеротрофная каллусная культура стебля чайного растения (*Camellia sinensis* L.), выращивая в условиях факторостата в темноте на модифицированной питательной среде Хеллера, содержащей 2,4-Д (5 мг/л) и глюкозу (20 г/л) [10]. Длительность пассажа составляла 45 дней. При проведении исследования каллусные культуры анализировали через каждые 7 дней и определяли их морфо-физиологические характеристики, прирост каллусной массы и ее оводненность (высушивание при 70°C) [11].

Фенольные соединения извлекали из свежей каллусной ткани 96%-ным этанолом. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание суммы растворимых фенольных соединений (с реактивом Фолина–Дениса; поглощение при 725 нм) [12]. Калибровочную кривую строили по (-)-эпикатехину.

Для определение активности гваякол-зависимых пероксидаз каллусную ткань растирали в холодном 0,066 М К/Na фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем поликлар АТ (1% от

навески). Гомогенат центрифугировали (20 мин, 13000 об/мин) и надосадочную жидкость использовали для определения активности пероксидазы ранее описанным методом на основании ее реакции с гваяколом (спектрофотометрирование при 460 нм) [13].

Содержание белка определяли по методу Брэдфорд [14].

Определение перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводили по накоплению малонового диальдегида (МДА), определяемого по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой при длине волны 532 нм [15].

Статистическая обработка. Все определения проводили в трех биологических и 2-3 аналитических повторностях. Результаты обрабатывали статистически. На диаграммах представлены средние арифметические значения определений и их квадратичные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гетеротрофная каллусная культура стебля чайного растения представляла собой медленно растущий плотный каллус светло-бежевого цвета. К концу пассажа она приобретала более темный цвет, что, вероятно, является следствием ее старения. Для каллусной культуры чайного растения характерна достаточно низкая скорость роста, которая носит почти линейный характер (рис. 1 А).

Важным аспектом при оценке роста каллусных культур является определение их оводненности. Как следует из полученных данных в культуре чайного растения она была достаточно высокой и составляла 92-94% (рис. 1 Б). Более высокий ее уровень характерен для завершающих фаз роста, что свидетельствует об усилении процесса растяжения клеток и их вакуолизации [25].

Как уже отмечалось выше, в клетках растений всегда присутствуют активные формы кислорода, что естественно отражается на протекающих в них метаболических процессах, в том числе и структурной организации мембран, о чем косвенно свидетельствует на уровень ПОЛ [26]. Как следует из полученных нами данных, на начальных этапах (7-14 дни) этот показатель возрастал, а потом резко снижался до минимального значения к 21-му дню (рис. 2). В дальнейшем же он практически линейно увеличивался до конца пассажа и превышал исходные значения (7 день роста) почти в 4 раза.

Это свидетельствует о значительных изменениях в функционировании антиоксидантной системы и, как следствие, изменениях в структуре мембран. В нашем случае мы остановили

внимание лишь на таких компонентах антиоксидантной системы, как пероксидаза и фенольные соединения.

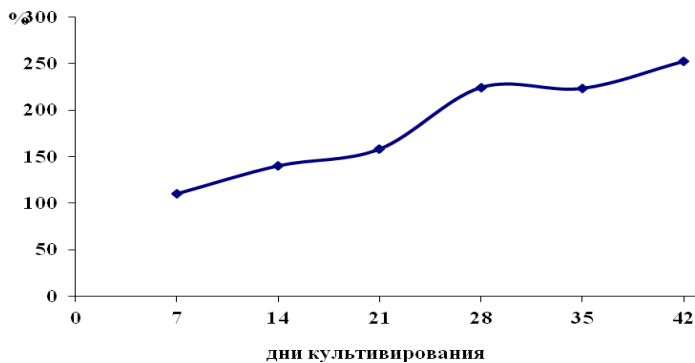


Рис. 1. Динамика роста каллусной культуры стебля чайного растения

Таблица
Динамика содержание воды в каллусной культуре стебля чайного растения

Оводнен- ность, %	Дни культивирования					
	7	14	21	28	35	42
	92,32± 0,53	93,74 ± 0,31	93,54 ± 0,97	93,68 ± 0,34	94,07 ± 0,31	94,07 ± 0,35

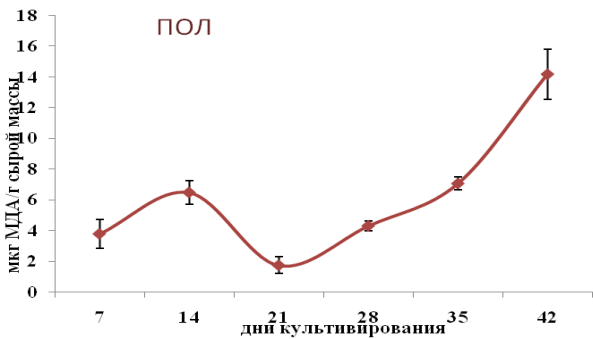


Рис. 2. Изменение уровня ПОЛ по мере роста каллусной культуры стебля чайного растения.

В то время как уровень ПОЛ к 14 дню культивирования возрастал, а к 21 - снижался, накопления суммы фенольных соединений и активность пероксидазы имели прямо противоположные тенденции: к 14 дню уменьшались до своих минимальных значений, а к 21 – увеличивались (рис. 3).

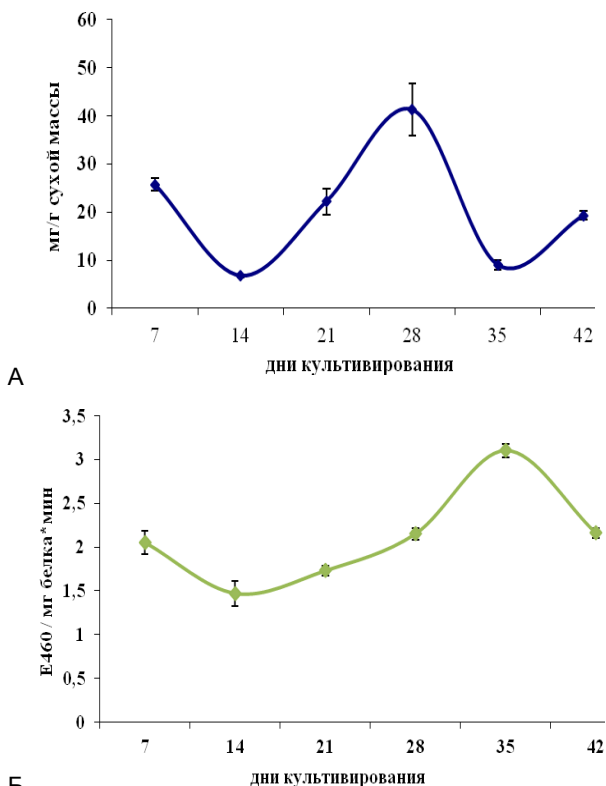


Рис. 3. Изменения в суммарном содержании фенольных соединений (А) и активности пероксидазы (Б) по мере роста каллусной культуры стебля чайного растения.

В случае низкомолекулярных антиоксидантов корреляция с уровнем ПОЛ прослеживалась лишь в период с 21 по 28 день культивирования, после чего количество фенольных соединений резко уменьшалось к 35-дню, а к концу цикла незначительно возрастало (рис. 2 и 3 А).

Что же касается высокомолекулярных антиоксидантов, в частности пероксидазы, то изменения в ее активности в

определенной степени коррелировали с уровнем ПОЛ в период с 21 по 35 день роста. В дальнейшем этой тенденции уже не отмечалось, а именно ее уровень снижался, тогда как уровень ПОЛ продолжал возрастать.

Из всего выше изложенного следует, что повышение уровня ПОЛ в каллусной культуре чайного растения в конце пассажа, в определенной степени, может быть следствием снижения уровня эндогенных антиоксидантов, как высок- так и низкомолекулярных форм. И именно этот факт, вероятно и является причиной старения культуры, проявляющейся в потемнении каллусов и формировании некротических участков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука. 1993. 250 с.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растений. 56-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 1996. 25 с.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК– ПРЕСС. 1999. 185 с.
4. Левенко Б.А. Биотехнология растений: сегодня и завтра // Физиология и биохимия культурных растений. 1999. Т.31. С.163-171.
5. Запрометов М.Н., Загоскина Н.В. Еще одно доказательство участия хлоропластов в биосинтезе фенольных соединений // Физиология растений. 1987. Т.34. С. 165–172.
6. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. – М. 2007. 140 с.
7. Колупаев Ю.Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции // Вестн. Харьковского нац. аграрн. ун-та. Сер. Биология. 2007. Вып. 3. С. 6-26.
8. Прадедова Е.В., Ишеева О.Д., Салаяев Р.К. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 177-185.
9. Кордюм Е.Л., Сытник К.М., Бараненко В.В. и др. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. Киев. 2003. 275 с.
10. Корецкая Т.Ф., Запрометов М.Н. Культура ткани чайного растения (*Camellia sinensis*) как модель для изучения условий образования фенольных соединений // Физиол. растений. 1975. Т.22. С.282–285.
11. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: Биокон. 2011. С. 386-402.
12. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука. 1971. С.185-197.
13. Henry E., Jordan W. The enzymes response of pea (*Pisum sativum*) stem sections to applied indolacetic acid, gibberellic acid and etrel: catalase,

-
- peroxidase and polyphenoloxidase // Z. Pflanzenphysiol. 1977. B.2. P. 321-325.
14. Bradford M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V.72. P.248-254.
15. Лукаткин А. С., Голованова В. С. Интенсивность перекисного окисления липидов в охлажденных листьях теплолюбивых растений // Физиология растений. 1988. Т. 35. С. 773-780.
-

СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛИСТЯХ САМШИТА В НОРМАЛЬНЫХ И НЕКОМФОРТНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ УСЛОВИЯХ

Иванова Р.А.

Институт генетики и физиологии растений, Академия наук Молдовы, г.
Кишинев, Республика Молдова, тел.(3732)530177, e-mail:
ralivanova@yahoo.com

Самшит вечнозелёный (*Busus sempervirens*), являясь растением субтропической зоны, широко высаживается и относительно хорошо произрастает в климато-почвенных условиях Республики Молдова. Однако, температурные условия этой климатической зоны не всегда являются достаточно комфортными для данного растения, так как варьируют в широком диапазоне от – 25оС (зимой) до + 39оС (летом). В качестве индикатора физиологического состояния растения, произрастающего в естественных условиях, может быть использован показатель синтеза и накопления вторичных метаболитов, в частности фенольных соединений. В отличие от большинства других веществ вторичного метаболизма, фенольные соединения являются универсальными компонентами растительной ткани [1,2]. Они играют важную роль в процессах фотосинтеза и дыхания, роста, развития, репродукции и иммунитета растений [1,3-5]. Механизм действия на рост связывают с их влиянием на гормональный обмен, что может выражаться как в стимулирующем, так и в ингибирующем воздействии. Такое двустороннее действие зависит от концентрации вещества и их строения, а также от фазы развития растения. Известно, что фенольные соединения, являясь дыхательными пигментами, играют важную роль в осуществлении некоторых промежуточных этапов процесса дыхания растений. Они

способны переходить в окисленные (хиноидные) формы, а затем, присоединяя водород от дыхательных субстратов вновь восстанавливаться в исходные соединения. Таким образом, они участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. Следовательно, их качественный состав и количество изменяется в зависимости от интенсивности биохимических процессов, происходящих в клетках растения, которые в свою очередь зависят от условий произрастания. До сих пор нет ясности в вопросе о вкладе фенольных соединений в защиту растений от ряда неблагоприятных факторов внешней среды, к которым относится и температурный стресс.

Целью настоящей работы явился сезонный мониторинг изменений количества фенольных соединений и антиоксидантной активности клеточного сока листьев самшита, произрастающего в естественных условиях на территории Республики Молдова.

Клеточный сок выделяли методом прямого прессования листьев. Общее количество фенольных веществ определяли методом Фолина-Чокалтэу [6], а антиоксидантную активность выявляли *in vitro* потенциометрическим методом с использованием в качестве генератора реакционноспособных пероксид радикалов 2,2-азобис(2-амидинопропан)дигидрохлорида [7]. Эффект связывания свободных радикалов выражали в процентах по сравнению с контролем, не содержащим антиоксиданты [8].

Во избежание ошибок связанных с возрастными различиями в синтезе и накоплении вторичных метаболитов, исследовали клеточный сок листьев второго года развития. Собранные листья выдерживали в темноте при комнатной температуре в течение 12 часов, чтоб уменьшить эффект суточной вариации фенольных соединений, обеспечив сопоставимые искусственно созданные "предрабсветные условия" [9].

Наблюдения были начаты весной 2010 года и для завершения полного цикла продолжались до зимы 2012. Весенние сезоны 2010 и 2011 годов практически не различались ни температурными режимами, ни осадками. Средняя температура воздуха в эти сезоны составляла 9,1-11,1°C. Нами установлено, что в достаточно комфортных температурных условиях конца марта – начала мая, когда дневные температуры изменялись в пределах +10 - +25°C, в клеточном соке листьев самшита содержится от 0,69 до 0,84 мг/мл фенольных соединений. При повышении температуры воздуха выше комфортных наблюдали значительные изменения количества фенольных соединений в

листьях самшита.

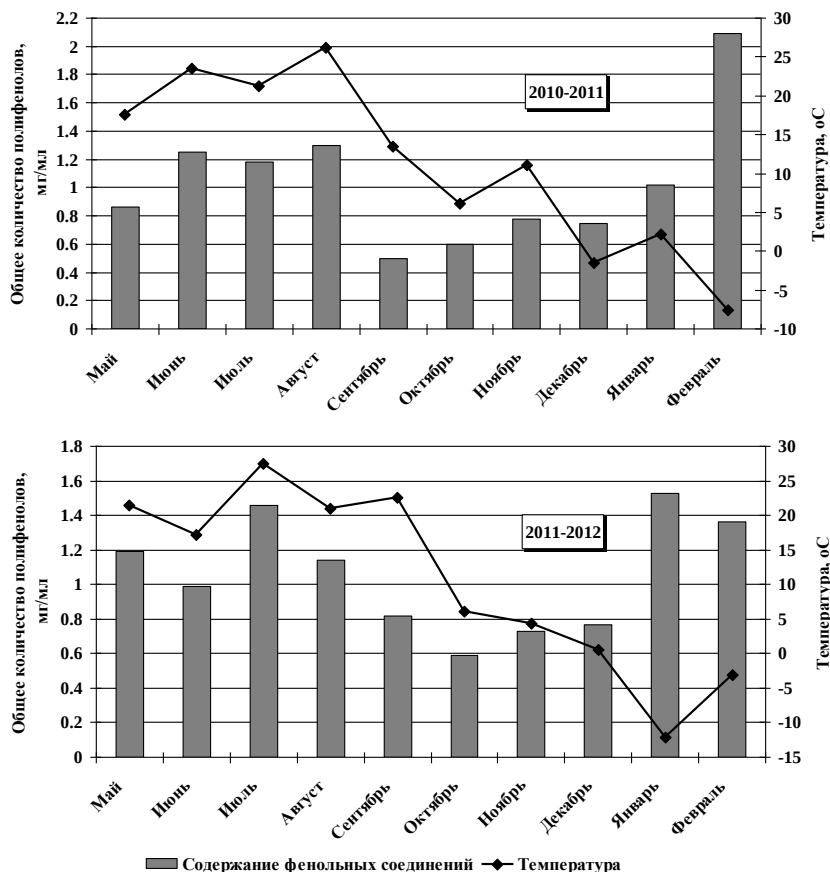


Рис. 1. Сезонные изменения температуры воздуха и количества фенольных соединений в листьях самшита

На рисунке 1 представлены результаты исследований, проведенные в последнюю неделю каждого месяца и значения среднесуточных температур в период проведения исследования. Данные, представленные на рис.1, позволяют проследить четкую зависимость содержания фенольных соединений в клеточном соке листьев самшита от флуктуации сезонных температур. Так в конце мая 2010 года клеточном соке листьев самшита было обнаружено $0,86 \pm 0,04$ мг/мл фенольных веществ, а в тот же период 2011 года их содержание было 1,4 раза больше и составляло $1,19 \pm 0,01$ мг/мл

(рис.1). Необходимо отметить, что вторая половина мая 2011 года была на 4-6°C теплее этого же периода 2010 года. В июне же 2010 года повышение среднесуточной температуры окружающей среды до 23,5°C (дневные температуры достигали +30,7°C), привело к увеличению содержания фенольных веществ в клеточном соке листьев самшита до 1,25±0,03 мг/мл. Однако, июнь 2011 года по сравнению с маем этого года наоборот характеризовался как более холодный, что отразилось на синтезе и накоплении фенольных соединений в листьях, содержание которых не превышало 0,99±0,02 мг/мл (рис.1).

Максимальное накопление фенольных соединений в клеточном соке листьев за весенне-летний период наблюдали в самые жаркие месяцы года, в августе 2010 и июле 2011. От года к году количество выявляемых соединений несколько отличается (на 10-15%), но тенденция сохраняется. Повышенные температуры воздуха конца июля и начала августа приводят в действие защитные механизмы растения, выражающегося в интенсификации синтеза фенольных соединений. Первые осенние похолодания, обычно наблюдаемые в конце сентября или начале октября, способствуют резкому торможению этого процесса. При этом количество, выявляемых фенольных соединений в клеточном соке, сокращается примерно в 2,5 раза. Преодолев период адаптации к резкому снижению летних температур (в ноябре-декабре обоих годов наблюдения), листья восстанавливают содержание фенольных соединений в пределах 0,73-0,77 мг/мл.

Исследования клеточного сока листьев самшита, проведенные в зимний период, позволили выявить еще один максимум накопления фенольных веществ, превышающий летний в 1,4-1,6 раза. Повышенное содержание фенольных соединений выявили в самые холодные периоды, в феврале 2011 и январе 2012. В конце февраля 2011 года был зарегистрирован абсолютный минимум зимних температур, среднесуточная температура 24 февраля составила -10,5°C. Что касается зимнего сезона 2012 года в Республике Молдова, он был холоднее примерно на 2,5°C, чем обычно. Начиная с 26 января 2012, установилась морозная погода, средняя температура воздуха была на 7-12 оС ниже нормы. Этот факт отразился и на реакции растений. Накопление фенольных соединений в листьях самшита в период зимней акклимации, вероятно, является ответом на условия окружающей среды, при которых происходит фотоингибирование. Представленные нами данные, подтверждают наличие единого механизма фотозащиты, индуцируемого в листьях самшита как

ответной реакции на суб- и супра- оптимальные температуры. Аналогичные выводы были сделаны ранее К. Normaetxe с соавторами [9, 10].

Параллельно исследовали антиоксидантную активность клеточного сока листьев самшита. Установлено, что клеточный сок листьев самшита также как и по количеству фенольных веществ, так и способностью улавливать свободные радикалы значительно различается в зависимости от сезона года. При этом, в наших экспериментах ранее было определено, что эти два показателя имеют прямую пропорциональную зависимость между собой [11]. Коэффициент корреляции Пирсона составляет $r^2=0.8233$ ($p>0.01$). В этой связи, сезонные кривые изменения антиоксидантной активности клеточного сока имеют те же два пика максимальных значений и осенний минимум, что и содержание фенольных соединений. В течение двух лет наблюдений, максимальное значение антиоксидантной активности клеточного сока было $87,29 \pm 4,36\%$ (февраль 2011 года), минимальное - $28,66 \pm 1,43\%$ (сентябрь 2010). Клеточный сок листьев самшита, находящихся в комфортных условиях, характеризовался антиоксидантной активностью $40,10-54,36\%$.

Из вышесказанного можно заключить, что существует единый механизм ответной реакции листьев самшита на температурные условия выше и ниже комфортных, в частности повышение содержания фенольных соединений в клеточном соке и увеличение антиоксидантной активности его. Измерение этих показателей может быть использовано в оценке абиотического стресса, оказываемого на растения окружающей средой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Harborne J.B. Plant phenolics. In: Bell E.A, Charlwood B.V. (eds) Encyclopedia of Plant Physiology, volume 8 Secondary Plant Products, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg-New York, 1980, pp. 329-395
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения: 56-е Тимирязевское чтение, 1995, 44 с.
3. The Flavonoids: Edited by Harborne J.B. Chapman & Hall, London and New York, 1994, 676 p.
4. Nicholson R.L., Hammerschmidt R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. //Annual review of phytopatology, 1992, 30, pp. 369-389.
5. Dixon R.A., Paiva N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. //Plant Cell, 1995, 7 (7), pp. 1085–1097.
6. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenolics and other oxidation substrates and antioxidants by means of

-
- Folin-Ciocalteu reagent. // In book: Methods in Enzymology, Part A., 1999, pp.152-178.
7. Sano M., Yoshida R., Degawa M. et al. Determination of peroxy radical scavenging activity of flavonoides and plant extracts using an automatic potentiometric titrator. //J.Agric.Food.Chem., 2003, 51 (10), p.2912-2916.
 8. Ivanova R. The potentiometric assay for measurement of peroxy radical scavenging capacity of plant extracts. //Herba polonica, 53 (2), 2007, p.136-137.
 9. Hormaetxe K., Becerril J. M., Hernández A., Esteban R., García-Plazaola J. I. Plasticity of photoprotective mechanisms of *Buxus sempervirens* L. leaves in response to extreme temperatures. //Plant Biol., 2007, 9, pp. 59-68.
 10. Hormaetxe K., Becerril J. M., Fleck I., Printo M., Garcia-Plazaola J.I. Functional role of red (retro)-carotenoids as passive light filters in the leaves of *Buxus sempervirens* L.: increased protection of photosynthetic tissues? //Exp. Botany, 2004, 56 (420), pp.2629–2636.
 11. Ivanova R. Monitoring of phenolics content and antioxidant activity changing in cell sap of *Buxus sempervirens* leaves. //Materiale conferintei comemorative „Structura si functionalitatea sistemelor biologice – diversitatea si universalitate”, Chisinau, 2011, pp.90-93.
-

УДК 581.1

СОДЕРЖАНИЕ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНАХ *BRASSICA. OLERACEA* L. И *B. NAPUS* L.

Калашникова Е.А., Май Дык Чунг

Российский государственный аграрный университет-МХХА имени К.А.
Тимирязева, Москва, Россия, e-mail: kalash0407@mail.ru

Важным направлением в современной селекции является создание улучшенных и принципиально новых генотипов сельскохозяйственных растений, обладающих единичной, групповой или комплексной устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам среды при сохранении и повышении их продуктивности и качества. Рациональное сочетание методов классической селекции с биотехнологическими методами позволяет решать поставленные задачи в более короткий срок.

Метод культуры изолированных пыльников и микроспор – один из перспективных способов получения гаплоидных растений. Культура микроспор и пыльцы является удобным экспериментальным объектом для фундаментальных

исследований, касающихся регенерации в одноклеточных системах. Кроме того, правильный подбор условий культивирования, обеспечивающих дифференцировку эмбриоидов из репродуктивных органов (микроспоры и семяпочки) и сравнение этого процесса с процессом формирования соматических и зиготических зародышей является предметом биохимических и морфологических исследований, а также опытов по изучению молекулярных механизмов, специфичных для эмбриогенеза. Получение растения из микроспор в культуре изолированных пыльников является наиболее распространенным методом создания гомозиготных линий многих видов *Brassica*. Однако этот процесс зависит от ряда взаимосвязанных факторов, каждый из которых оказывает свое влияние на морфогенетические процессы при культивировании изолированных пыльников и микроспор *in vitro*. Для некоторых культур показано, что эмбриогенез зависит от генетических, физиологических причин, стадии развития бутона и микроспор, а также факторов внешней среды, в частности, состава питательной среды (минеральный и гормональный состав) и условий культивирования (жидкие, твердые питательные среды, световой и температурные режимы). Кроме того, этот процесс зависит и от процентного содержания микроспор, находящихся на оптимальной стадии развития для индукции пыльцевого эмбриогенеза в момент инокуляции пыльника. Результаты исследований показали, что до сих пор эмбриогенез в культуре пыльников *in vitro* различных видов *Brassica* происходит спонтанно и имеет низкую частоту выхода гаплоидных растений (1-4%), а также предлагаемые технологии трудно воспроизводимы и недостаточно изучены на каждом этапе андрогенеза.

Одним из факторов, лимитирующих процесс прямого эмбриогенеза является синтез фенольных соединений (ФС), участвующих в основных процессах роста и развития растений. ФС в изолированных тканях окисляются различными фенолазами, что приводит к образованию продуктов окисления фенолов, которые ингибируют процессы деления и дифференцировки, тем самым оказывая соответствующее влияние на жизнеспособность и морфогенез первичного экспланта. В связи с этим представляет интерес изучение накопления ФС в репродуктивных органах растений различных видов *Brassica* с целью подбора оптимального первичного экспланта, обладающего повышенной морфогенетической активностью.

Работу проводили на сортах и гибридах F_1 представителей рода *Brassica*: белокочанной капусте (*B. oleracea* L.): гибрид F_1

Юбилей, сорт Клаус, линии ЭТ1 и АМФ 3Л; и рапсе (*B. napus* L.): гибрид WF×Титан. Растения – доноры выращивали в теплице на Селекционной станции им. Н.Н. Тимофеева РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Для извлечения фенольных соединений использовали свежий растительный материал (бутоны разного размера - 1 мм, 2-3 мм, 4-5 мм, 7-9 мм), который экстрагировали 96%-ным этанолом. В полученных экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание фенольных соединений с использованием реактива Фолина-Дениса. Калибровочную кривую строили по рутину.

Установили, что содержание ФС в бутонах белокочанной капусты и рапса существенно изменяется в зависимости от размера первичного экспланта. При этом, для всех изучаемых генотипов растений отмечается обратная корреляция между размером бутона и накоплением полифенолов в тканях. Так, при размере бутона 1 мм - содержание ФС находится в пределах от 92,46 до 114,24 мг/г сырой массы; при размере 2-3 мм - от 90,14 до 92,58 мг/г сырой массы; при размере 4-5 мм от 82,20 до 85,8 мг/г сырой массы; при размере 7-9 мм - от 50,79 до 55,63 мг/г сырой массы. Культивирование изолированных бутонов различного размера на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи В₅, кинетин 1 мг/л, НУК 0.5 мг/л приводило к образованию эмбриоидов с частотой 4% лишь в варианте с использованием бутона размером 2-3 мм. В остальных вариантах формирование растений не происходило.

УДК 581.1

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУРАХ И РАСТЕНИЯХ-РЕГЕНЕРАНТАХ МОРКОВИ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ГРИБА *ALTERNARIA RADICINA*

Калашникова Е.А.¹, Гончарук Е.А.², Загоскина Н.В.²

¹Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия, e-mail: kalash0407@mail.ru

²ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, e-mail: phenolic@ippras.ru

Высшие растения образуют различные вторичные метаболиты, в том числе и фенольной природы [1]. Функции этих

веществ связаны с процессами фотосинтеза, дыхания, а также устойчивости к различным стрессовым воздействиям, в том числе и к действию патогенов [2, 3].

Для моркови наиболее распространенным и опасным фитопатогеном является *Alternaria radicina* (черная гниль), вызывающая мацерацию тканей [4]. При этом происходит побурение нижней части стебля, листовой пластинки, соцветия и семян в процессе онтогенеза растений, а также корнеплодов (при их хранении). В связи с этим одним из важных направлений современной селекции является создание устойчивых форм, сортов и гибридов моркови. Успешное решение данной проблемы может осуществляться не только традиционными методами селекции, но и с использованием биотехнологических подходов, позволяющих повысить эффективность работы в данном направлении. Ведущее место в этом случае занимает клеточная селекция, позволяющая в условиях *in vitro* проводить отбор клеточных популяций, устойчивых к селективному фактору (например, фитопатогену или его экзометаболитам), а затем и регенерировать целые растения с повышенной устойчивостью [5]. Однако нельзя забывать и тот факт, что в условиях действия биотических факторов, в том числе патогенов, происходят изменения морфофизиологических характеристик растений, подавляется их рост и снижается продуктивность [6]. Изменяются и метаболические процессы, в том числе и биосинтез фенольных соединений, которые, как известно, участвуют в защите клеток как от проникновения патогенов, так и действия их метаболитов [3, 7, 8].

Учитывая важную роль фенольных соединений в защитных реакциях, целью нашего исследования являлось изучение изменений в их накоплении и составе на примере клеток суспензионных культур моркови, культивируемых в стандартных условиях или в присутствии экзометаболитов патогена *Alternaria radicina* (стрессовые условия), а также в полученных из них растениях-регенерантах.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Объектом исследования служили два генотипа моркови, обладающие различной полевой устойчивостью к грибу *Alternaria radicina*. Линия 906 относилась к среднеустойчивой группе, выведенной в Институте селекционных исследований Германии из сортотипа Нантская. Генотип *Rondo* являлся неустойчивым сортом, полученным в Германии. Семена этих культур были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории селекции и семеноводства овощных культур ВНИИОвощеводства (Московская

обл., Россия).

Клеточную селекцию проводили на суспензионной культуре полученной из хорошо пролиферирующей каллусной ткани, выращенной на питательной среде Мурасига и Скуга, содержащей 2,4-Д 1,5 мг/л, сахарозу 2% и агар 0,8% [9]. Суспензию клеток выращивали в колбах (в 20 мл питательной среды) на аппарате роллерного типа со скоростью вращения 100 об/мин. Пересадку культуры проводили через 14 суток.

В качестве селективного фактора использовали культуральный фильтрат *A. radicina*, содержащий экзометаболиты гриба, который добавляли в питательную среду в концентрациях 30% или 50% от конечного объема питательной среды. После селекции, суспензионную культуру платировали на агаризованную питательную среду, получали микрокаллус, из которого в дальнейшем получали растения-регенеранты.

Для извлечения фенольных соединений использовали свежий растительный материал (клеточную массу суспензий и ткани растений-регенерантов и) экстрагировали 96%-ным этанолом. В полученных экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание фенольных соединений с использованием реактива Фолина-Дениса [10]. Калибровочную кривую строили по рутину.

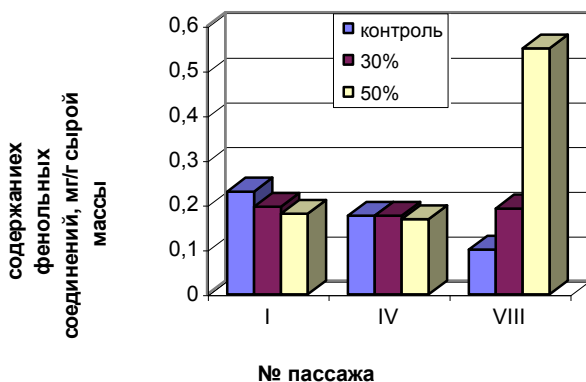
Состав фенольных соединений анализировали методом тонкослойной хроматографии на микрокрасталлической целлюлозе [11]. В качестве растворителя использовали систему н-бутанол+уксусная кислота+вода (40:12:28, по объему). Идентификацию веществ проводили на основании их флюоресценции в ультрафиолетовом свете, а также по качественной реакции с 1%-ным водным раствором хлорного железа и красной кровяной соли

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

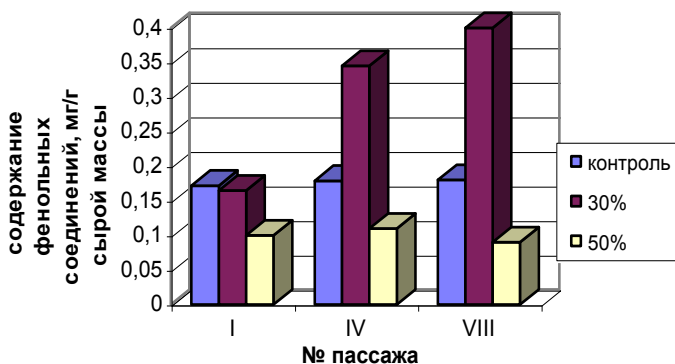
Известно, что устойчивость растений к патогенам часто коррелирует с содержанием в них фенольных соединений [3, 7]. В связи с этим первоочередной нашей задачей являлось сравнение изменений в накоплении этих вторичных метаболитов при длительном культивировании клеточных суспензий как в контрольных, так и стрессовых условиях, а именно в присутствии 30%-ного или 50%-ного культурального фильтрата патогена (рис. 1).

Как следует из полученных данных при культивировании суспензионной культуры моркови в стандартных и стрессовых условиях (присутствие в питательной среде экзометаболитов гриба

Alternaria radicina в различных концентрациях) приводит к изменению суммарного содержания растворимых фенольных соединений, которое зависит как от исследуемого генотипа, так и от условий культивирования.



А



Б

Рис. 1. Изменения в содержании растворимых фенольных соединений в суспензионных культурах моркови, культивируемых в стандартных (контроль) и стрессовых (присутствие экзометаболитов *A. radicina* – 30% и 50% культурального фильтрата) условиях.

А - сорт Rondo, Б - линия 906 (сортотип Нантская)

Например, присутствие культурального фильтрата патогена в питательной среде в различных концентрациях приводило к уменьшению синтеза фенольных соединений в среднем на 10-12%

по сравнению с контролем во время I-го пассажа (Рис. 1). Причем для линии 906 воздействие селективного фактора (50% КФ) существенно повлияло на снижение их количественного содержания (на 42%).

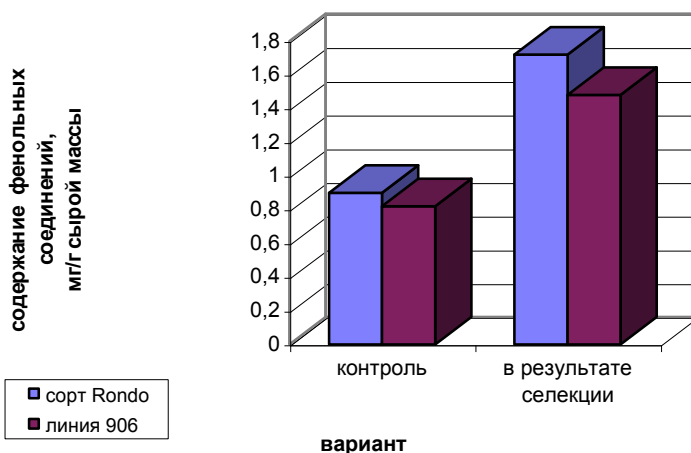


Рис. 2. Суммарное содержание растворимых фенольных соединений в растениях-регенерантах, полученных в контрольных (контроль) и селективных условиях (в присутствии экзометаболитов *A. radicina*, 50%)

В процессе культивирования суспензионной культуры двух изучаемых генотипов на селективных средах, способность клеток к синтезу фенольных соединений изменялась. В одних вариантах она постоянно увеличивалась (для сорта *Rondo* при 50% -ном КФ, для линии 906 при 30% -ном КФ), тогда как в других случаях – была относительно стабильна (для сорта *Rondo* при 30%-ном КФ, для линии 906 при 50%-ном КФ). Все это свидетельствует об отличиях в чувствительности клеток суспензии к действию стрессового фактора, что, возможно, проявляется и в различных механизмах их устойчивости к экзометаболитам патогена.

Далее мы остановил свое внимание на растениях-регенерантах моркови. Как следует из представленных на рис. 2 данных, у контрольных вариантов содержание фенольных соединений было в 1,5 - 2 раза ниже, чем у растений, полученных в результате клеточной селекции в присутствии экзометаболитов гриба *A. radicina*.

Следует также отметить, что во всех условиях растения-

регенеранты моркови сорта *Rondo* характеризовались более высоким уровнем накопления фенольных соединений, по сравнению с линией 906 (сортотип Нантская).

Изучение состава фенольных соединений показало, что у растений-регенерантов, полученных после селекции *in vitro*, он более разнообразен, чем в контроле (данные не приводятся). Вероятно, это связано с изменениями в их метаболизме, что и проявляется в более разнообразном составе синтезируемых веществ.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что присутствие экзометаболитов гриба *Alternaria radicina* при клеточной селекции моркови приводит к изменениям в их фенольном метаболизме. Это проявляется как на уровне накопления этих веществ вторичного метаболизма, так и на их качественном составе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Физиология растений /Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф. и др.; Под ред. Ермакова И.П.. – М.: Издательский центр «Академия». 2005. 640 с.
 2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука. 1992.382 с.
 3. Вольнец А.П. Новообразование защитных фенольных соединений при инфекционном стрессе // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. Под ред. Загоскиной Н.В., Бурлаковой Е.Б. М.: Научный мир. 2010. С.168-196.
 4. Никуленко Т.Р. Токсины фитопатогенных грибов и их роль в развитии растений. М.: Агропромиздат. 1987. 150 с.
 5. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Прокофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. 1990. М.:Агропромиздат. 384 с.
 6. Дьяков Ю.Г. Физиолого-биохимические механизмы устойчивости растений к грибным заболеваниям // Итоги науки и техники. Сер. Защита растений. М.: ВИНТИ. 1983. Т. 3. 150 с.
 7. Manibhushanrao K., Zuber M., Mitsuyama N. Phenol metabolism and plants disease resistant // Acta phytopatol. et entomol. / Hung. 1988. V. 23. N. 1-2. P.103-114.
 8. Allwood W., Clarke A., Goodacre R., Mur L. Dual metabolomics: A novel approach to understanding plant–pathogen interactions // Phytochemistry. 2010. V. 71 P. 590–597.
 9. Калашикова Е.А. Применение клеточных технологий в селекции растений // Доклады ТСХА. 2007. В. 279. Ч. 1. С. 47-51.
 10. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их определения // Биохимические методы в физиологии растений/ Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука. 1971. С. 185-197.
 11. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высшая школа. 1975. 250 с.
-

УДК (579.835+581.19)

УЧАСТИЕ ФЛАВОНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ В АДАПТАЦИИ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM LIPOFERUM* SP59B К СУЩЕСТВОВАНИЮ В АССОЦИАЦИИ С РАСТЕНИЯМИ

**Каневский М.В.¹, Коннова С.А.^{1,2}, Федоненко Ю.П.², Бурыгин
Г.Л.²**

¹ФГБОУ ВПО Саратовский государственный университет им. Н.Г.
Чернышевского

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
РАН г. Саратов, Россия, 8452 970403, e-mail: matvejkanev@mail.ru

При выяснении молекулярного механизма формирования ассоциативных отношений между микроорганизмами и растениями актуальным остаётся вопрос о роли вторичных метаболитов фенольной природы в молекулярной коммуникации микро- и макропартнёров. Для исследования ассоциативных взаимодействий используют в качестве модели бактерии рода *Azospirillum*, способные стимулировать рост и продуктивность многих важных хлебных злаков. В реализации начальных этапов взаимодействия с растениями существенную роль играют гликополимеры поверхности микроорганизмов, в том числе и бактериальные липополисахариды (ЛПС) [1]. Роль флавоновых веществ в формировании углеводного ландшафта наружной мембраны бактерий рода *Azospirillum* практически не изучена.

Целью данной работы было выявление адаптационных изменений в строении ЛПС бактерий под влиянием флавоноидов растений. Исследования проводились на модельной системе: бактерии *A. lipoferum* Sp59b и флавоноиды - кверцетин, нарингенин и рутин (Sigma). Выбор исследуемой культуры связан с наличием полученной нами ранее информации о структуре мембранных и капсульных полисахаридов этих микроорганизмов при выращивании на селективной среде с малатом натрия [2, 3] (стандартные условия). Интерес к флавоноидам – кверцетину, рутину и нарингенину определяются принадлежностью их к группе вторичных метаболитов, широко представленных в экссудатах злаковых растений [4, 5].

Для выявления характера влияния флавоноидов на структуру ЛПС культивирование бактерий в течение 24 часов проводили в жидкой малатной среде с добавлением одного из флавоноидов: кверцетина, нарингенина или рутина в концентрациях от 0.1 до 2.0

мг/мл. При их выборе учитывали результаты предварительных исследований по определению бактериостатических концентраций флавоноидов (для кверцетина она составила 3.0 мг/мл, а для нарингенина – 4.0 мг/мл), а также литературные данные о содержании флавоноидов в экссудатах растений.

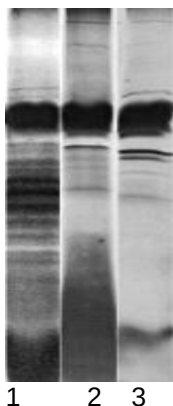


Рисунок 1. Электрофореграммы образцов:
1 – ЛПС из бактерий *A. lipoferum* Sp59b, выращенных в среде с кверцетином, 0.4 мг/мл
2 – ЛПС из бактерий *A. lipoferum* Sp59b, выращенных в среде с нарингенином, 0.5 мг/мл
3 – ЛПС из бактерий, выращенных в среде без флавоноидов.

При культивировании бактерий в среде с рутином бактериостатический эффект не наблюдался даже при концентрации 8 мг/мл. Клетки отмывали от капсулы, ЛПС выделяли экстракцией из сырой биомассы этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)-содержащим буфером [6]. Экстракты подвергали протеиназной обработке для удаления сопутствующих белков. В качестве метода анализа результатов воздействия флавоноидов на структуру ЛПС использовали SDS-электрофорез полученных фракций в 12.5% полиакриламидном геле. Визуализацию результатов проводили окрашиванием геля нитратом серебра с предварительным периодатным окислением углеводов. Установлено, что при добавлении в среду выращивания кверцетина, начиная с концентрации 0.4 мг/мл, возрастала гетерогенность мембранного пула ЛПС (рис. 1, дорожка 1) по сравнению с контрольным образцом (рис. 1, дорожка 3). В нём присутствовали молекулы с О-специфическими цепями разной длины, а также молекулы, углеводная часть которых была представлена только коровым олигосахаридом (рис. 1, дорожка 1). Результатом культивирования бактерий в присутствии нарингенина (0.5 мг/мл) оказалось преобладание в экстрактах ЛПС молекул с длинной О-специфической цепью (рис. 1, дорожка 2). Выращивание бактерий в

присутствии рутина ни в одной из исследуемых концентраций не привело к изменению электрофоретического профиля ЛПС. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными: ранее было показано, что при культивировании *A. brasilense* Cd с корневыми экссудатами растений, в которых присутствуют флавоноиды, наблюдается изменение профиля ЛПС, коррелирующее с изменением структуры последнего [7].

Для обнаружения изменения структуры антигенных детерминант в составе ЛПС были выполнены исследования методом иммуно-дот анализа с кроличьими поликлональными антителами, специфичными к ЛПС, и антителами к капсульному полисахариду *A. lipoferum* Sp59b, выращенных в стандартных условиях. Исследования показали, что ЭДТА-экстракты ЛПС бактерий, выращенных в присутствии флавоноидов, взаимодействуют только с антителами к капсульному полисахариду микроорганизмов, и не взаимодействуют с антителами к ЛПС. Таким образом, впервые показано, что кверцетин и нарингенин индуцируют изменения антигенных детерминант в составе ЛПС азоспирилл, которые экспонированы на поверхности бактерий и участвуют в их коммуникации в ризосфере. Учитывая, что выбранные флавоноиды являются представителями группы вторичных метаболитов злаковых растений, полученные результаты свидетельствуют об их важной роли в формировании ассоциативных отношений азоспирилл с растениями-хозяевами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (проект 11-04-00533)

ЛИТЕРАТУРА

1. Коннова С.А., Федоненко Ю.П., Игнатов В.В. Структура и функции гликополимеров поверхности азоспирилл глава // Молекулярные механизмы взаимодействия ассоциативных микроорганизмов с растениями / отв. ред. В.В. Игнатов; Ин-т биохимии и физиологии растений и микроорганизмов. – М.: Наука, 2005. – С. 46-69. 15 л.
2. Fedonenko Yu.P., Konnova O.N., Zatonsky G.V., Shashkov A.S., Konnova S.A., Kocharova N.A., Zdorovenko E.L., Ignatov V.V., Knirel Yu.A. Structure of the O-specific polysaccharide from the lipopolysaccharide of *Azospirillum lipoferum* Sp59b // Carbohydrate Research. 2005. V. 340. P. 1259-1263.
3. Смолькина О.Н., Качала В.В., Федоненко Ю.П., Бурьгин Г.Л., Здорovenko Э.Л., Матора Л.Ю., Коннова С.А., Игнатов В.В. Капсульный полисахарид бактерий *Azospirillum lipoferum* Sp59b: структура, антигенная специфичность // Биохимия. 2010. Т.35. С. 707-716.
4. Calzuola, I., Marsili V., Gianfranceschi G.L. Synthesis of antioxidants in wheat sprouts // J. Agric. Food Chem. 2004. V.52. P. 5201-5206.

-
5. Matus C., Daskalchuk T.E., Verma B., Puttick D., Chibbar R.N., Gray G.R., Perron C.E., Tyler R.T., Hucl P. Phenolic compounds contribute to dark bran pigmentation in hard white wheat // J. Agric. Food Chem. 2008. V.56. P. 1644-1653.
 6. Leive L., Shovlin V.K., Mergemhagen S.E. Physical, chemical and immunological properties of lipopolysaccharides released from *Escherichia coli* by ethylenediamine tetraacetate // J. Biol. Chem. 1968. V.243. P. 6384-6391.
 7. Fischer S.E., Miguel M.J., Morri G.B. Effect of root exudates on the polysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress // FEMS Microbiol. Lett. 2003. V. 219. P. 53-62.
-

УДК 582.711.711:577.13

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ *SPIRAEA* L. ИЗ ПРИРОДНЫХ И ИНТРОДУКЦИОННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ АЗИАТСКОЙ РОССИИ

Карпова Е.А.¹, Полякова Т.А.²

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия, тел 383 - 334-44-68, karyevq@mail.ru

²Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, 8 – 499 – 135-50-67, tat-polyakova@yandex.ru

На территории России и сопредельных государств в естественных условиях по данным разных авторов произрастает 20-25 видов рода *Spiraea* L. В процессе интродукции получены многочисленные формы и гибриды, введены в культуру виды природной флоры зарубежной Азии и Америки. Однако до сих пор не создана единая классификация рода. Большинство исследователей принято разделение рода на два подрода: *Protospiraea* Nakai и *Metaspiraea* Nakai [1, 2]. При этом не достигнуто согласия о составе секции *Chamaedryon* Ser. и целесообразности выделения из нее секции *Glomerati* Nakai. Таким образом, не четко определено таксономическое положение представителей секции *Glomerati*, в том числе *S. hypericifolia*.

Остается спорным статус отдельных таксонов: *S. humilis* Pojark.; *S. sericea* Turcz.; *S. ussuriensis* Pojark., *S. flexuosa* Fisch. ex Cambess., *S. elegans* Pojark., родственных и морфологически близких к *S. salicifolia* L., *S. media* Fr. Schmidt и *S. chamaedrifolia* L. [3].

Фенольные соединения видов рода *Spiraea* изучены недостаточно, особенно в хемотаксономическом аспекте. Из листьев *S. hypericifolia* выделены апигенин, лютеолин [4]. В листьях *S. chamaedrifolia*, *S. crenata*, *S. salicifolia*, *S. media* найдены кверцетин, кемпферол, сиреневая, ванилиновая, гентизиновая, коричная, п-кумаровая, кофейная и феруловая кислоты, в листьях *S. media* – изорамнетин [5], в листьях *S. salicifolia* обнаружены производные коричной кислоты [6].

Цель исследования – сравнительное изучение состава и содержания фенольных соединений гидролизированных экстрактов листьев *Spiraea* в связи с их систематическим положением.

Содержание фенольных соединений в листьях растений *S. salicifolia* L., *S. humilis* Pojark., *S. humilis* x *S. sp.*, *S. douglasii* Hook., *S. x billardii* Herincq. (*S. douglasii* Hook. x *S. salicifolia* L.), *S. betulifolia* Pall., *S. japonica* L., *S. japonica* 'Macrophylla', *S. japonica* 'Albiflora', *S. albiflora* (Miq.) Zab., *S. flexuosa* Fisch. ex Cambess., *S. ussuriensis* Pojark., *S. elegans* Pojark., *S. media* Fr. Schmidt, *S. trilobata* L., *S. sericea* Turcz., *S. x vanhouttei* (Briot) Zab. (*S. cantoniensis* Lour. x *S. trilobata* L.), *S. chamaedrifolia* L., *S. x schinabeckii* Zab. (*S. chamaedrifolia* L. x *S. trilobata* L.), *S. crenata* L., *S. nipponica* L., *S. hypericifolia* L. определяли в образцах из Приморского края, Хабаровского края, Амурской области, Забайкальского края, Республики Алтай, Алтайского края, а также из коллекций Амурского филиала Ботанического сада-института ДВО РАН и Центрального сибирского ботанического сада СО РАН, собранных в мае-сентябре 2003-2012 гг.

Состав и содержание флавоноидов и фенолкарбоновых кислот гидролизатов растений изучали методами хроматографии на бумаге, тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ (хроматограф «Agilent 1200» с диодноматричным детектором; колонка Zorbax SB-C18, размером 4,6×150 мм, с диаметром частиц 5 мкм; градиент метанола, подкисленного ортофосфорной кислотой). Скорость подачи элюента 1 мл/мин. Детектирование при 255, 270, 290, 325, 340, 360 и 370 нм. Идентификацию известных соединений осуществляли сравнением с аутентичными образцами.

В составе фенольных соединений гидролизатов обнаружено 28 веществ, из которых удалось идентифицировать галловую, протокатеховую, п-оксибензойную, ванилиновую, гентизиновую, сиреневую, салициловую, коричную, хлорогеновую, кофейную, п-кумаровую, феруловую, о-кумаровую кислоты, кверцетин, кемпферол.

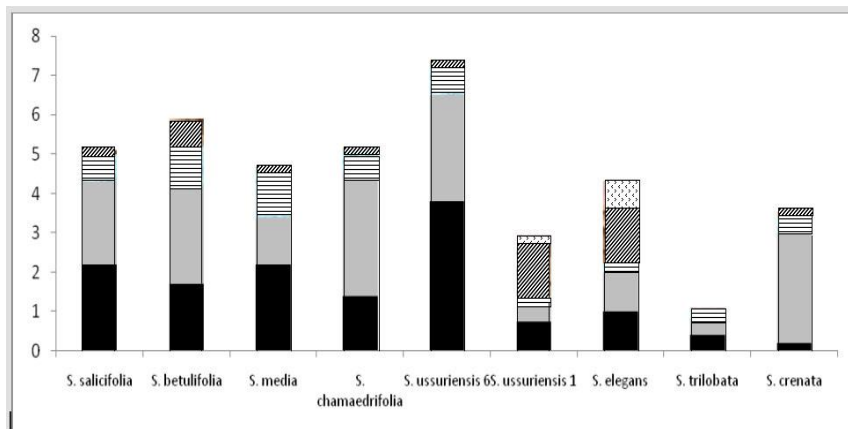


Рис. 1. Содержание фенольных соединений в некоторых видах рода *Spiraea* (% от абсолютно сухой массы). Условные обозначения: черный - оксibenзойные кислоты, серый – оксикоричные кислоты, горизонтальная штриховка - кверцетин, диагональная штриховка – кемпферол, точки - агликон II.

Содержание фенольных соединений у большей части видов составило 3-4 %, у видов *S. salicifolia*, *S. humilis*, *S. x schinabeckii* и некоторых популяций видов *S. douglasii*, *S. betulifolia*, *S. ussuriensis*, *S. hypericifolia* – выше 4%. На рисунке 1 дана схема состава фенольных соединений модельных видов из секций *Spiraria* (*S. salicifolia*), *Calospira* (*S. betulifolia*) и *Chamedryon* (*S. media*, *S. ussuriensis*, *S. elegans*, *S. trilobata*, *S. crenata*).

Около половины популяций содержали более 1% флавоноидов, некоторые популяции *S. billardii*, *S. douglasii*, *S. betulifolia*, *S. ussuriensis*, *S. elegans*, *S. sericea* – более 1,5%, что составило 30-60 % от суммы фенольных соединений. Наибольшее содержание флавоноидов в сумме фенольных соединений обнаружено в образцах *S. sericea* (66,3%), *S. ussuriensis* (56%) и *S. elegans* (53%).

Основными флавоноидными компонентами являются кверцетин и кемпферол. Высокое содержание кверцетина (более 1,5 %) обнаружено в гидролизатах *S. billardii* и *S. douglasii*, кемпферола – в гидролизатах *S. ussuriensis* и *S. elegans*. Только у последних двух видов и *S. flexuosa* обнаружено преобладание кемпферола в сумме агликонов. В составе гидролизатов обнаружен также агликон II ($\lambda_{\max}$ 255,370 нм), который по спектральным свойствам отнесен к флавонолам. Он выявлен только у

представителей секции *Chamaedryon*: *S. ussuriensis*, *S. elegans* и *S. trilobata*.

В большинстве образцов флавоноиды, оксибензойные и оксикоричные кислоты представлены приблизительно в равных долях. Среди представителей секции *Chamaedryon* обнаружены образцы с более высокой по сравнению с остальными видами долей оксикоричных кислот в сумме фенольных соединений: свыше 50% (*S. ussuriensis*, *S. flexuosa*, *S. chamaedrifolia*) и свыше 70% (*S. crenata*, *S. nipponica*). При этом содержание оксибензойных кислот у этих видов низкое (*S. crenata* (0,1% и 0,2%), *S. flexuosa* (0,4%)) и среднее (около 1 %). Оксибензойные кислоты преобладают в популяциях *S. humilis*, *S. douglasii*, *S. media*.

Галловая, протокатеховая, п-оксибензойная, хлорогеновая, кофейная, п-кумаровая кислоты обнаружены во всех видах. Содержание хлорогеновой, протокатеховой, кофейной и п-кумаровой кислот у большинства видов составляет 0,2-0,5%, п-оксибензойной кислоты – 0,1-0,3%, галловой кислоты около 0,1%. Коричная кислота обнаружена в большинстве популяций в минорных количествах (0,01-0,09%). В образцах *S. nipponica*, *S. crenata* и *S. schinabeckii* коричная кислота являлась основным компонентом комплекса фенольных соединений (1,5-2%).

Обнаружены определенные отличительные признаки таксонов по составу и содержанию флавоноидов и фенолкарбоновых кислот. Проявилась тенденция уменьшения содержания оксибензойных кислот от секции *Spiraria* к секции *Calospira* и *Chamaedryon* и далее к последнему ряду секции *Chamaedryon* - *Crenatae* A. Pojark. Виды *S. crenata* и *S. nipponica* отличаются высоким содержанием оксикоричных кислот (главным образом, коричной кислоты) и их доли в сумме фенольных соединений.

Выявлены различия видов внутри секции *Chamaedryon* по признакам качественного состава агликонов флавоноидов. Наиболее отличен от остальных видов *S. trilobata*, в составе агликонов которого не был обнаружен кемпферол. Этот вид содержит агликон A II, найденный также у *S. ussuriensis* и *S. elegans*, что говорит об определенной общности этих трех видов. Т.Т. Yu и К.С. Kuan (1963) [2] отнесли вид *S. elegans*, наряду с *S. trilobata*, к серии *Trilobatae* A. Pojark. emend. Yu. Однако, отсутствие кемпферола у *S. trilobata* свидетельствует не в пользу их объединения в одной серии.

Некоторые авторы рассматривают виды *S. ussuriensis*, *S. elegans* и *S. flexuosa* как подвиды *S. chamaedrifolia* [3]. Однако не

все образцы этих видов были однородны по соотношению кверцетин/кемпферол. В популяциях *S. ussuriensis* проявилась значительная изменчивость, связанная с высоким полиморфизмом морфологических признаков [7]. Образцы секции *Chamaedryon* по этому признаку можно разделить на 2 группы: 1) виды *S. media*, *S. chamaedrifolia*, *S. crenata*, *S. nipponica*, *S. hypericifolia*, *S. ussuriensis* (популяции № 2, 3 и 6); 2) виды *S. elegans*, *S. flexuosa* и *S. ussuriensis* (популяции № 1, 4, 5). В сумме агликонов образцов первой группы преобладает кверцетин, они имеют также относительно высокий уровень содержания фенолкарбоновых кислот (2-6%), пониженные величины содержания флавоноидов (до 1%) и их доли в сумме фенольных соединений (3-20%) (рис. 2).

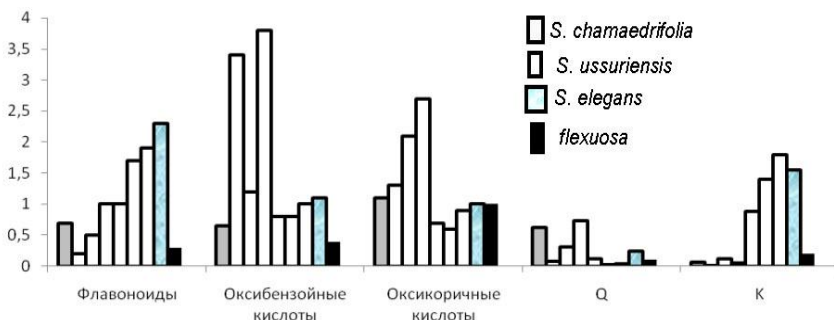


Рис. 2. Содержание фенольных соединений (% от абсолютно сухой массы) в видах рода *Spiraea*, родственных *S. chamaedrifolia*. Условные обозначения: *S. chamaedrifolia*; *S. ussuriensis* популяции № 2,3,6,4,1,5; *S. elegans*; *S. flexuosa*.

Образцы второй группы отличаются преобладанием кемпферола в сумме флавоноидов. Содержат небольшое количество фенолкарбоновых кислот (до 2%), значительное количество флавоноидов (1-2%) с высокой долей флавоноидов в сумме фенольных соединений (40-56%).

Таким образом, анализ состава и содержания фенольных соединений образцов *Spiraea* позволил выделить 5 основных маркерных признаков для определения сходства и различия таксонов: содержание оксibenзойных и оксикоричных кислот; доля фенолкарбоновых кислот и флавоноидов в сумме фенольных соединений; состав агликонов флавоноидов; соотношение кверцетин/кемпферол; состав минорных компонентов. Наибольшее отличие от всех видов выявилось у *S. trilobata* (не обнаружен

кемпферол) и *S. crenata* (максимальное содержание оксикоричных кислот, минимальное содержание флавоноидов). Виды *S. hypericifolia* и *S. crenata* имеют значительные отличия друг от друга по содержанию кверцетина и коричной кислоты, при этом по большинству признаков *S. hypericifolia* гораздо ближе к остальным исследованным представителям секции *Chamaedryon*, чем к *S. crenata*. Таким образом, признаков, специфичных для *S. hypericifolia* и секции *Glomerati*, не выявлено. В связи с этим классификация рода без выделения секции *Glomerati* внутри секции *Chamaedryon* представляется более естественной, но внутрисекционное деление требует коррекции. В этой системе признаков не выявлено значительных отличий близких видов *S. salicifolia* и *S. humilis*, *S. media* и *S. sericea* (разница в содержании минорных компонентов). Комплекс видов, близких к *S. chamaedrifolia*, явно разделился на 2 группы: 1) *S. chamaedrifolia*; 2) *S. elegans*, *S. flexuosa*. При этом популяции *S. ussuriensis* распределились между двумя группами. Следовательно, статус образцов *S. ussuriensis* нуждается в уточнении, а внутривидовая изменчивость *S. chamaedrifolia* и *S. ussuriensis* – в дальнейших тщательных исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Пояркова А.И. Род Таволга – *Spiraea* L. Флора СССР. Т. IX. Под ред. В.Л. Комарова. М., Л.: Изд-во АН СССР. С. 283-305.
2. Yu T.T., Kuan K.C. Taxa Nova Rosacearum Sinicarum (I), I. *Spiraea* L., Systema Spiraeae Sinicae // Acta Phytotax. Sinica. 1963. Т. 8. No. 3. P. 214-217.
3. Коропачинский И.Ю., Встовская Т.Н. Древесные растения Азиатской России. Новосибирск: Изд-во СО РАН. Филиал «Гео». 2002. С. 380-398.
4. Стороженко Н.Д. Полифенольные соединения таволги зверобоелистной (*S. hypericifolia* L.). Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Иркутск, 1977.
5. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Hydraginaceae — Haloragaceae. Л., 1987. С. 99–101.
6. Ahn B. T., Oh K. J., Park S. K., Chung S.G., Cho E. H., Kim J. G., Ro J. S., Lee K. S. Phenolic compounds from leaves of *Spiraea salicifolia* // Saengyak Hakhoechi. 1996. Vol. 27. № 3. P. 178-183.
7. Полякова Т.А. Внутривидовая изменчивость дальневосточных и сибирских видов рода *Spiraea* L. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 2004.

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА РЕЗВЕРАТРОЛА В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ ДИКОГО ВИНОГРАДА *VITIS* *AMURENSIS* RUPR.

Киселев К.В.¹, Дубровина А.С.¹, Тюнин А.П.¹, Шумакова О.А.^{1,2}

¹ФГБУН Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток, 8-924-320-46-04, kiselev@biosoil.ru;

²Школа естественных наук, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 8-914-715-00-49, shumakova_olga91@mail.ru

Резвератрол (3,5,4'-тригидроксистильбен) – это один из самых известных фенольных вторичных метаболитов растений, ценное биологически активное вещество, привлекающее значительный интерес исследователей (Kiselev 2011). Резвератрол обладает превентивными свойствами против нескольких видов рака, положительно влияет на сердечно-сосудистую систему, а также обладает высоким фармакологическим потенциалом в лечении нейродегенеративных заболеваний, и имеет большой потенциал для создания на его основе различных лекарственных средств (Vingtdeux et al. 2008). Кроме того, резвератрол интересен как индуцибельное защитное соединение растений (фитоалексин), синтезируемое растением в ответ на ультрафиолетовое излучение, воздействие фитопатогенов и другие стрессовые воздействия окружающей среды (Chong et al. 2009). Резвератрол обнаружен во многих растениях, таких как тутовое дерево, арахис, клюква и голубика. Виноград, в том числе и дикий виноград *Vitis amurensis* Rupr., относят к основным источникам резвератрола. В растениях содержание этого вещества невелико, поэтому получать резвератрол из растений невыгодно. Синтетические аналоги БАВ часто содержат токсичные примеси. Клеточные культуры винограда, при условии их высокой целевой продуктивности, могли бы стать альтернативным источником резвератрола. Цель работы нашей исследовательской группы в последние годы – поиск и разработка новых биотехнологических и генно-инженерных подходов для активации биосинтеза резвератрола в каллусных культурах клеток *V. amurensis* и исследование биохимических и молекулярно-генетических механизмов, ведущих к активному биосинтезу резвератрола клетками растений. В настоящем сообщении впервые представлены, обобщены и проанализированы все основные результаты, полученные в этом направлении нашим исследовательским коллективом.

Низкий уровень продукции резвератрола клетками *V.*

amurensis в стандартных условиях культивирования можно было бы объяснить относительно бедной средой, нехваткой предшественников биосинтеза резвератрола, поэтому важная часть нашей экспериментальной работы была посвящена оптимизации состава питательных сред: добавление предшественников резвертрола (фенилаланин, кумаровая кислота) в питательные среды и оптимизация гормонального состава питательных сред. Эти подходы давали положительный эффект на биосинтез резвератрола, однако общая продукция резвератрола клетками *V. amurensis* не превышала 10 мг на литр питательной среды (Kiselev et al. 2007; Shumakova et al. 2011; Kiselev et al. submitted). Другие исследования показали, что можно увеличить содержание резвератрола в 1.5-2 раза в культурах клеток *V. amurensis*, добавляя в питательные среды известные стресс-гормоны растения – салициловую кислоту и метилжасмонат (Kiselev et al. 2007; Dubrovina and Kiselev, 2012). Продукция резвератрола возрастала до 20 мг/л питательной среды. Однако этот уровень продукции ниже, чем в ранее описанных примерах, что является главным недостатком вышеописанного подхода. Таким образом, воздействие различных элиситоров и добавление предшественников в питательные среды привели к увеличению продукции резвератрола культурой клеток *V. amurensis*, однако уровень биосинтеза этого вещества остается недостаточным для промышленного использования полученных клеточных линий.

В связи с бурным развитием технологий рекомбинантных ДНК и биохимии растений появилась возможность принципиально нового подхода в управлении метаболическим аппаратом клетки. Так, генетическая трансформация каллусных культур клеток *V. amurensis* геном *rolB* из *Agrobacterium rhizogenes* привела к активному накоплению резвератрола полученными клеточными культурами: продукция резвератрола достигала 315 мг/л или 3.15% от сухой массы клеток (Kiselev et al. 2007). Трансформация другими генами *rol*, например геном *rolC*, увеличивала содержание резвератрола, но не в таких высоких пределах (Dubrovina et al. 2010). К недостаткам этого подхода можно отнести то, что содержание резвератрола в полученных трансгенных линиях было нестабильно и имело тенденцию на постепенное снижение (Dubrovina and Kiselev 2012). Наблюдаемая нестабильность продукции резвератрола, возможно, будет характерна и для клеточных культур других растений при применении других биотехнологических подходов. Причиной такой нестабильности, возможно, является соматоклональная изменчивость и мутагенез

ДНК, уровень которых значительно возрастает при культивировании клеток растений *in vitro* (Kiselev et al. 2011a). Это можно отнести к общим недостаткам использования растительного материала в качестве альтернативного источника ценных биологически активных веществ.

Для изучения взаимосвязи стимулирующего действия трансформации геном *rolB* на биосинтез резвератрола клетками *V. amurensis* и уровня $[Ca^{2+}]$ цит, мы исследовали влияние ингибиторов Ca^{2+} -каналов на рост и биосинтез резвератрола в трансгенных и контрольной культурах клеток. Мы использовали $LaCl_3$, общий ингибитор Ca^{2+} -каналов, верапамил, ингибитор Ca^{2+} -каналов плазматической мембраны L-типа, а также нифлюмовую кислоту, ингибитор внутренних Ca^{2+} -каналов. Установлено, что ингибиторы Ca^{2+} -каналов снимают стимулирующий эффект трансформации клеток *V. amurensis* геном *rolB* на биосинтез резвератрола (Dubrovina et al. 2009). С другой стороны повышение концентрации цитоплазматического кальция посредством добавления в питательные среды 1 μM ионофора кальция A23187 привело к достоверному увеличению продукции резвератрола в контрольных нетрансгенных клетках *V. amurensis* в 3-4 раза, до 10 мг/л, однако дальнейшее увеличение концентрации A23187 приводило к гибели клеток (Kiselev et al. 2012). Результаты этих экспериментов говорят о том, что ингибирование притока Ca^{2+} в цитоплазму блокирует синтез резвератрола в *rolB*-трансгенных культурах клеток *V. amurensis*, а значит активация аккумуляции резвератрола в *rolB* трансгенных клетках связана с поступлением Ca^{2+} в цитоплазму. Мы предполагаем, что активный биосинтез резвератрола является Ca^{2+} -зависимым процессом.

Поскольку по нашим данным трансформация клеток *V. amurensis* геном *rolB* значительно изменяет экспрессию некоторых генов Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ (CDPK) (Dubrovina et al., 2009), которые являются основными сенсорами Ca^{2+} в растительной клетке, возникает необходимость исследования возможности вовлечения CDPK в регуляцию биосинтеза резвератрола. Для проверки этой гипотезы мы секвенировали и клонировали полные последовательности кДНК некоторых CDPK *V. amurensis* и женьшеня настоящего *Panax ginseng* в векторные конструкции под двойной CaMV35s промотор и трансформировали культуры клеток *V. amurensis* полученными конструкциями. В настоящее время установлено, что при трансформации *V. amurensis* геном *PgCDPK2d* из *P. ginseng* продукция резвератрола по сравнению с нетрансгенными клетками достоверно увеличилась

до 30 мг/л (Kiselev et al. submitted), в то время как при трансформации геном *VaCDPK3a* из *V. amurensis* продукция резвератрола трансгенными культурами клеток оставалась на прежнем уровне (Kiselev et al. submitted). Наши первые результаты говорят о том, что только некоторые представители мультигенного семейства CDPK могут быть вовлечены в сигнальный путь, регулирующий биосинтез резвератрола.

Проведенные нами исследования показывают, что обработка клеточных культур *V. amurensis* 5-азацитидином (5A), который известен как химический агент деметилирующий цитозиновые нуклеотиды в ДНК, приводила к увеличению продукции резвератрола нетрансгенной клеточной культурой *V. amurensis* до 5 мг/л (Kiselev et al., 2011b). При этом мы наблюдали достоверное увеличение экспрессии некоторых генов стильбен синтаз, ферментов ответственных за биосинтез резвератрола. Эти результаты указывают на то, что метилирование ДНК по цитозину может быть вовлечено в регуляцию биосинтеза резвератрола в клетках *V. amurensis*. Возможно, при стандартных условия культивирования клетки *V. amurensis* не способны синтезировать большое количество резвератрола, поскольку экспрессия генов, участвующих в биосинтезе резвератрола, ингибирована посредством метилирования кодирующих и/или регуляторных последовательностей этих генов. Для изучения роли цитозинового метилирования ДНК в регуляции биосинтеза резвератрола и других вторичных метаболитов необходимы дополнительные исследования.

Таким образом, нами показано, что существует несколько биотехнологических методов активации биосинтеза и накопления резвератрола в клетках *V. amurensis in vitro*. Основным направлением нашей дальнейшей экспериментальной работы является изучение молекулярных механизмов, обеспечивающих активную продукцию резвератрола клетками растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dubrovina A.S., Kiselev K.V., Veselova M.V., Isaeva G.A., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. (2009) Enhanced resveratrol accumulation in *rolB* transgenic cultures of *Vitis amurensis* correlates with unusual changes in *CDPK* gene expression // J Plant Physiol 166:1194-1206
2. Dubrovina A.S., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N., Kiselev K.V. (2010) Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in *rolC* transgenic cell cultures of *Vitis amurensis* // Appl Microbiol Biotechnol 88:727-736

-
3. Dubrovina A.S., Kiselev K.V. (2012) Effect of long-term cultivation on resveratrol accumulation in a high-producing cell culture of *Vitis amurensis* // Acta Physiol Plant 34:1101-1106
 4. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. (2007) The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells // J Biotechnol 128:681-692
 5. Kiselev KV (2011) Perspectives for production and application of resveratrol // Appl Microbiol Biotechnol 90:417-425
 6. Kiselev K.V., Shumakova O.A., Tchernoded G.K. (2011a) Mutation of *Panax ginseng* genes during long-term cultivation of ginseng cell cultures // J Plant Physiol 168:1280-1285
 7. Kiselev K.V., Tyunin A.P., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N. (2011b) Resveratrol content and expression patterns of stilbene synthase genes in *Vitis amurensis* cells treated with 5-azacytidine // Plant Cell Tissue Organ Cult 105:65-72
 8. Shumakova O.A., Manyakhin A.Y., Kiselev K.V. (2011) Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* treated with coumaric acid // Appl Biochem Biotechnol 165:1427-1436
 9. Vingtdoux V., Dreses-Werringloer U., Zhao H., Davies P., Marambaud P. (2008) Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease // BMC Neurosci. 9: S6
-

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ЭКЗОГЕННЫХ ФЕНОЛОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ

Кислицина М.Н., Борисова Г.Г.

Уральский федеральный университет им. первого президента России Б.Н.
Ельцина, Екатеринбург, Россия, тел. 261-66-85, e-mail:
mariyakislitsina@yandex.ru

В последние десятилетия в связи с ростом антропогенной нагрузки на водные объекты возрастает значимость исследований, направленных на выявление ответных реакций гидробионтов на действие загрязняющих веществ. Водные растения являются важнейшим средообразующим компонентом водных экосистем и именно от них, прежде всего, зависит функционирование гидроценоза в целом.

Способность растений противостоять условиям внешней среды, как правило, оценивается на основании изменчивости их морфофизиологических параметров [1, 2]. Биохимическим изменениям, происходящим в растительном организме в условиях

антропогенной нагрузки, уделяется меньшее внимание [3, 4].

Известно, что для оценки токсического действия поллютантов на растения в качестве биомаркеров используют эндогенные фенольные соединения. При этом флавоноиды в меньшей степени подвергаются катаболическим превращениям, а значит, большее время сохраняют информацию о воздействии стресса на растительный организм [5].

В связи с этим, цель работы заключалась в выявлении влияния тяжелых металлов (ТМ) и фенольных соединений (ФС) на содержание флавоноидов в листьях водных растений.

Объектом исследования были погруженные водные растения *Potamogeton crispus* L. (рдест курчавый), *Ceratophyllum demersum* L. (роголистник темно-зеленый), *Potamogeton gramineus* L. (рдест злаковый). Все растения были отобраны в водотоках Свердловской области. Роголистник темно-зеленый и рдест курчавый отбирали из р. Сысерть, рдест злаковый – из р. Ляля.

Река Сысерть – приток р. Исети, на своем протяжении не имеет горнодобывающих и перерабатывающих предприятий. В связи с этим р. Сысерть может рассматриваться в качестве «условно чистого» водного объекта.

Река Ляля – приток р. Сосьвы. Основной источник загрязнения – ФС, поступающие со стоками Новолялинского целлюлозно-бумажного комбината (ЦБК). Растения отбирали выше и ниже впадения производственных сточных вод. Концентрация фенола, не считая наличия других поллютантов, в речных водах ниже места впадения стоков ЦБК (импактная зона) составила 0,01 мг/л, что в 10 раз выше величины их предельно-допустимой концентрации для водных объектов рыбохозяйственного назначения. В поверхностных водах фонового участка фенолов не обнаружено.

Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрически после проведения реакции, основанной на способности флавоноидов реагировать с лимоннокислым борным реактивом с образованием окрашенного комплекса [6].

P. crispus, *C. demersum*, собранные в р. Сысерть, инкубировали в течение 96 ч в сосудах с растворами сульфатов Cd^{2+} и Cu^{2+} (0,5 мг/л в пересчете на ион). В качестве контроля были использованы растения, инкубированные в среде без добавления металлов.

Результаты исследования показали, что в листьях *P. crispus* и *C. demersum* наблюдалась тенденция увеличения содержания флавоноидов в течение 48–72 часов инкубации с Cd^{2+} или Cu^{2+} .

Содержание флавоноидов в листьях *P. crispus*, инкубированного с Cd^{2+} и Cu^{2+} , через 48 ч инкубирования растений в среде с ТМ увеличилось в 2 раза по сравнению с контролем. В листьях *C. demersum*, подвергавшегося воздействию Cd^{2+} , произошло увеличение содержания флавоноидов на 67%. В листьях растений, инкубированных с Cu^{2+} , содержание флавоноидов увеличивалось на протяжении 72 ч, однако не превысило контрольного значения. После начальной стадии увеличения содержания флавоноидов в листьях исследованных растений происходило неуклонное снижение их количества. Вероятно, это связано с тем, что данные концентрации ТМ оказали угнетающее действие на растения. Биосинтез флавоноидов в листьях *P. crispus* мог поддерживаться в среде с Cd^{2+} и Cu^{2+} при концентрации 0,05 мг/л на протяжении 48 ч, в листьях *C. demersum* – в течение 48 и 72 ч соответственно.

Кроме того, было изучено влияние ФС на содержание флавоноидов в листьях *P. gramineus*. В наших исследованиях рдест злаковый, взятый из р. Ляля выше и ниже производственных стоков ЦБК, был подвергнут воздействию экзогенного фенола (0,1; 1; 10 мг/л) в модельном опыте. При инкубировании растений из импактной зоны в среде без добавления фенола и в среде с концентрацией фенола 0,1 мг/л в течение 96 ч содержание флавоноидов повысилось в 2 раза по сравнению с аналогичными растениями из фоновой зоны. При более высоких концентрациях фенола (1 и 10 мг/л) наблюдалась противоположная тенденция: растения, взятые выше стоков, отличались более высоким содержанием флавоноидов, чем их аналоги из импактной зоны. Из этого следует, что стимулом к увеличению содержания флавоноидов являлась определенная пороговая концентрация токсичных веществ. Низкое содержание флавоноидов в растениях, взятых из фоновой зоны, при небольшой концентрации фенола в модельном опыте (0,1 мг/л) не приводило к увеличению содержания флавоноидов по сравнению с контролем, тогда как при концентрации фенола 1 и 10 мг/л содержание флавоноидов увеличивалось в 3 и 2 раза соответственно. В растениях из импактной зоны содержание флавоноидов было наибольшим в контрольном варианте (без добавления фенола). Это можно объяснить тем, что данные растения уже находились под воздействием ФС в среде обитания. При дополнительном внесении фенола в среду в листьях этих растений произошло снижение общего содержания флавоноидов. Вероятно, экзогенный фенол оказал угнетающее действие на растения.

Таким образом, исследования показали, что действие

органических и неорганических поллютантов приводило к повышению содержания флавоноидов в листьях водных растений. Однако длительное воздействие повышенных доз токсических веществ может приводить к угнетению метаболических процессов растений, в том числе биосинтеза флавоноидов. Предполагается, что первичной биохимической реакцией на загрязнение является увеличение содержания флавоноидов, которое будет сохраняться, если оказываемое на растение воздействие находится в пределах его толерантности, и снижаться при увеличении нагрузки, вызывая угнетение роста, развития и метаболических процессов растений.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (ГК № П1301).

ЛИТЕРАТУРА

1. Безель В.С., Позолотина В.Н., Бельский Е.А., Жуйкова Т.В. Изменчивость популяционных параметров: адаптация к токсическим факторам среды // Экология. 2001. №6. С. 447–453.
2. Позолотина В.Н. Адаптационные процессы у растений // Экология. 1996. № 2. С. 111 – 116.
3. Полякова Л.В. Изменчивость содержания флавонолов и белка в природной популяции люцерны желтой // Биол. науки. 1990. № 10. С. 123–132.
4. Судачкова Н.Е., Шеин И.В., Романова Л.И., Милютин И. Л. и др. Биохимические индикаторы стрессового состояния древесных растений. Новосибирск, 1997. 176 с.
5. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М., 1993. 272 с.
6. Рогожин В.В. Практикум по биологической химии: уч.-мет. пос. СПб: Лань, 2006. 256 с.

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ КОНСТРУКЦИИ С ИНВЕРТИРОВАННЫМИ ПОВТОРАМИ ГЕНА 4CL (4-КУМАРАТ-КОА-ЛИГАЗЫ) НА ФЕНОТИП ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОСИНЫ

Ковалицкая Ю.А., Подрезов А.С., Шестибратов К.А.

Филиал ФБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия, (4967)33-09-66,
kovalitskaya@inbox.ru

Фенольные соединения растений различны, как и их функции. Например, C_6-C_3 соединения (фенилпропанового ряда), оксикоричные спирты, служат мономерами для синтеза сложного

природного полимера – лигнина, который обеспечивает механические свойства стеблей растений и проницаемость клеточных стенок для воды и питательных веществ. Однако высокая доля лигнина в древесине хвойных и лиственных пород затрудняет получение сырья для нужд целлюлозно-бумажной промышленности (ЦБП) и биоэнергетики. Кроме того, технический лигнин, который получается в виде отходов работы ЦБП сложно утилизировать. Трудность промышленной переработки лигнина обусловлена сложностью его природы, многовариантностью структурных звеньев и связей между ними, а также нестойкостью этого природного полимера, необратимо меняющего свойства в результате химического или термического воздействия. Таким образом, использование древесных пород с высоким (природным) содержанием лигнинов приводит к локальному экологическому загрязнению в районах ЦБП.

Решением данной проблемы может быть получение наукоемкими методами древесных растений с пониженным содержанием лигнина. Исследования в данной области условно можно разделить на два направления: модификация биосинтеза лигнина и гетерологичная экспрессия лигнолитических ферментов в растениях. Оба пути приводят к некоторому снижению содержания лигнинов, а в некоторых случаях к изменению качественного соотношения лигнинов в растениях. Однако у полученных растений наблюдаются различные морфологические изменения, например, потемнение древесины и отставание в росте от исходных генотипов [1]. Поэтому изучение процесса лигнификации растений до настоящего времени остается актуальным научным исследованием.

4-Кумарат-КоА-лигаза (4CL) – ключевой фермент фенилпропаноидного пути биосинтеза лигнинов всех трех типов (*n*-гидроксифениловых, гваяколовых, сингильных), связывающий *n*-кумаровую кислоту с ацетил-КоА. В растениях показано наличие нескольких тканеспецифичных изоформ фермента 4CL, и ингибирование всех или большинства изоформ фермента затруднено и может необратимо повлиять на биосинтез лигнина. Поэтому усилия ученых, работающих в этой области, направлены на получение растений с пониженной активностью фермента.

Целью данного исследования было изучение влияния экспрессии РНК-интерференционной конструкции с инвертированными повторами гена 4CL на фенотип трансгенных растений осины.

Одним из наиболее действенных механизмов подавления

экспрессии гена считается РНК-интерференция, посредством которой возможно «выключение» конкретных генов в клетках для установления их функции. На основе вектора рВl нами была создана РНК-интерференционная конструкция с инвертированными повторами гена *4CL* тополя под контролем *35S* промотора и нопалинсинтезазного терминатора *nos*, а в качестве селективного гена был использован ген устойчивости к канамицину - *nptII*. Полученный плазмидный вектор рВl-*4CL* был перенесен в *Agrobacterium tumefaciens* (штамм *CBE21*). Для трансформации осины (*Populus tremula*) использовали междоузлия растений, полученных в условиях *in vitro*. Селекцию трансгенных тканей проводили на питательных средах с содержанием канамицина 30 мг/л. Устойчивое укоренение регенерантов на селективной среде служило первым косвенным признаком встройки конструкции. Из всех полученных линий была выделена геномная ДНК и проанализирована методом ПЦР-анализа на присутствие селективного гена (*nptII*) и целевой конструкции *4CL* (Рис.1). Чтобы подтвердить отсутствие агробактериальной контаминации в анализируемом растительном материале, ДНК всех линий одновременно анализировалась на наличие агробактериального гена *VirB*. Проведенный ПЦР-анализ подтвердил трансгенный статус у 12 линий.

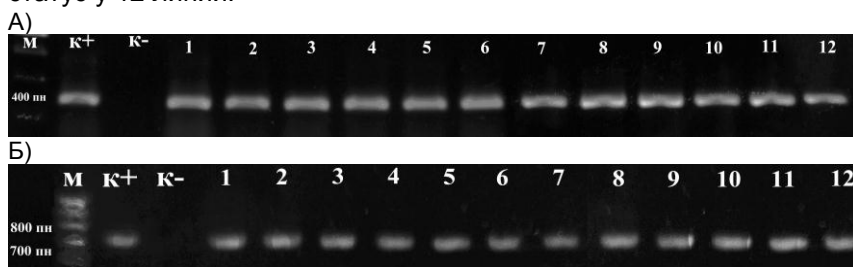


Рис.1. ПЦР-анализ трансгенных линий осины на присутствие А) конструкции - *4CL* (размер ожидаемого амплифицируемого фрагмента 387 п.н.) и Б) гена *nptII* (размер ожидаемого амплифицируемого фрагмента 741 п.н.); М – молекулярный маркер, K+ –плазмида, K- – отрицательный контроль, 1 - Pt XIII 4CL 1a, 2 - Pt XIII 4CL 1b, 3 - Pt XIII 4CL 1c, 4 - Pt XIII 4CL 2a, 5 - Pt XIII 4CL 2b, 6 - Pt XIII 4CL 2c, 7 - Pt XIII 4CL 3a, 8 - Pt XIII 4CL 3b, 9 - Pt XIII 4CL 3c, 10 - Pt XIII 4CL 4a, 11 - Pt XIII 4CL 4b, 12 - Pt XIII 4CL 4c.

Все трансгенные линии осины были высажены в защищенный грунт и в конце первого вегетационного сезона эти растения были использованы для биометрических исследований. Измерялась

высота растений от корневой шейки до верхушечной почки. Кроме того анализировали содержание лигнина в древесине трансгенных растений. По итогам этих исследований для дальнейшего изучения были отобраны 4 трансгенные линии: Pt XIII 4CL 1с, Pt XIII 4CL 2с, Pt XIII 4CL 3а, Pt XIII 4CL 4а.

В ходе биометрического анализа измеряли высоту растений, длину черешка и длину осевой жилки 3-4 листьев, а также количество междоузлий. Измерения показали, что все трансгенные растения достоверно отличались от растений исходного генотипа (Рис.2). Растения линий Pt XIII 4CL 2с и Pt XIII 4CL 3а были ниже контрольных растений на 30%, а растения линии Pt XIII 4CL 1с – на 9%. У растений этих же линий длина черешков 3-4 листьев достоверно превышала длину черешков контрольных растений. По остальным показателям достоверных различий не было выявлено.

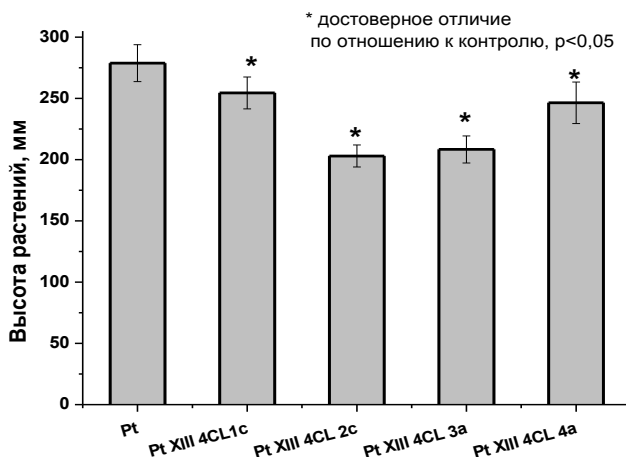


Рис.2. Высота растений в конце первого вегетационного сезона.

В ходе исследований трансгенных растений мы обнаружили изменение цвета древесины. Древесина растений линии Pt XIII 4CL 1с не отличалась по цвету от древесины контрольных растений, в то время как древесина растений линий Pt XIII 4CL 3а и Pt XIII 4CL 4а приобрела бурую окраску. Наиболее выраженная окраска наблюдалась у древесины растений линии Pt XIII 4CL 2с. По-видимому, ферменты биосинтеза лигнинов в растении находятся в тесном взаимодействии, поскольку при подавлении экспрессии гена *4CL*, мы наблюдаем окраску древесины, что свидетельствует о

снижении активности фермента CAD, приводящему к увеличению накопления остатков кониферилового альдегида [2].

В ходе анализа древесины трансгенных растений измерялись следующие параметры: удельное содержание экстрактивных веществ, удельное содержание кислотонерастворимого, кислоторастворимого и общего лигнинов. Анализируя результаты, представленные в таблице 1, видно, что в древесине растений линии Pt XIII 4CL 2с содержание лигнинов ниже на 23,3%, а у линии Pt XIII 4CL 4а на 11% в сравнении с контрольными показателями, в то время как у линий Pt XIII 4CL 1с и Pt XIII 4CL содержание лигнинов было на уровне контроля.

Таблица 1.

Результаты химического анализа древесины.

Линия	Удельное содержание экстрактивных веществ	Удельное содержание лигнина			Снижение общего лигнина относительно контроля, %	Доля кислоторастворимого лигнина относительно общего его содержания, %
		Кислото-нерастворимый, %	Кислото-растворимый, %	Общий лигнин, %		
Pt	8,3	21,0	3,4	24,4	-	13,8
Pt XIII 4CL 1с	10,1	21,4	3,0	24,3	0,2	12,1
Pt XIII 4CL 2с	13,1	15,2	3,6	18,7	23,2	19,1
Pt XIII 4CL 3а	10,1	22,5	3,0	25,5	-4,7	11,9
Pt XIII 4CL 4а	11,0	18,5	3,2	21,7	11,1	14,5

Кроме того, помимо снижения содержания общего количества лигнина в древесине трансгенных линий Pt XIII 4CL 2с и Pt XIII 4CL 4а, наблюдается пропорциональное увеличение доли кислоторастворимого лигнина относительно его общего пула.

Таким образом, максимальное снижение содержания лигнинов в древесине трансгенных растений строго коррелирует со

снижением высоты растения (замедление роста) и с изменением цвета древесины растений. Растения линии Pt XIII 4CL 1с немного ниже контрольных растений, цвет древесины не изменен и содержание лигнинов не отличается от контрольных значений, что подтверждает правомочность сделанных выводов. Подобную тенденцию мы наблюдали при изучении укоренения трансгенных растений осины *in vitro*. Были проанализированы следующие параметры: среднее количество корней на 1 растение, общая длина корней растения, процент укоренения на 3, 6, 9 и 12 сутки эксперимента. Показано, что закладка корней у всех трансгенных растений происходит своевременно, на 5-6 сутки, однако дальнейшая элонгация корней у растений линий Pt XIII 4CL 2с, Pt XIII 4CL 3а и Pt XIII 4CL 4а замедлена. Показатели общей длины корней растений данных трансгенных линий даже на 12 сутки эксперимента были в 2 раза ниже показателей нетрансгенного контроля (Рис.3). При этом все анализируемые показатели линии Pt XIII 4CL 1с были на уровне контрольных значений. Таким образом, мы наблюдали замедление роста корней у трансгенных растений с пониженным содержанием лигнина в древесине.

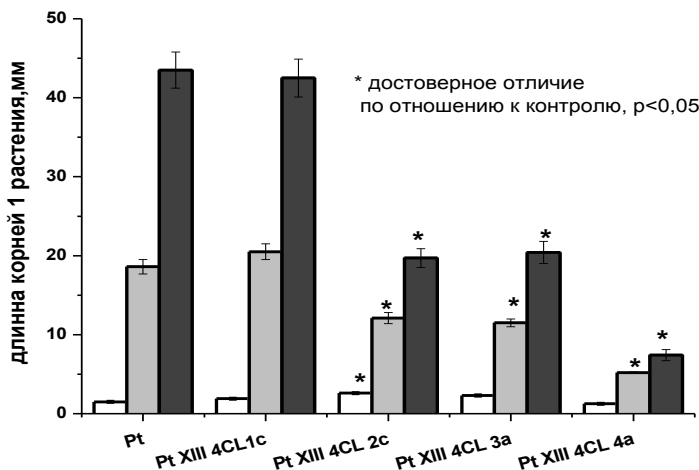


Рис.3. Длина корней растений на 6 (белый столбик), 9 (серый столбик) и 12 (черный столбик) сутки эксперимента.

Анализируя растения осины, трансформированные конструкцией 4CL, можно заключить, что «выключение» гена 4CL не приводит к резкому снижению содержания лигнинов в растении, но активирует другие пути биосинтеза лигнина, а также, по-видимому, приводит к снижению активности и других ферментов биосинтеза лигнина. Влияние 4CL на фенотип растений - снижение высоты трансгенных растений, изменение окраски древесины растений, снижение содержания лигнинов в древесине растений, трансформированных конструкцией 4CL, согласуются с результатами анализа трансгенных растений сосны, табака и осины с пониженной активностью фермента 4CL [3, 4]. Нами впервые показано влияние 4CL на процесс укоренения трансгенных растений. В дальнейшем мы планируем провести анализ качественного состава лигнинов в полученных трансгенных линиях и изучить возможные изменения морфологии проводящих путей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рукавцова Е.Б., Алексеева В.В., Бурьянов Я.И. Применение РНК-интерференции в метаболической инженерии растений // Биоорг.химия. 2010. Т. 36 . С. 159-169.
2. Higuchi T., Ito T., Umezawa T., Hibino T., Shibata D. Red brown colour of lignified tissues of transgenic plants with antisense CAD gene-wine red lignin from coniferyl aldehydes. // J. Biotechnol. 1994. V. 37. P. 151–158.
3. Wagner A., Donaldson L., Kim H., Phillips L., Flint H., Steward D., Torr K., Koch G., Schmitt U., Ralph J. Suppression of 4-Coumarate-CoA ligase in the coniferous gymnosperm *Pinus radiata* // Plant Physiol. 2009. V. 149. P. 370–383.
4. Li, L., Zhou, Y., Cheng, X., Sun, J., Marita, J.M., Ralph, J., and Chiang, V.L. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation // Proc Natl Acad Sci USA. 2003. V. 100. P. 4939–4944.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА КАК ПОСРЕДНИКИ ПРИ ИНДУЦИРОВАНИИ ТЕПЛОУСТОЙЧИВОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЕЙСТВИЕМ ЭКЗОГЕННЫХ САЛИЦИЛОВОЙ И 4-ОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТ

Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Карпец Ю.В.

Харьковский национальный аграрный университет им. В.В.Докучаева,
Харьков, Украина, тел. +380572997352, e-mail: plant_biology@mail.ru

2-оксибензойная (салициловая – СК) и 4-оксибензойная (4-ОБК) кислоты являются естественными метаболитами фенилпропаноидного пути растений [1]. СК относят к веществам,

сочетающим свойства сигнальной молекулы и стрессового фитогормона [2]. Физиологические эффекты 4-ОБК исследованы намного меньше. Показано, что 4-ОБК индуцировала устойчивость растений пшеницы к отрицательным температурам [3], хотя, в отличие от СК, не повышала холодоустойчивость молодых растений кукурузы [4]. Также 4-ОБК не проявляла способности индуцировать синтез PR-белков и повышать устойчивость растений к биотическим стрессорам [5]. Однако выявлена аккумуляция 4-ОБК во флоэмной жидкости огурца при заражении *Pseudomonas syringae*, связанная с активацией фенилаланинаммонийлиазы [6].

Способность экзогенной СК повышать устойчивость растений в значительной степени обусловлена усилением генерации активных форм кислорода (АФК), выполняющих роль посредников при передаче сигнала в геном, что обеспечивает формирование защитных реакций на биотические и абиотические стрессоры [5, 7]. В качестве мишени для реализации эффектов ароматических кислот, чаще всего рассматривается каталаза [4, 5, 8], ингибирование которой приводит к накоплению в клетках пероксида водорода. В то же время полученные для ряда видов растений данные об активирующем влиянии СК на активность НАДФН-оксидазы [9], пероксидазы [10], СОД [11] и оксалооксидазы [12] позволяют полагать, что ингибирование каталазы является далеко не единственной, а, возможно, и не основной причиной увеличения содержания АФК под действием СК. Особенности влияния 4-ОБК на ферментные системы, генерирующие и обезвреживающие АФК, до сих пор изучены очень слабо.

Целью настоящей работы было сравнить влияние СК и 4-ОБК на теплоустойчивость растительных клеток и генерацию ими АФК, а также установить их вероятные ферментативные источники.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

В качестве модельных объектов использовали отрезки колеоптилей пшеницы (*Triticum aestivum* L.), отделенные от 4-суточных этиолированных проростков сорта Элегия [11]. Колеоптили пшеницы инкубировали на 2% сахарозе с добавлением натриевой соли пенициллина (100 тыс. ед./л). В опытных вариантах в эту среду инкубации добавляли 10 мкМ растворы СК или 4-ОБК и инкубировали отрезки на указанных растворах в течение 2 ч, после чего проводили биохимические анализы либо подвергали колеоптили повреждающему прогреву в водном ультратермостате при температуре 43°C в течение 10 мин. Через 2 сут после прогрева оценивали их выживание. В отдельных сериях опытов колеоптили обрабатывали ингибиторами НАДФН-оксидазы (альфа-

нафтолом – 1 мкМ) или пероксидазы (салицилгидроксамовой кислотой – СГК в концентрации 500 мкМ).

Генерацию супероксидного анион-радикала ($O_2^{\cdot-}$) определяли по восстановлению нитросинего тетразолия [13], содержание пероксида водорода по Bindschedler et al. [14], активность оксалактоксидазы с использованием хромогенного субстрата *орто*-фенилендиамина и щавелевой кислоты [12], активность каталазы, СОД и пероксидазы – по описанным ранее методикам [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Предобработка колеоптилей СК и 4-ОБК заметно усиливала генерацию ими супероксидного анион-радикала и пероксида водорода и индуцировала устойчивость к повреждающему прогреву (рис. 1).

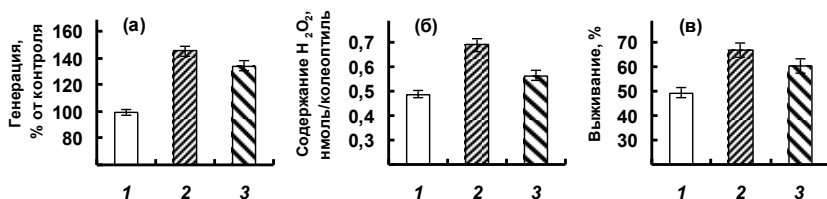


Рис. 1. Влияние ароматических кислот на генерацию супероксидного анион-радикала (а), содержание пероксида водорода в колеоптилях пшеницы (б) и их выживание (в) после повреждающего прогрева. 1 – контроль, 2– СК (10 мкМ), 3 – 4-ОБК (10 мкМ).

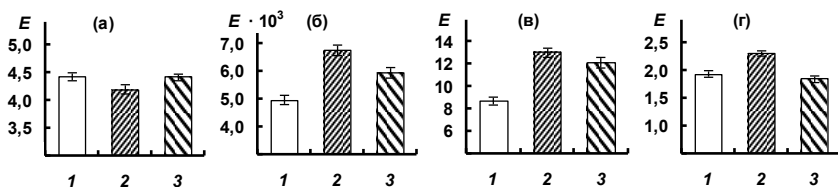


Рис. 2. Влияние СК и 4-ОБК на активность (E , усл. ед./колеоптиль · мин) каталазы (а), ионносвязанной пероксидазы клеточных стенок (б), СОД (в) и оксалактоксидазы (г) колеоптилей пшеницы. 1 – контроль, 2– СК (10 мкМ), 3 – 4-ОБК (10 мкМ).

Обработка СК и 4-ОБК практически не влияла на активность каталазы в колеоптилях пшеницы, однако вызывала повышение активности пероксидазы, связанной с клеточными стенками и СОД (рис. 2, а-в). Под действием СК также происходило небольшое, но

достоверное увеличение активности оксалаксоксидазы в колеоптилях, а 4-ОБК не влияла на активность этого фермента (рис. 2, г).

Для выяснения ферментативных источников АФК использовали ингибиторный анализ. Предобработка колеоптилей ингибитором НАДФН-оксидазы альфа-нафтолом частично нивелировала усиление генерации АФК, вызываемое как действием СК, так и 4-ОБК (рис. 3, а). Усиление образования супероксидного анион-радикала, вызываемое СК либо 4-ОБК, угнеталось также предобработкой колеоптилей ингибитором пероксидазы СГК. Можно полагать, что в усиление генерации супероксида клеточной поверхностью вносят вклад как НАДФН-оксидаза, так и пероксидаза.

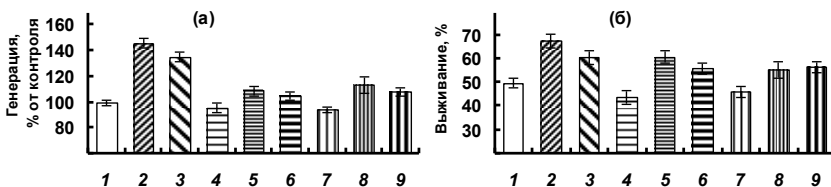


Рис. 3. Генерация супероксидного анион-радикала (а) колеоптилями пшеницы и их выживание (б) после повреждающего прогрева при обработке ароматическими кислотами и альфа-нафтолом и СГК. 1 – контроль, 2 – СК (10 мкМ), 3 – 4-ОБК (10 мкМ), 4 – альфа-нафтол (1 мкМ), 5 – СК (10 мкМ) + альфа-нафтол (1 мкМ), 6 – 4-ОБК (10 мкМ) + альфа-нафтол (1 мкМ), 7 – СГК (500 мкМ), 8 – СК (10 мкМ) + СГК (500 мкМ), 9 – 4-ОБК (10 мкМ) + СГК (500 мкМ).

На основании полученных результатов можно заключить, что основными причинами накопления пероксида водорода в колеоптилях пшеницы под влиянием СК и 4-ОБК являются повышение активности НАДФН-оксидазы и форм пероксидазы, участвующих в генерации супероксидного анион-радикала, а также СОД, превращающей супероксидный анион-радикал в пероксид водорода. Вклад оксалаксоксидазы в реализацию эффектов исследуемых ароматических кислот, по-видимому, невелик. Повышение концентрации H_2O_2 под влиянием экзогенных СК и 4-ОБК может приводить к формированию и передаче в генетический аппарат сигнала, индуцирующего защитные реакции, например усиление экспрессии генов антиоксидантных ферментов [2]. В этом отношении физиологические эффекты 4-ОБК могут быть близкими

к действию более изученной СК [3].

Ингибиторы НАДФН-оксидазы и пероксидазы значительно снижали положительное влияние СК и 4-ОБК на теплоустойчивость coleoptилей пшеницы (рис. 3, б), что можно рассматривать как свидетельство участия АФК как посредников при индуцировании защитных реакций растительных клеток экзогенными ароматическими кислотами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sircar D., Mitra A. Accumulation of p-Hydroxybenzoic acid in Hairy Roots of *Daucus carota* 2: Confirming Biosynthetic Steps through Feeding of Inhibitors and Precursors // J. Plant Physiol. 2009. V. 166. P. 1370-1380.
2. Wang L.J., Li S.H. Salicylic Acid-Induced Heat or Cold Tolerance in Relation to Ca^{2+} Homeostasis and Antioxidant Systems in Young Grape Plants // Plant Sci. 2006. V. 170. P. 685-694.
3. Horvath E., Pal M., Szalai G., Paldi E., Janda T. Exogenous 4-Hydroxybenzoic Acid and Salicylic Acid Modulate the Effect of Short-Term Drought and Freezing Stress on Wheat // Biol. Plant. 2007. V. 51. P. 480-487.
4. Horvath E., Janda T., Szalai G., Paldi E. In vitro Salicylic Acid Inhibition of Catalase Activity in Maize: Differences between the Isozymes and a Possible Role in the Induction of Chilling Tolerance // Plant Sci. 2002. V. 163. P. 1129-1135.
5. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. Active Oxygen Species in the Induction of Plant Systemic Acquired Resistance by Salicylic Acid // Science. 1993. V. 262, № 5141. P. 1883-1886.
6. Smith-Becker J., Marois E., Huguet E.J., Midland S.L., Sims J.J., Keen N.T. Accumulation of Salicylic Acid and 4-Hydroxybenzoic Acid in Phloem Fluids of Cucumber during Systemic Acquired Resistance is Preceded by a Transient Increase in Phenylalanine Ammonia-Lyase in Petioles and Stems // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 231-238.
7. Колупаев Ю.С., Карпец Ю.В., Мусатенко Л.И. Участь активних форм кисню в індукуванні солестійкості проростків пшениці саліциловою кислотою // Доповіді НАН України. 2007. № 6. С. 154-158.
8. Панина Я.С., Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. Ингибирование активности каталазы клубней картофеля салicyловой и янтарной кислотами // Докл. АН. 2004. Т. 397. С. 131-133.
9. Geetha H.M., Shetty H.S. Expression of Oxidative Burst in Cultured Cells of Pearl Millet Cultivars against *Sclerospora graminicola* Inoculation and Elicitor Treatment // Plant Sci. 2002. V. 163. P. 653-660.
10. Mika A., Boenisch M.J., Hopff D., Luthje S. Membrane-Bound Guaiacol Peroxidases from Maize (*Zea mays* L.) Roots are Regulated by Methyl Jasmonate, Salicylic Acid, and Pathogen Elicitors // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. P. 831-841.

-
11. Колупаев Ю.Є. Возможна роль супероксиддисмутази у саліцилатіндукованому нагромадженні пероксидів у колеоптилях *Triticum aestivum* L. // Укр. ботан. журн. 2007. Т. 64. С. 270-278.
 12. Трошина Н.Б. Яруллина Л.Г., Валеев А.Ш., Максимов И.В. Индукция салициловой кислотой устойчивости пшеницы к *Septoria nodorum* Berk. // Известия РАН. Серия биологическая. 2007. № 5. С. 545-550.
 13. Шорнинг Б.Ю., Смирнова Е.Г., Ягужинский Л.С., Ванюшин Б.Ф. Необходимость образования супероксида для развития этиолированных проростков пшеницы // Биохимия. 2000. Т. 65. С. 1612-1618.
 14. Bindschedler L.V., Minibayeva F., Gardner S.L., Gerrish C., Davies D.R. Bolwell G.P. Early Signalling Events in the Apoplastic Oxidative Burst in Suspension Cultured French Bean Cells Involve cAMP and Ca^{2+} // New Phytologist. 2001. V. 151. P. 185-194.
 15. Колупаев Ю.Е., Акинина Г.Е., Мокроусов А.В. Индукция теплоустойчивости колеоптилей пшеницы ионами кальция и ее связь с окислительным стрессом // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 227-232.
-

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗНЫХ ГУМИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ В УПРАВЛЕНИИ БИОПРОДУКТИВНОСТЬЮ РАСТЕНИЙ

Комаров А.А.¹, Суханов П.А.¹, Комаров А.А.², Пермьяков Е.Г.²
ГНУ АФИ РАСХН¹, ГНУ ЛенНИИСХ РАСХН², Санкт-Петербург, Россия 8-911-745-20-25, e-mail: Zelenydar@mail.ru

Гумусовые вещества почв являются фенольными соединениями, проявляющими не только структурное сродство, но и специфический физиологический отклик, который фиксируется при обработке ими растений. Таким образом, в почвенной среде гормональная регуляция питания растений может осуществляться за счет гумусовых веществ. Активность гумусовых веществ обязана их химической структуре и функциональным группам, которые могут взаимодействовать с гормон-связывающими белками в мембранных системах, вызывая гормонально подобный ответ. Показано, что ауксино- и гиббереллино-подобная активность связаны с высоким содержанием фенольных и карбоксильных групп гумусовых веществ (Nardi Serenella et al., 1990).

В настоящее время гуминовые удобрения и препараты широко используются в качестве средств управления

продуктивностью возделываемых культур. В 50-80 гг. прошлого столетия широкое применение имели достаточно простые гуматы, извлекаемые из различных органогенных источников с помощью щелочных агентов (гуматы натрия, калия, аммония). Затем стали появляться новые, разнообразные и все более специализированные гуминовые удобрения. Так, в 1987-1991 гг. А.А.Комаровым и М.Н.Сибаровой была разработана и апробирована уникальная технология моделирования естественного процесса формирования гумуса в условиях технологического контроля. Путем окислительно-гидролитической трансформации лигнина был получен новый модельный продукт гуминовых веществ – лигногуминовые кислоты. В дальнейшем, основываясь на этой технологии, ООО «НПО «РЭТ» был получен широкий ассортимент лигногуматов. Отличительная черта удобрений серии «Лигногумат» - окислительно-гидролитическая трансформация лигнифицированного растительного материала с получением сополимеризованных (средне- и высокомолекулярных) лигниновых структур в сопряженном процессе деметоксилирования и карбоксилирования. Лигногуминовые кислоты имеют ароматический каркас с минимальным содержанием азота. В этом отношении структурные фрагменты соединений близки структуре гиббереллинов, в чем-то близка и физиологическая реакция растений на их обработку лигногуматами.

В 1995-1996 гг. АОЗТ «Балтконверсия» было освоено экспериментальное производство гуматов из озерного сапропеля, а с 1998 г. налажено промышленное производство органоминерального удобрения «Дарина». Ближайшими аналогами этих удобрений являются продукты типа «Благо», «ФлорГумат» и др. Отличительная черта гуминовых удобрений из сапропеля – слабополимеризованная «рыхлая» молекулярная структура с меньшей (относительно гуминовых веществ почв и лигногуматов) молекулярной массой, наличием азота. В состав соединений входят индол-подобные структуры, а растения, обработанные подобными препаратами, проявляют реакцию сходную с действием ауксинов.

Наконец, учтя весь предыдущий опыт, в 2005-2008 гг. учеными Агрофизического института вместе с Белорусскими специалистами было разработано принципиально новое удобрение «Стимулайф», обладающее высокой физиологической активностью на растения, даже при минимальном разведении. Отличительная черта этого типа гуминовых препаратов состоит в том, что данный продукт выделяется при аммонолизе торфа в среде с 1%

раствором водного аммиака в присутствии перекиси водорода. В результате получают конденсированные продукты с включением азота в гетероцикл, а растения при обработке этими препаратами проявляют реакцию, подобную обработке цитокилинами.

Кроме того в экспериментах оценивался продукт биологической ферментации, марка «Идеал». Производитель ЗАО «МНПП «ФАРТ». Отличительная черта удобрения – биологическая вермикомпостная доработка органогенного материала с щелочной экстракцией ферментированного продукта.

Для сравнительной оценки разных гуматов в 2010-2011 гг. проводились эксперименты в производственных условиях фермерского хозяйства «Алакуль-1» Выборгского района и ЗАО «Победа» Ломоносовского района Ленинградской области. Опыты были заложены в типичных для региона условиях. Почва характеризовалась однородным механическим составом с нейтральной реакцией почвенной среды, высоким уровнем почвенного плодородия. Хозяйственный агротехнологический фон на протяжении всего вегетационного периода поддерживался на высоком уровне за счет оптимизированной системы питания растений, использования необходимых и достаточных средств защиты растений, высокой культуры земледелия. Это позволило оценить рострегулирующую специфику испытываемых удобрений при оптимальных условиях роста и развития растений. Со всеми удобрениями заложены производственные опыты на посевах основных культур: морковь столовая, сорт Нарбонне, Бангор; свёкла столовая, сорт Боро; капуста белокочанная, сорт Колобок.

Таблица 1.

Урожайность овощных культур при использовании гуминовых удобрений

Варианты опыта	Капуста		Морковь		Свёкла	
	т/га	±%	т/га	±%	т/га	±%
Контроль (фон хозяйства)	103,4		59,5	-	61,0	
«Идеал»	-	-	57,0	-4,2	72,4	18,7
«Дарина»	122,0	18,2	54,9	-7,7	70,3	15,2
«Лигногумат»	118,2	14,3	76,0	27,7	69,0	13,1
«Стимулайф»	130,2	25,9	68,5	15,1	73,9	21,1
НСР ₀₅	13,7		6,2		8,7	

При возделывании культур применялась стандартная технология хозяйства (фон – хозяйственная технология).

Повторность опыта 4 кратная. Внесение всех исследуемых препаратов производилось в два срока в строго рекомендуемых производителями дозах, исходя из расчетной дозы некорневой подкормки и нормы полива 300 л/га.

Сравнительный анализ действия испытуемых удобрений на возделываемые культуры представлен в табл.1. Удобрение «Идеал» проявило существенный позитивный эффект (прибавка более 18%) на свёкле. Существенное позитивное действие удобрения «Дарина» проявилось на капусте (прибавка более 18%). Использование «Лигногумата» расширило существенный позитивный отклик возделываемых культур: капуста (прибавка более 14%), морковь (прибавка более 27%), причем наибольший эффект среди всех испытуемых удобрений проявился на моркови. Наибольший позитивный отклик возделываемые культуры проявили на удобрение «Стимулайф». Этот препарат при расходе продукта менее 300 мл/га обеспечивал существенную прибавку свёклы (более 21%), капусты (более 25%), моркови (более 15%).

Таблица 2.

Показатели качества растительной продукции, полученные при использовании различных гуминовых удобрений

Варианты	Капуста белокочанная			Морковь столовая			Свёкла столовая		
	водораств. углеводы		Нитраты	Каротин		Нитраты	Аскорбин. к-та	Нитраты	
	ц/га	±%	мг/кг	кг/га	±%	мг/кг	кг/га	±%	мг/кг
Контроль (фон хозяйства)	36,0	-	564	20,4	-	105	11,2	-	1287
«Идеал»	-	-	-	14,1	-31	325	16,0	42,8	1357
«Дарина»	54,9	52,2	893	13,6	-33	170	10,0	-11	1050
«Лигногумат»	35,2	-2,2	590	18,8	-8	105	10,1	-10	1071
«Стимулайф»	33,6	-7,7	302	13,8	-32	100	10,9	-1	1102

Оценивая некоторые показатели качества овощной продукции на вариантах с обработкой гуматами видно, что данные весьма разнятся по культурам и применяемым гуматам. Так, обработка растений удобрением «Идеал» обеспечивала лучшие показатели качества свёклы (по накоплению аскорбиновой кислоты - на 42,8%). Применение «Дарины» обеспечивало наибольшее накопление водорастворимых углеводов в капусте, а «Стимулайф» обеспечивал снижение накопления нитратов в плодоовощной продукции всех оцениваемых культур.

На основании анализа проведенных исследований напрашивается вывод, который подтверждает ранее отмеченные

результаты о том, что эффективность различных гуминовых удобрений на разные культуры имеет разную специфику. Т.е. нет универсального удобрения или препарата для всех культур, а необходимо выбирать наиболее эффективный препарат для каждой культуры и даже сорта. Поэтому в дальнейшем необходимо сформировать специфичную сортовую агротехнологию по использованию наиболее адаптивных средств коррекции продукционного процесса.

Применение органо-минеральных удобрений на основе гуминовых веществ, в производственных условиях Ленинградской области, оказалось весьма успешным. Отмечено, что наибольший эффект давали обработки в ранние утренние и поздние вечерние часы, хорошее распыление, обеспечивающее максимальное попадание препарата на листовую поверхность. В производственных условиях различных хозяйств были зафиксированы высокие прибавки урожайности относительно хозяйственных (высокоинтенсивных) технологий по всем тестируемым культурам.

Среди экологически безопасных средств управления биопродуктивностью растений гуминовые препараты занимают особое место. Во-первых, потому, что являются естественными природными соединениями, обеспечивающими плодородие почв. Во-вторых, их используют в малых концентрациях, менее 0,1%. Как показали наши опыты оптимальная концентрация, обеспечивающая наибольший урожай, может быть в 100-10000 раз меньше (0,00001% и меньше). В-третьих, действуя подобно естественным фитогормонам растений, гуматы обеспечивают не только повышение продуктивности, но и качества выращиваемой продукции, снижают накопление нитратов, тяжелых металлов и других вредных веществ в ткани растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nardi Serenella, Pizzeghello Diego, Reniego Fabiano, Muscole Adele. Biological activity of humic substances extracted from soil under different vegetation cover // Common. Soil sci. And Plant Anal. 1999. 30. № 5-6. С.621-634.

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ САЛИЦИЛОВОЙ И АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТ В ТКАНЯХ ЛУКОВИЧНЫХ ЧЕШУЙ ТЮЛЬПАНА В ПЕРИОД СУХОПОКОЯ

Кондратьева В.В., Семёнова М.В.

ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН, Москва, Россия,
+7-499-977-91-54, lab-physiol@mail.ru

Для тюльпанов как и для большинства луковичных эфемероидов характерно короткое время вегетации, за которым следует продолжительный период сухопокоя, когда происходит заложение и формирование побегов будущего года с цветочными почками. Этот период можно рассматривать как адаптацию к неблагоприятным климатическим условиям, которая привела к перестройке всех морфологических и метаболических процессов в растении. В природной среде (сухие степи и полупустыни) тюльпаны этот период находятся в почве в виде видоизмененного побега — луковицы. В умеренных широтах их выращивание как многолетней культуры связано с рядом трудностей при формировании цветочных почек из-за температурного режима и влажности, а также развития грибной инфекции. Поэтому тюльпаны ежегодно выкапывают и помещают в камеру с режимом температуры и влажности близким к условиям их природного ареала. Задачей нашей работы было изучение формирования почки возобновления и динамики содержания веществ, связанных с включением адаптационных механизмов абсцизовой (АБК) и салициловой (СК) кислот в тканях чешуй луковиц при различных методах культивирования (ежегодная выкопка и многолетняя культура без выкопки) в Средней полосе России с целью создания ресурсосберегающих технологий в сфере озеленения городов.

СК и АБК играют существенную роль в приспособлении растительных организмов к нетипичным для них условиям внешней среды, участвуя в запуске многоступенчатых защитных механизмов при абиотическом стрессе. Наряду с этим и СК, и АБК связаны с устойчивостью растительного организма к различным патогенам (Balmer and Mauch-Mani, 2012). Оба вещества задействованы в протекторных механизмах, нейтрализующих окислительный стресс, вызванный высокой температурой (Larkindale and Knight, 2002). Экзогенные обработки АБК увеличивали холодостойкость теплолюбивых растений, повышая при этом уровень эндогенной СК (Szalai et al., 2011). Кроме того, формирование почки

возобновления контролируется гормональным балансом растения, а АБК играет ключевую роль в прохождении периода покоя у большинства растений (Wasilewska et al., 2008).

Объектами исследования были два сорта тюльпанов: Little Princess, представляющий собой межвидовой гибрид природных видов *Tulipa hageri* Heldreich и *T. aucheriana* Baker и сорт из группы Дарвиновы гибриды Yellow Dover. Опыт проведён в 2009-2011 гг. в ГБС им. Н.В. Цицина РАН. Растения высажены в грунт осенью 2009 года. После окончания периода вегетации 2010 года часть растений выкопали и луковицы поместили в камеру с контролируемыми условиями влажности и температуры, а другая часть оставлена для прохождения периода сухопокоя в грунте. В период сухопокоя с июля по сентябрь фиксировали луковичные чешуи для определения СК и АБК, а также вели наблюдения за формированием почки возобновления и развитие грибной инфекции. В начале октября луковицы из сушильной камеры посажены в грунт. В период вегетации весной 2011 года оценивали развитие растений по вариантам опыта: проводили биометрические измерения генеративного побега и фенологические наблюдения. Содержание СК и АБК определяли из одной навески. Экстракцию проводили 80% этанолом на холоде 3 раза по одному часу. Объединенный экстракт упаривали до водной фазы, делили ее на две части. Далее очистку проводили методом тонкослойной хроматографии для СК, а для выделения АБК экстракт предварительно чистили серным эфиром. На заключительном этапе применяли метод ВЭЖХ по внешнему стандарту по изократической системе приборов «Стайер» (Аквион, Россия) с колонкой RP-18 Luna.

Закладка почек возобновления началась раньше в сушильной камере у обоих сортов, но к моменту их высадки в обоих вариантах и у Little Princess, и у Yellow Dover размеры почек были почти одинаковы и все элементы генеративного побега полностью сформированы. В грунте у тюльпанов обоих сортов в сентябре появились корни. Следует отметить, что у сорта Yellow Dover в грунте зафиксировано сильное развитие грибной инфекции *Botrytis tulipae*. Динамика АБК отражала морфологические процессы, происходящие в тканях луковицы в период сухопокоя. У сорта Little Princess в начале периода летнего покоя уровень свободной АБК в тканях чешуй был около 5 мкг/г сухого вещества, затем по мере развития почки возобновления содержание этого фитогормона сократилось на порядок (до 0,6-0,7 мкг/г с.в.). В конце периода сухопокоя в грунте, когда активизировались ростовые процессы

уровень АБК снизился в 2 раза (до 0,3 мкг), а в сушильной камере остался на прежнем уровне. У сорта Yellow Dover при вхождении в сухопокой содержание АБК в тканях чешуй луковиц было значительно ниже, чем у Little Princess, но в дальнейшем, в июле-сентябре динамика содержания этого фитогормона стала аналогичной у обоих сортов. Следует отметить, что в августе содержание АБК в тканях чешуй луковиц Yellow Dover в грунте было в 2 раза ниже, чем в луковицах из сушильной камеры. Это было сопряжено со значительным развитием грибной инфекции у растений в грунте.

Содержание СК в начале сухопокоя в тканях луковиц у обоих сортов не отличалось (42,5 мкг/г). В середине июля у сорта Little Princess ее уровень повысился и в грунте, и в сушильной камере до 60-70 мкг/г с.в., а в конце сухопокоя у растений в сушильной камере снизился до 3,2 мкг/г с.в., но в грунте остался на прежнем уровне. Поражение *Botrytis tulipae* у этого сорта в грунте было незначительное. У сорта Yellow Dover в период сухопокоя отмечено снижение содержания СК по сравнению с исходным. В сентябре в грунте уровень СК в тканях луковиц этого сорта достигает исходного уровня, а в условиях сушильной камеры превосходит исходный в 3 раза. Однако, отмеченное в августе развитие грибной инфекции у растений в грунте только усилилось.

Таким образом, если динамика содержания АБК в тканях луковиц обоих сортов имела много общего в контролируемых условиях и в грунте и, в основном, определялась процессами протекающими внутри луковицы в период покоя, то в изменении содержания СК отмечены существенные различия между сортами и вариантами опыта, вероятно связанные с биогенным стрессом (патогенными грибами).

В период вегетации следующего 2011 года у сорта Little Princess из луковиц обоих вариантов опыта развились генеративные побеги с полноценными цветками. У тюльпанов, находившихся в период сухопокоя в грунте, зацвело 89% растений, а у растений из сушильной камеры — 95%, при этом грибной инфекцией было поражено 9,4% и 5,4% соответственно. Тюльпаны сорта Yellow Dover намного хуже перенесли период сухопокоя в грунте. Они сформировали генеративные цветущие побеги, но продолжительность цветения у этого сорта была меньше и зацвело только 64% растений (у находившихся в период сухопокоя в сушильной камере - 95%), а грибной инфекцией было поражено 79% луковиц (в условиях сушильной камеры - 14 %). Возможно, резкое увеличение уровня СК (почти в 3 раза по сравнению с

грунтом) у этого сорта в конце сухопокоя в контролируемых условиях способствовало защите растения от грибной инфекции после посадки в грунт. У сорта Little Princess весь период сухопокоя и в грунте, и в сушильной камере в тканях луковичных чешуй отмечен высокий (в 2-3 раза выше, чем у сорта Yellow Dover) уровень СК и поражение *Botrytis tulipae* у этого сорта, являющегося гибридом двух видов, было на порядок ниже.

Итак, изменение содержания СК и АБК в тканях луковичных чешуй тюльпанов двух сортов было сопряжено со степенью поражения грибной инфекцией и отражало ход морфогенетических процессов в почке возобновления при прохождении сухопокоя в грунте и контролируемых условиях, что повлияло на рост и развитие генеративных побегов в следующий период вегетации. На основании физиолого-биохимических и морфологических характеристик растений для многолетнего использования в озеленении можно рекомендовать межвидовой гибрид Little Princess, менее подверженный грибной инфекции и сформировавший полноценные цветущие генеративные побеги.

ЛИТЕРАТУРА

2. Balmer D. and Mauch-Mani B. Plant Hormones and Metabolites as Universal Vocabulary in Plant Defense Signaling // Signaling and Communication in Plants, Vol. 14, Biocommunication of Plants. - Springer, Berlin, 2012. - P. 37-50.
3. Larkindale J. and Knight M.R. Protection against Heat Stress-Induced Oxidative Damage in Arabidopsis Involves Calcium, Absciscic Acid, Ethylene, and Salicylic Acid // Plant Physiology. - 2002. - Vol. 128. - P. 682-695.
4. Szalai G., Pal M., Janda T. Absciscic acid may alter the salicylic acid-related abiotic stress response in maize // Acta Biologica Szegediensis. - 2011. - Vol. 55(1). - P.155-157.
5. Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C. Redko Y., Jammes F. Valon C., Freidit Frey N., Leung J. An update on absciscic acid signaling in plants and more // Molecular Plant. 1 - 2008. - P. 198-217.

ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ОБРАЗОВАНИЕ ФЕНОЛОВ И МОРФОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ ПЕЛАРГОНИИ КОРОЛЕВСКОЙ (*P. GRANDIFLORUM*) *IN* *VITRO*

Корчагина А.В., Корчагин А.В., Поляков А.В.

ГНУ ВНИИ овощеводства Россельхозакадемии д. Верея, Московская обл.,
тел. (496) 462-44-13 e-mail: gasanyan@gmail.com

В настоящее время пеларгония королевская — одна из самых востребованных и любимых культур у населения. Ее можно использовать не только в открытом грунте, но и в комнатном озеленении.

Основной способ размножения пеларгонии королевской — зеленое черенкование, при котором со временем в растениях накапливается внутренняя инфекция. В связи с этим, наилучшим способом для получения свободного от внутренней инфекции материала и его быстрого размножения является клональное микроразмножение [1].

Однако использование культуры меристем и апексов для оздоровления пеларгонии затруднено тем, что ткани этого растения выделяют вещества фенольной природы, токсичные для растений [2]. Это выражается в потемнении питательной среды, потемнении частей экспланта, соприкасающихся со средой, а в последующем и гибели ослабленных эксплантов [3].

В опытах с растениями пеларгонии королевской, проведенных нами ранее, было выяснено, что в эксплантах, культивируемых *in vitro*, в меньшей мере синтезируются вещества фенольной природы под воздействием раствора аскорбиновой кислоты. В связи с этим было предложено в дальнейшем использовать стерильный раствор аскорбиновой кислоты в концентрации 0,8 г/л при изолировании почек пеларгонии королевской путем их замачивания в течение 2-3 минут.

Целью данной работы было исследовать возможность повышения эффективности морфогенеза эксплантов пеларгонии королевской на этапе введения почек *in vitro* при изменении способа использования аскорбиновой кислоты — путем ее добавления непосредственно в среду.

Для этого был проведен опыт, в котором использована питательная среда Murashige, Skoog [4] с пятью вариантами

содержания аскорбиновой кислоты: 0 мг/л, 50 мг/л, 100 мг/л, 150 мг/л, 200 мг/л. Первый вариант среды (0 мг/л) был контрольным. При этом непосредственно в среду аскорбиновую кислоту не добавляли, однако при изолировании эксплантов почки замачивали в стерильном растворе аскорбиновой кислоты с концентрацией 0,8 мг/л в течение 2-3 минут.

Неоспоримым является тот факт, что аскорбиновая кислота разрушается при нагревании. Поскольку, в процессе приготовления питательной среды, она подвергается значительному нагреванию при автоклавировании (2 раза по 15 минут при давлении 0,75 атм. и температуре 117⁰С), было решено добавлять раствор аскорбиновой кислоты в готовую проавтоклавированную и охлажденную до 60 — 70⁰С среду.

Раствор аскорбиновой кислоты готовили не в стерильных условиях, после чего его нейтрализовали 1 N NaOH, доводя pH раствора до 5,8 (оптимальный показатель pH для растений рода *Pelargonium*). Далее раствор добавляли в горячую жидкую среду в стерильных условиях бокса через нанопильтер с размером пор 0,22 мкм. Затем среду разливали в предварительно проавтоклавированные пробирки и колбы.

Работа была проведена по общепринятой методике клонального микроразмножения [5]. Приготовление питательных сред осуществляли согласно методическим рекомендациям [6].

В среде присутствовали 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 2 мг/л и α -нафтилуксусная кислота (НУК) в концентрации 0,1 мг/л, содержание сахарозы составило 3%, агара — 6%.

В опыте участвовали сорта немецкой селекции Шоко и Петтикот. В качестве эксплантов были использованы пазушные почки растений [7]. Их изолировали при помощи скальпеля и пинцета в стерильных условиях бокса и помещали на питательные среды в пробирки. Средняя длина выделенного экспланта составляла $2 \pm 0,2$ мм (1-ое измерение). На 6 — 7-е сутки культивирования из пазушных почек начиналось образование молодых побегов. В это же время было проведено 2-ое измерение длины побегов. На 14-е сутки производили учет образования фенолов в пробирках (табл. 1) и в третий раз измеряли длину подросших эксплантов. На 26 — 28 сутки производили пересадку эксплантов в колбы для дальнейшего роста и размножения. При пересадке эксплантов в последний раз учитывали изменения, произошедшие с ними (4-ое измерение).

Исследования показали, что наименьшая частота

образования фенолов при культивировании эксплантов обоих сортов наблюдалась на среде с содержанием аскорбиновой кислоты 100 мг/л (11% в обоих случаях) (табл. 1). А максимальное число эксплантов с фенолами приходилось на среды с большим содержанием аскорбиновой кислоты — 150 мг/л (43% у сорта Петтикот и 43% у сорта Шоко) и 200 мг/л (54% и 31% соответственно). Таким образом, можно сделать вывод, что при увеличении содержания аскорбиновой кислоты в среде более, чем 100 мг/л, увеличивается образование фенолов.

Таблица 1

Образование фенолов на 14-е сутки культивирования пеларгонии королевской сортов Петтикот и Шоко на среде MS с различным содержанием аскорбиновой кислоты, n = 30

Сорт	Вариант среды	Содержание аскорбиновой кислоты, мг/л	Обнаружено эксплантов				
			жизне-способных, шт.	с приростом		с фенолами	
				шт.	% от жизне-способных	шт.	% от жизне-способных
Петтикот	1	0	26	26	100	4	15
	2	50	24	24	100	3	13
	3	100	27	27	100	3	11
	4	150	28	25	89	12	43
	5	200	26	20	67	12	54
Шоко	1	0	29	29	100	4	14
	2	50	28	28	100	5	18
	3	100	28	28	100	3	11
	4	150	28	26	92	12	43
	5	200	29	27	93	9	31

Помимо учета частоты появления эксплантов с фенолами проводили измерения длины эксплантов в процессе их роста, чтобы выяснить влияние аскорбиновой кислоты на морфогенез эксплантов (табл. 2).

Анализ динамики роста эксплантов показал (табл. 2), что присутствие в среде 50 мг/л или 100 мг/л аскорбиновой кислоты, а также замачивание почек в стерильном растворе аскорбиновой

кислоты наиболее благоприятно повлияли на морфогенез эксплантов пеларгонии королевской, в то время как концентрация аскорбиновой кислоты 150 мг/л или 200 мг/л существенно снижала способность эксплантов к росту.

Таблица 2

Средняя длина эксплантов пеларгонии королевской сортов Петтикот и Шоко на среде MS с различным содержанием аскорбиновой кислоты, $n = 30$

Сорт	Вариант среды	Содержание аскорбиновой кислоты, мг/л	Длина побега, мм			
			день посадки	7-е сутки	14-е сутки	28-е сутки
Петтикот	1	0	2,0	4,8	10,2	12,3
	2	50	2,0	5,5	10,5	12,3
	3	100	2,0	5,7	10,7	12,5
	4	150	2,0	3,7	8,8	10,4
	5	200	2,0	3,6	8,2	9,8
Шоко	1	0	2,0	4,2	9,9	12,0
	2	50	2,0	4,0	9,1	10,7
	3	100	2,0	3,8	8,4	10,5
	4	150	2,0	3,7	8,6	9,4
	5	200	2,0	3,1	7,7	8,9

$HCP_{05} = 1,1 \text{ мм}$

На основе проведенных исследований можно сделать вывод о том, что присутствие в среде аскорбиновой кислоты в концентрации 100 мг/л (вариант 3) в значительной степени ингибировало образование фенолов. При этом существенной разницы по росту эксплантов по сравнению с первым и вторым вариантами не наблюдалось. При увеличении концентрации аскорбиновой кислоты в среде до 150 мг/л и 200 мг/л происходило увеличение частоты появления эксплантов, в которых наблюдалось образование фенолов, а также снижение морфогенетической способности эксплантов.

Способ использования аскорбиновой кислоты (замачивание в растворе аскорбиновой кислоты на этапе введения эксплантов *in vitro* или наличие ее непосредственно в среде) не оказывает существенного влияния на морфогенез эксплантов пеларгонии королевской. Поскольку приготовление стерильного раствора 0,8

мг/л аскорбиновой кислоты значительно проще по технологии, чем добавление ее в среду, более оправдано замачивать почки пеларгонии королевской в растворе аскорбиновой кислоты перед введением эксплантов *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деменко В.И. Микрклональное размножение садовых растений : учебное пособие. - М.: РГАУ — МСХА им. К.А. Тимирязева, 2007. - 55 с
2. Киев Г.В.; Кафтанат В.Н. Оздоровление пеларгонии от вирусных болезней методом культуры тканей // Тезисы докладов. Кишинев, 1989. - С. 80-81.
3. Hildebrandt V., Harney P.M. Identity of a phenolic exudate inhibitor from geranium explants / Canad. J. Plant Sc. T. 69. N 2. - Can., 1989.- p. 569 — 575.
4. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures // Physiol. Plant. - 1962. - Vol. 15. P. 473-497.
5. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. - М.: Наука, 1983. - 253 с.
6. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. - М.: Наука, 1964. - 272 с.
7. Поляков А.В. Получение регенерантов овощных культур и их размножение *in vitro*. -М.: ГНУ ВНИИО Россельхозакадемии, 2005. - 35 с.

УДК 582.711.711:577.13 (571.6)

ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА SPIRAEA L.

Костикова В.А., Высочина Г.И.

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия,
8–913–741–52–63, serebryakova-va@yandex.ru

Фенольные соединения – это вторичные метаболиты, имеющие большое структурное разнообразие и широко распространенные в растениях [1]. Таксоноспецифичность различных групп фенольных соединений с успехом используется в хемотаксономии растений [2].

Виды рода *Spiraea* L. представляют значительный интерес как растения, используемые в традиционной медицине и имеющие большой ресурсный потенциал. В спиреях обнаружены фенольные соединения с высокой биологической активностью: флавоны,

флавонолы [3], флаваны [4], фенолкарбоновые кислоты [5]. В современных исследованиях достаточно хорошо изучена биологическая активность видов рода *Spiraea*, связанная с наличием производных фенолкарбоновых кислот: антимикробная, фитотоксическая [6], активность ингибирования α -глюкозидазы [7] и др.

Спиреи - это листопадные кустарники до 2,5 м высоты, чаще с прямостоячими ветвями. Листья черешковые, простые, от узколанцетных до округлых, цельные. Соцветия зонтиковидные, щитковидные или метёлковидные. Цветки белые, розовые, красные до пурпуровых. Плоды – многосемянные листовки [8].

Объём рода *Spiraea* на протяжении многих лет является предметом научных дискуссий. Полиморфизм, широкое географическое распространение многих видов рода, а также наличие явления гибридизации обуславливают сложность систематики спирей и делают этот род интересным объектом таксономических исследований. Систематика многих видов рода *Spiraea* спорна и неясна [9].

В настоящей работе использовали систему дальневосточных спирей, принятую В.В. Якубовым [10]: I - секция *Calospira* C. Koch. - 1. *S. betulifolia* Pall.; 2. *S. beauverdiana* Schneid. II - секция *Spiraria* Ser. - 3. *S. salicifolia* L.; 4. *S. humilis* Pojark. III - секция *Chamaedryon* Ser. - 5. *S. ussuriensis* subsp. *ussuriensis* Pojark.; 6. *S. ussuriensis* subsp. *elegans* (Pojark.) V. Jakubov. 7. *S. flexuosa* Fisch.ex Cambess.; 8. *S. media* var. *media* Franz Schmidt.; 9. *S. media* var. *sericea* (Turcz.) Regel; 10. *S. dahurica* (Rupr.) Maxim.; 11. *S. pubescens* Turcz. 12. *S. schlothgaueri* Ignatov & Worosch.

Дальневосточные представители рода *Spiraea* L. объединяют в 3 секции. В первых двух секциях спирей (*Calospira* и *Spiraria*) В.В. Якубов выделяет по два близкородственных вида. Спорные виды имеют крайне ненадёжные морфологические различия (опушение цветоножек и соцветий), а в местах совместного произрастания выявлены их гибриды [11]. В третьей секции (*Chamaedryon*) автором выделено 5 видов, среди которых также имеются спорные виды. *S. dahurica* практически ничем не отличается от угнетённых экземпляров *S. media*. *S. ussuriensis* и *S. flexuosa* также очень близки морфологически. *S. media* на Дальнем Востоке представлена двумя разновидностями, которые различаются опушением листовой пластинки, а *S. ussuriensis* - двумя подвидами, отличающимися формой листовой пластинки. Вид *S. schlothgaueri* не рассматривался в связи с отсутствием материала.

Целью настоящей работы является сравнительное изучение

состава фенольных соединений в листьях растений 11 таксонов 9 видов рода *Spiraea* Дальнего Востока России для уточнения их родственных отношений и систематического положения.

Материал для исследований собран в Приморском и Хабаровском крае, Амурской, Магаданской, Сахалинской и Камчатской области, Еврейской АО, а также в г. Благовещенске на территории Амурского филиала Ботанического сада - института ДВО РАН в мае - сентябре 2003 - 2011 гг.

Для исследования фенольных соединений использовали этанольные извлечения из листьев растений, полученные экстракцией на водяной бане. Состав фенольных соединений изучали методом двумерной хроматографии на бумаге Filtrak № 12 и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (хроматограф «Agilent 1200» с диодноматричным детектором; колонка Zorbax SB-C18, размером 4,6×150 мм, с диаметром частиц 5 мкм; градиентный режим элюирования; скорость подачи элюента 1 мл/мин). Детектирование соединений осуществляли при 340 нм. Математический анализ данных выполнен в ПСП «Statistica 6.0» и с учётом общепринятых методических указаний по биологической статистике [12]. Дендрограммы строили «методом Уорда» (Ward's method) с использованием коэффициента «Евклидово расстояние» (Euclidean distances).

В этанольных экстрактах растений рода *Spiraea* обнаружено 29 веществ, из которых 18 относятся к флавоноидам и 11 – к фенолокислотам и кумаринам. Флавоноиды окрашены в жёлтый или жёлто-зелёный цвет, а фенолокислоты и кумарины – в фиолетовый, голубой или бирюзовый цвет. На рис. 1А приведены в качестве примера схемы двумерных хроматограмм трех (из 11) исследованных таксонов и дендрограмма сходства 11 изученных таксонов.

Корейские учёные Т.W. Kim и Y.M. Lee (13) изучали состав флавоноидов у растений рода *Spiraea*, произрастающих на Корейском полуострове. Авторы исследовали состав флавоноидов методом двумерной бумажной хроматографии и применили полученные данные в хемосистематике корейских спирей. Автоматическая группировка (кластерный анализ) показала, что между некоторыми морфологически близкими таксонами есть существенные различия по составу флавоноидов. В работе приводятся данные о составе флавоноидов 3 дальневосточных видов спирей из разных секций, которые не являются спорными (*S. salicifolia*, *S. pubescens*, *S. media*).

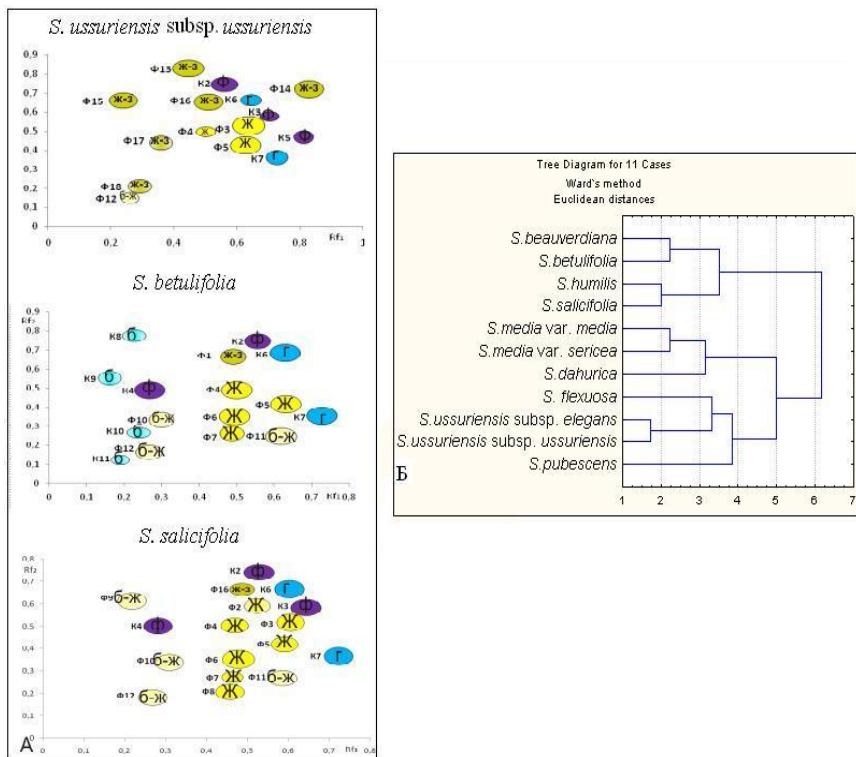


Рис. 1. Схемы двумерных хроматограмм экстрактов листьев некоторых представителей рода *Spiraea*, построенные на основе двумерной бумажной хроматографии – А и дендрограмма сходства дальневосточных спирей – Б. 1 А: по горизонтали - Rf_1 в системе изопропиловый спирт – муравьиная кислота – вода (2:5:5); по вертикали - Rf_2 в системе н-бутанол – уксусная кислота – вода (40:12:28). Цвет пятен: ж-жёлтый; б-ж – бледно-жёлтый; ж-з – жёлто-зелёный; ф – фиолетовый; г – голубой; б – бирюзовый

Методом ВЭЖХ в 11 таксонах спирей обнаружено 39 соединений. Большая часть этих веществ, судя по спектрам, вероятно, относится к фенольным соединениям. Среди них идентифицированы *п*-кумаровая и коричная кислоты и флавонолы – кверцетин и его гликозиды - гиперозид и рутин, кемпферол и его гликозид - астрагалин (рис. 2 А). На рис. 2А приведены хроматограммы трех таксонов, построенные на основе данных ВЭЖХ, и дендрограмма сходства всех 11 исследованных таксонов.

Кластерный анализ данных по составу фенольных соединений позволил более наглядно представить сходство дальневосточных спирей по составу фенольных соединений и связь компонентного состава с систематическим положением вида.

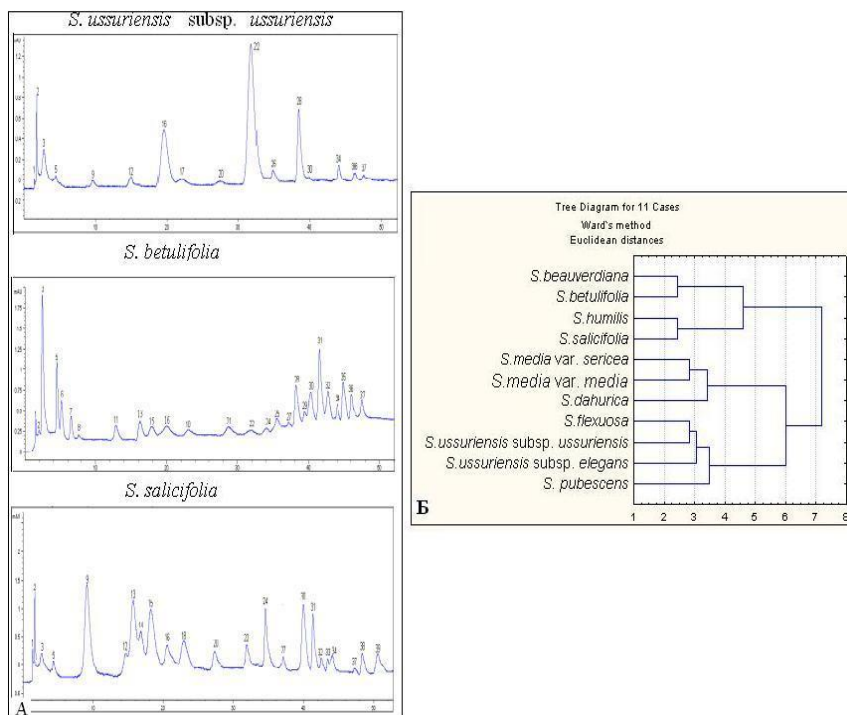


Рис. 2. Хроматограммы экстрактов листьев некоторых представителей рода *Spiraea*, полученные методом ВЭЖХ (340 нм) – А и дендрограмма сходства дальневосточных спирей – Б. 2 А: по горизонтали – время удерживания, мин; по вертикали – оптическая плотность

При сравнении дендрограмм, построенных на основе данных, полученных двумя разными методами (бумажной хроматографией и ВЭЖХ), установлено их почти полное сходство. Спиреи секций *Calospira* и *Spiraria* более близки по составу фенольных соединений, а значит и генетически. Спорные виды секции *Calospira* (*S. betulifolia* и *S. beauverdiana*) оказались очень сходными, но не идентичными между собой по составу фенольных соединений. Полученные данные являются дополнительным подтверждением их морфологического сходства и различия. То же

самое можно сказать и про спиреи секции *Spiraria* (*S. salicifolia* и *S. humilis*). Спиреи секции *Chamaedryon* образуют отдельный кластер, внутри которого разбиваются на группы, соответствующие их родству по морфологическим признакам. Разновидности *S. media* и *S. dahurica* сходны между собой. По данным бумажной хроматографии разновидности *S. ussuriensis* проявляют большее сходство между собой, а по данным ВЭЖХ более сходными оказались *S. flexuosa* и *S. ussuriensis* subsp. *ussuriensis*. Вид *S. pubescens*, не являющийся спорным, более близок к спиреям родства *S. ussuriensis*.

Таким образом, нами установлено, что состав фенольных соединений таксоноспецифичен в роде *Spiraea* Дальнего Востока России на уровне секций и видов, поэтому его можно использовать в качестве маркера при уточнении систематического положения таксонов и установления их родства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахтенко Е.Ю. Курапов П.Б. Многообразие вторичных метаболитов высших растений: учебное пособие. Вологда: МакросПринт. 2008. 264 с.
2. Высочина Г.И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишных. Новосибирск: Наука. 2004. 240 с.
3. Mughal U.R., Mehmood R., Malik A., Alia B., Tareen R.B. Flavonoid constituents from *Spiraea brahuica* // *Helvetica Chimica Acta*. 2012. Vol. 95. P. 100 – 105.
4. Стороженко Н.Д. Полифенольные соединения таволги зверобоелистной (*S. hypericifolia* L.): Автореф. дис... канд. хим. наук. Иркутск, СО АН СССР, 1977. 23 с.
5. Paris R.R., Murgu L. Polyphenolic compounds of *Spiraea crenata* // *Plant. med. et phytother.* 1970. Vol. 4. № 2. P. 138 - 149.
6. Hiradate S., Morita S., Sugie H., Fuji Y., Harada J. Phytotoxic cis-cinnamoyl glucosides from *Spiraea thunbergii* // *Phytochem.* 2004. Vol. 65. P. 731 - 739.
7. Yoshida K., Hishida A., Iida O., Hosokawa K., Kawabata J. Highly oxygenated monoterpene acylglucosides from *Spiraea cantoniensis* // *J. Nat. Prod.* 2010. Vol. 73. № 5. P. 814 - 817.
8. Шульгина В.В. Род Таволга – *Spiraea* L. // *Деревья и кустарники СССР. Дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции.* / Под ред. Соколова С.Я. М.-Л.: АН СССР. 1954. Т. 3. С. 269 - 331.
9. Полякова Т.А. Внутривидовая изменчивость дальневосточных и сибирских видов рода *Spiraea* L.: дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск СО РАН, 2004. 190 с.
10. Якубов В.В. Род Таволга – *Spiraea* L. // *Сосудистые растения Советского Дальнего Востока* / Под ред. Харкевич С.С. С.-П.: Наука, 1996. Т. 8. С. 130 – 136.

-
11. Коропачинский И.Ю., Встовская Т.Н. Древесные растения Азиатской России. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, «Гео». 2002. 707 с.
 12. Зайцев Г.Н. Математический анализ биологических данных. М.: Наука, 1991.183 с.
 13. Kim T.W. и Lee Y.M. Taxonomic Studies on the Genus Spiraea in Korea Based on Flavonoid Characteristics // Bulletin of the Seoul National University Arboretum. 1993. N.13, pp.17 – 36.
-

ПЕРВИЧНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКЗОГЕННОЙ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ МОЖЕТ НЕ ЗАТРАГИВАТЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Красавина М.С., Бурмистрова Н.А., Прудников Г.А.

ФГБУН Институт физиологии растений РАН, Москва, Россия, тел
(499)2318371, e-mail: krasavina@ippras.ru

Салициловая кислота (СК) – растительное вещество фенольной природы, обладающее многими чертами гормонов. Этим определяется множественность физиологических реакций, зависимых от её присутствия (см статьи в [1]), [2]. СК регулирует фундаментальные процессы в растении. Прежде всего исследователи обращают внимание на участие СК в защитных реакциях организма при биотических и абиотических стрессах. Идентифицирован ряд генов, активируемых или ингибируемых салициловой кислотой, и изучаются определяемые их активностью процессы. Подробно разрабатывается последовательность в цепи ответных метаболических реакций, вызванных СК. Проясняется значимость СК для жизнедеятельности растений при нормальных физиологических условиях. Со времени ставших классическими работ И.Раскина [3], показавших участие СК в термогенезе и цветении растений, обнаружена зависимость от СК прорастания семян и роста проростков, созревания плодов, развития и старения листьев, функционирования устьиц и фотосинтетической фиксации углерода, дыхания, транспирации, гравичувствительности и многих других процессов. Постепенно выясняются способы взаимодействия СК с другими гормонами – индолилуксусной и жасмоновой кислотами, этиленом [1, 2].

Спектр действия СК широк и поэтому чрезвычайно трудно вычленить ключевой процесс, определяющий такое многообразие эффектов. Имеются сведения о том, что наиболее ранним

эффектом экзогенной СК является воздействие на окислительно-восстановительный баланс в апопласте. Этот эффект наблюдался уже через несколько секунд, когда других изменений еще не отмечали. В апопласте поставщиками АФК служат НАДФН/НАДН-оксидазы плазмалеммы и различные пероксидазы клеточной стенки (SHAM-чувствительные гваякол-пероксидазы, глутатион-пероксидаза). Свой вклад в окислительно-восстановительный баланс вносят аминоксидаза и оксалат-оксидаза [4, 5]. Окислительно-восстановительные агенты важны для многих физиологических процессов – лигнификации и суберинизации клеточных стенок, ауксинового метаболизма, для заживления поранений и защитных реакций растений при биотических и абиотических стрессах.

Для предотвращения губительного действия высоких концентраций АФК при нарушениях редокс-баланса в клетках и в апопласте функционируют антиокислительные ферменты, такие как каталаза, супероксиддисмутаза. Окислительно-восстановительный гомеостаз поддерживается соотношением оксидантов и антиоксидантов. В редокс балансе клеток участвуют мембранно-связанные токоферолы, каротиноиды, липоевая кислота, регулируется соотношение восстановленных и окисленных форм аскорбиновой кислоты и глутатиона [6, 7].

Пероксидазы и каталаза в качестве субстрата используют перекись водорода и другие гидропероксиды. В качестве восстановителя могут быть использованы различные редуцирующие агенты. Наиболее физиологически значимыми являются тиолы (например, цистеин), индолы (в частности, ИУК), органические кислоты, ароматические и фенольные компоненты. Универсальным восстановителем служат восстановленные формы никотинадениннуклеотидов – НАДФН и НАДН [7]. Характерно, что все эти агенты могут выступать в качестве и окислителей, и восстановителей. Так, в зависимости от соотношения восстановительной и окислительной способности оксидантов и редуктантов пероксидазы могут диссипировать H_2O_2 в пероксидазном цикле или образовывать пероксид в оксидазном цикле. Известные редуктанты – фенолы – также могут менять свой окислительно-восстановительный статус – выступать как разрушители АФК в присутствии H_2O_2 , а в отсутствие перекиси пополнять состав АФК.

В состав большинства пероксидаз входит гем Fe, валентность которого изменяется в окислительно-восстановительном цикле. Перенос атома кислорода от пероксида

на геминовую группу фермента переводит исходный фермент (Fe^{3+}) в радикал – compound I (Fe^{4+}). При присоединении электрона от любого восстановителя создается compound II (Fe^{3+}). Однако при наличии более сильного восстановителя может снова генерироваться H_2O_2 (цит. по обзору [8]).

В качестве восстановителя может оказаться любое соединение, способное отдавать или присоединять электроны, например, любые металлы с переходной валентностью. Ряд ароматических соединений также может генерировать ароматические оксил-радикалы с участием пероксидаз [9]. В некоторых системах супероксид может образоваться и в отсутствие ферментов. Так, образование АФК под влиянием озона определяется его взаимодействием с неэнзиматическими компонентами мембран. Обработка листьев озоном приводила к образованию синглетного кислорода, зависимо от аскорбата, НАДФН, S-содержащих аминокислот, цистеина или восстановленного глутатиона [10].

Наличие бензольного кольца с большим количеством двойных связей и гидроксильной группой, а также COOH -группа делает салициловую кислоту способной вовлекаться в окислительно-восстановительные реакции. Действительно, в ряде опытов показано, что СК активует образование АФК. Например, введение СК в суспензионную культуру клеток табака приводило к образованию супероксида $\text{O}_2^{\cdot-}$ в окислительно-восстановительном процессе с участием H_2O_2 в качестве акцептора электронов. Аккумуляция $\text{O}_2^{\cdot-}$ подавлялась экзогенным СОД, который превращал супероксид в перекись водорода. В этом случае донором электронов выступала СК. Kawano [11] предложил следующую схему этого процесса. СК, ингибируя каталазу, вызывает аккумуляцию перекиси водорода в апопласте. Передача электронов от секретируемой в апопласт гваякол-пероксидазы на H_2O_2 переводит исходную форму фермента (Fe^{+3}) в окисленную форму – (compound I, Fe^{+5}). Взаимодействуя с молекулой СК, compound I восстанавливается до формы compound II (Fe^{+4}). При этом генерируется свободный радикал $\text{SA}^{\cdot}$. Передача второго электрона от другой молекулы СК на пероксидазу, находящуюся в форме компонента II (compound II), возвращает фермент в исходную форму (Fe^{+3}) и генерируется второй SA -radical. При восстановлении свободным радикалом $\text{SA}^{\cdot}$ молекулярного кислорода генерируется супероксид $\text{O}_2^{\cdot-}$, а СК, лишенная двух электронов, образует SA^+ в качестве продукта окисления. Т.е. в этой серии реакций не только образуется супероксид, но и СК

превращается в свободный радикал, усиливая окислительный взрыв [9, 11]). Участником такого процесса может быть не только гваякол пероксидаза, но и аскорбат пероксидаза, но эта реакция очень медленная. Низкие концентрации СК не вызывают губительной для клетки аккумуляции АФК. Напротив, нетоксичное повышение содержания АФК служит сигналом для активации защитных реакций клетки. СК в высоких концентрациях способна ингибировать антиокислительную активность и вызвать другие процессы, ведущие к клеточной смерти [2].

Дальнейший этап в проявлении действия СК – ее влияние на клеточную мембрану, в частности, на активность локализованных на мембранах ионных каналов – кальциевых, анионных и калиевых. Неясно, как может СК непосредственно взаимодействовать с компонентами ионного канала и изменять его проницаемость. Скорее всего, действие СК опосредовано изменением редокс-ситуации в апопласте. В литературе есть сведения о том, что проводимость ряда ионных каналов зависит от АФК [12]. Активация Са-канала начинается через несколько секунд после генерации АФК и вызывает вход катиона в клетку. Этим процессом определяется дальнейшая ситуация. Начальное примембранное повышение содержания Са приведет к деполяризации мембраны. Эта деполяризация слабая, но вызывает быстрое открывание других каналов. Последовательность реакций хорошо прослеживается при изучении электрических импульсов, генерируемых в клетках в ответ на различные раздражения, – местных, не распространяющихся на значительные расстояния, и распространяющихся потенциалов действия. Действие ингибиторов ионных каналов свидетельствует о том, что начальная медленная и слабая деполяризация связана с поступлением в клетку Са. Последующая быстрая деполяризация соответствует активации анионных каналов (Cl), а реполяризация – калиевых. Происходит выход из клетки Cl^- и K^+ .

Такая же последовательность событий происходит, по-видимому, и при генерации потенциалов действия (ПД). Реакция клеток харовых водорослей при генерации ПД много быстрее, чем местной реакции, регистрируемой клетками целой ткани. Поэтому первоначальной медленной деполяризации на клетках хары отметить не удалось. Но хорошо заметно, что в присутствии 0.1 мМ СК изменяется форма импульса – реполяризация начинается позднее и ее скорость замедляется. Ингибитор калиевых каналов ТЭА вызывал такие же изменения фазы реполяризации.

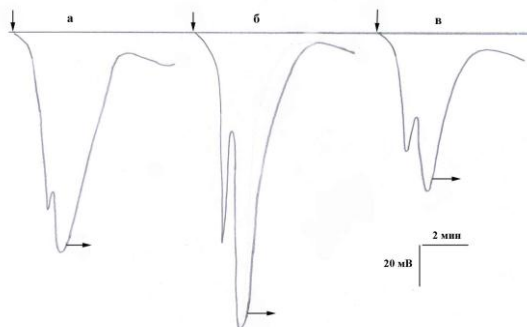


Рис. 1. Действие салициловой кислоты на местную реакцию, генерируемую в листе огурца: слева *контроль*, в центре – СК 0,1мМ, справа – СК 10мМ.

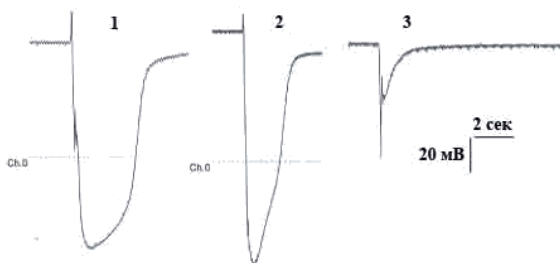


Рис. 2. Действие СК на ПД Chara corallina. 1- СК 0.1 мМ; 2 - контроль; 3 - СК 1 мМ.

Таким образом, кажется реальным предположение о том, что пусковым процессом, определяющим последующие вызванные СК изменения, является кратковременное локальное усиление генерации АФК в апопласте. Эти изменения могут быть вызваны неферментативным взаимодействием СК со способными к окислительно-восстановительным реакциям компонентами апопласта. Накопление АФК в примембранном слое активирует кальциевые каналы, через которые Са начинает проникать через мембрану. Мембрана деполяризуется, выход хлора и калия определяет генерацию электрического импульса, в том числе распространяющегося ПД. Кратковременное (импульсное) повышение концентрации Са в цитозоле приводит к разносторонним изменениям внутриклеточного метаболизма, а распространяющиеся импульсы служат сигналом для отдаленных клеток и органов растения об изменении условий в отдельных

частях растения и необходимости адаптироваться к таким изменениям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hayat S., Ali B., Ahmad A. Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants // *Salicylic acid: a plant hormone* / Eds. Hayat S., Ahmad A.: Springer, 2007.
2. Hayat S., Irfan M., Wani A. S., Alyemeni M. N., Ahmad A. Salicylic acids. Local, systemic or inter-systemic regulators? // *Plant Signal. Behavior* 2012. V.7. P. 1–10.
3. Raskin I. Role of salicylic acid in plants // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1992. V.43. P. 439–463.
4. Bolwell G.P. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses // *Curr. Opin. Plant Biol.* 1999. V. 2. P. 287–294.
5. Daudi A., Cheng Z., O'Brien J., Mammarella N., Khan S., Ausubel F.,M., Bolwell G. P. The apoplastic oxidative burst peroxidase in Arabidopsis is a major component of pattern-triggered immunity // *Plant Cell.* 2012. V. 24. P. 275–287.
6. Martinez C., Baccou J.-C., Bresson E., Baissac Y., Daniel J.-F., Jalloul A.,Montillet J.-L., Geiger J.-P., Assigbetsé K., Nicole M. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* // *Plant Physiology.* 2000. V. 122. P. 757–766.
7. Bolwell GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Manibayeva F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a threecomponent system. // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 1367–1376.
8. O'Brien J.A., Daudi A., Butt V. S., Bolwell G. P. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism // *Planta.* 2012, in press.
9. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction // *Plant Cell Rep.* 2003. V. 21. P. 829–837.
10. Kadono T., Yamaguchi Y., Furuichi T., Hirono M., Garrec J. P., Kawano T. Ozone-induced cell death mediated with oxidative and calcium signaling pathways in tobacco Bel-W3 and Bel-B cell suspension cultures // *Plant Signal. Behavior.* 2006. V. 1. P. 312–322.
11. Kawano T., Nobuya S., Takahashi S., Uozumi N., Muto S. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction // *Plant Cell Physiol.* 1998. V. 39. P. 721–730.
12. Pei Z.M., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G.J., Grill E., Schroeder J.I. Calcium channels activated by hydrogen peroxidase mediate abscisic acid signalling in guard cells // *Nature.* 2000. V. 406. P. 731–734.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO* КОРНЕЙ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО КАК ИСТОЧНИКА СЕЛЕКТИВНОГО ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ФЛАВОНА

Кузовкина И.Н.¹, Гусева Н.В.², Прокофьева М.Ю.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва (495) 9779211, ikuz@mail.ru; ²Томский сельскохозяйственный Институт, Томск, Россия

Род *Scutellaria* насчитывает около 360 видов шлемников, произрастающих в юго-восточных регионах России, а также в среднеазиатских республиках бывшего СССР. Наиболее распространенным и детально изученным представителем этого рода является шлемник байкальский, который относится к числу лекарственных растений, обладающих целым комплексом ценных фармакологических свойств, что обусловило его широкое использование как в официальной, так и в традиционной медицинской практике, особенно в Китае, где он известен с давних времен. Действующими компонентами всех видов шлемников, и в особенности шлемника байкальского, считаются флавоны – байкалеин, вогонин и соответствующие им глюкуроныды – байкалин и вогонозид, которые синтезируются и накапливаются, в корнях растений. Фармакологический препарат, который изготавливался в СССР до 1990 года из корней шлемника байкальского, обладал мягким, но эффективным гипотензивным действием, высокой антибактериальной активностью и ценным гемокоррекционным свойством, обусловившим эффективное использование спиртового экстракта корней этого растения при химиотерапевтическом лечении онкологических заболеваний. Диапазон физиологической активности экстракта корней шлемника и отдельных флавонов чрезвычайно широк и до сих пор полностью не изучен. Предполагается, что причиной физиологического действия флавонов является их высокая антиоксидантная активность. Изучением физиологической активности флавонов и выяснением детальных механизмов их действия интенсивно занимаются исследователи Японии, США, Франции, Китая, Кореи, Чехии и Польши. Существенный вклад в эти исследования внесли отечественные ученые Сибири - сотрудники НИИ фармакологии Томского Научного Центра (ТНЦ) СО РАМН, которые вместе с

химиками Государственного Научного Центра лекарственных средств (ГНЦЛС) Украины (г. Харьков) в течение многих лет занимались изучением химического состава и фармакологических свойств корней этого ценного растения. Им удалось разработать стратегию успешного применения препарата из корней шлемника, детали которой опубликованы в многочисленных статьях и в небольшой монографии [1]. К сожалению, эти работы были приостановлены в начале 90-х годов из-за отсутствия запасов лекарственного сырья. Ареал произрастания шлемника байкальского в РФ ограничен, и заготовка растения производилась в основном в Читинской области. В силу того, что растение размножается только семенами, а зацветает на 10-12 год, неконтролируемый сбор шлемника, а также пожары летних периодов последних лет привели к катастрофическому исчезновению растения. Естественное возобновление растения требует не менее 12 лет. Попытки интродукции шлемника байкальского в ряде районов России и Украины не в состоянии обеспечить заявляемые потребности в лекарственном сырье, что и привело к тому, что в РФ производство препарата на основе шлемника было прекращено в начале 90-х годов. В настоящее время в НИИ фармакологии ТНЦ проводятся лишь пробные испытания ноотропного действия экстрактов корней шлемника с небольшим количеством остаточного сырья. Таким образом, отсутствие лекарственного сырья шлемника вызвало исчезновение в аптечной сети препарата на его основе и привело к затруднениям в продолжении исследований фармакологических свойств корней шлемника байкальского.

Сложившаяся ситуация послужила предпосылкой для разработки в ИФР РАН способа культивирования растения в условиях *in vitro*, причем для этого были использованы не ткани и клетки шлемника, а его изолированно растущие корни. Корневая культура шлемника, так называемая *hairt root culture*, была получена в 1996 году в результате генетической трансформации стерильных проростков с помощью Т-ДНК Ri-плазмиды (*pRi*) почвенной агробактерии *Agrobacterium rhizogenes* [2]. Учитывая тот факт, что конечной целью получения *hairt roots* шлемника предполагалась вероятность их последующего практического использования в качестве источника лекарственного сырья нового типа, генетическая трансформация была проведена с помощью дикого, не модифицированного штамма *Agrobacterium rhizogenes*. В итоге, в лабораторных условиях были скопированы процессы, происходящие в естественных условиях в природе. Таким образом,

введенные в культуру *hairy roots* шлемника байкальского не несут посторонней генетической информации, за исключением приобретенного ими свойства повышенной чувствительности к эндогенным ростовым гормонам, которое и обусловило проявление у них способности к стабильному и интенсивному росту в питательных средах, не содержащих ростовые гормоны. Независимость культивируемых корней шлемника от экзогенных ростовых веществ явилась одновременно надежной основой их генетической стабильности, чего лишены культуры клеток и тканей растений.

Морфологическая идентичность культивируемых *in vitro* корней шлемника с корнями проростков растения сочетается с проявлением у полученной культуры определенного уровня биохимической дифференциации, которая выразилась в ее способности к синтезу флавонов, характерных как для корней ювенильного, так и для корней многолетнего интактного растения [3]. В ходе проведения многолетних исследований, связанных с культивированием генетически трансформированных корней двух видов шлемников - байкальского и андрахновидного, и с изучением состава образующихся в них вторичных метаболитов, были выявлены интересные и перспективные особенности корней шлемников, которые могут быть особенно ценными при их практическом использовании.

Опыт культивирования стабильно растущих в контролируемых условиях корней шлемника байкальского доказал, что образование флавонов в этом растении является корнеспецифичным и, следовательно, не зависящим от условий освещения. Качественный состав флавонов культивируемых корней шлемника представлен теми же флавонами, которые синтезируются и накапливаются в корнях целого, дифференцированного растения: а именно, байкалином, вогонозидом, байкалеином и вогонином. Несмотря на то, что основными флавонами шлемника байкальского являются четыре флавоноиды, маркером растения как с биохимической точки зрения, так и с позиции оценки фармакологической ценности растения считается байкалин и его агликон – байкалеин. Вогонозид и его агликон – вогонин – до некоторых пор считались сопутствующими флавоноидами, и их физиологическая активность оценивалась лишь в совокупности с активностью байкалина и байкалеина, так как количественное содержание этих флавонов в корнях целого растения, по данным фитохимиков различных лабораторий, существенно ниже, чем байкалина и байкалеина. Такова была

ситуация в конце прошлого столетия, когда нами были введены в культуру *hairy roots* шлемника байкальского.

Количественный ВЭЖХ анализ спиртовых экстрактов культивируемых корней показал, что флавоны в *hairy roots* представлены, в основном, глюкуронидами – байкалином и вогонозидом, что также типично для корней целых растений шлемника. Однако суммарная концентрация флавонов в *hairy roots* остается до настоящего времени почти в 3 раза ниже концентрации флавонов в корнях целого растения, что вполне естественно, так как *hairy roots*, также как корни ювенильных растений, имеют первичную структуру и лишены вторичного роста за счет утолщения и соответственно способности к накоплению флавонов в корневых тканях [4]. Этот недостаток *hairy roots* с успехом компенсируется их интенсивным и независимым от времени года стабильным ростом, в связи с чем общая продуктивность культивируемых корней сопоставима с продуктивностью корней целых растений шлемника. Экспериментально доказано, что масса 6-недельных *hairy roots*, выращенных в 8-ми колбах емкостью в 300 мл, содержит столько же флавонов, сколько может дать пятиграммовый корень 10-летнего целого растения.

Рабочие контакты с сотрудниками НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН позволили протестировать физиологическую активность спиртовых экстрактов, приготовленных из культивируемых *in vitro* корней шлемника, и сопоставить ее с активностью обычного сырья, то есть корней целого растения. Оказалось, что экстракт *hairy roots* по своим основным параметрам не только не уступает активности экстракта из корней целого растения, но по ряду показателей даже превышает его. Результаты тестирования, проведенные *in vitro* и *in vivo*, послужили базой для патентования сотрудниками НИИ нового комплексно действующего лекарственного средства, которое было создано на основе альтернативного растительного сырья, полученного в нашем Институте биотехнологическим способом [5]. Оставалось непонятным, почему в ряде случаев экстракт, приготовленный из *hairy roots*, концентрация флавонов в которых была ниже концентрации флавонов в корнях целых растений, не уступал им по своей физиологической активности. Здесь следует отметить существенное различие в количественном содержании индивидуальных флавонов-глюкуронидов - байкалина и вогонозида в корнях целых растений и в *hairy roots*. Если в корнях целых растений двух видов шлемников постоянно доминирующим флавоном является байкалин, то в культивируемых *in vitro* корнях, а также в корнях проростков, преобладает вогонозид. По данным

многочисленных публикаций и по результатам собственных исследований соотношение байкалина к вогонозиду в корнях многолетних растений составляет от 2:1 до 38:1, в то время как их соотношение в корнях, культивируемых *in vitro*, диаметрально противоположно и колеблется от 1: 2 до 1 : 6, а в корнях ювенильных растений достигает 1 : 26. Причем такое соотношение флавонов-глюкуронидов в *hairy roots* шлемника сохраняется стабильно в течение 15 лет и практически не зависит от условий их культивирования. Данный факт может иметь некоторое отношение к объяснению причины высокой физиологической активности корней шлемника байкальского, выращенных в условия *in vitro*, что и было подтверждено последующими событиями. В 2007 году появилось первое сообщение, констатирующее наличие у вогонина – агликона вогонозида уникального свойства. Оказалось, что он способен индуцировать апоптоз онкогенных клеток, не затрагивая при этом обычные диплоидные клетки [6]. Селективная активность вогонина была проверена и подтверждена многими фармакологами при работе сначала в условиях *in vitro*, а затем – *in vivo* [7-9]. Экспериментально доказано, что применение вогонина как цитотоксического вещества, не вызывает миелосупрессии, то есть ингибирования кроветворной системы у млекопитающих и подавления у них иммунитета (образования и функционирования эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов и тимоцитов), что типично при использовании традиционных противоопухолевых препаратов растительного происхождения, таких, как паклитаксел, этопозид, 9-аминокамтотецин, топотекан и иринотекан. Механизм уникального действия вогонина до конца пока не ясен, и интенсивные исследования в этом направлении проводятся в настоящее время в ведущих институтах многих стран (Японии, Германии, Китая, Кореи, США, Польши и Чехии). Логично встал вопрос о возможности получения вогонина в количестве, достаточном как для проведения экспериментальной работы, так и для создания нового цитотоксического препарата селективного действия. В связи с тем, что химический синтез вогонина остается до сих пор не реализованным, а суммарная концентрация вогонина и вогонозида в корнях целых растений шлемника составляет не более 1-3% (на вес сухих корней), культивируемые *in vitro* корни шлемника, в которых содержание этих флавонов в 3-4 раза выше, могут рассматриваться как реальный источник биотехнологического получения вогонина. Перспективность использования культивируемых *in vitro* корней шлемника как сырья нового типа для получения вогонина подтверждается также тем, что некоторые

стрессовые факторы на определенных этапах выращивания корней способны повышать активность нативного фермента корней шлемника - глюкуронидазы, что приводит к расщеплению вогонозида и к увеличению концентрации в корнях агликона - вогонина. На настоящий момент основным лекарственным сырьем остаются корни культивируемых и диких растений шлемника байкальского, количество которых стремительно снижается даже в Китае. В связи с этим фитохимики ряда стран, осознав необходимость извлечения из корней целых растений большого количества вогонина, перешли к модернизации способов экстракции из них флавонов (кавитационной экстракции при пониженном давлении) и к использованию высоко технологичных биоконверсионных методов расщепления извлекаемого из корней вогонозида [10]. В этой ситуации становится все более актуальной проблема реализации крупномасштабного культивирования изолированно растущих корней шлемника, которое может обеспечить получение экологически чистого лекарственного сырья, потенциально более богатого по своему содержанию вогонином. Доказательством того, что эта проблема разрешима, могут служить результаты пробного культивирования нашего штамма корней шлемника в оригинальном биореакторе швейцарской коммерческой фирмы ROOTес. Круглогодичное культивирование корней шлемника в биореакторе подобной конструкции может реально обеспечить получение большой массы экологически чистого лекарственного сырья нового типа, что одновременно будет способствовать сохранению естественно произрастающих и редко встречаемых растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гольдберг Е.Д. , Дыгай А.М. , Литвиненко В.И., Попова Т.П., Суслов Н.И. Шлемник байкальский: фитохимия и фармакологические свойства, Изд. Томского Университета, 1994. 222 с.
2. Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Альтерман И.Е., Карначук Р.А. Образование флавоноидов в трансформированных корнях *Scutellaria baicalensis* и пути их регуляции // Физиология растений, 2001. Т. 48.С. 523-528.
3. Кузовкина И.Н., Гусева А.В., Ковач Д., Сёке Е., Идовитченко М.Ю. Флавоны генетически трансформированных корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*) и индукция их образования при элиситации метилжасмонатом // Физиология растений, 2005. Т. 52. С. 90-96.
4. Kovacs G., Kuzovkina I., Szöke E., Kursinszki L. Determination of flavonoids in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Chromatographia // 2004. V. 60. P. 81-85.

-
5. Дыгай А.М., Суслов Н.И., Зузьков Г.Н., Кузовкина И.Н. и др. Средство, обладающее гемостимулирующим, антимутагенным, противоопухолевым, еребропротекторным, антигипоксическим, ноотропным, анксиолитическим и противоневротическим действием: Патент № 243869 (РФ) // 2012. № 1.
 6. Himeji M, Ohtski T, Fukazawa H, Tanaka M, Yazaki S, Ui S, Nishio K, Yamamoto H, Tasaka K, Mimura A. Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis* producing flavonoid wogonin among human cancer and normal diploid cells // *Cancer Letters* 2007. V. 245. P. 269-274.
 7. Baumann S., Fas S.C., Guasi M., Muller W.W., Merling A., Gulow K., Edler L., Krammer P.H., Li-Weber M. Wogonin preferentially kills malignant lymphocytes and suppresses T-cell tumor growth by inducing PLC (gamma) I- and Ca^{2+} -dependent apoptosis // *Blood*. 2008. V. 111. P. 2154-2363.
 8. Li-Weber M. New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin // *Cancer Treat. Review*. 2009. V. 35. P. 57-68.
 9. Enomoto R., Koshiha C., Suzuki C., Lee E. Wogonin potentiates the antitumor action of etoposide and ameliorates its adverse effects // *Cancer Chemother. Pharmacol*. 2011, V. 67. P. 1063-1073.
 10. Dong L.-L., Fu Y.-J., Zu Y.-G., Li J., Li X.-J., Efferth T. Negative pressure cavitation accelerated processing for extraction of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellaria* // *Chem. Engineering and Processing* 2011. V. 50. P. 780-789.

ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ КОМПОНЕНТЫ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ПЕРИКАРПИЯ *MALUS* MILL. (*ROSACEAE*), ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В ГОРАХ

Кумахова Т.Х., Бабоша А.В., Рябченко А.С.

¹ Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия, тел. (495)9395937, tkumachova@gmail.com

² Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина РАН, Москва, phimmunitet@yandex.ru

Изучение клеточной стенки как пограничной структуры является приоритетной проблемой биологии растений. Использование современных методов исследования в последние годы позволило рассматривать клеточную стенку как динамичный многокомпонентный и многофункциональный компартмент растительной клетки с довольно сложными механизмами формирования и функционирования (Горшкова, 2007). Несмотря на достигнутый с использованием молекулярно-генетических методов

прогресс в изучении структуры компонентов клеточной стенки, механизмы образования и локализация ряда соединений, в частности фенольного происхождения, играющих ключевую роль в выработке адаптивных реакций при стрессовых воздействиях, остаются до конца не выясненными. Между тем эти сведения имеют немаловажное фундаментальное и прикладное значение при изучении закономерностей метаболизма клеточной стенки.

В связи с этим перспективным направлением исследований является изучение изменений состава клеточной стенки в онтогенезе и ее модификаций, связанных с влиянием стрессовых факторов. Удачной модельной системой, на наш взгляд, могут быть развивающиеся в горных условиях плоды яблони, которые позволяют наблюдать динамику многих структурных и функциональных изменений.

С помощью методов электронной и конфокальной микроскопии изучена структура клеточных стенок развивающихся плодов двух сортов *Malus domestica*, произрастающих в горах Северного Кавказа на высотах 300 и 1200 м над ур. м. Подготовку материала для исследований с помощью трансмиссионной электронной микроскопии проводили по модифицированной нами методике (Кумахова, Меликян, 1989). Поперечные срезы «кожицы», включающей эпидерму, гиподерму и часть прилежащих к ним слоев паренхимы, производили в области экватора плода на одинаковом расстоянии от долей чашечки и плодоножки. Автофлуоресценцию изучали с использованием конфокального микроскопа *Olympus FV1000D* при возбуждении флуоресценции при 405, 473 и 560 нм.

Горные условия, характеризующиеся высокой интенсивностью солнечной радиации, богатой УФ-лучами, разреженностью атмосферы, пониженной температурой с резкими суточными колебаниями представляют собой особую среду, которая оказывает на растение специфические стрессовые воздействия. Одним из основных стрессовых факторов в горах, оказывающих наибольшее влияние на специфику формирования и развитие плодов, является УФ радиация.

Как показали наши исследования, у горных плодов в ходе развития происходит утолщение и интенсивная кутинизация клеточных стенок наружной зоны (эпидермы и гиподермы) перикарпия, а также формирование на поверхности кутикулы мощного воскового налета разной конфигурации. На стадии созревания плодов толщина кутикулы на наружных стенках клеток эпидермы достигает до 21 мкм. При этом кутинизация часто распространяется на радиальные и тангенциальные стенки клеток

эпидермы, а в некоторых случаях даже на оболочки клеток гиподермы. На микрографиях, полученных с помощью трансмиссионного электронного микроскопа, наружная зона (собственно кутикула), состоящая из кутина, более плотная, а внутренняя – рыхлая, пронизана многочисленными микроканальцами и включениями разной электронной плотности, вероятно, фенольной природы. В конфокальном микроскопе кутикула представлена слоем материала, сильно флуоресцирующего в широком диапазоне при возбуждении светом, как синей, так и зеленой или красной части спектра. На некоторых срезах хорошо видна ее зональность в виде слоев с различной интенсивностью свечения. Считается, что желто-зеленая флуоресценция кутикулы связана с присутствием в ней фенольных соединений (Соловченко, 2009). Стенки клеток паренхимы, прилегающие к гиподерме, выделяются интенсивным свечением в синей области. В эпидерме и гиподерме такое свечение отсутствует. Клетки гиподермы имеют сильно утолщенные стенки коричневого цвета вследствие слабого уровня флуоресценции. Выраженная флуоресценция в желтой и красной области спектра наблюдается только в зоне срединной пластинки. На солнечной стороне поверхности плода, число слоев толстостенных клеток гиподермы достигает 6-7 по сравнению с теневой, имеющей только 1–2 слоя подобных клеток с более тонкой стенкой. На высоте 300 м структура и их количество соответствует таковой, что на теневой стороне поверхности плодов, выращенных в горных условиях. Можно предположить, что указанные особенности строения наружных слоев перикарпия обусловлены высокой интенсивностью УФ излучения в горах. В литературе активно обсуждается роль фенольных соединений в защите поверхностных тканей растения от вредного воздействия УФ облучения. Считают, что фенольные соединения являются сигнальными молекулами, запускающими каскад реакций для формирования защитного ответа клетки (Нечаева, Загоскина, 2011). Им также отводится роль антиоксидантов, которые взаимодействуют с активными формами кислорода и тем самым препятствуют развитию губительного для клеток «окислительного взрыва» (Николаева и др. 2011). Кроме того, в литературе имеются сведения, что при действии солнечного излучения в кутикуле, эпидерме и гиподерме плодов яблони происходит синтез флавонолов, главным образом, гликозидов кверцетина (Соловченко, 2009). На теневой стороне поверхности содержание флавонолов в два–три раза меньше, при этом увеличение их синтеза пропорционально дозе солнечного УФ. В

кутикуле яблок в связанном виде локализованы также фенольные кислоты, содержание которых при действии солнечного излучения почти не меняется (Соловченко, 2009).

Ранее нами установлено, что у молодых плодов имеются устьица и многочисленные волоски, которые исчезают по мере их созревания (Кумахова, 2003, 2011). Наряду с устьицами впоследствии у них формируются чечевички, которые представляют собой бородавкоподобные образования, возвышающиеся над поверхностью плода. Чечевички, также выполняющие функцию газообмена, представляют собой вторичные анатомические структуры, обычно характерные для стеблей древесных растений. По нашим наблюдениям, у горных плодов они чаще закладывается на солнечной стороне поверхности. Причины и механизмы образования чечевичек на поверхности яблок до сих пор не выяснены. Как известно, кислород принимает участие в синтезе мономеров кутина (Горшкова и др., 2007). Учитывая это, можно предположить, что образование чечевичек связано с интенсивной кутинизацией поверхности плода, которая происходит примерно в это же время. С другой стороны интенсивный солнечный свет, свойственный горным территориям, может провоцировать гибель устьичных клеток, содержащих в отличие от клеток эпидермы хлоропласты, принимающие активное участие в запрограммированной гибели клеток (Дзюбинская и др., 2006). Кроме того важной особенностью развивающихся плодов является то, что клетки гиподермы имеют сильно утолщенные суберинизированные стенки. Об изменениях в составе клеточных стенок гиподермы свидетельствует положительная реакция при окраске срезов Суданом III на суберин. Флороглюциновая реакция тоже дает слабо выраженное малиновое окрашивание, свидетельствующее о наличии в них лигниноподобных веществ. Как известно, суберинизированные и лигнифицированные стенки клеток в отличие от целлюлозных оболочек способны поглощать до половины всех УФ-лучей. По данным литературы интенсивное воздействие УФ в горах инициирует укрепление клеточной стенки, которое осуществляется в результате окислительной сшивки структурных белков и фенольных соединений (Полесская, 2007; Takahama, Oniki, 2000). На наличие фенольных соединений также указывает слабая флуоресценция клеточных стенок гиподермы, придающая им желтовато-коричневый цвет. Стенки клеток заполняющей ткани чечевичек, расположенной ближе к поверхности, наоборот, выделяются интенсивной флуоресценцией в синей области, подобно паренхимным клеткам перикарпия.

Глубже расположенные слои клеток тоже интенсивно флуоресцируют, но уже в широком диапазоне, подобно свечению кутикулы.

Таким образом, ответной реакцией на стресс у плодов яблони является накопление в компартаментах клеток поверхностных тканей перикарпия фенольных соединений, что вероятно, обусловлено длительным воздействием интенсивного УФ. Вместе с формирующимися у горных плодов другими приспособительными анатомическими структурами, они играют важную роль в защите от фотоповреждения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. Казань. Изд-во КазНЦ РАН. 2007. 432 с.
2. Дзюбинская Е.В., Кисилевский Д.Б., Бакеева Л.Е., Самуилов В.Д. Программируемая клеточная смерть у растений: действие ингибиторов синтеза белка и структурные изменения в устьичных клетках гороха // Биохимия. 2006. Т. 71. №. 4. С. 493-504.
3. Кумахова Т.Х., Меликян А.П. Ультраструктура кутикулы плодов разных сортов *Malus domestica* (Rosaceae) // Бот. журн. 1989. Т. 74. № 3. С. 328-332.
4. Кумахова Т.Х. Некоторые особенности анатомии плодов *Malus domestica* (Rosaceae) в зависимости от высоты культивирования в горах // Бот. журн. 2003. Т.88. № 6. С. 75-84.
5. Кумахова Т.Х. Некоторые особенности гистогенеза плодов *Malus domestica* (Rosaceae) в зависимости от высоты ее культивирования в горах // Изв. ТСХА. 2011. № 2. С. 75-92.
6. Нечаева Т.Л., Загоскина, Н.В. Изменение в физиолого-биохимических характеристиках фитомиксотрофной каллусной культуры чайного растения при совместном действии салициловой кислоты и УФ-радиации // VII Междунар. науч. конф. «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2011. С. 153.
7. Николаева Т.Н., Катанская В.М., Загоскина Н.В. Изменение активности супероксиддисмутазы в листьях проростков яровой пшеницы, выращенных из обработанных экзогенными флавоноидами семян // VII Междунар. науч. конф. «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 2011. С. 154.
8. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М, 2007.
9. Соловченко А.Е. Экранирование видимого и УФ излучения как механизм фотозащиты у растений / Автореф. дисс. докт. биол. наук. 2009. 47 с.
10. Takahama U., Oniki T. Flavanoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: significance of the redox reactions // J. Plant Res. 2000. V. 113. P. 301-309.

УДК 581.1

РАСТЕНИЯ РОДА *ANACAMPSEROS* L. (*PORTULACACEAE*) И ОБРАЗОВАНИЕ В НИХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Лапшин П.В., Глыбина А.А., Назаренко Л.В., Загоскина Н.В.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва,
Россия, (495)977-94-33, e-mail: phenolic@ippras.ru

Одним из актуальных направлений биологических исследований является изучение физиологических особенностей высших растений, в частности накопления фенольных соединений (ФС) и выяснения их функциональной роли [1, 3]. И в этом плане перспективно изучение нетрадиционных объектов, представляющих не только отечественную, но и зарубежную малоизученную флору. К их числу относятся представители рода *Anacampseros* [4]. Они представляют собой миниатюрные, травянистые, многолетние, вечнозеленые растения с сочными, лежащими, короткими стеблями, равномерно покрытыми листьями. Исторически сложилось деление рода на основании их внешнего вида на две секции: *Anacampseros*, представленную легко растущими типичными листовыми суккулентами, и секцию *Avonia*, включающую растения, уникально адаптированные к жизни в пустыне, имеющие ту или иную степень выраженности каудексообразования и перехода к полуподземному или эфемероидному характеру онтогенеза [5].

Для суккулентов свойственно запасаение воды в ассимилирующих тканях (листовые и стеблевые суккуленты) или в полуподземных утолщенных основаниях стеблей (явление каудексообразования) и ее медленное перераспределение. Характерной их особенностью является наличие CAM-типа метаболизма, механизм которого позволяет максимально экономить воду [6]. В отличие от мезофитных растений, устьица суккулентов днем закрыты и ассимиляционный процесс фотосинтеза протекает в две стадии. Ночью CAM-растения накапливают CO_2 , а днем при закрытых устьицах он участвует в синтезе сахаров в цикле Кальвина. Осуществление фотосинтеза по такому пути позволяет в течение дня держать устьица закрытыми, и таким образом, сокращать транспирацию, что предохраняет растения от излишней потери воды и повышает их устойчивость к засухе [7]. Анакампсеросы на фоне многих других суккулентов отличаются исключительной устойчивостью к интенсивной

солнечной инсоляции на фоне высокой температуры при отсутствии постоянного доступа к воде.

Как уже отмечалось выше, высшие растения синтезируют фенольные соединения или полифенолы [2, 3]. Характерной их особенностью является легкая окисляемость, результатом которой является образование высоко реакционноспособных промежуточных продуктов типа семихинонных радикалов или орто-хинонов, способность к взаимодействию с белками за счет образования водородных связей и комплексообразование с ионами металлов [8]. Благодаря этим свойствам, а также большому структурному разнообразию, спектр участия полифенолов в жизни растений весьма широк [9].

Целью нашего исследования являлось сравнение особенностей накопления различных соединений фенольной природы в листьях растений рода Анакамперос.

Объектами исследования были 7 представителей рода Анакамперос (*Anacampseros* L.), семейство Портулаковые (*Portulacaceae*): *A. filamentosa* (Haw.) Sims и его красноокрашенная форма *f. Rubra*; *A. rufescens* (Haw.) Sims и его хлорофилл-дефектный сорт *cv. Sunrise*, а также *A. telephiastrum* DC., *A. namaquensis* H.Pearson & Stephens и *A. marlothii* Poelln. Используемые в работе виды представляли собой миниатюрные растения с лежащими стеблями (длина 5-10 см), равномерно покрытые мясистыми коричневато-зелеными листьями (длина 1-4 см), часто с длинными пазушными волосками. Растения выращивали в условиях оранжереи при естественном освещении. Температурный режим: зимой +7-10°C ночью и +10-15°C днем; летом +15-20°C ночью и 25-35°C днем. Время сбора образцов - зимне-весенний период.

Для извлечения фенольных соединений фрагменты свежих листьев гомогенизировали в 96%-ном этаноле. Гомогенат выдерживали в термостате при +45°C в течение 30 мин, центрифугировали 2 мин при 16 тыс об/мин. В надосадочной жидкости определяли суммарное содержание фенольных соединений спектрофотометрическим методом с реактивом Фолина-Дениса при 725 нм [10]. Определение концентрации флавоноидов проводили по интенсивности окрашивания при длине волны 415 нм по реакции с водным раствором $AlCl_3$. Калибровочную кривую строили по рутину.

В первую очередь мы проанализировали суммарное содержание растворимых фенольных соединений в листьях растений. Как следует из представленных на рис. 1 данных,

наиболее высокий их уровень отмечен *A. telephiastrum* , а минимальный - у *A. namaquensis*.

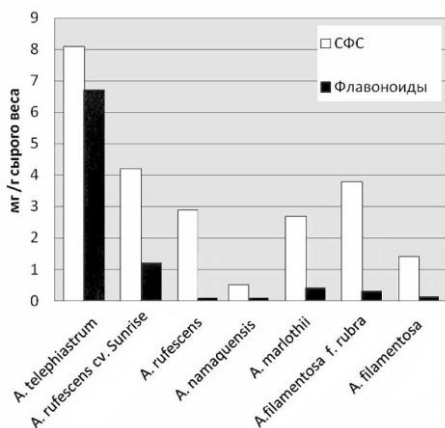


Рис. 1. Содержание суммы фенольных соединений (СФС) и флавоноидов в листьях разных видов растений рода *Anacampseros*.

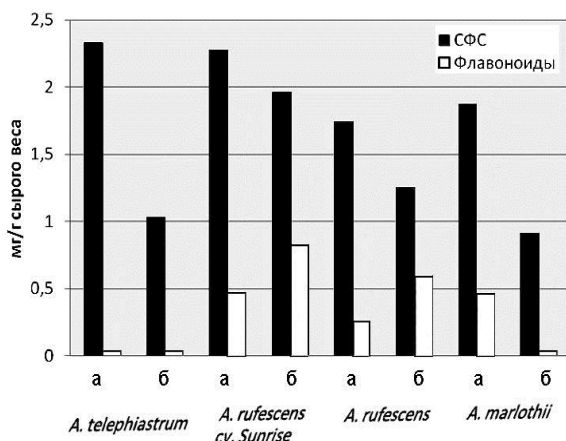


Рис. 2. Распределение фенольных соединений (СФС) и флавоноидов в апикальной (а) и базальной (б) частях листьев некоторых видов рода *Anacampseros*.

Интересен и факт достаточно низкого образования в этих растениях флавоноидов. В большинстве случаев на их долю приходилось не более 10-30% от суммарного содержания

фенольных соединений. Исключением являлся лишь *A. telephiastrum*, у которого этот показатель достигал 80%.

Если исходить из тезиса о том, что основным местом биосинтеза флавоноидов являются хлоропласты [9], то в этом случае данный аспект жизнедеятельности этих растений заслуживает дальнейших исследований.

Следующей нашей задачей было сравнение уровня накопления фенольных соединений в различных частях листа – апикальной и базальной (рис. 2). Что представляет интерес для понимания распределения этих вторичных метаболитов в листьях.

Как следует из полученных нами данных, во всех случаях суммарное накопление фенольных соединений было выше в апикальной части листьев исследованных суккулентов, чем в базальной. Что касается флавоноидов, то в целом, тенденция была противоположной.

Таким образом, на 7 представителях суккулентных растений рода *Anacampseros* (семейство *Portulacaceae*), не являющихся традиционными объектами биохимических и физиологических исследований, были выявлены различия в образовании соединений фенольной природы как между видами, так и по распределению их по тканям листа, которое зависело от их видовой принадлежности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения. LVI Тимирязевское чтение, М.: Наука, 1996, 45 с.
2. Запрометов М.Н. О функциональной роли фенольных соединений в растениях // Физиология растений. 1992 г. Т 39, 6, С. 1197-1205
3. Запрометов М.Н. Специализированные функции фенольных соединений в растениях // Физиология растений. 1993 Т 40, С. 921-931.
4. *Anacampseros*, *Avonia*, *Grahamia*. A grower's handbook. By Gordon Rowley. British Cactus and succulent Society. 1995. 80 p
5. Борисенко Т. И. Кактусы. Справочник. Киев: Наукова думка, 1986.
6. Синёв И.Е. Сравнительная биология суккулентов и склерофитов. Кактусы и другие сухолюбивые растения. 2002. 1(11), С 32-36.
7. Синёв И.Е. Чем отличаются суккуленты от других сочных сухолюбивых растений. Кактусы и другие сухолюбивые растения. 1999 №2. С1-5.
8. Барабой В. А. Биологическое действие растительных фенольных соединений. Киев: Наукова думка. 1976. 260 с.
9. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М. Высшая школа. 1974. 213 с.
10. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования // Биохимические методы в физиологии растений / Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука. 1971. С. 185-197.

СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПЛОДАХ ТРАНСГЕННОЙ ГРУШИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Лебедев В.Г.

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, Пущино, Россия, (4967) 33-09-66, vglebedev@mail.ru

Фенольные соединения широко распространены в растительном мире, являясь одними из самых распространенных продуктов их вторичного метаболизма. В растениях они выполняют самые разнообразные функции: активно участвуют в клеточном метаболизме, являются регуляторами роста, развития, и репродукции, защищают от биотических и абиотических стрессов. Помимо этого, фенольные соединения, обладая высокой биологической активностью, существенно повышают питательную ценность растительных продуктов и являются важным компонентом диеты человека. Известно, что встраивание чужеродных генов в геном растений в процессе генетической трансформации может приводить к возникновению различных непредвиденных эффектов. Эти эффекты могут выражаться и в изменении содержания и состава различных питательных веществ, в том числе и фенольных соединений. Трансгенные растения груши обыкновенной (*Pyrus communis* L.) были получены путем агробактериальной трансформации двумя векторными конструкциями. Бинарный вектор pBI121 содержал маркерный ген *gus* и селективный ген *nrptII*, а вектор p35SGUSintron – маркерный ген *gus* с интроном и селективный ген *hpt*. В 2000 году в соответствии с разрешением Межведомственной комиссии по генно-инженерной деятельности растения были высажены в открытый грунт для проведения полевых испытаний. В 2009-2011 годах с этих растений были собраны плоды, которые проанализировали на суммарное содержание фенольных соединений (по галловой кислоте), флаванов (по эпикатехину), флавонолов (по рутину) и хлорогеновой кислоты. В зависимости от года и линии содержание фенольных соединений варьировало от 50 до 270 мг/100 г, флаванов – от 40 до 240, флавонолов – от 5 до 14 мг/100 г. В экстремально засушливом 2010 году содержание полифенолов и флаванов возросло в 2.5-3 раза, но уровень флавонолов почти не изменился. Значительных отличий в содержании фенольных веществ в трансгенных растениях по сравнению с контролем не наблюдалось.

ПРИРОДНЫЕ ХАЛКАНОИДЫ, ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ, РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ

**Литвиненко В.И., Попова Т.П., Аммосов А.С., Попова Н.В.,
Дихтярев С.И.**

Государственное предприятие «Государственный научный центр
лекарственных средств и медицинской продукции» (ГП «ГНЦЛС»), Харьков,
Украина.

Национальный фармацевтический университет, Харьков. Украина. Тел.
(057) 720-62-58, e-mail: litvinenkovas@rambler.ru, pharmsy1@rambler.ru

В течение многих лет в ГП «ГНЦЛС» проводятся работы по изучению природных флавоноидов и созданию на их основе лекарственных средств [2, 5, 14].

Среди различных классов флавоноидов были представлены и производные халконов, например, халконовые агликоны и гликозиды солодки, бессмертника, ивы и др. [1, 5-7, 9].

Около двух десятков лет тому назад известны были производные двух классов этих соединений – халконы и дигидрохалконы [4 - 6, 13, 15, 17]. Но анализ химической структуры халканоидов солодки показал, что число классов в этом ряду значительно большее. Были найдены наряду с халконами, также дигидрохалконы, α -гидроксидигидрохалконы, β -гидроксидигидрохалконы и β -кетодигидрохалконы, ретрохалконы и др. [1, 9].

В связи с этим возникла необходимость пересмотреть классификацию этих соединений. В 1996 году в обобщающем обзоре [5] о природных флавоноидах, их биосинтезе и биохимической классификации среди производных этих соединений предложено выделить отдельный ряд «халканоиды». В этом ряду рассматривается около 50 возможных классов, отличающихся степенью окисления и восстановления в пропановом фрагменте, связывающим А- и В - кольца.

В настоящее время мы провели анализ первичной гипотезы о классификации и распространении в растениях халканоидов.

Оказалось, что среди ранее упомянутых соединений выделяют несколько основных классов, в том числе халконы, ретрохалконы, хинохалконы, халкен-1-олы, хинохалк-1-енолы, дигидрохалконы, дигидрохалкан-1-олы, халк-2-ены, халканы, ди-, олиго- и полихалканоиды. В каждом из основных классов отмечают α - и β - гидроксиды, α , β -эпоксиды, α , α -дигидроксиды, α -кетоды, β , β -

дигидроксиды, β -кето-производные халканоидов. Таким образом, в каждом из десятка основных классов выделяется до шести дополнительных.

В итоге можно предсказать возможное нахождение в растениях более шести десятков классов халканоидов, что в определенной мере подтверждает ранее высказанное предположение [5, 8].

Халканоиды, известные также как природные 1,3-дифенилпропаноиды, образуют центральное ядро для биосинтеза разнообразных классов флавоноидов [3, 12, 25, 28].

За образование халканоидов в растениях ответственен фермент, халкон-синтаза. Например, нарингенин-халкон синтаза использует малонил-СoA и 4-кумароил-СoA и получают СoA, нарингенин - халкон и CO_2 [29, 30].

Халконы (или бензилиденацетофеноны, или фенил-стирилкетоны, или 1,3-дифенил-2-пропен-1-оны) являются ароматическими кетонами и енонами, которые образуют центральное ядро для разнообразия важных биологически активных соединений, которые известны все вместе как халканоиды [29,30].

Синтез халконов проводят при альдольной конденсации между бензальдегидом и ацетофеноном в присутствии гидроокиси натрия как катализатора. Следовательно, химически халконы – это флавоноиды с открытой трехуглеродной цепью, связывающей два ароматических кольца (А и В) [24].

Соединения этого класса флавоноидов широко распространены в растениях в виде гидроксизамещенных агликонов и их О- и С-гликозидов, метиловых эфиров и пренил- и других производных [28].

К β -гидроксихалконам (дибензоилметанам или таутомерным β -кето-дигидрохалконам) принадлежит группа флавоноидов, которые обычно редко встречаются в природе. К настоящему времени известны около 10 пренил- β -гидроксихалконов, выделенных из растений семейства бобовых [1, 5, 18]. Такие соединения обычно образуют дикето - кетоэнольные таутомерные смеси или кето-энольные таутомеры, которые имеют Z-конфигурацию [1, 5, 9, 18, 24, 25, 28]

При обычных путях биосинтеза халканоидов у С-2 А-кольца содержится гидроксильная группа, а в ретрохалконах эта группа отсутствует.

Выделены ретрохалконы из корней солодки ложной и с. вздутой. Они образуются при взаимодействии с

метилтрансферазами. При этом кетогруппа мигрирует от C-1 к C-3 пропанового фрагмента. Результаты указывают на селективную индукцию пути ретрохалконов в клетках солодки в ответ на стресс [1, 9].

Хинохалконы, как отдельный класс халканойдов, выделены из цветков и семян сафлора красильного *Carthamus tinctorius* L., семейства Asteraceae. Из этого растения выделены и охарактеризовано более десяти хинохалконов [14, 20, 27], например, картамин – димер, состоящий из 3-С-глюкозида 2,3,4,4'-тетрагидрокси, 6-кето, р-хинохалкона и 3-С-глюкозида 2,3,4' – тригидрокси, 4,6-дикето, р-хинохалкона по C-5 (1)-метин-C-5(2)-положениям.

Картамин биосинтетически образуется из халкона (2,4,6,4'-тетрагидроксихалкон) и двух молекул глюкозы, далее образуется сафлор желтый А, сафлор желтый В, а затем образуется прекартамини, наконец, картамин. Из нарингенин-халкона биосинтетически образуется р-хинон по А-кольцу (С-3-С-6). Кетогруппа у C-3 гидратируется до дикетала. По одной из гидроксигрупп присоединяется С-глюкозный остаток, а вторая гидроксигруппа остается свободной. Во второй молекуле хинохалкона 4-гидроксигруппа окисляется до кетогруппы. Первая молекула по C-5 через остаток уксусной кислоты, образовавшейся из промежуточного С-углеводного фрагмента, конденсируется со второй молекулой хинохалкона, образуя прекартамин (карбоновая кислота). Под воздействием декарбоксилазы происходит декарбоксилирование и образование сопряженной двойной связи через метиновую группу. Таким образом синтезируется картамин.

Одним из оригинальных хинохалконов (т.е. халконом, содержащим хинон в кольце А) является саффломин С или 3-С-глюкопиранозид 2,3,4,4'-тетрагидрокси, 6-кето, 5(α)-(4-гидроксидигидрокориичной кислоты) р-хинохалкона. Этот хинохалкон конденсирован с р-гидроксикориичной кислотой по C-5 А-кольца и α-углероду кориичной кислоты. [20, 27],

Дигидрохалконы в растениях синтезируются аналогично халконам, но с участием редуктаз, которые восстанавливают кориичный фрагмент до дигидрокориичного.

Одним из известных дигидрохалконовых производных является флоретин (2,4,6,4'-тетрагидроксидигидрохалкон) и его 6-О-глюкозид (или 2-О-глюкозид) – флоридзин. Эти соединения широко распространены в различных органах видов яблони [21].

В первых работах по флавоноидным соединениям, в

которых отражались структурные особенности, положения заместителей отмечались только в А- и В-кольцах [5]. В халконовых производных нумерация начиналась в А-кольце от углерода, связанного с пропановым остатком, а в В-кольце – аналогично, но цифрами со штрихом [5]. В наших работах по природным халконам мы придерживались упомянутой нумерации углеродных атомов в А- и В-кольцах [5, 16]. Такая же нумерация принята в настоящее время для изохалканоидов, неохалканоидов. В то же время для халконов используется и другое обозначение. В кольце А приводится нумерация углеродных атомов цифрами со штрихами, а в кольце В- без штрихов [28, 29]. Мы полагаем, что такая нумерация мало обоснована, так как при изомеризации халконов во флаваноны ее необходимо менять на обратную.

Учитывая необходимость унификации правил, Создер М. с сотр. [26] и другие авторы [25] высказали аналогичные соображения по этому поводу. Они поддерживают первый вариант нумерации углеродных атомов в А- и В- кольцах халканоидов.

При систематическом обозначении в халконовых производных, иногда называемых циннамилфенолами [28], нумерацию ведут, в первую очередь в пропановом фрагменте от 1 до 3, где указывают положение фенильных и других заместителей [5, 28].

Но чаще халканоиды обозначаются полусистематическими названиями с сохранением корня «халкан» [5]. При этом углеродные атомы, соседние с С-1 кето-группой в пропановом фрагменте, отмечают буквами α и β [28].

По типам замещения в А- и В-кольцах обычного типа биосинтеза среди халканоидов аналогичны рассмотренных для флавоноидов шлемника [10,11].

Бобовые растения обладают уникальным 5-дезоксиполусистематическим типом флавоноидов и изофлавоноидов, некоторые из них играют важную роль в растительно-микробном взаимодействии [18].

Некоторые 5-дезоксиполусистематические флавоноиды, такие как 7,4'-дигидроксифлаван и даидзеин, активируют гены-под симбиотических ризобий и вызывают ряд процессов для корневых узелков и симбиотической азотфиксации

Бобово-специфический 5-дезоксифлавоноидный путь ветви на раннем этапе, где халкон-синтаза (CHS) создает $C_6-C_3-C_6$ структуру из 4-кумарил-КоА и трех молекул малонил-КоА (или ацетил-КоА). Обычно CHS производит 2, 4, 6, 4'-тетрагидроксихалкон (также называется нарингенин -халкон). В бобово-специфическом 5-дезоксифлавоноидном пути биосинтеза

флавоноидов участвует CHS и поликетидная редуктаза (PKR).

PKR (синоним халкон-редуктазы) является компонентом альдо-кето-редуктазы, которая входит в число большого надсемейства НАДФ (Н)-зависимых оксидоредуктаз [1, 9, 18].

Флавоноиды ряда халканоидов широко распространены в растительном мире. Но в основном их выделяли из растений семейства бобовых [18], сложноцветных. [20], реже из растений других семейств [25, 28]. В семействе бобовых одним из наиболее исследованных родов растения являются *Glycyrrhiza* L. [1, 5, 9], *Dalbergia* L, *Pongamia* L. и др. [18]. В семействе сложноцветных наряду с сафлором (*Carthamus* L.) [14, 20, 27], халконы отмечаются в роде бессмертник (*Helichrysum* L.) [6, 13, 16], череда (*Bidens* L.) [5, 14, 20] и др. [4, 5, 8].

В первых работах по изучению лекарственных свойств и созданию препаратов на основе халканоидов установлены желчегонные, спазмолитические, противовоспалительные, противоязвенные свойства (ликуразид, флакарбин, халкорин из корней солодки; фламин из соцветий бессмертника) [2, 5, 7, 13, 14].

В последующие годы эти исследования рассмотрены более широко [19, 22-24.]. Установлено, что халканоиды представляют важную группу полифенольных соединений. Халконы обладают интересным спектром биологических активностей, в том числе: антиоксидантные, антибактериальные, противовоспалительные, противоопухолевые, цитостатические и иммунодепрессивные виды активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аммосов А.С., Литвиненко В.И., Попова Т.П. Халкон-флавановый комплекс видов рода солодки (*Glycyrrhiza* L.) // Изыскание и создание природных лекарственных средств: Межвуз. сб. науч. тр. с международ. участ., посвящ. 25-летию кафедры фармакогнозии и ботаники.- Ярославль.-2009.- С. 52-59.
2. Дихтярев С.И., Литвиненко В.И. Исследования по созданию фитохимических препаратов в ГП «ГНЦЛС» // Фармаком.- 2005.- № 2/3.- С. 7-18.
3. Запрометов М.Н. Фенольные соединения растений и их биосинтез. – М.: ВИНТИ, 1988.- 188 с. (Итоги науки и техники. Биол. химия. Т. 27).
4. Литвиненко В.И., Попова Т.П., Воловик В.Г. Халконы и флаваноны растений отечественной флоры // Тез. докл. 3-его съезда фармацевтов Азербайджана.- Баку.- 1988.- С. 23-26.
5. Литвиненко В.И. Природные флавоноиды. // Технология и стандартизация лекарств. – Сб. научн. тр. – Харьков.- 1996.- С. 103-151.
6. Литвиненко В.И., Попова Н.В., Волькович О.О. Цмини: Ботанична

-
- характеристика, хімічний склад, застосування // Фармаком.- 2001.– №.1– С. 9-15.
7. Литвиненко В.И. Флавоноиды и лекарственные препараты на их основе // Фармация Казахстана. – 2004.– Спец. Выпуск.– С.16-19.
 8. Литвиненко В.И. Успехи химии фенольных соединений // Фармаком. – 2004.– № 4.– С. 85-94.
 9. Литвиненко В.И., Аммосов А.С. Фенольные соединения родов *Glycyrrhiza* L. и *Meristotropis* Fisch. // Фітотерапія. Часопис. 2006. – № 1.– С. 42-54.
 10. Литвиненко В.И., Попова Т.П., Воловик В.Г., Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Суслов Н.И. Фитохимия и фармакологические свойства препаратов шлемника байкальского.- Харьков.– 2007. – 763 с.
 11. Литвиненко В.И., Попова Т.П. Фенольные соединения шлемников мировой флоры // 7-й международ. симпоз. по фенольным соединениям: Фундаментальные и прикладные аспекты // М-лы симпоз.- Москва. – 2009. – С.151-154.
 12. Маргна У.В. Взаимосвязь биосинтеза флавоноидов с первичным метаболизмом растений. – М.: ВИНТИ. 1990. – 175 с. (Итоги науки и техники. Биол. химия.- Т. 33.)..
 13. Овдиенко О.А., Литвиненко В.И., Шретер А.И., Сало В.П. Количественно-систематическое изучение крымско-кавказских видов рода бессмертник – *Helichrysum* L. // Бюлл. МОИП.– 1977.– Т.82, № 2. – С. 74-87.
 14. Попова Н.В., Литвиненко В.И. Лекарственные растения мировой флоры.— Харьков. – 2008. – 510 с.
 15. Попова.Т.П., Литвиненко В.И. Флавоноиды ивы пурпурной // Новые лекарственные препараты из растений Сибири и Дальнего Востока: Тез. докл. всесоюзн. конф. Томск. – 1989.- Вып. 2.– С. 138.
 16. Попова Т.П., Литвиненко В.И. Изогелихризин соцветий цмина // Фармац. журн.- 1993.– № 11. – С.60-65.
 17. Сарапуу Л.П. Физиологическая роль и метаболизм флоридзина в яблоне. – Автореф. дис. докт. биол. наук.- М. – 1971. – 42 с.
 18. Aoki T., Akashi T., Ayabe S. Flavonoids of leguminous plants: Structure, biological activity and biosynthesis // J.Plant. Res. – 2000. – Vol. 113. – P. 475-488.
 19. Batovska D.I., Todorova I.T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones.// Curr Clin Pharmacol. 2010. – Vol. 5, N 1. – P. 1-29.
 20. Bohm B.A., Stuessy T.F. Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae). Wien: Springer. – 2001.- 831 p.
 21. Gosh C., Halbwirth H., Stich K, Phlodidzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants // Phytochemistry. – 2010. –Vol. 71. – P. 838-843.
 22. Katsori A.M., Hadjipavlou-Litina D. Recent progress in therapeutic applications of chalcones. // Expert Opin Ther Pat. 2011. –Vol. 21, N 10. – P. 1575-1596
 23. Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones

-
- // Eur J Med Chem. 2007 – Vol. 42, N 2. – P. 125-137.
24. Orlikova B., Tasdemir D., Golais F., Dicato M., Diederich M. Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential// Genes Nutr. 2011 Vol. 6, N 2. – P. 125–147.
 25. Patil C.B., Mahajan S.K., Katti S.A. Chalcone: A Versatile Molecule // J.Pharm. Sci. & Res. 2009. – Vol. 1, N 3. – P. 11-22.
 26. Soeder M. L., Soeder R.W. Use of punch cards in data retrieval of flavonoids // Planta med. – 1976.- Vol. 30, N 2. - P. 189-195.
 27. Yoon H.R., Paik Y.S. Isolation of two Quinochalcones from *Carthamus tinctorius* // J. Appl. Biol. Chem. 2008. – Vol. 51, N 4.– P. 169-171.
 28. Veitch N.C., Grayer R.J. Chalcones, Dihydrochalcones, and Aurones // Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications/ Ø. M. Andersen, K.R. Markham. – CRC Press 2005.– P. 1003–1100.
 29. Chalcone // <http://en.wikipedia.org/wiki/Chalcone>.
 30. Chalconoid // <http://en.wikipedia.org/wiki/Chalconoid>.
-

УДК 581.1:633.358:577.13

РОЛЬ N-ФЕНИЛ-2-НАФТИЛАМИНА В РЕГУЛЯЦИИ СИМБИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БОБОВОГО РАСТЕНИЯ С *RHIZOBIUM* В РИЗОСФЕРЕ

Макарова Л.Е., Петрова И.Г.

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, Россия, тел.: 8(3952)428256, e-mail: makarova@sifibr/irk.ru

В корневых экссудатах бобовых растений наряду с привлекающими микроорганизмы углеводами, аминокислотами и оксидикарбоновыми кислотами [1] выявлены фенольные соединения (ФС) [2]. В число функций ФС, выделяемых бобовыми растениями во внешнюю среду, входит хемоаттракция клеток ризобий, индукция у них метаболических процессов, направленных на синтез Nod-факторов (ризобияльных сигнальных молекул) [3], и регуляция концентрации этих бактерий в ризосфере. В корневых экссудатах бобовых растений установлено присутствие веществ протекторного назначения, действующих против фитопатогенов. Таковыми у представителей бобовых растений являются флавоноиды, подавляющие популяцию почвенной микрофлоры [4,5], за исключением, по-видимому, бактерий *Rhizobium* [6,7], а также ряд соединений неизофлавоноидного происхождения, оказывающих аналогичный эффект на микрофлору. К их числу следует отнести

азотсодержащее ароматическое соединение - N-фенил-2-нафтиламин, сложнэфирные соединения *орто*-фталевой кислоты и стильбен, подавляющие рост ризобий [8].

N-фенил-2-нафтиламин, обнаруженный нами в тканях корней и в корневых экссудатах гороха [9], а затем и в корневых экссудатах проростков сои и бобов [8], известен, как высокоактивное негативное аллелопатическое вещество [10]. N-фенил-2-нафтиламин относится к числу доминирующих компонентов в составе корневых экссудатов у бобовых растений [8]. Вероятно, изменения в количестве его выделения корневыми клетками во внешнюю среду имеют отношение к изменениям концентрации микросимбионта в ризосфере растения и в изменяющихся условиях среды - к ауторегуляции симбиотических отношений бобового растения с ризобиями. В настоящем сообщении представлены количественные показатели секреции N-фенил-2-нафтиламина корнями проростков гороха, которые подтверждают возможность участия этого вещества в регуляции концентрации ризобий в ризосфере растения-хозяина в зависимости от условий для его роста.

МЕТОДИКА.

Исходным растительным материалом служили 2 сут этиолированные проростки гороха (сорт Ямальский), выросшие в термостате при 22 или 9 °С без освещения. Далее их помещали на водную среду, содержащую микроэлементы в соответствии с прописью [11]. Для дальнейшего роста проростков создавали разные условия. В первом варианте растения выращивали в камере фитотрона с температурой 20-22 °С, влажностью воздуха около 60% и освещением ($80 \mu\text{M}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$, 13-ч фотопериод). В варианте с пониженной температурой рост исходных проростков и затем на водной среде происходил при 9 °С в камере KBW-240 (Binder), где включение освещения ($81 \mu\text{M}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$, 13-ч фотопериод) проводили с момента помещения растений на водную среду. В варианте без света рост исходных проростков и помещаемых на водную среду проходил в термостате с температурой 22 °С.

Получение экстрактов ФС из корневых экссудатов, определение количества и ростовой активности ФС в размножении бактерий *Rhizobium* в жидкой минимальной среде проводили методами, изложенными в [11,12].

Анализ содержания N-фенил-2-нафтиламина методом ВЭЖХ проводили на хроматографе Shimadzu LC-10ATvp с УФ-детектором («Shimadzu», Япония). Методика разделения и определения

содержания изучаемого вещества описана в работе [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В сообщении представлены данные, которые показывают влияние температуры и света - на количественные показатели выделения корнями проростков гороха ФС, их ростовую активность в отношении ризобий и содержание в составе ФС корневых экссудатов N-фенил-2-нафтиламина в течение 3-х суток после инокуляции ризобиями.

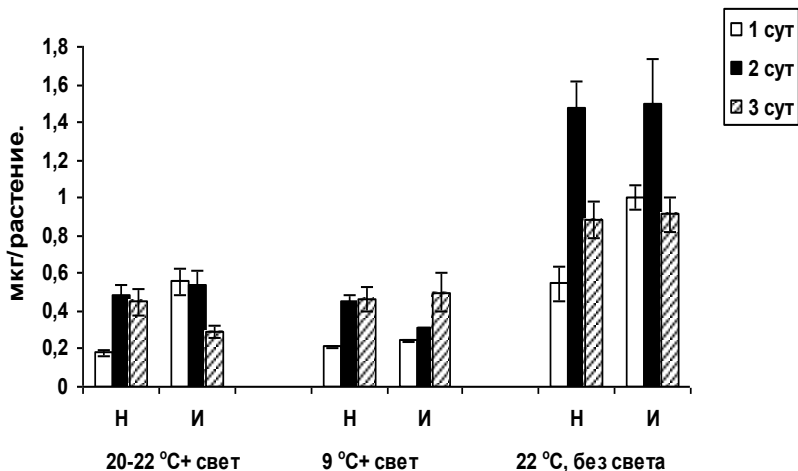


Рис. 1. Влияние условий выращивания на количество N-фенил-2-нафтиламина, секретируемого корнями инокулированных (И) и неинокулированных (Н) *Rhizobium* растений гороха с. Ямальский в течение 3-х суток на водной среде, содержащей микроэлементы. По оси абсцисс указаны условия выращивания: круглосуточно 20-22 °C + свет и 9 °C + свет, 13 —ч фотопериод; 22 °C, без света (круглосуточно). По оси ординат — количество N-фенил-2-нафтиламина, выделяемое корнями растения за 1 сут.

В создававшихся нами неблагоприятных для симбиоза условиях наиболее заметное снижение экссудации ФС происходило у растений, испытывавших действие пониженной температуры, в меньшей степени сказывалось отсутствие света. Но при этом особенностью для условий без освещения является усиление секреции N-фенил-2-нафтиламина (рис.1). Во всех вариантах условий, воздействовавших в наших экспериментах на растения, изменялись показатели количества и ростовой

активности секретируемых растениями гороха ФС и N-фенил-2-нафтиламина в течение 3-х суток и после инокуляции ризобиями.

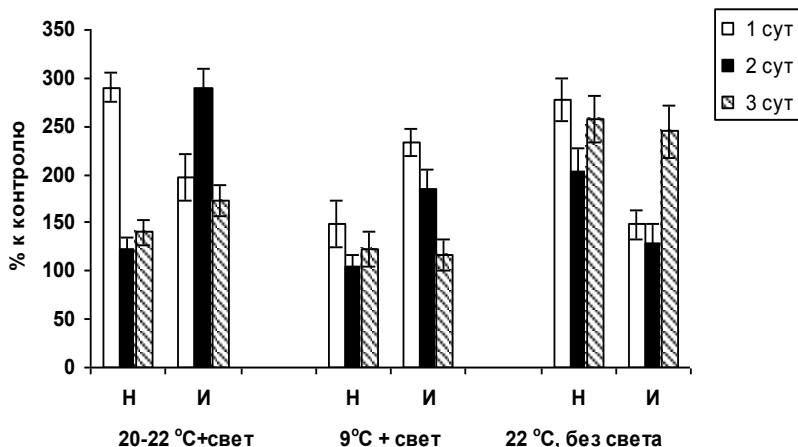


Рис. 2. Влияние на размножение *Rhizobium* в минимальной жидкой среде ФС из корневых экссудатов инокулированных (И) и неинокулированных (Н) указанными бактериями корней проростков гороха с. Ямальский. По оси абсцисс: обозначения условий выращивания, при которых выращивали растения гороха, те же, что и к рис. 2. По оси ординат: % к контролю - показатели размножения *Rhizobium* через 24 ч от начала их внесения в жидкую минимальную среду с ФС, концентрация которых в среде составляла 2 мкг /мл, контролем служила среда с бактериями без ФС.

Между показателями ростовой активности (рис.2) и количества выделяемого N-фенил-2-нафтиламина обнаружена четко выраженная отрицательная зависимость у растений, испытывавших действие пониженной температуры и росших при отсутствии света. Так коэффициент корреляции для неинокулированных ризобиями растений, подверженных действию пониженной температуры, имеет значение -0,88, для инокулированных – 0,98. Этот же показатель для растений, росших в темноте, соответственно, составлял -1,0 и -0,73. В варианте действия оптимальной температуры (20-22 °C) и света выраженная отрицательная зависимость ($r = -1.0$) между обсуждаемыми показателями установлена только для неинокулированных растений. Существование же положительной зависимости между ростовой активностью фенольных комплексов и содержанием в них N-фенил-2-нафтиламина ($r = 0,62$) у инокулированных растений

можно объяснить только одновременным с обсуждаемым веществом усилением выделения корнями этих растений во внешнюю среду ФС с высокой ростстимулирующей активностью на 2-3 сут после инокуляции (рис. 2). Подтверждением этого высказывания могут быть результаты последующих наших исследований.

Итак, в итоге проведенного анализа можно констатировать, что участие N-фенил-2-нафтиламина в регуляции на начальном этапе формирования бобово-ризобияльного симбиоза концентрации микросимбионта в ризосфере в связи с изменяющимися условиями среды вполне вероятно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gaworzewska E.T., Carlile M.J. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from Legumes and other plants // J. Gen. Micr. 1982. V. 128. P. 1179-1188.
2. D'Arcy-Lameta A. Study of soybean and lentil root exudates. II. Identification of some polyphenolic compounds, relation with plantlet physiology // Plant and Soil. 1986. V. 92. P. 113-123.
3. Long S.R. Genes and Signals in the *Rhizobium* – Legume Symbiosis // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 69-72.
4. D'Arcy-Lameta A. Study of soybean and lentil root exudates. III. Influence of soybean isoflavonoids on the growth of rhizobia and some rhizospheric microorganisms // Plant and Soil. 1987. V. 101. P. 267-272.
5. Makoi J.H.J.R., Ndakidemi P.A. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes // African Journal of Biotechnology. 2007. V. 6. 1358-1368.
6. Novak K. Production of phytoalexin in pea roots // Interrelationships between Microorganisms and Plants in Soil. Czechoslovakia, 1987 / Eds. V. Vančura, F. Kunc. Prague: Academia, 1989. P. 63-66.
7. Novak K., Kropáčová M., Havlíček V., Škrdleta V. Isoflavonoid Phytoalexin Pisatin is not Recognized by the Flavonoid Receptor NodD of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // Folia Microbiol. 1995. V. 40. P. 535-540.
8. Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В. Роль аллелопатических соединений в регуляции формирования бобово-ризобияльного симбиоза // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. С.394-402.
9. Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Назарова А.В., Путилина Т.Е. Изоляция и идентификация аллелопатического соединения N-фенил-2-нафтиламина из *Pisum sativum* // Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды. Материалы Всероссийской конференции. Иркутск, 2009. С. 287-290.
10. Wu Z.B., Zhang S.H., Wu X.H., Cheng S.P., He F. Allelopathic interactions between *Potamogeton maackia* *Microcystis aeruginosa* // Allelopathy Journal. 2007. V. 20. P. 327-338.

-
11. Макарова Л.Е., Рудиковская Е.Г. Роль фенольных соединений из корневых экссудатов в размножении *Rhizobium leguminosarum* в ризосфере гороха при разных температурах // Агрохимия. 2003. № 8. С.61-65.
 12. Макарова Л.Е., Латышева С.Е., Екимова Е.Г. Участие эндогенных фенольных соединений в реакции корней проростков гороха на инокуляцию *Rhizobium leguminosarum* при разных температурах // Физиол. растений. 2003. Т. 50. С. 291-298.
-

УДК 581.2.07+581.143:577.175.1

ИЗМЕНЕНИЕ ФЕНОЛЬНОГО И АУКСИНОВОГО СТАТУСА ФОРМИРУЮЩИХСЯ СЕМЯН ЯЧМЕНЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭПИБРАССИНОЛИДА

Манжелесова Н.Е.

ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича» НАН
Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: patphysio@mail.ru

Регуляция плодообразования сводится к изменению сроков цветения и увеличению количества цветков, улучшению оттока ассимилятов в формирующиеся семена и т.п. Значительную роль во всех этих процессах могут играть фенольные соединения [1, 2] и ауксины [3, 4].

Исследовали влияние высокоактивного стероидного фитогормона эпибрасинолида на ауксиновый и фенольный статус созревающих семян ячменя. Обработку растений ярового ячменя проводили в условиях полевого мелкоделяночного опыта путем опрыскивания растений веществом в дозе 5 мг/га в фазу начала колошения. Исследования проводили на 3-х фазах онтогенеза растений: I – колошение, II – ранняя молочная спелость и III – ранняя восковая спелость. В первую фазу колос брали целиком, во вторую и третью – только зерновки. Всего в семенах ячменя были обнаружены шесть свободных фенолкарбоновых кислот. Основными компонентами среди них были феруловая и п-кумаровая, причем феруловая кислота обнаруживалась и в контрольных, и в обработанных эпибрасинолидом растениях во всех 3-х исследовавшихся фазах, хотя количественно ее содержание было меньшим, чем п-кумаровой. П-кумаровая кислота в контрольных растениях присутствовала только в фазе колошения, обработка эпибрасинолидом приводила к увеличению

содержания этого соединения в 3 раза в фазу колошения и появлению довольно значительного его количества в фазах молочной и восковой спелости. Кроме того, в фазу колошения и в контрольных, и в опытных растениях в следовых количествах обнаружены синаповая и п-оксибензойная кислоты, два соединения не идентифицированы. Суммарное содержание свободных фенолкарбоновых кислот самым высоким было в фазе полного колошения (Таблица 1) и значительно снижалось в фазах молочной и восковой спелости. Обработка эпибрасинолидом приводила к значительному (в 3-10 раз) повышению суммарного содержания фенолкарбоновых кислот во всех фазах развития растений.

Таблица 1.

Изменения в содержании фенольных соединений в созревающих семенах ярового ячменя под влиянием эпибрасинолида

Вариант	Свободные ФС, мкг/г сухого вещества	Связанные ФС, мкг/г сухого вещества		
		Эфирные соединения	Флавоноидные соединения	Общая сумма связанных ФС
Контроль, I фаза	7,35	542,5±44,25	719,05±42,8	1261,6
Эпибрасинолид, I фаза	25,9	610,0±48,1	500,68±89,1	1110,7
Контроль, II фаза	0,51	131,67±61,0	435,26±78,9	566,93
Эпибрасинолид, II фаза	6,02	171,67±41,9	557,6±90,5	729,3
Контроль, III фаза	0,51	149,93±66,44	254,07±87,7	404,0
Эпибрасинолид, III фаза	4,27	198,34±61,0	383,16±14,9	581,5

Что касается конъюгированных фенольных соединений, то их компонентный состав и содержание были гораздо большими. Суммарное содержание флавоноидных гликозидов (всего обнаружено 16 компонентов) в семенах контрольных растений самым высоким было также в фазе колошения (см. табл.1). Содержание эфиров фенолкарбоновых кислот в контроле было максимальным в фазе колошения, резко снижалось в фазе молочной спелости и снова несколько возрастало к фазе восковой спелости. Если обработка эпибрасинолидом приводила к снижению суммарного содержания флавоноидных гликозидов в фазе колошения, то содержание эфиров в этой фазе, наоборот,

повышалось по сравнению с контролем. В фазах молочной и восковой спелости содержание как эфиров, так и гликозидов было на 28-30% выше, чем в контроле. Метаболизм фенольных соединений тесно связан с активностью пероксидазы, которая окисляет эти соединения, является ключевым ферментом синтеза лигнина и даже может оказывать непосредственное ингибирующее действие на рост фитопатогенных грибов [5, 6]. Изучение активности фермента показало, что наибольшая его активность в контрольных растениях наблюдалась в фазу молочной спелости, в фазах колошения и восковой спелости активность пероксидазы была ниже почти в два раза. Обработка эпибрассинолидом, наоборот, стимулировала активность фермента в фазу колошения, в фазах молочной и восковой спелости активность фермента под влиянием эпибрассинолида снижалась.

Таблица 2.

Изменения в содержании ауксинов в созревающих семенах ярового
ячменя под влиянием эпибрассинолида

Вариант	Свободные ауксины, мкг/г сухого вещества	Конъюгированные ауксины, мкг/г сухого вещества
Контроль, I фаза	20,31	262,4
Эпибрассинолид, I фаза	15,99	154,5
Контроль, II фаза	14,31	210,02
Эпибрассинолид, II фаза	21,34	338,7
Контроль, III фаза	19,81	217,25
Эпибрассинолид, III фаза	26,77	275,45

Исходя из взаимной функциональной связи фенольных соединений и ауксинов и важной роли ауксинов в формировании семян в этом же опыте исследовали ауксиновый статус созревающих семян. Всего было обнаружено два свободных ауксина, которые после разделения на хроматограммах идентифицировали по величинам R_f , УФ-спектрам и цветной реакции с реактивом Эрлиха. Исходя из этих показателей и литературных данных их определили как ИУК и индолилацетонитрил. Суммарное содержание индолкарбоновых кислот в семенах самым высоким было в фазе колошения (Таблица 2). Далее, в фазе молочной спелости оно снижалось, повышаясь

снова к фазе восковой спелости. Обработка эпибрасинолидом приводила к некоторому снижению их содержания в фазе колошения, затем оно повышалось по сравнению с контролем на 35-50%.

Если в контроле в первой фазе в большем количестве присутствовала ИУК, а во второй и третьей фазах обнаруживался только индопилацетонитрил, то в обработанных эпибрасинолидом растениях ИУК, наоборот, обнаружили только в фазе восковой спелости, в то время как индопилацетонитрил присутствовал на всех трех фазах развития семян. Компонентный состав и содержание конъюгированных ауксинов, как и фенольных соединений были большими. Всего обнаружилось шесть компонентов. Суммарное их содержание в семенах контрольных растений было максимальным в фазе колошения, в фазах молочной и восковой спелости – примерно одинаковым, но ниже, чем в первой фазе. В обработанных эпибрасинолидом растениях суммарное содержание связанных ауксинов, наоборот, в фазе колошения было низким, максимальное содержание наблюдалось в фазе молочной спелости, к фазе восковой спелости оно несколько падало, но было выше, чем в контроле. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что эпибрасинолид оказывает активирующее действие на ауксиновый и фенольный обмен в созревающих семенах ячменя, что оказывает влияние на ход протекающих в них метаболических процессов и, как следствие, ведет к повышению устойчивости и продуктивности.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.с. 1755213 (СССР) // Бюлл.изобрет.1985, №18
2. Pawar M.S., Laloraya M.M. // Biochem.Und Physiol. Plantz. 1998. Bd.183, N1. S.75-82.
3. Поликсенова В.Д., Кострома Г.Ф., Баранок Н.В. // Овощеводство. 1990, №8. 86-89.
4. Киселева И.С., Сычева Н.М., Каминская О.А., Михалева О.С. // Физиология растений. 1998. Т.45, №4. С.549-556.
5. Рубин Б.А., Арциховская Е.В., Аксенова В.А. Биохимия и физиология иммунитета. – М.: Высшая школа, 1975. – 318с.
6. Stahman M.A., Demorest D.M. // Fungal Pathogenecity and the plant's Resp. L., N.Y. – 1973. – P.402-405.

ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ШТАММА БАКТЕРИИ РОДА *BACILLUS* (БИОПРЕПАРАТ «МИКОЛИН») НА БОЛЕЗНЕУСТОЙЧИВОСТЬ ЯЧМЕНЯ

Манжелесова Н.Е., Корицько Л.А.

ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича» НАН
Беларуси, Минск, Беларусь, e-mail: patphysio@mail.ru

В отличие от животных и человека в растениях нет специализированной иммунной системы, но есть защитные вещества, защитные реакции и защитные барьеры, которые в совокупности обеспечивают устойчивость растений к фитопатогенам. Кроме врожденных, существуют приобретенные формы индуцированной устойчивости, которые отличаются от врожденных тем, что проявляются у ранее чувствительных к данному патогену растений в результате предварительного (иммунизирующего) заражения или обработки их определенными биологически активными веществами. Системную приобретенную устойчивость могут индуцировать также химические соединения и биопрепараты. Микроорганизмы, развивающиеся в комплексе с растением-хозяином в течение всего периода вегетации, оказывая влияние на различные физиологические процессы, могут повышать иммунные свойства растения, индуцируя изменения в обмене веществ восприимчивого хозяина в сторону, неблагоприятную для паразита.

Наши предыдущие исследования показали, что обработка посевов ячменя биопрепаратом «Миколин», разработанным в ГНУ «Институт экспериментальной ботаники» и представляющим собой живую культуру штамма бактерии *Bacillus mycoides* 683, путем опрыскивания растений в полевом мелкоделяночном опыте уменьшала степень их поражения возбудителями листовых болезней на 15 - 25%, оптимизируя обмен веществ растения-хозяина, снижая отрицательное воздействие патогенов [1]. В культуральной среде штамма были обнаружены фенольные соединения [2]. Среди многих защитных веществ и реакций растений фенольные соединения и связанные с ними физиологические процессы занимают важное место. Их защитное действие реализуется разными путями. Как антибиотические вещества они прямо оказывают ингибирующее влияние на прорастание спор и формирование ростковых трубок, т.е.

начальные процессы развития фитопатогенных грибов. Еще более сильное действие фенольные соединения оказывают как индукторы защитных реакций растений. Они интенсифицируют общий обмен растений, минимизируют «окислительный взрыв» в инфицированных тканях растения-хозяина, нейтрализуют свободные радикалы и активные формы кислорода, вызванные воздействием фитопатогенных грибов, подавляют гормональную активность паразитов, тем самым лишают их нормального питания и развития. Исходя из вышеизложенного, логично было предположить, что выявленная иммуномодулирующая активность биопрепарата может быть обусловлена наличием в культуральной среде именно фенольных соединений. Исследовали влияние обнаруженных веществ на индуцирование реакций болезнеустойчивости ячменя. Исследования проводили на модельной патосистеме ячмень – возбудитель сетчатого гельминтоспориоза, гемибiotрофный патоген *Pyrenophora teres* Sacc.. Растения выращивали в лабораторных условиях до 10-дневного возраста, обработку проростков проводили путем опрыскивания водными растворами эфирной и бутанольной фракций культуральной среды. Спустя сутки растения инокулировали спорами фитопатогенного гриба. Изучали изменения проницаемости мембран и перекисного окисления липидов, как наиболее эффективных показателей проявления болезнеустойчивости растениями в условиях экзогенной их обработки. Интенсивность перекисного окисления липидов мембран оценивали по способности 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), связываться с липидными перекисями [3]. Изменение проницаемости мембран определяли по выходу электролитов из листовой ткани с использованием кондуктометрического метода [4]. Эти показатели, а также количество фотосинтетических пигментов в листьях определяли дважды в течение опыта – через двое (латентная стадия) и пятеро (стадия появления визуальных признаков заболевания) суток после инокуляции спорами. Статистическую обработку вели по Рокицкому П.Ф [5]. Показано, что на 2-е сутки патогенеза содержание ТБК-продуктов увеличивалось по сравнению с контролем на 30%, оставаясь практически таким же и на 6-е сутки (рисунок 1, 2). Выход электролитов из инфицированных тканей ячменя возрастал в течение всего опыта и был более интенсивным на второй стадии болезни, превышая контрольный вариант в два с лишним раза. Это свидетельствует о том, что инфицирование *Pyrenophora teres* вызывает усиление процессов перекисного окисления липидов

клеточных мембран, которые по интенсивности, вероятно, превосходят уровень активности антиоксидантной системы, в результате чего развиваются некрозы, необходимые для дальнейшего развития гриба. Влияние факультативного патогена приводило также к разрушению фотосинтетических пигментов, болезнь завершалась их деструкцией и общим пожелтением листьев.

Предобработка растений бутанольной фракцией биопрепарата «Миколин», содержащей конъюгированные фенольные соединения, в основном флавоноидные гликозиды, в большей степени влияла на формирование реакций болезнеустойчивости ячменя в патосистеме, снижая по сравнению с инфекцией на 18% и 20% соответственно содержание ТБК-продуктов и выход электролитов из листьев. В то же время в этом варианте на 10% возрастало содержание фотосинтетических пигментов, особенно на начальном этапе патогенеза (рис 1, 2).

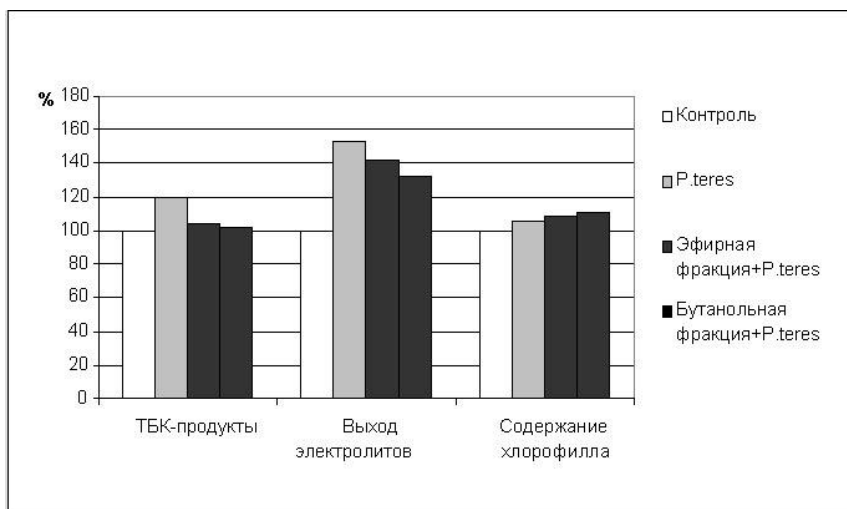


Рис. 1. Влияние обработки бутанольной и эфирной фракциями культуральной среды штамма бактерии *Bacillus mycoides* 683 на формирование реакций болезнеустойчивости ячменя в патосистеме ячмень - возбудитель сетчатого гельминтоспориоза (2-е сутки патогенеза)

Сохранение целостности мембран приводило к удлинению срока пребывания *Pyrenophora teres* в биотрофной стадии и поддержанию клеток растения-хозяина в жизнеспособном

состоянии, что и является признаком устойчивости. Эфирная фракция, содержащая фенольные соединения в свободной форме, также оказывала активирующее влияние на формирование реакций болезнеустойчивости растений ячменя к фитопатогенному грибу, но менее интенсивное.

Таким образом, исходя из полученных результатов, можно с большой долей вероятности предполагать, что фенольные соединения, обнаруженные в культуральной среде штамма бактерии *Bacillus mycoides* 683 могут выступать в качестве иммунизирующих агентов «Миколина», придавая биопрепарату свойства регулятора - антиоксиданта.

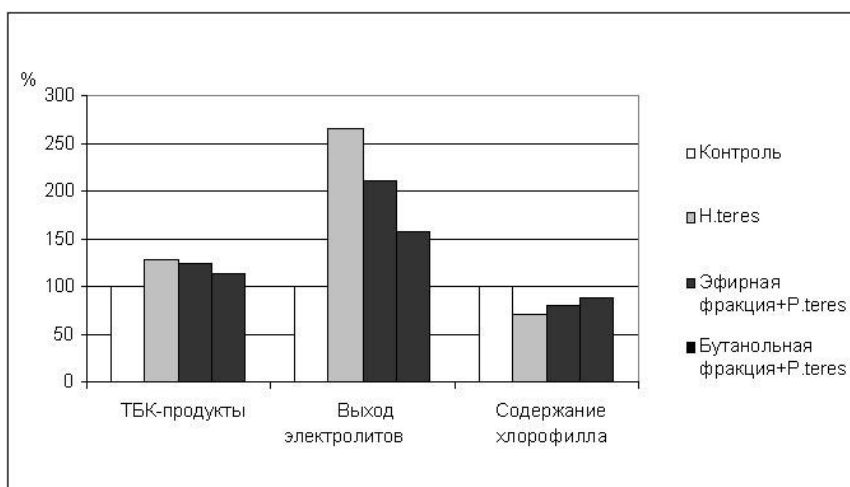


Рис. 2. Влияние обработки бутанольной и эфирной фракциями штамма бактерии *Bacillus mycoides* 683 на формирование реакций болезнеустойчивости ячменя в патосистеме ячмень - возбудитель сетчатого гельминтоспориоза (6-е сутки патогенеза).

ЛИТЕРАТУРА

1. Манжелесова, Н.Е. Микробиологическая иммунизация ячменя / Н.Е. Манжелесова, Н.В. Полякова, В.П. Шуканов, Л.А. Корытько, Е.В. Мельникова // Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам: материалы 2 Всерос. конф. СПб, 29 сентября – 2 октября 2008. / РАСХН; редкол.: В.А. Павлюшин [и др.]. – СПб, 2008. – С.268-270.
2. Манжелесова, Н.Е. Иммунизирующие агенты биопрепарата «Миколин» / Н.Е. Манжелесова, Т.Г. Шабашова, Н.В. Полякова, Н.П. Башко, Л.А. Корытько // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы VII Междун.конф., посвящ.

-
- 35-летию Института Микробиологии НАН Беларуси, 31мая – 4 июня 2010 / редкол.: Э.И. Коломиец, А.Г. Лобанок [и др.]. Мн.: «Беларуская навука». – С.459-462.
3. De Vos C.H.R., Shat H., Vooijs R., Ernst W.H.O. // J.Plant Physiol. – 1989. – Vol.135. – P.164-169.
 4. Гришенкова, Н.Н. Определение устойчивости растительных тканей к абиотическим стрессам с использованием кондуктометрического метода / Н.Н. Гришенкова, А.С. Лукаткин // Поволжский экологический журнал. 2005. №1. С.3-11.
 5. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. / П.Ф. Рокицкий. – Мн.: Ураджай, 1973. – 320с.
-

УДК 631.811.98:633.11

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ МЕТИЛЖАСМОНАТА И ЦИТОКИНИНА НА ПРОЦЕСС ОТЛОЖЕНИЯ ЛИГНИНА В БАЗАЛЬНОЙ ЧАСТИ КОРНЕЙ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

**Масленникова Д.Р., Фатхутдинова Р.А., Авальбаев А.М.,
Юлдашев Р.А., Шакирова Ф.М.**

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,
Уфа, e-mail: shakirova@anrb.ru

Ранее нами было показано, что обработка проростков пшеницы метилжасмонатом (МеЖ) в оптимальной в стимуляции роста концентрации 100 нМ вызывает быстрое существенное накопление цитокининов (ЦК). В ходе последующих исследований было выявлено ярко выраженное протекторное действие предобработки растений МеЖ в условиях солевого стресса, важный вклад в которое вносит предотвращение вызываемого засолением падения концентрации эндогенных ЦК. В связи с этим, можно полагать, что эндогенные цитокинины играют важную регуляторную роль в реализации защитного действия МеЖ на растения пшеницы. Известно, что важный вклад в формирование устойчивости растений к токсическому действию хлорида натрия вносит усиление синтеза лигнина и его отложения в оболочках клеток. Для выявления значения эндогенных цитокининов в реализации защитного действия метилжасмоната, мы провели сравнительный анализ влияния МеЖ и БАП на скорость отложения лигнина в клеточных стенках корней проростков в норме и в

условиях засоления. Обработка гормонами способствовала ускорению отложения лигнина в клеточных стенках корней проростков в норме и интенсификации этого процесса при последующем воздействии на предобработанные гормонами проростки 2%-ного NaCl, что приводило к укреплению их барьерных свойств и снижало степень повреждающего действия хлорида натрия на растения. Таким образом, важный вклад в реализацию предадаптирующего и защитного действия МеЖ и БАП вносит их способность укреплять барьерные свойства клеточных стенок корней проростков за счет ускорения отложения лигнина в них. Полученные данные свидетельствуют в пользу возможности выполнения эндогенными цитокининами роли гормональных интермедиатов в проявлении защитного действия МеЖ на растения пшеницы.

Работа поддержана грантом РФФИ-Поволжье № 11-04-97051a

СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПОБЕГАХ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *VACCINIUM* L. ФЛОРЫ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

Мечикова Г.Я., Степанова Т.А.

Дальневосточный государственный медицинский университет, Хабаровск,
Россия, (4212) 32-64-26, E-mail: galina.m.ya@mail.ru

Поиск растительных источников биологически активных веществ с целью получения на их основе лекарственных препаратов всегда есть и будет одной из актуальных задач отечественной фармакогнозии. В этой связи представляют интерес некоторые виды рода *Vaccinium* L.. Официальным видом этого рода является черника обыкновенная – *Vaccinium myrtillus* L., побеги которой широко используются в медицинской практике в качестве гипогликемического средства. Исследования последних лет показали, что надземная часть черники обыкновенной обладает и другими ценными фармакотерапевтическими свойствами.

Ареал *V. myrtillus* L. на Дальнем Востоке ограничен по сравнению с европейским. Между тем, в экосистемах российского Дальнего Востока встречаются другие виды черники: черника

пазушная – *V. axillare* Nakai, черника Смолла - *V. smallii* A. Gray (*V. hirtum* auct.), черника овальнолистная – *V. ovalifolium* Smith, черника Ятабе – *V. yatabei* Makino [1]. Первые два вида (*V. axillare* Nakai и *V. smallii* A. Gray) имеют достаточно обеспеченную сырьевую базу на Дальнем Востоке, что является значимым аргументом для включения их в ранг официальных видов. Кроме того, проведенные собственные фармакологические исследования показали присутствие гипогликемического эффекта у *V. axillare* Nakai и *V. smallii* A. Gray. Полученные результаты защищены патентами [2,3]. Для *V. smallii* A. Gray выявлена также канцеропреventивная активность [4].

Фармакотерапевтическая активность исследуемых дальневосточных видов рода *Vaccinium* L., равно как и официального вида - *V. myrtillus* L., обусловлены, прежде всего, комплексом веществ фенольного характера. Поэтому представляется интересным провести оценку содержания этих веществ в обсуждаемых таксонах, в том числе и в сравнительном аспекте с официальным видом, тем более, что сведений такого характера в литературе нет.

Объектами исследования служили побеги *V. myrtillus* L., *V. axillare* Nakai и *V. smallii* A. Gray, собранные в различных местах их ареала. Для сравнения некоторые образцы *V. myrtillus* L. были получены из европейского региона.

В данной работе представлен анализ результатов определения количественного содержания в побегах трех видов черники двух групп фенольного комплекса – флавоноидов и дубильных веществ, полученных за 9 лет наших исследований (2003-2011 гг.). Дубильные вещества были выбраны в качестве исследуемой группы по той причине, что стандартизация официального вида - *V. myrtillus* L., проводится по содержанию именно этой группы биологически активных веществ. Кроме того, по литературным данным, а также по результатам собственных исследований установлено, что приоритетной группой фенольного биологически активного комплекса всех трех видов черники являются флавоноиды. Эти вещества играют наиболее важную роль в реализации гипогликемического эффекта [5]. Поэтому выбор группы флавоноидов для исследований вполне обоснован с точки зрения фармакологической активности.

Дубильные (окисляемые) вещества определяли по методике, предложенной для растительных объектов в ГФ XI, модифицированной нами применительно к исследованным объектам. Количественный анализ флавоноидов проводили по

разработанной оригинальной методике [6]. Флавоноиды определяли дифференциальной спектрофотометрией при длине волны 410 нм в экстрактах, полученных из образцов сырья видов черники на спирте этиловом 70%. Для измерения оптической плотности полученных в ходе анализа экстрактов использовали спектрофотометр UV-1700 Shimadzu (Япония). Определение каждой группы веществ проводили в трехкратной аналитической повторности. Содержание биологически активных веществ выражали в процентах от массы абсолютно сухого сырья. Статистический анализ экспериментальных данных выполняли с применением программы Microsoft Excel 2010.

Анализируя полученные нами результаты, можно отметить следующее. Содержание флавоноидов в *V. myrtillus* L. колеблется от 0,74% до 2,53%, *V. axillare* Nakai – от 1,25% до 3,84%, *V. smallii* A. Gray – от 1,47% до 3,02% при средних значениях 1,73%, 2,46%, 2,27%, соответственно. Как установлено, колебания в содержании флавоноидов в побегах трех видов черники значительны: максимальное и минимальное содержание флавоноидов за период наблюдения различается в 3 раза для *V. myrtillus* L. и *V. axillare* Nakai, и в 2 раза для *V. smallii* A. Gray. Сравнение средних по критерию Стьюдента показало, что в сырье *V. axillare* Nakai и *V. smallii* A. Gray содержание флавоноидов достоверно выше, чем в побегах официального вида - *V. myrtillus* L. ($t_{\text{эксп.}}=4,5$; $3,2$; $t_{\text{крит.}}=2,0$) Между собой неофициальные дальневосточные виды (*V. axillare* Nakai и *V. smallii* A. Gray) не различаются по накоплению этой группы веществ ($t_{\text{эксп.}}=0,9$; $t_{\text{крит.}}=2,0$).

Среднее содержание дубильных веществ для образцов *V. myrtillus* L. составило 9,22% при интервале значений от 6,52% до 11,8%, для *V. axillare* Nakai – 8,54% при интервале значений от 6,32% до 11,0%, для *V. smallii* A. Gray – 7,74% при колебаниях от 4,55% до 10,1%. Наибольшая вариабельность этой группы веществ установлена для *V. smallii* A. Gray. Сравнение средних значений по критерию Стьюдента позволяет говорить о том, что имеющиеся различия в содержании дубильных веществ в *V. smallii* A. Gray по сравнению с содержанием их в официальном виде статистически достоверны ($t_{\text{эксп.}}=2,6$; $t_{\text{крит.}}=2,0$). По количеству дубильных веществ *V. smallii* A. Gray несколько уступает сырью официального вида - *V. myrtillus* L.. Но, учитывая норматив содержания дубильных веществ в побегах черники, это различие незначительно. Ниже для наглядности представлены полигональные диаграммы результатов определения количественного содержания исследуемых групп фенольного комплекса в побегах трех видов черники.

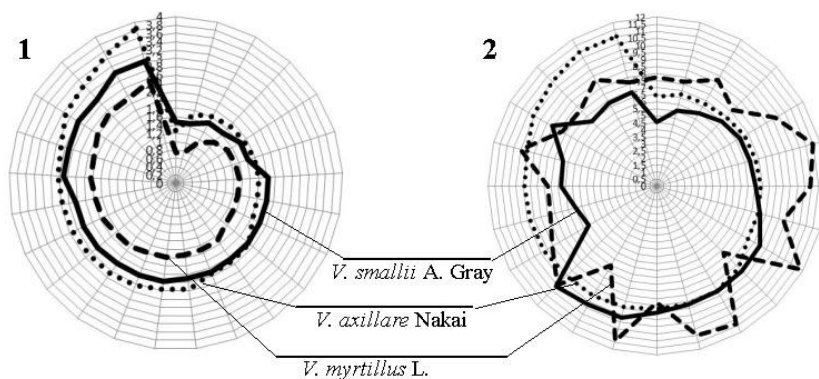


Рис. Полигональные диаграммы количественного содержания флавоноидов (1) и дубильных веществ (2) в побегах *V. myrtilus* L., *V. axillare* Nakai и *V. smallii* A. Gray

Таким образом, установлено, что исследованные дальневосточные виды рода *Vaccinium* L. содержат группы фенольного комплекса на достаточном терапевтическом уровне, что позволяет рассматривать их в качестве источников препаратов, по меньшей мере, с гипогликемической, антиоксидантной и канцеропреventивной активностью. Полученные данные подкрепляются и фармакологическими экспериментами. В соответствии с уровнем содержания в побегах исследованных групп фенольного комплекса возможен поиск и других видов биологической активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). Русское издание. СПб., 1995. 992 с.
2. Применение побегов черники волосистой в качестве средства коррекции метаболических нарушений головного мозга при сахарном диабете / Т.А. Степанова, Г.Я. Мечикова, В.Е. Морозова, Л.М. Макарова, В.Е. Погорелый // Патент 2400244 РФ. МПК А61К 36/45. А61Р 3/10.—№ 2007142886/15; заявл. 19.11.2007. опубл. 27.05.2009 Бюл. № 27.
3. Применение побегов черники пазушной в качестве средства, проявляющего активизацию утилизации глюкозы мозгом при лечении сахарного диабета / Т.А. Степанова, Г.Я. Мечикова, В.Е. Морозова, Л.М. Макарова, В.Е. Погорелый // Патент 2418602 РФ. МПК А61К 36/45. А61Р 3/10.—№ 2007128831/15; заявл. 26.07.2007. опубл. 20.05.2011 Бюл. № 14.

-
4. Cancer-preventive Activities of Secondary Metabolites from Leaves of the Bilberry *Vaccinium smallii* A. Gray / G.Ya. Mechikova, A.S. Kuzmich, L.P. Ponomarenko, A.I. Kalinovskiy, T.A. Stepanova, S.N. Fedorov, V.A. Stonik // *Phytotherapy research.* – 2010. – № 24 . – P. 1730-1732.
 5. Matsuda H. Antidiabetogenic constituents from several natural medicines / H. Matsuda, T. Morikawa, M.Yoshikawa / *Pure Appl. Chem.* – 2002. – Vol. 74, No. 7. – pp. 1301-1308.
 6. Определение флавоноидов в чернике обыкновенной побегах / Н.А. Цимбалист, Г.Я. Мечикова, Т.А. Степанова // *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр.* – Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2011. – Вып. 66. – С. 210-213.
-

УДК 577.152.193.024:576.314

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ АПОПЛАСТА РЕГУЛИРУЮТ АНТИ- И ПРООКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТЕЧНЫХ ПЕРОКСИДАЗ РАСТЕНИЙ

Минибаева Ф.В.¹, Часов А.В.¹, Гурьянов О.П.¹, Beckett R.P.²

¹ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, Казань, Россия, (843)2319045, fminibayeva@gmail.com;

²School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, South Africa, +27332605141, rpbeckett@gmail.com

Высокая активность и лабильность растительных пероксидаз обусловлена их широкой субстратной специфичностью, множеством типов связывания с клеточными структурами и разнообразием механизмов редокс-реакций с участием пероксидаз. Пероксидазные и оксидазные реакции, протекающие в гем-содержащем каталитическом центре, способствуют пероксидаза-опосредованному катализу как детоксикации H_2O_2 , так и образования активных форм кислорода (АФК). Мы полагаем, что роль пероксидазы в регуляции баланса АФК в апопласте растительных клеток обусловлена конкурентными и комплементарными взаимоотношениями различных фенольных субстратов. Показано, что в апопласте корней пшеницы феруловая, кумаровая и синаповая кислоты могут выступать в качестве субстрата-активатора при одновременном окислении более медленного субстрата пероксидазы, например, дигидроксифенилаланина или адреналина, что может приводить к образованию свободнорадикальных продуктов. Это подтверждается ингибированием окисления в присутствии

антиоксиданта аскорбиновой кислоты. В свою очередь, феруловая кислота и конифериловый спирт могут сами активироваться вторым, более быстрым, субстратом, например, о-дианизидином. Поиск естественных фенольных субстратов и эффекторов пероксидаз в апопласте корней с помощью хроматографического анализа выявил наличие множества фенольных соединений, профиль которых менялся в течение одночасовой инкубации. Идентификация основных пиков была проведена с помощью ESI-LCMS/MS.

Таким образом, окисление фенолов апопластными пероксидазами способствует укреплению клеточной стенки посредством ее лигнификации и суберинизации, что повышает устойчивость растительного организма к воздействию стрессовых факторов. С другой стороны, субстрат-субстратная активация апопластных пероксидаз имеет важное значение для окислительного взрыва, индуцируемого в растительных клетках при стрессе, в частности, при атаке патогенов. Образующиеся при этом АФК и феноксильные радикалы могут проявлять непосредственную токсичность для патогена, а также запускать сигнальные каскады.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 11-04-93962-ЮАР).

УДК 581.1+582.657.2

**СОПРЯЖЕННОСТЬ И ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ
АКТИВНОСТИ ФЕНИЛАЛАНИНАМИАКЛИАЗЫ, ЕЕ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ И ФЕНОЛЬНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ В ЗАЩИТНОМ ОТВЕТЕ РАСТЕНИЙ ПРИ
ГРИБНОЙ ИНФЕКЦИИ И ДЕЙСТВИИ САЛИЦИЛОВОЙ
КИСЛОТЫ**

**Молодченкова О.О., Адамовская В.Г., Цисельская Л.И.,
Безкровная Л.Я.**

Селекционно-генетический институт - Национальный центр семеноведения
и сортоизучения, Одесса, Украина, (0482) 395-473, olgamolod@ukr.net

Проблема иммунитета сельскохозяйственных растений является одной из наиболее актуальных проблем современной биологии. Интерес к фитоиммунитету обусловлен теми колоссальными потерями урожая от различных фитозаболеваний,

которые наблюдаются в мировом сельском хозяйстве, в том числе и на Украине [1]. Одними из наиболее перспективных, экономически обоснованных и экологически безопасных методов защиты растений от фитопатогенов являются создание устойчивых к заболеваниям сортов и индуцирование у растений устойчивости с помощью биологически активных веществ [2]. Для решения таких задач необходимо знать особенности функционирования иммунной системы растений и проводить поиск средств и методов воздействия на ключевые этапы реализации иммунного ответа [3]. Решающая роль в формировании механизмов устойчивости растений к фитозаболеваниям принадлежит биохимическим защитным реакциям, которые активируются под влиянием инфекции. Известно, что инфекционный процесс часто приводит к изменениям в фенольном метаболизме растений [1,4]. Усиление процессов образования фенольных соединений и лигнификации во многих случаях коррелирует с увеличением активности фермента, катализирующего первую и лимитирующую реакцию фенилпропаноидного пути – фенилаланинаммиаклиазы (ФАЛ)[5]. Одним из механизмов регуляции активности ФАЛ является действие специфических ингибиторов, таких как, α -аминооксиуксусная кислота (α -АМУ) и d-фенилаланин. Согласно гипотезе Зукера, синтез ФАЛ предшествует синтезу белкового ингибитора, индуцируемого транс-коричной кислотой. По мере роста количества ингибитора увеличивается скорость инактивации ФАЛ и растет пул неактивного фермента, результирующей чего является снижение активности ФАЛ [6]. Применение специфических ингибиторов, ограничивающих образование транс-коричной кислоты, вызывает значительное стимулирование активности фермента, уровень которого определяется индивидуальной реакцией каждого конкретного генотипа [7]. Учитывая то, что ключевые ферменты выступают в клетке основными факторами регуляции метаболизма в норме, а также в зависимости от действия внешних и внутренних факторов, изменяя активность фермента с помощью специфических ингибиторов и других биологически активных веществ, можно смещать нативное равновесие обмена веществ в ту или иную сторону. Инфицирование растений сопровождается изменением целого ряда биохимических параметров метаболизма, связанных с включение разных сигнальных систем, которые передают элиситорные сигналы в генетический аппарат клетки, что приводит к экспрессии защитных генов и индукции защитных реакций растений. Важная роль в этих процессах принадлежит сигнальным

молекулам, к числу которых относится салициловая кислота (СК)[8]. Несмотря на то, что в литературе имеется много фактического материала об участии фенолов и ФАЛ в защитных реакциях растений, однако конкретные механизмы их участия в формировании устойчивости растений зерновых культур к поражению грибными патогенами и при воздействии индукторов устойчивости пока еще полностью не раскрыты.

В связи с этим, целью наших исследований было выявление особенностей изменения активности ФАЛ, содержания фенольных соединений, лигнина при инфицировании грибными патогенами (возбудителями фузариоза, альтернариоза), действии экзогенной СК и специфических ингибиторов (α -АМУ и d-фенилаланина) в проростках генотипов зерновых культур (пшеницы, ячменя, кукурузы), различающихся по устойчивости к фитозаболеваниям и их роли в формировании механизмов устойчивости растений к фузариозу, альтернариозу – одних из наиболее вредоносных заболеваний сельскохозяйственных культур, вызывающих значительные потери урожая.

Проведенные исследования показали, что исходное содержание фенольных соединений, лигнина и уровень активности ФАЛ в контрольных растениях у разных по устойчивости генотипов изучаемых зерновых культур не может служить основой для заключения, что именно они обуславливают устойчивость исследованных генотипов к грибным патогенам, в частности, к возбудителям фузариоза и альтернариоза. По всей видимости, имеет значение не только исходное содержание этих веществ, но и наличие субстрата для фермента, и тот путь, по которому пойдет дальнейшее превращение коричной кислоты, являющейся ключевым метаболитом фенольного обмена.

Заражение возбудителями фузариоза, альтернариоза и действие СК вызвали различную ответную реакцию по изменению активности ФАЛ у растений разных зерновых культур в зависимости от рода культуры, устойчивости генотипа и воздействующего фактора. Изучение влияния α -АМУ и d-фенилаланина на активность ФАЛ при введении их в среду инкубации проростков зерновых культур при инфицировании возбудителями фузариоза показало, что данные ингибиторы оказывают существенное влияние на активность фермента. Характер изменения активности ФАЛ при действии изучаемых ингибиторов не всегда зависит от устойчивости генотипов к фузариозу, и, по всей видимости, определяется генотипом. Полученные результаты позволили сделать предположение, что

уровень активации и ингибирования ФАЛ определяется скоростью взаимодействия процессов, активирующих ФАЛ и системы ее инактивации, которая у разных по устойчивости и восприимчивости растений при действии специфических ингибиторов и активаторов, определяется индивидуальной реакцией каждого генотипа. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят расширить наши представления о механизмах регуляции активности ФАЛ в растениях зерновых культур, так как дополнительная активация фермента под действием индукторов устойчивости или специфических ингибиторов может служить важным резервом в комплексе защитных механизмов растений при инфицировании грибами патогенами.

Известно, что ФАЛ является одним из ключевых ферментов биосинтеза фенольных соединений и, по всей видимости, основным компонентом контрольного механизма, с функционированием которого связывают уровень количественных изменений в накоплении фенольных соединений и интенсификации процессов лигнификации клеток растений [5]. Для подтверждения этого предположения было проведено изучение количественного содержания фенольных соединений и лигнина в проростках зерновых культур при инфицировании растений возбудителями фузариоза и действии СК. Проведенные исследования показали, что содержание фенольных соединений и лигнина при действии изучаемых факторов, как правило, у устойчивых генотипов зерновых культур было достоверно выше по сравнению с контрольными растениями. Аналогичная закономерность была отмечена и для изменения активности ФАЛ у растений этих генотипов. У восприимчивых генотипов зерновых культур изменение содержания фенольных соединений и лигнина происходило неодинаково у различных культур и в зависимости от воздействующего фактора. У восприимчивых генотипов пшеницы и кукурузы содержание фенольных соединений при действии СК и патогена, как правило, было достоверно ниже по сравнению с контрольными растениями, а количество лигнина повышалось относительно контроля, но уровень этого увеличения был ниже в 2 раза, чем у устойчивых форм растений. Активность ФАЛ у восприимчивых генотипов пшеницы при инфицировании патогеном и действии СК снижалась относительно контроля, а у восприимчивых линий кукурузы – не изменялась или незначительно увеличивалась относительно контрольных растений. Ответная реакция восприимчивых сортов ячменя по изменению содержания изучаемых показателей при действии

патогена и СК позволила заключить, что их уровень контролируется разными механизмами. При действии СК у восприимчивых сортов содержание лигнина было ниже, а количество фенольных соединений находилось на уровне контроля, что, по всей видимости, связано с неэффективным функционированием фенилпропаноидного пути, что косвенно подтверждается снижением активности ФАЛ. В инфицированных возбудителями фузариоза растениях восприимчивых сортов ячменя наблюдалось достоверное повышение (в 1,5-2 раза) относительно контрольных растений содержания фенольных соединений и лигнина. Установленный в наших экспериментах низкий уровень активности ФАЛ у восприимчивых сортов ячменя при действии фузариозной инфекции является результатом или ускоренной спонтанной инактивации фермента данным патогеном, либо синтезом специфического белкового ингибитора ФАЛ в этих условиях, который блокирует ее активность.

К числу фенольных соединений относится и СК, которая является одной из ключевых молекул, принимающих участие в формировании иммунного ответа растений. Изучение уровня эндогенной СК в проростках зерновых культур показало, что при инфицировании грибными патогенами происходило изменение уровня свободной и связанной форм СК. При этом содержание эндогенной СК у устойчивых генотипов зерновых культур было, как правило, выше, чем у восприимчивых. Под влиянием экзогенной СК содержание эндогенной СК в растениях повышалось независимо от уровня устойчивости генотипа к фитозаболеваниям. Полученные данные указывают на возможное участие эндогенной СК в процессах формирования и регуляции защитных механизмов зерновых культур при инфицировании грибными патогенами и действии СК.

Повышенный уровень всех изучаемых показателей при совместном действии СК и патогена, по-видимому, приводит к включению и одновременному функционированию различных сигнальных систем, участвующих в защитных реакциях растений, в результате наблюдается феномен неспецифичности суммарного ответа растения на действие этих факторов, проявляющийся, прежде всего, в активации ФАЛ, и как следствие, - увеличению содержания фенольных соединений и лигнина.

Анализируя изложенные данные можно сделать вывод о том, что увеличение содержания фенольных соединений и усиление процессов лигнификации, которые происходят на фоне изменения активности ФАЛ являются составной частью

биохимической системы защиты растений зерновых культур, которая активируется при инфицировании грибными патогенами, действии СК и регулируется специфическими ингибиторами (α -АМУ и d-фенилаланином). В биохимической системе защиты растений отдельные защитные реакции существуют не изолированно, и включаются в определенной последовательности и взаимосвязи, усиливая и дополняя друг друга. Очевидно, что не все защитные реакции функционируют одновременно, а дифференцированно в зависимости от различных воздействий на растение. Во многом их включение зависит от физиологических и генетических особенностей растительного организма, фактора воздействия, что и обуславливает определенные особенности метаболизма фенольных соединений у растений разных родов зерновых культур при инфицировании грибными патогенами и действии различных биологически активных соединений (СК, специфических ингибиторов).

Полученные результаты будут способствовать расширению и конкретизации знаний о роли фенольных соединений в процессах формирования фитоиммунитета, а дальнейшие исследования в этом направлении станут основой для создания эффективных индукторов стимулирования и управления защитными системами растений зерновых злаковых культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Імунітет рослин: Підручник/М.Д. Євтушенко, М.П. Лісовий, В.К. Пантелєєв, О.М. Слюсаренко (за ред. М.П. Лісового). – К.: Клобіг, 2004. – 304 с.
2. Озерецковская О.Л., Ильинская Л.И., Васюкова Н.И. Механизмы индуцирования элиситорами системной устойчивости растений к болезням// Физиология растений. – 1994. – Т. 41, № 4. – С. 626-633.
3. Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавалия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. – Москва: Изд-во Общество фитопатологов, 2001.-302с.
4. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. – М.: Наука, 1993. - 273 с.
5. Краснянская В., Белова Л.П., Великанов Г.А., Видхолм Дж., Лозовая В.В. Экспрессия гена фенилаланинаммиа-лиазы из фасоли в “бородатых” корнях *Astragalus sinicus* // Физиология растений. – 2002. - 49, № 6. – С. 904-910.
6. Zucker M. Sequential induction of phenylalanine ammonia-lyase and lyase-inactivating system in potato tuber disks//Plant Physiol. – 1968.- V. 43, № 3. – P. 365-374.
7. Amrhein N. L- α -aminooxy- β -phenylpropionic acid – a potential inhibitor of L-phenylalanine ammonia-lyase in vitro and in vivo//Plant Sci. Lett. – 1977. – V. 8, № 4. – P. 313-317.

-
8. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л. Индуцированная устойчивость растений и салициловая кислота //Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – Т. 43, № 4. – С. 405-411.
-

УДК 581.1

КРАТКОВРЕМЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА НАКОПЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ФОТОМИКСОТРОФНОЙ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЕ ЧАЙНОГО РАСТЕНИЯ

Нечаева Т.Л., Загоскина Н.В.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва,
Россия

Фенольные соединения высших растений привлекают все большее внимание исследователей в связи с чрезвычайным разнообразием выполняемых ими функций, в том числе связанных с защитой от стрессовых воздействий [1,2]. И в этом отношении большей интерес представляет собой салициловая кислота (СК) – одно из простых по своей структуре веществ фенольной природы. Показано ее участие в регуляции цветения растений [3], регуляции транспорта органических веществ по флоэме [4], формировании ризобияльного симбиоза [5]. Имеются сведения о том, что при ее экзогенном действии возрастает устойчивость растений к гипо-[6,7] и гипертермии [8,9], осмотическому и солевому стрессам [10,11], действию тяжелых металлов [12]. В значительной степени это обусловлено изменениями в антиоксидантной системе растительных клеток, вызванными действием СК [8,13,14].

Основными компонентами антиоксидантной системы являются высокомолекулярные и низкомолекулярные антиоксиданты [15,16]. К числу последних относятся и фенольные соединения [17,18]. Благодаря их высокой биологической и антиоксидантной активности они находят все более широкое применение при лечении заболеваний различной этиологии [19,20].

Одним из успешных подходов для изучения действия биотических и абиотических факторов на клетки растений являются культуры *in vitro* [21]. К их числу относится и каллусная культура чайного растения, многолетние работы с которой позволили нам изучить различные аспекты фенольного метаболизма и его регуляции [22-24]. Известно, что для растений чая характерен

специализированный обмен, направленный на образование различных соединений фенольной природы, представленных мономерными (фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды), олигомерными (проантоцианидины) и полимерными (лигнин) формами [25,26].

Целью настоящего исследования являлось изучение изменений в образовании фенольных соединений в фотомиксотрофной каллусной культуре чайного растения после кратковременного действия различных концентраций СК.

Объект и методы исследования

Объект исследования и условия проведения экспериментов. Каллусные культуры, иницированные из молодого стебля чайного растения (*Camellia sinensis* L., грузинская разновидность), выращивали в условиях факторостата ИФР РАН в условиях 16-час. фотопериода на модифицированной питательной среде Хеллера, содержащей 2,4-Д (5 мг/л) и глюкозу (20 г/л) [27]. Длительность пассажа составляла 45 дней.

При проведении опытов каллусы 20-дневного возраста выдерживали 1 час в водных стерильных растворах СК (10^{-3} - 10^{-6} М) или в воде (контроль), после чего переносили на основную питательную среду и через 10 дней культивирования оценивали их морфо-физиологические характеристики, прирост каллусной массы и ее оводненность (высушивание при 70°C) [28].

Фенольные соединения извлекали из свежей каллусной ткани 96%-ным этанолом. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание суммы растворимых фенольных соединений (с реактивом Фолина–Дениса; поглощение при 725 нм) и содержание флаванов (с ванилиновым реактивом; поглощение при 500 нм) [29]. Калибровочные кривые в обоих случаях строили по (-)-эпикатехину.

Статистическая обработка. Все определения проводили в трех биологических и 2-3 аналитических повторностях. Результаты обрабатывали статистически. На диаграммах представлены средние арифметические значения определений и их квадратичные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фотомиксотрофная каллусная культура чайного растения имела светло-бежевый цвет, а на ее поверхности располагались окрашенные в зеленый цвет группы клеток. После кратковременного воздействия СК изменений в ее морфологических характеристиках не отмечалось, хотя прирост каллусной массы незначительно снижался (на 10-15%, по

сравнению с контролем), за исключением варианта с 10⁻⁶М СК. При этом во всех случаях была некоторая тенденция к повышению ее оводненности.

Основной нашей задачей являлось выяснение изменений в накоплении фенольных соединений в фотомиксотрофных культурах чая при действии СК.

Таблица

Содержание суммы растворимых фенольных соединений (ФС) и флаванов (ФЛ) в фотомиксотрофной каллусной культуре чайного растения, подвергнутой кратковременному действию салициловой кислоты (СК)

Концентрация СК, М	Количество ФС	Количество ФЛ
	мг/г сухой массы	
контроль	43,12 ± 0,29	15,23 ± 0,27
10 ⁻⁶	62,75 ± 0,66	31,88 ± 0,41
10 ⁻⁵	45,39 ± 0,33	16,06 ± 0,38
10 ⁻⁴	47,48 ± 0,46	15,67 ± 0,28
10 ⁻³	49,33 ± 0,54	17,12 ± 0,42

Как следует из полученных данных (табл.), количество в них фенольных соединений было достаточно высоким, что свидетельствует о сохранении в условиях *in vitro* биосинтетических характеристик тканей интактного растения [30]. После действия СК в большинстве случаев суммарное содержание растворимых фенольных соединений, в том числе и характерных для чайного растения флаванов, оставалась практически на уровне контроля, за исключением варианта 10⁻⁶ М СК, когда уровень этих веществ, соответственно в 1,5 и 2 раза превышал значения контроля. Все это свидетельствует о значительной активации биосинтеза фенольных соединений, преимущественно за счет нефлавановых компонентов фенольного комплекса. И этот аспект действия СК на метаболизм фотомиксотрофной каллусной культуры чая заслуживает дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запрометов М. Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.:Наука. 1993. 272 с.
2. Lattanzio V., Kroon P.A., Quideau S., Treutter, D. Plant phenolics – secondary metabolites with diverse functions // Recent Advances in Polyphenols Research. Wiley-Blackwell. Oxford. 2008. V. 1. P. 1–35.
3. Cleland C.F., Tanaka O. Effect of daylength on the ability of salicylic acid to induce flowering in the long-day plant *Lemna gibba* G3 and the shortday plant *Lemna paucicostata* 6746 // Plant Physiol. 1979. V. 64. P. 421-424.
4. Бурмистрова Н.А., Красавина М.С. Салициловая кислота – один из регуляторов флоральной разгрузки? // Междунар. конф. "Физиология растений – наука 3-го тысячелетия". М., 1999. С. 117.
5. Глянько А.К., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г., Миронова Н.В. Возможное участие перекиси водорода и салициловой кислоты в бобоворизобийном симбиозе // Изв. Российской АН. Сер. Биологическая. 2005. № 3. С. 300-305.
6. Horvath E., Janda T., Szalai G., Paldi E. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance // Plant Sci. 2002. V. 163. P. 1129-1135.
7. Nemeth M., Janda T., Horv'ath E. et al. Exogenous salicylic acid increases polyamine content but may decrease drought tolerance in maize // Plant Sci. 2002. V. 162. P. 569-574.
8. Dat J.F., Delgado H.L., Foyer C.H., Scott I.M. Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings // Plant Physiol. 1998. V. 116. P. 1351-1357.
9. Basra R.K., Basra A.S. Phenolic biosynthesis inhibitors accentuate the effects of heat-shock injury in mung bean seedlings: Alleviation by salicylic acid // New Seeds. 2001. V. 3. P. 41-49.
10. Шакирова Ф.М. Неспецифическая устойчивость растений к стрессовым факторам и ее регуляция. Уфа: Гилем. 2001. 160 с.
11. She H.-P., He J.-M., He Z.-X., Zou Q.-C. Cushion effect of salicylic acid on the damages invoked by salt stress of the young cucumber plants // J. Shaanxi Norm. Univ. Natur. Sci. 2001. V. 29. P. 99-101.
12. Misha A., Choudhuri M. A. Effect of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice // Biol. Plant. 1999. V. 42. P. 409-415.
13. Махдавиан К., Горбанли М., Калантари Х.М. Влияние салициловой кислоты на формирование окислительного стресса, индуцированного УФ-светом в листьях перца // Физиол. растений. - 2008. Т. 55. С. 620-623.
14. He Y., Zhu Z.J. Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*. // Biol. Plant. 2008. V. 52: P.792-795.
15. Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. // Ann. Bot. 2003. V. 91. P. 179-194.

-
16. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М. 2007. 140 с.
 17. Fraga C.G. Plant polyphenols: how to translate their in vitro antioxidant actions to in vivo conditions // IUBMB Life. 2007. V. 59. P.308-315.
 18. Hong Y., Lin S., Jiang Y., Ashraf M. Variation in contents of total phenolics and flavonoids and antioxidant activities in the leaves of 11 *Eriobotrya* species // Plant Foods. 2008. V. 63. P.200–204.
 19. Duthie G.G., Duthie S.J., Kyle J.A. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants // Nutr. Res. Rev. 2000. V. 13. P. 79–106.
 20. Крикова А.В., Давыдов Р.С., Мокин Ю.Н., Арльт А.В., Зинченко Л.А., Ивашев М.Н. Биологическая активность растительных источников флавоноидов // Фармация. 2006. Т. 54. С. 17-18.
 21. Balen B., Tkalec M., Pavokovic D., Pevalek-Kozlina B., Krsnik-Rasol M. Growth conditions in in vitro culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues // J Plant Growth Regul. 2009. V. 28. P.36–45.
 22. Запрометов М.Н., Загоскина Н.В. Еще об одном доказательстве участия хлоропластов в биосинтезе фенольных соединений// Физиол. растений. 1987. Т. 34. С. 165-172.
 23. Загоскина Н.В., Дубравина Г.А., Запрометов М.Н. Особенности формирования хлоропластов и накопление фенольных соединений в фотомиксотрофных каллусных культурах чайного растения // Физиол. растений. 2000. Т.47. С. 537-543.
 24. Загоскина Н.В., Гончарук Е.А., Алявина А.К. Изменения в образовании фенольных соединений при действии кадмия на каллусные культуры, инициированные из различных органов чайного растения // Физиол. растений. 2007. Т. 54. С. 267-274.
 25. Запрометов М.Н. Биохимия катехинов. М.: Наука. 1964. 200 с.
 26. Цоциашвили И.И., Бокучава М.А. Химия и технология чая. М. 1989. 188 с.
 27. Корецкая Т.Ф., Запрометов М.Н. Культура ткани чайного растения (*Camellia sinensis*) как модель для изучения условий образования фенольных соединений // Физиол. растений. 1975. Т.22. С.282 -285.
 28. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений //Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М.: Биоком. 2011. С. 386-402.
 29. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования //Биохимические методы в физиологии растений. М.:Наука. 1971. С.185-197.
 30. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. 286 с.
-

О ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЛИШАЙНИКОВ

Николаева Т.Н.¹, Заварзина А.Г.², Лапшин П.В.¹, Загоскина Н.В.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия, e-mail: phenolic@ippas.ru

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова факультет почвоведения

Одними из наиболее распространенных в растительном мире представителей вторичного метаболизма являются фенольные соединения (ФС). Они синтезируются практически во всех клетках и их функциональная роль очень разнообразна [1-3]. Она связана и с участием этих вторичных метаболитов в формировании органической части почв, а именно в образовании гумуса и его специфических соединений - гуминовых веществ [4]. Гуминовые вещества составляют до 90% органического вещества почв (гумуса) и представляют собой устойчивые высокомолекулярные полидисперсные соединения, образующиеся как в ходе частичной окислительной трансформации высокомолекулярных компонентов растительных тканей (например, лигнина), так и в результате полимеризации по свободнорадикальному механизму низкомолекулярных фенольных и азотсодержащих предшественников [4].

В условиях тундры, высокогорья, а также некоторых олиготрофных мест умеренной зоны, где малая заселенность высшими растениями, важная роль в формировании окружающей среды, в том числе и почв, отводится лишайникам. Они представляют собой симбиотическую ассоциацию гриба (микобионта) и водоросли и/или цианобактерии (фотобионта), в связи с чем их называют лишайнезированными грибами [5]. Лишайники разрушают минеральный субстрат путем физического воздействия (проникновения гиф микобионта), а также выделения простых органических кислот (щавелевой, лимонной и др.) и специфических для лишайников вторичных метаболитов ("лишайниковых кислот"), которые растворяют порообразующие минералы посредством кислотной атаки и комплексообразования [6].

Поскольку лишайники не содержат лигнина - основного предшественника гуминовых веществ в почвах под древесной растительностью, то высокомолекулярными предшественниками

этих веществ могут быть хитин и меланины, а низкомолекулярными - различные соединения фенольной и азотистой природы [7].

Целью работы было изучение содержания и состава спирто- и водо-растворимых ФС в напочвенных лишайниках родов *Lecanorales* и *Peltigerales*, доминирующих в растительном покрове тундр, в связи с их потенциальным участием в гумусообразовании.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования были выбраны виды лишайников, относящихся к порядкам *Peltigerales* (*P. aphthosa* (L.) Willd., *Solorina crocea* (L.) Ach.) и *Lecanorales* (*Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flotow, *Cetraria nivalis* (L.) Ach.). Образцы были собраны и определены А.А. Заварзиным (СПГУ, Санкт-Петербург) летом 2009 года в Хибинах (Кольский п-ов, Мурманская область). Их талломы были воздушно высушены и хранились в темноте без доступа воздуха.

Для извлечения ФС сухие талломы лишайников растирали в ступке и навеску растительного материала (50-100 мг) подвергали экстракции 96% этанолом (соотношение материала и экстрагента 1:5) при 45°C в течение 30 мин при периодическом перемешивании или водой (30°C, 1 час). Смесь центрифугировали при 7000 об/мин в течение 5 мин. Состав ФС исследовали

методом тонкослойной хроматографии на целлюлозе (Ferak, Германия). В качестве растворителя использовали смесь *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:5, верхняя фаза) [8].

Предварительную идентификацию ФС по специфической ярко-голубой или синей флуоресценции в УФ-свете (длины волн 254 и 366 нм) проводили на ультрахемископе DESAGA UVIS ("DESAGA", Голландия). Использовали также качественные реакции на ФС, опрыскивая хроматограммы смесью 1%-ных водных растворов FeCl_3 и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (на все классы ФС); диазотированным *p*-нитроанилином и 20% раствором Na_2CO_3 (на фенолкарбоновые кислоты) [9]. В качестве стандартов-метчиков использовали фенолкарбоновые (*p*-оксибензойную, ванилиновую, протокатеховую, галловую и сиреневую кислоты; Sigma, USA), а также лишайниковые кислоты – антранорин, усниновую и гирофоровую, любезно предоставленными И.А.Шапиро (БИН РАН, Санкт-Петербург).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение содержания этанол-растворимых ФС показало, что у лишайников порядка *Peltigerales* (*P. aphthosa*, *S. crocea*) оно было в 3-4 раза выше, чем у представителей порядка *Lecanorales* (*Cl. arbuscula*, *C. nivalis*). Аналогичная тенденция характерна и для

водорастворимых ФС. Следовательно, чем больше ФС накапливалось в талломе, тем больше их обнаруживалось и в водных экстрактах. Все это позволяет предположить, что не только мортмасса, но и живые лишайники служат источником растворимых ФС, которые под воздействием атмосферных осадков могут поступать в почву и включаться в процессы гумусообразования.

Следующей нашей задачей являлось изучение состава ФС, извлекаемых из лишайников как этанолом, так и водой. В этанольных экстрактах *P.apthosa* и *S.crocea* обнаружено 9 веществ фенольной природы, из которых два являлись доминантными компонентами (табл.).

Таблица.

Значения Rf фенольных соединений этанольных и водных экстрактов лишайников*

спиртовые экстракты, Rf											
<i>Peltigera apthosa</i>		0,23	0,28	0,37	0,42	0,48	0,55	0,66	0,77		<u>0,96</u>
<i>Solorina crocea</i>		0,22	0,28	0,37	0,42	0,48	0,55	0,66	0,77		<u>0,96</u>
<i>Cladonia arbuscula</i>									0,77	0,85	<u>0,91</u> <u>0,96</u>
<i>Cetraria nivalis</i>							0,56	0,64	0,77	0,85	<u>0,91</u> <u>0,96</u>
водные экстракты, Rf											
<i>Peltigera apthosa</i>		0,22	0,29	0,34	0,40	0,48	0,51	0,61		0,80	
<i>Solorina crocea</i>			0,29	0,34 0,37	0,40	0,48	0,54	0,63 0,65		0,80	
<i>Cladonia arbuscula</i>	0,12	0,24			0,39	0,48	0,54	0,65	0,72 0,76	0,82	
<i>Cetraria nivalis</i>	0,12 0,19	0,22 0,24			0,39	0,48	0,54 0,56	0,63 0,65	0,76		

*жирным шрифтом выделены доминантные соединения, значения Rf лишайниковых кислот - подчеркнуты

У *Cl.arbuscula* и *C.nivalis* обнаружено, соответственно, 4 и 6 соединений, количественное соотношение которых в фенольном комплексе, судя по интенсивности их окрашивания реактивом на ФС, было примерно одинаково. При этом состав ФС спиртовых экстрактов лишайников, относящихся к одному порядку, имеет большое сходство, что особенно характерно для представителей порядка *Peltigerales*.

Известно, что изученные леканоровые лишайники содержат

лишайниковые вещества, которые экстрагируют ацетоном [10]. Частично, эти соединения могут переходить и в этанольные экстракты. Возможность присутствия лишайниковых веществ в числе спирторастворимых соединений была проверена с использованием в качестве стандартов широко распространенных у лишайников соединений – атранорина, усниновой и гирофоровой кислот. Было установлено, что в использованной нами системе растворителей эти соединения имеют значения R_f 0,93 и 0,98, отличные от таковых спирторастворимых ФС (табл.).

В водных экстрактах пельтигеровых лишайников обнаружено 9 соединений фенольной природы, из которых ярко выражено преобладание двух компонентов, в водных экстрактах леканоровых лишайников обнаружено 9-11 соединений, доминировало из них 2-6. Интересен тот факт, что у всех исследованных видов лишайников многие ФС, переходящие в спиртовой экстракт, обнаруживаются и в составе водорастворимых соединений.

Судя по предварительным данным, некоторые из ФС являются конъюгатами фенолкарбоновых кислот - *п*-оксибензойной, ванилиновой и, возможно, протокатеховой. В пользу этого предположения свидетельствует их реакция с диазотированным *п*-нитроанилином (сходство в окрашивании), хотя значения их R_f не совпадали с таковыми стандартов. Наличие в талломах лишайников конъюгатов фенолкарбоновых кислот представляется возможным. Известно, что эти C_6-C_1 соединения фенольной природы в большинстве случаев присутствуют в клетках растений в виде конъюгатов с углеводами, ациклическими и алициклическими кислотами, аминами и другими веществами и крайне редко в свободном виде [9].

Таким образом, нами установлено присутствие в фенольном комплексе лишайников не только специфических лишайниковых веществ, но и широко распространенных в растительном царстве ФС, в частности, производных фенолкарбоновых кислот, формирующихся на ранних стадиях биогенеза ФС и участвующих во многих физиологических процессах [11]. Способность большинства спирторастворимых соединений переходить и в водный раствор предполагает возможность вымывания этих соединений из талломов с атмосферными осадками и участия во многих биологических процессах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука.1993. 285 с.
2. Boudet A.-M. Evolution and currentstatus of research in phenilic compounds// Phytochemistry.2007.V.68. P. 2722-2735.

-
3. Recent advances in polyphenol. Eds. Santos-Buelga C., Escribano-Bailon M., Lattanzio V., Wiley-Blackwell. 2010. V.2. 352 p.
 4. Stevenson F.G. Humus chemistry: Genesis, Composition, Reactions. Second Ed. New York: Wiley. 1994.
 5. Ботаника. Курс альгологии и микологии// под ред. Ю.Т. Дьякова. М.: Изд-во МГУ. 2007. 559 с.
 6. Chen J., Blume H.P., Beyer L. Weathering of rocks induced by lichen colonization// Catena. 2000. V.39. P. 121-146.
 7. Elix J.A. Biochemistry and secondary metabolites // Lichen biology. Ed. Nash T.H. Cambridge: Cambridge University Press. 1996. P. 154-180.
 8. Запрометов М.Н., Николаева Т.Н. Способность изолированных хлоропластов из листьев фасоли осуществлять биосинтез фенольных соединений // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 699-705.
 9. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высшая школа. 1974. 250 с.
 10. Huneck S., Yoshimura I. Identification of lichen substances. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1996. 493 p.
 11. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука. 1993. 285с.
-

ДИНАМИКА ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ СЕЯНЦЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО МУЧНИСТОЙ РОСОЙ

Полякова Л.В.¹, Литвиненко В.И.²

¹УкрНИИ лесного хозяйства и агролесомелиорации, Харьков, Украина
polyakova_lv@mail.ru

²ГП Государственный научный центр лекарственных средств и
медицинской продукции, Харьков, Украина

Влияние патогена на биохимические изменения в растительной клетке затрагивает вещества как первичного так и вторичного обмена. Целью работы было проследить изменчивость первичных и вторичных метаболитов в сеянцах дуба на протяжении 4-х месяцев – в возрасте 2 месяца (март, отсутствие инфекции) и в возрасте 6 месяцев (июль, активная фаза инфицирования листьев мучнистой росой). Содержание белка (Б) определяли по методу Г.А.Бузун и соавт.[1], из вторичных метаболитов определяли содержание флавонолов (ФЛ, доминирует кверцитрин), свободный кверцетин (Кв), гидролизуемые танины (ГТ). В 2-х мес. возрасте были проанализированы 64 особи, в 6-месячном возрасте 42, так как наиболее восприимчивые сеянцы имели сухие листья (табл.1).

Таблица 1.

Биохимическая характеристика семян полусибового потомства 600-летнего дерева дуба черешчатого (% от сух. веса листьев; Кв – мг/г; под чертой CV%)

Группа	Б-2 м	Б-6 м	ФЛ-2 м	ФЛ-6 м	ГТ-2 м	ГТ-6 м	Кв-2 м	Кв-6 м
64ос	<u>9.4±0.15</u> 12.6	-	<u>0.76±0.06</u> 71.05	-	<u>2.77±0.09</u> 26.3	-	<u>0.53±0.03</u> 22.6	-
42ос.	-	<u>9.41±0.2</u> 14.1	-	<u>0.69±0.06</u> 62.3	-	<u>1.71±0.09</u> 32.5	-	<u>0.2±0.01</u> 28.0
14 ос	<u>9.36±0.29</u> 11.7	<u>8.95±0.3*</u> 12.8	<u>0.78±0.12</u> 61.5	<u>0.73±0.1</u> 50.6	<u>2.75±0.24</u> 11.6	<u>1.72±0.15</u> 33.1	<u>0.51±0.04</u> 25.4	<u>0.18±0.02</u> 38.8
28 ос.	<u>9.41±0.25</u> 15.9	<u>9.58±0.2*</u> 14.6	<u>0.77±0.29</u> 62.3	<u>0.61±0.08</u> 77.0	<u>2.73±0.12</u> 24.9	<u>1.77±0.11</u> 33.8	<u>0.58±0.05</u> 27.3	<u>0.16±0.03</u> 41.5
уст								
воспр								

Примечание: ос – особи; уст –устойчивые к мучнистой росе; воспр.- восприимчивые. 2 м – 2 месяца; 6 м -: 6 месяцев; * Р ≤0.05.

Данные табл.1 показывают, что содержание Б в 2-х месячном возрасте практически одинаково во всех группах растений. В возрасте 6 месяцев содержание Б снижается в группе устойчивых особей и, напротив, возрастает в группе восприимчивых. Из вторичных метаболитов по среднему содержанию ФЛ все группы растений отличались незначительно, но имели очень высокий уровень изменчивости (CV> 50%). Содержание ГТ в 2-х месячном возрасте было практически в 1.5 раза выше, чем в возрасте 6 месяцев во всех сравниваемых группах. Вариабельность ГТ, а также Кв, сохранялась на среднем уровне (CV - 22-38%).

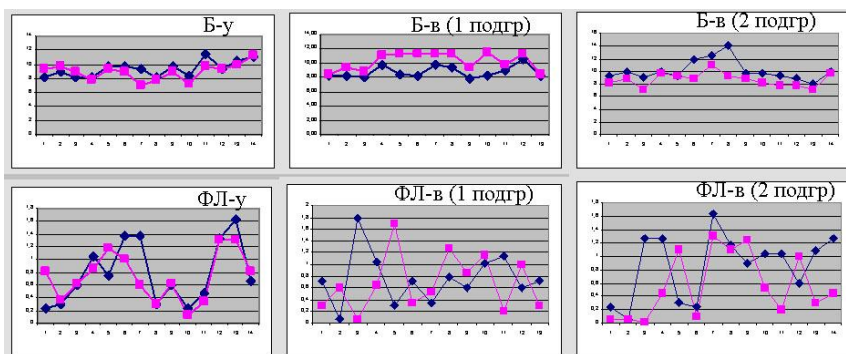


Рис 1. Диаграммы, отражающие содержание белка (Б) и флавонолов (ФЛ) в семенах устойчивой (Б-у, ФЛ-у) (14 особей) и восприимчивой группы (Б - в, ФЛ - в; 1-я подгруппа – 13 особей; Б-в, ФЛ-в; 2-я подгруппа – 14 особей). возраст 2 месяца; возраст 6 месяцев.

Далее рассмотрели характер изменчивости наиболее стабильного показателя - Б - и наиболее вариабельного – ФЛ (рис.) Контролем служила группа устойчивых к инфекции сеянцев. Диаграммы, отражающие содержание веществ в каждой особи в 2 срока анализа показали, что содержание Б в сеянцах устойчивой группы (14 особей) практически одинаково в обоих возрастных состояниях (Б - у).

Неожиданным оказалось поведение Б в особях восприимчивой группы. Диаграммы показывают, что вся выборка 1-го и 2-го сроков анализа по количественным отношениям распадается на две подгруппы. В листьях сеянцев с первоначально пониженным уровнем Б инфекция вызвала заметное повышение его уровня – на 17% (с $8.77 \pm 0.23\%$ до $10.3 \pm 0.36\%^{**}$) (1-я подгр.). В растениях с повышенным в возрасте 2 мес. содержанием Б к 6-ти мес. наблюдалось снижение его уровня – на 16% (с $10.11 \pm 0.43\%$ до $8.69 \pm 0.28\%^{*}$) (2-я подгр.).

Это показывает, что при действии патогена могут запускаться разные механизмы защиты, приводящие как к деградации части первоначально накопленного Б (2-я подгр.), так и к синтезу *de novo*, в случае его пониженного содержания в начальный период развития (1-я подгр.). Литературные данные указывают, что конкуренция за азот - это процесс, в котором не только патоген зависит от азотного статуса растения-хозяина, но и азотный метаболизм хозяина изменяется во время атаки патогена путем транслокаций в геноме [5]. Была обнаружена также существенная разница в салицилат-индуцируемой изменчивости протеомов корней и листьев гороха [2], что свидетельствует о различных стратегиях защиты от патогена в одном и том же растении. В случае с сеянцами дуба различие индуцированного ответа протеома на внедрение патогена, вероятно, может зависеть от первоначального (до появления инфекции) уровня Б в листьях.

Диаграммы устойчивой группы сеянцев демонстрируют хорошее совпадение количественных показателей не только Б, но и ФЛ в оба срока анализа. В сеянцах восприимчивой группы, особенно после развития инфекции, индивидуальная изменчивость ФЛ заметно возрастает ($CV=77\%$), что может указывать на ослабление регуляции синтеза веществ под влиянием элиситоров патогена. Об этом же свидетельствуют более низкие коэффициенты корреляции Б-ФЛ, Б-ГТ в сеянцах восприимчивой группы (табл.2).

Таблица 2.

Корреляции между основными биохимическими и морфологическими показателями сеянцев

группа	Б-ФЛ- 2 2 мес.	Б-ФЛ 6 мес.	Б-ГТ 2 мес.	Б-ГТ 6мес.	Б-выс 2 мес	Б-выс 6 мес	ГТ- выс 2 мес	ГТ- выс 6 мес
ПС- 600 42 ос.	0.23	0.37**	- 0.2	- .43**	- 0.07	0.205	- 0.123	- 0.162
Уст.гр. 14 ос.	0.323	0.424	- 0.15	- 0.57*	- 0.15	0.314	- 0.02	- 0.11
Воспр. 28 ос.	0.194	0.40*	0.24	- 0.39*	- 0.17	0.17	- 0.22	- 0.185

* ** $P \leq 0.05, 0.01$.

Можно отметить, что между содержанием Б и ФЛ существует устойчивая позитивная корреляция среднего уровня, четко проявляемая к возрасту 6 месяцев. На среднем уровне находится корреляция содержания Б и ГТ, однако эта корреляция носит устойчивый негативный характер, несмотря на то, что в данном случае отсутствует конкуренция за фенилаланин [6]. Позитивная корреляция характерна также для Б и ростовой активности сеянцев и, напротив, негативная для ростовой активности и содержания ГТ.

Заслуживает внимания очень высокая вариабельность ФЛ (CV- 50-77%). В сеянцах содержание ФЛ варьирует от 1.8% до следового количества – 0.02-0.06%, что указывает на значительное разнообразие семенного потомства в отношении активности генов, регулирующих их синтез (рис). Несмотря на большой разброс значений, влияние ФЛ на ростовую активность среди 42-х 6-мес. сеянцев не прослеживается, в то время как содержание Кв (CV= 22-28%) оказало заметное влияние на прирост (табл. 3).

Таблица 3.

Содержание флавонолов и кверцетина в листьях ПС-600 в зависимости от прироста за 4 месяца

Группа особей	Прирост, см	ФЛ %	Кв мг/г	Б %
1-я (14 особей)	6.73±0.38**	0.67±0.007	0.16±0.027*	9.86±0.42
2-я (16 особей)	1.64±0.17**	0.64±0.11	0.173±0.02*	9.25±0.32
3-я (12 особей)	0.21±0.03**	0.52±0.15	0.24±0.023*	9.10±0.31

** $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$, сравнение 3-й группы с 1-й и 2-й.

Данные табл.3 показывают, что пониженный уровень Кв в листьях 1-й и 2-й групп обеспечивает заметный прирост сеянцев в высоту, в то время как повышение уровня в 3-й группе (на 40-50% по сравнению с 1-й-2-й) снижает прирост практически до нуля. Гликозилированная форма ФЛ достоверного влияния на прирост сеянцев не оказывала, хотя можно отметить тенденцию снижения уровня как ФЛ так и Б от сеянцев с максимальным приростом к минимальному.

В последнее время появились работы, в которых подробно рассмотрен механизм влияния ФЛ на транспорт ауксинов [3,4]. В трансгенных линиях ореха грецкого (соматический эмбриогенез) с редуцированным синтезом ФЛ (кверцитрин, мирицитрин) было отмечено более интенсивное корнеобразование по сравнению с контрольной линией, несмотря на то, что содержание ИУК в стеблях эксплантов разных линий было практически одинаковым. Инициация корнеобразования добавлением в питательную среду ИМК приводит к двукратному увеличению выхода укорененных эксплантов в линиях с редуцированным синтезом ФЛ по сравнению с контролем. Авторы считают, что ФЛ за счет образования комплексов с полисахаридами и протеином могут изменять свойства мембран, нарушая рецепторно-транспортную систему ауксинов. В культуре *Arabidopsis* [4], мутантной по активности синтеза кверцитрина (линия *rol 1-2*), эксперимент с экспортом из протопластов меченых ИУК и НУК показал отсутствие влияния на ИУК, но увеличение экспорта НУК по сравнению с контролем. Авторы считают, что ФЛ накапливаются в эпидермальных клетках зоны растяжения корней и могут модифицировать скорость транспорта ауксинов. То есть в обоих исследованиях отмечается связь между содержанием ФЛ и активностью транспорта ауксинов прежде всего в зоны растяжения корня.

В случае с дубом черешчатым, в листьях которого доминирует кверцитрин, действительно, было отмечено влияние пониженного уровня ФЛ в сеянцах, используемых для микроклонирования, на более активное развитие корневой системы эксплантов, переведенных в грунт. Позднее были выкопаны 20 сеянцев ПС-600 (04.2012 г., возраст 1.5 г.), проанализированных в марте 2011 г., корни отделены, высушены и взвешены (табл.4).

Из данных табл.4 следует, что низкий уровень ФЛ в листьях (2-я группа) сопровождается увеличением массы корня на 21%, что способствует более высокой приживаемости и активности роста сеянцев в первые годы развития. Однако низкий уровень ФЛ в

листьях в дальнейшем может проявиться для растения снижением его антиоксидантной активности, характерной для этой группы веществ [7].

Таблица 4.

Содержание белка и флавонолов (%) в листьях семян 2-х месячного возраста (ПС-600) и вес корней в возрасте 1.5 года (г).

Группа растений	Б %	ФЛ %	Вес, г
1-я (10 особей)	9.40±0.20*	1.33±0.06**	0.30±0.02*
2-я (10 особей)	8.80±0.17*	0.52±0.09**	0.38±0.03*
% 1 гр. – 2 гр.	107	250	79

*, ** P ≤ 0.05, 0.01

Таким образом, изучение веществ первичного и вторичного обмена в динамике развития семян позволило выявить связь как с особенностями ростовой активности семян, так и устойчивостью к инфицированию мучнистой росой. В случае инфекции можно отметить, что наибольшие изменения элиситоры патогена вызывают в листьях растений, восприимчивых к заболеванию. В листьях устойчивых семян значительно изменить синтез Б и ФЛ не удастся, при этом, как указывают фитопатологи, на листьях заметны зоны внедрения патогена, но отсутствует его развитие. ФЛ во всех случаях показывают очень высокую вариабельность. Для ГТ снижение уровня до следовых количеств не отмечено, а сохранение практически одинакового содержания в группах устойчивых и восприимчивых особей указывает на отсутствие влияния патогена на синтез этой группы веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растениях с помощью амидо-черного // Физиол.раст.-1982.- Т.29. - С.350-358.
2. Яковлева В.Г., Тарчевский И.А., Егорова А.М. Роль салициловой кислоты в формировании иммунитета у растений // Мат. VII межд.смп. по ФС., Москва, 19-23 октября.-2009.- С.289.
3. Euch C.El., C.Jay-Allemand, M.Pastuglia, P.Doumas, J.p.Carpenter, P.Capelli, J.Jouanin. Expression of antisense chalcone synthase RNA in transgenic hybrid walnut microcuttings. Effect on flavonoid content and rooting ability // Plant Mol.Biol.-1998 -V.38.- P.467-479.
4. Khun B.M., Geisler M., Bigler L., Ringli Ch. Flavonols Accumulate Asymmetrically and Affect Auxin Transport in *Arabidopsis* // Plant Physiol.-2011. - V.156.- P. 585-595.
5. G.Lui, Y.Ji, N.H.Bhulean, G.Pilot, J.Zou, Y.Wel. Amino Acid Homeostasis Modulates Salicylic Acid Associated Redox Status and Defense Responses

-
- in Arabidopsis// The Plant Cell.-2010.-V.22.- no.11.- P. 3845-3863.
6. Ossipov V., Ossypova S., Bykov V., Oksanen E., Koricheva J., Haukioja E. Application of metabolomics to genotype and phenotype discrimination of birch trees grown in a long-term open-field experiment // Metabolomics - 2008.-V.4.- P.39-51.
 7. Takahama U. Hydrogen Peroxide-Dependent Oxidation of Flavonols by Intact Spinach Chloroplasts // Plant Physiol. – 1984.-V. 74.- P. 852-855.
-

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА РАЗВИТИЕ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА У ЯЧМЕНЯ ПРИ ПОРАЖЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ СЕТЧАТОГО ГЕЛЬМИНТОСПОРИОЗА

Полякова Н.В.

Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси,
Минск, Беларусь, +375 17 284 05 43, e-mail: patphysio@mail.ru

Жизнедеятельность любого растения, а тем более фитопатосистемы или сообщества хозяин – патоген, контролируется в числе прочих и гормональной системой [1]. Она регулируют не только жизнь растения и инфицирующего его гриба, но и возникновение нового физиологического статуса, обеспечивающего динамическое равновесие между видами и через него ту форму устойчивости, благодаря которой поддерживается стабильность внутренней среды фитопатосистемы. Гормональная информация связана не только с пропускной способностью рецепторов мембранных каналов, с импульсами, посылаемыми геномом к отдельным частям данной системы. Может происходить взаимодействие сигналов, возникновение новых, вследствие «освобождения» рецепторов от предшествующих сигналов, а также, вследствие функционирования гормонов в местах их образования [2]. В результате информация, включающая системы рецепции и передачи сигналов, может обретать роль среды, существование которой поддерживается частями общего регуляторного процесса инфицированной ткани. Следовательно, возникновение и перенос информации в патосистемах следует рассматривать как способность к саморегулированию, в основе чего лежит взаимодействие противоположно направленных физиологических процессов, которые иницируя трансформирование регуляторной функции, приспосабливают

растение к внешнему инфекционному воздействию.

Наши исследования [3] характера распределения гормональной активности в клеточных структурах и апопласте инфицированных тканях ржи и ячменя показали, что в межклеточной жидкости (внутренней среде пораженного растения) присутствуют гормональные соединения, придающие специфичность среде обитания патогенов и регулирующие не только возникновение у них биотрофного питания, но и транспорт метаболитов из мезофильных клеток в свободное пространство – место локализации мицелия патогена. Этот механизм гормон-рецепторных взаимодействий функционирует в период формирования возбудителем сетчатого гельминтоспориоза (*Pyrenophora teres*) биотрофных отношений с клетками ячменя на ранних стадиях патогенеза, что ассоциируется с проявлением болезнеустойчивости. Дальнейшие наши исследования направлены на изучение в ячмене, пораженном гельминтоспориозом, содержания салициловой кислоты (СК) и ее экзогенного влияния на развитие патологического процесса. Регуляторные свойства СК в отношении активности инфекционного процесса, развивающегося на питающих растениях, малоизучены. Она рассматривается [2] как возможный участник некрозообразовательного процесса, развивающегося после поражения растений возбудителями болезней, как индуктор системно приобретенной устойчивости к ним. СК ингибирует активность каталазы, расщепляющую перекись водорода, способствуя этим самым накоплению пероксида водорода, который индуцирует некрозообразование, т.е. усиливает реакцию сверхчувствительности, что является показателем повышения болезнеустойчивости. При ингибировании процесса некрозообразования СК переводится в связанное состояние, образуя гликозиды. Внедрение гриба *P. teres* в ткани проростков ячменя приводило к росту уровня салициловой кислоты (СК) на всех стадиях поражения устойчивого сорта Прима и достигало соответственно 126 и 128%. Изменения в содержании СК в тканях инфицированного восприимчивого сорта Гостинец было незначительно выше контрольного уровня. Этот подъем был меньше, чем у сорта Прима: вместо 126 %, отмеченных для него на первой стадии болезни, концентрация СК у восприимчивого сорта возрастала всего на 33 %; степень увеличения СК на второй стадии патогенеза у генотипа Прима составила 128 %, а у генотипа Гостинец – 75 %. Такое резкое уменьшение количества СК у восприимчивого сорта согласуется с возможной утратой данным

гормоном своей основной функции – защищать растения ячменя от возбудителя сетчатого гельминтоспориоза. Сам факт резкого увеличения количества СК в тканях пораженного *P. teres* устойчивого сорта ячменя свидетельствует об индуцировании в его тканях системно приобретенной устойчивости. Предполагается, что СК активирует экспрессию генов системно приобретенной устойчивости, в результате которой синтезируются защитные (или стрессовые) белки. К ним относятся лектины и PR-белки (патогенезозависимые), непосредственно участвующие в повышении болезнеустойчивости ячменя к гельминтоспориозным пятнистостям [4, 5]. Изложенное свидетельствует о том, что как сигнальная молекула СК участвует во взаимодействии хозяин-патоген. Процесс сигнальной трансдукции СК, начинающийся с взаимодействия с соответствующими рецепторами на плазмалемме инфицированной клетки ячменя и заканчивающийся конкретным биологическим эффектом - повышением болезнеустойчивости, сопровождается изменением концентрации ионов Ca^{2+} , выделяемых патогеном [6], который и обуславливает специфику ответа клетки на действие стимула, запускающего такую защитную реакцию.

СК использовалась нами также и в качестве экзогенного регулятора гормонального статуса питающего растения. С этой целью изучали влияние экзогенной СК на формирование симптомов сетчатого гельминтоспориоза после опрыскивания отрезков листьев ячменя и оценивали степень поражения 7-дневных проростков, обработанных СК за сутки до заражения. Отмечено, что при нанесении инокулюма гельминтоспориозного гриба на отрезки листьев ячменя развитие признаков поражения зависело от концентрации СК и сорта растения. Так, у устойчивого сорта ячменя Прима предобработка СК в концентрации 10^{-3} М вызывала массовое спороношение, минимальную зону мицелиального роста и некроз в месте нанесения инокулюма. Уменьшение концентрации СК с 10^{-4} М до 10^{-7} М вызывало разрастание мицелия, ингибирование спороношения, уменьшение некротизации листовой пластинки и увеличение зоны хлороза. Несколько иная картина была получена при инфицировании отрезков листьев восприимчивого сорта Гостинец. Высокие концентрации СК (10^{-3} М - 10^{-5} М) ингибировали спороношение гриба, тогда как низкие, наоборот, стимулировали, вызывая некроз с сильным хлорозом. Схожая картина была получена при применении этой же схемы на целом растении. Предобработка СК растений с последующим заражением возбудителем сетчатой

пятнистости показала у устойчивого сорта снижение балла поражения по мере разведения концентрации, а у восприимчивого степень развития болезни практически не изменилась. Все растения были хлоротичны с точечной пятнистостью, особых отличий между вариантами практически не выявлялось. Часто более четко были поражены верхушки листьев. К 11 дню растения усыхали. Помимо опрыскивания листьев экзогенной СК обработка ячменя осуществлялась также посредством замачивания в течение суток семян ячменя разных по устойчивости сортов в водных растворах разных концентраций СК, после чего семена высаживали в сосуды и появившиеся семидневные проростки опрыскивали водной суспензией спор (Табл.). Контролем служили семена, инкубированные в дистиллированной воде в течение 24 часов. Наиболее эффективными оказались концентрации 10^{-5} и 10^{-6} М у обоих сортов. Как высокие, так и низкие концентрации показали схожую картину вне зависимости от степени устойчивости сорта.

Таблица.

Влияние экзогенной салициловой кислоты на степень поражения ячменя сетчатым гелиминтоспориозом (предобработка – замачивание семян СК)

№	Концентрация СК	Балл поражения	Описание поражения
Сорт Гостинец			
1	10^{-9} М	2,5	Некротическая пятнистость верхушек
2	10^{-8} М	2,5	Некротические пятна всего листа
3	10^{-7} М	1-1,5	Точечное поражение
4	10^{-6} М	0,5	Малозаметная пятнистость
5	10^{-5} М	0,5	Слабо выраженная пятнистость
6	10^{-4} М	1,5	Некротические пятна небольшого размера
7	10^{-3} М	2,5	Некроз с хлорозом
8	контроль	2,5	Некроз с хлорозом на верхушках
Сорт Прима			
1	10^{-9} М	1	Точечное слабое поражение
2	10^{-8} М	0,5	Поражение схожее. Слабое пожелтение верхушек листьев с зелеными островками. Явных признаков болезни нет.
3	10^{-7} М	0,5	
4	10^{-6} М	-	
5	10^{-5} М	-	
6	10^{-4} М	0,5	
7	10^{-3} М	0,5-1	Точечное слабое поражение
8	контроль	2	Некротическое поражение с хлорозом

Таким образом, установленная взаимозависимость защитных механизмов, возникающая при поражении ячменя сетчатым гельминтоспориозом, обусловлена стимулированием в его тканях активности салициловой кислоты, регулирующей продолжительность биотрофного существования факультативного паразита и как следствие – повышение системно приобретенной устойчивости, общепринятым индуктором которой также является салициловая кислота. Гормональная система инфицированных сетчатой пятнистостью клеток ячменя переключает внутриклеточный метаболизм с обычных программ на активирование защитных. Предобработка пораженных растений экзогенной СК изменяет состояние эндогенной гормональной системы и этим самым осуществляет предадаптацию растений к заболеванию за счет трансдукции сигналов из внешней среды во внутриклеточную и индуцирование посредников, многократно усиливающих эти сигналы. В результате последние преобразовываются в соответствующие противоинфекционные ответы растительной клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулаева О.Н. Как регулируется жизнь растений // Соросовский Образовательный журнал. Биология. 1995. №1. С.20-27.
 2. Медведев С.С. Физиология растений. СПб. Изд. Петерб. Ун-та. 2004. 335С.
 3. Серова З.Я. Структурные и физиолого-биохимические связи между организмами при формировании фитопатосистем. Минск. 2002. 110С.
 4. Шакирова Ф.М., Сахабутдинова А.Р. Сигнальная регуляция устойчивости растений к патогенам // Успехи современной биологии. 2003. Т.123. №6. С.563-572.
 5. Дмитриев А.П. Сигнальные молекулы растений для активации защитных реакций в ответ на биотический стресс // Физиология растений. 2003. Т.50. №3. С.465.
 6. Карпук В.В. Структурная организация патогенеза злаков, вызываемого грибной инфекцией: Дисс. ... докт. биол. наук.: 03.00.12, 03.00.24.– Минск, 2000.– 410 С.
-

ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ НА СИНТЕЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПРИ ФИТОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Постоеенко О.М., Компанец Т.А.

Учебно-научный центр «Институт Биологии» Киевского национального
университета имени Тараса Шевченко. Киев, Украина тел. 521-35-02
postoenko@ukr.net

Одним из эколого-биохимических механизмов адаптации растений при комплексном влиянии антропогенных факторов и вирусных инфекций считаются изменения в составе и количественном соотношении соединений антиоксидантной группы, в частности – фенольной природы [1].

Фенольные соединения – один из важных классов вторичных метаболитов, широко представленных в растениях. Разнообразные функции фенольных соединений в растительной клетке, и одновременно с этим широкий спектр биологического воздействия на организм человека и животных, обосновывают актуальность изучения их участия в развитии защитных реакций организмов в неблагоприятных условиях существования [2]. Данные литературы по влиянию стресс-факторов на содержание фенольных соединений в растениях фрагментарны и противоречивы. Однако они однозначно свидетельствуют про изменчивости этих показателей [3]. Этот факт подтверждает предположение о немаловажной роли фенольных соединений в формировании резистентности растений к изменениям интенсивности природных и антропогенных стрессовых факторов [4].

Исходя из вышесказанного целью работы было проанализировать влияние расположения места произрастания относительно факторов антропогенной нагрузки на фитовирусологическое состояние растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) и содержание в них фенольных соединений, а также подтвердить в лабораторных условиях корреляционную зависимость между размножением вируса и синтезом фенольных соединений, как одного из звеньев в цепи неспецифической защиты растений.

Методом случайных выборок из агроценозов с разной степенью антропогенной нагрузки по визуальным симптомам были отобраны растения сахарной свеклы, которые в дальнейшем исследовались методом иммуноферментного анализа на присутствие вирусных антигенов и методом экстракции для

определения концентрации фенольных соединений [5, 6].

Методом ИФА была продемонстрирована зависимость распространения и процента выявления антигенов в растениях от места отбора образцов. Листовые пластинки, отобранные для ИФА, высушивали и определяли в них содержание фенольных соединений. Наибольшее содержание фенольных соединений регистрировалось нами в растениях, отобранных на участках с высокой степенью антропогенной нагрузки и, соответственно, наибольшей пораженностью вирусными патогенами. Такая взаимосвязь сохранялась и в отношении других мест отбора образцов.

Для подтверждения корреляционной взаимосвязи между накоплением вирусных частиц и изменением уровня концентрации фенольных соединений мы провели лабораторный эксперимент на модели «растения сахарной свеклы – ВТМ». Содержание фенольных соединений увеличивалось в зараженных вирусом растениях по сравнению с контрольными неравномерно. При сравнении динамики накопления вирусных антигенов и фенольных соединений в зараженных ВТМ растениях сахарной свеклы, прослеживается такая зависимость. В период между 3-м и 6-м днями после инфицирования наблюдалось незначительное увеличение концентрации вирусных антигенов на фоне достоверного роста концентрации фенольных соединений. С 6-го по 10-й дни – количество фенольных соединений увеличивалось, даже более стремительно, чем в предыдущий период, а концентрация антигенов ВТМ в это время существенно не изменялась.

Таким образом, нами показано прямую зависимость между степенью антропогенной нагрузки и степенью пораженности растений вирусами, и содержанием в этих растениях фенольных соединений. Показано, что репродукция ВТМ в растениях сахарной свеклы индуцирует синтез фенольных веществ, которые накапливаясь, вероятно, начинают подавлять накопление вируса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rice-Evans C.A. Parker L. (Eds.) *Flavonoids in Health and Diseases*. — Marcel Dekker, New York, 1997.
2. Halliwell B., Gutteridge (Eds) *Free Radicals in Biology and Medicine*. — Clarendon Press, Oxford (Uk), 1985. —P. 167.
3. Paladini A. C., Marder M. Viola H. et al. *Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds // J. Pharm. Pharmacol.* —1999. —Vol. 51. —P. 519—526.

-
4. Залесский В.Н., Великая Н.В. Антиапоптотические, проапоптотические и антиоксидантные реакции молекул флавоноидов — растительных фенолов // Проблемы харчування. —2003. —№1. —С. 38—43.
 5. Зайцев В.М. Методи концентрування та визначення фенольних сполук (огляд) / В.М. Зайцев, В.А. Халаф, Г.М. Зайцева // Методи и объекты химического анализа. — 2008. — Т.3, №1. — С. 4-21.
 6. Постоєнко В.О., Бондарчук Л.І., Патица В.П. Методи оцінки якості та стандартизації апіфітопрепаратів у формі мазей – К.: 2004 – 27с.
-

ВЛИЯНИЕ СВЕТА НА БИОСИНТЕЗ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO* КОРНЯХ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО (*SCUTELLARIA BAICALENSIS* GEORGI)

Прокофьева М.Ю.

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, Москва
тел.: (495) 9779211, e-mail: maria.vdovitchenko@gmail.com

Стимулирующее действие света на биосинтез фенольных соединений в растениях было многократно доказано на примере фотосинтезирующих органов и на каллусных тканях, полученных из них. Впервые биосинтез фенольных соединений был обнаружен в хлоропластах молодых листьев чайного растения и ивы [1]. Позднее участие хлоропластов в синтезе фенольных соединений было показано также на каллусных культурах чайного растения, а также на изолированных хлоропластах фасоли [2; 3]. Положительное влияние света на биосинтез вторичных метаболитов в генетически трансформированных корнях описано лишь для некоторых объектов - *Datura stramonium*, *Catharanthus roseus* и *Solanum khasianum*, основными веществами которых являются алкалоиды [4; 5; 6]. Данные об изменении качественного и количественного содержания фенольных соединений, и в частности флавоноидов, в корневых культурах, растущих в условиях освещения, до настоящего времени были неизвестны.

Культуры рRi Т-ДНК трансформированных корней, полученные от редких и исчезающих видов лекарственных растений, представляют огромный интерес не только как потенциальные источники физиологически активных соединений, применяемых в медицине, но и как модельные системы для

проведения различных исследований. К таким растениям относится шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi), который находит широкое использование в официальной и традиционной медицине [7; 8]. Основными действующими веществами, содержащимися в корнях шлемника байкальского и определяющими их физиологическую активность, являются фенольные соединения – *флавоноиды*. Доминирующие флавоноиды в культивируемых генетически трансформированных корнях шлемника байкальского представлены *флавонами*, типичными для корней целого растения – а именно *байкалеином*, *вогонином* и соответствующими им глюкуронидами – *байкалином* и *вогонозидом* [9].

Для совершенствования и оптимизации условий культивирования генетически трансформированных корней шлемника байкальского нами был применен метод так называемых «искусственных семян». Данный способ заключается в инкапсулировании корневых фрагментов в гелевую оболочку с последующим их сохранением при температуре 4°C. В результате такой низкотемпературной иммобилизации корневых фрагментов нами была получена линия изолированно растущих корней шлемника байкальского, в клетках которой в условиях освещения ($20\text{--}35 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{с}$ в области ФАР, фотопериод 18/6 ч (свет/темнота)) наблюдалось формирование хлоропластов. При исследовании поперечных тонких срезов зеленых участков корней с помощью световой микроскопии было обнаружено, что хлоропласты заполняли клетки всех слоев первичной коры корня, кроме внешнего слоя клеток – эпидермы, и в большинстве случаев отсутствовали в клетках центрального цилиндра. Суммарное содержание хлорофилла *a* и *b* в зеленых корнях было почти в 3 раза ниже, чем в листьях целого растения, но в 1,5 раза выше, чем в его стеблях. При этом в зеленых корнях преобладал хлорофилл *b*, по сравнению с надземной частью шлемника байкальского, что может быть следствием различий структурно-функциональной организации фотосинтетических аппаратов у исследуемых объектов.

Для определения влияния факторов культивирования на вариабельность количественного соотношения основных флавонов в линиях корневой культуры шлемника байкальского, полученных из инкапсулированных фрагментов и выращенных в темноте (темновая культура) и на свету (световая культура), был проведен хроматографический анализ состава вторичных соединений в корнях. При этом учитывалась длительность цикла

культивирования исходных культур, экспланты которых использовали при пересадке, продолжительность пассажа и способ выращивания корней – в условиях погруженной и поверхностной культуры (то есть в жидкой и на агаризованной питательных средах соответственно).

В ходе анализа метанольных экстрактов разных вариантов корневых культур шлемника байкальского с помощью ВЭЖХ было установлено, что наиболее продуктивными по синтезу основных флавонов были корни, выращенные в погруженной культуре в темноте. Причем накопление вторичных метаболитов увеличивалось с возрастом культивируемых корней в течение одного пассажа. Так, 6-недельная культура шлемника байкальского содержала в 1,5 раза больше флавонов в пересчете на сухой вес корней, чем 3-недельная, при этом количественное соотношение байкалина, вогонозида и их агликонов оставалось практически одинаковым. В условиях освещения в погруженной культуре корней шлемника байкальского общая концентрация флавонов снижалась, по сравнению с темновой культурой, и изменялось количественное соотношение агликонов и глюкуронидов в корнях.

При поверхностном культивировании корневой культуры шлемника байкальского на агаризованной среде как в условиях освещения, так и в темноте наблюдалось снижение в корнях содержания флавонов в 1,2-1,5 раза, по сравнению с погруженной корневой культурой. Различалось и соотношение основных флавонов в корневых культурах – так, в корнях, выращенных на твердой питательной среде, концентрация агликона вогонина была 1,6 раза выше чем в корнях погруженной культуры шлемника байкальского. При этом содержание его глюкуронида вогонозида оставалось в этих культурах неизменным, а количество байкалина и байкалеина заметно снижалось в поверхностных культурах корней, выращенных как в условиях освещения, так и в темноте.

Следует отметить также, что возраст исходных корневых культур шлемника байкальского, из которых отбирали экспланты для пересадки корней на агаризованную среду, не сильно влиял на общее количество основных флавонов и на их соотношение в корневых культурах в конце пассажа. Однако при культивировании эксплантов, полученных от 2-недельных культур корней в условиях освещения конечная концентрация основных флавонов была несколько выше, чем в корневых культурах, выращенных из эксплантов, полученных от 6-недельных культур. В случае же культивирования корневых культур в темноте наблюдалась обратная ситуация, то есть культивирование эксплантов,

полученных от 6-недельных культур приводило к получению корневой массы с большим содержанием основных флавонов, чем полученных от 2-недельных эксплантов. Кроме того, изменялось и соотношение флавонов при выращивании корневых культур из эксплантов разного возраста. Так, по истечении 3-недельного срока культивирования наблюдалось изменение количественного соотношения байкалина и байкалеина в культурах, выращенных в условиях освещения, при этом уровень вогонозида и вогонина в этих корнях оставался одинаковым. Более значительное проявление различий в соотношениях отдельных флавонов происходило в корневых культурах, выращенных в темноте, а именно – в корнях, выращенных из 6-недельных эксплантов, где наблюдалась самая высокая концентрация вогонина, почти в 2 раза превышающая содержание этого флавоноид в культурах, выращенных из 2-недельных эксплантов.

Таким образом, вариабельность синтеза и накопления флавонов в корневых культурах шлемника байкальского, выращенных в разных условиях, указывают на необходимость подбора условий культивирования при работе с изолированно растущими корнями. Кроме того, сравнительный хроматографический анализ метанольных экстрактов корневых культур шлемника байкальского, выращенных в темноте и в условиях освещения, а также экстрактов стеблей и листьев целого растения наглядно показал, что в изолированно растущих корнях, выращенных в темноте, количественное содержание фенольных соединений было наибольшим. Культивирование корней шлемника байкальского в условиях освещения снижало концентрацию фенольных соединений в них почти на 10%. В ходе хроматографического анализа было установлено также, что в условиях освещения изменялось соотношение основных флавонов – байкалеина, вогонина, байкалина и вогонозида в корневой культуре шлемника байкальского, по сравнению с темновой культурой корней. Также было отмечено, что на фоне небольшого снижения концентрации вогонозида в световой культуре корней шлемника байкальского, по сравнению с темновой культурой, в 7 раз уменьшалось содержание его агликона вогонина. Количественное содержание флавонов в фотосинтезирующих надземных органах интактных растений шлемника байкальского основных флавонов было в 5-9 раз меньше, чем их содержание в корнях, выращенных в условиях освещения, и они были представлены только глюкуронидами – байкалином и вогонозидом. Таким образом, полученные данные доказали стабильность

корнеспецифического образования флавонов шлемника байкальского и независимость их биосинтеза от присутствия в клетках хлоропластов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запрометов М.Н., Колонкова С.В. О биосинтезе фенольных соединений в хлоропластах. // ДАН СССР. 1967. Т. 176. № 2. С. 470-473.
 2. Загоскина Н.В., Дубравина Г.А., Запрометов М.Н. Особенности формирования хлоропластов и накопление фенольных соединений в фотомиксотрофных культурах чайного растения. // Физиология растений. 2000. 47, 537-543.
 3. Запрометов М. Н., Николаева Т. Н. Способность изолированных хлоропластов из листьев фасоли осуществлять биосинтез фенольных соединений // Физиология растений. 2003. Т. 50. №5. С. 699-702.
 4. Flores H.E., Dai Y., Cuello J.L., Maldonado-Mendoza I.E., Loyola-Vargas V.M. Green Roots: Photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ. // Plant Physiol. 1993. V. 101. P. 363-371.
 5. Bhadra R., Morgan J.A. Shanks J.V. Transient studies of light-adapted cultures of hairy roots of *Catharanthus roseus*: Growth and indole alkaloid accumulation. // Biotechnology and Bioengineering. 1998. V. 60. № 6. P. 670-678.
 6. Jacob A., Malpathak N. Green hairy root cultures of *Solanum khasianum* Clarke – a new route to in vitro solasodine production // Current science. 2004. V. 87. № 10. P. 1442-1447.
 7. Joshee N., Patrick T.S., Mentreddy R.S., Yadav A.K. Scullcap: Potential Medicinal Crop. In: Trends in New Crops and New Uses // Eds. Janick J. and Whipkey A. Alexandria: ASHS Press. 2002. P. 580-586.
 8. Cole J.B., Saxena P.K., Murch S.J. () Medicinal biotechnology in the genus *Scutellaria*. // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2007. V. 43. P. 318-327
 9. Кузовкина И.Н. Гусева А.В., Альтерман И.Е., Карначук Р.А. Образование флавоноидов в трансформированных корнях *Scutellaria baicalensis* и пути их регуляции // Физиология растений. 2001. Т. 48. С. 523-528.
-

**ОБ ОБРАЗОВАНИИ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В
РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ
ГЕНОМ $\Delta 12$ -АЦИЛ-ЛИПИДНОЙ ДЕСАТУРАЗЫ
ЦИАНОБАКТЕРИИ *SYNECHOCYSTIS SP.***

**Прядехина Е.В., Лапшин П.В., Юрьева Н.О., Алявина А.К.,
Загоскина Н.В.**

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва,
Россия, e-mail: phenolic@ippras.ru

Одной из важнейших сельскохозяйственных культур, используемых человеком в пищу, является картофель. Более 50% его мирового производства идет для питания человека, 30% - на корм животным, 3-4% - для получения крахмала и спирта и около 10% - на посадочный материал [1]. Однако свыше 20-25% общего валового сбора урожая картофеля ежегодно теряется как от различных болезней, так и от других стрессовых воздействий [2].

В последние годы для повышения продуктивности и устойчивости картофеля используют новые биотехнологии, к числу которых относится и метод генетической трансформации. Введение «нужных» генов с помощью *A. tumefaciens* уже позволило получить растения с повышенной пищевой ценностью, устойчивостью к абиотическим стрессам (холоду, засолению, действию гербицидов) [3].

Одним из стрессовых факторов, наносящих большой урон сельскохозяйственным растениям, является низкая температура. Для предотвращения ее негативного воздействия можно использовать введение в геном клеток десатураз - ферментов, отвечающих за образование двойных связей в цепях жирных кислот (ЖК) [4]. Они изменяют состояние мембран, увеличивая количество ненасыщенных ЖК в составе липидов. В последние годы уже были получены растения, трансформированные геном $\Delta 12$ -десатуразы (*des A*) из цианобактерии *Synechocystis*. Было показано, что введение гена *desA* в растения картофеля способствовало повышению содержания ненасыщенных ЖК в листьях [5]. При этом в тканях трансформантов существенно изменилось содержание линолевой ($\Delta 9,12$ - 18:2) и линоленовой ($\Delta 9,12,15$ - 18:3) кислот. В большинстве линий содержание 18:2 увеличивалось от 35 до 72% от общего количества ЖК.

Важным моментом является не только изучение изменений в

составе ЖК мембран растительных клеток, но и других физиолого-биохимических характеристик трансгенных культур. К их числу можно отнести и изучение образования фенольных соединений – одних из наиболее распространенных вторичных метаболитов растительных клеток [6].

В связи с этим целью нашего исследования являлось изучение трансгенных растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.; раннеспелый сорт Скороплодный) со средним и высоким уровнем экспрессии гена *desA* из термофильной цианобактерии *Synechocystis* sp.

Объект и методы исследования

Трансгенные растения были получены в Институте общей генетики РАН и любезно предоставлены проф. И. Голденковой-Павловой. Они культивировались в коллекции Института физиологии растений РАН при 22°C и 16-часовом фотопериоде на агаризованной питательной среде Мурасиге-Скуга, содержащей 2% сахарозы [7]. Последовательность генов десатураз была трансляционно слита с последовательностью репортерного гена *LicBM3*, кодирующего термостабильную лихеназу. Экспрессия данных генов была подтверждена с помощью метода ПЦР и определения активности репортерного белка лихеназы.

Для извлечения фенольных соединений листья, срезанные со срединной части растений, экстрагировали 96%-ным этанолом. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание суммы растворимых фенольных соединений с реактивом Фолина–Дениса (поглощение при 725 нм) [8] и содержание флавонолов по реакции с 1%-ным водным раствором хлористого алюминия (поглощение при 415 нм) [9]. Калибровочные кривые в обоих случаях строили по рутину.

Исследования проводили в двух биологических повторностях. Для математической обработки результатов использовали программу Excel. В таблице и на рисунке представлены средние арифметические значения определения и их стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение содержания фенольных соединений и флавоноидов в листьях 60-дневных растений картофеля контрольной и трансформированных линий выявило различия между ними (рис. 1).

При этом содержание фенольных соединений в контрольной линии было значительно меньше, чем в линиях с различным уровнем экспрессии гена *desA*. Наибольшее их накопление

характерно для линии со средним уровнем экспрессии (почти в 3 раза выше, чем в контроле). Исходя из этого можно заключить, что введение гена *desA* в растения картофеля сопровождается активацией биосинтеза фенольных соединений.

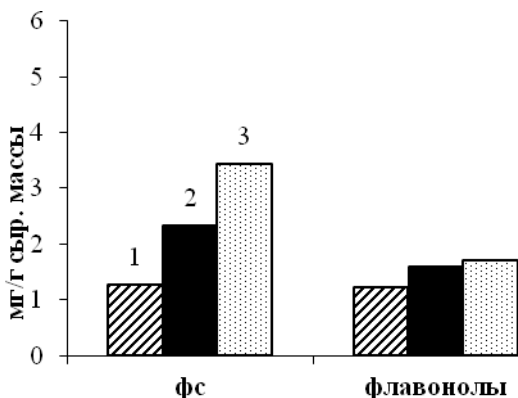


Рис. 1. Содержание фенольных соединений (ФС) и флавонолов в листьях контрольных и трансформированных геном *desA* растений картофеля (возраст – 60 дней).

Варианты: 1 – контрольные растения; 2 - трансгенные растения с высоким уровнем экспрессии гена, 3 - трансгенные растения со средним уровнем экспрессии гена.

В определенной степени аналогичная тенденция характерна и для накопления флавонолов – одних из наиболее распространенных фенольных соединений зеленых тканей растений [6]. Однако в этом случае различия между всеми вариантами незначительны. Следовательно, введение гена *desA* не затрагивает пути образования флавоноидов.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что введение гена *desA* в культивируемые в условиях *in vitro* растения картофеля влияет на их способность к накоплению фенольных соединений, вероятно, преимущественно нефлавоноидных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутов А.В. Все о картофеле. Елец: ЕГУ им. И.А. Бунина. 2008. 426 с.
2. Симаков Е.А., Анисимов Б.В., Складова Н.П., Яшина И.М., Еланский С.Н. Сорта картофеля возделываемые в России. М.: НП «Русский университет современного дополнительного образования молодежи». 2005. 112 с.
3. Лутова Л.А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды

-
- // Соровский образовательный журнал. 2000. Т.6. С.10-17
4. Лось Д.А. Молекулярные механизмы холодоустойчивости растений. *Вестн. РАН*. . 2005 Т. 75. С. 338-345.
 5. Демин И.Н. Участие 12-ацил-липидной десатуразы в формировании устойчивости растений картофеля к гипотермии: Автореф. дисс.... канд. биол. наук. М.:Ифр РАН. 2010. 25 с.
 6. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.; Наука. 1993. 272 с.
 7. Демин И.Н., Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Трунова Т.И. Введение гена des A 12-ацил-липидной десатуразы цианобактерии повышает устойчивость растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному гипотермией // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 710-720.
 8. *Запрометов М.Н.* Фенольные соединения и методы их определения // Биохимические методы в физиологии растений/ Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука. 1971. С. 185-197.
 9. *Gage T. B., Wendei S. H.* Quantitative determination of certain flavonol-3-glycosides // *Analitical chemistry*. 1950. V.22. P.708-711.
-

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ И ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ НА РОСТОВЫЕ РЕАКЦИИ *SOLANUM TUBEROSUM*

Пузина Т.И., Ланцев В.Л., Макеева И.Ю., Помазенкова С.С.

ФБГОУ ВПО "Орловский государственный университет", Орел, Россия, тел (4862)777818 (раб.), e-mail: TIPuzina@gmail.com

Большинство исследователей относят фенольные соединения к эндогенным регуляторам роста негормональной природы. Что касается салициловой кислоты, то в последнее время, появляется много данных, указывающих на её фитогормональное действие. Имеются сведения, что гидроксикоричные кислоты, из группы фенилпропаноидов, участвуют в регуляции активности ферментов ауксинового обмена. В этой связи представляло интерес изучить действие салициловой кислоты и гидроксикоричных кислот на ростовые реакции растений картофеля, а также выявить их влияние на качество дыхания и активность ауксинов.

Исследования проводили на растениях картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Удача, которые выращивали в почвенной культуре в условиях вегетационного домика и в полевом

севообороте на агробиостанции Орловского госуниверситета. Часть исследований проводили в лабораторных условиях на побегах возобновления картофеля, полученных при проращивании клубней во влажных опилках.

Варианты опыта включали: опрыскивание 0,1 мМ раствором салициловой кислоты; 0,01 мМ раствором цитохалазина Б - специфическим ингибитором полимеризации актиновых микрофиламентов; 0,1 мМ раствором салициловой кислоты совместно с 0,01мМ раствором цитохалазина Б; в варианте с гидроксикоричными кислотами обработку растений проводили препаратом "Циркон" в концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ г действующего вещества на литр; контрольные растения опрыскивали водой.

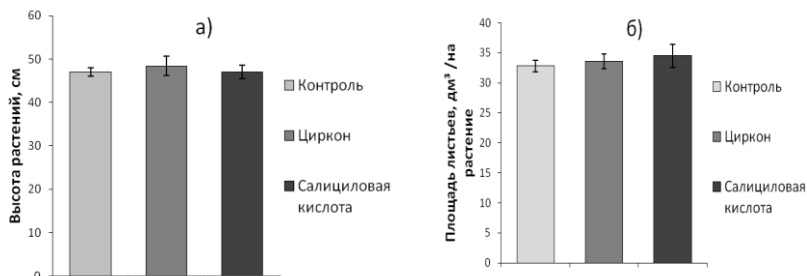


Рис. 1. Влияние салициловой и гидроксикоричных кислот на высоту растений (а) и площадь листьев (б).

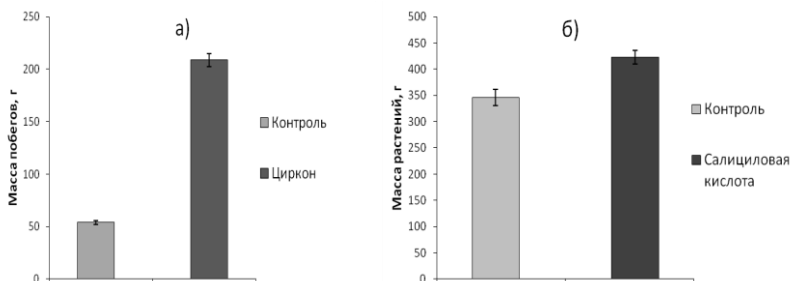


Рис. 2. Влияние гидроксикоричных кислот на массу растений в почвенной культуре (а) и салициловой кислоты на массу растений в полевом севообороте (б) салициловой кислотой (рис. 3а).

Массу органов картофеля определяли путем взвешивания на торсионных и технических весах; площадь листьев - весовым методом; объём корней - методом Сабинаина, Колосова; общую и

рабочую адсорбирующую поверхность по адсорбции метиленовой сини. Активность ауксинов в листьях определяли методом биотестирования с использованием в качестве теста coleoptiles пшеницы Московская - 39; интенсивность дыхания - по количеству выделяющегося CO_2 в приборах для наблюдения газообмена при дыхании («Физприбор», Россия) методом титрования. Для изучения дыхания поддержания (R_m) исследуемые растения помещали в темноту на 48 часов. Биологическая повторность опытов - пятикратная.

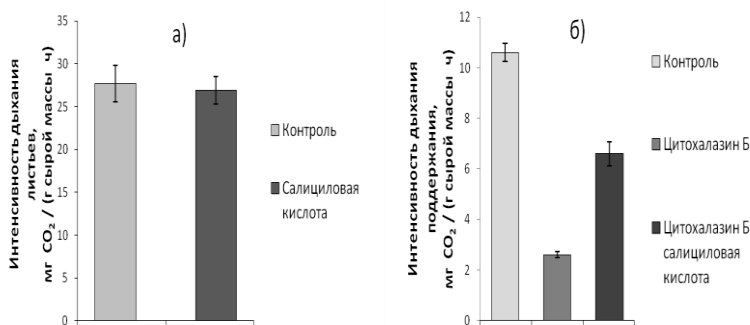


Рис. 3. Влияние салициловой кислоты на интенсивность дыхания (а) и дыхания поддержания (б).

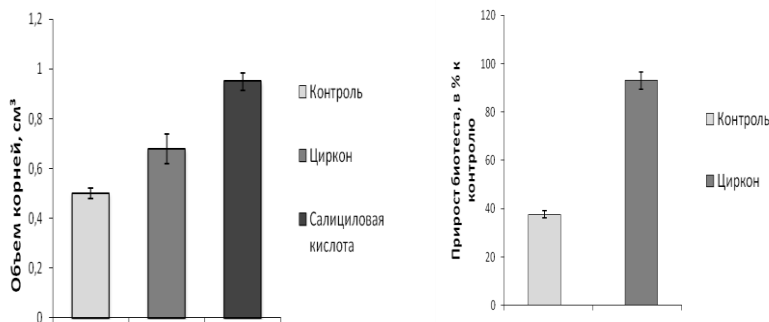


Рис 4. Влияние салициловой и гидроксикирочных кислот на объем корневой системы.

Рис. 5. Влияние гидроксикирочных кислот на активность ауксинов в листьях.

В литературе имеются противоречивые сведения о действии салициловой и гидроксикирочных кислот на ростовые

реакции растений [1 - 3]. В наших опытах обогащение растений *Solanum tuberosum* салициловой кислотой и гидроксикиричными кислотами оказало неоднозначное влияние на ростовые показатели, а именно не повлияло на высоту растений и не изменило площадь листьев (рис. 1). Вместе с тем, существенно возросла сырая масса побегов при обработке цирконом (рис. 2а). Отмечен также положительный эффект салициловой кислоты на массу целого растения (рис. 2б). Это наблюдалось на фоне одинаковой интенсивности дыхания листьев в контроле и в варианте с салициловой кислотой (рис. 3а). Однако, не исключено, что салициловая кислота изменяет соотношение компонент дыхания: дыхание поддержания и дыхание роста. Данные рис. 3б косвенно свидетельствуют об этом. Так, в условиях дезинтегрированного актинового цитоскелета, салициловая кислота повышала дыхание поддержания, значительно снизившееся под действием цитохалазина Б.

Салициловая кислота в большей степени по сравнению с гидроксикиричными кислотами повлияла на рост корневой системы (рис. 4). Так, объем придаточных корней побегов возобновления в данном варианте был почти в два раза больше против контроля, тогда как в варианте с цирконом - на 30%.

Таблица 1.
Влияние гидроксикиричных кислот на адсорбирующую поверхность корней

Вариант	Адсорбирующая поверхность корней, см ²	
	общая	рабочая
Контроль	108,2 ± 5,0	54,3 ± 0,6
Циркон	137,5 ± 4,2	67,5 ± 2,1

Важно отметить, что гидроксикиричные кислоты увеличивали рабочую адсорбирующую поверхность корней более чем на 20% (табл. 1). Возможно, что стимуляция роста корней под действием гидроксикиричных кислот связана с содержанием в растении ауксинов. Данные рис. 5 свидетельствуют о значительном возрастании активности данной группы фитогормонов в листьях растений, обработанных цирконом.

Таким образом, при обработке растений *Solanum tuberosum* салициловой и гидроксикиричными кислотами обнаружено отсутствие реакции высоты растения и площади листьев против контроля. Одновременно выявлено увеличение массы надземных органов и объема корневой системы, что может быть связано с

изменениями в ауксиновой активности и соотношении дыхания поддержания и дыхания роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мишина О.С., Белопухов С.Л., Прусакова Л.Д. Физиологические основы применения регуляторов роста Циркона и Карвитола для увеличения продуктивности гречихи // Агрохимия. 2010. №1. С. 52 - 78.
2. Молодченкова О.О. Предполагаемые эффекты салициловой кислоты в растениях // Физиология и биохимии культ. растений. 2001. Т. 33. №6. С. 463 - 473.
3. Серегина И.И. Влияние циркона на продуктивность пшеницы // Агрохимический вестник. 2007. №3. С. 18 - 19.

УДК 581

ВЛИЯНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ UV-B ОБЛУЧЕНИЯ И ЗАСОЛЕНИЯ НА ДИНАМИКУ СОДЕРЖАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В РАСТЕНИЯХ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП

Радюкина Н.Л.¹, Тоайма В.¹, Зарипова Н.Р.¹, Кузнецов Вл.В.²

¹Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Россия, Москва,
тел.: 499-9779400, natrad@yandex.ru

²Российский университет дружбы народов, Россия, Москва

В настоящее время установлено, что одним из общих стрессорных ответов растений на действие повреждающих абиотических факторов различной природы является усиление генерации активных форм кислорода и развитие окислительного стресса. Это связано, в первую очередь, с ингибированием скорости транспорта электронов не только в результате повреждения структуры и биологических функций мембран, прежде всего, хлоропластов и митохондрий, но и вследствие недостаточного пула восстановительных эквивалентов (Cheesman, 2007).

Одним из защитных механизмов при окислительном стрессе является стресс-зависимое накопление в растениях низкомолекулярных органических антиоксидантов. К подобным метаболитам относятся пролин, полиамины, а также вещества фенольной природы, такие как антоцианы, флавоноиды, растворимые фенолы и другие (Радюкина и др., 2009, 2010;

Бахтенко и Курапов, 2008). Индукция различных антиоксидантных защитных реакций в растениях при действии стрессоров различной природы считается одним из общих ответов. Функционирование антиоксидантной системы при кросс-адаптации растений к действию различных абиотических стрессоров, таких как UV-B облучение и засоление, изучено недостаточно. Еще меньше известно о вкладе фенольных соединений в защиту растений от последовательного действия UV-B облучения и засоления. Следует также отметить, что большинство вторичных метаболитов, к которым относятся фенольные соединения и алкалоиды, являются основой биологически-активного действия лекарственных растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований служили три растения: полынь *Artemisia lерcheana* Web., базилик камфорный *Ocimum basilicum* L., калинджи (или чернушка посевная) *Nigella sativa* L.. Исследуемые растения различаются по устойчивости к засолению и действию UV-B облучения и представляют хозяйственную ценность. Растения культивировали в водной культуре в камере фитотрона при 12-часовом световом периоде и интенсивность света 100 ± 30 мкмоль/м² сек⁻¹ (Philips F36W/54) Температура воздуха составляла $23 \pm 6^\circ\text{C}$ и $16 \pm 8^\circ\text{C}$ (день/ночь), относительная влажность воздуха – 55/70% (день/ночь). При изучении совместного действия NaCl и UV-B растения подвергали комбинированному действию NaCl и UV-B облучения в различной последовательности: вариант 1 – обработка 100 мМ NaCl; вариант 2 – обработка 100 мМ NaCl и через 24 часа 10 мин UV-B (12,3 Дж/кв.м) облучение; вариант 3 – 10 мин UV-B и через 24 часа добавление 100 мМ NaCl. Листья фиксировали жидким азотом через 4, 24, 48, 60 и 72 часа и хранили при -70°C для анализа. Определение растворимых фенольных соединений проводили по методу Фолина-Дениса (Загоскина и др., 2003). Содержания флавоноидов и антоцианов были определены по методу Mabry (Mabry *et al.*, 1970).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Растения базилика, полыни и чернушки обладали различной устойчивостью к действию UV-B облучения и засоления (Радюкина и др., 2012). Самым устойчивым к действию облучения из исследованных растений оказался базилик, наименее устойчивым полынь, чернушка занимала промежуточное положение. По устойчивости к действию засоления исследованные растения располагались в обратном порядке: полынь–чернушка–базилик. Также выявили, что при последовательном действии облучения и

засоления на исследуемые растения имеет значение порядок приложения этих стрессоров.

Динамика содержания антоцианов в листьях растений, представленная на рисунке 1, сильно различалась. Для базилика накопление антоцианов индуцировалось действием UV-B облучения и ингибировалось последующим засолением (рис.1а). При обратном порядке приложения стрессоров индукция накопления этих метаболитов UV-B на фоне засоления была в два раза ниже, чем в первом варианте. В листьях полыни действие двух факторов на накопление антоцианов имело синергический характер - усиливалось после приложения второго фактора (рис.1б). При этом при действии засоления, а затем UV-B накопление антоцианов проявлялось в меньшей степени, но зато наблюдалось еще одно повышение содержания после 72 ч. В листьях чернушки оба фактора вызывали индукцию накопления антоциана в любом порядке, а кривая изменения содержания имела два максимума (рис.1 в).

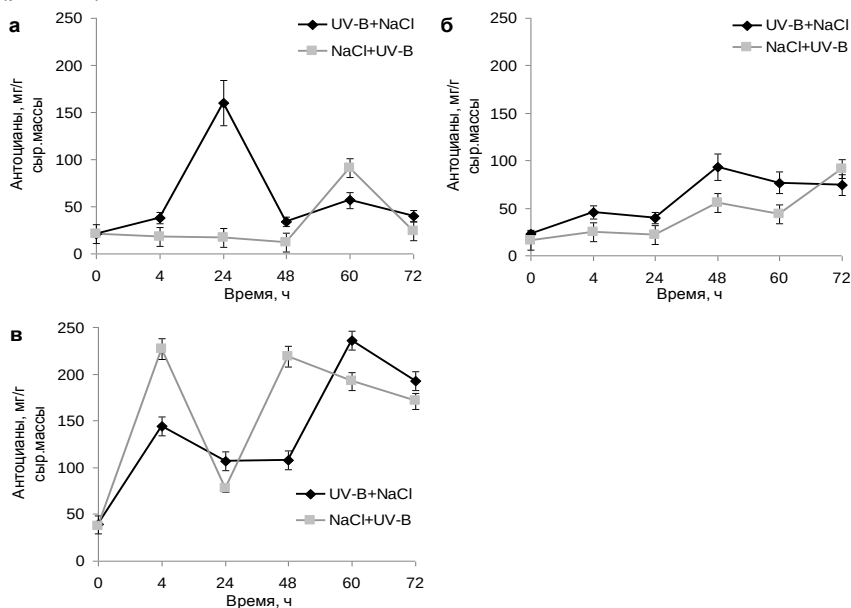


Рис. 1. Динамика содержания антоцианов у растений: а – базилика, б – полыни, в – чернушки.

Изменение содержания флавоноидов в листьях исследованных растений имело похожую тенденцию (рис.2). У

базилика в листьях засоление также тормозило накопление флавоноидов (рис.2а). У полыни в листьях повышение их содержания наблюдалось после действия второго фактора (рис.2б). У чернушки в листьях действие второго фактора вызывало временное снижение содержания флавоноидов, но затем оно снова повышалось (рис.2в). Можно заключить, что антоцианы и флавоноиды являются универсальными антиоксидантами, но их биосинтез может тормозиться засолением. Динамика содержания растворимых (общих) фенолов имела более сложный характер у трех исследованных растений (рис.3). У базилика в листьях повышение их содержания наблюдалось только при действии второго фактора (рис.3 а). В листьях полыни наблюдалось два максимума, совпадающих с действием первого и второго факторов (рис.3б). В листьях чернушки оба последовательно действующих фактора не вызывали заметного накопления растворимых фенолов (рис.3в). Такая динамика содержания растворимых фенолов может объясняться тем, что вклад индивидуальных веществ в этот показатель сильно различается у исследованных растений.

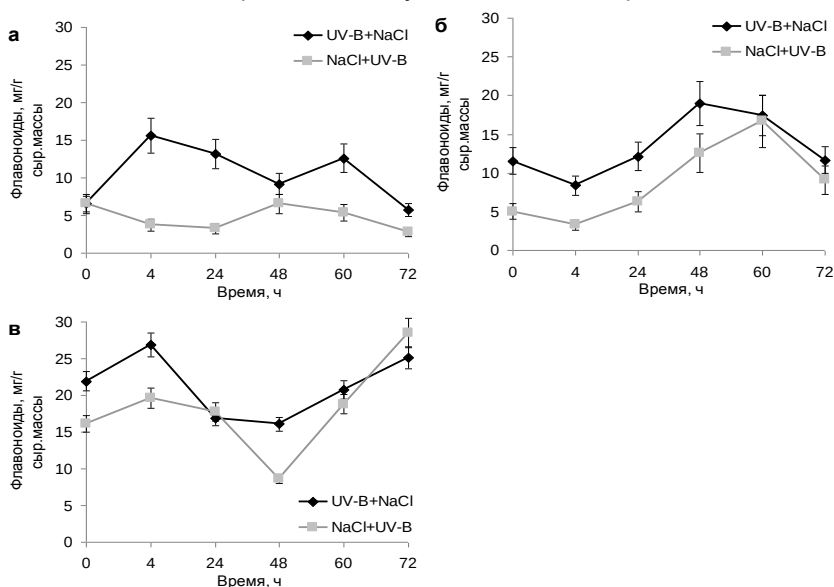


Рис. 2. Динамика содержания флавоноидов у растений: а – базилика, б – полыни, в – чернушки.

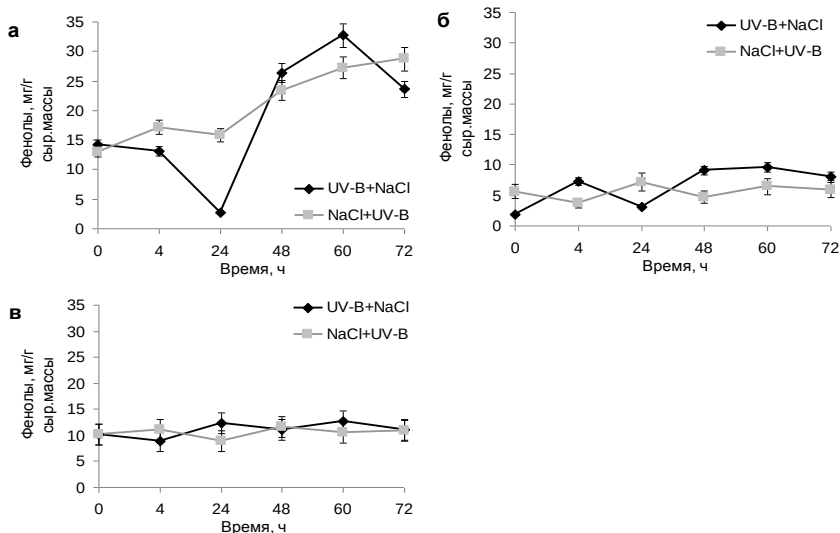


Рис. 3. Динамика содержания общих фенолов у растений: а – базилика, б – полыни, в – чернушки.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что индукция той или иной реакции биосинтеза низкомолекулярных соединений, составляющих антиоксидантную сеть растений, зависит как от вида растения, так и от вида стрессора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cheesman J.M. (2007) Hydrogen Peroxide and Plant Stress: A Challenging Relationship. Plant stress, 1, 1, P.4-15.
2. Радюкина Н.Л., Шашукова А.В., Мапелли С., Шевякова Н.И., Кузнецов Вл.В. (2010) Пролин регулирует уровень полиаминов в растениях шалфея в нормальных условиях и при UV-B облучении. Физиология растений, 57, 449-457
3. Радюкина Н.Л., Мапелли С., Иванов Ю.В., Карташов А.В., Брамбилла И., Кузнецов Вл.В. (2009). Гомеостаз полиаминов и антиоксидантные системы корней и листьев *Plantago major* L. при солевом стрессе. Физиология растений, 56, 359-368.
4. Бахтенко Е. Ю., Курапов П.Б.(2008) Многообразие Вторичных метаболитов высших растений. Вологда: МакросПринт, 266 с.
5. Загоскина Н.В., Дубравина Г. А., Алявина А. К., Гончарук Е. А. (2003) Влияние ультрафиолетовой (УФ-Б) радиации на образование и локализацию фенольных соединений в каллусных культурах чайного растения. Физиология растений, 50, 302-308.
6. Mabry, T. J., Markham, K. R and Thomas, M. B. (1970). The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag Publication, New York , 261-

266.

7. Радюкина Н.Л., Тоайма В, Зарипова Н.Р. (2012). Участие низкомолекулярных антиоксидантов в кросс-адаптации лекарственных растений к последовательному действию UV-B облучения и засоления. Физиология растений, 59, 1-9

УДК 581.1

**СРАВНЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
ПРИ ДЕЙСТВИИ CuSO_4 И НИЗКОЙ ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ
ТЕМПЕРАТУРЫ НА ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ РАПСА СО
ВСТРОЕННЫМ ГЕНОМ ТРАНСФАКТОРНОГО БЕЛКА
*OSMYB4***

Ралдугина Г.Н.¹, Мареай М.М.², Гомаа А.М.², Шумкова Г.А.¹

¹ФГБУН Институт физиологии растений им.К.А. Тимирязева РАН, Москва
8(499) 231 83 02; galina@ippras.ru

²Российский университет дружбы народов, Москва

Растения отвечают на действие стрессоров различной физической природы дифференциальной экспрессией генома и перепрограммированием клеточного метаболизма, что позволяет организму перейти из состояния стресса в адаптивное [1, 2]. В основе стратегии адаптации растений, как к низкотемпературному стрессу, так и к действию тяжелых металлов (ТМ), как правило, лежат несколько общих механизмов: (1) интенсивная аккумуляция совместимых осмолитов для поддержания водного статуса клеток в неблагоприятных условиях (2) активация или формирование антиоксидантных ферментов и (3) накопление органических соединений с антиоксидантными свойствами [1-3].

Это означает, что среди генов, экспрессия которых изменяется в ответ на действие стрессора, имеются те, которые определяют адаптацию организма к действующему стрессу. Интеграция экспрессии этих регулируемых генов, обеспечивающих формирование защитных механизмов и повышение устойчивости, осуществляется с помощью различных компонентов систем трансдукции стрессорного сигнала и регуляторов транскрипции, в качестве которых выступают транскрипционные факторы (ТФ) [4] - белки, контролирующие синтез мРНК. Все известные в настоящее время ТФ объединены в различные семейства в зависимости от последовательности консервативного ДНК-связывающего домена.

Одним из самых распространенных в растениях является MYB-семейство TF - [5], большинство генов которых действуют как активаторы транскрипции. К этому семейству относится и ген *Osmyb4* (Y11414), выделенный из генома растений риса [6]. Роль этого гена в засухоустойчивости и холодовой адаптации была выяснена по его сверхэкспрессии в трансгенных растениях *A. thaliana*, показавших повышенную устойчивость и к засухе и к холоду за счёт различных биохимических изменений, наблюдающихся во время адаптации к неблагоприятным условиям окружающей среды [7, 8], а также в трансгенных растениях ярового рапса (*Brassica napus* L.) к холоду [9]. Мы предположили, что устойчивость трансгенных растений (ТР) с геном *Osmyb4* может обуславливаться вовлечением данного TF в регуляцию биосинтеза фенольных соединений, обладающих антиоксидантными эффектами, за счет чего повышается устойчивость трансгенных растений как к пониженным температурам, так и к действию ТМ. Целью данного исследования было сравнение способности к накоплению различных фенольных соединений при действии этих стрессоров на трансгенные растения рапса, содержащие ген *Osmyb4*.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования были взяты растения ярового рапса (*Brassica napus* L.) сорта Вестар (Westar) канадской селекции. Полученные через культуру тканей ТР, содержащие трансген *Osmyb4*, стоящий под индуцируемым холодом промотором *cor*, и нетрансформированные растения (НТР) размножали черенкованием и высаживали в сосуды со средой Хогланда– Снайдерс. При достижении растениями стадии 5–6 листьев для изучения действия охлаждения их переносили в камеру с температурой 4°C. При изучении действия CuSO_4 растения такого же возраста переносили в сосуды с питательной средой, дополненной сульфатом меди в различной концентрации. Содержание в растениях растворимых фенолов, флавоноидов и антоцианов при действии охлаждения определяли на 5-е сут., а при действии сульфата меди определения проводили на 7-е сут. Для анализов брали 3-й или 4-й лист сверху. Содержание антоцианов определяли по методу Mabry et al. [10], определение содержания растворимых фенольных соединений проводили по методу Фолина–Дениса с некоторыми модификациями [11]. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по методу Heath и Packer [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из трансгенных растений, подвергнутых воздействию пониженной температуры или обработанных сульфатом меди в различных концентрациях, выделяли тотальную РНК и после обратной транскрипции оценивали уровень индивидуальных транскриптов. Было установлено, что при воздействии пониженной температуры трансген *Osmyb4* активно экспрессируется, у контрольных растений экспрессию не наблюдали. При воздействии на растения CuSO_4 в концентрациях: 0, 25, 50, 100, 150 мкМ экспрессию трансгена наблюдали, начиная с концентрации 50 мкМ. При этом с увеличением содержания соли в питательном растворе наблюдали увеличение активности экспрессии. Исходя из этих результатов, дальнейшие опыты по воздействию охлаждения или сульфата меди проводили, воздействуя на растения температурой $+4^\circ\text{C}$ в течение 5 сут. или 100 мкМ CuSO_4 в течение 7 сут.

Известно, что стрессорные факторы оказывают на ткани растений токсическое воздействие, которое можно определить по интенсивности протекания процессов перекисного окисления липидов мембран, обнаруживаемое по уровню малонового диальдегида (МДА), накапливающегося в тканях растений, соответствуя степени повреждающего действия стрессора. При воздействии $+4^\circ\text{C}$ уровень МДА у НТР повышался почти в 2 раза, тогда как у ТР увеличения накопления МДА не наблюдали (таблица 1). Это говорит об отсутствии серьезных повреждений метаболизма у растений рапса при их экспозиции в условиях гипотермии. При действии на растения CuSO_4 накопление МДА было значительно выше, как у ТР, так и у НТР. Из результатов табл. 1, видно, что у НТР накопление МДА составляло почти 900%, тогда как при действии пониженной температуры накопление составило только 200%. Однако и при воздействии CuSO_4 ТР были значительно устойчивее, чем НТР, накапливая МДА в 1,4 раза больше, чем ТР, что свидетельствовало о более сильном токсическом действии сульфата меди, чем охлаждения (табл.1).

Это позволило предположить, что одной из причин повышения устойчивости ТР к действию данных стрессоров может быть усиление биосинтеза фенольных соединений, которым принадлежит важная роль в защитных реакциях растений, т.к. они обладают антиоксидантными свойствами [13].

Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что у НТР содержание флавоноидов и общих фенолов практически не изменялось в процессе адаптации нетрансгенных растений к холоду (4°C), тогда как воздействие CuSO_4 значительно

способствовало аккумуляции этих соединений (почти в 4 раза растворимых фенольных соединений, в 2 раза флавоноидов и в 3 раза антоцианов). ТР показали значительно большее накопление всех фенольных соединений и при воздействии CuSO_4 оно было значительно выше, чем при воздействии пониженной температуры.

Таблица 1.

Содержание мда (мкмоль/г сыр. биомассы) в трансгенных и нетрансформированных растениях рапса при действии сульфата меди или низкой положительной температуры

	+4°C			CuSO_4		
	Без обработки	Обработка	%	Без обработки	Обработка	%
НТР	0,17	0,35	206	0,12	1,07	892
ТР	0,17	0,11	65	0,12	0,76	633

НТР – нетрансформированные растения; ТР – трансгенные растения

% - отношение значения МДА обработанных растений к необработанным (за 100% принимали значение, полученное для необработанных растений)

Таблица 2.

Накопление фенольных соединений (отн.ед. /г сыр. биомассы) в трансгенных и нетрансформированных растениях рапса при действии низких положительных температур или сульфата меди

	+4°C			CuSO_4		
	Без обработки	Обработка	%	Без обработки	Обработка	%
Сумма фенольных соединений						
НТР	7,3	10,1	138	7,2	30,2	422
ТР	7,7	28,7	373	7,1	41,6	585
Флавоноиды						
НТР	5,4	8,4	155	5,1	12,1	239
ТР	5,7	21,2	372	5,2	24,5	471
Антоцианы						
НТР	23,2	32,1	137	15,1	43,5	287
ТР	23,4	125,2	534	14,3	73,3	514

НТР – нетрансформированные растения; ТР – трансгенные растения

% - отношение результата для обработанных растений к необработанным (за 100% принимали значение, полученное для необработанных растений)

Таким образом, было показано, что как в процессе адаптации к низкотемпературному стрессу, так и при воздействии соли ТМ – сульфата меди - растения рапса с гетерологической суперэкспрессией *Osmr4* гена обнаруживали способность к

интенсивной аккумуляции общих фенолов и флавоноидов, а также антоцианов, обладающих мощным антиоксидантным эффектом.

В основе этого явления лежит способность транскрипционного фактора OSMYB4 стимулировать аккумуляцию совместимых осмолитов, прежде всего, пролина, а также антиоксидантных соединений фенольной природы и антоцианов. Это подтверждает идею, согласно которой продукт *Osmyb4* гена играет особую интегрирующую роль в ответе растений на повреждающее воздействие, координируя экспрессию многих генов различных метаболических путей, обеспечивающих формирование стресс-защитных механизмов.

Работа поддержана грантом РФФИ

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецов Вл.В. Физиологические механизмы адаптации и создание стресс-толерантных растений // VII Купревичевские чтения / Под ред. Ламана Н.А. Минск: Технология, 2009. С. 5–78.
2. Cheng S. Effects of Heavy Metals on Plants and Resistance Mechanisms // *Eviron Sci and Pollut. Res.* 2003. V.10. P.256-264.
3. Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. 64-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 2007. 54 с.
4. Latchman D.S. Eukaryotic Transcription Factors. Academic Press. New York. (2007. 488 p.
5. Du H., Zhang L., Tang X.F., Yang W.J., Wu Y.M., Huang Y.B., Tang Y.X. Biochemical and Molecular Characterization of Plant MYB Transcription Factor Family // *Biochemistry (Moscow)*. 2009. V. 74. P. 1–11.
6. Park M./R., Yun K./Y., Mohanty B., Herath V., Xu F., Wijaya E., Balic V.B., Yun S./J., Reyes B.G. Supra_Optimal Expression of the Cold_Regulated OsMyb4 Transcription Factor in Transgenic Rice Changes the Complexity of Transcriptional Network with Major Effects on Stress Tolerance and Panicle Development // *Plant Cell Environ.* 2010. V. 33. P. 2209–2230
7. Vannini C, Locatelli F, Bracale M, Magnani E, Marsoni M, Osnato M, Mattana M, Baldoni E, Coraggio I. Overexpression of the Rice Osmyb4 Gene increases Chilling and freezing Tolerance of Arabidopsis thaliana Plants // *Plant J.* V. 2004. V. 37. P. 115–127.
8. Mattana M, Biazzi E, Consonni R, Locatelli F, Vannini C, Provera S, Coraggio I. Overexpression of Osmyb4 enhances compatible Solute Accumulation and increases Stress Tolerance of Arabidopsis thaliana // *Physiol. Plant.* 2005. V.125. P. 212–223.
9. Гомаа А.М., Ралдугина Г.Н., Бурмистрова Н.А., Радионов Н.В., Кузнецов Вл.В. Стрессорный ответ трансгенных растений рапса с геном Osmyb4 трансфакторного белка риса на действие низкой положительной температуры // *Физиология растений.* 2012. Т. 59. № 1, С.118-128.
10. Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. The Systematic Identification of Flavonoids. New York: Springer Verlag, 1970. P. 261–266.

-
11. Загоскина Н.В., Дубравина Г.А., Алявина А.К., Гончарук Е.А. Влияние ультрафиолетовой (УФ-Б) радиации на образование и локализацию фенольных соединений в каллусных культурах чайного растения // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 302–308.
 12. Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. Kinetics and Stoichiometry of Fatty Acid Peroxidation // Arch. Biochem. Biophys. 1968. V. 125. P. 189-198.
 13. Michalak A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress // Pol. J. Environ. Stud. 2006. V. 15. P. 523–530.
-

УДК 581.1

СУПРЕССИЯ БИОСИНТЕЗА АНТОЦИАНОВ У РАСТЕНИЙ ГОРОШКА ДУШИСТОГО (*LATHYRUS ODORATUS* L.)

Ратькин А.В.

ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Москва, Россия,
тел.8(499)135-43-27, ratkin@vigg.ru

Антоцианы относятся к флавоноидным соединениям, которые выполняют в растениях структурные, защитные, резервные, сигнальные и регуляторные функции [1,2]. В отличие от других подгрупп флавоноидов (дигидрофлавонолов, флавонолов, флавонов, аурионов, халконов и др.) антоцианы определяют оранжевую, алую, розовую, красную, голубую, пурпурную и фиолетовую окраску цветков и вегетативных органов. Эта особенность антоцианов позволяет использовать их как удобную модельную систему для изучения регуляции экспрессии генов у растений, поскольку эффекты мутаций можно исследовать на визуальном, биохимическом, а в последние годы и на молекулярно-генетическом уровнях. Ранее были идентифицированы три класса генов *W*, *U* и *Y* которые в гомозиготном рецессивном состоянии блокируют биосинтез антоцианов и определяют белую, кремовую и желтую окраску лепестков соответственно. Такие гены были обнаружены у более, чем 60 видов растений, однако биохимический состав пигментов у большинства этих растений не изучался, что не позволяло установить этапы биосинтеза, на которых действуют мутантные гены [3].

У некоторых видов растений обнаружены доминантные гены, подавляющие синтез антоцианов. Была установлена специфичность их действия у разных видов растений. Так, у

недотроги гены O и W блокируют в лепестках синтез антоциана дельфинидина, но не подавляют образование антоцианов цианидина и пеонидина [4]. У растений петунии ген-супрессор *ln1* блокирует в цветках синтез только цианидина [5]. Доминантный ген D разрушает пеларгонидин у растений сенполии [6].

К настоящему времени установлена первичная структура пяти основных генов, кодирующих конечные стадии биосинтеза этих пигментов[7]. Показано, что инсерционные мутации в этих структурных генах приводят к блокированию синтеза антоцианов и формированию у мутантных растений белой окраски лепестков. Обнаружено, что белоцветковые формы могут возникать и в результате мутаций в регуляторных генах, контролирующих экспрессию структурных антоциановых генов [7,8] . Исследование таких мутаций у растений ипомеи, петунии и арабидопсиса показало ,что они влияют и на развитие некоторых морфологических признаков [9].

В то же время, механизмы действия генов супрессоров и их взаимодействие с генами, кодирующими биосинтез разных типов антоцианов остаются мало изученными. Ранее нами было показано, что у горошка душистого биосинтез разных типов антоцианов в цветках контролируется не менее, чем шестью генами [10].

Цель данной работы заключалась в поиске и идентификации новых генов супрессоров, регулирующих биосинтез антоцианов у горошка душистого.

Для обнаружения генов, блокирующих биосинтез антоцианов, первоначальный отбор исходных растений из 71 сортовой популяции проводили по двум критериям – окраска пазух листа и окраска лепестков цветка. У растений горошка душистого, произрастающих в природных популяциях (линия ОБ-2), пазухи листа и лепестки цветков имеют антоциановую пигментацию. Это означает, что гены, кодирующие биосинтез пигментов , находятся в функционально активном состоянии. Для исследования были отобраны 13 линий горошка душистого. Растения выращивали в теплице и вегетационном домике. Гибриды получали по методике, принятой для бобовых культур .Всего было изучено 19 гибридных комбинаций. Во время цветения проводили описание изучаемых признаков и фиксацию лепестков для изучения состава флавоноидных пигментов. Идентификацию антоцианидинов и агликонов флавонолов проводили с использованием методов хроматографии на бумаге, тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии по описанным ранее методикам [11].

Результаты проведенного исследования представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика линий горошка душистого по окраске пазух листа, лепестков и составу флавоноидных пигментов.

Линия	Окраска лепестка	Антоцианидины						Флавонолы		
		Пл	Ц	Пн	Д	Пт	Мв	К	Кв	М
Антоциановая окраска пазух листа										
ОБ-2	Пурпурная	-	-	-	+	+	+	+	+	-
СБ-2	Кремовая	-	-	-	-	-	-	+	+	-
К-1	Белая	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Л-2	Розовая	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Зеленая окраска пазух листа										
С-1	Кремовая	-	-	-	-	-	-	+	-	-
УД-2	Кремовая	-	-	-	-	-	-	+	+	-
КГ-2	Кремовая	-	-	-	-	-	-	+	+	-
СТ-1	Оранжевая	+	-	-	-	-	-	+	-	-
В-1	Ало-красн.	+	-	-	-	-	-	+	-	-
55	Темно-красн	-	+	+	-	-	-	+	+	-
Ф-3	Сиреневая	-	-	-	+	+	+	+	+	+
КМ-3	Пурпурная	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ЭБ-3	Темно-фиол.	-	-	-	+	+	+	+	+	+

Все изученные линии подразделяются на две группы: 1- с антоциановой окраской пазух листа и 2 - с зеленой окраской пазух листа (антоцианы не синтезируются). Окраска лепестков цветка у линий с антоциановой пигментацией пазух листа изменяется от кремовой и белой к розовой и пурпурной. В этом случае , растения различаются и по составу антоцианидинов и флавонолов. У кремово - и белоцветковых растений антоцианидины не обнаружены, но синтезируются флавонолы кемпферол и кверцетин. Эти данные указывают на то, что образование этих классов пигментов контролируется разными генами. У растений с зеленой окраской пазух листа в лепестках разных линий обнаружены не только антоцианидины цианидин и пеонидин (темно-красные цветки),и дельфинидин,петунидин,мальвидин (сиреневая, пурпурная, темно-фиолетовая окраска цветков), но и растения , синтезирующие пеларгонидин (оранжевая и ало-красная окраска лепестков). Как следует из табл. 1 эти линии различаются и по составу флавонолов, при этом у растений с кремовой окраской цветков антоцианидины не синтезируются.

Таким образом, выделены мутантные линии у которых биосинтез антоцианов блокирован как в пазухах листа, так и в лепестках цветков. Показано, что образование разных

антоцианидинов в лепестках осуществляется независимо от антоциановой пигментации пазух листа.

Для обнаружения и идентификации генов, контролирующих образование антоцианов в пазухах листьев скрещивали между собой растения, различающиеся по окраске пазух листа. Всего было изучено 11 гибридных комбинаций. В табл. 2 приведены результаты по двум комбинациям.

Таблица 2.

Идентификация гена, блокирующего биосинтез антоцианов в пазухах листа

Скрещивание	Окраска пазух в F1	Окраска пазух листа в F2		Теоретич. ожид. соотн	X ²	P
		антоциан	Зеленая			
ОБ-2х СТ-1	Антоциан	93	35	3 : 1	0,37	0,50-0,80
К-1 х КГ-2	Зеленая	59	158	1 : 3	0,68	0,20-0,50

В комбинации скрещивания К-1 х КГ-2, в отличие от большинства изученных гибридных комбинаций в которых доминировала антоциановая окраска пазух листа (см. ОБ-2хСТ-1), обнаружено доминирование зеленой окраски пазух листа по отношению к антоциановой окраске (у гибридов первого поколения антоцианы не синтезировались). Во втором поколении гибриды расщепились на 1 часть растений с антоциановой окраской и 3 части с зеленой окраской. Эти данные позволяют идентифицировать новый ген , подавляющий биосинтез антоцианов в пазухах листа. Этот ген обозначен нами символом Sp . Для установления генов, блокирующих биосинтез антоцианов в лепестках , были получены гибриды от скрещивания между собой линий, не синтезирующих в лепестках антоцианы , а также от скрещивания бело- и кремовоцветковых растений с линиями, накапливающими в лепестках разные типы антоцианидинов : пеларгонидин, цианидин и пеонидин, и дельфинидин, петунидин, мальвидин. Результаты представлены в табл. 3. Как видно из таблицы 3, в скрещиваниях С-1 х СБ-2, К-1 х СБ-2 и К-1 х КГ-2 у гибридных растений в F1 антоцианы в лепестках не обнаружены. В то же время, в F₂ наряду с белоцветковыми растениями был обнаружен класс растений, синтезирующих в лепестках антоцианы цианидин и пеонидин . Появление таких растений означает, что гены, кодирующие биосинтез антоцианов , находятся у исходных линий и гибридов F₁ в доминантном состоянии, но не проявляют

своей активности вследствие их супрессии. Анализ полученных данных позволяет выявить доминантный ген, подавляющий образование антоцианов в лепестках. Этот ген обозначен нами символом W. Как показывает гибридологический анализ, обнаруженный ген W в доминантном состоянии блокирует в F1 биосинтез моногидроксильированного пеларгонидина (K-1 x B-1) и дигидроксильированного в кольце В цианидина и его метилированного производного пеонидина (K-1 x Л-2). Что касается тригидроксильированного дельфинидина (K-1 x Ф-3) образование которого кодируется геном Е, то ген-супрессор W не препятствует синтезу этого антоциана у растений F1, а в F2 обнаруженное соотношение фенотипических классов указывает на взаимодействие этих генов по типу доминантного эпистаза.

Таблица 3.

Идентификация гена супрессора, подавляющего биосинтез антоцианидинов в лепестках цветков горошка душистого.

Скрещивание	Антоцианы в F1	Антоцианидины в F2				Теорет. ожид. соотн.	X ²	Р
		ДПтМв	ЦПн	Пл	бел			
С-1хСБ-2	-	-	18	-	90	52 : 12	0,30	0,50-0,80
К-1хСБ-2	-	-	22	-	66	52 : 12	0,71	0,20-0,50
К-1хКГ-2	-	-	68	-	161	13 : 3	2,70	0,05-0,20
УД-2хСТ-1	ЦПн	-	98	25	32	9 : 3 : 4	3,14	0,20-0,50
СБ-2хВ-1	ЦПн	-	81	3	24	45 : 3 : 16	1,33	0,50-0,80
К-1хВ-1	-	-	17	7	75	12 : 3 : 1	0,33	0,80-0,95
К-1хЛ-2	-	-	20	-	83	12 : 4	2,34	0,05-0,20
К-1хФ-3	ДПтМв	181	16	-	53	12 : 3 : 1	1,15	0,50-0,80

У всех изученных линий в лепестках обнаружены два класса пигментов – антоцианы и флавонолы. В растениях, у которых блокирован синтез антоцианов, в лепестках обнаружены флавонолы. Это означает, что супрессоры специфичны к одному из изучаемых классов пигментов - антоцианам и функционируют

после образования дигидрокемпферола, который является общим предшественником в биосинтезе и антоцианов, и флавонолов. Результаты гибридологического анализа показывают, что доминантный ген супрессор W, который подавляет образование пеларгонидина, цианидина и пеонидина в лепестках, не блокирует биосинтез антоцианов в пазухах листа. Исходя из этого можно заключить, что гены Sp и W разные и действуют на разных этапах онтогенеза растений горошка душистого. Полученные результаты выявляют и роль рецессивного и доминантного супрессоров в регуляции биосинтеза антоцианов. В первом случае доминантный аллель восстанавливает заблокированный рецессивным супрессором этап биосинтеза антоцианов, что приводит к экспрессии уже в F1 ранее не проявляющихся функционально активных генов (см табл.3 УД-2хСТ-1, СБ-2хВ-1) и формированию разных типов антоциановой окраски лепестков у растений второго поколения (F2). Во втором случае, продукты функционирования доминантного супрессора W подавляют активность доминантных генов, кодирующих разные типы антоцианидинов. Отсутствие экспрессии этих структурных генов и определяет белую и кремовую окраску лепестков у большинства гибридных растений (см.табл.3, К-1хВ-1 и К-1хЛ-2). Проведенные к настоящему времени молекулярно-генетические исследования механизмов доминантной супрессии биосинтеза антоцианов на инсерционных мутантах арабидопсиса [12], петунии [13] и других видов растений показали, что ингибирование может осуществляться репрессорными белками на посттранскрипционном уровне.

ЛИТЕРАТУРА

1. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растений // 56-е Тимирязевское чтение.- М.: Наука. 1996. 45 с.
2. Gould K.S., Lister C. Flavonoid Functions in Plants // Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications/ Eds Andersen Q.M., Markham K.R. Boca Raton – L.- N.Y.: Taylor&Francis, 2006. P. 397-441.
3. Paris C.D., Haney W.J., Wilson G.B. A survey of the interaction of genes for flower colour // Techn. Bull. 1960. V.281. P.1-127.
4. Hess D. Chemogenetische Untersuchungen zur Synthese der Blütenfarbstoffe von *Nemesia strumosa* // Z. Pflanzenphysiol. 1969. Bd. 61. S. 140-150.
5. Gerats A.G.M., Cornellisen R.T.J, Groot S., Hogervorst J.M.W., Schram A.W., Bianchi F. A Gene Controlling Rate of Anthocyanin Synthesis and Mutation Frequency of the Gene An1 in *Petunia hybrida* // Theor. Appl. Genet. 1982. V. 62. P. 199-203.
6. Nowacki E., Nowacka D., Dys B., Hulewicz T. Genetic Control Of Pigmentation in *Saintpaulia ionantha* H. Wendl // Genetica Polonica. 1980. V.

-
21. № 1. P. 83-92.
7. Davies K.M., Schwinn K.E. Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis // *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications* / Eds Andersen Ø.M., Markham K.R. Boca Raton – L.- N.Y.: Taylor & Francis, 2006. P. 143-218.
 8. Albert N.W., Lewis D.H., Zhang H., Schwinn K.E., Jameson P.E., Davies K.M. Members of an R2R3-MYB transcription factors family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning // *The Plant Journal*. 2011. V.65. P. 771-784.
 9. Park K., Ishikawa N., Morita Y., Choi J., Hoshino A., Iida S. A bHLH regulatory gene in the common morning glory, *Ipomoea purpurea*, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and seed trichome formation // *The Plant Journal*. 2007. V. 49. P. 641-654.
 10. Ратькин А.В., Тарасов В.А. Генетический контроль биосинтеза антоцианов в цветках горошка душистого (*Lathyrus odoratus* L.) // *Генетика*. 2010. Т. 46. № 4. С. 488 – 496.
 11. Ратькин А.В., Запрометов М.Н., Андреев В.С., Евдокимова Л.И. Изучение биосинтеза антоцианидинов и флавонолов в цветках душистого горошка (*Lathyrus odoratus* L.) // *Журнал общей биологии*. 1980. Т. XLI. № 5. С. 685-699.
 12. Gonzalez A., Zhao M., Leavitt J.M., Lloyd A.M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/ bHLH / Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedling // *The Plant Journal*. 2008. V. 53. P. 814-827.
 13. Y. Morita, R. Saito, Y. Ban et al. Tandemly arranged chalcone synthase A genes contribute to the spatially regulated expression of siRNA and the natural bicolor floral phenotype in *Petunia* hybrid // *The Plant Journal*. 2012. 70. P.739-749.
-

УЧАСТИЕ ОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ В МОРФОГЕНЕЗЕ КОРНЕВОЙ СИСТЕМЫ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

Салмин С.А.

ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», Орёл, Россия ,
тел. (4862) 777332, e-mail: gio2-74@male.ru

Развитие побеговых систем растений, как известно, подчиняется строгим морфологическим законам. В корневых системах растений наличие подобных закономерностей менее очевидно. Выявить чёткие закономерности строения корневых систем взрослых растений обычно уже не удаётся. Однако,

возможен поиск закономерностей формирования корневых систем при изучении процесса заложения примордиев и ранних стадий развития корней у проростков. В последнее время в практике растениеводства находят применение препараты фенольной природы, осуществляющие контроль над ростом и развитием растений и повышающие устойчивость к неблагоприятным факторам среды [1]. В последнее время их относят к регуляторам роста негормональной природы, так как они действуют в концентрациях, превышающих концентрационный эффект фитогормонов. В большинстве исследований отмечается только ингибиторный эффект фенольных соединений. Между тем отмечается и стимулирующее действие некоторых фенолов на рост и органогенез [2,3]. Было показано, что введение в молекулу фенола второй и третьей оксигруппы придаёт ему свойства синергиста ИУК. Эти вещества являются ингибиторами оксидазы ИУК – фермента, разрушающего ауксины. К ним относятся, прежде всего, оксикоричные кислоты (кофейная, феруловая, синаповая) и их производные. Потому одним из механизмов положительного влияния некоторых фенольных соединений на рост и морфогенез растительного организма является, очевидно, регуляция ауксинового обмена. Вместе с тем, не исключено стимулирующее действие фенольных соединений на рост вне связи с ауксинами.

Целью данной работы было изучение ветвления корня в нормальных условиях и механизмов изменения ветвления при действии препарата «Циркон», изготовленного на основе оксикоричных кислот. Выяснение этих проблем необходимо для выявления основных механизмов эндогенной регуляции ветвления корня и понимания возможных пределов регуляции ветвления корней с помощью регуляторов роста.

Для выяснения роли каких-либо факторов на ветвление корня необходимо разделить в какой мере они непосредственно влияют на формирование корня, а в какой мере посредством воздействия на рост главного корня. Для решения этой проблемы определяют время формирования бокового корня внутри материнского, начиная от первых делений клеток перидермы до выхода бокового корня из материнских тканей [4].

Работу проводили на корнях проростков кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Сахарная. Для экспериментов использовали проростки с длиной главного корня 20-30мм или 100мм. Проростки помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой (контроль), или раствором препарата «Циркон»(ННПП «НЭСТ М», Россия) в дистиллированной воде в

концентрации 25 мкл/л. Чашки выдерживались в тёмном термостате при 27° С. Измеряли линейкой длину корней в течение трёх суток. Длину участков главного корня, несущих боковые корни, измеряли через 48 и 72ч после начала опыта. Подсчитывали число боковых корней в 1-сантиметровых отрезках по длине корня.

Вычисляли время развития боковых корней внутри материнского, начиная от возникновения примордия до его выхода из материнского корня (Тб.к.) [5].

Для характеристики действия ингибиторов на рост главного корня вычисляли степень ингибирования роста (I) в процентах от контроля. Подсчитывали число примордиев боковых корней внутри материнского корня.

Измеряли длину клеток перицикла в первых трёх базальных сантиметрах.

Статистическая обработка результатов проводилась по общепринятой методике (Лакин, 1980) с помощью программ Microsoft Excel 7.0 и CSS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ветвление корней проростков кукурузы типично для корней большинства изученных растений. Примордии закладываются в акропетальной последовательности – от семени к кончику корня, и в такой же последовательности появляются боковые корни. Рост корней в контрольном варианте в течение трёх дней постепенно ускорялся. Первые боковые корни появлялись на 2-е сутки после начала опыта. Чем длиннее был корень, тем длиннее была зона боковых корней. Однако, в 48ч эта зависимость была выражена слабее.

Среднее время формирования бокового корня внутри материнского составило $50,8 \pm 1,4$ ч (рис. 1). Оно практически не зависело от скоростей роста корня в 1-е, 2-е, 3-е сутки. Число боковых корней не зависит от длины корня, но зависит от длины зоны боковых корней. Максимальное число боковых корней формировалось в 1-м см корня, а затем их число снижается. Анатомический анализ показал, что среди боковых корней не было примордиев новых боковых корней.

Измерение размеров клеток перицикла показало, что их длина увеличивается в базальной части корня, значит, что число клеток на один сантиметр уменьшается, при большем числе образующихся боковых корней. Следовательно, большее число клеток участвует в образовании боковых корней.

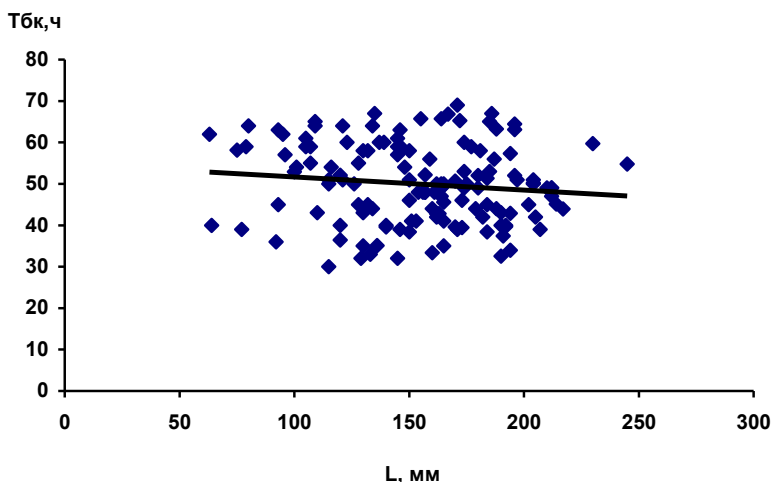


Рис. 1. Продолжительность формирования бокового корня (Тбк) у контрольных корней проростков кукурузы, достигших разной длины (L) через 72ч после начала опыта ($r=-0,252$; $p=0,482$) .

Циркон ингибировал рост главного корня у проростков с исходной длиной главного корня 20-30 мм (рис.3), тогда как у проростков с исходной длиной 100мм такой эффект отсутствует (рис.3).

Циркон в значительной степени подавлял образование боковых корней даже в наиболее старых участках корня. По сравнению с контролем боковых корней образовывалось меньше на 50%. Длина зоны боковых корней сокращалась в соответствии с уменьшением длины главного корня.

Результаты исследования показали, что циркон не оказывает стимулирующего действия на рост главного корня, а только ингибирует его. Циркон также всегда ингибирует образование боковых корней, но на ранних этапах ингибирующее действие проявляется сильнее. Приближение боковых корней к кончику главного корня обусловлено торможением его роста. Циркон не нарушает акропетальной последовательности заложения боковых корней, все примордии развиваются в боковые корни.

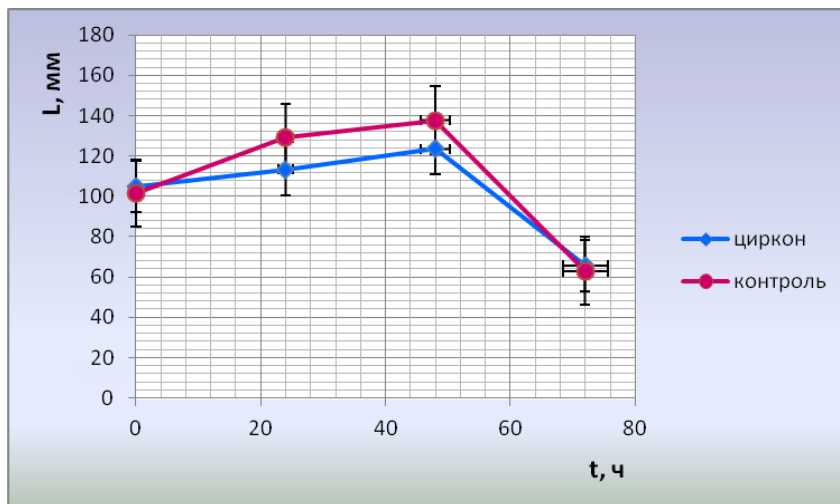


Рис.2. Кривые роста корней проростков кукурузы с исходной длиной 100 мм в течение 72 ч в растворе циркона.

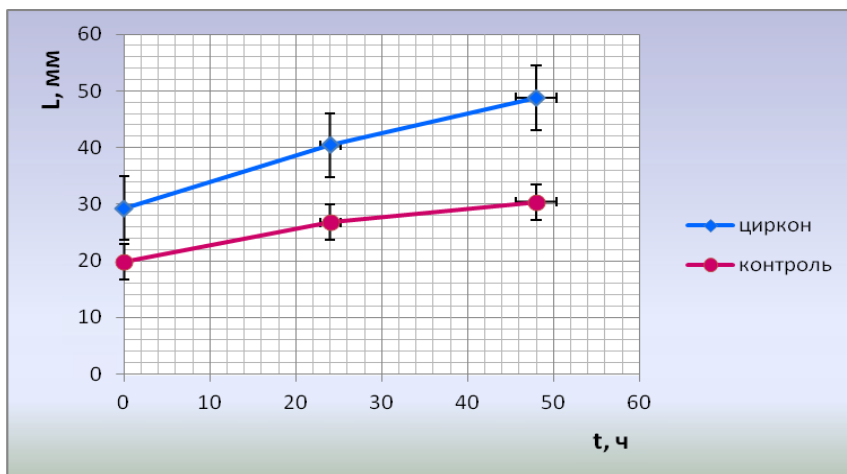


Рис.3. Кривые роста корней проростков кукурузы с исходной длиной 20 мм и 30 мм в течение 48 ч в растворе циркона.

Итак, приведённые данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Циркон ингибирует рост главного корня на ранних стадиях его формирования и не влияет на его поздние стадии.

2. Циркон ингибирует ранние стадии образования боковых корней.

2. Анатомический анализ показал, что все примордии развивались в боковые корни.

3. Обработка корней цирконом не влияет на время формирования боковых корней внутри материнского.

4. Эффект приближения боковых корней к кончику корня объясняется не ослаблением апикального доминирования, а замедлением роста главного корня.

5. Остается не ясным причина устойчивости времени формирования боковых корней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Серёгина И.И. Продуктивность и адаптивная способность сельскохозяйственных культур при использовании микроэлементов и регуляторов роста: Автореф. докт. Дисс. М.:– 2008г.
2. Vendrig J., Buffei K. Growth-stimulating activity of trans- caffeic acid isolated from *Coleus rhenaltianus* // *Nature*. 1961. V.192. № 4799. P.276-277.
3. Hess Ch.E. Phenolic compounds as stimulators of root initiation // *Plant Physiol*. 1965. (Suppl.). XIV. V.40.-P. 14-17.
4. Иванов В.Б. Временные закономерности развития бокового корня как пример использования временной шкалы при анализе изменения метамеров по длине оси // *Морфогенез и ритм развития высших растений*. М.: МГПИ им. Ленина. 1987. С. 19-23.
5. Ivanov V.B. Root growth responses to chemicals // *Sov. Scient. Rev. Ser. D*. 1994/ P. 1-70.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия.-3-е изд.,перераб.- М.: Высш.школа, 1980.-343с.

ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ГЕРАНИ ЛУГОВОЙ (*GERANIUM PRATESE*) НА РОСТ И РАЗВИТИЕ СЕМЯН БИОТЕСТОВ

Сёмин И.А., Снисаренко Т.А.

Московский государственный областной университет, Москва, Россия, тел (905)569 7953, karadji4@mail.ru

Как показывают ранее проведенные исследования, биохимический состав герани луговой (*Geranium pratense*) богат флавоноидами, которые играют важную роль в метаболизме растений [1,2]. Вопрос более детального изучения биохимического состава данного вида из семейства Geraniaceae и его

взаимодействие с другими видами фитоценоза, является в настоящее время актуальным.

Таблица 1.

Влияние экстракта герани луговой (*Geranium pratense*) на прорастание семян огурца.

Вариант опыта	Длина корня, мм										Среднее значение
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Контроль	8	7	17	16	20	3	10	6	14	4	10,5
1:1	48	44	52	49	42	46	47	43	36	41	44,8
1:5	20	33	15	23	12	34	22	50	37	15	26,1
1:15	16	38	19	24	15	14	38	25	40	29	25,8

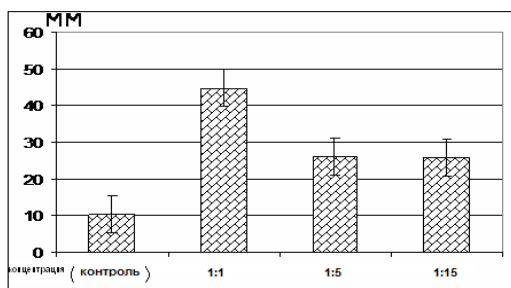


Рис. 1. Средний показатель длины корней проросших семян огурца

Поскольку важным источником физиологически активных веществ, поступающих в почву, являются различные остатки культурных и сорных растений – корневые остатки, солома, ботва [3], нами было проведено исследование, посвященное изучению влияния биологически активных веществ выделяемых геранью луговой (*Geranium pratense*) в почву на фитоценозы, к которым она имеет отношение. Известно, что комплекс фенольных соединений принимает участие в регулировании системы ростовых стимуляторов в процессе онтогенеза[4]. Для этого нами была использована методика «Биотестов на проращивание семян»[5]. Влияние экстракта определялось с помощью измерения длины корней проросших семян огурца в течении семи суток, в растворах разной концентрации. В качестве среды для прорастания семян использовалась водная вытяжка почвы с места обитания герани луговой (*Geranium pratense*). Сбор сырья для приготовления вытяжки проводился на территории Национального парка Лосиный остров в Московской области. Для эксперимента были взяты семена огурца сорта «Брейк F1», в каждой группе было по 10

семян, групп было 4, одна из которых являлась контрольной, семена биотеста находились в дистиллированной воде. Остальные группы, в которых концентрация экстракта была разная: 1:1, 1:5, 1:15, являлись экспериментальными. На седьмой день эксперимента, был произведен замер длины корня проросших семян.

По полученным данным (табл.1, рис. 1), можно судить, что семена прорастают более интенсивно в среде с экспериментальными растворами концентрации 1:1, 1:5, 1:15, нежели в контрольной среде. При концентрации водной вытяжки 1:1 замечено значительное ее влияние на всхожесть семян. Это позволяет сделать вывод, что фенольные соединения, содержащиеся в герани луговой (*Geranium pratense*)[6], оказывают положительный эффект на прорастание семян.

Таблица 2.

Влияние водной вытяжки из листьев и стеблей герани луговой на прорастание семян кукурузы (корни).

	Длина корня, см								
Вариант опыта	1	2	3	4	5	6	7	8	Средние значения
К	11,4	3	7,1	8,4	13,5	10,7	13	1,4	8,5
1:3	6	13	8,3	9,7	11,2	11,5	9,7	5,7	5,5
1:5	4	5	14,7	7,8	10,5	5,6	10	7,6	6,9
1:10	12	4,4	2,7	11,4	3	7,3	3,2	16,2	6,3
1:15	8,2	19,2	18	16	12,8	16	5,5	9,5	10,3

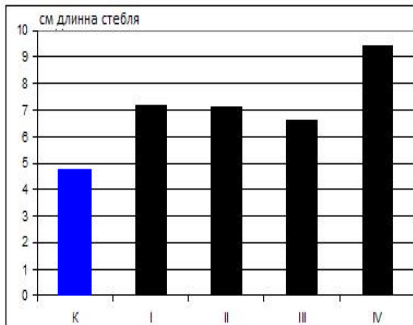
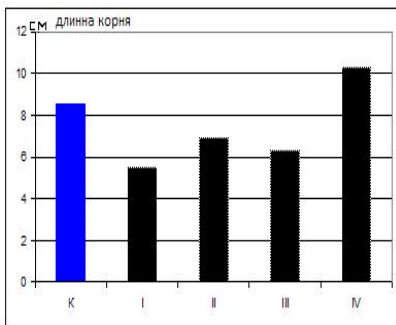
Также нами было проведено исследование, в котором биотестом являлись семена кукурузы. В процессе эксперимента была приготовлена водная вытяжка из листьев и стеблей герани луговой (*Geranium pratense*), в концентрациях 1:3, 1:5, 1:10, 1:15. В качестве контрольной среды использовалась дистиллированная вода. Так как в ходе эксперимента, из 14 семян биотеста помещенных в контрольную среду проросло 8, то и из групп с экспериментальной вытяжкой, для сравнения было взято по 8 наиболее развитых семян. В экспериментальных растворах всхожесть семян была более массовой. В растворе с концентрацией 1:3 проросли все 14 семян, в растворе с концентрацией 1:5 проросло 10 семян, в растворе с концентрацией 1:10 проросло 11 семян, в растворе с концентрацией 1:15 проросло

11 семян. Для оценки степени воздействия экспериментальной вытяжки нами определялись длина корня и стебля проросших семян биотеста (семена кукурузы)[7].

Таблица 3.

Влияние водной вытяжки из листьев и стеблей герани луговой на прорастание семян кукурузы (стебли).

Вариант опыта	Длина стебля, см								
	1	2	3	4	5	6	7	8	Средние значения
К	8,5	6,1	8	7	8,9	9	7,6	4,1	4,7
1:3	7,4	7,2	7,5	8,1	8,7	6,5	6,8	6	7,2
1:5	7,5	7,7	7,6	5,7	6,6	9	5,2	8	7,1
1:10	9,7	3,3	3	10,2	3,4	9,8	4,6	8,9	6,6
1:15	8,1	12,5	10	8,1	11	8	9	8,8	9,4



А Б
Рис. 2.А Средний показатель длины стебля, Б Средний показатель длины проросших семян кукурузы. корней проросших семян кукурузы.
К – контроль; I – концентрация 1:3; II – концентрация 1:5; III – концентрация 1:10; IV – концентрация 1:15

Результаты эксперимента показали, что в растворах с повышенной концентрацией количество проросших семян больше чем в контрольной среде (дистиллированная вода), формирование стебля проходило интенсивнее в экспериментальных растворах, чем в контрольной среде. На корнях семян прорастающих в экспериментальной среде появлялись боковые корни, у семян из

контрольной группы боковые корни не образовывались, можно предположить, что в водной вытяжке из листьев герани луговой присутствуют вещества стимулирующие прорастание и развитие семян относящихся к группе фенольных соединений присутствующих в листьях и стеблях герани луговой (*Geranium pratense*). Известно, что именно они вызывают в растениях различные ростовые и биохимические эффекты.[5,4]

Можно сделать вывод, что из-за присутствующих в биохимическом составе герани луговой (*Geranium pratense*) фенольных соединений, которые обладают стимулирующим действием на ростовые процессы, прорастание семян биотеста в экстрактах из этого растения протекает значительно лучше, чем в контрольной среде.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Akdemir ZS, Tatli II, Saracoğlu I, Ismailoğlu UB, Sahin-Erdemli I, Çalış I. Polyphenolic compounds from *Geranium pratense* and their free radical scavenging activities. *Phytochemistry*. 2001 Jan;56(2):189-93.
2. Оразов О.Э., Никитина В.С. Сельскохозяйственная биология, 2009, № 1, с. 93-98.
3. Кустова О.К. Аллелопатическое влияние послеутробных остатков *Ocimum basilicum*. - Промышленная ботаника. 2007, вып. 7.
4. Гродзинский А. М., Гродзинский Д. М. Краткий справочник по физиологии растений. - Киев: Наукова думка, 1973.
5. Гродзинский А. М. Аллелопатия в жизни растений и их сообществ. – Киев: Наукова думка, 1965.
6. Минаева В.Г. Флавоноиды в онтогенезе растений и их практическое использование. Новосибирск, 1978.
7. Снисаренко Т. А. Адаптационные особенности *Rhododendron caucasicum* Pall. на северном склоне центрального Кавказа в условиях вертикальной зональности. – Севастополь 1999.

ВЛИЯНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ЛИСТЬЯХ ВАЛЕРИАНЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

Тихонова И.Г., Фурса Н.С., Забелина С.К.

Ярославская государственная медицинская академия, Ярославль, Россия,
тел. +79109704859, itihonova17@rambler.ru

Микроэлементы, являющиеся компонентами и активаторами ферментов и играющие огромную роль в различных биосинтезах, оказывают большое влияние на содержание

различных практически важных химических соединений в растениях: алкалоидов, флавоноидов, сердечных гликозидов, эфирных масел, витаминов, дубильных веществ и др. [1–5]. Это создает предпосылку для направленного влияния на биогенез действующих веществ в лекарственных растениях путем использования соответствующих микроудобрений. Надземная часть валерианы лекарственной, содержащая комплекс фенольных соединений, в частности гидроксикоричных кислот и флавоноидов, является весьма ценным потенциальным лекарственным сырьем [6]. Нами предпринята попытка проследить влияние некоторых микроэлементов при внекорневой обработке растений на содержание действующих веществ в листьях валерианы лекарственной.

На учебно-практической базе ЯГМА «Скобыкино» (г. Ярославль) были заложены 20 опытных участков размером 1×2 м, на котором высажены по 10 растений валерианы лекарственной второго года жизни. В первой половине августа 2010 года была произведена внекорневая обработка надземной части данных растений растворами марганца сульфата, цинка сульфата, кобальта нитрата, никеля нитрата и аммония молибдата в концентрациях 0,001%, 0,01%, 0,1% по 25 мл на каждое растение. Растения из контрольной группы обрабатывали соответствующим количеством дистиллированной воды. Сбор листьев для определения содержания суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот производился через три и шесть недель после обработки растений микроэлементами.

Количественное определение суммы флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии по реакции с алюминия хлоридом в уксусно-уротропиновом буфере по методике [7], оптическую плотность определяли на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 412 нм. Предварительно проводили адаптацию использованной методики для нашего сырья. Оптимальными условиями для извлечения суммы флавоноидов явилось трехкратное экстрагирование 70% этиловым спиртом по 30 минут. Для количественного определения суммы гидроксикоричных кислот нами был использован метод прямого спектрофотометрирования спиртового извлечения [8], оптическую плотность измеряли при длине волны 340 нм. Наиболее полное извлечение суммы гидроксикоричных кислот достигалось при трехкратном экстрагировании 70% этиловым спиртом по 30 минут.

Таблица 1.

Содержание суммы флавоноидов в листьях валерианы лекарственной в зависимости от концентрации вносимого микроэлемента. Сбор через три недели.

Концентрация/ микроэлемент	0,1%	0,01%	0,001%	Контроль, %
MnSO ₄	0,6234±0,0011%	0,6885±0,0095%	1,1203±0,0084%	0,5684% ±0,0096%
ZnSO ₄	0,6344±0,0071%	0,8937±0,0025%	0,7171±0,0034%	
Co(NO ₃) ₂	0,4345±0,0051%	0,6470±0,0032%	0,7116±0,0044%	
Ni(NO ₃) ₂	0,5837±0,0067%	0,7041±0,0056%	0,5351±0,0013%	
Mo(NH ₄) ₂	0,5878±0,0034%	0,4355±0,0065%	0,6364±0,0011%	

Таблица 2.

Содержание суммы флавоноидов в листьях валерианы лекарственной в зависимости от концентрации вносимого микроэлемента. Сбор через шесть недель.

Концентрация/ микроэлемент	0,1%	0,01%	0,001%	Контроль, %
MnSO ₄	0,5832±0,0067%	0,6458±0,0099%	0,7545±0,0049%	0,5683% ±0,0038%
ZnSO ₄	0,4853±0,0067%	0,6867±0,0013%	0,4518±0,0021%	
Co(NO ₃) ₂	0,4270±0,0044%	0,4387±0,0042%	0,4685±0,0041%	
Ni(NO ₃) ₂	0,6537±0,0022%	0,5883±0,0055%	0,4785±0,0082%	
Mo(NH ₄) ₂	0,4580±0,0029%	0,4886±0,0061%	0,3871±0,0005%	

Таблица 3.

Содержание суммы гидроксикиричных кислот в листьях валерианы лекарственной в зависимости от концентрации вносимого микроэлемента. Сбор через три недели.

Концентрация/ микроэлемент	0,1%	0,01%	0,001%	Контроль, %
MnSO ₄	3,4534±0,0105%	3,1381±0,0499%	3,1689±0,0291%	3,2826 ±0,0269
ZnSO ₄	2,7567±0,0023%	3,2674±0,0581%	3,0293±0,0354%	
Co(NO ₃) ₂	2,4498±0,0019%	2,9726±0,0108%	2,7182±0,0102%	
Ni(NO ₃) ₂	2,8948±0,0087%	3,5778±0,0951%	3,1608±0,0512%	
Mo(NH ₄) ₂	2,3452±0,0026%	2,0343±0,0173%	2,4593±0,0387%	

Таблица.4.

Содержание суммы гидроксикиричных кислот в листьях валерианы лекарственной в зависимости от концентрации вносимого микроэлемента. Сбор через шесть недель.

Концентрация/ микроэлемент	0,1%	0,01%	0,001%	Контроль, %
MnSO ₄	3,6211±0,0511%	3,2711±0,0609%	2,9713±0,0099%	4,1579 ±0,062
ZnSO ₄	3,6906±0,0433%	2,8703±0,0241%	2,8040±0,0140%	
Co(NO ₃) ₂	3,2722±0,0310%	2,8179±0,0151%	3,3905±0,0056%	
Ni(NO ₃) ₂	3,0600±0,0245%	3,7389±0,0306%	2,4324±0,0045%	
Mo(NH ₄) ₂	3,1356±0,0184%	3,7122±0,0162%	3,1538±0,0029%	

Из данных, приведенных в таблицах 1 и 2 следует, что увеличение содержания суммы флавоноидов наблюдается через три недели после обработки растений растворами марганца сульфата, кобальта нитрата, аммония молибдата в концентрации 0,001% , растворами цинка сульфата и никеля нитрата в концентрации 0,01%. Через шесть недель после опрыскивания микроэлементами увеличение содержания суммы флавоноидов происходило при обработке растений 0,001% раствором марганца сульфата, 0,01% раствором цинка сульфата и 0,1% раствором никеля нитрата. Увеличение содержания суммы флавоноидов после внекорневой обработки растений, вероятно, связано с тем, что данные микроэлементы входят в состав ферментов или являются активаторами ферментов, принимающих участие в биосинтезе флавоноидов. По нашим данным, наибольшее стимулирующее действие на биосинтез флавоноидов оказывают наименьшие концентрации вносимых микроэлементов (0,001% и 0,01%), а более высокие дозы (0,1%) в большинстве случаев угнетают синтез фенольных соединений.

Согласно полученным данным (табл. 3, 4) незначительное увеличение содержания гидроксикоричных кислот наблюдается через три недели после обработки растений растворами марганца сульфата в концентрации 0,1% и никеля нитрата в концентрации 0,01%. Через шесть недель после опрыскивания микроэлементами не наблюдалось увеличения содержания гидроксикоричных кислот. Вероятно, это связано с тем, что гидроксикоричные кислоты являются промежуточным звеном в биосинтезе флавоноидов [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Баяндина И.И. Влияние сернокислого цинка на содержание гиперидинов и флавоноидов зверобоя продырявленного // VII Международный симпозиум по фенольным соединениям: фундаментальные и прикладные аспекты. Материалы докладов. 19-23 октября 2009 г. – М, 2009.- С.30-31.
2. Касьянова А.Ю., Баширова Р.М., Кудашкина Н.В. Влияние внесения сульфата кобальта на содержание кумаринов в *Angelica archangelica* L. // Химия растительного сырья.-2004.-№1-С. 41-45.
3. Битюцкий Н.П. Микроэлементы высших растений.- СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2011.-368 с.
4. Сафронова Г.П. Влияние марганца на образование дубильных веществ и алкалоидов в картофеле: Автореф. Дисс. ... канд. биол. наук. – Свердловск, 1968. -20 с.
5. Гринкевич Н.И., Сорокина А.А. Роль геохимических факторов среды в продуцировании растениями биологически активных веществ //

-
- Биологическая роль микроэлементов,- М.: Наука, 1983г.- 238с.
6. Талашова С. В. Фармакогностическое изучение, стандартизация и комплексная переработка валерианы лекарственной: Дисс. ... канд. фармац. наук. – Ярославль, 1996.-203 с.
 7. Совершенствование анализа и технологии настоев и отваров, содержащих флавоноиды/ О.Г. Аносова, М.В. Колпакова, Н.И. Минникова и др. // Фармация. – 1994. - №1- С. 30-34.
 8. Трубников А.А. Фармакогностическое изучение цикория дикорастущего и культивируемого в Ярославской области: Дисс. ... канд. фармац. наук. – Ярославль, 2000.-193 с.
 9. Биогенез природных соединений /Пер. с англ., под ред. Л.М. Гинодмана.- М.: Мир, 1965.-724 с.
-

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА РЕЗВЕРАТРОЛА ПОСРЕДСТВОМ ЦИТОЗИНОВОГО МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ГЕНОВ *STS* В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ *VITIS AMURENSIS* RUPR.

Тюнин А.П., Киселев К.В.

ФГБУН Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН,
Владивосток, Россия, 8-950-281-0346, tyunin@biosoil.ru

Одним из наиболее изученных и перспективных для фармакологии полифенольных соединений растительного происхождения является *транс*-резвератрол (3,5,4'-тригидроксистильбен). Показано, что резвератрол, обладая мощными антиоксидантными свойствами, препятствует окислительной модификации липидов (Leighton et al., 1999) и останавливает накопление окисленных липопротеинов низкой плотности в стенках сосудов (Fremont, 2000). Наряду с кардиопротекторным действием, резвератрол благотворно влияет на работу нервной системы. Показано, что резвератрол обладает противоопухолевой активностью на стадии возникновения, роста опухоли и образования метастазов (Aziz et al., 2003). Поэтому резвератрол имеет большой потенциал для создания на его основе различных биологически активных добавок к пище, а также лекарственных средств.

Представители семейства *Vitaceae* (Виноградные), и в частности характерный для Приморского края России виноград амурский *Vitis amurensis* Rupr., являются основным источником резвератрола. В клетках растений биосинтез резвератрола идет

фенилпропаноидным путем. Стильбен синтаза или резвератрол синтаза (STS, EC 2.3.1.95) непосредственно конденсирует три молекулы малонил-КоА и молекулу кумарил-КоА с образованием молекулы резвератрола. В геноме множества стильбен-продуцирующих растений стильбен синтазы представлены мультигенными семействами (Kiselev 2011). В геноме *V. amurensis* на данный момент описано наличие 12 экспрессирующихся генов STS. Известно, что использование растительных стресс-гормонов (салициловая кислота), а также предшественников полифенольных соединений (фенилаланин, кумаровая кислота) способно индуцировать биосинтез резвератрола и изменять уровень экспрессии некоторых генов STS в клеточных культурах *V. amurensis*.

Одним из наиболее значимых эпигенетических факторов контролирующей экспрессию генов является цитозиновое метилирование ДНК. В клетках высших растений метилированию подвергаются цитозиновые нуклеотиды в составе ДНК (Law and Jacobsen 2010). Метилирование ДНК регулирует экспрессию генов, взаимодействуя с ферментами, модифицирующими белки хроматина, и малыми интерферирующими РНК. Поддержание физиологического паттерна метилирования необходимо для нормального развития организма. Кроме этого, установлено участие метилирования ДНК в регуляции реакции иммунного ответа растений. В клетках растений метилирование осуществляется энзиматически – ферментами метилазами, в составе сложных ферментативных комплексов. Цитозиновое метилирование ДНК играет главную роль в процессах генного «замолкания», особенно в процессе транскрипционного «замолкания генов». Цитозиновое метилирование в составе промоторной области гена, а также метилирование цитозиновых позиций в составе 5'и 3'областей гена наиболее сильно влияет на экспрессию данного гена у растений (Meuer 2010). К сожалению, на данный момент в литературных источниках нет информации о том, может ли метилирование ДНК регулировать продукцию вторичных метаболитов в клетках растений. Таким образом, задачей нашей работы стало исследование статуса метилирования генов биосинтеза резвератрола в клеточной культуре винограда *V. amurensis* под воздействием салициловой кислоты (СК).

В проведенном исследовании нами было изучено действие СК на экспрессию и уровень цитозинового метилирования трех генов STS: *VaSTS1*, *VaSTS2*, *VaSTS10* в клеточной культуре *V. amurensis* V2. Выбор данных генов STS объясняется следующим

образом: ранее было показано, что ген *VaSTS10* слабо экспрессирующийся в норме, значительно увеличивал свою экспрессию при обработке деметилирующим агентом 5-азацитидином (5A) клеточных культур *V. amurensis* (Kiselev et al. 2011). Содержание резвератрола при этом увеличивалось в 2 раза. Экспрессия гена *VaSTS2* значительно индуцируется действием СК, при этом содержание резвератрола в клетках *V. amurensis* увеличивается в 3 раза в сравнении с необработанными клетками. В отличие от генов *VaSTS2* и *VaSTS10*, ген *VaSTS1* проявляет наивысший уровень экспрессии в норме, при этом его экспрессия достоверно не изменяется под действием 5A или СК в клеточных культурах *V. amurensis*. При обработке СК клеточных культур *V. amurensis* в двух концентрациях (50 и 300 мкМ) экспрессия *VaSTS2* увеличивалась в 5 раз, экспрессия *VaSTS10* усилилась в 3 раза, в то время как экспрессия гена *VaSTS1* значительно не изменялась (Киселев и др., 2010). В ходе исследования, нами была освоена методика бисульфитного секвенирования, позволяющая определить цитозинное метилирование для каждого цитозинового нуклеотида в составе исследуемого гена.

Таким образом, нам удалось показать, что слабо экспрессирующиеся гены *VaSTS2* и *VaSTS10* гиперметилированы по цитозиновым нуклеотидам в составе промоторной области и областей 5' и 3' концов генов при нормальных условиях. Однако, при обработке клеток *V. amurensis* СК уровень цитозинового метилирования в составе промоторных областей, а также областей 5' и 3' концов генов значительно снижается, что сопровождается значительным увеличением транскрипционной активности этих генов и повышением содержания резвератрола в клетках. Ген *VaSTS1* характеризуется достаточно низким уровнем цитозинового метилирования в норме и действие СК его значительно не изменяет, что коррелирует с незначительным изменением экспрессии *VaSTS1* под действием СК в сравнении с нормой. Таким образом, цитозинное метилирование ДНК регулирует продукцию резвератрола через транскрипционную активацию/инактивацию генов *STS* в клеточных культурах *V. amurensis*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киселев К.В., Дубровина А.С., Исаева Г.А., Журавлёв Ю.Н. (2010) Влияние салициловой кислоты на экспрессию генов фенилаланинаммиакилаз и стильбенсинтаз в культуре клеток *Vitis amurensis* Rupr. // Физиология растений 57:441-448
2. Aziz M.H., Kumar R., Ahmad N. (2003) Cancer chemoprevention by resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies and the underlying mechanisms // Int

-
- J Oncol 23:17-28
3. Fremont L. (2000) Biological effects of resveratrol // Life Sci 66:663-673
 4. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. (2007) The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells // J Biotechnol 128:681-692
 5. Kiselev KV (2011) Perspectives for production and application of resveratrol // Appl Microbiol Biotechnol 90:417-425
 6. Kiselev K.V., Tyunin A.P., Manyakhin A.Y., Zhuravlev Y.N. (2011) Resveratrol content and expression Patterns of stilbene synthase genes in *Vitis amurensis* cells treated with 5-Azacytidine // Plant Cell Tissue Organ Cult 105: 65-72
 7. Law J., Jacobsen S. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants (2010) // Nat Rev Genet 11:204-220
 8. Leighton F., Cuevas A., Guasch V., Perez D.D., Strobel P., San Martin A., Urzua U., Diez M.S., Foncea R., Castillo O., Mizon C., Espinoza M.A., Urquiaga I., Rozowski J., Maiz A., Germain A. (1999) Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans // Drug Exp Clin Res 25:133-141
 9. Meyer P. (2010) DNA methylation systems and targets in plants // FEBS Lett 28:32-40
-

УДК 581.1.:632.95.024.13

ПОВЫШЕНИЕ ЭЛИСИТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ХИТОЗАНА САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ В СИСТЕМЕ ТОМАТЫ- ГАЛЛОВАЯ НЕМАТОДА

**Удалова Ж.В.¹, Зиновьева С.В.¹, Герасимова Н.Г.², Байчева О.³,
Дамянова А.³**

¹Центр паразитологии ИПЭЭ РАН,

² Институт биохимии им.А.Н.Баха РАН, Москва, Россия, (495)9545034,
udalova.zh@rambler.ru,

³ Институт ядерных исследований и ядерной энергии БАН, София,
Болгария, andam@inrne.bas.bg

Галловая нематода, широко распространенный патоген, способный паразитировать на значительном круге растений-хозяев, включая основные экономически значимые овощные и декоративные культуры. Она отличается высокой плодовитостью, способностью размножаться партеногенетически и длительное время сохраняться в почве. Галловая нематода лучше своего хозяина приспособлена к неблагоприятным воздействиям. Основным симптомом болезни растений, вызванной этой

нематодой, является образование на корнях галлов, в которых локализуются личинки и самки. Галлы нарушают проводящую функцию корней и препятствуют развитию новых корней, снижая всасывающую поверхность корневой системы, сами нематоды являются причиной вторичных бактериальных и грибных инфекций, что ведет в конечном итоге к преждевременной гибели растений.

Одним из направлений в защите растений от патогенов является индуцирование устойчивости с помощью элиситоров и сигнальных молекул. Индуцирование устойчивости может происходить как локально, например, в месте нанесения элиситора (развивается реакция сверхчувствительности), так и системно, т.е. формируется сигнал, который передаётся в другие части растений, где индуцируются защитные реакции. Характерной особенностью системной индуцированной устойчивости (СИУ) является эффективность против широкого круга патогенов и продолжительность действия. Салициловая кислота (СК), входящая в сигнальную систему растений, относится к индукторам СИУ. В настоящее время имеется много данных, показывающих, что СК играет центральную роль в защите растений от биотрофных патогенов. СК активно задействована в создании иммунного статуса растения. Она выступает в роли медиатора, воспринимающего, умножающего и передающего информацию из клетки, атакуемой патогеном, на ее генетический аппарат, где происходит экспрессия защитных генов. Содержание СК в тканях растений при действии на них патогенов или элиситоров возрастает в десятки раз. Этот процесс называется «салицилатным взрывом». Накопление СК в растительных тканях начинается только в ответ на инфицирование и не связано с поранением.

Элиситор хитозан вызывает в растениях как локальную, так и системную устойчивость. Ранее нами было установлено, что хитозан повышал содержание свободной формы СК, являющейся важным медиатором сигнальных систем в тканях томатов, инфицированных галловой нематодой. Добавление СК к хитозану усиливало его способность стимулировать защиту растений в отношении исследованных патогенов. Сравнительный анализ биологической активности в системе картофель-фитофтора ряда производных хитин-хитозанового олигомера, показал, что наиболее активным был N-(2-гидрокси-3-метоксибензил)-N-пиридоксхитозан, содержащий в своей цепи фрагменты СК. Данное соединение стимулировало раневую репарацию тканей картофеля и повышало устойчивость к фитофторозу (1, 2).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Лабораторные исследования действия низкомолекулярного хитозана (5 кДа), N-2-гидрокси-3-метоксибензил)-N-пиридоксхитозан и СК проводили на патологической системе томаты - галловая нематода (*Meloidogyne incognita*). Соединения хитозана любезно предоставлены сотрудниками Центра «Биоинженерии» РАН Варламовым В.П. и Левовым А.Н. Исследовали устойчивый (F1 Шаганэ) и восприимчивый (F1 Гамаюн) к галловой нематоды гибриды томатов. Обработку проводили замачиванием семян с последующим опрыскиванием вегетирующих растений растворами препаратов. Вегетирующие растения были инвазированы *M. incognita* (3 тыс. личинок/растение). Было заложено два опыта. В первом исследовали действие хитозана, СК и хитозана+СК, во втором – хитозана и модифицированного хитозана (N-(2-гидрокси-3-метоксибензил)-N-пиридоксхитозан). Контроль – вода. В процессе вегетации оценивали рострегулирующую активность соединений. Через 3 нед. после заражения опыт был снят для оценки на пораженность корней, наличие самцов и самок нематод, а также на плодовитость самок. Здоровые растения томата Гамаюн, обработанные модифицированным хитозаном, были исследованы на содержание металлов-микроэлементов (Zn, Mn, Fe, Cu, Mg). Анализ проводили методом атомной абсорбционной спектроскопии. (PERKIN ELMER 3030 – France).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Обработка томатов хитозаном и хитозаном совместно с СК существенно подавляла инвазию восприимчивых растений томатов галловой нематодой и влияла на морфо-физиологическое состояние паразита (табл. 1). Растения, обработанные хитозаном, оказывались более устойчивыми к поражению нематодами и заметно лучше развивались по сравнению с контрольными. Что касается нематод, то было обнаружено достоверное уменьшение размера самок и снижение плодовитости. Обработка растений хитозаном+СК в большей степени снижала поражаемость растений нематодой, плодовитость которой также оказалась самой низкой, число яиц в оотеках было в 1,5 раза меньше по сравнению с контрольным вариантом. Интересно, что СК стимулировала развитие растений, однако количество галлов на корнях и число яиц в оотеках самок было существенно выше контрольного варианта. Исследования, проводимые нами ранее в данной патологической системе по определению оптимальной концентрации СК, не дали однозначных результатов в отношении

повышения устойчивости к нематод. С другой стороны, добавление СК к элиситору хитозану позволило повысить эффективность от обработки по сравнению с одним хитозаном. Полученные данные дали основания предположить, что в случае обработки семян и растений СК совместно с элиситором экспрессия генов, контролирующих устойчивость растений, меняется сильнее.

Таблица 1.

Влияние обработки томатов хитозаном и СК на развитие и зараженность растений и морфо-физиологические и популяционные характеристики галловой нематоды

Вариант обработки	Вес стебля и листьев, г	Длина стебля, см	Балл заражения*	Число галлов/растение	Ср. число яиц/оотека
Контроль (здоровый)	59,3	62,3	-	-	-
Контроль (зараженный)	45,3	58,8	3,0	352	108
СК	141,0	147,0	4,0	413 (117%)	189 (175%)
Хитозан	86,0	124,3	2,0	193 (55%)	99 (91%)
Хитозан +СК	103,3	128,5	1,5	144 (41%)	68 (63%)

* по 5-балльной шкале (Удалова, 1993)

Сравнительные исследования применения хитозана и модифицированного фрагментами СК хитозана показало, что соединения хитозана не угнетали развития растений, а в некоторых вариантах стимулировали их рост. Ростстимулирующая активность зависела от сортовой принадлежности томатов и особенно ярко проявилась на томатах восприимчивого гибрида. Следует отметить, что хитозан в большей степени влиял на рост и развитие растений, чем его модифицированный вариант. Как видно из таблицы 2 зараженные растения, обработанные хитозаном и модифицированным хитозаном, хорошо развивались. На корнях были единичные галлы, тогда как в контроле отмечалось много сингаллов (слившихся галлов), что существенно сказывается на состоянии растений. Средние размеры, образовавшихся на корнях галлов при обработке хитозаном и модифицированным хитозаном в 1,9 и 2,1 раза мельче контрольных. Балл заражения томатов, обработанных модифицированным хитозаном, был значительно

ниже в сравнении с контрольными растениями. Обработка томатов препаратами хитозана значительно отразилась на развитии нематод. Отмечено наличие большого числа неполовозрелых самок, соответственно, их размеры и среднее число яиц в оотеке были существенно ниже контрольных.

Таблица 2.

Влияние обработки томатов хитозаном и модифицированным хитозаном на вес и зараженность растений и морфо-физиологические и популяционные характеристики галловой нематоды.

Вариант	Вес растения, г	Балл заражения	Ср. размер галла, мм ²	Ср. размер самки, мм ²	Ср. число яиц/оотека
Контроль	14,2	3,0	9,913	0,368	237
Хитозан	12,0	2,25	5,114 52%	0,295 80%	162 68%
Модифицированный хитозан	21,2	1,25	4,720 47%	0,315 91%	134,5 47%

Таблица 3.

Влияние модифицированного хитозана на содержание металлов-микроэлементов в тканях томатов

Элемент	Орган растения	Контроль (вода)	Модифицир. хитозан
Zn	Листья	40,4	63,2
	Корни	55,6	164,1
Mn	Листья	56,0	51,4
	Корни	32,6	65,0
Fe	Листья	124,8	143,2
	Корни	103,8	198,6
Cu	Листья	7,8	9,0
	Корни	4,2	6,4

Заражение растений галловой нематодой приводит к нарушению биохимических и физиологических процессов в растениях. Показано, что хитозан способствует нормализации гомеостаза растений нарушенного при различных стрессовых воздействиях. Об изменениях происходящих в растениях при стрессах биотической и абиотической природы можно судить по содержанию в тканях и органах растений микроэлементов, например различных металлов. Обладая высокой биологической активностью, они представлены в растениях в очень низких дозах. Своё влияние на различные биологические процессы они

осуществляют посредством взаимодействия с важнейшими регуляторными веществами: гормонами и витаминами. И их участие в формировании иммунитета значительно.

Как видно из представленной таблицы 3, обработка томатов модифицированным фрагментами СК хитозаном позволяет увеличить содержание исследованных металлов-микроэлементов как в надземных, так и в подземных органах растений, но в корнях увеличение содержания этих элементов при обработке происходит значительно, чем в листьях. Что может быть существенно, поскольку галловые нематоды локализуются в корневой системе.

Очевидно, что обработка растений исследованными препаратами хитозана тормозит развитие нематод. Сравнивая действие хитозана с его производным, можно отметить высокую элиситорную активность совместного внесения хитозана с СК и модифицированного хитозана и по некоторым показателям она была значительно выше одного хитозана. Так один из основных показателей зараженности - степень галлообразования при обработке модифицированным хитозаном составила в среднем около 13%, при обработке хитозаном - 37%, в контроле около 70 %. Это позволяет говорить о том, что модифицирование хитозана СК может усилить защитное действие в отношении галловой нематоды. Предполагается, что в олигомерах СК-модифицированная часть определяет свои сигнальные потоки, отличные от индуцируемых хитозановой частью (3). Было показано, что введение различных фрагментов салициловой кислоты в хитозан неоднозначно влияет на защитные и репарационные свойства растений (2). На основании имеющихся данных можно предположить, что изменение химической, а также пространственной структуры олигомера введением в цепь двух фрагментов 2-гидрокси-3-метоксибензильного и пиридоксалевого, способствует запуску процессов, связанных с экспрессией защитных генов.

Работа поддержана РФФИ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Львова А.Н. Получение низкомолекулярного хитозана и его производных, обладающих защитными и репарационными свойствами. Автореф. Дисс.. Щелково.2010., 26с.
2. Васюкова Н.И., Озерецковская О.Л., Чаленко Г.И., Герасимова Н.Г., Львова А.А., Ильина А.В., Варламов В.П., Тарчевский И.А. Иммуномодулирующая активность производных хитозана с салициловой кислотой и её фрагментами. // Прикладная биохимия и микробиология, 2010, Т. 46, № 3, С. 379-384

-
3. Яковлева В.Г., Тарчевский И.А., Левов А.Н.// Материалы 9 Междунар. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» М.; ВНИРО, 2008. С.261-263
-

УДК 634.1/7.037:632.9

ПРИМЕНЕНИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ОЗДОРОВЛЕНИИ ОТ ВИРУСОВ И МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ САДОВЫХ КУЛЬТУР

Упадышев М.Т.

ГНУ Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства Россельхозакадемии, Москва, Россия, тел. 8 (495) 329-32-33, e-mail: upad8@mail.ru

Среди оксибензойных кислот большое внимание исследователей на протяжении последних десятилетий привлекает салициловая кислота (СК). Салициловая кислота считается одним из эндогенных месейнджеров, активирующих устойчивость растений к патогенам [1]. Механизмы неспецифической устойчивости, индуцированной салициловой кислотой, связаны, как правило, с активацией синтеза PR-белков [2, 3], снижением проводимости плазмодесм и образованием каллозы [4].

Большинство исследований устойчивости растений, обусловленной салициловой кислотой, проведено в отношении вируса табачной мозаики [4-6]. Данных относительно активности салициловой кислоты к вирусам плодовых и ягодных культур недостаточно. Ранее нами продемонстрирована эффективность салициловой кислоты по ингибированию ряда вирусов на некоторых плодовых и ягодных культурах, в том числе на груше и рябине – в отношении иларвирусов, на ежевике и малино-ежевичном гибриде – неповирусов и вируса кустистой карликовости малины [7].

Салициловая кислота способна оказывать влияние и на ростовые процессы у растений. Некоторые исследователи рассматривают её в качестве антагониста ИУК [8]. В наших исследованиях салициловая кислота, внесенная в питательную среду без ИМК, стимулировала ризогенез у побегов ремонтантной малины, малино-ежевичного гибрида и груши, а также улучшала приживаемость микрорастений в нестерильных условиях [9].

Целью настоящей работы явилось изучение действия салициловой кислоты на оздоровление растений яблони, груши и

вишни от вирусов, а также на органогенез и ростовые процессы у микрорастений этих культур.

Эксперименты проводили в 2011-2012 гг. В качестве объектов исследований использовали подвой яблони 62-396 (клоны 396-4-113 и 396-1-34), груши Березка (клоны Б 4-98 и Б 1-95), вишни ВСЛ-2. В каждом варианте брали по 15-20 растений. Экспланты, зараженные вирусами, высаживали на модифицированную среду Мурасиге-Скуга, в которую добавляли 6-БАП (0,5 мг/л) и салициловую кислоту (42 мг/л). Выбор данной относительно высокой концентрации СК обусловлен сильной степенью зараженности эксплантов вирусами – индекс зараженности перед началом экспериментов по большинству вирусов варьировал от 3,4 до 22,0. В более ранних опытах на других культурах концентрация СК 42 мг/л была эффективной в отношении ингибирования непо- и иларвирусов [9]. Яблоню и грушу оздоравливали от латентных вирусов хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV), бороздчатости древесины яблони (ASGV), ямчатости древесины яблони (ASPV), мозаики яблони (ArMV); вишню – от вируса шарки сливы (PPV), некротической кольцевой пятнистости листьев косточковых (PNRSV), карликовости сливы (PDV), хлоротической пятнистости листьев яблони. ИФА осуществляли с использованием базовой методики Clark, Adams [10] и в соответствии с «Методическими указаниями по экспресс-диагностике вирусов на ягодных культурах» [11]. Для вирусологических анализов использовали диагностические наборы фирмы «Neogen» (Великобритания).

Таблица 1.

Эффективность оздоровления микрорастений яблони (подвой 62-396) от латентных вирусов в зависимости от применения салициловой кислоты (в среднем по 2 клонам)

Вариант	ACLSV		ASGV		ASPV	
	Индекс зараженности*	Оздоровление, %	Индекс зараженности	Оздоровление, %	Индекс зараженности	Оздоровление, %
Контроль (без СК)	3,3	12,5	1,7	50,0	1,6	62,5
СК 42 мг/л	3,0	37,5	1,7	62,5	2,1	50,0

*Индекс зараженности – отношение оптической плотности зараженного образца к серонегативному контролю.

Салициловая кислота в концентрации 42 мг/л ингибировала развитие вируса ACLSV в тканях эксплантов яблони, что приводило

к увеличению выхода свободных от вирусов растений на 25 % по сравнению с контролем (таблица 1).

В целом относительно низкий процент свободных от вируса ACLSV растений яблони связан с высокой концентрацией данного вируса в тканях эксплантов – в 6-7 раз выше по сравнению с другими латентными вирусами.

Выход свободных от вируса ASGV растений подвоя яблони в варианте с применением СК возрастал на 12,5 %, в то время как в отношении вируса ASPV СК в испытанной концентрации оказалась неэффективной. Получение безвирусных растений в контроле, вероятно, связано с неравномерным распределением вирусов по тканям растений и действием факторов культивирования.

Выход свободных от комплекса всех латентных вирусов растений по клону яблони 396-4-113 в контроле отсутствовал, а на среде с СК составил 25 %. По клону 396-1-34 при оздоровлении от комплекса вирусов эффект от использования СК не выявлен.

На подвое груши Березка СК обеспечивала увеличение выхода свободных от вирусов ASGV и ASPV растений соответственно в 2 и 2,5 раза, но оказалась неэффективной в отношении вируса ArMV (табл. 2). Выход свободных от комплекса рассматриваемых вирусов растений груши в среднем по 2 клонам в контроле составил 25 %, а на среде с СК – 50 %.

Таблица 2.

Эффективность оздоровления микрорастений груши (подвой Березка) от латентных вирусов в зависимости от применения салициловой кислоты (в среднем по 2 клонам)

Вариант	ASGV		ASPV		ArMV	
	Индекс зараженности	Оздоровление, %	Индекс зараженности	Оздоровление, %	Индекс зараженности	Оздоровление, %
Контроль (без СК)	2,3	37,5	2,0	25,0	1,7	37,5
СК 42 мг/л	1,6	75,0	1,9	62,5	1,5	37,5

При оздоровлении подвоя вишни ВСЛ-2 от вируса шарки сливы СК в испытанной концентрации оказалась неэффективной, поскольку безвирусных растений получить не удалось.

СК в концентрации 42 мг/л ингибировала ростовые процессы у эксплантов яблони и груши (табл. 3).

Таблица 3.

Действие салициловой кислоты на ростовые процессы и гибель эксплантов семечковых культур в процессе культивирования

Вариант	Подвой яблони 62-396				Подвой груши Березка			
	Высота, мм	Число листьев	Число почек	% гибели	Высота, мм	Число листьев	Число почек	% гибели
Контроль (без СК)	24,0	13,1	3,3	0,0	18,7	8,4	1,7	7,5
СК 42 мг/л	10,1	6,9	1,6	40,0	11,9	7,2	1,2	40,0

СК приводила к высокой гибели эксплантов, снижению высоты растений у подвоя яблони в 2,4 раза, числа листьев – в 1,9 раза, числа почек – в 2,1 раза. При этом была выявлена клоновая специфика. У клона 396-1-34 ростовые параметры на среде с СК снижались в меньшей степени, чем у клона 396-4-113.

По сравнению с яблоней подвой груши Березка в целом характеризовался более низкими темпами размножения, что отчасти могло повлиять на результат опыта в отношении степени ингибирования. Показатели роста на среде с СК у подвоя груши снизились в 1,4 раза по числу почек и в 1,6 раза по высоте по сравнению с контролем. Гибель эксплантов груши в опытном варианте была такой же, как и у яблони.

Наименее чувствительным к введению в состав питательной среды СК оказался подвой вишни (табл. 4).

Таблица 4.

Действие салициловой кислоты на ростовые процессы и гибель эксплантов подвоя вишни ВСЛ-2 в процессе культивирования

Вариант	Высота, мм	Число листьев	Число почек	% гибели
Контроль (без СК)	25,3	11,0	2,9	15,0
СК 42 мг/л	20,2	10,6	2,4	15,0

При незначительном снижении ростовых параметров в варианте с СК гибель эксплантов была одинаковой на обеих средах. Это свидетельствует о возможности увеличения концентрации СК при оздоровлении, что, возможно, привело бы и к ингибированию вирусов в тканях подвоя вишни.

Таким образом, эффект оздоровления зависел от культуры

(вида растения и клоновых особенностей), вида вируса и его концентрации в тканях растений. Оздоровление от какого-либо одного вида вируса протекало успешнее, чем от комплекса вирусов. СК ингибировала развитие латентных вирусов в тканях эксплантов яблони и груши, что приводило к увеличению выхода свободных от вирусов растений. СК в испытанной концентрации оказалась неэффективной в отношении подавления вирусов на подвое вишни. СК в концентрации 42 мг/л проявляла фитотоксичность, которая была сильнее выражена на семечковых культурах по сравнению с подвоем вишни.

ЛИТЕРАТУРА

1. Васюкова Н.И., Герасимова Н.Г., Озерецковская О.Л. Роль салициловой кислоты в болезнеустойчивости растений // Прикладная биохимия и микробиология. 1999. Т. 35, № 5. С. 557-563.
 2. Кулаева О.Н. Восприятие и преобразование гормонального состава у растений. Анализ проблемы и введение к публикации материалов международного симпозиума «Восприятие и трансдукция гормональных сигналов у растений» // Физиология растений. 1995. Т. 42, № 5. С. 661-671.
 3. Durrant W.E., Dong X. Systemic acquired resistance // Annual Rev. of Phytopathology. 2004. V. 42. P. 185-209.
 4. Красавина М.С., Малышенко С.И., Ралдугина Г.Н. и др. Может ли салициловая кислота влиять на межклеточный транспорт вируса табачной мозаики через изменение проводимости плазмодесм // Физиология растений. 2002. Т. 49, № 1. С. 71-77.
 5. Durner J., Shah J., Klessing D.F. Salicylic acid and disease resistance in plants // Trends Plant Sci.- 1997. V. 2. P. 266-274.
 6. Alvarez M.E. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance // Plant Mol. Biol. 2000. V. 44. P. 429-442.
 7. Упадышев М.Т. Вирусные болезни и современные методы оздоровления плодовых и ягодных культур: Дис. ... докт. с.-х. наук.- М., 2011. 479 с.
 8. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста // Физиология растений. 1997. Т. 44. № 3. С. 471-480.
 9. Упадышев М.Т. Роль фенольных соединений в процессах роста, развития и оздоровления от вирусов ягодных и плодовых культур. Кн.: Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Научный мир, 2010. С. 278-289 с.
 10. Clark M., Adams A. Characterization of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses // J. Gen. Virol. 1977. V. 34. P. 475-485.
 11. Методические указания по экспресс-диагностике вирусов на ягодных культурах / Ю.Н.Приходько, О.Ю.Суркова, М.Т.Упадышев и др.- М.: ВСТИСП, 2002. 36 с.
-

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПУЛ БИОФЛАВОНОИДОВ В ЛИСТЬЯХ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО (*TRIFOLIUM PRATÉNSE* L.)

Федураев П.В., Чупахина Г.Н., Скрыпник Л.Н.

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия,
тел. 8(4012)310067, e-mail pavelf15@mail.ru

К регуляторам роста растений принадлежат большая группа эндогенных веществ, активно участвующих в обменных процессах на всех этапах его жизни [1,2].

Однако, на ряду с эндогенными веществами выделяют целую группу соединений, которые могут стимулировать рост и развитие растений извне. К ним относят как синтетические производные нативных фитогормонов, так и вещества которые систематически не относятся к ним [3].

В данной работе рассматриваются фитоактивные вещества экзогенной природы, являющиеся фенольными соединениями по своему химическому строению, и их влияние на синтез биологически активных компонентов растения. Доказано, что ни один класс природных веществ не оказывает такого многочисленного и разнообразного воздействия, как фенольные соединения [4,5,6]. В последнее время становятся актуальными исследования, посвященные поиску способов повышения содержания в растениях физиологически активных веществ, в том числе и биофлавоноидов [7,8].

В качестве объекта исследования был выбран Клевер луговой (*Trifolium pratense* L.) являющийся одним из доминирующих видов луговых фитоценозов средней полосы России. Кроме того данный вид является ценным кормовым растением [9].

Было исследовано влияние галловой кислоты, кверцетина, гидроксикоричной кислоты в концентрациях: 10^{-4} г/л, 10^{-5} г/л, 10^{-6} г/л, 10^{-8} г/л, 10^{-10} г/л, на прорастание семян клевера (табл. 1).

Оказалось, что оптимально стимулирование прорастание семян были следующие концентрации фенолов: 10^{-10} г/л для галловой кислоты, 10^{-8} г/л для кверцетина, 10^{-8} г/л для гидроксикоричной кислоты.

Оптимально стимулирующие прорастание семян клевера лугового концентрации фенольных соединений были использованы для изучения действия экзогенных полифенолов на накопление

антоцианов, лейкоантоцианов, катехинов, а так же определения суммы фенольных соединений (рис.).

Таблица 1

Влияние различных концентраций фенольных соединений на прорастание семян и длину проростков

Вещества	Параметры	Возраст проростков									
		7 день					14 день				
		Концентрации растворов, г/л									
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-10}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-10}
Галловая кислота	Длина проростков, см	1,7	2,3	0,8	1,5	3	1,7	2,6	0,8	1,5	3,6
	процент проростания, %	32	46	20	38	32	36	46	24	40	46
Гидроксикоричная кислота	Длина проростков, см	0	0,5	0,3	1,6	2,5	0,4	0,8	0,4	2,6	3
	процент проростания, %	0	17	20	32	30	8	23	22	42	35
Кверцетин	Длина проростков, см	2,3	1,2	3,0	2,8	1,2	2,5	1,6	3,2	4,3	1,4
	процент проростания, %	35	38	26	34	40	35	38	31	46	42

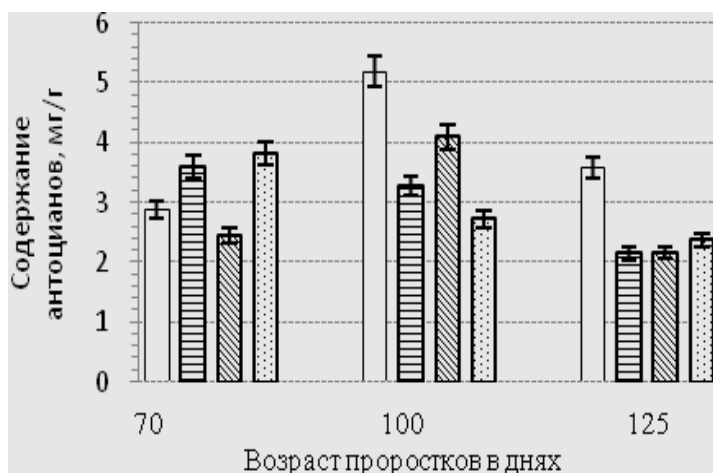
Для изучения влияния фитостимуляторов на биосинтез вторичных метаболитов, растения были разделены на четыре группы, в зависимости от состава раствора вносимого в почву: 1. контроль - дистиллированная вода; 2. раствор галловой кислоты, конц. 10^{-10} г/л; 3. раствор гидроксикоричной кислоты, конц. 10^{-8} г/л; 4. раствор кверцетина, конц. 10^{-8} г/л.

Анализ растений производили на 75-й, 100-й, 125-й день после всходов.

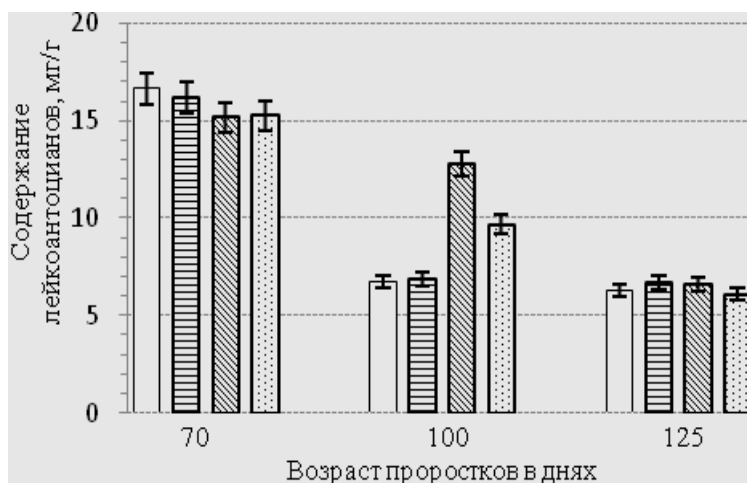
Анализы выполнялись в трех биологических повторностях, полученные данные обработаны статистически с использованием пакета электронных таблиц Microsoft Excel и представлены в виде средних арифметических значений с указанием среднего квадратического отклонения

Исследования показали, что обработка проростков экзогенными соединениями (гидроксикоричная кислота и кверцетин) привела к повышению эндогенного пула антоцианов только 70-дневных проростков. В других вариантах опыта эти соединения (а так же галловая кислота) ингибировали накопление антоцианов. Уровень лейкоантоцианов повышался в присутствии галловой кислоты и кверцетина только у 100-дневных проростков. В остальных вариантах изменения контрольного уровня лейкоантоцианов в присутствии экзогенных фенольных соединений не наблюдалось. Установлено, что уровень катехинов в растениях

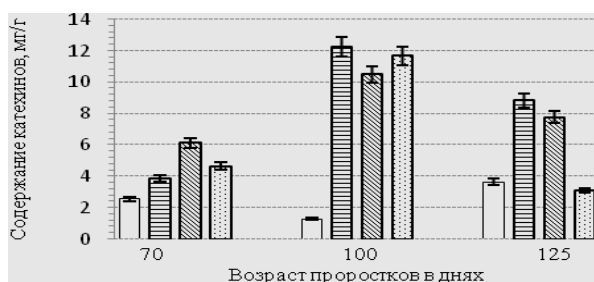
обработанных фитостимуляторами был достоверно выше контроля у проростков всех возрастов. Сумма фенольных соединений увеличивалась только при обработке растений галловой кислотой во все периоды вегетации.



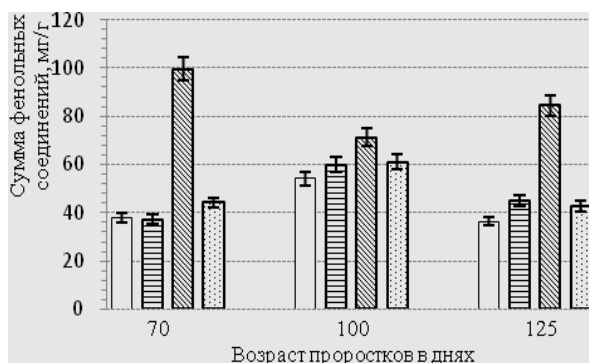
А



Б



В



Г

Рис. Влияние фенольных соединений на накопление: А. антоцианов; Б. лейкоантоцианов; В. катехинов; Г. суммы фенольных соединений. (столбики в диаграммах слева направо: контроль; гидроксикоричная кислота; галловая кислота; кверцетин)

Кроме того дынные вещества использовались для изучения развития листовой пластины клевера лугового (табл. 2).

Таблица 2

Влияние различных веществ фенольной природы на размер листовой пластинки клевера

Вещества	Длина, мм	Ширина, мм
Контроль	20±2	12±2
Гидроксикоричная кислота ()	25±3	15±3
Галловая кислота	25±3	13±2
Кверцетин	20±2	17±3

Однако, различные вещества фенольной природы статистически значимого влияния на размер листовой пластинки не оказали. Происходит изменение обменных процессов, которые, однако, не сказываются на ростовых процессах.

Образуясь ли в растениях или поступая из вне, фитоактивные вещества направляют характер протекающих в них процессов. Таким образом, эти вещества обеспечивают функциональную целостность растительного организма. Была выявлена связь между уровнем полифенолов и веществами используемых в качестве фитостимуляторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Муромцев Г.С. Регуляторы роста растений /М.: Колос, 1979. - 246 с.
2. Кравец В.С. и др. Регуляторы роста растений: внутриклеточная гормональная сигнализация и применение в аграрном производстве //Физиология растений, 2008, том 55, №4, с. 629 – 640.
3. Чупахина Г. Н. Система аскорбиновой кислоты растений: Монография. -Калинингр. ун-т. - Калининград, 1997. - 120 с.
4. Stevenson, D. E. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? / D. E. Stevenson, R. D. Hurst // Cell. Mol. Life Sci. – 2007. – Vol. 64, № 22. – P. 2900-2916.
5. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications / J. E. Brown [et al.]; eds. Ø. M. Andersen, K. R. Markham. – Boca Raton: CRC Press, 2006. – 1197 p.
6. Костюк, В. А. Биорадикалы и биоантиоксиданты / В. А. Костюк, А. И. Потапович. – Минск: БГУ, 2004. – 179 с.
7. Янчевская Т.Г., Ольшаникова А. Л., Вербицка Н.А. Действие на растения картофеля биологическиактивных веществ природного происхождения: Тезисы докладов шестой международной конференции «Регуляторы роста и развития растений», 2001.-С. 299.
8. Тарасенко С.А., Дорошкевич Е.И., Тарасенко В.С. Влияние стимуляторов роста на урожай и качество сельскохозяйственных культур// Тез. докл. шестой международной конференции «Регуляторы роста и развития растений», 2001.- 280 с.
9. Губанов И. А., Киселёва К. В., Новиков В. С. Иллюстрированный определитель растений Средней России. М.: Т-во науч. изд. КМК, Ин-т технолог. иссл, 2003. С. 472

ВЛИЯНИЕ РАДИАЦИИ НА СОСТАВ И СОДЕРЖАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ *PENTAPHYLLOIDES FRUTICOSA*

Храмова Е.П.¹, Тарасов О.В.², Крылова Е.И.², Лавренчук А.В.³

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия,
тел.: +7 (383) 3344468, E-mail: khramova@ngs.ru

²ФГУП «Производственное объединение Маяк», Озерск, Челябинской обл.,
Россия

³Институт геологии и минералогии им. В.С.Соболева СО РАН,
Новосибирск, Россия

В условиях возрастающего радионуклидного загрязнения биосферы, обусловленного испытаниями ядерного оружия и развитием ядерных технологий, проблема влияния радиации на живые организмы, особенно хронического облучения в малых дозах, актуальна и имеет большое научное и практическое значение. В ответ на радиационное воздействие в биологических объектах возникают высокореактивные молекулы: ионы, возбужденные молекулы, свободные радикалы, которые являются начальными инициаторами первичных радиационно-химических процессов [1,2]. Флавоноиды, будучи эндогенными низкомолекулярными антиоксидантами и предшественниками хиноидных радиотоксинов, способны нейтрализовать действие активных форм кислорода и свободных радикалов путем предупреждения перекисидации липидов и образования хелатных комплексов [3]. Разнообразные внешние воздействия, в том числе γ -облучение, могут индуцировать специфический фермент – фенилаланин-аммиак-лиазу (ФАЛ), активация которого приводит к увеличению количества флавоноидов в клетках растений, защищая их от стрессовых факторов [4-6].

Таблица 1.
Радиационная характеристика участков зоны ВУРСа

Характеристики	Уч-к 1	Уч-к 2	Уч-к 3
Средняя плотность загрязнения по ^{90}Sr , МБк/м ²	133,5	17	0,07
Средняя плотность загрязнения по ^{137}Cs , кБк/м ²	8400	900	160
Мощность эквивалентной дозы на уровне почвы, мкЗв/ч	3,1	1,26	0,16
Плотность потока β -частиц на поверхности почвы, частиц/мин.см ²	2180	820	9

В зоне Восточно-Уральского радиоактивного следа (ВУРСа),

который сформировался в 1957 г. в результате аварии на производственном объединении «Маяк», заложены 3 пробные площадки с разным уровнем загрязнения радионуклидами ^{90}Sr и ^{137}Cs (табл.1).

Растения *Pentaphylloides fruticosa* (L.) O.Schwarz – пятилистника кустарникового (сем. Rosaceae), высажены саженцами в 2004 г. на каждом из трех участков. Исходный материал выращен на интродукционном участке Горно-Алтайского филиала Центрального сибирского ботанического сада СО РАН (АФ ЦСБС СО РАН, с. Камлак) из семян, собранных в природной ценопопуляции.

Цель работы заключалась в выявлении особенностей влияния хронического действия радиации на состав и содержание флавоноидов и морфометрические параметры на примере *Pentaphylloides fruticosa*, выращенного в градиенте загрязнения радионуклидами ^{90}Sr и ^{137}Cs .

Для промера морфометрических параметров использован метод компьютерного анализа изображений [7]. Определение флавоноидов выполняли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определение радионуклидов – ^{90}Sr и ^{137}Cs проводили методами β – и γ -спектрометрии [8].

Таблица 2.

Удельная активность радионуклидов в листьях *P. fruticosa* из разных участков зоны ВУРСа (кБк/кг и Бк/кг на воздушно-сухую массу)

Радионуклиды	Участок 1	Участок 2	Участок 3
^{90}Sr , кБк/кг	223 ± 26^1	$18,7 \pm 2,7$	$\leq 0,25 \pm 0,04$
^{137}Cs , Бк/кг	$1,9 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$	$0,73 \pm 0,13$

¹ – среднее значение $\pm$ ошибка среднего (при числе степеней свободы $f = 2$ и $P=0,95$)

Наибольшее количество ^{90}Sr и ^{137}Cs обнаружено в листьях *P. fruticosa* из участка 1, расположенного в непосредственной близости к источнику загрязнения. По мере удаления от него содержание ^{90}Sr в растениях из участков 2 и 3 снижается в 12 – 900 раз, ^{137}Cs – в 5-3 раза соответственно (табл.2). Следует отметить, что величины, характеризующие уровень загрязнения почвы, и удельная активность ^{90}Sr в органах *P. fruticosa* убывают по мере

удаления от эпицентра аварии, но активность ^{137}Cs в листьях растений на третьем участке выше, чем на втором.

Установлено, что радиационное воздействие вызвало статистически значимое уменьшение поверхности листа и конечной доли, их длины и ширины, прироста годичного побега и длины черешка листа на 20-45 % у растений из наиболее загрязненного участка по сравнению с особями из менее загрязненных радионуклидами участков. Проявившаяся на втором участке бимодальность в распределениях некоторых морфометрических признаков, возможно, свидетельствует о дифференциации выборки и выделении групп растений с разной ответной реакцией на облучение.

Исследование флавоноидного состава методом ВЭЖХ показало, что в экстрактах листьев пятилистника кустарникового содержится не менее 14 компонентов флавоноидной природы вне зависимости от места и условий произрастания. На основании собственных, литературных и полученных спектральных данных (УФ- и масс-спектроскопии), сопоставлении времен удерживания пиков веществ на хроматограммах анализируемых образцов с временами удерживания пиков стандартных образцов установлены пять флавонолгликозидов – гиперозид, изокверцитрин, рутин, кверцитрин и астрагалин; два агликона – кверцетин и кемпферол; эллаговая кислота и ее эфир. Остальные компоненты пока не идентифицированы, но на основании УФ-спектров отнесены к флавоноидным структурам. В целом, содержание флавоноидов (в сумме и по большинству индивидуальных компонентов) в листьях растений с ростом уровня радиации практически не изменяется и составляет в сумме 31,4-31,8 мг/г на абс.сух массу. Для отдельных компонентов с ростом радионуклидного загрязнения наблюдаются тенденции к повышению концентраций, например, гиперозида, изокверцитрина + рутина (в сумме), астрагалина и кемпферола или к снижению – кверцитрина. Содержание остальных компонентов при этом изменяется нелинейно. Однако статистически значимое различие между отдельными выборками касается только содержания изокверцитрина - рутина, эллаговой кислоты, кверцетина.

Можно заключить, что увеличение β -облучения в 240 раз и γ -облучения в 20 раз в большинстве случаев дает близкие результаты по содержанию отдельных компонентов и их общей суммы, но в зависимости от вариаций условий облучения механизмы действия радиации, скорее всего, существенно различаются. Это, по-видимому, связано с эффектом малых доз,

хроническим облучением и радиорезистентностью вида к воздействию ионизирующих излучений [2].

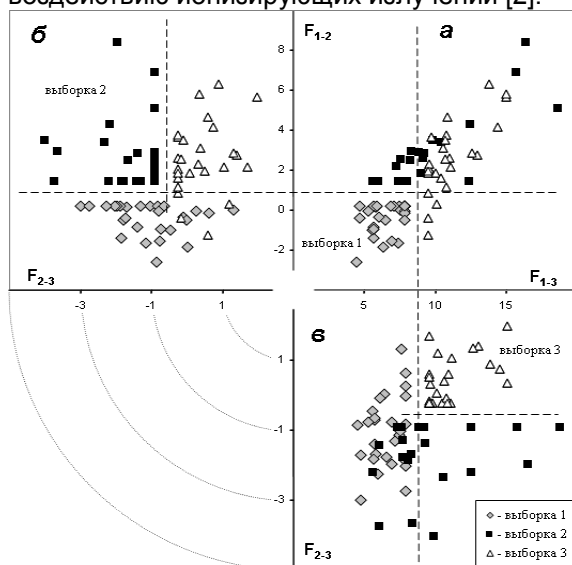


Рис.1. Разделение выборок с разным уровнем облучения методом опорных векторов. Пунктирная линия соответствует гиперплоскости (классификатору), построенному так, чтобы максимизировать расстояние между множествами (а – выделена выборка 1, б – выборка 2, в – выборка 3). По осям отложены дискриминантные функции, разделяющие выборки 1 и 2 (F_{1-2}), 1 и 3 (F_{1-3}) и 2 и 3 (F_{2-3}).

Исходя из предположения, что в листьях растений в норме присутствуют вещества фенольной природы, тормозящие митозы, но с возрастанием уровня облучения увеличивается содержание хиноидных радиотоксинов – продуктов окисления природных флавоноидов, обладающих способностью угнетать митоз и деление клеток [1], оценивалась степень связи между накоплением флавоноидов и морфометрическими показателями *P. fruticosa*. По мере повышения облучения корреляции между биохимическими и морфометрическими показателями нарушаются. У растений с относительно чистого участка 3 значения коэффициента корреляции в диапазоне от -0.53 до -0.64 свидетельствуют о возможной взаимосвязи между биохимическими показателями (общее содержание флавоноидов, компонент 8) и морфологическими параметрами (поверхность листа и длина черешка), тогда как на двух других участках такая связь

отсутствует. У растений из выборки 1, напротив, просматривается возможная взаимосвязь между парами отдельных компонентов (гиперозид, эфир эллаговой кислоты, кверцитрин, кверцетин) и морфологическими показателями (площадь листа и конечной доли, длина черешка) (R от - 0.50 до +0.43). Принимая во внимание установленную Miliauskas G. с соавт. [9] высокую антирадикальную активность отдельных компонентов полифенольного комплекса *P. fruticosa*, можно предположить, что полученные результаты косвенно свидетельствуют о приоритетности участия этих компонентов в защите от ионизирующего облучения.

Для разделения объектов, подвергшихся разной степени облучения, использован дискриминантный анализ методом опорных векторов (Support Vector Machine) [10,11]. Показано, что в зависимости от уровня облучения выборки различаются по совокупности морфометрических показателей и содержанию флавоноидов (Рис.1). Каждой особи соответствует определенный комплекс морфометрических и биохимических параметров, определяющий принадлежность к одной из исследованных выборок.

В результате проведенного исследования на примере *Pentaphylloides fruticosa*, выращенного в градиенте загрязнения радионуклидами ^{90}Sr и ^{137}Cs , показано, что состав и содержание флавоноидов (в сумме и по большинству индивидуальных компонентов) не изменяется. Однако, несмотря на статистически незначимые различия по средним значениям между отдельными морфометрическими показателями и содержанию флавоноидов (в сумме, по группам и индивидуальным компонентам), выборки различаются по совокупности этих показателей в зависимости от уровня облучения. Приоритетность участия в защите от ионизирующего облучения, скорее всего, принадлежит гиперозиду, эфиру эллаговой кислоты, кверцитрину и кверцетину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузин А.М. Радиационная биохимия. М.:Изд-во АН СССР, 1962. 335с.
2. Кузин А.М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии. М.:Наука, 1986. 283с.
3. Rice-Evans CA, Packer L. Flavonoids in Health and Disease. New York: Marcel Dekker, 1998. 525 p.
4. Lange H., Shropshire W., Mohr H. An analysis of phytochrome-mediated anthocyanin synthesis // Plant. Physiol. - 1971. V. 47. - P.649-655.
5. Dixon R.A., Paiva N.L. Stressinduced phenylpropanoid metabolism // Plant Cell. 1995. V.7. P.1085-1097.
6. Hartley S.E., Jones C.G. Plant chemistry and herbivory: or why the world is green // Plant Ecology. / Crawley M.J. (ed.). 1997. P. 284-324.

-
7. Трубина Л.К. Стереомодели в изучении биологических объектов, Новосибирск: СГГА, 2006. 136с.
 8. Бакуров А.С., Григорьева Т.А., Першина Л.И. Радиохимические методы при проведении радиационного мониторинга окружающей среды // Вопросы радиационной безопасности. 2004. № 4. С. 62-65.
 9. Miliauskas G., van Beek T.A., Venskutonis P.R., Linssen, J.P.H., de Waard P., Sudhölter E.J. Antioxidant activity of *Potentilla fruticosa* // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2004. V.84. P.1997–2009.
 10. Вапник В. Н., Червоненкис А. Я. Теория распознавания образов (статистические проблемы обучения). М.: Наука. 1974. 416 с.
 11. Воронцов К. В. Лекции по методу опорных векторов. URL: <http://www.ccas.ru/voron/download/SVM.pdf>
-

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ ПОДСОЛНЕЧНИКА В СВЯЗИ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЗАРАЗИХЕ

Чигрин Т.В., Задорожная О.А.

Институт растениеводства им.В.Я.Юрьева НААН, Харьков, Украина,
(0572)900244, olzador@ukr.net

Заразиха (*Orobanchе cumana* Wallr.) является одним из вредоносных паразитов подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Потери урожая семян подсолнечника из-за поражения заразой в странах средиземноморья и Восточной Европы составляют 50-90% [1]. С целью создания устойчивых форм подсолнечника к данному паразиту необходимо проводить предварительную оценку исходного материала. Такая оценка может проводиться морфологическими [2], гистологическими [3-5], биохимическими [5-7], молекулярными [8] методами.

Известно более 8 рас заразихи: А, В, С, D, Е, F, G, Н. Постоянно появляются новые, все более агрессивные расы. Протестировать новые расы с помощью линий-дифференциаторов, а также провести анализ с помощью морфологических, гистологических и молекулярных методов не всегда есть возможность. В связи с этим целесообразно использовать методы с помощью которых можно быстро и эффективно оценить устойчивость исходного материала подсолнечника на устойчивость к заразихе без учета расы паразита.

При внедрении паразита наблюдается определенный биотический стресс, вследствие чего изменяются соответствующие

метаболические пути, что проявляется в повышении секреции веществ фенольной природы, которые концентрируются в поврежденных частях, образуя защитный слой [5]. Была исследована роль ряда ферментов, которые играют важную роль в ответе на биотические стрессы, в частности полифенолоксидазы (ПФО) (КФ1.10.3.1), пероксидазы (ПОД) (КФ1.11.1.7), каталазы (КАТ) (КФ1.11.1.6) в формировании устойчивости растений к паразитам и патогенам. Для подсолнечника данные по активности этих ферментов в условиях биотического стресса ограничены.

Известны исследования по изучению активности ПФО во время поражения подсолнечника патогенами, в частности *Botrytis cinerea* Fr., *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berlese et de Toni, *Alternaria helianthini* (Hansf.) Tub. et Nish. [2,10-12]. У устойчивых образцов активность ферментов была, как правило, более высокая. Установлена также более высокая активность ПОД у устойчивых форм подсолнечника, инокулированных заразой, по сравнению с восприимчивыми [6]. По полученным данным после инокуляции заразой, активность ПОД восприимчивых сортов существенно не отличалась от активности неинокулированных или даже снижалась.

В связи с этим, целью данной работы было установить активность таких ферментов, как полифенолоксидаза, пероксидаза, каталаза, играющих определенную роль в формировании защитных свойств растений, в частности при инокуляции заразой.

Материалом для исследований были линии подсолнечника селекции Института растениеводства им. В. Я. Юрьева (табл.1). Линии характеризовались разной устойчивостью к заразе по данным морфологического анализа [13, 14] и отличались по наличию генов устойчивости к пяти расам заразы Or_5 [15].

Активность ферментов определяли в проростках, которые получали путем проращивания семян в условиях искусственного климата, спектрофотометрическим методом [16] и выражали в условных единицах на г сырой ткани (усл.ед./г тк.). Результаты обрабатывали стандартными методами вариационной статистики [17].

По результатам исследований установлено, что по активности ПФО, ПОД, КАТ наблюдается явная зависимость изученных показателей от генотипа (табл.1).

Примечание. *Разница по показателям активности фермента между образцом и стандартом восприимчивости достоверна при $P < 0,05$ Or_5 -наличие гена Or_5 , который обуславливает устойчивость к пяти расам заразы, or_5 -наличие

рецессивного гена or_5 , который не обуславливает устойчивость к пяти расам паразитов.

Таблица 1.
Активность ферментов у линий подсолнечника без инокуляции в сравнении со стандартами устойчивости или восприимчивости к паразиту (ум.од./г тк.)

Название линии	Устойчивость, определенная морфол.-методом	Наличие гена Or_5	Активность полифенолоксидазы, усл.ед./г тк.	Активность пероксидазы, ум.од./г тк.	Активность каталазы, ум.од./г тк.
Cx503A	средняя	or_5	76,3±2,4*	10,1±1,3	6,3±1,4
Cx1002A	высокая	Or_5	79,1±2,4*	13,6±1,6	4,0±0,5
Cx1006A	высокая	$Or_5 or_5$	82,2±2,4*	19,1±1,4	2,6±0,4
Cx2552A	средняя	or_5	82,5±1,1*	14,5±2,3	10,1±2,4
X114B	средняя	or_5	72,0±3,3*	9,2±1,0	3,4±1,5
X711B	высокая	$Or_5 Or_5$	72,0±3,3*	28,3±3,6	2,8±0,4
X908B	станд. воспр..	or_5	56,7±2,4	17,6±2,4	5,9±1,6
PR64A71	станд. устойчив.	Or_5	77,25±1,5*	12,8±2,9	5,6±0,6

Таблица 2.
Активность ферментов у линий подсолнечника без инокуляции в сравнении со стандартами устойчивости или восприимчивости к паразиту (ум.од./г тк.)

Название линии,	Устойчивость, определенная морфологич. методом	Наличие гена Or_5	Активность пероксидазы, ум.од./г тк.	Активность пероксидазы при инокуляции, ум.од./г тк.	Активность каталазы, ум.од./г тк.	Активность каталазы при инокуляции, ум.од./г тк.
Cx503A	средняя	or_5	10,1±1,3	12,4±1,8	6,3±1,4	8,8±1,4
Cx1002A	высокая	Or_5	13,6±1,6	17,1±2,0	4,0±0,5	4,0±0,8
Cx1006A	высокая	$Or_5 or_5$	19,1±1,4	24,4±2,1*	2,6±0,4	6,0±0,7*
Cx2552A	средняя	or_5	14,5±2,3	17,4±1,7	10,1±2,4	11,3±2,5
X114B	средняя	or_5	9,2±1,0	10,0±1,5	3,4±1,5	4,7±1,0
X711B	высокая	$Or_5 Or_5$	28,3±3,6	20,4±2,7*	2,8±0,4	1,4±2,3*
X908B	стандарт восприимч.	or_5	17,6±2,4	8,7±1,1*	5,9±1,6	3,1±0,5
PR64A71	стандарт устойчив.	Or_5	12,8±2,9	29,7±5,5*	5,6±0,64	6,6±0,7

Примечание. *Разница по показателям активности фермента между инокулированными и неинокулированными образцами достоверна при $P < 0,05$. Or_5 -наличие гена Or_5 , который обуславливает устойчивость к пяти расам паразитов, or_5 -наличие рецессивного гена or_5 , который не обуславливает устойчивость к пяти расам паразитов.

Активность ПФО большинства образцов достоверно превышает активность стандарта восприимчивости и варьирует относительно стандарта устойчивости. По активности ПОД и КАТ не наблюдали стабильной зависимости в изменении активности от устойчивости образца, определенной другими методами.

Активность ПОД и КАТ у разных генотипов варьировала. Полученные данные свидетельствуют о возможности прогнозировать устойчивость к заразице только для дифференциации очень восприимчивых образцов по активности ПФО. Возможность более детальной характеристики устойчивых образцов по активности ПФО, ПОД, КАТ не установлена.

Активность ПОД и КАТ изучали в контрольных образцах и образцах, которые подвергали инокуляции заразицей. При инокуляции активность данных ферментов изменялась в зависимости от генотипа (табл.2).

Так при инокуляции наблюдали увеличение активности ПОД, КАТ у стандарта устойчивости и ее снижение у стандарта восприимчивости. У линии Sx1006A при инокуляции наблюдали достоверное увеличение активности ПОД и КАТ, у линии X711B – достоверное снижение. У остальных исследованных образцов в большинстве случаев при инокуляции наблюдали лишь тенденцию к увеличению активности ПОД и КАТ.

Таким образом, результаты анализа активности ферментов полифенолоксидазы, пероксидазы, каталазы свидетельствуют о возможности дифференциации образцов подсолнечника по устойчивости к заразице только с помощью показателей активности ПФО лишь образцов с высоким уровнем восприимчивости к заразице. При инокуляции изученных образцов заразицей в большинстве случаев наблюдается тенденция к увеличению активности ПОД и КАТ. У стандарта восприимчивости к заразице наблюдали снижение активности этих ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Honiges A., Wegmann K., Ardelean A. *Orobanche* resistance in sunflower//*Helia*.-2008.- V.31. - №49. – P. 1-12.
2. Кириченко В.В., Гуменюк А.Д., Долгова Е.М. и др. - Селекция подсолнечника на устойчивость к заразице и совершенствование метода ранней диагностики в условиях фитотрона // Селекция и семеноводство. – 1987. – Вып. 63. – С.44-46.
3. Панченко А.Я., Антонова Т.С. Особенности защитной реакции устойчивых форм подсолнечника на внедрение заразицы // Сельскохозяйственная биология. - 1974. V. - 9, №4. - С.554-557.
4. Labrousse P., Arnaud M.C., Serieys H., Berville A. and Thalouarn P. - Several mechanisms are involved in resistance of *Helianthus* to *Orobanche cumana* Wallr. // *Annals of Botany*. – 2001. – 88. – P. 859-868.
5. Echevarria-Zomeno Sira, Perez-de-Luque Alejandro, Jorin Jesus, Maldonado M. Ana Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche Cumana* Wallr.) in sunflower (*Helianthus annuus* L.): cytochemical studies // *Jornal of Experimental Botany*. – 2006. - Vol. 57. – November.- P. 4189-

-
- 4200.
6. Авраменко Р.С. Изучение качественных особенностей различных по устойчивости к заразице сортов подсолнечника: Автореф. дис... канд.биол.наук. – Воронеж. - 1973.- 23с.
 7. Antonova T.S., Terborg S.J. The role of peroxidase in the resistance of sunflower against *Orobancha cumana* in Russia // Weed Research.-1996. - 36.- №2.- P.113-121.
 8. Задорожна О. А. Ідентифікація у соняшнику гену стійкості до вовчка Or_5 за допомогою молекулярних маркерів//Аграрний вісник причорномор'я.-2012.- Вип.61.-С.158-163.
 9. Аксенова В.А., Кожанова О.Н. О механизме активирования пероксидазы у устойчивых и восприимчивых растений при заражении // Физиология растений.-1976.-Т.23.-вып.2.-С.391-396.
 10. Зайчук В.Ф., Попов П.С., Калинченко Т.В. Активность полифенолоксидазы в корзинках подсолнечника // Масличные культуры. – 1986. - №3. - С.30.
 11. Saftic-Pankvic D., Veljovic-Jovanovic S., Pucarevic M., Radovanovic N., Mijic A. Penolic compounds and peroxidases in sunflower near-isogenic lines after downy mildew infection //Helia.-2006.-V.29.-N.45.-P.33-42.
 12. Anjana G., Kini K.R., Shetty H.S., Prakash H.S. Changes in peroxidase activity in sunflower during infection by necrotrophic pathogen *Alternaria helianthini*//Archives of Phytopathology and Plant Protection.-2008.-V.41.- №8.-P.586-596.
 13. Каталог гібридів соняшнику селекції Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва/ Кириченко В.В., Макляк К.М., Коломацька В.П. та ін. - Харків, 2010. – 44с.
 14. Каталог рабочей коллекции самоопыленных линий подсолнечника Института растениеводства им.В.Я.Юрьева / В.В. Кириченко, З.К.Аладьина, А.Д.Гуменюк и др. - Харьков, 1996. - 88с.
 15. Задорожна О. А. Ідентифікація у соняшнику гену стійкості до вовчка Or_5 за допомогою молекулярних маркерів//Аграрний вісник причорномор'я.-2012.- Вип.61.-С.158-163.
 16. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений. – 1987. - 430с.
 17. Вольф В.Г. Статистическая обработка опытных данных. – М: Колос, 1966.-255с.
-

**ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ НА
ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОКРАСКИ И ОБРАЗОВАНИЕ
АНТОЦИАНОВ И ФЛАВОНОЛОВ В ЦВЕТКАХ *PETUNIA
HYBRIDA* HORT.**

**Широкова А.В.¹, Николаева Т.Н.², Ташлицкий В.Н.³,
Костяновский Р.Г.⁴, Кадоркина Г.К.⁴, Крутиус О.Н.⁴**

¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва

³Московский государственный университет, химический факультет,
Москва

⁴Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва

Эффективным инструментом при изучении процессов развития растений являются химические мутагены, несмотря на то, что между индукцией мутаций и ее визуальным определением лежит длинная цепь регуляторных звеньев [1]. И в этом случае весьма перспективно исследовать изменчивость окраски цветка, как наиболее вариабельного признака.

В большинстве семейств высших растений окраску цветка обуславливают антоцианы, флавоны и флавонолы, относящиеся к обширному классу флавоноидов - фенольных соединений $C_6-C_3-C_6$ ряда [2]. Большинство флавоноидов, описанных в литературе, представляет собой гликозиды, которые хорошо растворимы в воде и находятся в вакуолях клеток [3,4]. Они выполняют разные функции в растениях, суть которых сводится к поддержанию их жизнедеятельности и размножению. В цветках антоцианы, флавоны и флавонолы служат для привлечения опылителей, и таким образом, способствуют опылению и образованию семян [5].

Антоцианидины, являющиеся агликонами антоцианов, представляют собой производные катиона флавилия. Основные из них - это пеларгонидин, цианидин, дельфинидин, пеонидин, петунидин и мальвидин. Все они представлены в цветках покрытосеменных по отдельности или в различных сочетаниях, что и определяет целый спектр их оттенков: от оранжевого, розового, алого и красного до розовато-лилового, фиолетового и голубого [3]. Часто цианидин встречается в сочетании либо с пеларгонидином и/или пеонидином, либо с дельфинидином. Дельфинидину могут сопутствовать и его производные – мальвидин или петунидин.

Флавонолы также широко распространены в высших растениях. Они близки по структуре к антоцианидинам и придают

цветкам желтую или кремовую окраску [2, 5].

Нельзя забывать и о том, что окраска цветка обусловлена взаимодействием многих мультигенов, часто неаллельных. Гены, контролирующие отдельные ступени синтеза различных классов флавоноидов и их модификации, регуляторные гены, включающие и отключающие его «рукава», влияющие на концентрацию, поддерживающие pH, копигментацию и взаимодействие с ионами металлов уже клонированы во многих видах растений. Широко распространены различные типы модификации флавоноидов: гидроксилирование, метилирование гидроксильных групп, гликозилирование, ацилирование и другие реакции. [6]. Окраска цветка часто зависит от активности ферментов, которые гидроксилируют антоциановые молекулы в различных положениях. Однако, если гены для одного и более энзимов на ранних этапах флавоноидного метаболизма не функционируют, пигменты могут не образоваться. Гибридизация или воздействия мутагенами могут вызвать восстановление активности ферментов, отвечающих за синтез различных флавоноидов, заблокированных на разных его этапах у сортов и видов.

Целью нашей работы было изучение действия мутагенов на состав флавоноидных пигментов в цветках петунии, чтобы уже в поколении M_2 выделить формы наименее варьирующие по этому признаку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обработка семян мутагенами и получение форм с новыми окрасками. Семена петунии (*Petunia hybrida* Hort) сорта 'Snow Ball' были обработаны водными растворами мутагенов в следующих концентрациях: этилметансульфонат (ЭМС) 0.3; 0.2; 0.04; 0.03; 0.02; диметилсульфат (ДМС) 0.08; 0.04; 0.02; диэтилсульфат (ДЭС) 0.05; 0.025%. Контрольный вариант - замачивание в воде. Экспозиция составляла 16 часов. В каждом варианте было обработано по 300 семян петунии. Семена поколения M_2 и M_3 собирали отдельно с каждого растения.

Идентификация антоцианидинов. В период массового цветения лепестки растений фиксировали в стандартной смеси 97% этанола и концентрированной соляной кислоты (99:1). В надосадочной жидкости анализировали состав и содержание антоцианов. Была использована UPLC/MS система, состоящая из хроматографа Waters Acquity и тандемного квадрупольного МС-детектора TQD (Waters). Анализировали 2 мкл экстракта на колонке 0.21x5cm Column Acquity BEH C18 (1.7 μ m) при 35 $^{\circ}$ C и скорости потока 0.5 мл/мин с использованием элюентов А: 20 mM раствор

муравьиной кислоты в воде и В: 20 мМ раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле по градиентной программе 5-5%B (0.2 мин) 5-100%B (0.8 мин), 100-100%B (0.5 мин), 100-5%B (0.1 мин), 5-5%B (1.5 мин) с диодно-матричной УФ-детекцией (от 220 до 500 нм) и МС-детекцией (от 250 до 700 m/z). Параметры МС-детектора: Capillary Voltage 3kV, Cone Voltage 55 V, Extractor Voltage 5 V, RF Lens 0.2V, Source Temperature 120C, Desolvation Temperature 450 C, Desolvation Gas Flow 800 L/hr, Cone Gas Flow 50 L/hr, LM Resolution 1 - 14.0, HM Resolution 1 - 14.5, Ion Energy 1 - 0.4. В качестве стандартов-метчиков для идентификации антоцианов использовали экстракт из ягод черники.

Таблица 1.

Распределение антоцианидинов в цветках мутантных растений петунии (поколения M₂) и сорта 'Snow Ball'

№ образца	Окраска цветка	Название агликона и масса иона ⁽⁺⁾				
		Мальви-дин 331 m/z	Петуни-дин 317 m/z	Дельфини-дин 303 m/z	пеонидин 301 m/z	цианидин 287 m/z
SB контроль	Белая	-	-	-	-	-
33-7-11	Бледно-розовая	-	+	-	-	-
26-1-2	Бледно-розовая	-	-	-	-	+
33-7-7	Светло-розовая	-	+	-	-	-
46-4-14	Розовая теплая	-	+	-	+	+
46-4-2	Светло-сиренево-розовая	+	+	+	-	-
33-9-24	Сиренево-розовая	-	+	+	-	-
33-9-30	Сиренево-розовая	+	+	+	+	-
33-7-12	Светло-сиреневая	+	+	-	-	-
46-4-15	Сиреневая	+	+	+	-	-
33-9-7	Фиолетово-синяя с розовым центром	-	+	+	-	-
46-4-33	Фиолетовая	+	+	+	-	-

Наличие (+) или отсутствие (-) антоцианидина

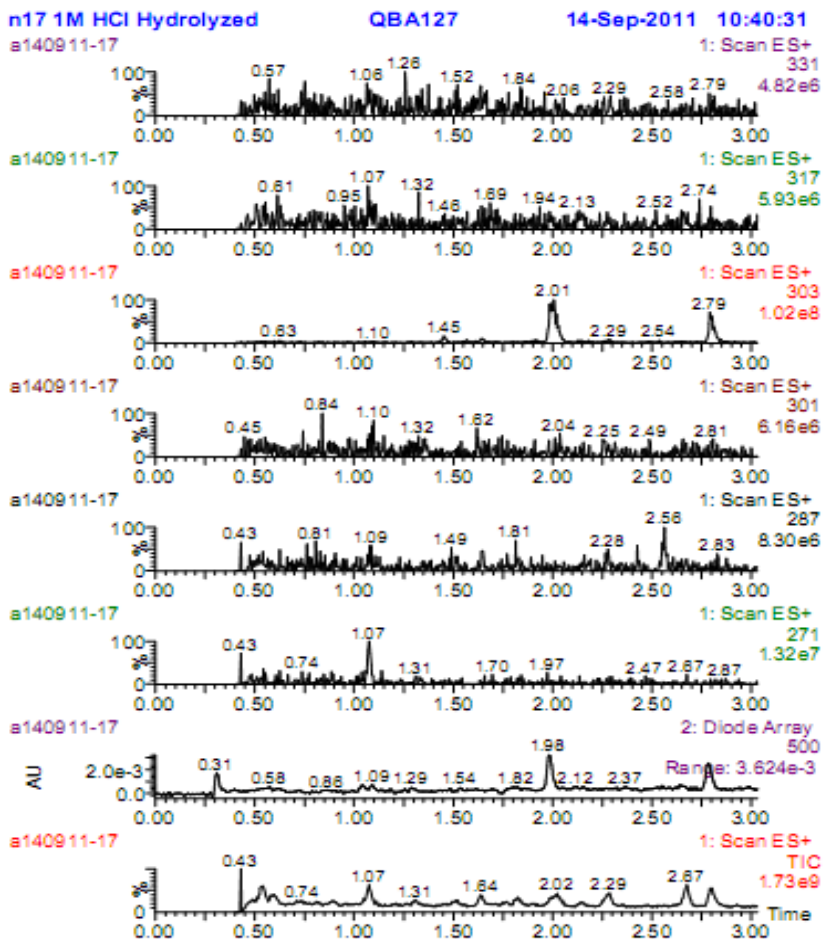


Рис. 1. ВЭЖХ/масспектрометрия антоцианидинов экстрактов венчиков *Petunia hybrida* дикого типа (сорт 'Snow Ball')

Идентификацию флавонолов осуществляли по специфической ярко-голубой или синей флуоресценции в УФ-свете (длины волн 254 и 366 нм) после разделения этанольных экстрактов методом тонкослойной хроматографии на целлюлозе в системе н-бутанол:уксусная кислота:вода в соотношении 4:1:5 (верхняя фаза) [7]. Также использовали качественные реакции: смесь 1%-ных водных растворов FeCl_3 и $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (на все классы

фенольных соединений) и 1%-ный раствор $AlCl_3$ в этаноле (на флавонолы) [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Окраска цветка. Влияние всех трех мутагенов проявилось уже в поколении M_1 , что проявлялось в значительных изменениях окраски цветков у большинства вариантов. После воздействия ДЭС формировались растения с бутонами окрашенными в розоватый или сиреневатый цвет, а открытые цветки были белыми (8%).

В случае действия ДМС (0.8%) наибольшее число растений имело светло-сиреневые, сиренево-розовые или розовые венчики (17 %). Растения с наиболее интенсивной окраской цветка (фиолетовой) были отмечены только при использовании 0.04% ДМС.

Кроме изменений основной окраски были получены формы с «сеткой» в зеве, зеленоватыми жилками, зеленоватым или лимонно-желтым горлом, центром венчика у растений сорта 'Snow Ball'. При использовании 0.02% ЭМС было обнаружено 11% растений с сиреневыми цветками с белым или бледно-желтым центром и желто-зеленым зевом, сиреневые цветки с темно-сиреневым кольцом вокруг зева, темно-сиреневыми с белым или зеленоватым зевом.

Таблица 2.

Распределение флавонолов в цветках мутантных растений петунии (поколения M_2) и сорта 'Snow Ball'

№ линии	Окраска цветка	Флавонолы		
		Кемпферол	Кверцетин	Мирицетин
контроль	Белая	+	+	+
26-11-1	Белая, с сиреневыми жилками	+	+	-
33-7-11	Бледно-розовая	—	+	+
46-4-2	Бледно-розовая	+	+	+
33-7-7	Светло-розовая	+	+	+
33-7-6	Светло-сиреневая	+	+	+

В потомстве растений M_2 с бледно-окрашенными цветками появились растения с цветками практически всех возможных

оттенков. Наиболее контрастные изменения происходили после обработки семян 0.08% ДМС. В этом случае цветки имели окраску от фиолетовой и синевато-сиреневой до розовой. Кроме того, для всех растений семьи 46-4 характерно пятно в центре, причем как окрашенного, так и белого венчика.

Состав флавоноидов. Изучение состава флавоноидов показало отсутствие в цветках петунии дикого типа антоцианов (табл.1, рис. 1) и присутствие флавонолов - кемпферола, кверцетина и мирицетина (табл.2). У мутантных растений в окрашенных цветках обнаружили, главным образом, мальвидин и петунидин, тогда как дельфинидин, цианидин и пеонидин встречались редко. В неокрашенной средней части цветков этих растений накапливались мирицетин, кверцетин и редко – кемпферол, как это отмечалось и у дикого типа.

Контрастные различия в окраске отдельных участков венчика цветка (розовая – фиолетовая с синим) могут быть обусловлены независимыми мутациями, приводящими к изменениям в экспрессии генов.

Предположение, что различные окраски в разных частях цветка связаны с различными концентрациями одного пигмента не верно, по данным анализа в разных частях цветков содержатся различные антоцианидины. Так, в синих с розовым центром цветках растения 33-9-7 обнаружены дельфинидин и петунидин. Эти результаты показывают, что в результате мутации синтез антоцианов в различных частях цветка может происходить независимо (несогласованно).

Таким образом, данные биохимического анализа показывают, что появление новых окрасок цветка у петунии было вызвано обратными мутациями, восстановившими нормальный синтез антоцианов [6] в цветках петунии, а различия в экспрессии генов биосинтеза в разных частях цветка [9], привело к появлению антоцианидинов в результате действия мутагенов ДМС и ЭМС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рапопорт И. А. Химические мутагены в селекционных и генетических опытах // В сб. Эффективность химических мутагенов в селекции. М.: Наука. 1976. С. 3-35.
2. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. М.: Наука. 1993. 205 с.
3. Харборн Дж. Введение в экологическую биохимию. М.: Мир. 1985. 311 с.
4. Харборн Дж., Симмондс К. Распространение фенольных агликонов в природе // Биохимия фенольных соединений. М.: Мир. 1968. С.70-139

-
5. Harborne J.B, Williams C.A. Anthocyanins and other flavonoids // Natural Prod. Reports. 1995. V. 12. P. 639-657.
 6. Holton T., Cornish E. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis // Plant Cel. 1995. V. 7. P.1071-1083.
 7. Запрометов М.Н., Николаева Т.Н. Способность изолированных хлоропластов из листьев фасоли осуществлять биосинтез фенольных соединений // Физиология растений. 2003. Т. 50. С. 699-705.
 8. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высшая школа. 1974. 250 с.
 9. Saito H.K., Kuchitsu Y., Ozeki M., Nakayama K. Spatiotemporal metabolic regulation of anthocyanin and related compounds during the development of marginal petaloid petals in *Petunia hybrida* (Solanaceae)//J. Plant Res. 2007. V.120. P. 563-568.
-

ВЛИЯНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАСТЕНИЙ НА ПРОДУКЦИЮ РЕЗВЕРАТРОЛА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВИНОГРАДА АМУРСКОГО *VITIS AMURENSIS* RUPR.

Шумакова О.А.^{1,2}, Киселев К.В.²

¹Школа естественных наук, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия, 8-914-715-00-49, shumakova_olga91@mail.ru;

²ФГБУН Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, Россия, 8-924-320-46-04, kiselev@biosoil.ru

Виноград, в том числе и дикий виноград амурский *Vitis amurensis* Rupr., содержит ряд БАВ, которые благоприятно воздействуют на организм человека. Среди таких веществ самое известное – это резвератрол (3,5,4'-тригидроксистерилбен). Резвератрол выделяется среди полифенолов растений своей мощной антиоксидантной активностью, которая превосходит активность витамина Е [1 - 2]. Существуют данные о положительном эффекте резвератрола на продолжительность жизни организмов [3 - 4]. В настоящее время на основе этого вещества уже создаются биологически активные добавки к пище.

Сегодня нет дешевого и эффективного способа получения резвератрола. В растениях содержание этого вещества невелико, а синтетические аналоги БАВ часто содержат токсичные примеси. Клеточные культуры винограда, при условии их высокой целевой продуктивности, могли бы стать альтернативным источником резвератрола. Однако известно, что содержание резвератрола в

клеточных культурах растений обычно ниже необходимого для использования этих культур в промышленном производстве стильбенов [5], поэтому следует индуцировать биосинтез резвератрола с помощью методов биотехнологии.

Одним из классических методов индукции синтеза вторичных метаболитов в культурах клеток растений является добавление предшественников. Поскольку биосинтез резвератрола идет фенилпропаноидным путем, мы предположили, что увеличение продукции резвератрола растительными клетками можно добиться стимулированием работы фенилпропаноидного пути на разных этапах биосинтеза. Фенилаланин-аммиак-лиаза (PAL) – первый фермент в этом пути, катализирует дезаминирование фенилаланина (Phe), превращая его в коричную кислоту. Поэтому присутствие Phe – важный фактор для начала биосинтеза резвератрола. Последним ферментом в биосинтезе резвератрола и его производных в фенилпропаноидном пути является стильбен синтаза (STS), который конденсирует три молекулы малонил-КоА с одной молекулой кумарил-КоА, конечным продуктом этой реакции является резвератрол. Кумарил-КоА образуется в результате формирования ферментом циннамат-4-гидроксилазой (C4H) тиоэфирной связи между карбоксильной группой СА и коэнзимом А. Поэтому мы предположили, что добавление Phe и СА должно активировать первый и последние этапы, соответственно, биосинтеза резвератрола, тем самым повысить продукцию резвератрола в культуре клеток винограда *V. amurensis*.

В работе мы использовали каллусную культуру клеток винограда V2, которая была получена сотрудниками лаборатории биотехнологии БПИ ДВО РАН в 2002 году из лианы дикого винограда *V. amurensis*. Растворы предшественников фенольных соединений добавляли в питательные среды в концентрации 0.1 мМ, 0.5 мМ и 2 мМ в асептических условиях [6]. Для количественного анализа экспрессии генов *PAL* и *STS* использовали ПЦР РВ. Определение качественного и количественного содержания стильбенов производилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [7].

Добавление Phe в питательные среды клеточных культур *V. amurensis* увеличивало продукцию резвератрола в 8.5 раз. При этом стоит отметить, что наблюдается тенденция на увеличение экспрессии всех генов *PAL* и 9 из 10 генов *STS*, которая зависела от количества добавляемого Phe и гена *STS* [6]. Добавление СА в питательные среды клеточной культуры *V. amurensis* увеличивало

продукцию резвератрола в 16 раз. При этом экспрессия генов *PAL* оставалась неизменной, либо наблюдалась тенденция на снижение экспрессии генов *PAL* с повышением концентрации СА [8]. Также наблюдалась тенденция на увеличение экспрессии 6 генов *STS* из 10. Экспрессии генов *STS8* и *ST10* достоверно ингибировались в 4-7 раз при добавлении 2 мМ СА [8].

Мы предполагаем, что увеличение продукции резвератрола в культуре V2 при добавлении Phe произошло за счет прямой активации фенилпропаноидного пути. Об этом свидетельствует достоверная активация экспрессии генов семейства *PAL* [6]. Добавление СА не ведет к активации всего фенилпропаноидного пути, опосредованную увеличением экспрессии генов *PAL*, как при добавлении Phe, потому что экспрессия четырех генов *PAL* из пяти достоверно ингибировалась. Мы предполагаем, что добавление СА в питательные среды повысила содержание резвератрола через выборочное воздействие на экспрессию отдельных генов *STS*, то есть через активацию последнего этапа в биосинтезе резвератрола – только отдельных реакций фенилпропаноидного пути [8].

Эти результаты показывают, что активация последних стадий фенилпропаноидного пути более эффективно действует на биосинтез резвератрола в клеточных культурах. Таким образом, мы показали, что эффективность СА в увеличении биосинтеза резвератрола выше, чем при добавлении Phe почти в 2 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lastra and Villegas. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications // *Molecular Nutrition and Food Research*. 2005. V. 49. P. 405-430.
2. Chang H.C., Chen T.G., Tai Y.T., Chen T.L., Chiu W.T., Chen R.M. Resveratrol attenuates oxidized LDL-evoked Lox-1 signaling and consequently protects against apoptotic insults to cerebrovascular endothelial cells // *Journal of cerebral blood flow and metabolism*. 2011. V. 31. P. 842-854.
3. Wood J.G., Rogina B., Lavu S., Howit. K., et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans // *Nature*. 2004. V. 430 P.686 –689.
4. Giovannelli L., Pitozzi V., Jacomelli M., Mulinacci N., Laurenzana A., Dolara P., Mocali A. Protective Effects of Resveratrol Against Senescence-Associated Changes in Cultured Human Fibroblasts // *Journals of gerontology series a-biological sciences and medical sciences*. 2011. V. 66 P. 9-18.
5. Donnez D., Jeandet P., Clement C., Courot E. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms // *Trends in biotechnology*. 2009. V. 27 P. 706-713.
6. Киселев К.В., Шумакова О.А., Маняхин А.Ю. Влияние

-
- предшественников фенольных соединений растений на биосинтез резвератрола в культурах клеток винограда амурского *Vitis amurensis* Rupr. // Прикладная Биохимия и Микробиология. 2012. в печати.
7. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. The rolB gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells // J. Biotechnol. 2007. V. 128 P. 681-692.
 8. Shumakova O.A., Manyakhin A.Y., Kiselev K.V. Resveratrol content and expression of phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase genes in cell cultures of *Vitis amurensis* treated with coumaric acid // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2011.V. 165 P.1427-1436.
-

УДК 581.143.6; 581.2.07;632.938

ИНДУЦИРОВАННОЕ НАКОПЛЕНИЕ ЛИГНИНА В СИСТЕМЕ «РАСТЕНИЕ - ГРИБНОЙ ПАТОГЕН»

**Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Заикина Е.А., Сурина О.Б.,
Ахатова А.Р.**

ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,
Уфа, Россия, (347) 2356088, e-mail: yarullina@bk.ru

Накопление и отложение лигнина рассматривается как один из важных механизмов защиты растительных клеток от патогенных микроорганизмов [1]. В настоящее время широко обсуждается участие активных форм кислорода (АФК) в формировании и проявлении многообразия защитных реакций растений к фитопатогенам [2,3]. Эффективными индукторами защитных реакций растений, механизмы защитного действия которых связывают с генерацией АФК являются хитоолигосахариды, салициловая (СК) и жасмоновая (ЖК) кислоты, фунгициды системного действия [4]. Доказано, что СК - интермедиат НАДФН-оксидазной системы, - стимулирует защитные реакции растений против биотрофных патогенов посредством регуляции активности ферментов про-/антиоксидантной системы, укрепления клеточной стенки за счет отложения лигнина. Действие ЖК – интермедиата липоксигеназной сигнальной системы, - изучено в растениях, инфицированных некротрофными патогенами. В таких растениях отмечена активация ингибиторов протеиназ и ферментов антиоксидантной защиты [5]. Тем не менее, исследований, касающихся воздействия сигнальных молекул СК и ЖК на генерацию АФК и накопление лигнина все еще не достаточно. Мало известно о патосистемах, в которых патоген характеризуется

смешанным типом паразитирования (грибы гемобиотрофы), или является некротрофом. В связи с этим целью работы явилось обнаружение особенностей воздействия СК и ЖК на интенсивность накопления лигнина и продукцию H_2O_2 при инфицировании растений пшеницы возбудителями грибных болезней с гемобиотрофным и некротрофным типом паразитизма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В качестве объектов исследования были использованы проростки пшеницы *T. aestivum* L. сорта Жница, выращенной из предобработанных (3 ч) растворами 10^{-6} М салициловой (ч.д.а., «Реахим», Россия) и 10^{-7} М жасмоновой (ч.д.а., «Реахим», Россия). Полностью развернутые листья 7-суточных проростков пшеницы срезали, помещали во влажную камеру на фильтровальную бумагу, срезы прикрывали ватой, смоченной в растворе бензимидазола (40 мг/л). Отрезки листьев инокулировали суспензией спор из расчета 10^6 спор/мл. Инокулированные листья выдерживали при комнатной температуре в темноте в течение 24 часов, после чего переносили на светоплощадку с фотопериодом 16 ч/сут. Симптомы развития болезни регистрировали в течение 5-и суток после инокуляции листьев.

Микробный материал. Для инфицирования листьев были использованы различающиеся по агрессивности штаммы гемобиотрофного патогенного гриба *Septoria nodorum* Berk. и некротрофного возбудителя корневой гнили *Bipolaris sorokiniana* Ram. В предварительных опытах обнаружено, что штамм 9МН проявлял высокую, а штамм 4ВД низкую степень агрессивности к сортам яровой мягкой пшеницы Башкирская 24, Саратовская 29, Жница, Омская 9.

Выявление локализации лигнина в листьях. Накопление лигнина изучали по автофлуоресценции фиксированных в смеси 96 % этанола и уксусной кислоты (3:1) клеток листьев. При микроскопическом исследовании использовали возбуждающий светофильтр с эмиссией 380 нм и пропускающий фильтр с длиной волны 460 нм. Материал предварительно обрабатывали 50 мМ NaOH (15 мин) для удаления феруловых кислот. В каждом варианте изучали по 5-15 зон инфицирования.

Определение продукции и концентрации перекиси водорода в растениях. Для выявления продукции H_2O_2 в зоне роста грибов отрезки листьев инфильтрировали раствором диаминабензидина (ДАБ) с добавлением щавелевой кислоты в течение 30 мин [6], затем фиксировали в 96° этиловом спирте. Содержание H_2O_2

оценивали на спектрофотометрическими методами при 560 нм с использованием ксиленолового оранжевого.

Молекулярные методы исследования. Для анализа экспрессии гена каталазы с помощью программы «Primer Select» (DNASar) были подобраны высокоспецифичные праймеры к одному из генов каталазы гриба *S. nodorum* SNOG_03173, фланкирующие фрагмент размером 485 п.н. внутри 6 экзона гена (www.broadinstitute.org).

Статистическая обработка. Эксперименты включали не менее 3-х биологических повторов при анализе биохимических показателей и не менее 15-и при анализе экспрессии. На рисунках приведены средние результаты опыта и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Патосистема «пшеница – возбудитель септориоза». Наблюдения за развитием гриба *S. nodorum* показали, что этот патоген образовывал на листьях пшеницы бурые пятна, увеличивающиеся по мере развития инфекционного процесса. Результаты наблюдений, сделанные через 24, 48 и 72, 120 ч после инокуляции листьев, показали, что развитие высокоагрессивного штамма возбудителя септориоза *S. nodorum* на листьях пшеницы было более интенсивным, чем развитие низкоагрессивного штамма. Предобработка пшеницы СК и ЖК значительно уменьшала развитие обоих штаммов гриба на протяжении опыта.

В контрольных неинфицированных листьях слабая зеленая флуоресценция, характерная для отложений лигнина, наблюдалась в клеточной стенке ксилемы и замыкающих клеток устьиц. Развитие возбудителя септориоза через 48 ч после инокуляции сопровождалось появлением в зоне роста патогена интенсивной зеленой флуоресценции в устьичных клетках и в прилежащих к ним эпидермальных и мезофилльных клетках. При этом при инфицировании растений высокоагрессивным штаммом количество флуоресцирующих клеток в листьях оказалось меньше, чем в варианте с инфицированием листьев низкоагрессивным штаммом. То есть, патосистема «пшеница – низкоагрессивный штамм *S. nodorum*» характеризуется более интенсивной лигнификацией клеточной стенки в сравнении с патосистемой «пшеница – высокоагрессивный штамм *S. nodorum*». В варианте опыта с предобработкой растений СК при использовании как низкоагрессивного, так и высокоагрессивного штаммов количество флуоресцирующих клеток возрастало, однако в варианте опыта с предобработкой растений ЖК этот параметр соответствовал уровню инфицированного контроля.

Таблица 1.

Содержание H_2O_2 в листьях пшеницы сорта Жница при инфицировании штаммами гриба *S. nodorum* с различной агрессивностью

Вариант	Время после инфицирования, ч		
	24	48	120
H_2O_2 , мкМ/мг сырой массы			
Контроль	13.4 ± 0.4	15.3 ± 0.5	16.2 ± 1.1
штамм 9МН	17.1 ± 0.7	18.7 ± 0.9	23.6 ± 1.5
штамм 4 ВД	33.2 ± 2.3	29.2 ± 1.7	27.9 ± 1.8

Известно, что важную роль, как в инициации, так и интенсификации процессов лигнификации играет H_2O_2 . Исследования показали, что в ответ на инфицирование возбудителем септориоза происходит повышение уровня H_2O_2 в растительных тканях в зависимости от агрессивности штамма (таблица).

Так в листьях, зараженных высокоагрессивным штаммом 9 МН, концентрация H_2O_2 хотя и была выше, чем в контрольном варианте, но не превышала уровень последнего более чем на 25% на протяжении всего опыта. Напротив, в листьях пшеницы, инфицированных низкоагрессивным штаммом гриба 4 МН, содержание H_2O_2 было в 2 раза выше контрольного варианта.

В настоящее время показана индуцирующая роль H_2O_2 в развитии защитного ответа, в том числе за счет усиления процессов лигнификации в растениях. В то же время известно, что низкая ее концентрация способствует росту патогенов. Для снижения уровня H_2O_2 в зоне инфицирования грибы используют механизмы, связанные с активацией каталазы [7].

Как видно из рис. 1., при инфицировании растений пшеницы высокоагрессивным штаммом 9МН, экспрессия гена каталазы проявлялась уже к 6-му часу после инфицирования и поддерживалась на относительно высоком уровне на протяжении всего опыта.

В то же время, при заражении пшеницы слабоагрессивным штаммом 4ВД экспрессия этого гена выявлялась в растительных тканях только через 24 часа после инфицирования. В дальнейшем (48 ч после инокуляции) экспрессионная активность гена каталазы выявлялась незначительно.

Патосистема «пшеница – возбудитель гельминтоспориозной корневой гнили». Наблюдения за развитием другого гриба, *B. sorokiniana*, показали, что этот патоген

образовывал на листьях пшеницы бурые пятна, также как это свойственно *S. nodorum*. Микроскопический анализ влияния СК и ЖК на рост *B. sorokiniana* показал, что оба исследуемых соединения ограничивали рост патогена на листьях через 24, 36 и 48 ч после инокуляции. Рост гриба сопровождался интенсивной продукцией H_2O_2 в гифах гриба и контагирующих с ними устьичных клетках, а также появлением интенсивной зеленой флуоресценции в зоне роста гриба в эпидермальных и мезофилльных клетках, особенно ярко это проявилось в варианте с предобработкой растений СК.

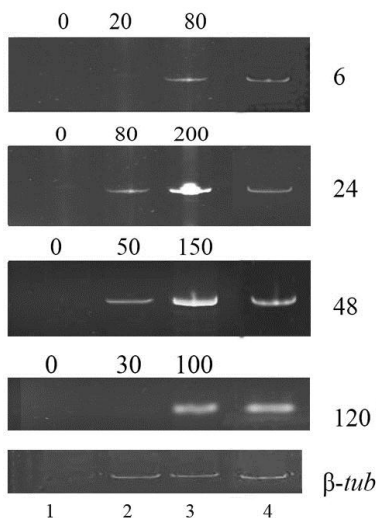


Рис. 1. Экспрессия гена каталазы SNOG_03173.1. гриба *S. nodorum* в листьях пшеницы сорта Жница: 1 – контроль (неинфицированные растения); 2 – инфицирование слабоагрессивным штаммом гриба 4ВД; 3 – инфицирование высокоагрессивным штаммом гриба 9МН; 4 – амплификаты ДНК *S. nodorum*. Цифрами представлен уровень экспрессии гена каталазы в %

Таким образом, изучение влияния СК и ЖК на интенсивность роста *S. nodorum* и *B. sorokiniana* на листьях пшеницы показало, что оба исследуемых соединения повышали устойчивость растений к патогенам. В варианте с применением СК важными защитными реакциями растений явились интенсивная продукция перекиси водорода и накопление лигнина в клеточной стенке в зоне роста грибов. Подавление защитного ответа у растений пшеницы при инфицировании *S. nodorum* может быть обусловлено усиленной экспрессионной активностью гена каталазы гриба, что отразилось на снижении уровня H_2O_2 и интенсивности процессов лигнификации в растительных тканях.

Работа выполнена при финансовой поддержке

РФФИ_поволжье_а № 11-04-97037, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы проект ГК № 16.740.11.0061 и П-339.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hawkins S., Boudet A. Defense lignin and hydroxycinnamyl alcohol dehydrogenase activities in wounded *Eucalyptus gunnii* // *Forest Path.* 2003. V. 33. P. 91–104.
2. Тарчевский И.А. Сигнальные системы растений // М.: Наука, 2002. 294 с.
3. Daudi A. Reactive Oxygen Species in Plant–Pathogen Interactions // In *Signaling and Communication in Plants: Book 2. Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*, Eds. del Río L.A., Puppo A., Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009. P. 113-133.
4. Тютчев С.Л. Научные основы индуцирования болезнеустойчивости растений. С.-Пб.: ООО «Инновационный центр защиты растений» ВИЗР, 2002. 328 с.
5. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // *Trends in Plant Science.* 2002. V. 7. P. 405-410.
6. Caliskan M., Cuming A.C. Spatial specificity of H₂O₂-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination // *Plant Journal.* 1998. V. 15. P. 165-171.
7. Aver'yanov A.A., Lapikova V.P et al. Suppression of early stages of fungus development by hydrogen peroxide at low concentrations // *Plant Pathology J.* 2007. V.6 (3). P. 242-247.

ВЛИЯНИЕ АБИОТИЧЕСКИХ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ И РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

**Яхин О.И.¹, Лубянов А.А.^{1,2}, Гареева Г.Б.¹, Батраев Р.А.¹,
Маркелова Е.М.¹, Яхин И.А.¹, Калимуллина З.Ф.¹, Яппаров И.Ф.¹**

¹ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН,
Уфа, Россия, тел. 8(347)2356088, yakhin@anrb.ru

²Уфимский филиал ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный
университет»

Фенольные соединения являются вторичными метаболитами, которые участвуют в различных физиологических процессах, связанных с ростом и устойчивостью растений. В последние годы активно исследуется участие фенольных соединений в формировании ответных реакций высших растений на действие

абиотических стрессовых факторов.

В настоящей работе рассматривались следующие стрессовые факторы: различные виды засоления (хлоридное, сульфатное, карбонатное), ионы тяжелых металлов (ацетаты кадмия, свинца, цинка), гипотермия, водный стресс и использовались регуляторы роста семейства «стифун», а также эпин-экстра и салициловая кислота. Объекты исследований - растения озимой пшеницы *Triticum aestivum* L. сорта Альбина 45, озимой ржи *Secale cereale* L. сорта Чулпан 7, лука-батунa *Allium fistulosum* L. сорта Русский зимний.

В исследованиях было рассмотрено влияние стрессовых факторов и биорегуляторов на ключевые аминокислоты, являющиеся предшественниками фенольных соединений, обладающих антиоксидантными свойствами и участвующих в процессе лигнификации растительных клеток. Аминокислоты шикиматного пути – тирозин и фенилаланин при действии регуляторов роста семейства «стифун» значительно возрастали. Увеличение содержания тирозина и фенилаланина – аминокислот, являющихся у пшеницы предшественниками ксилана, могло быть связано с усилением процессов элонгации стебля в фазе кущения. Так, в полевых экспериментах применение стифуна приводило к увеличению длины, диаметра и толщины стенок междоузлий растений пшеницы.

Как показали результаты наших исследований, регуляторы роста оказали влияние на содержание фенольных соединений у изучаемых растений. В зависимости от природы и концентрации действующего вещества наблюдалось либо возрастание их суммарного содержания, либо уменьшение.

Следует отметить, что в наших экспериментах при экспозиции растений пшеницы на растворе высокой концентрации ацетата кадмия существенно увеличивалось содержание пролина, тирозина, фенилаланина. Стифун в условиях действия кадмия на проростки пшеницы изменял содержание свободных аминокислот. При действии регулятора роста повышалась по сравнению с вариантом, где применяли только ацетат кадмия, концентрация пролина, и особенно сильно - фенилаланина.

У растений озимой пшеницы и озимой ржи ацетат кадмия увеличивал содержание фенольных соединений в высокой концентрации в побегах и корнях. При действии высоких доз кадмия и предобработке регуляторами роста содержание фенольных соединений еще более возрастало по сравнению с действием только кадмия.

Ацетат свинца при высокой концентрации существенно повышал общее содержание фенольных соединений в побегах и корнях растений озимой ржи. При этом наблюдалось сильное ингибирование роста растений, особенно корневой системы. При уменьшении концентрации наблюдалась менее выраженные тенденции увеличения уровня фенольных соединений по сравнению с действием максимальной дозы ацетата свинца.

По мнению исследователей активация метаболизма клеточных антиоксидантов является общим стрессовым ответом, вызванным тяжелыми металлами. Фенольные соединения могут участвовать в формировании устойчивости растений к действию тяжелых металлов. Так, согласно литературным данным, при токсическом действии Cd в корнях проростков кукурузы наблюдалось повышение уровня растворимых фенольных соединений: содержание фенольных соединений при действии Cd в концентрации 10×10^{-5} М Cd^{2+} было максимальным и снижалось при действии 15×10^{-5} и 20×10^{-5} М, но было выше уровня контроля. Поступление Cd усиливало в злаках образование полифенолов, особенно трицина, а в крестоцветных – как полифенолов, так и тиолов [1, 2]. При изучении образования фенольных соединений в каллусных культурах чайного растения листового, стеблевого и корневого происхождения при действии Cd (6.3×10^{-5} М) происходило увеличение содержания фенольных соединений в корневом и стеблевом каллусах на 50 и 87%, тогда как в листовом происходило незначительное снижение, при действии 10.6×10^{-5} М Cd увеличение составило превышение на 13 и 6%, соответственно, в листовом происходило снижение на 20% [3]. Также при действии Cd происходило возрастание уровня флаванов в каллусах корневого и стеблевого происхождения, в листовом каллусе накопление флаванов в этом случае было ниже, чем в контроле. Наблюдалось возрастание содержания лигнина (полимерная форма фенольных соединений) в корневом и стеблевом каллусах, тогда как в листовом – не изменялось. Авторы сделали вывод, что каллус корневого происхождения был более устойчив к действию кадмия [3]. В кончиках корней проростков инкубированных на 5 мкМ растворе CdSO_4 концентрация лигнина не изменялась по сравнению с контролем, тогда как при действии 50 мкМ Cd происходило существенное возрастание лигнина [4]. Исследователями было показано, что у *Avena strigosa*, *Crotalaria juncea* L. и *Tagetes erecta* L. при действии CdCl_2 накопление фенольных соединений происходит по-разному [5]. Так, содержание растворимых фенольных соединений в листьях *T.*

erecta уменьшалось при действии Cd, тогда как в листьях *C. juncea* удваивалось при действии раствора Cd концентрацией 5 мг/л, подобные эффекты Cd были в листьях и стеблях *C. spectabilis*, в *A. strigosa* также наблюдалось некоторое возрастание растворимых фенольных соединений. По мнению исследователей, результаты по содержанию фенольных соединений и активности ферментов могут свидетельствовать о том, что кадмий в листьях *C. juncea* увеличивает лигнификацию, что может являться механизмом устойчивости к кадмию, вероятно задерживая его во фракции клеточных стенок [5]. С другой стороны возможная роль избыточного увеличения фенольных соединений при накоплении кадмия в *C. juncea* может заключаться в формировании комплексов кадмий-фенольные соединения в вакуолях, как показано для кадмий-устойчивых видов.

Как свидетельствуют полученные нами результаты, стифун проявлял протекторные свойства при цитотоксическом действии кадмия, что выражалось в стабилизации процессов деления и растяжения клеток растений пшеницы. Также показано, что стифун уменьшал уровень спонтанного мутирования у растений *Allium fistulosum*, *Triticum aestivum*. При применении стифуна происходило уменьшение повреждающего действия кадмия на клетки корневых меристем лука-батун, что проявлялось в снижении количества всех типов хромосомных aberrаций, наряду с этим он уменьшал уровень aberrаций хромосом у лука-батун по сравнению с контролем. Происходило снижение при действии стифуна общего уровня хромосомных aberrаций по сравнению с действием только кадмия. При установлении зависимости «время-эффект» выявлено уменьшение стифуном уровня хромосомных aberrаций по сравнению с действием только кадмия. Эпин-экстра также снижал количество aberrаций, индуцируемых кадмием. Таким образом, стифун и эпин-экстра проявляли протекторное действие на растениях *Allium fistulosum*, выражающееся в уменьшении кластогенного и анеугенного эффектов кадмия, при их применении как до его воздействия, так и при совместной экспозиции с ацетатом кадмия.

Полученные нами данные позволяют предполагать, что в протекторное действие изучаемых регуляторов роста в условиях кадмиевого стресса могла быть вовлечена антиоксидантная система растений. По мнению исследователей, накопление растворимых полифенолов в тканях может занимать важное место в антиоксидантной системе растений. Следует отметить, что полифенольные соединения могут проявлять антимуtagenную

активность [6].

Ацетат кадмия повышал содержание фенольных соединений у проростков *Allium fistulosum*. Изменение уровня фенольных соединений при действии регуляторов роста зависело как от используемой концентрации, так и способа их применения (обработка проростков в течение 1 часа или экспозиция в течение 18 часов). Следует отметить, что была выявлена тенденция повышения содержания фенольных соединений в вариантах с применением регуляторов роста на фоне ацетата кадмия по сравнению с действием только кадмия.

Действие хлоридного засоления проявлялось в возрастании уровня фенольных соединений в побегах озимой пшеницы и озимой ржи при максимальных исследованных концентрациях.

При сульфатном засолении все изученные концентрации увеличивали содержание фенольных соединений в побегах растений. В корнях наблюдалось уменьшение уровня фенольных соединений. У растений озимой ржи наблюдалась сходная тенденция. Все использованные концентрации соли были ростингибирующими на обеих культурах.

При действии карбонатного засоления также наблюдали возрастание уровня фенольных соединений в побегах и уменьшение – в корнях при действии всех 3 концентраций соли.

Регулятор роста стифун увеличивал содержание фенольных соединений в проростках пшеницы. При этом он повышал показатели линейных размеров, сырой и сухой массы растений.

Различные абиотические стрессы вызывают сверхпродукцию активных форм кислорода в растениях, которые являются высоко реактивными и токсичными, что приводит в конечном итоге к окислительному стрессу [7]. В целом вовлечение активных форм кислорода в различные метаболические процессы в растительных клетках может иметь общее значение при различных видах стресса. Учитывая выявленную в данной работе полифункциональность регуляторов роста в условиях целого ряда абиотических стрессовых факторов - водного дефицита, хлоридного засоления, гипотермии, тяжелых металлов, гербицидов, в дальнейших экспериментах при исследованиях механизмов их действия будет проведено более детальное изучение влияния данных регуляторов роста на антиоксидантную систему растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинина Ю.Ю., Дульцева Г.Г., Палесский С.В., Скубневская Г.И. Изучение химической природы защитной реакции растений на

-
- избыточное содержание кадмия в почве // Экологическая химия. 2003. 12. № 1. С. 41 – 46.
2. Скубневская Г.И., Дульцева Г.Г., Дубцова Ю.Ю. Координационные взаимодействия кадмия с органическими лигандами: хроматографический анализ // Экологическая химия. 2004. 13. № 1. С. 3 – 5.
 3. Uraguchi S., Watanabe I., Yoshitomi A., Kiyono M., Kuno K. Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in novel Cd-accumulating crops, *Avena strigosa* and *Crotalaria juncea* // J. Exp. Bot. 2006. V. 57. N. 12. P. 2955–2965.
 4. Алекперов У.К. Антимутагенез: Теоретические и практические аспекты. М.: Наука, 1984. – 104 с.
 5. Загоскина Н.В., Гончарук Е.А., Алявина А.К. Изменения в образовании фенольных соединений при действии кадмия на каллусные культуры, инициированные из различных органов чайного растения. // Физиология растений. 2007. 54. С. 267-274.
 6. Schützendübel A, Schanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold D, Polle A. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots // Plant Physiol. 2001. 127. P. 887–898.
 7. Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiology and Biochemistry. 2010. V. 48. P. 909 – 930.
-

РАЗДЕЛ 3.

**ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ И
ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В МЕДИЦИНЕ И
ПРОМЫШЛЕННОСТИ**

УДК 615.322 : 615.254.1

ПОЛИФЕНОЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ РАСТЕНИЙ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ДИУРЕТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

Азарова О.В., Брюханов В.М., Зверев В.В., Лампатов В.В.

ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет»,
Барнаул, Россия, тел.: (+7) 3852–26-06-62, kunaza00@mail.ru

В рамках решения проблемы обеспечения растительным сырьем динамично развивается биотехнологический метод получения фитопрепаратов на основе редких и исчезающих видов растений с ограниченным ареалом распространения. В результате скрининговых исследований лаборатории по изучению лекарственных растений Алтайского государственного медицинского университета были отобраны перспективные при лечении воспалительных заболеваний почек клеточные культуры, содержащие полифенольные соединения различных групп. В данной работе представлен фрагмент комплексного исследования фармакологической активности полифенолов клеточных культур, относящийся к изучению их влияния на выделительную функцию почек.

МЕТОДИКА

Объектами исследований служили полифенольные фитокомплексы, извлеченные из культуры клеток незабудочника шелковистого *Eritrichium sericeum* Lehm. (культура Er-1), воробейника краснокорневого *Lithospermum erythrorhizon* Siebold & Zucc. (штамм ВК-39 F) (Boraginaceae); марены сердцелистной *Rubia cordifolia* L. RC-1 (Rubiaceae); маакии амурской *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. (Fabaceae) (клеточный штамм А-18). Технология культивирования клеточной массы из вегетативных и репродуктивных органов дикорастущих растений дальневосточного региона разработана в Биолого-почвенном институте Дальневосточного отделения РАН. Штаммы марены (ВСКК-ВР № 60) и воробейника ВСКК-ВР № 36 депонированы в Каталоге коллекционных штаммов Всероссийской коллекции культур клеток высших растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Выделение, очистка и анализ полифенолов клеточных культур проведены лабораторией химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского Института биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН.

Экстрактивный комплекс на основе штамма маакии А-18 содержит 20 изофлавоноидов: изофлавоны и птерокарпаны, а

также их моно-, диглюкозиды и малонилгликозиды [1]. Препараты незабудочника и воробейника представляют собой сухие экстракты клеточной культуры, содержащие олигомеры кофейной кислоты: розмариновую кислоту, рабдозин и эритрин, с суммарным содержанием не менее 70,5% [2]. Из культуры клеток марены получен суммарный очищенный препарат семи антрахинонов с доминированием мунистина и пурпурина [3]. В дальнейшем суммарные препараты на основе полифенолов клеточных культур будут именоваться полифенольные комплексы клеточной культуры (ПФКК).

Фармакологическое исследование проводили на беспородных белых крысах обоего пола массой 180-210 г. С целью выяснения механизма действия полифенолов на клубочковую фильтрацию и канальцевый транспорт электролитов определяли показатели диуретической и салуретической активности, а также экскрецию креатинина для групп крыс, получавших однократно препараты ПФКК марены, маакии и незабудочника в суточной дозе 100 мг/кг и ПФКК воробейника в дозе 250 мг/кг. ПФКК вводили внутривентрикулярно в смеси с 2% крахмальной взвесью в течение 14 дней. Статистическую обработку результатов проводили методом вариационных рядов с использованием критериев Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мочегонное действие реализовалось в достоверном увеличении суточного диуреза на фоне применения ПФКК воробейника, незабудочника и марены. Вызванная препаратами полиурия достигала максимума к десятому дню применения препарата воробейника и к восьмому дню введения препарата незабудочника, превышая исходный уровень мочеотделения на 64% ($p < 0,05$) и на 104 % ($p < 0,001$) соответственно, и оставалась стабильно высокой спустя два дня после отмены препаратов. Мощные диуретические свойства продемонстрировал фитокомплекс марены, применение которого сопровождалось последовательным развитием диуретической реакции, достигающей пика на четвертый день применения, когда уровень мочеотделения в 3,2 раз превосходил исходный. Затем диурез стабилизировался на значениях, в 2,5...2,9 раза превышавших контрольные, и сохранялся в этих пределах после прекращения введения ($p < 0,05$).

При изучении влияния на канальцевый транспорт электролитов обнаружено усиление салуретической функции почек. Наиболее существенное воздействие на натрийурез оказали полифенолы маакии и незабудочника. Более выраженным влиянием на экскрецию ионов натрия, окончательно

сформировавшимся к концу первой недели эксперимента, обладал препарат незабудочника. Начиная с восьмого дня введения последнего, был зарегистрирован рост натрийуреза, достоверно превышающий контрольный уровень в 1,5 раза ($p=0,005$).

Клеточные культуры марены и незабудочника перспективны в качестве фитоагентов, сдерживающих потерю калия при угнетении канальцевой реабсорбции. Уровень манифестации калийуреза под действием ПФКК незабудочника (48%, $p=0,005$) уступал по степени выраженности аналогичного показателя для ПФКК воробейника (76%, $p=0,004$), что позволяет сделать вывод о более слабом проявлении побочного эффекта препарата незабудочника. В отношении экскреции калия отмечено отсутствие достоверных изменений после четвертого дня введения ПФКК марены и стагнация показателей калийуреза во вторую неделю эксперимента, когда величина калийуретического индекса практически не изменялась и была сопоставима с исходным уровнем.

ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении соотношения двух процессов: канальцевой реабсорбции и клубочковой фильтрации, получены данные о преимущественном механизме действия исследуемых полифенолов и локализации эффекта на уровне нефрона. Для фитокомплексов незабудочника и воробейника развитие мочегонного эффекта обусловлено преимущественным усилением клубочковой фильтрации с дополнительным угнетением канальцевой реабсорбции воды преимущественно в нисходящем отделе петли Генле. Изофлавоноиды маакии оказывают наиболее многофакторное воздействие на функцию почек. С одной стороны, это сосудистое воздействие, реализующееся посредством расширения почечных артерий и повышения почечного кровотока. Менее выражено прямое угнетающее действие изофлавоноидов маакии на процессы реабсорбции в почечных канальцах. Аналогичное действие оказывают полифенолы марены.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fedoreyev S.A., Bulgakov V.P., Grishchenko O.V., Veselova M.V., Krivoschekova O.E., Denisenko V.A., Tchernoded G.K., Zhuravlev Yu.N. Isoflavonoid composition of a callus culture of the relict tree *Maackia amurensis* // J. Agric. Food Chem. 2008. Vol. 56, N 16. – P. 7023–7031.
2. Fedoreyev S.A., Veselova M.V., Krivoschekova O.E., Mischenko N.P., Denisenko V.A., Dmitrenok P.S., Glazunov V.P., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Zhuravlev Yu.N. Caffeic acid metabolites from *Eritrichium sericeum* cell cultures // Planta Med. 2005. Vol. 71, N 5. P. 446–451.

-
3. Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Glazunov V.P., Tchernoded G.K., Bulgakov V.P., Zhuravlev Y.N. Anthraquinone production by callus cultures of *Rubia cordifolia* // Fitoterapia. 1999. V. 70. P. 552–557.
-

УДК 633.88

К ВОПРОСУ О СОДЕРЖАНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРОДУКТАХ ПЕРЕРАБОТКИ СВЕЖЕГО СЫРЬЯ ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ

Бабаева Е.Ю., Петрова А.Л., Загуменников В.Б.

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и
ароматических растений РАСХН, Москва, Россия, тел.: 8-905-753-0081

В России в настоящее время культивируется более 50 видов лекарственных и ароматических растений. Исследования последних лет показывают, что своими целебными свойствами препараты из лекарственного растительного сырья (ЛРС) обязаны оптимальному соотношению и гармоничному воздействию комплекса содержащихся в них биологически активных веществ (БАВ). В связи с этим БАВ из ЛРС легче включаются в процессы жизнедеятельности и усваиваются организмом. Большим преимуществом фитопрепаратов является хорошая переносимость в терапевтических дозах, отсутствие побочных эффектов, в том числе и аллергических реакций. В связи с этим препараты из ЛРС используются для длительного лечения в реабилитационный период и для профилактики у всех возрастных категорий.

К недавно возделываемым, но широко изучаемым растениям можно отнести эхинацею пурпурную (*Echinacea purpurea* Moench). Она служит для получения нескольких видов ЛРС: травы, травы свежей и корневищ с корнями. Известно более 70 препаратов, созданных на основе сырья эхинацеи, применяемых в качестве, стимулирующих иммунитет, противовоспалительных и антибактериальных средств. Стандартизируются все виды сырья по содержанию суммы производных оксикоричных кислот в пересчете на цикориевую кислоту. [1]

После получения сока из травы эхинацеи пурпурной свежей на фармацевтических предприятиях остается жом, который в настоящее время не находит применения. Но в нем, по предположениям, еще содержится определенное количество БАВ. Он может служить перспективным источником производных

оксикоричных кислот в виде лечебно-кормовой добавки для крупного рогатого скота и птицы с целью повышения уровня их иммунитета. Это перспективно как элемент безотходной технологии при переработке травы свежей на сок. В связи с этим большой научный и практический интерес в области кормления животных представляет изучение отходов переработки травы эхинацеи пурпурной свежей после удаления сока. Листья эхинацеи пурпурной свежие можно получить от растений 1 года в конце вегетационного сезона, и они также могут служить сырьем для получения сока.

Объектами исследования данной работы служили: 1. сырье «эхинацеи пурпурной трава свежая» и «эхинацеи пурпурной листья свежие», полученное от растений 4, 5, 6 и 7 гг. вегетации, заготовленное в фазу массового цветения на территории опытного севооборота ВИЛАР РАСХН, г. Москва в 2010 г.; 2. жом, полученный после отжатия сока из травы и листьев эхинацеи свежих.

Количественное определение суммы производных оксикоричных кислот в пересчете на цикориевую кислоту в жоме проводили согласно методике, описанной в ТУ 9373-142-04868244-2008 «Эхинацеи пурпурной трава свежая» [2]. Использовали спектрофотометр СФ-46. Все анализы проводили не менее чем в трёхкратной повторности. Перед этим анализ на содержание действующих веществ был проведен в исходном сырье. Все образцы травы свежей соответствовали требованиям нормативного документа. Математическая обработка данных проведена методом дисперсионного анализа двухфакторного опыта.

Исходя из растворимости оксикоричных кислот и их производных, можно предположить, что основная часть этих фенольных соединений переходит в сок. Анализ содержания суммы производных оксикоричных кислот в перече́те на цикориевую кислоту в жоме показал, что жом из травы свежей содержит меньше исследуемых веществ, чем полученный из листьев свежих примерно в 5,8 раза (табл.1). Это связано с локализацией производных оксикоричных кислот в клеточном соке вакуолей. Стебли, составляющие около 50% структуры травы, представляют собой в основном проводящие элементы, чем и объясняется более низкое содержание в жоме травы свежей изучаемых БАВ по сравнению с жомом из листьев свежих.

Наибольшее достоверное содержание суммы производных оксикоричных кислот в зависимости от возраста растений наблюдалось в жоме из травы свежей и листьев свежих от

растений 5 и 6 гг. вегетации. Оно превышало содержание этих веществ в жоме сырья других возрастов в среднем на 0,15%. В целом содержание производных оксикоричных кислот в жоме травы свежей ниже, чем в сырье (ТУ 9373-142-04868244-2008 требует не ниже 2,1%) в среднем в 2,7 раза.

Таблица 1

Содержание суммы производных оксикоричных кислот в жоме из травы эхинацеи свежей и листьев свежих, % , 2010 г.

Номер	Орган растения Вариант	Жом из травы свежей	Жом из листьев свежих
1	4 г.в.	0,69	4,25
2	5 г.в.	0,83	4,50
3	6 г.в.	0,87	4,54
4	7 г.в.	0,67	4,41
	НСП 05А	0,04	0,05
	НСП 05В	0,02	0,04

В итоге можно отметить, что в жоме травы и листьев эхинацеи пурпурной свежих еще содержится определенное количество суммы производных оксикоричных кислот, что может представлять интерес для кормопроизводства или производства биологически активных добавок к пище. Вопрос требует дополнительных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сакович Г.С., Колхир В.К., Сокольская Т.А., Воскобойникова И.В. Некоторые итоги клинического изучения препаратов и компонентов эхинацеи, результаты исследования безопасности. Возможные побочные эффекты, взаимодействия с другими лекарственными средствами // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2010. №4. С. 11-19
2. ТУ 9373-142-04868244-2008 Эхинацеи пурпурной трава свежая.// Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР). М.: 2008

ФЕНОЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА ОВОЩЕЙ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ПИТАНИЯ

Борисова А.В., Макарова Н.В.

ФГБОУ ВПО «Самарский государственный технический университет»,
Самара, Россия, тел.: 89093700888, anna_borisova_63@mail.ru

Фенольными соединениями называют многочисленный ряд веществ, содержащих ароматическое кольцо, несущее гидроксильную группу, а также их функциональные производные [1]. Из нескольких сотен известных природных фенольных соединений флавоноиды и фенольные кислоты образуют наиболее многочисленные группы. Фенольные вещества относятся к вторичным метаболитам растений [2; 3]. Фенольные кислоты и флавоноиды, поступающие с растительной пищей, играют очень важную роль в организме человека. В особенности это относится к фруктам и овощам. Они оказывают противораковое, антимуtagenное и антиоксидантное действие [2]. Сообщается о желчегонном, противовоспалительном, антиспастическом, противоаллергическом, сосудорасширяющих, антимикробном свойствах фенольных веществ, входящих в состав растительных экстрактов [4]. Растительные фенолы регулируют работу желудка и кишечника, относятся к числу наиболее действенных лечебных средств при язвенной болезни желудка и бронхиальной астме, геморрагическом синдроме и почечной недостаточности, при болезнях сердца и сосудов, печени и почек.

Исследованиями канадских ученых [5] подтверждается взаимосвязь между содержанием фенольных веществ в различных плодах, овощах и зерновых продуктах и антиоксидантной активностью, коэффициент корреляции между этими величинами составляет 0,90-0,96. Также при определении антиоксидантной активности томатов, выращенных в Новой Зеландии, ученые пришли к выводу, что основными антиоксидантными компонентами были фенольные вещества (в частности галловая кислота), флавоноиды (рутин, катехин), аскорбиновая кислота и ликопин [6]. Содержание флавоноидов и фенолов существенно коррелировало ($k=0,84-0,89$) с антиоксидантной активностью гидрофильного экстракта, и их содержание было рекомендовано использовать как показатель антиоксидантной активности.

Фенольные вещества и флавоноиды должны употребляться человеком с пищей ежедневно. Суточная норма потребления фенольных веществ составляет 200 мг и флавоноидов 54 мг в день

[3].

Таким образом, многочисленные медико-биологические свойства фенольных соединений позволяют отнести растительные объекты, являющиеся богатым источником фенольных кислот, флавоноидов, антоцианов, к функциональной пище. Овощи являются одним из самых распространенных и доступных источников фенольных веществ. Разнообразные блюда, приготовленные из овощей, ежедневно входят в рацион каждого человека. Немаловажной поэтому является задача выявления видов овощей, наиболее богатых фенольными соединениями, для составления лечебных диет, разработки рецептур продуктов, обладающих направленными функциональным антиоксидантным действием.

Нами были проведены исследования химического состава 4 видов овощей, собранных на территории Самарской области в 2011 году:

- перцев сортов Подарок Молдовы (красный), Ярослав (желтый);
- томатов сортов Черный Принц (черный), Желтый Шар (желтый), Старроуз F1 (розовый), Рычанский (красный);
- моркови сортов Шантенэ, Рогнеда;
- тыквы сортов Витаминная, Волжская серая 92.

У исследованных образцов определяли общее содержание фенольных веществ и флавоноидов. Содержание фенольных веществ определяли фотоколориметрическим методом с помощью реактива Folin-Ciocalteu's [5]. Методика основана на окислении фенольных групп исследуемого спиртового экстракта овощей реактивом Folin-Ciocalteu's в среде насыщенного карбоната натрия. Реакция протекала при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего определяли коэффициент пропускания при длине волны 725 нм. Общее содержание фенольных веществ определяли по калибровочной кривой и выражали в мг галловой кислоты на 100 г исходного сырья.

Содержание флавоноидов измеряли фотоколориметрическим методом [7]. Коэффициент пропускания определяли при длине волны 510 нм. Общее содержание флавоноидов определяли по калибровочной кривой и выражали в мг катехина на 100 г исходного сырья.

Результаты исследования химического состава овощей приведены в таблице.

Анализируя данные таблицы можно констатировать, что наибольшее содержание фенольных веществ и флавоноидов находится в красном перце Подарок Молдовы (по содержанию

фенольных веществ данный сорт превосходит суточную норму потребления в 1,59 раз), а наименьшее – в тыкве Волжская серая 92. Также богаты фенольными веществами и катехином перец желтый Ярослав и томаты черные Черный Принц. Красные томаты, морковь и тыква отличаются низким содержанием фенольных соединений и флавоноидов.

Таблица

Содержание фенольных веществ и флавоноидов в овощах

Объект	Общее содержание фенольных веществ, мг галловой кислоты/100 г исходного сырья	Общее содержание флавоноидов, мг катехина/100 г исходного сырья
Перец сорта Подарок Молдовы	318,0	36,0
Перец сорта Ярослав	147,0	30,0
Томат сорта Черный Принц	99,0	13,0
Томат сорта Желтый Шар	77,0	12,0
Томат гибрид Старроуз F1	75,0	12,0
Томат сорта Рычанский	61,0	12,0
Морковь сорта Шантенэ	74,0	6,0
Морковь сорта Рогнеда	72,0	6,0
Тыква сорта Витаминная	61,0	2,3
Тыква сорта Волжская серая 92	51,0	1,9

Таким образом, можно сделать вывод, что для обеспечения функциональности пищи должна быть богата фенольными веществами, которые обеспечивают антиоксидантное, антираковое, антиопухолевое действие, а также обладают обширным укрепляющим эффектом. Из изученных нами овощей в качестве перспективного сырья для производства функциональных продуктов питания можно рекомендовать перцы сортов Подарок Молдовы и Ярослав, также томаты сорта Черный Принц.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия фенольных соединений // Под ред. Дж. Харбона. М.: Мир. 1968. 451 с.
2. Fridman M. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review // J. Agr. and Food Chem. 1997. 45. № 5. P. 1523-1540.
3. Stracke B.A., Ruefer C.E., Watzl B. Polyphenol- und Carotinoidgehalt in Äpfeln und Karotten aus ökologischem und konventionellem Anbau // Ernährungs Umschau. 2010. №57. S. 526-531.

-
4. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека. М.: Наука. 1984. 160 с.
 5. Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L., OOmah B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products // J. Agr. and Food Chem. 1998. V. 46. №10. P. 4113-4117.
 6. Toor R.K., Lister C.E., Savage G.P. Antioxidant activities of New Zealand-grown tomatoes // J. Food Sci. and Nutr. 2005. V. 56. №8. P. 597-605.
 7. Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Rizner Hras A., Simonic M., Knez Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities // Food Chem. 2005. V. 89. №2. P. 191-198.
-

ЭКСТРАКЦИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В СРЕДЕ СУБКРИТИЧЕСКОЙ ВОДЫ

Володченко И.И., Лесишина Ю.О., Дмитрук А.Ф.

Донецкий национальный университет экономики и торговли имени
Михаила Туган-Барановского, Донецк, Украина, iravolodchenko@mail.ru

Для получения экстрактов из растительного сырья, которые широко используют в парфюмерно-косметической промышленности, а также в качестве пищевых добавок, необходимо искать условия экстракции, при которых выход биологически активных веществ максимален, а их разрушение под действием температуры и растворителей минимально. Традиционно используемые методы экстракции имеют ряд недостатков, именно поэтому в последнее десятилетие, для экстракции соединений, входящих в состав растительного сырья, предложено использовать субкритическую воду (перегретая вода под давлением при температурах от 100°C до 374°C). Экстракты, полученные в таких условиях, хорошо сохраняют запах, вкус и биологическую ценность исходного сырья, поэтому находят все большее применение в производстве пищевых и косметических продуктов.

Цель данной работы заключалась в разработке экологически безопасной методики получения растительных экстрактов в среде субкритической воды с максимальным выходом фенольных соединений и сравнении разработанной методики с традиционно применяемым методом экстракции – мацерацией.

Для исследований были отобраны растения, содержащие значительное количество фенольных соединений – потенциально перспективных природных антиоксидантов. Так, для получения

экстрактов использовали: листья и цветки боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea Pall.*), цветки липы сердцевидной (*Tilia cordata Mill.*), бессмертника песчаного (*Helichrysum arenarium L.*), ромашки аптечной (*Matricaria recutita L.*) и траву зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum L.*).

Экстракцию в субкритических условиях проводили при температуре (Т) 120°C и давлении (р) 0,2 МПа в течение 10 минут. Для этого в реактор из нержавеющей стали (высота реактора - 169 мм, диаметр – 100мм, толщина стенки – 35 мм) объемом 69,0 см³ помещали навеску измельченного растительного сырья (2 г), туда же добавляли 20,3 см³ бидистиллированной воды. Реактор герметично закрывали, помещали в муфельную печь, оборудованную термопарой, и нагревали до выбранной температуры со скоростью нагрева 1°C/мин. После охлаждения реактора до комнатной температуры, надсадочную жидкость сливали и использовали для дальнейших исследований.

Мацерацию проводили при температуре 25°C следующим образом: навеску измельченного растительного сырья смешивали с бидистиллированной водой в конической колбе со шлифом в соотношении сырье:бидистиллят = 1:10 и настаивали в течение 48 часов, периодически перемешивая содержимое колбы. Метод мацерации (настаивания), является наиболее простым способом экстрагирования, который применяется при изготовлении экстрактов, настоек.

Полученные разными способами водные экстракты упаривали на ротационном испарителе ИР-1М2, высушивали и для дальнейших исследований использовали в сухом виде.

Таблица 1

Количество извлеченных при экстракции разными способами веществ

экстракт	Сухой остаток*, %	
	мацерация	субкритическая вода
бессмертник	8,5±0,5	22,4±0,3
боярышник	10,4±0,6	26,9±1,8
зверобой	16,6±0,6	17,7±0,9
липа	5,9±0,4	22,6±1,3
ромашка	10,4±0,5	30,4±0,6

*в пересчете на воздушно-сухое сырье

Количество извлеченных веществ в экстрактах характеризовали величиной сухого остатка, которую определяли гравиметрическим методом. Количественное содержание в

экстрактах фенольных соединений (в перерасчете на танин) определяли перманганатометрическим методом, содержание флавоноидов (в перерасчете на рутин) – методом дифференциальной спектрофотометрии.

Как видно из таблицы 1, содержание сухих веществ в экстрактах, полученных в среде субкритической воды, практически в 2-4 раза превышает этот показатель в экстрактах, полученных методом мацерации. Этот результат может быть обусловлен возможностью более легкого проникновения молекул растворителя вглубь мицеллы в субкритических условиях. Вероятно, при этом также происходит частичное разрушение растительных клеток, что облегчает последующее извлечение веществ. Выход сухих веществ в экстрактах травы зверобоя не зависит от способа экстракции и составляет ~ 17%.

Таблица 2

Количественное содержание фенольных соединений и флавоноидов в исследуемых экстрактах

Экстракт	Содержание фенольных соединений, %*		Содержание флавоноидов, %*	
	Мацерация	Субкритическая вода	Мацерация	Субкритическая вода
бессмертник	0,3±0,1	2,5±0,2	0,11±0,01	0,29±0,01
боярышник	1,1±0,1	1,3±0,1	0,17±0,03	0,41±0,02
зверобой	1,7±0,1	2,7±0,1	0,18±0,02	0,46±0,02
липа	0,8±0,0	3,7±0,1	0,10±0,02	0,23±0,01
ромашка	0,4±0,1	5,3±0,2	0,08±0,01	-

*в пересчете на воздушно-сухое сырье

Из данных таблицы 2 видно, что количество фенольных соединений и флавоноидов, извлеченных водой в субкритическом состоянии, на порядок (в 7-12 раз) больше по сравнению с количеством фенолов, извлеченных традиционным методом.

Полученные результаты позволяют заключить, что экстракция фенольных соединений из растительного сырья в среде субкритической воды значительно эффективнее метода мацерации.

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ СОЦВЕТИЙ ЧЕРНОГОЛОВКИ ОБЫКНОВЕННОЙ *PRUNELLA VULGARIS* L.

Голембиовская Е.И.

Государственное учреждение „Институт фармакологии и токсикологии
НАМН Украины”, Киев, Украина, тел.: 067-234-22-48, e-mail:
golembiki@yahoo.fr

Черноголовка обыкновенная (*Prunella vulgaris* L.) семейства Яснотковых (*Lamiaceae*) является широко распространенным видом, который имеет более 21 субтаксонов, культивируемых повсеместно и используемых в нетрадиционной медицине и в кулинарии.

Это растение было известно в Европе еще с XVII столетия своей способностью уменьшать температуру, снимать воспаление. Черноголовка обыкновенная также широко использовалась в качестве гипотонического, глистогонного, мочегонного и ветрогонного средств. В народной медицине широко использовалась трава черноголовки для полосканий при лечении воспалений ротовой полости, гингивита, стоматитов. Доказано, что благодаря противовирусным, цитопротекторным, противовоспалительным и антиоксидантным свойствам, черноголовка обыкновенная является эффективным средством для лечения гингивита [1].

В 1653 году известный английский травник Николас Кулппепер писал, что черноголовку обыкновенную было бы хорошо применять как внутренне, так и внешне при ранах и кровотечениях [2]. Еще в древние времена готовили отвары черноголовки на воде и вине, смешивая их вместе, и считали, что такая смесь может вылечить почти от всех болезней. Именно поэтому растение в народе еще называют "heal-all", то есть "панацея".

Черноголовка обыкновенная проявляет выраженные противовоспалительные свойства, что обусловлено наличием полисахаридов и фенольных структур, в частности кофейной и розмариновой кислот. Считается, что эти вещества препятствуют выделению супероксида и нитритов, простагландинов, стимулируют синтез адренокортикотропных гормонов, в частности глюкокортикоидов, которые имеют выраженную противовоспалительную активность, а также простагландинов E2 [2].

Фенольные соединения проявляют защитную роль в карциногенезе, воспалении, атеросклерозе, тромбозе, а также

высокую антиоксидантную активность [3, 4].

Розмариновая кислота считается одним из наиболее активных и важных компонентов чернойголовки в борьбе с изменениями, которые вызваны действием ультрафиолетового облучения, то есть, обнаруживает антиоксидантную активность. Такой эффект достигается ею благодаря торможению во внутриклеточном пространстве перекисного окисления липидов, повышения уровня АТФ и уменьшения содержания глутатиона [5].

Танины стимулируют фагоцитарную активность клеток благодаря формированию гидрофобных комплексов с протеинами бактериальной клетки ковалентными связями с водородом, предотвращают размножение микробных и бактериальных организмов, подавляют развитие опухолей. Механизмом их противовирусной активности является инактивация адсорбции, транспорта протеинов, полисахаридов и обратной транскрипции энзимов вирусной клетки [2].

Кофейная кислота, известна своими мочегонными, желчегонными свойствами, в некоторой степени капилляроукрепляющими и противовоспалительными свойствами, регулирует функцию щитовидной железы[2].

Анализ литературных данных выявил, что качественный и количественный состав биологически активных веществ (БАВ) соцветий чернойголовки обыкновенной практически не изучен и свидетельствует также о полном отсутствии сведений о составе БАВ в прочих органах растения.

В связи с этим, целью настоящего исследования являлось качественное и количественное определение фенольных соединений в соцветиях (колосьях) чернойголовки обыкновенной с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [6,7].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования наличия фенольных соединений в соцветиях чернойголовки нами использовались спиртовые экстракты усредненной пробы колосьев *Prunella vulgaris* L., заготовленных в фазу массового цветения в июле 2012 года в Ивано - Франковской области, Украина. Потерю в массе при высушивании определяли с использованием общепринятой методики, указанной в ГФУ 1-го издания.

Вытяжки получали экстрагированием 70% спиртом этиловым при соотношении сырья и экстрагента 1:10 и нагревании на кипящей водяной бане с обратным холодильником однократно в течение 45 минут.

Таблица 1

Идентифицированные фенольные соединения водно-спиртового экстракта
соцветий черноголовки обыкновенной

№ п/п	Время удерживания, мин	Максимум(ы) поглощения в УФ-свете, нм	Название компонента
1	6.8	260	Галовая кислота
2	9.1	277	Произв. катехина*
3	13.52	308	Протокатеховая кислота*
4	18.0	229, 280, 308	Проантоцианидин*
5	18.1	228, 280, 308	Протокатеховый альдегид*
6	18.6	284	Произв. катехина*
7	18.8	312	п-кумаровая кислота*
8	19.2	246, 325	Сальвианоловая кислота*
9	19.4	322	Оксикоричная кислота*
10	20.4	324, 217, 233	Хлорогеновая кислота
11	21.4	311	п-кумароилхинная кислота*
12	22.7	321, 295	Кофейная кислота
13	23.9	287	Произв. элаговой кислоты*
14	31. 08	255, 348	Рутин
15	31.9	254, 341, 266	Элаговая кислота
16	32.4	255, 349	Гиперозид
17	36.4	337, 265	Апигенин-7-глюкозид
18	38.8	330	Розмариновая кислота
19	38.9	330, 300, 287	Дикафеилхинная кислота*
20	47.5	347, 253	Лютеолин
21	52.7	337, 266	Апигенин

* - компонент определен сравнением спектров поглощения с литературными данными

Разделение и идентификацию фенольных соединений черноголовки обыкновенной проводили методом ВЭЖХ на хроматографе жидкостном «Shimadzu ser. 20» с УФ - дидноматричным – детектором, на октадецилсилильной обращеннофазной колонке Phenomenex® Luna C18 (250 мм × 4.6 мм, 5 мкм). Подвижная фаза: 0,01% раствор трифторуксусной

кислоты в ацетонитриле и 0,01% раствор трифторуксусной кислоты в воде в градиентном режиме; скорость потока элюента - 1,0 мл/мин; объем вводимой пробы - 5 мкл, температура колонки – 30 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Детектирование осуществляли при длинах волн 254 нм, 280 нм, 330 нм, 360 нм и 520 нм, которые иллюстрируют селективность детектора. Большинство веществ фенольной природы поглощает при 280 нм, давая характерные спектры поглощения.

Фенольные соединения черноголовки определяли сравнением их времен удерживания и УФ - спектров со спектрами доступных стандартов, а также данными литературы. Идентифицированные компоненты приведены в таблице 1.

Как следует из таблицы, данные УФ - спектров экстрактов из соцветий черноголовки обыкновенной показывают, что 70 % спиртом этиловым экстрагируются фенольные соединения различных классов. В экстракте колосьев черноголовки присутствуют фенольные кислоты (протокатеховая, кофейная, хлорогеновая, феруловая, розмариновая, сальвианоловая кислоты и их производные), флавоноиды: флавоны и флавоновые агликоны (апигенин, лютеолин), их гликозиды, танины (проантоцианидины, галловая, элаговая кислоты, катехин и их производные)

Полученные данные подтверждаются результатами качественного анализа на содержание различных групп фенольных соединений.

В результате проведенных нами исследований установлено, что черноголовка обыкновенная - *Prunella vulgaris* L. – часто используемая в нетрадиционной медицине, является щедрым источником веществ фенольной природы. Обнаружено десять фенольных кислот, три флавоноидных гликозида, два флавоноидных агликона, шесть танинов. Розмариновая кислота является доминирующим компонентом среди представленных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Williams R. J., Spencer J. P. E., Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? // Free Radical Biol. Med. 2004. V. 36. P. 838-849.
2. Andersen, O. M., Markham, K. R. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications/ Eds.: CRC Press: Boca Raton. FL. 2006. P. 471-552.
3. Dmitruk S.I., Dmitruk S.E., Berezovskaya T.P., Prishchep T.P. Flavones of *Prunella vulgaris* // Khimiya Prirodnikh Soedinenii. 1987. V. 3. P. 449-450.
4. Aaby K., Hvattum E., Skrede G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity// J. Agric. Food Chem.

-
2004. V. 52. P. 4595-4603.
5. Lamaison J.L., Petitjean-Freytet C. Derives hydroxycinnamiques et flavonoides dans le genre *Prunella* (*Lamiaceae*): Activites antioxydantes et interet chimiotaxonomique // *Plantes Medicinales et Phytotherapie*. 1990. V.24. P. 152–157.
 6. Maatta-Riihinen K. R., Kamal-Eldin A., Torronen A. R. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family *Rosaceae*) // *J. Agric. Food Chem.* 2004. V.52. P. 6178-6187.
 7. Proestos C., Sereli D., Komaitis M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC–MS // *Food Chem.* 2006. V.95. P. 44–52.
-

РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ ДУШИЦЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*ORIGANUM VULGARE* L.) В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ СМЕСЯХ

Гудзенко А.В., Курапова Т.Н.

ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев,
Украина, тел.: 0442774118, e-mail: ganvi@yandex.ru

В наши дни фальсификация лекарственных препаратов представляет серьезную угрозу фармацевтическому рынку во всем мире. Одним из эффективных способов предотвращения попадания фальсификата на фармацевтический рынок является наличие в арсенале контролирующих лабораторий аналитической нормативной документации на готовые лекарственные средства (ЛС), а также их полупродукты, которая соответствует современным фармакопейным требованиям и позволяет достоверно оценивать их качество. Поэтому разработка эффективных методик контроля качества ЛС является одним из наиболее актуальных вопросов современной фармацевтической химии.

Наиболее остро проблема фальсификации представлена в сегменте многокомпонентных лекарственных средств растительного происхождения (МЛСРП), т.к. существующие на данный момент методики контроля качества данной группы препаратов достаточно редко соответствуют современным фармакопейным требованиям и не позволяют проводить качественную и количественную стандартизацию всех компонентов данных препаратов.

Одно из наиболее перспективных направлений модернизации процессов анализа МЛСРП – это применение

маркерных соединений или маркеров, т.е. веществ, присутствие которых характерно только для определенного вида растительного сырья.

Разработка и внедрение в фармацевтическую практику методик анализа МЛСРП с использованием маркерных соединений имеет не только практическую ценность, но и несомненную научную целесообразность.

Одним из наиболее распространенных компонентов МЛСРП являются трава душицы обыкновенной (*Origanum vulgare* L.), которая успешно используется в медицинской практике как в виде монопрепаратов, так и в виде составных частей МЛСРП [1]. Данное лекарственное сырье обладает широким спектром биологической активности, в частности, антиоксидантными, противовоспалительными, бактерицидными и анальгезирующими свойствами [2].

По литературным данным антиоксидантное действие травы душицы связано в том числе с высоким содержанием оксикоричных кислот [3]. Исходя из того, что одним из мажоритарных представителей данного класса соединений в душице является розмариновая кислота [3], считалось целесообразным изучить возможность использования данного соединения в качестве маркера травы душицы в растительных смесях.

Исходя из вышесказанного, целью наших исследований было определение возможности проведения стандартизации травы душицы обыкновенной в растительных смесях по наличию и количественному содержанию фенилпропаноида розмариновой кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовались растительные смеси следующего состава: травы душицы обыкновенной – 1 г, листьев крапивы двудомной – 1 г, травы пустырника – 1 г, плодов шиповника – 1 г, зерен овса посевного – 1 г, корней цикория дикого – 1 г, травы горца птичьего – 1 г, цветков бузины черной – 1 г, плодов боярышника – 1 г, корней одуванчика лекарственного – 1 г, семян льна – 1 г (исследуемая растительная смесь с душицей); листьев крапивы двудомной – 1 г, травы пустырника – 1 г, плодов шиповника – 1 г, зерен овса посевного – 1 г, корней цикория дикого – 1 г, травы горца птичьего – 1 г, цветков бузины черной – 1 г, плодов боярышника – 1 г, корней одуванчика лекарственного – 1 г, семян льна – 1 г (исследуемая растительная смесь без душицы) а также моноэкстракты указанного выше растительного сырья.

В качестве стандартных использовали растворы достоверного образца розмариновой кислоты в 50 % этиловом

спирте.

Экстракцию розмариновой кислоты в исследуемых объектах проводили с использованием 50 % этилового спирта.

Хроматографическое изучение исследуемых и стандартных образцов проводили на хроматографе Shimadzu ser. 20, оборудованном диодно-матричным детектором с использованием колонки Synergy 4U Fusion RP, размером 250 мм x 4,6 мм, размер частиц 5 мкм.

В качестве мобильной фазы использовали смеси 0,05 % трифторуксусной кислоты и ацетонитрила (градиентное элюирование).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для нахождения подходов к стандартизации травы душицы обыкновенной в растительных смесях, с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), была разработана методика определения розмариновой кислоты в растительном сырье.

На рис. 1 представлены хроматограммы стандартного раствора розмариновой кислоты (А) и экстракта травы душицы обыкновенной (Б).

Как свидетельствуют вышеуказанные рисунки, время выхода пика розмариновой кислоты в данных условиях хроматографирования составляет порядка 26 минут и он присутствует как на хроматограмме стандартного раствора розмариновой кислоты (А), так и на хроматограмме экстракта травы душицы обыкновенной (Б).

В данных же условиях был проведен анализ растительного сырья, которое чаще всего входит в состав многокомпонентных препаратов с душицей, а именно, листьев крапивы двудомной, травы пустырника, плодов шиповника, зерен овса посевного, корней цикория дикого, травы горца птичьего, цветков бузины черной, плодов боярышника, корней одуванчика лекарственного и семян льна.

В результате проведенных исследований мы пришли к выводу, что по присутствию и количественному содержанию розмариновой можно стандартизовать траву душицы в смесях со всем приведенным выше сырьем.

Для подтверждения возможности стандартизации травы душицы по наличию и количественному содержанию розмариновой кислоты в присутствии указанного ранее растительного сырья, в этих же условиях были проанализированы исследуемые растительные смеси с содержанием душицы и без нее.

Хроматограммы экстрактов растительных смесей

представлены на рис. 1 (В, Г).

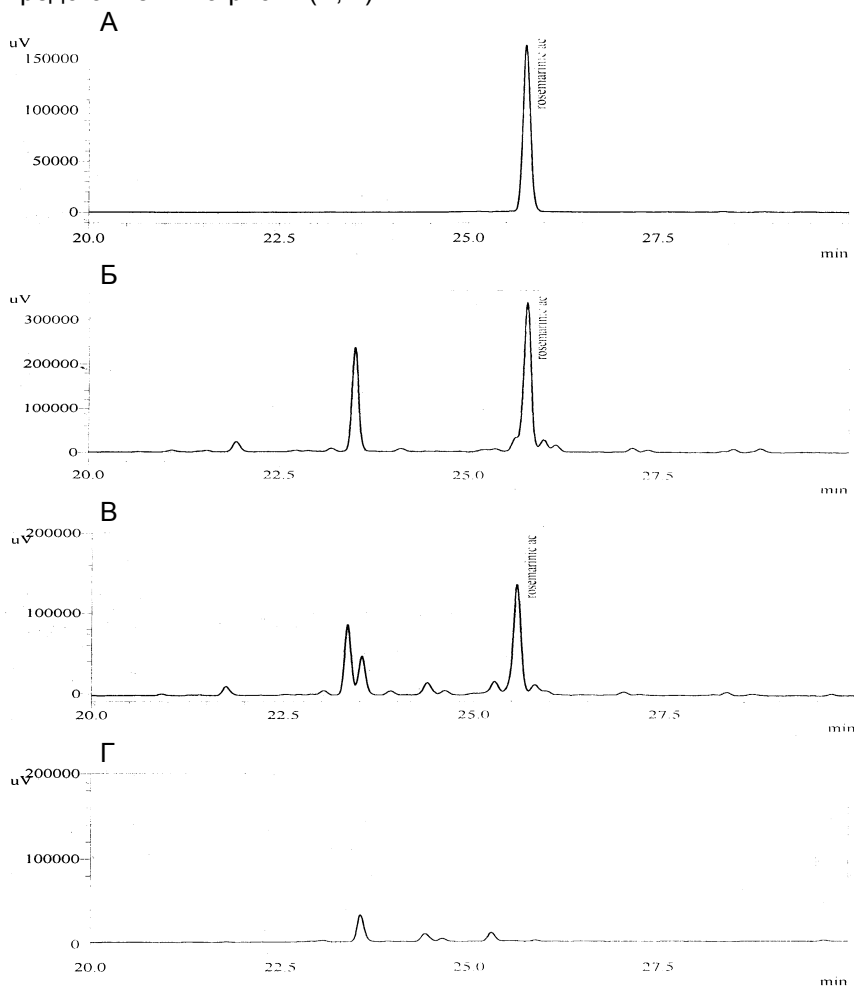


Рис. 1. Хроматограммы исследуемых растворов: А – стандартного раствора розмариновой кислоты; Б – экстракта травы душицы обыкновенной; В – растительной смеси с содержанием душицы; Г – растительной смеси без душицы.

Как следует из указанного рисунка, на хроматограммах экстракта травы душицы (рис. 1 Б) и многокомпонентной смеси с душицей (рис.1В) присутствует пик розмариновой кислоты, в то время, когда на хроматограмме растительной смеси без содержания душицы (рис. 1 Г) данный пик отсутствует.

Таким образом, исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что по разработанной нами хроматографической методике в растительных смесях, в состав которых входят трава душицы обыкновенной, листья крапивы двудомной, трава пустырника, плоды шиповника, зерна овса посевного, корни цикория дикого, трава горца птичьего, цветки бузины черной, плоды боярышника, корни одуванчика лекарственного и семена льна, траву душицы обыкновенной можно стандартизировать по наличию и количественному содержанию розмариновой кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коваленко, В.М. Компендиум. Лекарственные препараты: в 2-х т. / В.М. Коваленко, О.П. Вікторова. – К: Морион. 2009. 2224 с.
2. Универсальная энциклопедия лекарственных растений /Сост. И.Путырский, В. Прохоров. М.: «Дом». 2000. 656 с.
3. Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts / B. Kaurinovic, M. Popovic, S. Vlaisavljevic at al. // Molecules. – 2011. – Vol. 16, N. 9. – P.7401-7414.

УДК 615.322:582.734.4

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЛИСТЬЕВ АЗИМИНЫ ТРЕХЛОПАСТНОЙ (*AZIMINA TRILOBA* (L.) DUNAL)

Джан Т.В.,¹ Клименко С.В.,² Григорьева О.В.²

¹ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев,
Украина

²Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины, Киев,
Украина, тел.:0978743933, Zakucilo@gmail.com

Азими́на трехлопа́стная (*Asimina triloba*) относится к обширному семейству Анноновые (Аппоасеae) из Северной Америки. Она – единственный представитель семейства (среди более 120 родов), ареал произрастания которого выходит за пределы субтропической зоны. Азими́на трехлопа́стная – реликтовый вид древней доледниковой флоры США. Она естественно произрастает на территории восточных штатов. Из-за сходства ее плодов с папайей и бананами азимину называют еще банановым деревом или американским пау-пау. Азими́на трехлопа́стная со временем благополучно прижилась и на других континентах. К настоящему времени банановое дерево успешно культивируют во Франции, Италии, Испании, Японии, Бразилии, Грузии. Центром её коммерческого выращивания является юго-

восток штата Огайо, где ежегодно неподалёку от г. Олбани проводится так называемый Pawpaw Festival [1].

Впервые в Украину азимины были интродуцированы в Никитский ботанический сад в 1819 г. К началу XX в. среди испытанных в саду интродуцентов ее отметили как один из самых перспективных видов. Однако те растения не сохранились. Вторично она была интродуцирована в Никитский ботанический сад в 1922 г. – и опять растения не дожили до нашего времени. Самое старое дерево азимины в возрасте 55 лет растет в дендропарке Одесского государственного университета и в Киеве в Ботаническом саду им. А. В. Фомина. И в третий раз азимины, теперь уже в больших масштабах, были интродуцированы в Никитский ботанический сад в 1994 году. На сегодня, самая большая коллекция азимины в Украине находится в «Опытном хозяйстве "Новокаховское" Никитского ботанического сада – Национального научного центра». В Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко НАН Украины коллекция *A. triloba* представлена более 20 формами, выращенными из семян, полученных из США, и двумя поколениями местной репродукции. Эти растения прижились – и опыт по их выращиванию положил начало размножению азимины на севере Украины [2].

Климатические условия природного ареала азимины характеризуются умеренно холодной зимой, теплым и влажным летом, среднегодовая температура составляет 9–12°C, сумма осадков 900–1000 мм. Абсолютный минимум для северной части ареала не превышает -30°C. Для нормального роста, развития азимины и вызревания плодов необходимо не менее 160 дней вегетации при сумме эффективных температур 2600–2800°C.

В благоприятных условиях азимины вырастает до 12 метров. Благодаря гладкой коре, красивым крупным листьям яйцевидной формы (длиной до 35 см и шириной до 12 см) и пирамидальной широкой кроне азимину считают не только плодовым, но и декоративным растением. Верхняя сторона молодых листьев имеет блеск по типу глянцевого, а нижняя – опушенная. Цветки бананового дерева большие и красочных оттенков: от фиолетового до красного. Чашечка состоит из 3 листиков, а венчик образуют 6 лепестков, размещенных в два круга. Продолговатые плоды азимины с закрученными концами вырастают до 12 см в длину и не превышают 5 см в диаметре. Под тонкой кожицей находится сочная мякоть светло-бежевого цвета. Она имеет сладкий вкус и землянично-ананасовый аромат.

Азимину употребляют как в свежем, так и в переработанном виде. Ее консервируют с сахаром, из нее получают вкусные

джемы, варенья, сиропы мармелады и даже безалкогольные напитки.

Ранее местное население США употребляло плоды бананового дерева как вспомогательное средство при отравлениях. Поскольку азимина способствует выводу токсинов и других вредных веществ, накопившихся в организме, то ее постоянный и длительный прием оказывает на него заметное омолаживающее действие. По свидетельствам местных жителей, после месяца поедания этого целительного банана кишечник становился, словно у ребенка. Азимина содержит много важных для здоровья человека микроэлементов и сахаров. Она богата аскорбиновой кислотой, пектиновыми веществами, органическими кислотами. Сок азимины считается отличным глистогонным и инсектицидным средством [1].

Специалисты по результатам многочисленных научных исследований утверждают, что азимина обладает уникальным противоопухолевым и антимикробным действием. Благодаря высокой концентрации ацетогенина она предотвращает развитие некоторых видов раковых клеток, а также способствует остановке роста уже имеющегося онкообразования. Ацетогенины способны убивать даже те клетки рака, которые нечувствительны к воздействию химиотерапевтических агентов. Экстракт бананового дерева благотворно влияет на иммунную систему: повышает ее защитные функции и предохраняет клетки от вредного влияния стрессовых ситуаций и свободных радикалов [3].

Целью данной работы было исследование содержания основных биологически активных веществ в листьях азимины трехлопастной *Azimina triloba* (L.) Dunal.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом изучения были листья азимины трехлопастной десяти форм, выведенных в НБС им. Н.Н. Гришко НАН Украины. Эти формы выращены из семян, полученных из США, и имеют возраст от 9 до 20 лет. В условиях Лесостепи Украины наступление фенологических фаз азимины трехлопастной связано с накоплением суммы эффективных температур ($\Sigma_{\text{эф.}t > 5^{\circ}\text{C}}$): на начало вегетации – 90–140°C, на время цветения и завязывания плодов – 140–210°C (среднесуточная температура воздуха устанавливается выше +10°C). Начало вегетации азимины в условиях Киева проявляется набуханием генеративных почек во второй-третьей декаде апреля. Цветение начинается у 5-летних растений, цветет азимина до распускания листьев при среднесуточной температуре 12–17°C. Продолжительность периода цветения зависит как от погодных условий, так и от влажности почвы и воздуха в этот период и составляет 18–23 дня.

Плодоносить азимины начинают с 7-8 лет, созревание плодов в Киеве происходит в первой декаде сентября и продолжается до начала октября.

Исследование содержания флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом (спектрофотометр Hewlett Paskard 8452A) по реакции с алюминия хлоридом в пересчете на рутин [4], гидроксикоричных кислот – по реакции образования в щелочной среде аци-нитроформы [5]. Содержание индивидуальных фенольных соединений – хлорогеновой кислоты и рутина – проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Shimadzu UFLC с диодноматричным детектором, оборудованному автосамплером и термостатом колонок. Колонка – C18X-Terra длиной 150 мм и диаметром 4,6 мм, с размером частиц 5 мкм, температура колонки 35°C, скорость потока 1 мл/мин., объем инъектирования 5 мкл, детектирование проводили при длине волны 360 нм. Движущаяся фаза: А – 0,1% водный раствор трифторуксусной кислоты, В – 0,1% раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На основании проведенного исследования спектрофотометрическим методом установлено, что максимальное содержание гидроксикоричных кислот и флавоноидов в листьях азимины наблюдается в начале вегетации (после цветения) и составляет 5%-7% суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кислоту хлорогеновую и 6%-8% суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Содержание хлорогеновой кислоты и рутина составляет 1%-2% и 0,2%-0,3%, соответственно.

Хлорогеновая кислота обладает высокой биологической активностью, которую связывают с ее антиоксидантными свойствами. Она способна к восстановлению высоко окисленных свободных радикалов и подавлению образования активных форм кислорода, ингибируя окислительно-восстановительные ферменты, а также связывая в стабильные комплексы ионы металлов с переменной валентностью, которые играют важную роль в иницировании свободно-радикальных реакций. Хлорогеновая кислота замедляет освобождение глюкозы в крови после приема пищи и ингибирует глюкоза-6-фосфатазу, уменьшая печеночный гликогенолиз, способствует увеличению уровня глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), играющего превентивную роль в развитии диабета. Недавними исследованиями установлено, что хлорогеновая кислота ингибирует интегразу, а также экспрессию обратной транскриптазы вируса ВИЧ [6].

Таким образом, листья азимины представляют интерес как

перспективное растительное лекарственное сырье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pawpaw Description and Nutritional Information. Kentucky State University Cooperative Extension Program. Pawpaw Research Project, Community Research Service, Atwood Research Facility, Frankfort, KY40601-2355.
2. С.В. Клименко. Интродукция и селекция нетрадиционных плодовых растений в Украине // Труды Никитского ботанического сада. 2008. Т. 130. С. 83-95.
3. McLoughlin J.L. Paw paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. P. 1311-1321.
4. Блажей А., Шутый Л. Фенольные соединения растительного происхождения. М. 1977. 239 с.
5. European Pharmacopoeia. Third Edition. Supplement. 1998. Council of Europe. Strasbourg. P. 1989-1990.
6. Clifford M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. // J. Sci. Food Agric. 1999. Vol. 79. P. 362-372.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ПОЛИФЕНОЛОВ КОРНЕЙ КЕРМЕКА ГМЕЛИНА

Жусупова Г.Е., Мурзагулова К.Б., Абилов Ж.А.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан,
тел.: 87272755669, e-mail: zhusupova@gmail.com

В данном сообщении представлены данные по разработке таблеток на основе лекарственной растительной субстанции, которая представляет собой смесь полифенолов и выделяется из корней кермека Гмелина (*L. gmelinii*). Корни кермека Гмелина заготовлены в Энбекшиказахском районе Алматинской области в соответствии с требованиями к их заготовке, сушке и хранению. Для заготовленного и обработанного сырья был проведен макроскопический и микроскопический анализы, получены данные по содержанию в них тяжелых металлов, радионуклидов, а также получены данные, свидетельствующие об их микробиологической чистоте. Все показатели находятся в соответствии с регламентируемыми нормами их присутствия для лекарственного растительного сырья. Измельчение и ситовой анализ исследуемого вида сырья проведен в соответствии с требованиями монографии Государственной Фармакопеи Республики Казахстан.

Для исследуемого объекта установлены такие показатели как определение влажности, золы общей, золы, нерастворимой в 10

% кислоте хлороводородной, сульфатной золы, основных групп биологически активных веществ. Показатель «Общая зола» указывает на количество минеральных веществ, содержащихся как в самом сырье, так и в примесях, и для корней кермека Гмелина он составляет 5,72 %. Значения показателя «Зола, нерастворимая в 10 % HCl» для корней исследуемого вида растений составляет 0,71 %, что значительно ниже регламентируемых норм для фармакопейных образцов растений (до 10 %). Количество же сульфатной золы для *L. gmelinii* значительно (7,73 %), и оно, как правило, соизмеримо с содержанием металлов в растениях, образующих нерастворимые сульфаты. К таким металлам относится кальций, содержание которого, как показал микроэлементный анализ сырья, в них значителен, так как растения рода *Limonium gmelinii* содержат каналца, удаляющие избыточное количество кальциевых и натриевых солей из почвы.

Таким образом, все установленные товароведческие показатели характеризуют взятые для исследования корни кермека Гмелина как достаточно качественное лекарственное сырье, на основе которого возможно получение лекарственной субстанции «Лимонидин» в виде сухого экстракта.

Получение субстанции «Лимонидин» проведено по простой, экономически и экологически целесообразной технологической схеме с высоким выходом (30-35 % от веса высушенного и обработанного сырья) с использованием в качестве эксципиента водного раствора этилового спирта, который генерируется в процессе производства. Для субстанции «Лимонидин» установлены физико-химические и технологические ее параметры. Она представляет собой кристаллическое вещество буровато-коричневого цвета с вкраплениями более темных частиц. Вкус горьковатый, вязущий, со слабым специфическим запахом. Форма частиц – анизодиаметрическая кристаллическая структура в виде пластинок, поверхность сложная, разнообразная. Субстанция «Лимонидин» нерастворима в бензоле, хлороформе, глицерине, подсолнечном масле и растворима в диметилсульфоксиде, диметилформамиде, в водных растворах этилового спирта (30 % и 50 %), умеренно растворима в воде при 25 °С, растворима при 40-50 °С и очень легко растворима в воде при температуре 100 °С. По определению насыпной плотности, сыпучести и угла естественного откоса субстанция характеризуется низкой сыпучестью за счет

сильной гигроскопичности. Смачиваемость – частичная. К поляризации склонны лишь наимельчайшие частицы порошка. Технологические параметры: насыпная плотность, г/см³: 1,03±0,05; сыпучесть, г/с: 2,7±0,5; угол естественного откоса: 57,7±1,3. Дисперсность (фракционный состав) субстанции не был классифицирован, так как этот параметр задается технологически.

Влажность субстанции не превышает значений данного показателя для фармакопейных образцов. Содержание общей золы – 3,10 %, золы, нерастворимой в 10 % растворе HCl составляет 0,08 %, что не превышает установленной нормы для растительных субстанций, равной 1%.

При качественном хроматографическом исследовании субстанции «Лимонидин» обнаружены флавонолы (мирицетин, кверцетин, изорамнетин, монометилловый эфир мирицетина, 3,4,5,3',4',6'-гексагидроксиоксифлаван), их гликозиды (мирицитрин, рутин, 3-β-галактозилкверцетин и 3-β-галактозилмирицетин, 3-α-галактопиранозидмирицетин и 3-O-α-L-(2"-галлоил)-арабинопиранозид мирицетина, пирогаллол, галловая и эллаговая кислоты. Основным мономерным флаваном субстанции является (-)-эпигаллокатехингаллат, обнаружены также описанные впервые в литературе различные формы флаван-3-олов: (-)-эпигаллокатехин-(4β→8)-(-)-3,5,7,3',4',6'-гексагидроксифлаван и (+)-галлокатехин-(4α→8)-[(-)-эпигаллокатехин]₅-(4β→8)-(-)-эпигаллокатехингаллат.

Количественная оценка суммы дубильных веществ в субстанции определена известным комплексонометрическим методом, флавоноидов по унифицированной для ряда растительных субстанций методике, основанной на спектрофотометрировании их комплексов с алюминием в солянокислых растворах при длине волны 410 нм с использованием в качестве стандартного раствора рутина.

Результаты определения протекторной (in vitro) и гепатопротекторной (in vivo) активностей субстанций шести видов рода *Limonium Mill* подтвердили, что для всех этих растений характерными являются дубильные вещества. Содержание последних в субстанции «Лимонидин» достигает 43,20 %.

Количество же тяжелых металлов в субстанции «Лимонидин» не превышает допустимых норм для растительной субстанции, а жизненно важные макро- и микроэлементы содержатся в ней в

необходимых количествах, что, по-видимому, в результате синергизма с другими важными компонентами и обуславливает широкий спектр физиологического действия полученного лекарственного средства – субстанции «Лимонидин».

На основе комплекса субстанции «Лимонидин» и циклодекстрина (ЦД) в Фармацевтической компании «Ромат» (г. Павлодар) разрабатывается новая лекарственная форма в виде таблеток. Циклодекстрины представляют собой уникальную группу химических веществ, обладающих специфической функциональной активностью благодаря способности образовывать комплексы включения с различными веществами. В качестве ЦД был использован β -циклодекстрин с размером внутренней полости 1,53 нм. Исследовано молекулярное комплексобразование β -ЦД с субстанцией Лимонидин двумя методами: а) метод пастообразования; б) метод брикетирования (пропускание через роликовый компактер под давлением 20 тонн). Метод пастообразования проходит с выходом менее 50 %, брикетирование позволяет получать комплекс включения почти с количественным выходом. Процесс нанокапсулирования контролировался наблюдением через микроскоп – изменение формы и размера частиц. Полученный комплекс высушивался до влаги не более 3 %. Полученный продукт представляет собой однородную удовлетворительно сыпучую массу, хорошо растворимую в воде, 0,1 н растворе НС1 и водных растворах спирта этилового (30, 50 %). Исследование комплекса проводилось с использованием методов ИК-, УФ-спектроскопии и дифрактометрии.

Исследованы технологические характеристики полученного комплекса: насыпная плотность до и после усадки, сыпучесть. Изучены биофармацевтические свойства комплекса: высвобождение действующего вещества в различных средах. На полученный комплекс разработана Спецификация качества. Полученный комплекс субстанции «Лимонидин» с циклодекстрином представляет собой порошок светло-буровато-коричневого цвета с вкраплениями более темных частиц, со слабым специфическим запахом с содержанием влаги не более 3 %. Насыпная плотность до усадки 0,707 г/см. Насыпная плотность после усадки 0,809 г/см. Порошок не является сыпучим. Количественное содержание действующего вещества субстанции «Лимонидин» в полученном его комплексе с циклодекстрином составляет не менее 46,0 %.

Разработка рационального состава и технологии получения таблеток на основе действующего вещества – субстанции

Лимонидин с ЦД и эксципиентов, а также составление на них Фармацевтической разработки проводилась в соответствии с международным требованиями, изложенными в Гармонизированном трехстороннем руководстве ICH (Фармацевтическая разработка Q8, 2009 г.).

Субстанция «Лимонидин» отличается высокой гигроскопичностью, поэтому были проведены исследования по подбору рецептуры, пригодной для прямого прессования:

- Оптической микроскопии субстанции и смесей с различными наполнителями.
- Исследование гранулометрического состава аналитическим просеиванием субстанции и смесей с различными наполнителями.
- Насыпной плотности субстанции с различными наполнителями.
- Текучести субстанции с различными наполнителями.
- Оценки и корректировки параметров процесса смешения (время смешивания; порядок смешивания).
- Оценки и корректировки параметров процесса таблетирования (усилие на верхнем и нижнем пуансонах, усилие предварительного и основного прессования, их разброс, усилие выталкивания).

Разработаны два состава гранулятов, таблетированием которых получены таблетки, удовлетворяющие фармакопейным требованиям (профили прессуемости, прочность, истираемость, распадаемость).

ЛИТЕРАТУРА

1. Флора СССР. М.: АН СССР. 1952. Т. XVIII. С. 411-467.
 2. Государственная фармакопея Республики Казахстан. Алматы. Издательский дом «Жибек жолы». 2009. Т. 2. 805 с.
 3. Zhusupova G.E., Abilkaeva S.A. Dimeric prodelphinidins from *Limonium gmelinii* roots// III. Chem. of Natural Compounds. 2006. P.134-138. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-006-0068-8>.
 4. Zhusupova G.E., Artamonova N.A., Abilov Zh.A., Orazbaeva Zh.K. Lipophilic pigments and fatty acids from the aerial parts of certain plant species of the genus *Limonium*. VII. // Chem. of Natural Compounds. 2006. P. 512-514. <http://dx.doi.org/10.1007/s10600-006-0200-9ds>.
-

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ *LEONURUS QUINQUELOBATUS* ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ В РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНАХ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

Загурская Ю.В.¹, Баяндина И.И.², Васильев В.Г.³, Богатырев А.И.⁴, Казанцева Л.М.⁵

¹ФГБУН Институт экологии человека СО РАН, Кемерово, syjl@ngs.ru;

²ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный аграрный университет», Новосибирск, bayandina@ngs.ru;

³ФГБУН Новосибирский институт органической химии СО РАН, Новосибирск, vgvasil@nibch.nsc.ru;

⁴ФГБОУ ВПО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск,

⁵Алтайский филиал ЦСБС СО РАН «Горно-Алтайский ботанический сад», урочище Чистый луг, 649218, с. Камлак, Шебалинский район, Республика Алтай, gabs@ngs.ru

Leonurus quinquelobatus Gilib. (пустырник пятилопастной) травянистое многолетнее растение. Разные виды рода пустырника являются официальными и включены в национальные фармакопеи многих стран мира. Во вьетнамскую и китайскую фармакопеи включен другой вид - пустырник японский (*L. japonicus*) [1]. В российскую фармакопею XI издания включены пустырник сердечный и пустырник пятилопастный, причем официальные на территории России виды пустырника известны своим выраженным седативным действием [2].

Траву пустырника применяют в качестве лекарственного средства при вегето-сосудистой дистонии, гипертонической болезни (ранние стадии), повышенной возбудимости. Как наружное средство настойку пустырника используют с целью заживления ожогов, отморожений и ран [3, 4].

В состав биологически активных веществ пустырника входят флавоноиды (рутин, квинквелозид), дубильные вещества, сапонины, эфирное масло. Известно, что антиаритмическое и кардиотоническое действие пустырника обусловлено наличием фенольных соединений, в частности флавоноиды *L. cardiaca* и *L. quinquelobatus* обладают кардиотоническим и седативным действием [5].

Во многих видах этого рода были обнаружены различные группы биологически активных веществ: флавоноиды (рутин, генкванин, кверцетин), дубильные вещества, сапонины, азотсодержащие соединения (леонурин, стахидрин) [6, 7].

Проанализированы почвенно-климатические условия и степень загрязнения окружающей среды в регионах проведения исследований: Кемеровская область (КЕО), Новосибирская область (НСО) и Республика Алтай (РА). При сравнении климатических и экологических показателей регионов исследования основывались на данных НИА-Природа (<http://www.priroda.ru>) за 2004 год.

Климат двух модельных регионов характеризуется как континентальный, а Кемеровской области – резко континентальный. Средние температуры января и июля в КЕО и НСО различаются незначительно (-20 и $+19^{\circ}\text{C}$), исключение составляет РА (-15 и $+18^{\circ}\text{C}$). Продолжительность вегетационного периода также существенно отличается только в Республике Алтай (120 суток) по сравнению с остальными областями (160 суток). Наибольшее количество промышленных предприятий – источников загрязнения воздушной (L) и водной (A) среды локализовано в Кемеровской области (L – 14, A – 7), а наименьшее в Новосибирской области (L – 4, A – 4). По суммарной степени загрязнения воздушной и водной среды наивысшие показатели характеризуют Кемеровскую область (1167,14 тыс. т. и 1886,28 млн. м^3), средние значения принадлежат Новосибирской области (201 тыс.т., и 629 млн. м^3). Загрязнение окружающей среды в Республике Алтай минимально (14,34 тыс. т. и 3,56 млн. м^3).

Нами проанализировано содержание нескольких классов фенольных соединений в сырьевой части *Leonurus quinquelobatus* Gilib. второго года жизни, выращенного в Кемеровской (г. Кемерово), Новосибирской (г. Новосибирск) областях и Республике Алтай (с. Камлак) в 2011 году. Сбор и сушка образцов производились по правилам, изложенным в Государственной фармакопее [3]. Качество сырья, полученного нами, соответствует требованиям, предъявляемым к лекарственному растительному сырью.

Содержание фенольных соединений определяли общепринятыми спектрофотометрическими методами: флавоноидов по образованию окрашенных комплексов с AlCl_3 , модифицированными для объектов исследования методами [8]; катехинов и лейкоантоцианов – реакцией с ванилиновым реактивом [9]; гидроксикоричных кислот – прямой спектрофотометрией [10]; суммы фенольных соединений – с реактивом Фолина- Чиокалтеу [11]. Полученные водно-спиртовые экстракты анализировали методом ВЭЖХ-МС в системе жидкостного хроматографа Agilent 1200 SL (с диодно-матричным детектором) и гибридного квадруполь - времяпролетного масс-спектрометра Bruker micrOTOFQ. Использован обращено-фазовый

режим элюирования. После сравнения полученных данных для экстрактов и смеси стандартов удалось идентифицировать только два вещества – хлорогеновую кислоту (16.9 мин) и рутин (24.2 мин). Остальные пики хроматограммы экстракта идентифицировали по полученным УФ- и масс-спектрам.

При сборе сырья пустырника было обнаружено, что смена фаз вегетации растений в регионах исследования происходит не одновременно. В Новосибирске растения *L. quinquelobatus* достигли соответствующего фенологического состояния к 23 июня, в Кемерово это произошло на неделю позже (30 июня), а в Камлаке первая возможность собрать качественный материал появилась только 6 июля.

Наибольшим содержанием фенольных соединений по всем изученным классам веществ характеризуются алтайские образцы: содержание флавоноидов в пересчете на цинарозид – около 1,5%, содержание катехинов и лейкоантоцианов – около 0,15%, суммарное содержание фенольных соединений равно 11,3% и достоверно отличалось от этого показателя для растений из Кемерово и Новосибирска. Наиболее значительная разница между кемеровскими и новосибирскими пробами наблюдается в содержании флавоноидов (0,97 и 0,85% соответственно). Содержание гидроксикоричных кислот в изученных образцах в 2-3 раза превосходит количество в них флавоноидов.

Полученные данные характеризуют растения *L. quinquelobatus*, выращенные на Алтае, как обладающие наиболее высоким содержанием фенолкарбоновых кислот (более 4,5% в пересчете на хлорогеновую кислоту). Другие регионы также существенно различались между собой по этому показателю: в пересчете на хлорогеновую кислоту растения из Кемерово превосходили по содержанию новосибирские образцы более чем на 1% (3,6 и 2,5% соответственно). Количество катехинов и лейкоантоцианов в траве пустырника низкое – от 0,128 до 0,162 % – и почти не различалось по регионам.

Собранные нами образцы сравнивали с продающимися в аптеках лекарственными препаратами и биологически активными добавками четырех различных фирм. Растения, полученные нами, превосходят по содержанию фенольных соединений большинство аптечных препаратов.

Исходя из данных, полученных методом ВЭЖХ-МС, основным компонентом в экстрактах пустырника являются производные кофейной кислоты, доминирующими флавоноидными веществами являются квинквелозид и гликозид апигенина.

Для каждого образца было рассчитаны относительные

содержания шести основных компонентов фенольной природы: производных хлорогеновой и кумаровой кислот, рутина, квинквелозида, гликозида апигенина и неидентифицированного флавоноида ($t_R = 28.6$ мин). На Алтае и в Кемеровской области сырье пустырника содержало одинаковое количество производного апигенина и неизвестного флавоноида (Табл. 1).

Таблица 1.

Соотношение основных фенольных компонентов в сырьевой части *L. quinquelobatus*, культивируемых в различных регионах Западной Сибири (в пересчете на минимальную площадь пика)

Соединение / Образец	Камлак	Новосибирск	Кемерово
Хлорогеновая кислота и её производные	1,6	1,0	1,6
Рутин	2,6	1,0	1,6
Неизвестный флавоноид	1,5	1,0	1,4
Производные кумаровой кислоты	1,5	1,7	1,6
Квинквелозид	4,2	2,9	3,0
Производное апигенина	2,4	2,5	2,1
Сумма	1,6	1,0	1,5

В растениях из Новосибирской и Кемеровской областей содержание рутина достоверно не различается, и уступает алтайским образцам почти в 2 раза. В Новосибирской области обнаружено повышенное, по сравнению с остальными территориями, содержание квинквелозида и ещё двух флавоноидов. Количество производных хлорогеновой кислоты минимально в растениях из Новосибирска, кемеровские и алтайские пробы не различались по данному признаку. Суммарное содержание компонентов фенольной природы также минимально в образцах из Новосибирска, кемеровские и алтайские растения различались по данному показателю незначительно.

Средняя продуктивность растений по суммарному выходу фенольных соединений, рассчитанная на основании массы сырья, полученного с десяти растений, и содержания соединений, оказалась наиболее высока в Новосибирске, и составила почти 6 г на растение, несколько меньшее количество суммы полифенолов содержат растения, собранные в Кемерово – 5,2 г, минимум вероятного выхода веществ характеризует алтайские образцы – 2,7 г. То есть, с увеличением сырьевой массы растений происходит снижение содержания фенольных веществ различных классов, вследствие возрастания доли стеблей в массе сырья.

Прямых зависимостей между экологическими факторами и содержанием фенольных веществ в пустырнике не выявлено, однако это может быть связано с широким диапазоном

оптимальных для растений данного вида условий.

Таким образом, полученное нами сырье растений *L. quinquelobatus* второго года жизни характеризуется высоким содержанием фенольных соединений различных классов. Наибольшее содержание всех групп полифенолов отличает растения, выращенные на Алтае. Растения, полученные в условиях Кемерово, характеризуются средним содержанием биологически активных веществ, но, как и другие, превосходят по качеству большинство аптечных препаратов. Установлены различия в составе и содержании фенольных соединений различных классов в сырьевой части пустырника при выращивании в различных регионах.

Работа поддержана РФФИ (грант №10-04-98011-р_сибирь).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hayashi Y. Studies on the ingredients of *Leonurus sibiricus* L. // Yakugaku zasshi. 1962. V. 82. N. 7. P. 1020-1023.
2. Нго Т.Т. Зиэп, Жохова Е.В. Продукты вторичного метаболизма видов рода *Leonurus* (Lamiaceae) // Растительные ресурсы. 2007. Т. 43. Вып. 4. С. 125-141.
3. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. / 11-е изд. М. 1990. 400 с.
4. Пронченко Г.Е. Лекарственные растительные средства: Справочное пособие для вузов / под ред. Арзамасцева А.П., Самылиной И.А. М.: ГЭОТАР МЕД. 2002. 288 с.
5. Ritter M., Melichar K., Strahler S., Kuchta K., Schulte J., Sartiani L., Cerbai E., Mugelli A., Mohr F.W., Rauwald H.W., Dhein S. Cardiac and electrophysiological effects of primary and refined extracts from *Leonurus cardiaca* L. (Ph.Eur.). // Planta Med. 2009. V. 76. N. 6. P. 72-82.
6. Дикорастущие полезные растения России / под. ред. А. Л. Буданцева, Е. Е. Лесиовской. СПб.: Изд-во СПХФА, 2001. 663 с.
7. Chao Z., Ma L.L., Zhou X.J. Determination of stachydrine and leonurine in Herba Leonuri by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2004. V. 24. N. 11. P. 1223-1226.
8. Зиэп Т. Т., Жохова Е.В. Разработка методики количественного определения суммарного содержания флавоноидов в траве пустырника спектрофотометрическим методом // Химия растительного сырья. 2007. № 4. С. 73-77.
9. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А.И. Ермакова. Л.: 1987. С. 348-349.
10. Ларькина М.С., Кадырова Т.В., Ермилова Е.В. Изучение динамики накопления фенолкарбоновых кислот в надземной части василька шероховатого // Химия растительного сырья. 2008. №3. С. 71–74.
11. Мазец Ж.Э., Шаститко Л.В., Бузук Г.Н., Спиридович Е.В. Динамика накопления соединений фенольной природы в листьях *Betula pendula* // Весті БДПУ. Серія 3. 2010. № 3. С. 3-7.

ПОЛИФЕНОЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА РЯДА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *POTENTILLA* L. В УСЛОВИЯХ БЕЛАРУСИ

Игнатенко В.А., Кухарева Л.В., Гиль Т.В., Кот А.А.

ГНУ Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика
Беларусь, тел.:(+375 017) 284-15-67 ; e-mail: Ignatenko_07@list.ru,
KucharevaL@mail.ru, T.Gill@cbg.org.by

Среди большого разнообразия лекарственных растений отечественной флоры несомненный интерес представляют растения рода лапчатка *Potentilla* L. - сем. розовых *Rosaceae* L., издавна применяющиеся в народной медицине многих стран, например в русской, тибетской и китайской медицине.

Полезные свойства рода *Potentilla* L. определяются его уникальным химическим составом, относительно изученным в настоящее время. Известно, что в лапчатках содержатся кумарины, гидроокисоричные кислоты, флавоноиды (флавоны, катехины, антоцианы, содержащиеся в виде гликозидов), дубильные вещества, органические кислоты, витамины, углеводы, макро- и микроэлементы и др. [1,3]. Препараты из растений оказывают гемостатическое, вяжущее, противовоспалительное и антигельминтное действие. Данные соединения характеризуются широким спектром биологической активности: являются антиоксидантами, иммуностимуляторами, адаптогенами, антидепрессантами, действуют как омолаживающее средство, улучшающее качество жизни.

Род насчитывает около 300 видов, большая часть которых распространена в Северном полушарии, он один из самых обширных во флоре бывшего СССР, насчитывает 148 видов, произрастающих в различных климатических условиях, но лесных среди них мало. Растет почти по всей территории Европы, на Кавказе, в Западной Сибири и Средней Азии. В светлых лесах можно встретить лапчатки белую (*P. alba* L.) и серебристую (*P. argentea* L.) - в европейской части. Однолетние, двулетние и многолетние корневищные, травянистые растения, иногда полукустарники с прямостоячими, ползучими или приподнимающимися стеблями. Листья тройчатые, пальчатые или перистые. Цветки желтые, реже белые, розовые, пурпуровые, одиночные или собраны в соцветия. Плод у всех представителей рода лапчатка – многоорешек.

Народная медицина сохранила способы лечения, основанные не только на приготовлении отваров и настоек

корневища, но и лекарственного применения сока, зеленых частей свежего растения. Трава и корневища некоторых лапчаток в народной медицине используется при заболеваниях желудка и кишечника, отеках, диарее, желтухе, заболеваниях печени, наружно используют для компрессов при ранах, ушибах с кровоподтеками и др. [1,3]. Отвар травы и корневища лапчаток обладает вяжущим, антимикробным действием, применяются при желудочно-кишечных и простудных заболеваниях.

Полезные свойства лапчаток и многостороннее использование поставило задачу о введении их в культуру. На текущий момент развития лекарственного растениеводства - сорт является наиболее доступным фактором повышения урожайности и качества растительного сырья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования явились представители рода лапчатка: л. серебристая (*Potentilla argentea* L.), л. прямая (*Potentilla erecta* L.) - сорт "Лучезарная" и л. белая (*Potentilla alba* L.) - сорт "Зарянка" из семейства розовых *Rosaceae* L., произрастающие в коллекционном питомнике лекарственных и пряно-ароматических растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси на хорошо окультуренной дерново-подзолистой почве.

Отбор проб проводился в фенофазу массового цветения. В высушенных усредненных пробах растительного сырья определяли содержание отдельных компонентов биофлавоноидного комплекса в 3-х кратной повторности с последующей статистической обработкой результатов с помощью пакета прикладных программ Excel следующими методами: суммы антоциановых пигментов (лейкоантоцианы) – по методу Т. Swain, W. E. Hillis [2] с построением градуировочной кривой по кристаллическому цианидину; суммы флавонолов - по методу Л. Сарапуу и Х. Мийдла [5], суммы катехинов – фотометрическим методом с использованием ванилинового реактива по методу М.Н. Запрометова [5], гидрооксикоричных кислот – по методу Мжаванадзе с соавт. [7]. Для изучения фенольного состава сырья использовали качественные реакции, УФ-спектрофотометрию, бумажную (нисходящую) хроматографию, хромогенными проявителями были: пары NH_4OH , 2% спиртовой раствор NaOH , 5% спиртовой раствор AlCl_3 [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении особенностей жизнедеятельности растений в условиях изменяющихся внешних факторов важнейшими показателями служат уровень накопления, сочетание и

соотношение отдельных фракций биологически активных веществ, специфичных для каждого вида и вместе с тем внутренне связанных с онтогенетическими ритмами развития растений [6]. Известно, что представители рода лапчаток успешно выращиваются в культуре. Отмечено, что условия культуры являются для лапчаток мощным экологическим фактором, влияние которого очень заметно [8].

На основании результатов качественных реакций, флуоресценции в УФ-свете, данных R_f веществ, а также прямой спектрофотометрии в надземной массе идентифицированы фенольные соединения: производные лютеолина, кверцетина и кемферола, рутин и др., гидрооксикоричные кислоты (п-кумаровая, кофейная, хлорогеновая и ее изомеры и др.), флаванов (катехины и др.), дубильные вещества.

Содержание фенольных веществ в растениях может колебаться в широких пределах не только у различных видов рода, но и у представителей одного и того же вида в зависимости от условий произрастания. Поэтому установление фактов обуславливающих колебания в содержании отдельных групп соединений позволило бы подойти к регулированию их образования в растениях.

Количественное определение см. рисунок фенольных соединений, гидрооксикоричных кислот и флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом на VSU-2P (Германия) при соответствующей длине волны. Так, содержание в изучаемых видах составило: гидрооксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту от 504 до 1349 мг%, флавоноидов в пересчете на кверцетин от 2683 до 5050 мг%. Среди флавоноидов лейкоантоцианидины преобладали у лапчатки серебристой до 3679 мг%, а л.белая и прямая всего до 960 мг%.

Содержание флаванов проводили спектрофотометрическим методом на КФК-2 (раствор ванилина, поглощение при 500 нм), калибровочная кривая построена по (-)-эпикатехину. Максимальным накоплением отличилась также л.серебристая до 2044 мг%, средне количество у л.белой до 1300 мг%, втрое меньше у л. прямой.

Растительный организм на разных этапах своего роста и развития претерпевает различные физиолого-биохимические изменения. В результате этого содержание веществ в организме, в частности биологически активных, не остается постоянным и обычно подвержено значительным колебаниям. Установлено, что эти особенности носят закономерный характер тесно связанный с фазами развития организма.

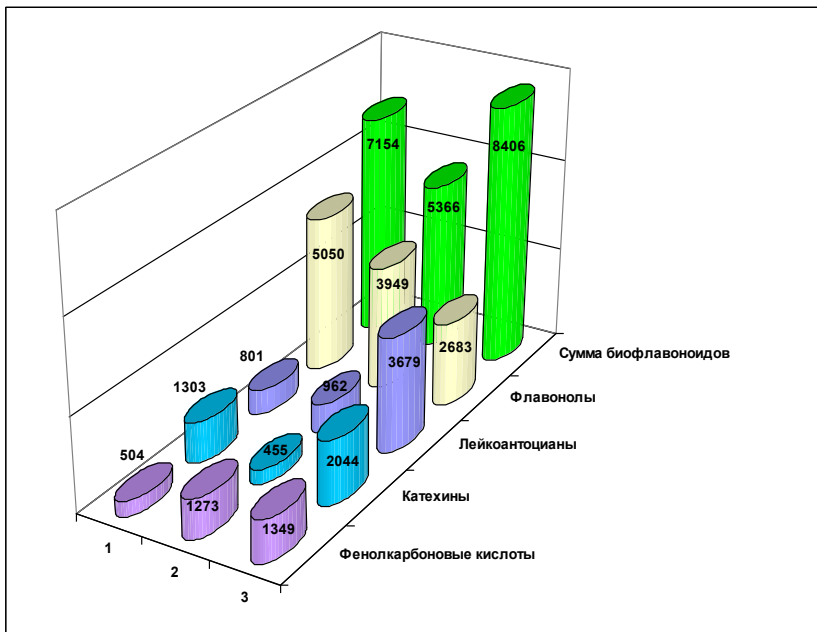


Рис. Содержание фенольных соединений у различных представителей рода лапчатка (мг, %)
 1 - Лапчатка белая "Зарянка", 2 - Лапчатка прямая "Лучезарная", 3 - Лапчатка серебристая.

Нашими исследованиями установлено, что изученные растения рода лапчатка являются перспективными для разработки бактерицидных, противовирусных, адаптогенных, антиоксидантных и других лекарственных средств и препаратов. При этом нами было установлено, что растения рода лапчатка культивируемые в условиях Беларуси обладают повышенной способностью к биосинтезу биофлавоноидов. Наиболее высокое суммарное содержание этих соединений наблюдалось в период цветения у лапчатки серебристой и лапчатки белой до 8406 мг% (см. рисунок). Наши представители сем. Розовых относятся к видам богатыми фенольными соединениями, среди которых встречаются 5 из основных классов флавоноидов.

Результаты выполненной работы позволили создать оригинальную базовую информацию по характеристике накопления полифенольных соединений в созданных 2 сортах и 1 сортообразце лекарственных растений рода лапчатка культивируемых в условиях Беларуси.

ЛИТЕРАТУРА

1. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Сем. *Hippuridaceae* - *Lobeliaceae* // СПб.:Изд. Наука. 1991. 198 с.
2. Методы биохимического исследования растений / А.И. Ермаков [и др.]; под общ. ред. А.И. Ермакова – 3-е изд. Ленинград. ВО Агропромиздат. 1987. 430 с.
3. Шмерко Е.П., Мазан И.Ф. Лечение и профилактика растительными средствами. Баку: Азербайджан. 1992. 316 с.
4. Барабой В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений. Киев. Наукова думка. 1976. 260 с.
5. Запрометов М.Н. Биохимия катехинов. М.: Наука. 1964. 325 с.
6. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука. 1993. 272 с.
7. Мжаванадзе В.В., Таргамадзе И.Л., Драник Л.И. Количественное определение хлорогеновой кислоты в листьях черники кавказской (*V. arctostaphylos* L.) // Сообщ. АН Груз ССР. 1971. Т. 63. Вып. 1. С. 205-210.
8. Технология возделывания лекарственных растений // Мн.: Минсктиппроект. 2008. 128 с.

УДК 635.25:584.19:581.1

ПРИМЕНЕНИЕ СЕРОВОДОРОДНЫХ МИНЕРАЛЬНЫХ ВОД ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ СЕЛЕНА В ЧЕСНОКЕ

Кесаев А.Т.

Горский ГАУ, Владикавказ, PCO-Алания, тел. 8-988-835-63-65,
alina.kesaeva25@mail.ru

Северная Осетия-Алания богата природными источниками. В последние годы на ее территории обнаружены более 40 источников минеральных вод, обладающих уникальным химическим составом и используемых в медицине.

Минеральная Закинская вода обнаружена на высоте 2000 м и содержит достаточно высокое количество сероводорода - 120 мг/л. Учитывая и другие ценные микроэлементы в воде, использовали ее при посадке чеснока, выдерживая в ней зубки 2-3 часа с последующим обволакиванием природной глиной диалбекулит.

Содержащаяся в воде сера (в составе сероводорода) блокирует заболевания чеснока. Известно, что селен заменяет серу в аминокислотах метионин и цистеин. При этом первоначально синтезируется селенометионин, который далее преобразуется в селеноцистеин, селеноцистатин или при деметилировании в селенометилселеноцистеин.

Образующийся селен присутствует в ряде окислительно-восстановительных ферментов вместе с железом (содержащимся в диалбекулите – 7,1%).

Селен участвует в реакциях образования хлорофилла, синтеза трикарбоновых кислот, а также в метаболизме длинноцепочных жирных кислот. Все это свидетельствует об активном участии серы (в составе минеральной Закинской воды) в процессе фотосинтеза. Большое участие сера и селен принимают в образовании витамина Е (токоферола), образуемого в растении чеснока.

Функция серы в растительном организме состоит в поддержании уровня окислительно-восстановительного потенциала клетки за счет обратимости реакции цистеин – цистин $\text{SH} - \text{глутатион} - \text{S} - \text{S} \text{ глутатион}$. Сера является также компонентом коэнзима А и витаминов (липоевой кислоты, биотина, тиамина), играющих существенную роль в дыхании и липидном обмене.

Изучая различные варианты опытов, выявлено, что чистая продуктивность фотосинтеза максимальная на варианте, где использованы местные природные источники (минеральная сероводородная вода и глина диалбекулит).

Анализ полученных результатов по фотометрическим показателям свидетельствует, что природные источники обеспечивают растения чеснока питательными элементами с одновременной теплоемкостью и сорбционной способностью глины накапливать вещества, содержащиеся в минеральной воде.

Наблюдение за развитием растений высаженных зубков показали, что всходы на оптимальном варианте появились на 4-5 день раньше контрольного варианта. Кроме того, исследованиями определено, что в горных условиях с резкими перепадами температур в разное время суток и высокой ультрафиолетовой радиацией растения чеснока развиваются более интенсивно, чем в предгорной зоне.

В наших опытах урожайность озимого чеснока на варианте с использованием природных малозатратных питательных веществ составляла более 8т/га, тогда как на контроле она не превышала и 5,8 т/га. При этом количество селена увеличилось с 7,2 на контроле без обработки минеральной водой до 16,8 мг/кг на оптимальном варианте (минеральная вода и глина диалбекулит). Одновременно снизилось заболевание чеснока с 5,2 до 1,8%, а масса луковиц возросла с 29,2 до 39,2 г.

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА *CORNACEAE* DUMORT.

Клименко С.В., Осипова И.Ю.

Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины, Киев,
Украина, тел. +380442538485, cornuskljmenko@mail.ru

Виды полиморфного семейства *Cornaceae* Dumort. мало распространены и изучены в Украине, хотя многие из них ценятся как плодовые, лекарственные и очень декоративные растения. По данным разных авторов семейство насчитывает от 50 до 110 видов. Аборигенные виды семейства в Украине представлены всего 3 видами: *Cornus mas* L. (кизил мужской или настоящий), *Swida sanguinea* (L.) Opis (свидина кроваво-красная) и *S. australis* (C.A. Mey.) Pojark. ex Grossh. (свидина южная).

Наиболее изучен *Cornus mas* L., который в Украине дико растет в Крыму, в Закарпатье и Прикарпатье, локально – в Черкасской и Кировоградской областях. В Виноградовском районе Закарпатья в урочище Ботар, сохранились природные заросли кизила площадью до 30 га – это одно из наибольших местонахождений кизила в Европе. Кизилу свойственна высокая стойкость к неблагоприятным погодным условиям [5, 7].

В результате аналитической и синтетической селекции в Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко, в Киеве, созданы сорта кизила перспективные для культивирования в промышленных, фермерских и аматорских хозяйствах в Лесостепи и Полесья Украины, а также в Степи, в условиях орошения. Впервые в 1990–2001 гг в Госсортоиспытание переданы и внесены в Реестр сортов растений Украины 14 сортов кизила [8, 13, 14].

Интродуцированные в Украину из разных ботанико-географических районов ценные виды семейства *Cornus officinalis*, *Synoxylon*, виды рода *Swida* практически не исследовались.

Все части растений видов кизиловых (плоды, листья, кора, корни) являются лекарственным сырьем и издавна используются в народной медицине для лечения малокровия, нарушения обмена веществ, как противогинготное, противодиабетическое средство [1, 11, 15].

Лекарственное значение и пищевая ценность плодовых растений, как правило, определяется содержанием биологически активных веществ в плодах и – в меньшей степени, в вегетативных органах. Плоды кизила настоящего и лекарственного известны как богатый источник БАВ [6]. Вегетативные органы изучены меньше, хотя исследования последних лет [2, 3, 16] показывают, что они

являются ценным лекарственным сырьем.

Объекты исследований – виды семейства *Cornaceae*, а именно: *Cornus mas* – дерен настоящий (три сорта – Элегантный, Коралловый, Янтарный), *Cornus officinalis* – дерен лекарственный, *Synoxylon japonica*, *cousa* – циноксилон японский или Коуза и два вида свидины – *Swida sanguinea* – кроваво-красная и *Swida alba* – белая.

Цель наших исследований – определение содержания фенольных соединений (ФС) в вегетативных органах растений упомянутых видов для оценки их как лекарственного сырья.

Характерной особенностью высших растений является их способность синтезировать огромное разнообразие так называемых вторичных соединений [4, 10, 17]. Эти вещества различны как по строению, так и по выполняемым функциям. К их числу относятся фенольные соединения – это вещества с различными химическими свойствами, они присутствуют как в генеративных, так и в вегетативных органах растений. Многообразие флавоноидов определяет их полифункциональность – они участвуют во многих жизненно важных процессах растительного организма. В литературе есть данные об участии их в репродуктивных процессах, в ряде работ показано, что флавоноиды являются стимуляторами или ингибиторами некоторых ферментативных преобразований. Важная роль флавоноидов, наряду с другими ФС, в повышении иммунитета растений [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наибольшим количеством суммы ФС отличается циноксилон японский – в течение вегетации содержание фенолов в побегах составило 4,82–29,53 мг/г массы абсолютно сухого вещества, а в листьях – 46,2–77,78 мг/г. Далее идет дерен настоящий – в побегах количество фенолов было 10,57–24,60, а в листьях – 28,18–49,14 мг/г. В сортовых образцах ФС было меньше, чем у дикого. Интересно, что содержание фенольных соединений в сортах дерена уменьшался от сорта Элегантного (с красными плодами) до сорта Янтарного (с желтыми плодами). Так, в побегах Элегантного количество ФС составило 4,87–18,89, в листьях – 16,00–21,56 мг/г, в побегах Кораллового – 3,21–10,32, в листьях – 10,67–17,89 мг/г, у сорта Янтарный фенольных соединений было меньше: в побегах – 1,09–7,34, в листьях – 8,79–14,83 мг/г массы абсолютно сухого вещества. Что касается дерена лекарственного, то форма № 1 имеет несколько больше фенольных соединений, чем форма № 2. Так, в побегах формы № 1 количество ФС колебалось от 6,45 до 17,97 мг/г, в листьях – от 38,00 до 59,14 мг/г в

форме № 2 эти показатели таковы: в побегах от 4, 39 до 15,21, в листьях – от 27,49 до 43,31 мг/г.

Свидина белая и кроваво-красная также содержат значительное количество фенольных соединений, но у свидины кровавой их несколько больше. Так, в ее побегах количество фенолов составляет 4,60–39,89, в листьях – 35,60–57,67 мг/г, в побегах свидины белой – 3,06–29,27, в листьях – 30,04–39,47 мг/г массы абсолютно сухого вещества.

При определении дубильных веществ (средние данные за вегетационный период) нами получены следующие данные: в побегах циноксилон японского – 15,36%, дерена лекарственного формы № 1 – 10,52%, формы № 2 – 8,11%, дерена настоящего – 13,48%, сорта Элегантный – 6,58%, сорта Коралловый – 5,38%, сорта Янтарный – 4,51%; в листьях, соответственно – 17,39%; 13,82%; 11,95%, 16, 74%; 9,27%; 6,67%; 5,84%.

Как видно, тенденция накопления дубильных веществ как в побегах, так и в листьях такая же, как и содержание суммы ФС. В исследованных нами образцах кизила количество дубильных веществ несколько меньше, чем отмечает Г.П. Леонтьев (1979) в диком кизиле Молдовы [9]. По его данным, в побегах кизила настоящего накапливается 15,0–20,0% дубильных веществ. Такие расхождения можно объяснить разными почвенно-климатическими условиями кизила в Молдове и в Лесостепи Украины.

В побегах свидины кроваво-красной содержится 4,60–15,89%, в листьях – 9,67–20,51%; в побегах свидины белой – 3,71–11,94%, в листьях – 7,59–16,54% дубильных веществ. И по этому показателю свидина кроваво-красная преобладает над свидиной белой.

Оригинальные данные получены по содержанию флавоноидов у исследуемых видов семейства *Cornaceae*. Здесь лидером является свидина белая: в листьях и побегах ее наибольшее содержание флавоноидов, соответственно – 7,51 и 2,23 мг/г массы абсолютно сухого вещества, далее идут дерен лекарственный – 6,99 и 1,75 мг/г и свидина кроваво-красная – 5,95 и 1,92 мг/г. Наименьшее количество флавоноидов накапливается в листьях и побегах дерена сорта Янтарный, соответственно – 3,67 и 1,30 мг/г и циноксилон японского, в листьях – 3,76 и в побегах – 0,57 мг/г массы абсолютно сухого вещества. В других образцах содержание флавоноидов в листьях составляет от 4,31 до 4,49 (дерен настоящий), а в побегах – от 1,83 до 2,41 (тоже дерен настоящий) мг/г массы абсолютно сухого вещества. Полученные данные свидетельствуют, что, в частности, листья и побеги исследованных видов семейства *Cornaceae* могут использоваться как дополнительный источник веществ с Р-витаминной

активностью, тем более, что все они являются лекарственными растениями.

Упомянутые виды хорошо адаптировались в новых условиях Лесостепи, имеют высокую репродуктивную способность, иммунны к болезням и вредителям, о чем свидетельствуют многолетние наблюдения С.В. Клименко [7].

Наши экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в вегетативных органах исследованных видов семейства *Cornaceae* содержится довольно много фенольных соединений вообще и, в частности, дубильных веществ и флавоноидов. Учитывая то, что большинство фенольных соединений являются биологически активными, они вместе с другими веществами обуславливают лечебные свойства растений исследованных видов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев В.П. Растительные ресурсы Китая. Л. 1935. 108 с.
2. Джан Т.В., Ковальський О.В. Вивчення складу летких сполук у листі кизилу звичайного (*Cornus mas* L.). Актуальні питання створення нових лікарських засобів// матер. Всеукр. наук.-практ. конф. студ. та мол. вчених. Х.: НФаУ. 2012. С. 72.
3. Джуренко Н.І., Паламарчук О.П., Клименко С.В. Вміст флавонолідів у листках малопоширених плодово-ягідних рослин// Теоретичні та прикладні аспекти інтродукції рослин і зеленого будівництва. Умань. 2002. С. 159–160.
4. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их биологические функции. М.: Наука. 1971. 185 с.
5. Клименко С.В. Кизил на Украине. Киев. Наук. думка. 1990. 174 с.
6. Клименко С.В., Недвига О.Н., Скрипка Е.В. и др. Биологически активные вещества новых плодовых растений // 3 Укр. конф. по мед. ботанике. Тез. докл. Ч.2. Киев. 1992. С. 66–67.
7. Клименко С.В. Кизил в Україні: біологія, вирощування, сорти. К.: Фітосоціоцентр. 2000. 92 с.
8. Клименко С.В. Кизил. Сорты в Украине. Полтава: Верстка. 2007. 67 с.
9. Леонтьяк Г.П. Кизил. Перспективы его использования // Лесное хозяйство Молдавии. 1979. № 5. С. 60–61.
10. Лукнер М. Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных. М.: Мир. 1979. 548 с.
11. Мамедов Ш.Ш., Руденко И.С., Дудукал Г.Д. Биохимический состав дикорастущего кизила, произрастающего в Шеки-Закатальской зоне Аз ССР // Ботан. исслед. Кишинев. 1990. Вып. 7. С. 109–112.
12. Минаева В.Г. Флавоноиды в онтогенезе растений и их практическое использование. Новосибирск. Наука. 1978. 255 с.
13. Реєстр сортів рослин України на 2001 р. Киев. 2001. 139 с.
14. Klymenko S., Brindza J., Grygorieva O. Non-traditional fruits and berry plants in the register of sorts of plants of Ukraine// Bezpečnost a kvalita potravín. Nitra. 2010. S. 244–247.
15. Hofman J. Poznamky o drinu// Ziva. 1954. № 2. P. 8–13.

-
16. Iwashina T., Hatta H. The flavonoid glycosides in the leaves of *Cornus* species // *Annals of the Tsukuba Botanical Garden*. 1992. № 1. P. 23–37.
 17. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective // *Phytochemistry*. 2003. V. 64. P. 3–19.
-

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТРАЦЕНСОДЕРЖАЩИХ РАСТЕНИЙ

Корулькин Д.Ю., Музычкина Р.А.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан,
тел. (727) 3871751, e-mail: Dmitry.Korulkin@kaznu.kz

Многие антраценсодержащие растения принадлежат к числу лекарственных с широким спектром физиологического действия и описаны в Государственных фармакопеях многих стран. Известно 160 фитопрепаратов, в состав которых входят различные природные антрахиноны. Наряду с официальными растениями, народная медицина использует и другие антраценсодержащие растения и лекарственные средства из них. Например, издавна в медицинской практике применяют мягкие слабительные и антидерматические средства, действующим началом которых являются гидрокси-, метокси- и гликозидированные производные антрахинона. Несмотря на то, что существуют более дешевые синтетические слабительные средства, препараты из растений, до наших дней, не утратили своего значения, так как действуют мягко, безболезненно, не вызывая раздражения органов и тканей, хорошо выводятся из организма, не вызывают побочных эффектов.

О значении этой группы лекарственных растений свидетельствует и тот факт, что среди 37 видов только слабительных лекарственных растений, разрешенных к медицинскому применению более 100 лет назад, до сих пор используются *Cassia acutifolai Delile.*, *Frangula alnus Mill.*, *Rheum palmatum L.*, *R. tanguticum Maxim*, и многие другие (более 40 видов).

В фармакопеях многих стран, наибольшее признание получили слабительные лекарственные средства, содержащие димерные антрагликозиды.

В ряде стран в качестве лечебных средств применяют широко распространенные местные виды растений. Так, в Индии вместо китайского ревеня в качестве слабительного средства используют корни *Rheum emodi Rh. Werbinum*, а в Японии - корни *Rheum indulatum*. Как правило, в народной медицине одно и то же

растение используется для различных целей. Например, многие виды кассий применяются как слабительное: *Cassia absus* L. и *C.fistula* L. в Индии, *Cacutifolia* Del. *C.anqustifolia* Vahl. - в большинстве стран мира, *Cholosericea* Fresen. - в Адене, *C.marilandica* L. - в США, *C. Moschata* - в Колумбии, *C.obovata* Collad L. - в Италии и на Ямайке, *C.carnaval* Sped., *Ccorimbosa* Lam., *Chookeriana* Gill., *Csubulata* Gris - в Аргентина, *C.obtusifolia* L., *C.sophora* L., *C.tora* L. - в тропических странах Африки, Азии и Америки. В качестве бактерицидного препарата кассию употребляют в Западной Африке, где сухие листья растирают в порошок и прикладывают к ожогам и язвам. Семена *Cassia absus* L., листья *C.Occidentalis* L., *Csophora* L. используются в Южной Африке и Индии как средство против круглых червей. Как антипаразитарное средство и для лечения кожных заболеваний в народной медицине Зимбабве используется растение *Odura pulchra*.

Настой корней *C.alata* L. применяется в Гватемале при ревматизме, отвар корней *Csieberiana* D.C. - как диуретик в Гамбии, отвар из листьев *Coxyphylla* Kunth. - как рвотное в странах центральной Америки и Мексике, листья *Cmimosoides* L. - как чай в Японии. Как заменитель кофе в Гватемале, Бразилии и Мексике используют семена *Clavigata* Willd., *Coccideutalis* L., *C. Sericea* Sw, *C. Toga* L.

В качестве слабительных средств используют листья различных видов сенны, экстракт сенны (антрасеннин), настойку «венское питье», сложный порошок «солодкового корня», антроны кассии (каскарозиды), листья и плоды кассии. Известно также, что экстракт семян и стручков кассии обладает фунгицидными свойствами. Корни и семена кассии рекомендованы в качестве антимикробного средства, а суммарный препарат из *Cassia pumila* (фисцион, хризофанол, эмодин, неокантонол) обладает спазмолитическим действием.

Корень и корневище ревеня обладают тонизирующим, слабительным и вяжущим действием. Лекарственные свойства ревеней обуславливаются антрагликозидами, хризофанолом, эмодином, реином, реинозидами, танногликозидами. Препараты ревеня применяют самостоятельно и в сочетании с другими веществами. Наиболее известны «порошок ревеня», «экстракт ревеня сухой», «водно-спиртовая вытяжка», «настойка ревеня спиртовая», «сироп ревенный», применяемый при атонии кишечника, метеоризме и для улучшения пищеварения. Выявлена митотическая активность водорастворимых фракций *Rheum officinale*.

Экстракты многих видов зверобоя проявляют фотодинамическую активность и входят в состав соответствующего препарата «иманин». Антрахиноны из *Morinda parvifolia* и *M. officinalis* обладают противолейкозным действием.

Из коры крушины ломкой производится препарат «кофранал», химическое исследование которого показало, что он содержит эмодин и глюкофрангулин, которые, попадая в организм, в результате кислотного гидролиза распадаются на эмодин, D-глюкозу и L-рамнозу, а при ферментативном - на D-глюкозу и франгулин.

В медицинской практике используется экстракт крушины имеретинской, плоды крушины, применяющиеся в виде отваров и настоек, «рамнил»-препарат, содержащий до 60% антрагликозидов, который наряду со слабительным эффектом применяется и при желудочно-кишечных заболеваниях. Суммарный препарат «холагол», в состав которого входит эмодин, оказывает желчегонное и спазмолитическое действие.

Мелкоизмельченная кора крушины входит в состав препарата «Викалин», применяемого при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, а так же в составе лекарственных смесей «желудочный сбор» № 3, 5, 11, «слабительный сбор» № 1–6, таблетки «Альтра», «Нормогран», «Неонормакол», «Нербапол» и др.

Марена красильная содержит свободные и связанные антрахиноны и употребляется в народной медицине в качестве вяжущего и мочегонного средства, при рахите, заболеваниях суставов, детской сухотке, желтухе, ревматических болях. Сухой экстракт марены обладает диуретическим и спазмолитическим действием, а так же способностью разрыхлять почечные камни, состоящие из фосфатов кальция и магния. Например, «Цистенал» и «Спазмоцистенал» - комплексные препараты, содержащие экстракт марены красильной, расслабляют мускулатуру мочеточников и облегчают прохождение мелких конкрементов.

Препараты «Франгин» из крушины, «Франгулаксин» из алоэ, благодаря содержанию антрагликозидов, обладают мягким слабительным действием и назначаются в детской практике. Из листьев алоэ издавна получали лекарственное средство «Сабур» - сгущенный и затвердевший сок листьев алоэ, содержащий алоин, свободные и связанные антрагликозиды. В народной медицине, гомеопатии, ветеринарии «Сабур», как и сами листья алоэ, имеет разностороннее применение: это общепризнанное сильное слабительное средство, его употребляют при туберкулезе,

нарывах, лишаях, головных болях, болезнях глаз и при многих других заболеваниях.

Экстракт листьев алоэ применяют при прогрессирующей близорукости, миотическом хориоретините, конъюнктивите, кератите, помутнении стекловидного тела, при бронхиальной астме, при ревматических болях, как ранозаживляющее средство. Как средство, влияющее на процессы тканевого обмена, применяют «сироп алоэ с железом». Из сиропа алоэ готовят специальный экстракт, содержащий биогенные стимуляторы. Известен «линимент алоэ», применяемый в глазной практике, а также для лечения гнойных ран и воспалительных заболеваний кожи. Описан опыт лечения экстрактом листьев алоэ язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, бронхиальной астмы, некоторых отоларингологических заболеваний, а в комплексе с новокаином - для лечения амфодонтоза. Из алоэ предложено средство для восстановления или укрепления аутогенных сил организма человека и животных, а также защиты кожи.

Оксиантрахиноны являются основой липких фармацевтических пластырей противовоспалительного действия. Для лечения вирусных заболеваний, вызываемых *herpes simplex* используют алоэ-эмодин из коры *R. frangula*, листьев *Cassia angustifolia* и других растений.

Известно применение водных экстрактов плодов и корней некоторых видов щавелей в медицинской и ветеринарной практике в качестве противовоспалительных и ранозаживляющих средств, применение антрахинонов щавелей, ревеней и др. лекарственных растений для лечения кожных заболеваний, а также при гипертонической болезни.

Фармакологические исследования различных видов щавелей, проведенные ВИЛР, показали их высокую активность против энтероколитов с кровотечением и подтвердили сведения народной медицины о возможности использования щавелей при чесотке, грибках, лишаях, а также как противогрибковое и противогнилостное средство.

Для лечения псориаза и сухой экземы, а также аллергических заболеваний предложены водные экстракты антрагликозидов из листьев и соцветий *Tanacetum balsamite*, стеблей *Persicaide douce*.

Из природных восстановленных производных большое значение в лечебной практике имеет «Хризаробин» - суммарный препарат, состоящий из окисленных и восстановленных форм антрахинонов, которые накапливаются в пустотах тропических деревьев, например *Andira oraroba*.

Хризаробин и его синтетические аналоги - «Антралин» (Дитранол), «Цигнолин» и др. применяются также для лечения чешуйчатого лишая и грибковых поражений кожи. Они оказывают противовоспалительное и зудоуспокаивающее действие, причем при длительном наблюдении за больными не отмечено преимуществ стероидосодержащих мазей по сравнению с мазями, содержащими восстановленные производные антрахинона. Различные виды щавелей используют в медицинской практике Турции, Индии и Китая, причем отмечено, что из 200 обследованных видов терапевтическое значение имеют 23 вида и 5 гибридов с различным содержанием суммы антрахиноновых производных.

Из корневищ некоторых видов ревеней и щавелей, культивируемых в Венгрии описано выделение 17–19% хризаробиноподобного вещества.

Аналог хризаробина был получен из ревеня тангутского, но в процессе клинического изучения проявилась его относительно высокая токсичность и противопоказания к применению при заболеваниях печени и почек, а также раздражающее действие на слизистую оболочку глаз.

Многoletние клинические наблюдения за действием хризаробина из щавеля тянь-шанского не выявили побочного действия и противопоказаний и он был рекомендован для лечения герпеса, псориаза, экзем и некоторых других поражений кожи у взрослых и детей.

Антималярийная активность, антимикробный и цитотоксический эффекты отмечены у антрахинонов *Cinchona*.

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ИСТОЧНИК ИМПОРТОЗАМЕЩАЮЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Куркин В.А.

Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия,
тел.: 8-(846)-260-33-59; e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

В настоящее время особую значимость приобретают лекарственные средства растительного происхождения, применяемые для профилактики и лечения различных заболеваний [1-5, 7, 8]. Преимущество растительных лекарственных средств по сравнению с синтетическими препаратами заключается в мягкости

их терапевтического действия наряду с отсутствием выраженных побочных эффектов. В этом отношении особый интерес представляют фенольные соединения лекарственных растений, которые являются ценным источником адаптогенных, нейротропных, иммуномодулирующих, противовирусных, антимикробных, противовоспалительных, гепатопротекторных, желчегонных и антиоксидантных лекарственных средств, однако в настоящее время на фармацевтическом рынке РФ доминируют дорогостоящие зарубежные препараты. Особенно неблагоприятна ситуация в номенклатуре антидепрессантных, ноотропных и анксиолитических растительных препаратов, которые практически все являются зарубежными [1].

В этой связи актуальными являются исследования по обоснованию целесообразности создания импортозамещающих антидепрессантных, ноотропных, анксиолитических, гепатопротекторных и иммуномодулирующих растительных препаратов. В этом отношении особый интерес представляют лекарственные растения, содержащие фенилпропаноиды и флавоноиды [2-5].

Цель исследования - научное обоснование целесообразности создания и внедрения импортозамещающих лекарственных средств на основе растительного сырья, содержащего фенольные соединения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов использованы корневища и корни родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), кора сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.), корневища и корни элеутерококка колючего [*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.], семена и плоды лимонника китайского (*Schizandra chinensis* Baill.), трава Melissa лекарственной (*Melissa officinalis* L.), цветки лаванды колосовой (*Lavandula spica* L.), листья гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.), трава зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) и зверобоя пятнистого (*Hypericum maculatum* Grantz.), плоды расторопши пятнистой [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.], трава эхинацеи пурпурной [*Echinacea purpurea* (L.) Moench.], а также фенольные соединения (фенилпропаноиды и флавоноиды), выделенные из исследуемого лекарственного растительного сырья (ЛРС).

В работе использованы тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), спектрофотометрия, ¹H-ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, различные химические превращения. Антидепрессантную активность оценивали с использованием теста «Отчаяние», оценку

ноотропной активности проводили с помощью теста «Т-образный лабиринт» и теста «Открытое поле», анксиолитическую активность определяли методом «Приподнятый крестообразный лабиринт» и в условиях методики «конфликтная ситуация», психостимулирующую активность препаратов выявляли с помощью теста на снотворную активность («Тиопеталовый сон»), гепатопротекторную активность на модели токсического гепатита [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате изучения химического состава целого ряда лекарственных растений выделены и охарактеризованы с использованием УФ-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, ТСХ и ВЭЖХ, различных химических превращений более 150 веществ, относящихся к простым фенолам, фенилпропаноидам, кумаринам, флавоноидам, среди которых 20 соединений являются новыми. На основе изучения физико-химических, спектральных свойств разработана новая классификация фенольных соединений. При этом обоснована необходимость введения в фармакогнозию фенилпропаноидов, хинонов и ксантонов как самостоятельных классов биологически активных соединений (БАС), что нашло отражение в учебнике «Фармакогнозия» [2]. Обсуждается значимость ксантонов как БАС не только в контексте сырьевой базы противовирусного средства «Алпизарин» (виды копеечника), но и в таких растениях, как золототысячник обыкновенный и горечавка желтая. Показана целесообразность рассмотрения антраценпроизводных, бензохинонов и нафтохинонов в общей группе хинонов. К фенилпропаноидам отнесены такие лекарственные растения, как родиола розовая, эхинаcea пурпурная, элеутерококк колючий, сирень обыкновенная, расторопша пятнистая, лимонник китайский, лопух большой (*Arctium lappa* L.), омела белая (*Viscum album* L.). Фенилпропаноиды являются биогенетическим предшественником флавоноидов – одного из самых бурно развивающихся классов БАС, обладающих широким спектром фармакологической активности. За последние 10-15 лет число фармакопейных растений, содержащих флавоноиды в качестве ведущей группы БАС, возросло с 11 до 30 видов, среди которых уникальными являются гинкго двулопастный, эрва шерстистая (*Aerva lanata* Juss.) и др. Кроме того, в 25 лекарственных растениях флавоноиды выступают в роли 2-ой или 3-ей групп действующих веществ, причем в этом случае они не только обуславливают фармакологический эффект, но и часто являются критерием качества сырья или лекарственной субстанцией (например, пижма обыкновенная, сушеница топяная, календула лекарственная, виды

солодки, березы, тополя [2].

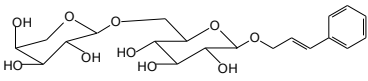
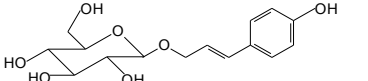
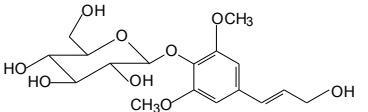
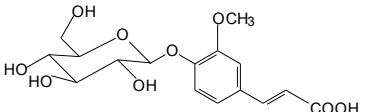
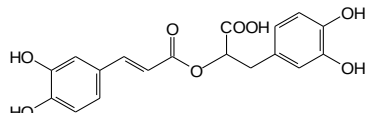
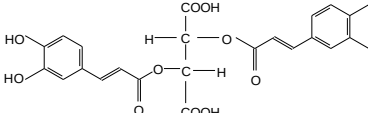
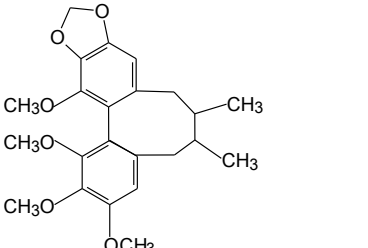
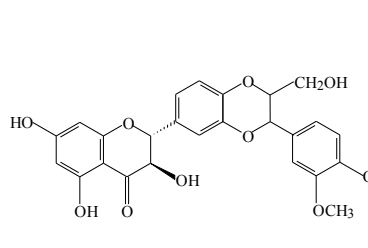
С точки зрения химической классификации нами критически пересмотрено положение некоторых лекарственных растений, например, родиолы розовой, элеутерококка колючего, расторопши пятнистой (фенилпропаноиды), зверобоя продырявленного (флавоноиды).

В результате проведенных исследований из ЛРС выделены и охарактеризованы фенилпропаноиды (1-8) и флавоноиды (9-12), представляющие интерес с точки зрения химической стандартизации сырья и препаратов соответствующих лекарственных растений, а также проявления биологической активности. В результате проведенных исследований предложены новые подходы к химической стандартизации сырья лекарственных растений с использованием стандартных образцов розавина (1), триандрина (2), сиригина (3), лавандозида (4), розмариновой кислоты (5), цикориевой кислоты (6), гамма-схизандрина (7), силибина (8), гиперозида (9), гинкгетина (9), 3,8¹¹-биаспигенина (11), никотифлорина (12).

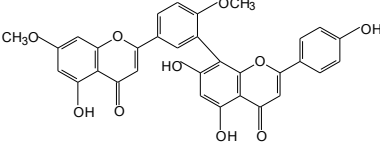
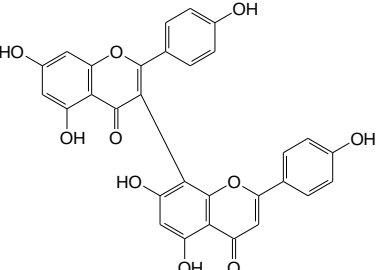
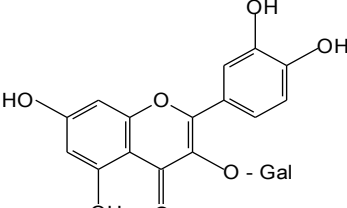
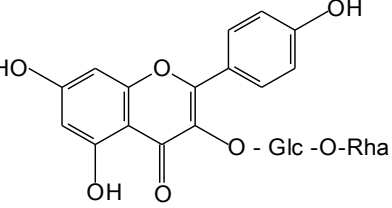
Изучены зависимости спектральных и фармакологических свойств ряда фенилпропаноидов и флавоноидов от их химической структуры. На основе изучения физико-химических, химических, спектральных и фармакологических свойств фенилпропаноидов и флавоноидов обоснована целесообразность применения целого ряда импортозамещающих лекарственных средств. На основе сырья эхинацеи пурпурной разработаны иммуномодуляторы, превосходящие по фармакоэкономическим характеристикам зарубежные аналоги. В качестве перспективного гепатопротектора рассматривается пролонгированная лекарственная форма, получаемая из субстанции плодов расторопши пятнистой. Выраженная антиоксидантная активность выявлена для рутина, кверцетина, дигидрокверцетина, силибина, розавина, сухого экстракта родиолы розовой. Из цветков лаванды колосовой выделено новое природное соединение – лавандозид, обладающий седативной активностью. Установлено, что перспективным источником анксиолитиков является трава Melissa лекарственной. Показано, что наиболее перспективными в плане создания тонизирующих и адаптогенных средств являются растения, содержащие производные коричных спиртов (родиола розовая, сирень обыкновенная, элеутерококк колючий и др.). Антидепрессантный эффект отмечен для экстракта элеутерококка жидкого и настойки зверобоя. Определено, что антидепрессантный эффект настойки зверобоя пятнистого более выражен по сравнению с таковым соответствующего препарата зверобоя

продырявленного. Из выделенных веществ наибольшую антидепрессантную эффективность проявили синингин, розавин, триандрин и гиперозид. Выраженная ноотропная активность обнаружена для препаратов, разработанных на основе корневищ родиолы розовой и листьев гинкго двулопастного. С точки зрения влияния на ноотропную активность заслуживает внимания один из доминирующих флавоноидов листьев гинкго – гинкгетин (9), а также доминирующий фенолпропаноид родиолы розовой – розавин (1).

Фенилпропаноиды лекарственных растений

	
Розавин (1): родиола розовая	Триандрин (2): родиола розовая (биомасса)
	
Синингин, или элеутерозид В (3): элеутерококк колючий, сирень обыкновенная	Лавандозид (4): лаванда колосовая
	
Розмариновая кислота (5): мелисса лекарственная	Цикориевая кислота (6): эхинацея пурпурная
	
Гамма-схизандрин (7): лимонник китайский	Силибинин (8): расторопша пятнистая

Флавоноиды лекарственных растений

	
<i>Гинкгетин (9):</i> гинкго двулопастный	<i>3,8'-Бисапигенин (10):</i> звербой продырявленный
	
<i>Гиперозид (11):</i> звербой продырявленный, звербой пятнистый, виды боярышника	<i>Никотифлорин (12):</i> гинкго двулопастный

Таким образом, лекарственные растения, содержащие фенольные соединения, являются перспективным источником гепатопротекторных, антиоксидантных, иммуномодулирующих, адаптогенных, антидепрессантных, анксиолитических и ноотропных лекарственных средств.

Работа выполнена при поддержке проекта 02.740.11.0650 ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственный реестр лекарственных средств. Т. 1. Официальное издание. М.: ООО «Информационно-издательское агентство «Ремедиум», 2008. 1398 с.
2. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов. 2-е изд., перераб. и доп. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2007. 1239 с.
3. Куркин В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. 963 с.
4. Куркин В.А. Фенилпропаноиды - перспективные природные биологически активные соединения. Самара: СамГМУ, 1996. 80 с.

-
5. Тюкавкина Н.А. Биофлавоноиды. Химия, пища, лекарства, здоровье: Актовая речь. М., 2002. 56 с.
 6. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2007. 832 с.
 7. Kurkin V.A. Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity // Chemistry of Natural Compounds. 2003. Vol. 39, No. 2. P. 123-153.
 8. Wagner H. Pharmazeutische Biologie. Drogen und ihre Inhaltsstoffe. Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag, 1993. 522 s.
-

УДК 581.1

НЕЙРОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА ФЕНИЛПРОПАНОИДОВ

Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Дубищев А.В.

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения и социального развития Российской
Федерации, Самара, Россия, тел.: (846)-260-33-59;
Kurkinvladimir@yandex.ru;

Механизмы обратной связи, созданные природой с помощью естественного отбора, достаточно совершенны, однако, если они подвергаются чрезмерным нагрузкам или действуют в условиях, не свойственных данному организму, в результате ослабления защитных сил организма возникают нарушения в параметрах нейро-иммуно-гуморального равновесия. Наиболее часто нарушают гомеостаз стрессы, следствием чего является нарушение обмена веществ, хронические заболевания, злокачественные новообразования и другие состояния [1]. Большинство применяемых сейчас лекарств либо стимулируют, либо ингибируют физиологические процессы, происходящие в клетках, тканях, органах и системах, а также в организме в целом. В основе активности лекарств лежит их физико-химическое или химическое взаимодействие с биологическими субстратами (рецепторами клеточных мембран, транспортными белками, ионными каналами клетки, генами, а также с ферментами).

В современном арсенале лекарственных препаратов необходимо выделить группу лекарственных средств растительного происхождения, изначально направленных не только на специфическое или преимущественное влияние на отдельный орган или систему, но и обладающие широким спектром лечебно-профилактического воздействия, т.е. влияющие на

нормализацию всех или большинства параметров гомеостаза [1]. В частности, фитоадаптогены, к которым относятся препараты элеутерококка колючего, родиолы розовой, лимонника китайского, левзеи и другие растительные объекты, содержащие в качестве биологически активных соединений (БАС) фенилпропаноиды, позволяют организму быстрее приспособиться к различным неблагоприятным воздействиям путем адаптации нейро-гормональных регуляторных механизмов и активации системы иммунитета. Применяются препараты на основе данных растений при астенических состояниях, для снятия усталости, для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. В плане влияния на центральную нервную систему тонизирующие свойства данной группы связывают с влиянием на восходящую ретикулярную формацию головного мозга и активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. Учитывая механизм действия адаптогенов, длительный их прием нежелателен, также не следует их назначать в вечернее время.

Обсуждаемые и другие растительные объекты, содержащие в качестве основной группы фенилпропаноиды, были подвергнуты углубленному изучению как в плане химического состава лекарственного растительного сырья и анализа сырья и препаратов, включая разработку веществ – стандартов: (розавин, γ -схизандрин, сиригин), так и в плане установления и уточнения спектра биологической активности [2, 3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для установления зависимости «структура – свойство» и «химический состав – фармакологическая активность» разрабатываемых экстракционных препаратов обсуждаемых растений и содержащихся в них индивидуальных веществ – фенилпропаноидов и их производных изучалась нейротропная активность. Исследования были проведены в следующих направлениях: определение гипногенной и антигипногенной активности фитопрепаратов, содержащих фенилпропаноиды, и индивидуальных веществ – фенилпропаноидов; изучение ноотропной активности в плане влияния на физическую работоспособность и выносливость, на поведение животных в открытом пространстве, на показатели обучения, на формирование памяти; выявление анксиолитических свойств и антидепрессивной активности.

Спектр нейротропной активности был определен по методике потенцирования снотворного эффекта барбитуратов и хлоралгидрата, ноотропная активность – в тесте принудительного плавания мышей с грузом; ориентировочно-исследовательская

реакция крыс - в установке «открытое поле»; выработку условной реакции пассивного избегания; влияние на амнезию, вызванную максимальным электросудорожным шоком; анксиолитическая активность в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» и «конфликтная ситуация»; антидепрессивная активность в тесте отчаяния.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обсуждая нейротропный эффект, и, в частности, тонизирующие и адаптогенные свойства препаратов корневищ родиолы розовой, следует отметить, что активность в основном обусловлена гликозидами коричневого спирта, среди которых доминирующим компонентом является розавин. Сравнительное исследование нейротропной активности индивидуальных веществ на модели хлоралгидратного сна у мышей показало, что наиболее выраженные стимулирующие свойства проявляют фенилпропаноиды розавин и триандрин, причем пробуждающее действие данных соединений реализуется преимущественно посредством влияния на кору головного мозга [4].

Перспективным представляется новый вид лекарственного растительного сырья – кора сирени обыкновенной, содержащая фенилпропаноид сирингин (в элеутерококке колючем данное соединение имеет название элеутерозид В). При изучении спирто-водных извлечений из сирени отмечена более высокая тонизирующая и адаптогенная эффективность по сравнению с препаратами элеутерококка, что связано с двумя факторами: содержание сирингина в коре сирени на порядок больше такового в корневищах элеутерококка, в коре растения содержится салидрозид - один из основных компонентов фенольной природы в корневищах родиолы розовой, который наряду с фенилпропаноидами определяет тонизирующую активность препаратов данного сырья [5, 6].

Практическим выходом данного направления исследований явилась разработка новых тонизирующих и адаптогенных препаратов «Родиолы розовой настойка», «Лимонника настойка», «Сирени настойка», а также получение ряда лекарственных форм (сироп, таблетки) на основе спирто-водных извлечений изучаемых растений.

Отдельного внимания заслуживает мелисса лекарственная, содержащая в качестве одной из основных групп БАС кофейную кислоту и ее производные (розмариновая кислота). Ранее это ценное растение рассматривалось преимущественно с позиций седативной активности терпеноидного комплекса, тогда как фенольные соединения (фенилпропаноиды и флавоноиды) в

аспекте разработки лекарственных препаратов и решения вопросов стандартизации, - глубоко не исследовалась. В этой связи в СамГМУ разработан эффективный экстракционный препарат «Мелиссы настойка», который предложен в качестве седативного, анксиолитического и иммуномодулирующего средства. Учитывая безопасность и «самодостаточность» растения, в настоящее время ведутся исследования по разработке лекарственного препарата для педиатрической практики (в форме сиропа) [1, 7].

Итогом изучения зависимости «структура – свойство» и «химический состав – фармакологическая активность» для обсуждаемых растений явилась формулировка концепции создания тонизирующих препаратов на основе лекарственного растительного сырья, содержащего фенилпропаноиды и их производные, а именно: тонизирующая активность характерна для растений, содержащих производные коричных спиртов (тогда как производные коричных кислот таким действием не обладают) [1, 2].

В этой связи нуждается в пояснении отмеченный для препаратов эхинацеи пурпурной тонизирующий эффект. С учетом содержания в траве эхинацеи пурпурной в качестве основной группы действующих веществ гидроксикоричных кислот – главным образом, производных кофейной кислоты, и, в частности, доминирующего соединения – цикориевой кислоты, важным обстоятельством, на наш взгляд, является наличие в молекуле другого фенилпропаноида - эхинакозида структурного фрагмента салидрозида. Данное вещество является одним из основных фенилэтаноидов родиолы розовой, обуславливающих ее тонизирующие и адаптогенные свойства. При изучении нейротропной активности водно-спиртовых извлечений из травы эхинацеи была подтверждена стимулирующая активность. В этой связи необходимо критически отнестись к рекомендациям в инструкциях к препаратам эхинацеи относительно их приема 3 раза в день: целесообразно прием в вечернее время исключить [8].

С учетом вышеизложенного виды лекарственного растительного сырья, содержащие фенилпропаноиды в качестве доминирующей группы БАС, можно рассматривать как ценные сырьевые источники для получения лекарственных средств с разноплановым спектром нейротропной активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куркин В.А. Фенилпропаноиды - перспективные природные биологически активные соединения. Самара: СамГМУ, 1996. 80 с.
2. Kurkin V.A. Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity // Chemistry of Natural Compounds. 2003. Vol. 39. No. 2. P. 123-153.

-
3. Ikeya Y., Taguchi H., Mitsuhashi H. et al. Lignan from *Schizandra chinensis* // *Phytochemistry*. 1988. Vol. 27. N. 2. P. 569-573.
 4. Куркин В.А., Запесочная Г.Г. Химический состав и фармакологические свойства растений рода родиола (обзор) // *Химико-фармац. журнал*. 1986. Т. 20. № 10. С. 1231-1244.
 5. Куркин В.А., Гриненко Н.А., Запесочная Г.Г. Лигнаны коры *Syringa vulgaris* // *Химия природ. соединений*. 1992. № 6. С. 768-771.
 6. Саратиков А.С., Краснов Е.А. Родиола розовая (золотой корень). Томск: Изд-во Томского ун-та. 4-е изд., перераб. и доп. 2004. 292 с.
 7. Tittel G., Wagner H., Bos R. Über die chemische Zusammensetzung von Melissenölen // *Planta medica*. 1982. Vol. 46. S. 91-98.
 8. Bauer R., Wagner H. *Echinacea: Handbuch für Ärzte Apotheker und andere Naturwissenschaftler*.-Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1990. 182 s.
-

ФЛАВОНОИДЫ КАК КРИТЕРИЙ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ПРЕПАРАТОВ ФАРМАКОПЕЙНЫХ РАСТЕНИЙ

Куркина А.В.

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения и социального развития Российской
Федерации, Самара, Россия; тел.: 8-(846)-260-33-59; e-mail:
Annushkae@yandex.ru

Лекарственное растительное сырье (ЛРС), содержащее флавоноиды, широко применяется в медицинской практике в качестве источника желчегонных, гепатопротекторных, антиоксидантных, ангиопротекторных, диуретических, противовоспалительных, противоязвенных, спазмолитических лекарственных средств [1-8]. За последние 15-20 лет число фармакопейных видов сырья, отнесенных к флавоноидам, увеличилось с 11 до 30 наименований [3, 4]. Кроме того, флавоноиды имеют статус второй группы биологически активных соединений (БАС) в 35 видах лекарственных растений, включая эфиромасличное сырье (цветки пижмы обыкновенной, листья мяты перечной, трава полыни эстрагон и др.), а также виды, содержащие фенилпропаноиды, в частности, гидроксикоричные кислоты (цветки бессмертника песчаного и др.), в случае которых подходы к химической стандартизации достаточно противоречивы, а используемые методики анализа не всегда отвечают параметрам валидации. В этой связи актуальным является совершенствование

имеющейся нормативной документации (НД), а также разработка новой нормативной документации на ЛРС, лекарственные субстанции и препараты [6].

Цель настоящей работы - исследование по обоснованию подходов к химической стандартизации сырья фармакопейных растений, содержащих флавоноиды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе исследованы виды лекарственных растений, содержащих флавоноиды, в случае которых весьма актуальным является совершенствование методов стандартизации и их гармонизация в ряду: сырье – лекарственная субстанция – лекарственный препарат. В сравнительном плане исследовали следующие виды ЛРС: цветки бессмертника песчаного [*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.], цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), траву эрвы шерстистой (*Aerva lanata* L.), листья мяты перечной (*Mentha piperita* L.), цветки ромашки аптечной (*Matricaria chamomilla* L.), траву тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), траву полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.), траву репешка аптечного (*Agrimonia eupatoria* L.), цветки и плоды боярышника кроваво-красного (*Crataegus sanguinea* Pall.). Наряду с вышеперечисленными видами ЛРС были исследованы также индивидуальные соединения, выделенные из изучаемых видов ЛРС. Регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью систематизации фармакопейных растений, содержащих флавоноиды, нами разработана классификация, позволяющая учитывать всю совокупность БАС с точки зрения биологической активности, стандартизации и технологии получения лекарственных препаратов, а именно:

1. Фармакопейные растения, содержащие флавоноиды в качестве ведущей группы БАС.
2. Фармакопейные эфиромасличные растения, содержащие флавоноиды.
3. Фармакопейные растения, сочетающие горечи и флавоноиды.
4. Фармакопейные растения, сочетающие сапонины и флавоноиды.
5. Фармакопейные растения, сочетающие витамины и флавоноиды.
6. Фармакопейные растения, сочетающие простые фенолы и флавоноиды.
7. Фармакопейные растения, сочетающие дубильные вещества и

флавоноиды.

8. Алкалоидоносные растения, содержащие флавоноиды.

В настоящее время НД некоторых видов ЛРС, в случае которых ведущей группой БАС являются флавоноиды, до сих пор не содержит раздел «Количественное определение» (например, трава горца почечуйного, трава хвоща полевого), а в некоторых случаях сырье анализируется по содержанию других групп БАС (например, цветки гибискуса сабдариффа по содержанию органических кислот). Имеется целый ряд видов ЛРС (цветки календулы, трава пассифлоры инкарнатной, плоды черники обыкновенной), хотя формально и не относящихся к флавоноидам, однако оценка качества вышеперечисленного сырья, на наш взгляд, целесообразна по флавоноидам, поскольку именно данной группой действующих веществ обуславливаются фармакологические эффекты. Важно подчеркнуть, что стандартизация многих видов сырья, относящихся к другим БАС, осуществляется по содержанию флавоноидов, а именно: арника горная (цветки), береза бородавчатая (листья), ива остролистная (листья), конский каштан обыкновенный (листья), пижма обыкновенная (цветки), скумпия кожевенная (листья), сушеница топяная (трава), тополь черный (почки), трилистник водяной (листья) и др.

При разработке методик количественного определения флавоноидов в ЛРС необходимо учитывать тот факт, что близкие спектральные характеристики могут иметь и другие фенольные соединения, в частности, фенилпропаноиды, кумарины, ксантоны. Наиболее типичная ситуация, обнаруженная нами в большинстве исследованных фармакопейных растениях, - это сочетание флавоноидов и фенилпропаноидов, причем именно последние, как правило, обуславливают характер кривой поглощения электронных спектров, например, в цветках пижмы (табл. 1). Это можно объяснить тем, что фенилпропаноиды (гидроксикоричные кислоты) являются биогенетическими предшественниками флавоноидов, поэтому достаточно часто им сопутствуют. Кроме того, целый ряд флавоноидов встречается в виде так называемых ацилгликозидов, в которых в качестве ацильного остатка часто выступают коричные кислоты (*п*-кумаровая, кофейная кислоты), вносящий значительный вклад в кривую поглощения веществ (например, тилирозид и кумароилтилирозид в траве эрвы шерстистой). Из данных, приведенных в таблицах 1 и 2, следует, что именно фенилпропаноиды во многом обуславливают характер кривой поглощения «плечо в области около 290 нм и максимум поглощения в области около 330 нм».

Таблица 1

Сравнительная характеристика УФ-спектров растворов водно-спиртовых извлечений из лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды

№№ п/п	Наименование объекта исследования	Значения максимумов поглощения, нм		
		Исходный раствор	+AlCl ₃	Дифференциальный спектр (длинноволновый максимум)
1.	Водно-спиртовое извлечение из цветков бессмертника песчаного	292пл*, 331	281, 334, 400пл*	418
2.	Водно-спиртовое извлечение из цветков пижмы обыкновенной	291пл*, 332	291, 332, 400пл*	400
3.	Водно-спиртовое извлечение из цветков ромашки аптечной	293, 322	298, 323	411
4.	Водно-спиртовое извлечение из травы тысячелистника	291, 331	281, 334, 396пл*	395
5.	Водно-спиртовое извлечение из травы эрвы шерстистой	268, 322, 360пл*	278, 330пл*, 407	407
6.	Водно-спиртовое извлечение из травы репешка аптечного	267, 321,	278, 334пл*, 397	403
7.	Водно-спиртовое извлечение из листьев мяты перечной	288, 327	290, 333	389
8.	Водно-спиртовое извлечение из травы полыни эстрагон	292пл*, 329	292пл*, 330, 410пл*	405
9.	Водно-спиртовое извлечение из плодов боярышника	281, 330пл*	280, 332пл*, 406пл*	410
10.	Водно-спиртовое извлечение из цветков боярышника	271, 289, 326	280, 330, 406	410

Примечание: * - «изгиб» в кривой поглощения спектра

Это имеет место как в случае эфиромасличных растений, например, пижма обыкновенная (табл. 1), так и в видах, в которых ведущей группой биологически активных соединений являются флавоноиды (бессмертник песчаный и др.) (табл. 1). В обоих вариантах использование дифференциальной спектрофотометрии приводит к получению кривой поглощения, спектральные характеристики которой определяются особенностями химического строения флавоноидов [3, 4, 8]. В дифференциальных электронных спектрах растворов водно-спиртовых извлечений из цветков пижмы обыкновенной, обнаруживается максимум поглощения при длине волны 400 нм (табл. 1).

Таблица 2

Сравнительная характеристика УФ-спектров растворов некоторых флавоноидов и фенилпропаноидов

№№ п/п	Наименование вещества	Значения максимумов поглощения, нм		
		Исходный раствор	+AlCl ₃	Дифференциальный спектр (длинноволновый максимум)
1.	Рутин	257, 267пл*, 362	274, 300, 409	412
2.	Цинарозид	256, 267пл*, 352	278, 298пл*, 395	400
3.	Изосалипурпозид	246пл*, 370	252пл*, 408	418
4.	Пиностробин	289, 330пл*	309, 380	380
5.	Дигидрокверцетин	292, 332пл*	292, 388	388
5.	<i>п</i> -Кумаровая кислота	295пл*, 309	295пл*, 310	-
6.	Кофейная кислота	290, 330	288, 334	-
7.	Хлорогеновая кислота	290, 331	290, 333	-

Примечание: * - «изгиб» в кривой поглощения спектра

Кривая поглощения УФ-спектра раствора извлечения из цветков пижмы обыкновенной в варианте дифференциальной спектрофотометрии в основном обусловлена веществами флавоновой природы (табл. 1), имеющими, как правило, в этих условиях максимум поглощения около 400 нм, свойственный государственному стандартному образцу (ГСО) цинарозида (табл.

2). Сопоставимые спектральные характеристики получены и для растворов водно-спиртовых извлечений из травы репешка аптечного, листьев мяты перечной, травы тысячелистника, плодов и цветков боярышника (табл. 1). Кривая поглощения УФ-спектра раствора извлечения из цветков ромашки аптечной и травы эрвы шерстистой в варианте дифференциальной спектрофотометрии в основном обусловлена флавонолами (табл. 1), имеющими, как правило, в этих условиях максимум поглощения около 407-411 нм (табл. 2), свойственный такому известному ГСО, как рутин (табл. 2). В УФ-спектр раствора извлечения из цветков бессмертника песчаного значительный вклад вносят халконы, особенно в варианте дифференциальной спектрофотометрии (табл. 1). Это подтверждается спектральными характеристиками ГСО изосалипурпозиды, имеющего максимум поглощения в УФ-спектре при длине волны 418 нм (табл. 2). В случае флаванонов и флаванолов также возможно применение дифференциальной спектрофотометрии, так как эти вещества (например, пиностробин, дигидрокверцетин) реагируют с $AlCl_3$ (табл. 2).

Следовательно, для целей стандартизации лекарственных растений, содержащих флавоноиды, целесообразно использование в случае флавонов, флаванолов и халконов соответственно ГСО цинарозида, рутина и изосалипурпозиды. Показана также целесообразность использования нового подхода к стандартизации эфиромасличного лекарственного растительного сырья (листья мяты перечной, цветки ромашки аптечной, трава тысячелистника, трава полыни эстрагон), заключающегося в определении не только эфирного масла, но и суммы флавоноидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная Фармакопея СССР. Одиннадцатое издание. Вып. 2. М.: Медицина, 1990. 400 с.
2. Государственный реестр лекарственных средств. Т.1. Официальное издание. М.: Ремедиум, 2008. 1398 с.
3. *Коруйкин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстиков Г.А.* Природные флавоноиды. Новосибирск: Академическое издательство «Гео», 2007. 232 с.
4. *Куркин В.А.* Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов). 2-е изд., перераб. и доп. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ», 2007. 1239 с.
5. *Куркин В.А.* Основы фитотерапии: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. 963 с.
6. *Куркина А.В., Хусаинова А.И.* Методика определения суммы флавоноидов в цветках пижмы // Фармация. 2010. Т. 58, № 3. С. 21-24.
7. *Тюкавкина Н.А.* Биофлавоноиды. Химия, пища, лекарства, здоровье:

Актовая речь. М., 2002. 56 с.

8. Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. The Systematic Identification of Flavonoids. Berlin; Heidelberg; New York, 1970. 354 p.
-

УДК 615.322:616.036

КОМПЛЕКС ОЛИГОМЕРНЫХ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ КАК КОМПОНЕНТ ТЕРАПИИ ХРОНИЧЕСКОГО АЛКОГОЛИЗМА

Кушнерова Н.Ф.¹, Момот Т.В.²

¹Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева
Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, Россия, тел.
(423)2313061. e-mail: natasha50@mail.ru.

²Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного
отделения РАН, Владивосток, Россия

Интерес к проантоцианидинам обусловлен их антиоксидантными свойствами. Это послужило предпосылкой для апробации комплекса олигомерных проантоцианидинов (КОПЦ) у больных хроническим алкоголизмом с нарушениями функций печени. КОПЦ был выделен из гепатопротекторного препарата «Калифен»[®] (патент RU №2177330), представляющего собой водно-спиртовой экстракт из жмыха (гребни, косточки и кожица ягод) калины (*Viburnum Sargentii* Koehne). КОПЦ представляет собой порошок желтого цвета, растворимый в воде [1]. В качестве препарата сравнения использовали эталонный гепатопротектор «Легалон»[®], являющийся комплексом флавоноидов из плодов расторопши пятнистой *Silybum marianum*. Целью настоящей работы явилось исследование влияния КОПЦ на биохимические параметры крови, характеризующие функциональное состояние печени, а также физиологические характеристики организма при хроническом алкоголизме.

В контрольную группу включено 84 психически и соматически здоровых донора, у которых исключался эпизодический прием спиртных напитков в течение двух недель перед биохимическим исследованием. Одновременно в эксперименте приняли добровольное участие 20 пациентов-мужчин в возрасте от 30 до 40 лет с диагнозом хронический алкоголизм II стадии, которые проходили лечение в наркологической клинике г. Владивостока. Впоследствии из них были сформированы 2 группы по 10 человек: больные, получавшие стандартную терапию (дезинтоксикационные и симптоматические средства) в комплексе с легалоном в течение

1 мес и больные, получавшие аналогично стандартную терапию в комплексе с КОПЦ. Исследование сыворотки крови проводили на 5-й день после поступления больных в стационар с целью исключения острого влияния алкоголя. При этом обследуемые получали КОПЦ в виде водного раствора по 100 мг 3 раза в сутки или легалон по той же схеме и в той же дозе, которая является рекомендуемой суточной дозой для полифенольных соединений [2].

Таблица

Влияние растительных комплексов (легалон и КОПЦ) на биохимические показатели сыворотки крови и физиологические параметры у больных алкоголизмом ($M \pm m$)

Показатели	1-я группа До лечения	2-я группа Стандарт. терапия+ легалон	3-я группа Стандартная терапия+ КОПЦ	4-я группа Легалон	5-я группа КОПЦ
АЛТ (мкмоль/мл/час)	1,48±0,02	1,10±0,08 ^B	0,75±0,01 ^{B, +}	0,70±0,04 ^B	0,29±0,01 ^{B, 3}
АСТ (мкмоль/мл/час)	0,70±0,02	0,70±0,03	0,66±0,01	0,45±0,02 ^B	0,20±0,01 ^{B, 3}
Общий билиру- бин (мкмоль/л)	24,65±1,49	23,41±0,96	20,00±0,85 ^a	19,73±0,79	13,15±0,59 ^{B, 1}
Прямой билиру-бин (мкмоль/л)	6,55±0,70	4,29±0,63	4,20±0,39 ^a	4,23±0,17 ^a	3,10±0,12 ^B
ЛПНП (ммоль/л)	6,20±0,32	6,00±0,25	4,40±0,24 ^{B, +}	4,37±0,16 ^B	3,20±0,14 ^{B, 1}
Общий белок (г/л)	68,00±0,76	70,52±0,63	72,65±0,42 ^B	77,43±0,71 ^o	77,50±0,24 ^B
Масса тела (кг)	79±1,76	77±1,51	78±1,45	77±1,62	78±1,05
Становая тяга (кг)	130±3,45	145±3,26 ^a	145±3,29 ^a	148±2,58 ^o	150±2,74 ^B

Примечание: различия статистически значимы: ^a - $p < 0,05$; ^o - $p < 0,01$; ^B - $p < 0,001$ –сравнение с 1-й группой; ⁺ - $p < 0,001$ – сравнение со 2-й группой; ¹ – $p < 0,05$, ³ – $p < 0,001$ - сравнение с 4-й группой.

По окончании лечения пациенты были выписаны из стационара, но продолжали принимать в течение 1 мес (по 100 мг 2 раза в сутки) вышеназванные растительные комплексы в качестве поддерживающей терапии. Таким образом, в ходе исследования были выделены следующие группы: 1-я группа – контроль (здоровые), 2-я группа – больные до лечения, 3-я группа – лечение стандартной терапией + легалон, 4-я группа – лечение стандартной терапией + КОПЦ, 5-я группа – легалон, 6-я группа – КОПЦ. Эффективность действия препаратов оценивали по нормализации биохимических показателей сыворотки крови. Для этого

определяли по общепринятым методам активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ), содержание общего и прямого билирубина, общего белка, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП). Также фиксировались параметры физиологического состояния организма (масса тела, станова тяга).

Изучение биохимических показателей в сыворотке крови больных алкоголизмом (2-я группа) выявило их значительные отклонения от нормы (таблица).

Так, активность трансаминаз – главных маркеров цитолиза, была значительно повышена: АЛТ в 2 раза (норма 0,1-0,68 мкмоль/л) и АСТ в 1,5 раза (норма 0,1-0,45 мкмоль/л), что является результатом повреждения клеточных мембран гепатоцитов и выходом ферментов в кровь. Кроме того, регистрировалось увеличение содержания общего билирубина на 20% и прямого (конъюгированного) на 50% по отношению к верхним границам нормы (8,5–20,5 мкмоль/л и 0,9–4,3 мкмоль/л, соответственно). Отмеченная гипербилирубинемия, особенно конъюгированная, свидетельствует о происходящих процессах повреждения в паренхиматозных клетках печени, либо закупорке системы желчных протоков и угнетении желчеобразовательной функции печени [3]. Общее содержание белка в сыворотке крови больных при этом, напротив, оказалось сниженным на 11% по отношению к нижней границе нормы (76–80 г/л). Данный факт обусловлен подавлением синтеза белка под действием этилового спирта и ацетальдегида [4]. О нарушении функционального состояния печени у больных алкоголизмом свидетельствует также повышение в сыворотке количества ЛПНП (основные переносчики холестерина и триацилглицеринов) более чем в 1,5 раза при норме до 3,7 ммоль/л. Эти изменения обусловлены угнетением триглицеридлипазы [5], лецитин: холестерин-ацилтрансферазы (ЛХАТ) [6] и катаболизма липопротеинов [7]. Из-за нарушения процессов митохондриального окисления образующийся избыток жирных кислот в печени, а также активация микросомальных ферментов, ответственных за синтез ТАГ, способствуют развитию жировой инфильтрации печени. Важно отметить, что при жировой печени алкогольной этиологии повышается синтез ЛПОНП и, соответственно, ЛПНП, при одновременном угнетении их катаболизма.

После проведения общепринятого курса лечения совместно с легаленом (3 группа) в сыворотке крови больных отмечалось снижение активности АЛТ на 26% ($p < 0,001$) и содержания конъюгированного билирубина сыворотки на 35% ($p < 0,05$) по

сравнению с аналогичными показателями, регистрируемыми при поступлении в стационар. В то же время активность АСТ, содержание общего билирубина и ЛПНП оставались на исходном уровне и, по-прежнему, высокими. Количество общего белка, несмотря на проведенную терапию, было ниже нормы (76-80 г/л). Из полученных результатов следует, что после проведенной общепринятой терапии совместно с легалоном сохраняются существенные сдвиги метаболических процессов в крови, характеризующие функциональное состояние печени, и которые сформировались при интоксикации этанолом.

Применение КОПЦ во время основного лечения (4-я группа) показало положительные динамические изменения и явную тенденцию к восстановлению функциональных печеночных показателей. Так, в сыворотке крови обследуемых снизилась активность АЛТ на 49% ($0,75 \pm 0,01$ мкмоль/мл/час; $p < 0,001$) и АСТ на 6% по сравнению с таковыми до лечения (2 группа). Содержание общего и прямого билирубина снизилось на 19% ($p < 0,05$) и 36% ($p < 0,05$) по сравнению с таковыми во 2-й группе и достигло верхней границы нормы. Наблюдалась положительная тенденция к увеличению (на 7%) уровня общего белка. Значительно снизилась концентрация ЛПНП на 27% ($p < 0,001$) в сыворотке крови пациентов, получавших КОПЦ, в отличие от таковых величин до лечения. Данный факт может быть обусловлен активацией полифенолами ЛХАТ сыворотки крови [9], которая катализирует перенос жирных кислот с лецитина на холестерин с образованием его эфиров и поступлением в гепатоцит возросшего потока эфиров холестерина. Таким образом, эффект КОПЦ предполагает восстановление синтеза и катаболизма липопротеинов, нарушенных этанолом. После окончания лечения стандартной терапией совместно с растительными комплексами, обследуемые продолжали принимать легалон и КОПЦ еще в течение 1 месяца (5-я и 6-я группы). Важно отметить улучшение физического состояния больных после курса совместной терапии. Показатели становой тяги значительно возросли в обеих группах обследуемых на 15% ($p < 0,001$). Однако, клинико-биохимические исследования у тех пациентов, которым в общую терапию был включен КОПЦ, показали более быстрое восстановление исследуемых параметров. Значительно раньше, чем у больных, в лечение которых был включен легалон, исчезают гиперферментемия, гипербилирубинемия, повышается содержание общего белка в сыворотке крови, нормализуется уровень ЛПНП. Прием легалона на протяжении всего курса лечения лишь "подтянул" к верхней границе нормы следующие показатели: активность трансаминаз,

содержание общего и прямого билирубина, общего белка. Уровень же ЛПНП оставался достаточно высокими и был выше аналогичных величин в сыворотке крови лиц, получавших КОПЦ, в среднем на 26-36%.

Известно, что в состав легалона входит активная группа изомерных флавоноидных содинений (силибинин, силикрестин, силидианин), не образующих олигомерных форм. В выделенном комплексе из калины в качестве основных компонентов низкомолекулярных фракций ОПЦ были идентифицированы мономеры катехин и (-)эпикатехин, проантоцианидины димеры В1, В3, В4, а также тримеры С1 и Т2 со степенью полимеризации $n = 2-5$ [9]. Таким образом, применение КОПЦ совместно с базовой терапией у больных алкоголизмом, оказалось более эффективным, чем легалона для восстановления сывороточных биохимических показателей. Меньшая эффективность легалона связана с очень низкой биодоступностью компонентов, входящих в его состав из-за ограниченной их растворимости в водной фазе [10] и, следовательно, низкой абсорбции в желудочно-кишечном тракте. Выявленные положительные метаболические и функциональные эффекты комплекса проантоцианидинов из калины при алкогольном поражении печени могут служить основой для дальнейшего изучения механизмов действия этого соединения и обоснования его клинического применения в терапии алкоголизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Рахманин Ю.А. Антиоксидантное действие олигомерных проантоцианидинов, выделенных из калины, при поражении печени четыреххлористым углеродом и профилактике его токсического эффекта // Гиг. и сан. 2003. № 3. С. 57-60.
2. Венгеровский А.Н., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств // Ведомости фарм. комитета. 1999. № 2. С. 9-12.
3. Monroe P., Vlahcevic Z.R., Swell L. Effects of acute and chronic ethanol intake on bile acid metabolism // Alcohol. Clin. Exp. Res. 1981. Vol. 5, N 1. P. 92-100.
4. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и желчных путей: Пер. с англ./ Под ред. З.Г. Апросиной, Н.А. Мухиной. - М.: ГЭОТАР. - Медицина, 2002. 864с.
5. Brindley D.N. What factors control hepatic triacylglycerol accumulation in alcohol abuse // Biochem. Soc. Trans. 1988. Vol. 16, N 3. P. 251-253.
6. Sasso G.F., Ceccanti M., Nardi E. et al. Cholesterol-acyltransferase (LCAT) activity in alcoholic liver disease // Panminerva med. 1989. Vol. 31, N 1. P. 30-31.
7. Andrade B.R.J., Escolar C.J.L., Aguado G.F. et al. Influencia de diversos grados de consume de alcohol sobre las lipoproteinas y apolipoproteinas plasmaticas // Med clin. 1989. Vol. 93, N 5. - P. 169-172.

-
8. Гаскина Т.К., Курилович С.А., Горчаков В.Н. Изменение скорости лецитинхолестеролацилтрансферазной реакции и липидных показателей сыворотки крови под влиянием катергена в условиях острого экспериментального перерождения печени // Вопр. мед. химии. 1989. Т. 35, № 4. С. 24-28.
 9. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф. Калина – новый нетрадиционный источник олигомерных проантоцианидинов // Хим.-фарм. журнал. 2004. Т. 38, № 2. С. 41-45.
 10. Kim Y.C, Kim E. J., Lee E.D. et al. Comparative bioavailability of silibinin in healthy male volunteers // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 2003. Vol. 41. N 12. P. 593-596.
-

УДК 556.541.32

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ВОДОРОСЛЕЙ- МАКРОФИТОВ - БИОИНДИКАТОРЫ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ВОД ПОД ВЛИЯНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ В УСЛОВИЯХ САНИТАРНОЙ ПЛАНТАЦИИ

Лапин А.А.¹, Зеленков В.Н.², Потапов В.В.³

¹Кафедра «Водные биоресурсы и аквакультура». ГОУ ВПО
«Казанский государственный энергетический университет», Казань

²Отделение «Физико-химическая биология и инновации» РАЕН, Москва

³Научно-исследовательский геотехнологический центр ДВО РАН,
Петропавловск-Камчатский, Россия.

В последние годы моря России становятся местом перегрузки и транспортировки газоконденсата, нефти и нефтепродуктов, что ведет к усилению загрязнения прибрежной акватории и оказывает губительное воздействие на морскую биоту. Данной проблеме уделено большое внимание в Морской доктрине Российской Федерации (подраздел «Принципы национальной морской политики», раздел 3 «Обеспечение безопасности морской деятельности»): «разрешение противоречий между увеличением объемов и интенсивности добычи углеводородного сырья и других ресурсов с морского дна и необходимость сохранения, воспроизводства и добычи биоресурсов Мирового океана». Наибольшему отрицательному воздействию нефтепродуктами подвергаются представители фауны и флоры, обитающие в прибрежной полосе, где концентрация загрязнителей наиболее высокая, именно эта зона является местом размножения, раннего развития для многих рыб, беспозвоночных, водорослей [1].

Существующие в настоящее время способы борьбы с

загрязнениями акватории нефтепродуктами делятся на механические (боновые заграждения), которые препятствуют распространению нефтяного пятна и химические, способствующие разложению или коагуляции нефтепродуктов. К сожалению, химические реагенты сами в свою очередь оказывают негативное воздействие на прибрежную биоту. Для широкомасштабной ликвидации последствий нефтяного загрязнения морских арктических вод предлагается экономически эффективная методология использования для этих целей бурых водорослей, что может способствовать уменьшению воздействия хозяйственной деятельности в России на арктические международные воды [2].

Основной экологической проблемой Черного моря является загрязнение его прибрежных акваторий (шельфа) различными поллютантами: нефтью и нефтепродуктами, детергентами, тяжелыми металлами, хлорорганическими соединениями и др., что, как известно, является стрессовым фактором для гидробионтов. Под влиянием загрязнителей в клетках живых организмов усиливается образование метаболически активных свободных радикалов, вызывающих повреждение компонентов клеток, такое состояние называется оксидантным стрессом [3]. Для предотвращения его возникновения в клетках существуют антиоксидантные (АО) системы как энзиматической, так и неэнзиматической природы [4].

Установлено, что у водорослей АО активностью обладает группа биополимеров: супер-оксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза. Большую роль в этом процессе играют витамины (А, С, Е) и глутатион. Считается, что реакция АО системы клеток гидробионтов на различные виды загрязнения является универсальной и ее показатели могут использоваться для контроля качества водной среды [5].

Среди черноморских водорослей-макрофитов (ВМ) в качестве биоиндикаторов предложены *Ceramium rubrum* и *Enteromorpha intestinalis*, а их биомаркерами – уровень перекисного окисления липидов. В то же время, остается не исследованной реакция водорослевых тест-объектов по некоторым другим параметрам их АО системы [6].

Цель работы - изучение антиоксидантной активности образцов водорослей-макрофитов, позволяющие использовать их в качестве биоиндикаторов экологического состояния вод под влиянием различных загрязнений в условиях санитарной плантации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объектов исследования использовались ВМ

Sacharina bongardiana, высушенные образцы которых были получены нами в мае 2011 г, с опытно-экспериментальной системы биологической очистки вод Авачинской губы научно-исследовательского геотехнологического центра Дальневосточного отделения Российской академии наук (г. Петропавловск-Камчатский) в рамках проведения совместных исследований. При изучении химических показателей образцов водорослей - макрофитов и экстрактов из них использовались методы, принятые в научных исследованиях и предусмотренные Государственной фармакопеей СССР (ГФ) XI изд. [7]. Перед приготовлением экстрактов высушенные растения анализировались на содержание влаги, измельчались и просеивались до размера частиц менее 0.4 мм.

Спиртовые экстракты из образцов водорослей готовили следующим образом: навеску помещали в посуду из темного стекла, заливали спиртом этиловым (гидромодуль 1: 10), и настаивали в течение 14 суток. Водные экстракты из образцов ВМ приготавливали завариванием их кипящей дистиллированной водой (в соотношении 1:50 в пересчете на сухой вес образца) и перемешивании (15 мин.). Экстракты очищались центрифугированием при 5000 об/мин (15 мин.).

При определении суммарной антиоксидантной активности (САОА) использовался кулонометрический метод анализа с помощью электрогенерированных радикалов брома по сертифицированной нами методике [8]. САОА выражали в мг рутина в пересчете на 100 г абсолютно сухого образца (а.с.о.). Содержание сухих веществ и влаги в образцах определяли на влагомере МХ-50 A&D при оптимальной температуре 160 °С.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием компьютерных программ *Microsoft Excel* и *Statistica 6.0*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В образцах наиболее устойчивого к загрязнению вида ВМ *S. Bongardiana* были исследованы физико-химические показатели, в том числе САОА - характеристика стресса растений от загрязнений. Нами исследованы образцы ВМ, отобранные 24.09.2010 г - в момент наибольшего накопления в них тяжелых металлов (ТМ) в «загрязненном» месте. Одни из них, такие как медь и кобальт, сразу поглощаются в больших количествах (особенно медь). Другие, такие как кадмий, цинк и свинец, вначале поглощаются в меньшей степени, но затем имеют более высокую динамику поступления. По данным литературы сорбционная емкость по отдельным ТМ определяется возможным количеством катионов

металла, связываемого альгиновой кислотой, содержание которой в ВМ составляет от 15 до 33 % сухого веса.

При изучении спиртовых экстрактов в загрязненном месте – «бухта Раковая» кулонометрическим методом анализа водоросли имеют САОА на 36,45 % отн. меньше чем чистом – «бухта Три брата», 198,46 и 312,29 мг рутина на 100 г абсолютно сухого образца ВМ соответственно, при ошибке измерения не превышающей 5% отн., что свидетельствует об уменьшении содержания в них фенольных соединений, хорошо экстрагируемых спиртом (таблица 1).

САОА ВМ, взятых с наиболее «загрязненного» и «чистого» мест акватории определяли и их водных экстрактов. Содержание влаги в образцах ВМ с чистого места составляло 7.40% масс., с грязного места 5.13% масс. В «загрязненном» месте ВМ имеют САОА на 209,66 % отн. больше чем «чистом», 1142,57 и 368,97 мг рутина на 100 г абсолютно сухого образца (а.с.о.) соответственно, при ошибке измерения не превышающей 7% отн. (таблица 1), что связано с увеличением в водорослях водорастворимых полисахаридов, например альгинатов, имеющих высокую САОА [9].

Антиоксидантная активность (АОА) обнаружена у представителей различных классов водорослей [4], несмотря на большое количество публикаций, до сих пор остается открытым вопрос, какие вещества водорослей обладают самой высокой активностью, которая отмечена у липидных экстрактов [10]. АОА обладают фракции водных, в которых присутствовала фукоза [11] и этанольных экстрактов [12].

Таблица 1

Суммарная антиоксидантная активность образцов водорослей в мг на 100 г а.с.о. (стандарт – рутин)

№	Экстракты образцов водорослей макрофитов	САОА	ΔX	S_x	S	E %, отн.
Спиртовые экстракты						
1	С «грязного места»	198,46	10,56	0,02	4,25	5,32
2	С «чистого места»	312,29	8,17	0,01	3,29	2,61
Водные экстракты						
3	С «грязного места»	1142,57	76,01	0,04	47,80	6,65
4	С «чистого места»	368,97	2,81	0,003	1,13	0,76

ВЫВОДЫ

1. Впервые изучено влияние загрязнений водоемов на антиоксидантные свойства водорослей – макрофитов и показано, что их спиртовые экстракты уменьшают активность под действием

тяжелых металлов, что свидетельствует об уменьшении содержания в них фенольных соединений, хорошо экстрагируемых этиловым спиртом.

2. Напротив водные экстракты водорослей – макрофитов, взятых с наиболее «загрязненного» места с опытно-экспериментальной системы биологической очистки вод акватории Авачинской губы показали увеличение антиоксидантной активности по сравнению с контрольными образцами, взятыми с «чистого» места. Этот факт связан с увеличением в водорослях водорастворимых полисахаридов, например альгинатов, имеющих высокую антиоксидантную активность.

3. Изучение антиоксидантной активности образцов водорослей-макрофитов позволяет использовать их в качестве биоиндикаторов экологического состояния вод под влиянием различных загрязнений в условиях санитарной плантации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Патин С.А. Экологические проблемы освоения нефтегазовых ресурсов морского шельфа. - М.: Изд. ВНИРО. - 1996. - 350 с.
2. Отчет о выполнении пилотного проекта «Очистка арктической морской среды от загрязнений с помощью бурых водорослей» в рамках реализации проекта «Российская Федерация Поддержка Национального плана действий по защите арктической морской среды». ООО «Сирена» Санкт-Петербург - Мурманск. - 2009. - 87 с. [Электронный ресурс]: [http://www. http://siren-ltd.spb.ru/](http://www.http://siren-ltd.spb.ru/) (дата обращения 8.04.12).
3. Грановская Л. А., Широкова Е. А., Телитченко Л. А., Светлова Е. Н. Адаптационные изменения структурно-функциональных характеристик *Chlorella pyrenoidosa* Chick (Chlorophyta) при воздействии ультрафиолетового облучения. Альгология. - 1993. - Т. 3. - № 1. - С. 41 - 48.
4. Yuan, Yvonne. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. Food Chem. Toxicol / Ed. N. Walsh. - 2006. - V. 44. - P. 1144–1150.
5. Шахматова О. А. Активность антиоксидантной системы личинок рыб как показатель качества морской среды. Экология моря. - 2002. - Вып. 59. - С. 48 - 50.
6. Walker M. A., McKersie B. D. Role of ascorbate-glutathione antioxidant system in chilling resistance of tomato. J. Plant Physiol. - 1993. - V. 141. - P. 234 - 239.
7. Государственная фармакопея СССР. Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. МЗ СССР. 11-е изд., доп. М.: Изд-во Медицина. - 1989. - 398 с.
8. Лапин А.А. МВИ-001-44538054-07. Суммарная антиоксидантная активность. Методика выполнения измерений на кулонометрическом анализаторе. ООО Концерн «Отечественные инновационные технологии», г. Жердевка, Тамбовской обл. - 2007. - 6 с.

-
9. Лапин А.А., Зеленков В.Н. Антиоксидантные свойства водорастворимых пектинов листьев амаранта. Бутлеровские сообщения. - 2010. - Т. 20. - № 4. - С. 79 – 85.
 10. Ruperez P., Ahrazem O., Leal J.A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. J. Agric Food Chem. - 2002. - V. 50. - № 4. - P. 840–845.
 11. Ruberto G., Baratta V., Biondi D., Amico V. Antioxidant activity of the marine algal genus *Cystoseira* in a micellar model system. J. Appl. Phicol. - 2001. - V. 13. - № 5. - P. 403 - 407.
 12. Аминина Н.М., Кадникова И.А., Вострокнутов А.А. Антиоксидантная активность экстрактов морских водорослей. С. 838 – 841. [Электронный ресурс]: http://www.tinro-center.ru/attachments/022_838-967-biotechnology-konovalov.pdf (дата обращения 8.04.12).
-

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ СО СТРЕСС-ПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, АКТИВНОСТЬ СОД И УРОВЕНЬ ПОЛ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ

**Лапшин П.В., Нечаева Т.Л., Николаева Т.Н., Катанская В.М.,
Гафуров Р.Г.¹, Загоскина Н.В.**

ФГБУН Институт физиологии растений им.К.А. Тимирязева РАН, Москва,
Россия, тел.: (499)9779433, e-mail: phenolic@ippras.ru

¹Институт физиологически активных веществ, Черноголовка, Московская обл., Россия, e-mail: ravig@icp.ac.ru

Высшие растения в процессе онтогенеза подвергаются разнообразным неблагоприятным воздействиям окружающей среды, в том числе влиянию низких повреждающих температур, что приводит к значительному увеличению образования в клетках различных форм активного кислорода (АФК) [1]. Сверхпродукция АФК, получившая название окислительного стресса, вызывает каскад цепных реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ), входящих в состав фосфолипидов мембран [2,3]. При этом происходит снижение количества ненасыщенных жирных кислот и, как следствие, повышается вязкость мембран, увеличивается их протонная проницаемость, а также происходит инаktivация мембран-связанных ферментов [3-5]. Все это приводит к повреждению жизненно важных систем клетки и организма в целом. В нормально функционирующей клетке баланс между образованием АФК и их элиминацией поддерживается за счет

многокомпонентной системы защиты, состоящей из высокомолекулярных (ферменты) и низкомолекулярных (глутатион, аскорбиновая кислота, фенольные соединения и др.) антиоксидантов [6]. Фенольные соединения являются одними из наиболее распространенных в клетках растений представителей вторичного метаболизма, для которых характерна высокая антиоксидантная активность и интерес исследователей к этой группе веществ в настоящее время достаточно высок [7,8].

Для поддержания жизнеспособности растений, особенно сельскохозяйственных культур, используют разнообразные фиторегуляторы, способствующие лучшей их адаптации к условиям окружающей среды [9]. Особенно важно это для пшеницы, подвергающейся действию низких температур в период вегетации. К фиторегуляторам нового поколения относится препарат Бензихол, обладающий стресс-протекторной активностью [10].

Целью работы являлось изучение действия Бензихола на проростки пшеницы, подвергнутые действию гипотермии, на уровне определения ПОЛ, как одного из основных показателей состояния антиоксидантной системы растений, накопления фенольных соединений и активности супероксиддисмутазы (СОД).

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Объектом исследования являлась пшеница ярового сорта «Амир», семена которой выдерживали в течение 12 час. в водных растворах регуляторов роста (10^{-4} и 10^{-5} М, вариант 1 и 2, соответственно), а затем выращивали рулонным способом в камере фитотрона при +24°C и 16-час. фотопериоде в течение 7 дней. Контролем служили растения, семена которых выдерживали в воде. В качестве стрессового фактора использовали воздействие низкой температуры (-7°C, 2 часа).

Определяли морфо-физиологические характеристики растений, в том числе линейные размеры растений, листьев и корней, а также оводненность листьев.

Фенольные соединения извлекали из свежих листьев 70%-ным этанолом [11]. В экстрактах спектрофотометрическим методом определяли содержание суммы растворимых фенольных соединений с реактивом Фолина–Дениса (поглощение при 725 нм) [12] и содержание флавоноидов по реакции с 1%-ным водным раствором хлористого алюминия (поглощение при 415 нм) [13]. Калибровочные кривые в обоих случаях строили по рутину.

Определение перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводили в листьях контрольных (22°C) и опытных (-7°C) проростков пшеницы по накоплению малонового диальдегида

(МДА), определяемого по цветной реакции с тиобарбитуровой кислотой при длине волны 532 нм [14].

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД), представляющей цитозольную фракцию фермента (Cu,Zn-СОД), осуществляли методом, в основе которого лежит ее способность конкурировать с нитросиним тетразолием за супероксидные радикалы [15]. (Beauchamp, Fridovich, 1971). За единицу активности СОД принимали 50% ингибирование образования формазана (спектрофотометрирование при 560 нм).

Исследования проводили в двух биологических повторностях. Для математической обработки результатов использовали программу Excel. В таблице и на рисунке представлены средние арифметические значения определения и их стандартное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Обработка семян Бензихолом способствовала более интенсивному росту проростков, чем это наблюдалось в контрольных условиях. Значения длины листьев и корней превышали таковые контроля на 15-20%. Накопление биомассы растений также повышалось (особенно в варианте с 10^{-5} М).

Что касается фенольных соединений, то в листьях проростков, выращенных при $+24^{\circ}\text{C}$ содержание суммы растворимых фенольных соединений и флавоноидов в контроле и варианте 1 было практически одинаковым, тогда как у варианте 2 – на 20% ниже (табл.).

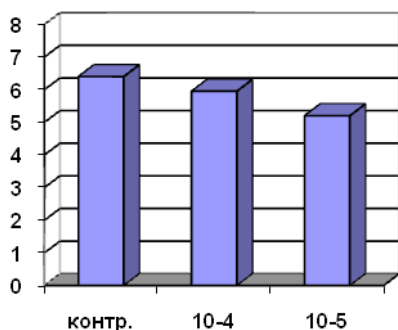
Таблица

Изменения в содержании суммы растворимых фенольных соединений (ФС) и флавоноидов (ФЛ) в листьях проростков пшеницы, подвергнутых действию Бензихола (БХ) и низкой температуры

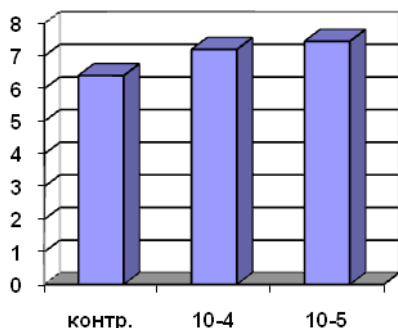
Вариант	ФС	ФЛ
	мг/г сырой массы	
+24°C		
контроль	6,5± 0,66	3,6±0,13
БХ, 10 ⁻⁵ М	6,7± 0,65	3,6 ±0,11
БХ,10 ⁻⁴ М	5,0 ±0,41	2,9± 0,09
-7°C, 2 часа		
контроль	6,2 ±0,71	3,9 ±0,11
БХ, 10 ⁻⁵ М	4,4± 0,33	3,0± 0,11
БХ,10 ⁻⁴ М	6,7+ 0,82	4,1+ 0,13

Такое снижение накопления фенольных соединений не является следствием изменения ростовых процессов, а, вероятно, связано с метаболической регуляцией.

При стрессовом воздействии (-7°C) у контрольных растений содержание фенольных соединений и флавоноидов в листьях сохранялась практически на уровне, что не характерно для опытных вариантов. Во всех случаях, у проростков, выросших из обработанных Бензихолом семян, количество этих веществ изменялось по сравнению с проростками, росшими в нормальных условиях: у варианта 2 - на 25% и 10%, соответственно, по сравнению с «нормой», тогда как у варианта 1 - на 40% и 15%, соответственно. Следовательно, изменения в накоплении фенольных соединений в листьях проростков пшеницы, по-видимому, регулируются поступившей в семена концентрацией Бензихола.



а



б

Рис. 1. Уровень ПОЛ (ед. активности/г сырой массы) в контрольных (а) и выдержанных при низкой температуре (б) листьях проростков яровой пшеницы сорта Амир, подвергнутых действию Бензихола.

Что касается СОД, одного из «ключевых» ферментов антиоксидантной защиты клеток от активных форм кислорода, то

ее активность во всех случаях была достаточно низкой и почти одинаковой во всех исследованных вариантах.

Как известно, уровень ПОЛ является важным показателем при оценке состояния клеток растений и развитии в них стрессовой реакции [2].

В нашем случае, в листьях проростков пшеницы, выращенных в обычных условиях (+24°C) более высокие его показатели характерны для контрольного варианта. Выдерживания семян в растворах Бензихола сопровождалось повышением уровня ПОЛ (рис. 16).

После кратковременного действия низкой температуры в контрольном варианте изменений в уровне ПОЛ не отмечалось, тогда как в опытных вариантах – этот показатель значительно снижался. Можно даже говорить о том, что чем выше была концентрация стресс-протекторного соединения (Бензихола), тем ниже был уровень ПОЛ в листьях проростков. Все это свидетельствует о том, что в стрессовых условиях проявляется защитное его действие.

Таким образом, комплексное изучение действия фитогормонального биомиметика на морфо-физиологические (рост, продуктивность) и биохимические (накопление низкомолекулярных и высокомолекулярных антиоксидантов, уровень перекисного окисления липидов) характеристики, выявило его рострегулирующую и стресспротекторную активности, зависящие от дозы препарата и физиологического состояния растений пшеницы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы ОХНМ-09 и ОХНМ-10 «Медицинская и биомолекулярная химия».

ЛИТЕРАТУРА

1. Трунова Т.И. Растение и низкомолекулярный стресс. 64-е Тимирязевское чтение. М.: Наука, 2007. 54 с.
2. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: Университет. Книжный дом, 2007. 139 с.
3. Heath R.L. The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells // *Adv. Phytochem.* 1987. V. 21. P. 29-54.
4. Mittler R. Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance // *Trends Plant Sci.* 2002. V. 7. P. 405-409.
5. Мерзляк М.Н. Активированный кислород и окислительные процессы в мембранах растительной клетки // *Итоги науки и техники. Сер. Физиология растений.* М.: ВИНТИ, 1989. Т. 6. 168 с.
6. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма "Слово". 2006. 556 с.

-
7. *Запрометов М. Н.* Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука. 1993. 272 с.
 8. *Bidel L. P.R., Coumans M., Baissac Y. et al.* Biological activity in plant cells / Recent advances in polyphenol research. Eds. Santos-Buelga C., Escribano-Bailon M., Lattanzio V. USA. 2010. V. 2. P. 163-205.
 9. Гамбург К.З., Кулаева О.Н., Муромцев Г.С. и др. Регуляторы роста растений. М.: Наука. 1979. С.174-212.
 10. Гафуров Р.Г., Махмутова А.А. Рострегулирующая активность N – и O-бензилсодержащих соединений – новой группы синтетических аналогов природных ауксинов // Прикладная биохимия и микробиология. 2005. Т.41. С. 243-249.
 11. *Олениченко Н.А., Осипов В.И., Загоскина Н.В.* Фенольный комплекс листьев озимой пшеницы и его изменение в процессе низкотемпературной адаптации растений // Физиология растений. 2006. Т. 53. С. 554-559.
 12. *Запрометов М.Н.* Фенольные соединения и методы их определения // Биохимические методы в физиологии растений/ Под ред. Павлиновой О.А. М.: Наука. 1971. С. 185-197.
 13. *Gage T. B., Wendei S. H.* Quantitative determination of certain flavonol-3-glycosides // Analytical chemistry. 1950. V.22. P.708-711.
 14. *Лукаткин А. С., Голованова В. С.* Интенсивность перекисного окисления липидов в охлажденных листьях теплолюбивых растений // Физиология растений. 1988. Т. 35. С. 773-780.
 15. *Beauchamp C., Fridovich I.* Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrilamide gels // Anal. Biochem. 1971. N.3. P. 276-287.
-

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАСТЕНИЙ РОДА ПЕРВОЦВЕТ (PRIMULA)

Латыпова Г.М., Бубенчикова В.Н., Романова З.Р.

ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет»,
Уфа, Россия

ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», Курск,
Россия Тел. 8 (347) 272 60 67, 8 917 75 25 174, E-mail:
primula17@rambler.ru

Растения рода примула, или первоцвет (*Primula*), широко распространены во флоре РФ. Большой интерес в медицинской и фармацевтической практике представляют первоцвет весенний (лекарственный) (*Primula veris* L. или *P. officinalis* (L.)Hill.) и его подвид первоцвет крупночашечный (*P. macrocalyx* Bunge). В отечественной официальной медицинской практике разрешен к применению первоцвет весенний. Растение обладает

противокашлевым, спазмолитическим, седативным, слабительным, потогонным, жаропонижающим действием. В настоящее время зарегистрированы 10 зарубежных препаратов на основе корневищ первоцвета весеннего в качестве отхаркивающих средств. Листья и корневища с корнями первоцвета весеннего официнальны в Румынии, входят в Британскую Травяную Фармакопею в качестве седативного, спазмолитического и гипнотического средства. Корневища с корнями первоцвета весеннего были включены в фармакопеи Венгрии, Польши, Чехословакии. В РФ листья первоцвета весеннего применяются в качестве поливитаминного пищевого растительного сырья (ГОСТ 3166-76) [3].

Литературные данные показывают достаточную изученность подземных частей первоцвета весеннего по содержанию таких групп биологически активных веществ (БАВ), как тритерпеновые сапонины, углеводы, эфирные масла, надземных частей – по содержанию аскорбиновой кислоты, углеводов, эфирных масел, но состав полифенольных соединений изучен недостаточно. Первоцвет крупночашечный имеет большие сырьевые запасы на территории Республики Башкортостан, широко используется в народной медицине и может быть использован как дополнительный источник получения БАВ. Однако в химическом отношении является мало изученным [3, 4].

Целью данных исследований явилось изучение качественного состава фенольных соединений травы первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного с целью расширения номенклатуры официального импортозамещающего лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе.

Для качественного анализа фенольных соединений использовали метод хроматографии в тонком слое сорбента на пластинках марки «Silufol» (марки UV-254 и UV-366, Чехия), «Sorbfil» (марки ПТСХ-П-А и ПТСХ-АФ-А-УФ, Россия). На стартовую линию хроматографических пластинок размером 15x10 см наносили по 30 мкл исследуемых растворов и по 10 мкл 1% растворов в 70% спирте этиловом доступных достоверных образцов фенольных соединений «Fluka», «Sigma», «ISN» (США), пластинки с нанесенными пробами высушивали на воздухе в течение 5 минут. Хроматографирование проводили восходящим способом, после прохождения фронтов элюента 12 см пластинки извлекали и высушивали. Далее пластинки рассматривали в УФ-свете при длине волны 254 нм. Для хроматографирования использовали различные фракции водно-спиртового извлечения из сырья изучаемых растений.

Определение арбутина проводили в бутанольных фракциях

на пластинках «Sorbfil» в системе: хлороформ-спирт метиловый (8:2) с последующей обработкой хроматограмм диазотированной кислотой сульфаниловой и 10% раствором натрия гидроксида после высушивания. В результате проведенных исследований в исследуемых извлечениях обнаружен арбутин (пятна с R_f 0,51 розовато-красного цвета) [1,4].

В хлороформных фракциях изучаемых объектов определяли кумарины в системе: бензол-этилацетат (8:2) с последующей обработкой хроматограмм 10% спиртовым раствором натрия гидроксида и детектированием в УФ-свете. В траве первоцвета весеннего идентифицирован умбеллиферон (пятно ярко-голубой флуоресценции с R_f 0,25), в траве первоцвета крупночашечного – кумарин (пятно зеленой флуоресценции с R_f 0,91) [1, 4].

Для обнаружения фенолкарбоновых кислот использовали этилацетатную фракцию. Определение проводили на пластинках «Sorbfil» и «Silufol». Наилучшее разделение наблюдалось в системе растворителей хлороформ-спирт метиловый-вода (26:14:3). В изучаемых объектах обнаружены по два соединения с R_f 0,74 и 0,97, пятна которых на хроматограмме имеют фиолетовую и голубую флуоресценцию, отнесенные к галловой и коричной кислотам [4].

Для обнаружения флавоноидов использовали эфирную и этилацетатную фракции. Наиболее оптимальными системами оказались следующие: н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:2); кислота уксусная ледяная кислота муравьиная концентрированная– хлороформ (10:2:2); этилацетат – кислота уксусная ледяная – вода (5:1:1). Для отделения флавоноидных соединений от сопутствующих веществ - оксикоричных кислот, использовали двумерную хроматографию на пластинках «Sorbfil» в двух системах, сначала в системе – гексан-ацетон-кислота уксусная (20:10:0,1) (данная система использовалась без насыщения), затем в системе н-бутанол-кислота уксусная-вода (4:1:1). Хроматограммы рассматривали в УФ-свете до и после обработки хромогенными реактивами. При проявлении хроматограмм 5% спиртовым раствором алюминия хлорида и последующим нагреванием в сушильном шкафу в течение 2–3 мин при 100–105° С обнаружены два соединения в виде желтых пятен, R_f которых идентичны рутину и гиперозиду. При проявлении пластинок 0,1% раствором ванилина в кислоте серной с последующим нагреванием в течение 3 мин при температуре 80° С наблюдалось три пятна желто-коричневой и оранжевой окраски, идентичные по R_f и по окраске рутину и гиперозиду [1,4].

Табл.1

Фенольные соединения травы первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного, идентифицированные методом ВЭЖХ

Группа БАВ	Первоцвет весенний	Первоцвет крупночашечный
Флавоноиды	Апигенин Байкалин Витексин Дигидрокверцетин Кверцетин Рутин Кемпферол Лютеолин-7-гликозид	Апигенин Байкалин Витексин Дигидрокверцетин Кверцетин Рутин Кверцимеритрин Гиперозид Яцеин
Простые фенолы	Арбутин	Арбутин
Дубильные вещества	Танин	Катехин
Кумарины	Умбеллиферон	Дигидрокумарин Кумарин О-метоксикумарин
Фенолокислоты	Галловая кислота	Галловая кислота Салициловая кислота
Оксикоричные кислоты	Коричная кислота Кофейная кислота Феруловая кислота Хлорогеновая кислота Цикориевая кислота	Коричная кислота Кофейная кислота Феруловая кислота Хлорогеновая кислота Цикориевая кислота Неохлорогеновая кислота О-кумаровая кислота

Для дальнейшего изучения качественного состава травы первоцветов использовали метод ВЭЖХ. Для определения фенольных соединений готовили водно-спиртовые извлечения из сырья, приготовленные экстракцией 70% раствором спирта этилового [3]. Исследования проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «Gilston», модель 305 (Франция); инжектор ручной, модель «Rheodyne 7125» (США) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы «Мультихром для «Windows». В качестве неподвижной фазы была использована металлическая колонка размером 4,6х250 «Kromasil C 18», размер частиц 5 микрон. В качестве подвижной фазы спирт метиловый-вода-кислота фосфорная концентрированная, в соотношении 400:600:5. Анализ проводили при комнатной температуре. Скорость подачи элюента 0,5 мл/мин.

Продолжительность анализа 70 мин. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора «Gilston UV/VIS» модель 151, при длине волны 254 нм. По 20 мкл исследуемых растворов и стандартных образцов вводили в хроматограф и хроматографировали по вышеприведенной методике. Для приготовления подвижной фазы использовали спирт метиловый (ос. ч.), кислоту фосфорную концентрированную (ос. ч.), очищенную дистиллированную воду. Для приготовления рабочих растворов стандартных образцов использовали стандарты кумаринов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот фирм «Fluka», «Sigma», «ISN» (США) и спирт метиловый (ос. ч.). Идентификацию разделенных веществ проводили путем сопоставления времен удерживания пиков, полученных на хроматограмме пробы, с временами удерживания стандартных растворов. Результаты исследования представлены в таблице 1.

В результате проведенных исследований в траве первоцвета весеннего идентифицировано 14 соединений, в траве первоцвета крупночашечного идентифицировано 23 соединения фенольной природы.

Таким образом, сравнительное изучение химического состава фенольных соединений травы первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного показывает их практическую идентичность по качественному составу фенольных соединений. Что позволяет обосновать целесообразность использования сырья обоих видов производящих растений в качестве источников соединений фенольной природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Латыпова, Г.М. Исследование состава фенольных соединений первоцвета весеннего, произрастающего во флоре Башкортостана / Г.М. Латыпова, З.Р. Романова, В.Н. Бубенчикова, В.А. Катаев, Л.Т. Гильмутдинова, Г.В. Соколов // Башкирский химический журнал. – 2007. – № 5. – С. 34-36.
2. Латыпова, Г.М. Исследование качественного и количественного состава флавоноидных соединений густого экстракта первоцвета лекарственного / Г.М. Латыпова, З.Р. Романова, В.Н. Бубенчикова, Г.В. Аюпова // Химия растительного сырья. – 2009. – № 4. – С. 113-116.
3. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Раеoniaceae – Thimelaeaceae. / Отв. ред. П.Д. Соколов. – Л.: Наука, 1986. – С. 175–176.
4. Романова З.Р. Фармакогностическое исследование первоцвета весеннего и первоцвета крупночашечного: автореф. дис. ... канд. фарм. наук: (14.00.02) / З.Р. Романова; Башкирский гос. медицинский ун-т. - Курск, 2011. – 22 с.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ КАЛИНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Масленников П.В.

Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия,
тел. 89114579097, e-mail: pashamaslennikov@mail.ru

Лекарственные растения составляют особую группу объектов исследования – благодаря высокой биологической активности, с одной стороны, и практической не изученности накопления в них антиоксидантов фенольного типа, с другой. Показательно, что в последние годы отношение клиницистов к лекарственным растениям кардинальным образом изменилось: подчеркивается важность последних в сохранении и поддержании здоровья населения. Показано, что лекарственные растения являются важным источником поступления биологически активных веществ (БАВ) для организмов высших трофических уровней, в том числе и человека [1].

Лекарственные растения содержат сложный комплекс химических соединений, оказывающих различное и многостороннее действие на организм человека. Особым вниманием исследователей пользуются растения, содержащие фенольные соединения и полифенолы, вследствие их ценности для медицины и фармакологии, как источников лекарственных препаратов широкого спектра действия. Значительное количество природных антиоксидантов фенольного класса, присутствующих в лекарственных травах, обуславливают их антиоксидантное, противовоспалительное, антимикробное, спазмолитическое и нейропротекторное действие [2]. Другим не менее важным свойством растительного сырья является его Р-витаминная активность, обусловленная содержанием различных фенольных соединений [3]. Важным свойством многих фенольных и полифенольных соединений является их участие в окислительно-восстановительных реакциях и в процессах нейтрализации активных форм кислорода (АФК) [4]. Цель настоящей работы – исследовать суммарное содержание фенольных соединений в лекарственных растениях и оценить антиоксидантную активность (АОА) данного лекарственного сырья.

Исследовалось суммарное содержание фенольных соединений в лекарственных растениях из коллекции Ботанического сада БФУ им. И. Канта (г. Калининград). Для

исследования были собраны листья растений в период цветения в сроки наибольшего содержания действующих веществ, индивидуальные для каждого вида растений (июнь-август 2010 г.), в соответствии с методическими рекомендациями [5]. Определение суммарного содержания фенольных соединений в исследуемых растениях проводилось спектрофотометрическим методом. В качестве аналитической реакции использовалась реакция образования окрашенного в синий цвет раствора берлинской лазури, возникающей при взаимодействии двухвалентного железа и гексоцианоферрата калия ($K_3Fe(CN)_6$). Интенсивность окраски полученного раствора при длине волны 720 нм позволяет судить о количестве фенольных соединений. В качестве стандартных образцов использовали растворы галловой кислоты. Навеску растительного материала растирали до гомогенного состояния в присутствии подкисленного 96°-го этанола (20:1), гомогенат центрифугировали при 4500 g в течение 30 минут [6]. Оптическую плотность растворов определяли на спектрофотометре «СФ-2000» (ЗАО «ОКБ СПЕКТР» Россия).

Во флоре Калининградской области насчитывается 708 видов растений, которые в той или иной степени обладают лекарственными свойствами. Из 708 видов около 300 являются широко распространенными. Сбор остальных лекарственных растений в природе, в том числе 42 видов охраняемых растений, может нанести значительный ущерб популяциям и привести к их исчезновению [7]. Фармакологическая ценность лекарственных растений определяется количеством биологически активных веществ, их соотношением и доминированием в химическом составе растения тех или иных соединений. В данной работе исследовалось суммарное содержание фенолов в листьях 66 видов лекарственных растений, произрастающих в Ботаническом саду БФУ им. И. Канта. Из числа изученных видов лекарственных растений наиболее широко представлены семейства сложноцветные (11 видов), губоцветные (11 видов), лютиковые (6 видов), зонтичные (5 видов) и бурачниковые (3 вида). Семейства норичниковые, толстянковые, кутровые, синюховые в общем насчитывали 8 видов растений. Из 31 семейства изученных травянистых растений, 22 представлены одним видом растений.

Фенольные соединения – один из наиболее распространенных и многочисленных классов природных соединений, обладающих биологической активностью. Образование фенолов является динамическим процессом, в значительной степени зависящим от многочисленных факторов окружающей среды. Главным, из которых является «стрессовый»,

возрастной и фактор освещенности [8]. Накопление фенольных веществ в различных частях и органах растений тесно связано с их функцией в жизнедеятельности растений и фазой развития [9]. Показано, что максимальное содержание фенольных веществ наблюдается в середине лета, в период цветения, и зависит от вида растения. Так, например, основная часть полифенолов у лопуха большого сосредоточена в листьях и корнях, для подорожника большого - в листьях и семенах, а у кипрея - в бутонах и цветах [8]. Наибольшее количество фенольных соединений было найдено (в порядке уменьшения количества) в листьях синюхи голубой (*Polemonium coeruleum*), герани кроваво-красной (*Geranium sanguineum*), мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis*), чернокореня лекарственного (*Cynoglossum officinale*), шалфея клейкого (*Salvia glutinosa*), шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis*), ревеня дланевидного (*Rheum palmatum*), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis*). Содержание суммы фенолов в этих растениях составило 47,7 -166,3 мг/г. Из 8 видов лекарственных растений с максимальным содержанием фенольных веществ, 4 вида входили в семейство губоцветные (*Lamiaceae*).

Достаточно высоким содержанием фенолов отличались листья родиолы розовой, душицы обыкновенной, монарды двойчатой, наперстянки крупноцветковой, медуницы лекарственной, аралии сердцевидной, лука поникающего, василистника малого, лаванды узколистной, цикория обыкновенного, полыни метельчатой, кровохлебки лекарственной, пустырника пятилопастного, подофилла Эмоди, астранции крупной, очитка большого. Эти растения оказались способными накапливать в своих листьях фенольные соединения в концентрациях от 21,8 до 42,3 мг/г. Для остальных исследованных видов лекарственных растений, которых оказалось несравнимо больше (42), средние уровни накопления фенолов были значительно ниже 20 мг/г сухого веса.

Основные и наиболее активные природные антиоксиданты имеют фенольную природу. Существенный вклад в величину суммарного содержания антиоксидантов (ССА) лекарственных трав вносят флавоноиды, дубильные вещества, оксиароматические кислоты, природные полифенолы, витамины и др. При этом АОА веществ фенольного ряда может варьировать в широких пределах. Так, например, оценка антиоксидантной активности различных природных флавоноидов показала, что наибольшей АОА после теафлавина обладают кверцетин и цианидин [2]. Поэтому содержание водорастворимых низкомолекулярных антиоксидантов фенольного типа в растительном сырье является важнейшим

показателем его биологической ценности.

Таким образом, анализ содержания фенольных соединений в 66 лекарственных растениях Калининградской области позволил выявить среди них виды с высоким уровнем накопления фенолов. Максимальное содержание суммы фенолов отмечено в листьях растений синюхи голубой, герани кроваво-красной, Melissa лекарственной, чернокореня лекарственного, шалфея клейкого, шлемника байкальского, ревеня дланевидного, шалфея лекарственного. Полученные данные по суммарному содержанию фенольных соединений в исследуемых лекарственных растениях позволяют комплексно оценить их антиоксидантные и Р-витаминные свойства, а виды с высоким содержанием анализируемых фенолов рекомендовать для сбора растительного сырья в качестве источников природных БАВ. Растения с высоким содержанием биологически активных веществ и СА могут быть использованы как основа для создания инновационных функциональных пищевых продуктов и продуктов лечебно-профилактического назначения с повышенным антиоксидантным действием. Такие продукты могут нейтрализовать вредное воздействие окислительного стресса и использоваться для своевременной индивидуальной антиоксидантной терапии в коррекции антиоксидантного статуса человеческого организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ключникова Н.Ф., Голубкина Н.А., Сенькевич О.А., Ключников П.Ф. Селен в лекарственных растениях Хабаровского края// Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. 2009. Вып. 4. С. 37-40.
2. Карпова Е.А., Храмова Е.П., Фершалова Т.Д. Флавоноиды и аскорбиновая кислота у некоторых представителей рода *Begonia* L. //Химия растительного сырья. 2009. №2. С. 105–110.
3. Писарев Д.Н., Новиков О.О., Сорокопудов В.Н., Халикова М.А. Жилиякова Е.Т., Огнева О.В. Химическое изучение биологически активных полифенолов некоторых сортов рябины обыкновенной - *Sorbus aucuparia* // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация. 2010. № 22 (93). Вып. 12/2. С. 123-128.
4. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Мн.: БГУ, 2004. 179 с.
5. Цыпленков В.П., Федоров А.С., Банкина Т.А., Федорова Н.Н. Определение химического состава растительных материалов. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 1997. 152 с.
6. Gupta Ch., Verma R. Visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content and antioxidant activity of three common vegetable // IJPSR. 2011. V. 2. №1. P. 175-182.
7. Соколов А.А. Лекарственные растения: учебно-метод. пособие. Калининград: Изд-во КГУ, 2004. 31 с.

-
8. Мисин В.М., Сажина Н.Н., Завьялов А.Ю. Сезонная динамика изменения содержания антиоксидантов фенольного типа в листьях подорожника и одуванчика // Химия растительного сырья. 2010. №3. С. 103-106.
 9. Сажина Н.Н., Мисин В.М. Измерение суммарного содержания фенольных соединений в различных частях лекарственных растений // Химия растительного сырья. 2011. №3 С. 149-152.
-

УДК 613.2:615.32

РАСТИТЕЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ПОЛИФЕНОЛОВ В ПРОФИЛАКТИКЕ ЗДОРОВЬЯ МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ

Мерзляков В.Ю., Кушнерова Н.Ф.

¹Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева
Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, Россия, тел.
(423)2313061; e-mail: vum77@mail.ru.

На врачей различных специальностей в процессе трудовой деятельности действуют сочетанные стрессовые факторы (химические, биологические, физические, психоэмоциональные и др.). При хроническом воздействии стресса истощается резерв адаптации и формируется оксидативный стресс, который обуславливает стрессорные заболевания или болезни адаптации (синдром хронической усталости, язвы желудочно-кишечного тракта, гипертоническая болезнь, атеросклероз и др.). Это делает актуальным расширение и углубление научных исследований, направленных на разработку здоровые сберегающих технологий, программ для профилактики и воссоздания здоровья в различных сферах профессиональной деятельности. В связи с этим была создана и предлагается к употреблению биологически активная добавка к пище «Калифен» (свидетельство на товарный знак № 228327, ТУ 9168-079-00480052-07), которая была выделена из калины (*Viburnum sargentii* Koehne) и запатентована как средство, обладающее антирадикальной активностью (патент № 2220614). Химический состав препарата был исследован с помощью жидкостного хроматографа «Controller LCC 500» (Pharmacia). Калифен – водно-спиртовой экстракт, который представляет собой композицию различных классов веществ: лейкоантоцианов, катехинов и их полимерных форм, олигомерных танинов, лигнина, флавонолов, органических кислот (фумаровой, аскорбиновой,

глицериновой, галактуроновой и др.), свободных аминокислот (гистидина, аргинина, аспарагиновой и глутаминовоц кислот, треонина, серина, глицина, цистеина, метионина, изолейцина, тирозина и др.), сахаров (сахарозы, рафинозы) и других органических соединений. Полифенолы составляют свыше 60% сухого остатка экстракта. Целью работы явилось использование БАД «Калифен» для профилактики нарушений метаболических реакций у врачей в процессе профессиональной деятельности.

Проведено обследование женщин врачей лечебно-профилактических учреждений г. Владивостока в возрасте 40–50 лет. В 1-ю группу (контрольную) включено 20 здоровых доноров женщин сопоставимого с обследуемыми возраста; во 2-ю группу - 27 врачей (анестезиологи и хирурги), подвергающихся в течение рабочего дня комплексному стрессовому воздействию (химический, психоэмоциональный, напряженность трудового процесса и др.), которым после биохимического обследования крови было предложено ежедневно утром после еды принимать в течение 6-ти недель по 2,5 мл БАД «Калифен» (они составили 3-ю группу). Доза в 2,5 мл соответствует профилактической дозе в 100 мг общих полифенолов в сутки [1]. Состояние антиоксидантной системы оценивали по величине антирадикальной активности крови, активности супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1), глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9), уровня восстановленного глутатиона, малонового диальдегида [2]. Осмотическую резистентность и средний объем эритроцитов определяли по общепринятым методам.

При первичном биохимическом исследовании плазмы крови врачей (2 группа до приема калифена) была обнаружена более высокая активность супероксиддисмутазы (СОД) ($882 \pm 5,0$ ед. по сравнению с 822 ± 28 ед. активности/мл крови в контроле; $p < 0,05$) и низкая активность ключевого фермента глутатионного звена – глутатионпероксидазы (ГП) ($46,05 \pm 1,44$ против $61,70 \pm 1,91$ нмоль НАДФН/мин/мл плазмы в контроле, $p < 0,001$). Одновременно отмечалось снижение уровня восстановленного глутатиона на 29% ($3,35 \pm 0,29$ мкмоль/г Hb против $4,73 \pm 0,22$ мкмоль/г Hb в контроле, $p < 0,001$). Полученные результаты свидетельствуют о напряжении системы антиоксидантной защиты организма, что подтверждается уменьшением величины общей антирадикальной активности (АРА) ($10,84 \pm 0,23$ против $12,27 \pm 0,09$ ед. тролокса/мл плазмы в контроле; $p < 0,001$). Данный факт определяет сниженную защиту мембранных структур клеток от разрушительного действия активных форм кислорода и гидроксил-радикалов, что лежит в основе

формирования оксидативного стресса. Увеличение концентрации в крови малонового диальдегида (МДА) ($3,94 \pm 0,29$ мкмоль/мл против $2,38 \pm 0,08$ мкмоль/мл в контроле; $p < 0,001$) определяет активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также повышение проницаемости мембран. Подтверждением этого является сдвиг порога начала ($0,50 \pm 0,01\%$ NaCl) и окончания ($0,40 \pm 0,01\%$ NaCl) гемолиза эритроцитов (в норме гемолиз эритроцитов начинается при концентрации $0,45\%$ NaCl, а завершается при $0,35\%$ NaCl). То есть, мембрана эритроцитов обладает пониженной устойчивостью к гемолизирующему агенту. Средний объем эритроцитов был на уровне верхней границы нормы ($89,78 \pm 0,78$ мкм³; в норме – $76-90$ мкм³), а в ряде случаев и выше ($98,00 \pm 0,70$ мкм³). Увеличение объема эритроцитов замедляет прохождение эритроцита в тонких капиллярах и способствует развитию тканевой гипоксии.

Применение калифена в течение 6 недель (3 группа), сопровождалось восстановлением до контрольных величин (1 группа) активности СОД ($785,43 \pm 6,58$ ед.), ГП ($52,10 \pm 3,00$ нмоль/мин/мл), величины восстановленного глутатиона ($6,06 \pm 0,40$ мкмоль/г Hb), МДА ($2,75 \pm 0,30$ нмоль/мл), АРА ($12,35 \pm 0,22$ ед. тролокса/мл). Начало гемолиза эритроцитов произошло при концентрации $0,45 \pm 0,02\%$ NaCl, а завершение гемолиза – при $0,35 \pm 0,01\%$ NaCl, то есть границы осмотической устойчивости восстановились до контрольного уровня.

Для выяснения биохимических механизмов протекторного эффекта калифена мы провели сравнение исследованных биохимических параметров до и после приема БАД (2-я и 3-я группы). Так, в плазме крови 3-й группы по сравнению с таковыми величинами во 2-й группе на 5% ($p < 0,001$) снизилась активность СОД, на 23% ($p < 0,001$) – ГП, на 39% ($p < 0,01$) возрос уровень восстановленного глутатиона и на 30% ($p < 0,01$) уменьшилось содержание малонового диальдегида. Прием калифена сопровождался ростом антирадикальной активности на 14% ($p < 0,001$). Также отличалась осмотическая устойчивость эритроцитов к понижению концентрации NaCl до и после приема калифена: в 3-й группе границы устойчивости выросли на 0,05%, что свидетельствует о повышении эластичности мембраны.

На основании выше изложенного следует, что влияние производственных условий на медицинских работников сопровождается выраженной картиной изменений метаболических реакций, характерных для воздействия стресса. Профилактическое использование БАД «Калифен» нормализует каскады метаболических реакций. Биохимический механизм сохранения

метаболизма обусловлен тем, что растительные полифенолы, входящие в состав БАД «Калифен», имеют способность улавливать свободные окисленные и пероксильные радикалы, образуя при этом относительно стабильный феноксил-радикал [3]. Это в значительной степени сдерживает процессы перекисного окисления липидов и снимает состояние оксидативного стресса [4]. В результате уменьшается уровень малонового диальдегида и увеличивается антирадикальная активность, что свидетельствует об увеличении антиоксидантного статуса. Это оправдывает применение БАД с полифенольными комплексами и в профилактических целях до стрессового воздействия, и в качестве терапевтических в процессе его развития и после завершения. Кроме того, благодаря особенности химического строения полифенолы способны играть роль универсальной буферной емкости, выступая как в качестве донора, так и акцептора электронов и протонов, и снимать состояния гиперпротонемии и тканевой гипоксии [5]. Применение экстрактов растительного происхождения полифенольной природы при воздействии стрессовых факторов является перспективным направлением. Профилактический прием БАД «Калифен» позволит эффективно бороться с последствиями воздействия на организм неблагоприятных факторов различной природы, что, безусловно, увеличит профессиональное и биологическое долголетие работоспособного населения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств // Вестник фарм. комитета. 1999. № 2. С. 9-12.
2. Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Янькова В.И. Руководство по методам исследования параметров системы «Перекисное окисление липидов - антиоксидантная защита» в биологических жидкостях. - Владивосток: Изд-во Дальневосточного университета, 2003. С. 45-48.
3. Re R., Pellegrini N., Proteggente A et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay // Free Radic. Biol. Med. 1999. V. 26, N 9-10. P. 1231-1237.
4. Pignatelli P., Ghiselli A., Buchetti B. et al. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine // Atherosclerosis. - 2006. - Vol. 188, N 1. - P. 77-83.
5. Sanz M. J., Ferrandiz M. L., Cejudo M. et al. Influence of a series of natural flavonoids on free-radical generating systems and oxidative stress // Xenobiotica. 1994. Vol. 24. N 7. P. 689-699.

ПОЛИФЕНОЛЫ КОРНЕЙ КАЗАХСТАНСКИХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ RUMEX И ИХ БИОАКТИВНОСТЬ

Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан,
тел. (727) 3871751, e-mail: rmuz@mail.ru

Во флоре Казахстана описано 23 вида растений Rumex, из них 12 имеют значительные запасы для возможной заготовки и использования самостоятельно и в качестве сырья для получения фитопрепаратов.

Все 23 вида изучены нами на содержание основных групп БАВ. Результаты исследований 12 видов Rumex представлены в таблице.

Таблица 1.

Состав основных групп БАВ корней видов Rumex

Вид Rumex	Дубильные вещества	Антрахиноны	Флавоноиды	Кумарины	Ксантоны	Фенол-кислоты
конский	22.17	1.80-3.06	2.13-4.06	0.73	0.22	8.96-9.71
тяньшанский	25.60	1.96-4.50	2.19-5.17	0.88	0.38	6.77-8.71
русский	33.20	3.96-5.72	6.29-9.58	0.72	0.19	7.14-9.57
памирский	30.10	3.41-4.56	7.92-9.44	0.68	0.26	9.14-11.56
Маршалловский	20.62	3.23-4.54	5.56-8.12	0.79	0.29	6.80-11.12
Рехингера	23.31	1.70-1.90	1.70-2.90	0.85	0.17	6.65-8.19
Паульсена	25.00	1.30-1.96	2.21-4.17	0.41	0.21	6.75-8.64
кислый	27.41	0.80-1.55	2.19-3.78	0.38	0.15	5.98-8.01
узколистный	20.19	2.30-2.48	2.06-3.19	0.64	0.33	5.72-7.81
пирамидальный	22.41	2.29-4.17	2.13-4.17	0.71	0.36	4.47-6.12
обыкновенный	25.62	1.71-2.36	2.02-3.84	0.36	0.41	7.13-8.85
курчавый	23.17	1.80-2.92	2.12-3.96	0.59	0.54	6.87-7.92

Из литературных данных по изучению состава 56 видов щавелей известны антрахиноны в 52 видах, флавоноиды в 31 виде,

дубильные вещества в 36 видах, другие компоненты в этих и других видах.

Известно также разностороннее практическое использование различных видов щавелей в официальной и народной медицине. Нами разработано 4 фитопрепарата и введено в официальную медицину 4 вида казахстанских щавелей.

СЕКРЕТОРНЫЕ СТРУКТУРЫ – МЕСТА СИНТЕЗА И АККУМУЛЯЦИИ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Муравник Л.Е., Костина О.В., Иванова А.Н., Шаварда А.Л.

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург, Россия;
тел.: +7 812 3464477, e-mail: lemur50@mail.ru

Среди многообразных функций фенольных соединений, обнаруженных в растениях, выделяется защитная, которая обусловлена фунгицидными, бактерицидными, инсектицидными и аллелопатическими свойствами этих химических веществ. Для реализации защитной функции в покровных тканях, подвергающихся воздействию грибной инфекции, микроорганизмов или насекомых, синтезируются и накапливаются различные соединения фенольной природы [1].

С целью изучения механизмов синтеза и накопления фенолов, установления периода прохождения этих процессов в онтогенезе растений, выявления ультраструктурных особенностей клеток, принимающих в них участие, а также для определения химического состава образующихся веществ в качестве модельной системы удобно использовать секреторные структуры, которые формируются на покровных тканях вегетативных и репродуктивных органов. Железистые образования способны синтезировать, накапливать или выделять различные соединения первичного и вторичного метаболизма. Их можно изолировать с поверхности листьев, цветков или плодов, что дает возможность определять состав метаболитов только в секреторной ткани.

В настоящей работе изучались трихомы и другие железистые структуры у видов *Droseraceae*, *Empetraceae*, *Ericaceae*, *Juglandaceae* и *Rubiaceae*. Были исследованы морфологически разнообразные железки, формирующиеся на поверхности листьев, прилистников, завязей или перикарпия.

Существуют различные способы обнаружения фенольных соединений в растениях. К ним относятся классические и

современные методы структурной ботаники, в частности, гистохимия и флуоресцентная микроскопия, а также методы аналитической химии. В трихомах *Empetrum nigrum* гистохимические реакции выявляют фенольные соединения в клетках головки. Газовая хроматография с последующей масс-спектрометрией (ГХ-МС) обнаруживают в трихомах ряд фенольных кислот, бибензилов, халконов и флаванонов. Результаты гистохимических реакций подтверждают присутствие танинов и флавоноидов в трихомах изученных видов *Ericaceae*. В головчатых железках видов *Juglans* и в пельтатных трихомах *Pterocarya rhoifolia* гистохимические тесты демонстрируют наличие конденсированных танинов и полифенолов, а флуоресцентные маркеры обнаруживают флавоноиды. Даже без применения флуорохромов в клетках пельтатных трихом наблюдается автофлуоресценция фенольных соединений. Данные ГХ-МС выявляют в составе трихом *P. rhoifolia* галловую и хлорогеновую кислоты, тимол, кверцетин и катехин, причем количество катехина в 10-50 раз превышает содержание других фенольных соединений. У видов *Galium* и *Pentas lanceolata* в железках прилистников обнаружены конденсированные танины, полифенолы и флавоноиды. Они локализируются в базальной части секреторных клеток и в клетках выполняющей ткани. Хотя железки плотоядных растений *Droseraceae* специализируются на синтезе гидролаз и полисахаридной слизи, для них также характерно присутствие фенольных соединений, а именно флавоноидов [2] и нафтохинонов [3].

Известно, что многие фенолы токсичны для цитоплазмы клеток, в которых локализируются, по этой причине они откладываются в вакуолях [4-5], в клеточной стенке и в кутикуле [6]. На ультраструктурном уровне присутствие веществ фенольной природы в вакуолях подтверждается образованием черного аморфного осадка. Многие изученные нами виды растений содержат в вакуолях электронно-плотные включения, размер которых зависит от типа железки, стадии ее развития, пространственного расположения секреторной клетки в головке. Так, в пищеварительных железках *Dionaea muscipula* и *Aldrovanda vesiculosa* на ранних этапах дифференциации встречаются мелкие вакуоли с гомогенными глобулами на тонопласте. По мере созревания железок глобулы сливаются в сплошной слой либо формируют ячеистую структуру. В железистых волосках у видов *Drosera* в секреторных клетках, расположенных на вершине головки, находятся прозрачные вакуоли, а в клетках боковой поверхности они содержат темный осадок. Электронно-плотные

отложения присутствуют под кутикулой или на ней в трихомах *Calluna vulgaris*, *Ledum palustre*, *Aldrovanda vesiculosa*, ряда видов *Drosera*.

Вопрос о том, где осуществляется синтез фенолов, и какие клеточные органеллы принимают в нем участие, нуждается во всестороннем изучении. На стадии активной секреции в пельтатных трихомах *P. rhoifolia* одной из часто встречающихся органелл является эндоплазматический ретикулум, представленный двумя формами: гранулярной (ГЭР) и агранулярной (АЭР). В трихомах *E. nigrum* значительного развития достигает АЭР, особенно много его в средних и нижних секреторных клетках головки. Пролиферация АЭР отмечается в трихомах нескольких видов *Juglans*, при этом у *J. ailanthifolia*, *J. cordiformis* и *J. mandshurica*, головки которых окрашены в разные оттенки красного цвета, степень развития ретикулярных элементов больше, чем у *J. regia* со слегка желтоватыми головками железок. У видов *Drosera* локализация трубочек АЭР приурочена преимущественно к клеткам латеральной поверхности головки железистых волосков, в вакуолях которых появляется осmioфильный осадок. Среди ультраструктурных особенностей железок *Drosophyllum lusitanicum* также выделяется развитие ГЭР и АЭР. Если с наличием ГЭР в железках плотоядных растений принято связывать синтез гидролитических ферментов, необходимых для внеклеточного переваривания насекомых, то формирование трубчатого АЭР нуждается в интерпретации. По данным биохимических и молекулярных исследований [7], именно на мембранах эндоплазматического ретикулаума локализуются мультиферментные комплексы, имеющие отношение к синтезу флавоноидов и фенилпропаноидов.

У всех исследованных видов растений пластиды секреторных клеток представлены лейкопластами, характерной особенностью которых является увеличенная площадь поверхности по отношению к объему органеллы. С наружной мембраной оболочки лейкопластов часто контактируют ретикулярные футляры. Ранее было установлено, что формирование комплексов пластид с элементами эндоплазматического ретикулаума характерно для терпеноидогенных железок [8-10]. Однако в наших исследованиях неоднократно было показано, что такие комплексы формируются также в клетках, синтезирующих фенольные соединения. Например, в железках *E. nigrum* или *C. vulgaris* накапливается незначительное количество терпеноидов по сравнению с фенольными соединениями, однако контакты оболочки лейкопластов с ГЭР происходят регулярно.

Таким образом, аккумуляция халконов, флавонов и бибензилов, происходящая в трихомах растений *Empetraceae*, по-видимому, предотвращает развитие микроорганизмов в замкнутом пространстве эрикоидных листьев. Трихомы представителей *Juglandaceae*, содержащие катехин и кверцетин, *Ericaceae* и *Rubiaceae*, содержащие флавоноиды, защищают репродуктивные побеги, молодые плоды, листья и прилистники от поедания травоядными и поражения фитопатогенами. У изученных нами растений аккумуляция фенольных соединений помимо защитной выполняет и другие функции. Яркое окрашивание головок железок у плотоядных растений *Droseraceae*, благодаря накоплению в них антоцианов, связано с привлечением насекомых для последующей поимки и переваривания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Harborne J. H., Williams C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992 // *Phytochem.* 55(6): 481-504.
 2. Juniper B. E., Robins R. J., Joel D. M. 1989. The carnivorous plants. London, Academic Press. 353 pp.
 3. Durand R., Zenk M. H. The homogentisate ring-cleavage pathway in the biosynthesis of acetate-derived naphthoquinones of the *Droseraceae* // *Phytochem.* 1974. 13(8): 1483-1492.
 4. Wink M. 1993. The plant vacuole: a multifunctional compartment // *J. Exp. Bot.* 44 (Supplement): 231-246.
 5. Mol J., Grotewold E., Koes R. 1998. How genes paint flowers and seeds [Reviews] // *Trends in Plant Science.* 3(6): 212-217.
 6. Markham K. R., Ryan K. G., Gould K. S., Rickards G. K. 2000. Cell wall sited flavonoids in lisanthus flower petals // *Phytochem.* 54(7): 681-687.
 7. Winkel-Shirley B. 1999. Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways // *Physiol. Plant.* 107: 142-149.
 8. Васильев А. Е. 1977. Функциональная морфология секреторных клеток растений. Л., Наука. 208 с.
 9. Cheniclet C., Carde J.-P.. 1985. Presence of leucoplasts in secretory cells and of monoterpenes in the essential oil: a correlative study // *Israel J. Bot.* 34: 219-238.
 10. Duke S. O., Paul R. N. 1993. Development and fine structure of the glandular trichomes of *Artemisia annua* L. // *Int. J. Plant Sci.* 154: 107-118.
-

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФИТОПРЕПАРАТА ИЗ *TAMARIX ARCEUTHOIDES* BGE

Мынбаева Ж.Т.¹, Абилов Ж.А.², Рахмадиева С.Б.¹, М. Igbal Choudhary³

¹Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан, zhanar_mynbayeva@mail.ru

²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

³International Center for Chemical and Biological Sciences, H.E.J. Research Institute of Chemistry, Dr. Panjwamy Center for Molecular Medicine and Drug Research University of Karachi, Karachi – 75720, Pakistan

Флора Казахстана представляет интерес в качестве источника возобновляемого растительного сырья для получения биологически активных веществ. Одной из распространенных групп фенольных соединений, встречающихся во всех классах флоры, являются флавоноиды, которые привлекают внимание исследователей как физиологически активные соединения с широким спектром действия.

Обзор структуры и свойств растительных полифенолов флавоноидных соединений позволяет утверждать, что главными функциональными группами полифенолов, определяющими их поведение, химическую активность, биохимическое и фармакологическое действие, являются фенольные гидроксилы. Из числа реакций, обусловленных активностью гидроксильных групп, наибольший интерес и практическую важность представляют реакции окисления.

Для флавоноидных соединений определяющим химическим свойством является склонность к легкой отдаче протона и к окислению. Легко окисляясь, фенольные соединения в силу сопряженности окислительно-восстановительных реакций способствуют восстановлению других веществ в реакционной смеси, либо, во всяком случае, препятствуют их окислению. Такое действие фенольных соединений может быть охарактеризовано как восстановительное или точнее как антиокислительное (антиоксидантное).

Объяснение механизма антиоксидантного действия флавоноидных соединений может быть дано на основе представления об окислительно-восстановительной реакции, как о ступенчатом свободно-радикальном самоускоряющемся процессе.

Цель данной работы является установление антиоксидантной биологической активности казахстанских растений.

Флора Казахстана представляет огромный резерв дикорастущих растений одним из которых являются растения семейства *Гребенщиковые* (*Tamaricaceae* Lindl.) .

Семейство *Гребенщиковые* (*Tamaricaceae* Lindl.) во флоре Казахстана представлено 4 родами: Хололахна – *Hololachne* Ehrb. (1 вид); Реамюрия – *Reaumuria* L. (3 вида); Гребенщик – *Tamarix* L. (11 и 2 гибридные виды); Мирикария – *Myricaria* Desv. (2 вида) [1].

Растения семейства *Гребенщиковых* (*Tamaricaceae*) широко произрастают и обладают достаточными запасами на территории Казахстана, они издавна применялись в народной медицине для лечения ревматизма, при болезнях лимфатической системы, желудка, кишечника, селезенки, ротовой полости, репродуктивной системы, а также при бесплодии [2].

В последние десятилетия зарубежными исследователями проведено химическое исследование растений рода *Гребенщик* (*Tamarix* L.), произрастающих в Египте, Пакистане, Индии и Китае [2, 3].

Исследование казахстанских видов растений рода *Гребенщик* (*Tamarix* L.) впервые начато на кафедре органической химии и химии природных соединений КазНУ им. аль-Фараби [4-6].

Ранее нами был изучен химический состав *гребенщика можжевельного* (*Tamarix arceuthoides* Bge.) [7,8].

Объект исследования: растения *Тамарикс можжевельный* (*Tamarix arceuthoides* Bge.) рода *Tamarix*.

Исследование антиоксидантной биологической активности данного растения представляет собой большой научный и практический интерес с целью поиска новых биологически активных веществ и создание на их основе ценных, высокоэффективных препаратов растительного происхождения для применения в медицине и сельском хозяйстве.

Нами была изучена антиоксидантная активность казахстанского растения: *гребенщика можжевельного* (*Tamarix arceuthoides* Bge), то есть, наработаны условные препараты из различных фракций, исследуемого растения (образцы № 1-6).

Ранее мы исследовали содержание флавоноидов в растений, которое составляет 2,7 – 0,67 % .) [7].

Изучение антиоксидантного действия растения проводилось на базе Казахской государственной Академии г. Астана (Казахстан). Уровень перекисного окисления исследовали двумя тест - методами: 1) *in vitro* был проведен при моделировании ПОЛ на желточном липопротеиде; 2) эксперимент *in vivo* проводили на белых крысах. Об антиоксидантной активности судили по изменению уровня каталазы в сыворотке и в гомогенатах тканей по

методу М.А. Королюка (мозг, печень, почки).

Антиоксидантная активность (in vitro) изучена по методу, разработанному профессором Пивоваренко В.Г. с коллегами Киевского университета им. Т. Шевченко [9]. Для оценки ингибирующего эффекта действующего начала растений нами определялась оптическая плотность комплекса тиобарбитуровой кислоты (ТБК) с таким конечным продуктом перекисного окисления липидов, как малоновый диальдегид (МДА) в контрольной пробе и в растворе липосом в присутствии исследуемых экстрактов, а также по способу взаимодействия карбонильных соединений с 2,4-динитрофенилгидразином [10] об антиоксидантных свойствах судили по формуле (чем выше значения, тем более выражена антиоксидантная активность исследуемого экстракта) [9, 10].

$$AOA = \frac{D_{\text{контр.}} - D_{\text{экстр.}}}{D_{\text{экстр.}}} \cdot 100\%, \text{ где}$$

$D_{\text{контр.}}$ - показатель контрольного раствора;

$D_{\text{экстр.}}$ - показатель раствора веществ.

Если в работах Пивоваренко В.Г. с соавторами [1] и Зайцева В.Г. [2] исследована антиоксидантная активность индивидуальных веществ, то в нашем исследовании изучались смеси экстрактивных соединений. Для более достоверного сравнения результатов титр был взят для всех экстрактов в одинаковом значении и равнялся 1 мг/мл.

Данные, полученные в ходе анализа, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты первичного биологического скрининга антиоксидантной (in vitro) активности экстрактов из *гребенщика можжевельного* (*Tamarix arceuthoides* Bge)

№ экстракта (1 мг/мл).	экстрагент	Антиоксидантная активность (%)
1	бензол	9,90
2	гексан	7,64
3	этилацетат	18,99
4	30 % водный ацетон	21,70
5	70 % водный ацетон	12,01
6	Ионол (с=10 ⁻² М)	14,67

По табличным данным мы видим, что в экстрактах содержится различное количество активных веществ, участвующих

в перекисных процессах. Для дальнейших исследований окислительного стресса *in vivo* большой интерес представляют экстракты № 3, 4. У этих экстрактов показатели эффекта ингибирования перекисных процессов в модельной реакции оказались выше, чем у синтетического антиоксиданта ионола ($c=10^{-2}M$), что может, обусловлено повышенным содержанием полифенольных соединений и позволяет их рекомендовать в качестве потенциальных антиоксидантов растительного происхождения.

Вместе с тем, сравнение изученных экстрактов между собой выявило, что наиболее перспективным в плане изучения антиоксидантной активности является экстракт № 4, для которого показатель ингибирования выше чем у ионола в 1,5 раза.

Таким образом, был проведен первичный биологический скрининг (*in vitro*) на антиоксидантную активность для препаратов из *Tamarix arceuthoides* Bge. в результате установлено, что наработанные препараты из *Tamarix arceuthoides* Bge. обладают высокой антиоксидантной активностью, далее образцы-экстракты № 3, 4 были изучены на антиоксидантное действие уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эксперименте *in vivo* на белых крысах.

Эксперимент *in vivo* проведен на пятнадцати (15) белых крысах - самках массой 170 — 200 г. Животные были разделены на 3 группы: 1 - интактные (здоровые) животные; 2 - животные с острой гипоксией (контрольные); 3 - крысы, получавшие образцы-экстракты № 3, 4. Образцы-экстракты № 3, 4 крысы получали 10 дней (0,5/100 г массы тела) до моделирования гипоксии. Модель острой гипоксии воспроизводили путем механического удушья продолжительностью 15 мин., предварительно интубировав трахею для реанимации после клинической смерти. Оставляли после реабилитации на один час, после чего производили забор крови и органов (мозг, печень, почки). Установлена, что острая гипоксия приводит к выраженным изменениям активности ферментов антиоксидантной системы организма. О состоянии ПОЛ судили по содержанию малонового диальдегида (МДА). Об антиоксидантной активности судили по изменению уровня каталазы в сыворотке крови и в гомогенатах тканей по методу М.А. Королюка (мозг, печень, почки).

Результаты исследований было выявлено, что в гомогенатах печени образец-экстракт № 3 снижает содержание МДА до $1,23 \pm 0,17$ мкмоль/л ($p > 0,001$) по сравнению с контролем $1,75 \pm 0,32$ мкмоль/л. И было выявлено, что в сыворотке крови экстракт № 4 снижает содержание МДА до $1,79 \pm 0,61$ мкмоль/л ($p > 0,001$) по

сравнению с контролем $5,19 \pm 1,22$ мкмоль/л в 3,4 раза. Также для образцов № 3, 4 выраженная закономерность имеет место в гомогенатах почки и мозга.

Таким образом, был проведен первичный биологический скрининг на антиоксидантную активность для препаратов из *Tamarix arceuthoides* Bge. В результате установлено, что образцы № 1-6. проявляют выраженное антиоксидантное свойство и могут быть использованы в качестве эффективного антиоксиданта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Флора Казахстана. - Алма-Ата: АН КазССР, 1963, т.6. - С.176-188.
 2. Султанова Н.А. Химическое исследование растений рода *Tamarix* - *T.hispida*, *T. ramosissima*. Автореф. дис. канд. Алматы, 2003.- 25 с.
 3. Sharma S.K., Parmar V.S. Novel constituents of *Tamarix* species //J. of Scien. and Indus Res., 1998.- Vol 57.- P. 873-890.
 4. Султанова Н.А., Абилов Ж.А., Омуркамзинова В.Б., Чаудри И.М. Флавоноиды из *Tamarix hispida* семейства *Tamaricaceae* // Хим. природ.соед., 2002.- № 1.- С.80.
 5. Умбетова А.К., Есиркегенова Ш.Ж., Чаудри И.М., Омуркамзинова В.Б., Абилов Ж.А. Флавоноиды растений рода *Tamarix* // Хим. природ.соед., 2004.- № 3.- С.250.
 6. Умбетова А.К., Чаудри И.М., Султанова Н.А., Бурашева Г.Ш., Абилов Ж.А. Флавоноиды растений рода *Tamarix* // Хим. природ.соед., 2005.- № 6.- С.600-601.
 7. Мынбаева Ж.Т., Султанова Н. А., Рахмадиева С.Б, Абилов Ж.А. Химическое исследование *Tamarix arceuthoides* Bge. // Вестник КазНУ им. аль-Фараби.Серия химическая. Алматы. 2005.
 8. Мынбаева Ж.Т., Султанова Н. А., Рахмадиева С.Б, Абилов Ж.А. Изучение amino-, феноло- и жирно- кислотных составов *Tamarix arceuthoides* Bge. // Вестник КазНУ им. аль-Фараби. Сер. хим. Алматы. 2005.№ 4 (40). С. 35-40.
 9. Пивоваренко В.Г., Тугамова А.В., Осинская Л.Ф., Холодова Ю.Д. Синтез и антиоксидантная активность изофлавонов, содержащих гидрофильные и липофильные заместители // Хим.-фарм. журнал.- 1997. №1. С.14-18
 10. Зайцев В.Г. Модель системы перекисного окисления липидов и их применение для оценки антиоксидантного действия лекарственных препаратов. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Волгоград. 2001, 139с.
-

НОВЫЙ ИЗОПРЕНОИД ИЗ REAUMURIA SOONGARICA

Мынбаева Ж.Т.¹, Абилов Ж.А.², Рахмадиева С.Б.¹, M. Igbal Choudhary³

¹ Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Астана, Республика Казахстан, факс (3172) 357451, zhanar_mynbayeva@mail.ru

² Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Республика Казахстан

³ International Center for Chemical and Biological Sciences, H.E.J. Research Institute of Chemistry, Dr. Panjwani Center for Molecular Medicine and Drug Research University of Karachi, Karachi, Pakistan

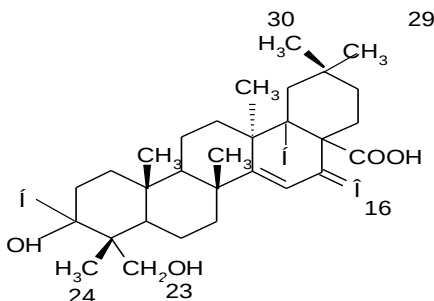
Наиболее ценными по - прежнему считаются вещества, выделенные из растений. Ведущее место среди природных соединений, используемых для создания высокоэффективных лекарственных препаратов, занимают полифенолы, дубильные вещества, флавоноиды, кумарины, полисахариды, аминокислоты, алкалоиды и соединения являющиеся вторичными метоболизма - изопрентоды. Несмотря на то, что для многих из них установлены состав, строение, разработаны методы синтеза, нами из растительного объекта был выделен и идентифицирован новый изопреноид. В связи с этим выявление новых источников биологически активных веществ - задача актуальна. И только целенаправленная работа по исследованию растительных объектов, выделению из них биологически активных веществ, исследование их химических свойств и биологической активности приведут к рациональному научно-обоснованному использованию сырьевой базы, которой является богатейшая флора Казахстан, насчитывающая более 6000 видов лекарственных растений.

Объект исследования: реомюрия джунгарская (*Reaumuria soongarica* (Pall.) Maxim.) рода *Reaumuria* L семейства *Tamaricaceae* LINDL. (Гребенщиковых).

Методы работы: обще принятые методики приведенные в Государственной Фармакопее XI издания; различные методы хроматографии; химические (кислотный гидролиз, щелочная деструкция, антоцианидиновая проба) и спектральные (ЯМР- ^1H , COSY, NOESY, HMBC, HMQC и J-resolved, ЯМР - ^{13}C ИК-, УФ-спектроскопия, атомно- абсорбционная спектроскопия).

Нами из водно-ацетонового экстракта последовательно экстрагированием водно-ацетонового экстракта хлороформом, этилацетатом и из хлороформной фракции адсорбционно-распределительной хроматографией на силикагеле был выделен

новый изопреноид - 3β, 23-дигидрокси-16-оксо- Д- фридоолеан - 14-ен- 28-диовой кислоты. В результате обширного литературного поиска сведений о данном веществе не имеется, соответственно данное соединение является новым ранее не описанным в литературных источниках.



ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ *COLURIA GEOIDES* (*ROSACEAE*)

Мяделец М.А.¹ Дутова С.В.²

¹ ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, тел. (383)334-44-68, e-mail: MarinaMyadelets@yandex.ru

² Хакасский государственный университет им. Н.Ф. Катанова, кафедра фундаментальной медицины и гигиены, Абакан, Россия, e-mail: coluria@mail.ru

Coluria geoides (Pall.) Ldb. (колюрия гравилатовидная) – многолетнее короткокорневищное травянистое растение сем. *Rosaceae*, гемизндемик Южной Сибири [1]. Известно как пряно-ароматическое и лекарственное растение. Это ценный эфиронос – заменитель гвоздичного дерева (*Eugenia caryophyllata* Thunb.), в корневищах растения накапливается эфирное масло, содержащее 96% эвгенола (эвгенол включен в отечественную фармакопею). Эфирное масло и водное извлечение из сырья *C. geoides* проявили выраженную антимикробную активнсть в отношении золотистого стафилококка и синегнойной палочки [2]. В связи с перспективностью использования *C. geoides* введена в культуру на территории Хакасии М.Н. Ворониной (2002) и в ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск) Г.П. Семеновой (2007). Химический состав данного

вида изучен недостаточно. Из биологически активных веществ (БАВ) обнаружены кумарины, дубильные вещества, полисахариды, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, незначительное количество сесквитерпеновых лактонов и полиацетиленовых соединений [3], а также эфирное масло, компонентный состав которого установлен [4].

Цель данной работы - исследование в сырье *C. geoides* содержания и состава фенольных соединений, так как это одна из самых значимых групп БАВ лекарственных растений,

В работе использовали сырье *C. geoides* L., собранное в фазе цветения на территории Республики Хакасия (Аскизский район, окр. оз. Баланкуль, караганово-злаково-осоковая луговая степь). Для хроматографического исследования использовали извлечения, полученные из воздушно-сухого сырья (надземная и подземная части *C. geoides*). Проводили исчерпывающую экстракцию 70 и 40%-м этанолом [5]. Фенольные соединения исследовали методами бумажной (БХ), тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии. Аналитическая ВЭЖХ-система, состояла из жидкостного хроматографа “Agilent 1200” с диодноматричным детектором и системы для сбора и обработки хроматографических данных ChemStation. Детектирование – при λ 360 (агликоны), 370 нм (гликозиды). Для идентификации фенольных соединений использовали стандартные образцы фенолокислот, кумаринов и флавоноидов. Критериями для идентификации являлись времена удерживания исследуемых веществ, УФ-спектры, базы данных и обзорные статьи по основным спектральным характеристикам природных соединений. Содержание компонентов вычисляли в % [6]. Количественное определение неидентифицированных соединений проводилось в пересчете на государственный стандартный образец (ГСО) кверцетина.

Для определения содержания флавонолгликозидов в образцах проводили анализ агликонов, образующихся после кислотного гидролиза соответствующих гликозидов.

Методом двумерной БХ в сырье *C. geoides* (надземная и подземная части) обнаружили не менее 17 веществ фенольной природы. В УФ свете большинство зон адсорбции имели желтую и светло-желтую окраску, характерную для флавонолов и их 7-гликозидов. Одно вещество имело желто-коричневую окраску, что характерно для флавонов, флавонол-3-гликозидов, флаванонов и халконов. Пять веществ проявились в виде зон адсорбции с голубой, фиолетовой, сине-фиолетовой, бирюзовой флюоресценцией. Подобную окраску могут давать кумарины,

фенолкарбоновые кислоты и некоторые флавоноиды (изофлавоны, флавон-5-гликозиды).

В результате анализа суммы кумаринов методом восходящей ТСХ после проявления 5% этанольным раствором гидроксида калия и диазореактивом было обнаружено семь веществ кумариновой природы.

Методом ВЭЖХ в выбранных условиях хроматографического разделения в сырье *C. geoides* было установлено наличие не менее 15 соединений фенольной природы (табл.), 6 из которых (соединения VIII, IX, протокатеховая, эллаговая кислоты, агликоны кверцетин и кемпферол) были обнаружены в экстрактах после кислотного гидролиза. В экстрактах, не подвергавшихся кислотному гидролизу, было отмечено 11 соединений. В подземных органах *C. geoides* выявлено только 7.

По времени удерживания стандартных веществ и УФ-спектрам 4 соединения были идентифицированы как гликозиды кверцетина, кемпферола, кумарин и галловая кислота, наличие которой подтверждено методом внутреннего стандарта.

Неидентифицированные компоненты (соединения I-VII) были зарегистрированы на длине волны 360, 370 нм, что позволяет отнести их к группе фенольных соединений. Соединения I, II имеют УФ-спектры, характерные для флавонов, флавонолов и веществ кумариновой природы [7]. Возможность определения других хроматографических пиков фенольных соединений образцов *C. geoides* была ограничена имеющимся в наличии набором индивидуальных фенольных соединений в качестве образцов сравнения.

Далее были проанализированы экстракты *C. geoides* после кислотного гидролиза. В результате выявлено еще 4 соединения. Из них идентифицированы протокатеховая и эллаговая кислоты. Неидентифицированные соединения VIII, IX можно отнести к фенолкарбоновым кислотам, так как их максимумы поглощения были зарегистрированы на длине волны 270 нм, а на 360, 370 нм пики этих соединений были отрицательными. Принадлежность к фенолкарбоновым кислотам подтверждают и полученные УФ-спектры. Кроме того, по времени удерживания и спектральным характеристикам соединение IX сходно с ГСО ванилиновой кислоты.

Сравнивая процентное содержание кверцетина и кемпферола и их гликозидов, следует отметить, что кверцетин в экстрактах *C. geoides* практически весь находится в связанном виде, а кемпферол большей частью в виде агликона.

Таблица

Характеристика и содержание фенольных соединений, обнаруженных в сырье *C. geoides*

Соединение	Время удерживания (t _R), мин	Спектральные данные λ _{max} , нм	Количественное содержание (% от массы абс.-сух. сырья)	
			Надземная часть	Подземная часть
Экстракты до кислотного гидролиза				
1. Галловая кислота	1,86	220, 280	10,13	0,15
2. Соединение I	4,47	250, 330	0,56	0,66
3. Соединение II	5,26	250, 320	0,29	0,18
4. Кумарин	13,52	215, 275	0,74	—*
5. Соединение III	18,52	215, 275	1,14	2,69
6. Соединение IV	22,26	220, 275	1,56	—
7. Соединение V	32,61	—	1,43	—
8. Соединение VI	35,85	—	0,91	0,11
9. Кверцетин	40,57	—	0,49	—
10. Соединение VII	43,99	—	0,12	0,17
11. Кемпферол	47,63	—	0,23	0,03
Экстракты после кислотного гидролиза				
12. Соединение VIII	1,37	220, 280	9,39	0,87
13. Протокатеховая кислота	1,75	210, 240, 280	1,51	1,22
14. Соединение IX	2,48	210, 250, 295	0,25	0,61
15. Эллаговая кислота	3,86	255, 370	5,26	1,01
16. Кверцетин	5,85	256, 370	0,42	0,24
17. Кемпферол	11,08	—	0,39	0,07

Примечание: “—” означает отсутствие соединения в исследуемом образце, либо спектральные данные соединения не получены.

Анализ состава фенольных соединений показал некоторые отличия в компонентном составе надземной и подземной частей *C. geoides*. Так, в надземной части обнаружено 15 фенольных соединений, из которых только 12 встречаются в подземных

органах. Сравнивая процентное содержание общих для них фенольных соединений, следует отметить, что в большем количестве они содержатся в надземной части *C. geoides*. Особенно четко это прослеживается на количественном содержании галловой и эллаговой кислот, кверцетина, кемпферола.

Таким образом, методом БХ в сырье *C. geoides* удалось выявить 17 веществ фенольной природы. Методом ТСХ суммы кумаринов из подземных органов *C. geoides* было обнаружено семь веществ кумариновой природы. С применением метода ВЭЖХ установлено наличие не менее 15 фенольных соединений, представленных фенолкарбоновыми кислотами, флавоноидами, веществами кумариновой природы. Идентифицированы галловая, протокатеховая и эллаговая кислоты, кумарин, агликоны кверцетин, кемпферол, гликозиды кверцетина и кемпферола. Фенольные соединения в данном растении идентифицированы впервые.

ЛИТЕРАТУРА

1. Флора Сибири. Rosaceae. Т. 8. Новосибирск, 1988. 200 с.
 2. Водолазова, С. В. Антимикробная активность эфирных масел и водных извлечений из лекарственных растений Хакасии / С. В. Водолазова, М. А. Мяделец, М. Р. Карпова и др. // Сибирский медицинский журнал. 2011. Т. 26.- №2. Вып. 2. С.54-58.
 3. Лекарственные растения Хакасии / Под ред. Водолазовой С.В. Абакан, 2011. 164 с.
 4. Водолазова С.В., Ткачев А.В. Антимикробные свойства и химический состав эфирного масла *Coluria geoides* (Pall.) Ldb. // Мат. I (IX) Межд. конф. мол. Ботаников в Санкт-Петербурге, 2006. С. 141.
 5. Высочина Г.И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишных. Новосибирск: Наука, 2004. 240 с.
 6. Храмова Е.П., Комаревцева Е.К. Изменчивость флавоноидного состава листьев *Potentilla fruticosa* (Rosaceae) разных возрастных состояний в условиях Горного Алтая // Раст. ресурсы. 2008. Т. 44. № 3. С. 96–102.
 7. Клышев Л.К., Бандюкова В.А., Алюкина Л.С. Флавоноиды растений (распространение, физико-химические свойства, методы исследования). Алма-Ата, 1978. 220 с.
-

НОВЫЙ ФИТОПРЕПАРАТ «ВИТИН» И ЕГО БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Назарова В.Д., Бектемисова А.У.

Северо-Казахстанский государственный университет им. М. Козыбаева
(СКГУ), Петропавловск, Казахстан, mail@nkzu.kz, abektemisova@mail.ru

Полное обеспечение населения медицинскими препаратами отечественного производства является одним из основных приоритетов социальной политики Правительства РК и действующей государственной программы импортозамещения. Успешное решение этой задачи тесно связано с освоением в лекарственном отношении природного богатства страны. Флора Казахстана является ценным источником для получения высокоэффективных фитопрепаратов широкого спектра действия, малотоксичных, не вызывающих аллергическую и кумулятивную реакцию [1].

Одним из наиболее оптимальных путей решения данной проблемы является организация производства препаратов из лекарственных растений. В настоящее время в Республике Казахстан уже активно разрабатывается целый ряд отечественных лекарственных средств растительного происхождения, которые прошли клинические испытания и зарегистрированы, например, противоопухолевый препарат «Арглабин», ранозаживляющая мазь «Биалм», противовоспалительное средство «Глидеринин», «Алхидин» и другие[2].

Лекарственное растение *Linosyris villosa* (грудница мохнатая) семейства сложноцветных широко произрастает на территории Северного Казахстана. В странах СНГ насчитывается их 6 видов. В Северном Казахстане произрастает 4 вида грудницы: татарская, прутьевидная, обыкновенная, мохнатая. Объектом нашего исследования является грудница мохнатая, которая издавна применяется в народной медицине при лечении бронхиальной астмы, желудочно-кишечного тракта и печени[3,4].

Грудница мохнатая – это многолетнее травянистое растение, химический состав которого изучается впервые. Фитохимическим анализом в сочетании с методом бумажной хроматографии, после проявления специфическими реагентами в водно-спиртовом экстракте обнаружили фенолокислоты, аминокислоты, углеводы, флавонолы и их гликозиды, минеральные вещества и в следах – дубильные вещества.

Методом адсорбционно – распределительной хроматографии

на полиамиде выделили кверцетин, рутин, мирицетин, кемпферол, которые идентифицировали физико-химическими методами анализа (щелочная деструкция, кислотный гидролиз, ИК-, УФ-спектроскопия), в сравнении с достоверными образцами [5].

Количественно определили сумму экстрактивных веществ (36,7%) в пересчете на абсолютно сухое сырье, углеводы (2,4%), (фотоколориметрический метод, антроновый реактив), аскорбиновую кислоту с помощью титрованного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (12,5мг%), фенолокислоты (2,33%), аминокислоты (0,075%), количество минеральных веществ (8,0%) и влажность сырья (6,0%). Одномерной бумажной хроматографией в сравнении с метчиками установили качественный состав грудницы мохнатой. В водно-спиртовом экстракте обнаружили присутствие моносахаридов: глюкозу, фруктозу, рамнозу и дисахарид-сахарозу. В качестве свободных аминокислот в экстракте присутствовали: серин, гистидин, треонин, пролин и амид-аспарагин. Из фенолокислот в экстракте обнаружили протекатеховую и галловую кислоты.

Из надземной части растения получили комплекс биологически активных веществ (субстанция «Витин»), который был изучен в лаборатории токсикологии Центра лекарственных средств на токсичность, раздражающее, заживляющее действия и на кровь. Анализ полученных данных свидетельствует, что комплекс биологически активных веществ «Витин» не токсичен. Исследование раствора «Витин» на раздражающее действие проведено на кроликах – альбиносах 160-ти дневных. Отмечено, что у животных во время исследования и сутки спустя, после эксперимента, покраснения, слезотечения, светобоязни не наблюдалось. Субстанция «Витин» была изучена на гнойных ранах. Исследование провели на коликах-альбиносах, которым были нанесены насечки нестерильным инструментом. Раны воспалились на 4-ый день. После обработки ран раствором «Витин» на 2-ой день прекратилось воспаление, на 5-ый день рана зажила. В контрольной группе заживление ран у животных завершилось на 10-11 день. Полученные результаты дают возможность предположить, что субстанция «Витин» стимулирует процесс заживления и обладает антисептическим действием [6].

Исследовали также влияние раствора «Витин» на периферическую кровь. Были взяты 3 группы кроликов одного возраста (160 дней). Первая группа кроликов имела пониженное содержание гемоглобина. Вторая группа имела нормальное содержание гемоглобина, а третья группа – контрольная с нормальным содержанием гемоглобина. Исследование проводили

в течении 45 дней. Первой и второй группе перорально вводили раствор «Витина» и вместо питьевой воды ставили раствор с «Витином». Контрольная группа получала обычную воду и содержалась в стандартных условиях. В результате проведенных исследований установили, что у кроликов первой группы (с пониженным содержанием гемоглобина) гемоглобин повысился в среднем на 13,0% и, после достижения нормального уровня, практически не повышался. У кроликов второй группы с нормальным содержанием гемоглобина) за 45 дней незначительно повысился уровень гемоглобина, что позволяет сделать предположение, что «Витин» стимулирует и нормализует кроветворение [4].

На базе травматолого-ортопедического отделения городской больницы скорой медицинской помощи г. Петропавловска проводили клинические исследования субстанции «Витин» при лечении гнойных и ожоговых ран конечностей. Эффективность субстанции оценивалось в комплексе клинических и бактериологических исследований. Клинические наблюдения показали, что субстанция «Витин» улучшает состояние больных и тканей пораженных участков без дополнительного использования других лекарственных средств. При этом нормализация индекса интоксикации наступала на 4-5 сутки. Микробиологические исследования показали высокие бактерицидные свойства раствора «Витин» [2].

Субстанцию «Витин» изучили на адаптогенную активность. Исследование проводили на белых мышах. В качестве ксенобиотика использовали фенол в дозе 10 ПДК, который приводил к включению ответных реакций адаптационного и дезадаптационного характера у животных. Препарат «Витин» на фоне хронической интоксикации фенолом оказал протекторное действие, уменьшив степень выраженности изменений системы крови, вегетосоматических показателей, а также адаптогенный эмбриозащитный эффект, проявившийся в уменьшении признаков задержки постэмбрионального развития [2].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кьюсев П.А. Полный справочник лекарственных растений. М.: Эксмо-Пресс, 2001. 571 с.
2. Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. Новосибирск.: ГЕО, 2007. 229 с.
3. Куркин В.А., Ламрини М. Флавоноиды цветков *LVANDULA SPICA* // Химия природ. соедин. 2007. №6. С. 582-583
4. Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Основы химии природных соединений. Алматы.: Қазақ университеті, 2010. С. 389-490
5. Введение в фитохимические исследования и выявления

биологической активности веществ растений / Под ред. Мамонова Л.К., Музычкиной Р.А. – Алматы.: Школа XXI века, 2008. - 215 с.

6. Т.П.Кукина, И.И.Баяндина Микроэлементы и биологически активные компоненты некоторых видов пихты // VI Всероссийская конференция «Химия и технология растительных веществ». Санкт-Петербург. 2010. С.57-59
-

ИЗВЛЕЧЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ И ФЛАВОНОИДОВ ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Никитина В.С., Абдуллин М.И.

Башкирский государственный университет, Уфа, Россия,
тел./факс:+7(347)2286255/+7(347)2286257; e-mail:nikvalent@mail.ru

Лекарственные средства растительного происхождения находят широкое применение в современной фармакотерапии. К ним можно отнести как химически чистые вещества и комплексы веществ, так и настойки, эликсиры, бальзамы и другие экстрактивные препараты. Важнейшими группами действующих биологически активных веществ, содержащихся в лекарственном растительном сырье, являются флавоноиды и полисахариды. Физиологически активные растительные полисахариды широко используются для лечения язвенной болезни, для выведения из организма солей тяжелых металлов и радионуклидов, обладают иммуномодулирующей активностью. Флавоноиды – это наиболее многочисленная группа как водорастворимых, так и липофильных природных фенольных соединений, часть флавоноидов относится к группе витамина Р, они обладают капилляроукрепляющим действием и антиоксидантной активностью [1-3]. В связи с высокой физиологической активностью растительных полисахаридов и флавоноидов изучение рациональных способов совместного их выделения из лекарственных растений имеет актуальное значение.

Целью данной работы являлось проведение сравнительного изучения выделения водорастворимых полисахаридов и флавоноидов из некоторых лекарственных растений - корней девясила высокого *Inula helenium* и одуванчика лекарственного *Taraxacum officiale* Wigg. , листьев эхинацеи *Echinacea* и стевии медовой *Stevia rebaudiana*.

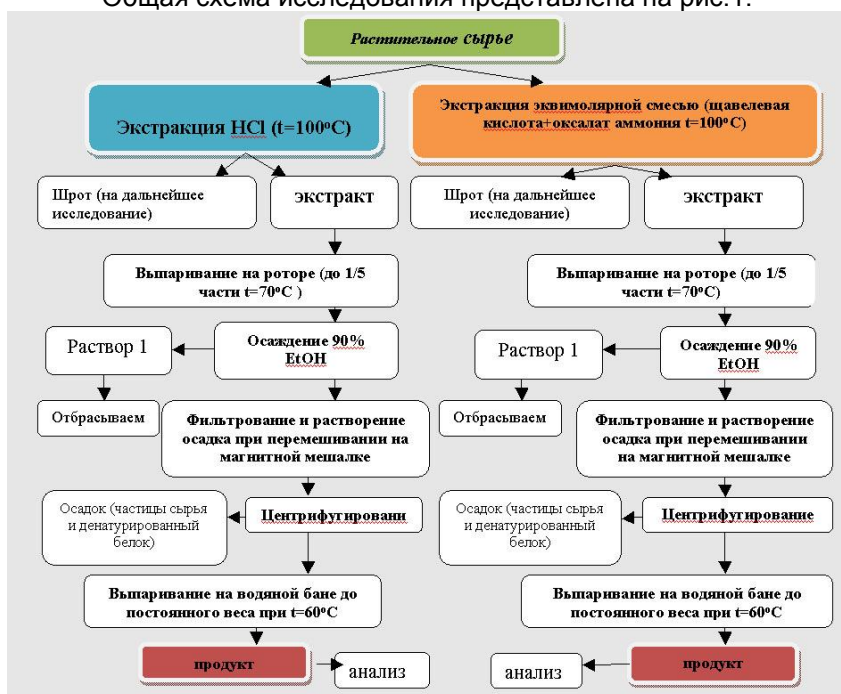
Анализ содержания полифруктанов осуществляли по известной из литературы методике на основе проведения колориметрической реакции полифруктанов с резорцином в

присутствии тиомочевины в пересчете на фруктозу [4,5]. Содержание растворимых полифенольных соединений и флавоноидов определяли методом спектрофотокolorиметрии по реакции комплексообразования флавоноидов с хлоридом алюминия в пересчете на рутин [6].

Таблица 1
Суммарное содержание полифруктанов, флавоноидов и каротиноидов в исходном растительном сырье

Вид и орган растения	Содержание		
	полифруктанов, % масс.	флавоноидов (по рутину) мг/г	каротиноидов, мг/г
листья стевии	9,4	2,98	5,56
листья эхинации	4,4	4,42	5,85
корни девясила	17, 0	1,58	4,00
корни одуванчика	2,7	2,30	4,50

Общая схема исследования представлена на рис. 1.



В таблице 1 приведены средние значения содержания полифруктанов, флавоноидов и каротиноидов в исходном

растительном сырье. По содержанию полифруктанов наблюдали наиболее высокое значение для корней девясила высокого, в корнях одуванчика их содержание в несколько раз меньше. В листьях наибольшее содержание полифруктанов обнаружено в стевии, в листьях эхинацеи их в два раза меньше. По уровню накопления флавоноидов- наибольшее количество в листьях эхинацеи.

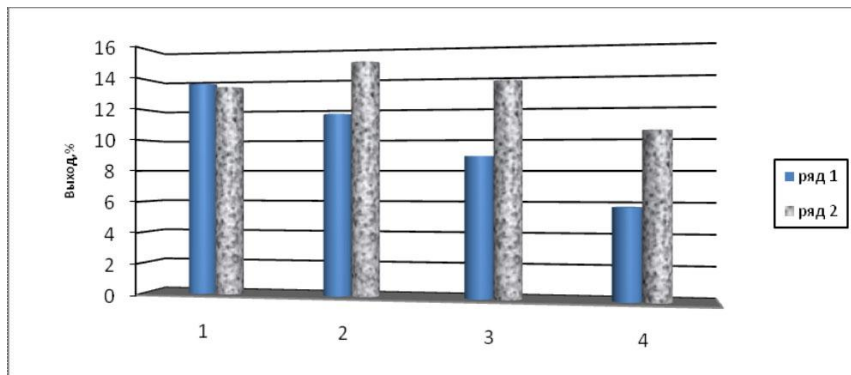


Рис. 2. Изменчивость выхода экстрактивных веществ в зависимости от качества растительного сырья и экстрагентов (ряд 1 - соляная кислота 0,5% раствор, ряд 2 – эквимольная смесь 0,5%-ных растворов оксалата аммония и щавелевой кислоты).

1 – корни девясила, 2 – корни одуванчика, 3 – листья стевии, 4 – листья эхинацеи.

Изменчивость выхода экстрактивных веществ в зависимости от качества растительного сырья и состава экстрагентов представлена на диаграмме, рис. 2. Как видно, при использовании 0,5%-ного раствора HCl ($pH=1,15$) выход экстрактивных веществ был на 3-5% ниже, чем при экстракции другим экстрагентом – эквимольной смесью оксалата аммония и щавелевой кислоты ($pH= 2,57$).

Выделенные экстракты полностью растворялись в воде при комнатной температуре, состояли из полисахаридов (93 -95%), флавоноидов (1,5-2%) и каротиноидов (около 1%).

Исследованные виды растений являются ценными сырьевыми источниками для получения растительных полифруктанов и флавоноидов с целью дальнейших поисковых работ по созданию новых фармпрепаратов. В связи с тем, что соотношение низко- и высокомолекулярных углеводов, а также соотношение флавоноидов-гликозидов и флавоноидов-агликонов

изменяются в зависимости от возраста растений, сроков вегетации и условий произрастания для каждого вида растений, необходима дополнительная работа по изучению изменчивости их содержания. Разносторонняя фармакологическая активность растительных полисахаридов и флавоноидов позволяет рассматривать полученные из соответствующего растительного сырья экстрактивные смеси биологически активных соединений как перспективные источники новых эффективных терапевтических средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Оводов Ю.С. Полисахариды цветковых растений: структура и физиологическая активность //Биоорганическая химия, 1998, т. 24. №7. с. 483-501.
2. Барабой В.А. Молекулярные основы биологического действия фенольных соединений.- В кн.: Биологическое действие растительных фенольных соединений. Киев, Наукова думка, 1976, с. 164-179.
3. Запрометов М.Н., Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях, М., 1993.
4. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Исследование колориметрической реакции инулина с резорцином в зависимости от условий ее проведения.// Химия растительного сырья . 2008. №1. с. 87–93.
5. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. Методика количественного определения суммарного содержания полифруктанов в корнях лопуха (*Arctium Spp.*).//Химия растительного сырья. 2010. №1. С. 115-120.
6. Кемертелидзе Э.П., Георгиевский В.П. Физико-химические методы анализа некоторых биологически активных веществ растительного происхождения. Тбилиси: Мецниереба, 1977. 223 с.

РАДИОЛИЗ И РАДИОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ДОННИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО И БАГУЛЬНИКА БОЛОТНОГО

Николаева В.В., Антропова И.Г.

РХТУ имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия, vali888@bk.ru

В наши дни всё больше внимания уделяется поиску лекарственных растений с выраженными антирадикальными свойствами.

В данном исследовании внимание было уделено изучению радиоллиза и радиопротекторной активности экстрактов лекарственных кумаринсодержащих растений - багульника болотного и донника лекарственного. Были использованы сухие

побеги багульника болотного и донника лекарственного. Считается, что препараты из донника лекарственного и багульника болотного могут помочь больным лучевой болезнью, они способствуют увеличению количества лейкоцитов в крови.

В работе использована спектрофотометрия для определения состава экстрактов, рН-ионметрия для определения радиопротекторной активности по выходу ионов калия из дрожжевых клеток расы Феодосия-7. Растворы облучали на установке РХМ-γ-20 при мощности поглощённой дозы 0.11 Гр/с по дозиметру Фрике.

Спектрофотометрически исследованы экстракты из лекарственных растений, полученных при использовании различных растворителей: диэтилового эфира, этилацетата, изопропанола и воды. В электронных спектрах экстракта багульника болотного в диэтиловом эфире полоса при 265 нм соответствует простому фенолам, при 310 нм – кумаринам, оксibenзойным кислотам, и полоса в видимой части спектра при 600-700 нм – принадлежит хлорофиллу. Показано, что выбранные растворители экстрагируют кумаринсодержащие активные вещества.

Известно, что в химии высоких энергий ионизирующее излучение используют как модельный источник окислительного стресса за счёт образования свободных радикалов. Спектральное сравнение радиационной чувствительности экстрактов из багульника болотного и донника лекарственного показало, что багульник болотный радиационно-стойкий в данных растворителях в аэрированных условиях, а донник лекарственный в диэтиловом эфире и этилацетате при дозе 1,2 кГр радиационночувствителен. Согласно спектральным данным чувствительность кумаринсодержащих экстрактов к ионизирующему излучению выше у донника лекарственного, чем у багульника болотного.

Оценка радиопротекторной активности показывает наличие защитных свойств у водных растворов кумаринов, выделенных из донника лекарственного и их отсутствие у кумаринов, выделенных из багульника болотного.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СТИЛЬБЕНОИДОВ С НЕОРГАНИЧЕСКИМИ КОМПОНЕНТАМИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Полунина И.А., Полунин К.Е., Дзарданов Д.В., Ларин А.В.

ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина
РАН, Москва, Россия, 8-495-955-46-9, e-mail: polunina@phychel.ac.ru

Гидроксипроизводные стильбена – стильбеноиды – являются представителями природных полифенольных соединений, которые содержатся в древесине хвойных деревьев, акаций, виноградной лозы, *Маакии амурской*, *Polygonum cuspidatum* и других лекарственных растений. Многие стильбеноиды, такие, как резвератрол, пицеатаннол, птеростильбен, рапонтигенин, являются фитоалексинами, т.е. растительными антибиотиками без вредных побочных эффектов. Они не проявляют иммунотоксического и аллергизирующего действия, их используют в традиционной медицине, вводят в состав БАДов и растительных лекарственных препаратов, например, «максар», «трансерол», «protykin».

Как растительные, так и синтетические стильбеноиды обладают комплексом ценных биохимических свойств – они оказывают противовоспалительное, кардио- и гепатопротекторное действие, проявляют антиоксидантные и антивирусные свойства, могут подавлять рост и развитие раковых клеток, ингибируют агрегацию и коагуляцию составных частей крови, действуют на метаболизм липопротеинов. В официальной медицине стильбеноиды (фолликулин, димэстрол, диэтилстильбэстрол, синэстрол и октэстрол) давно используются в гормонозаместительной терапии, поскольку проявляют гормональную активность.

В Фармакопее РФ стильбеноиды используются в качестве активных лекарственных компонентов различных порошков, таблеток, мазей и кремов. Иммобилизация стильбеноидов на поверхности биосовместимых неорганических наполнителей, используемых в фармацевтической и косметической промышленности, позволяет придать лекарственным дисперсиям новые полезные свойства, например, пролонгировать действие лекарственных веществ и защитить их от неблагоприятных внешних воздействий. Кроме того, введение пигментов и наполнителей придает таблетированным формам товарный вид, переносит место действия лекарства за пределы желудка, позволяет сохранять недостаточно устойчивые органические

соединения и сочетать несколько соединений в одной многослойной таблетке. Перспективны также таблетки с нерастворимым керамическим скелетом из оксида титана, фосфата кальция и других биосовместимых материалов, из которых вещество постепенно освобождается вымыванием.

Неорганические соединения, используемые в фармации, не всегда остаются индифферентными по отношению к физиологически активным лекарственным соединениям, хотя это всегда предполагается по умолчанию. Даже в отсутствии физического воздействия на дисперсную систему в виде ее перемешивания, нагревания, прессования, измельчения и т.п., компоненты дисперсии могут взаимодействовать между собой на межфазных границах, образуя молекулярные связи и комплексы разной степени прочности. Механохимическое или физическое воздействие, оказываемое на лекарственные дисперсии в ходе различных технологических процессов, активирует подобные межмолекулярные и химические взаимодействия на границах раздела фаз. В некоторых случаях такое взаимодействие даже стимулируется, например, при модифицировании поверхности керамических имплантатов нового поколения противовоспалительными препаратами, стимулирующими процессы регенерации. Главным требованием, предъявляемым к композиционным материалам медицинского назначения, является слабая связь между его компонентами, гарантирующая легкое высвобождение лекарственных веществ и сохранение их заявленной биологической активности.

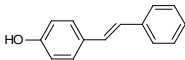
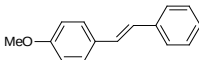
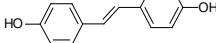
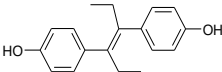
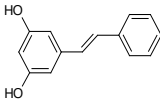
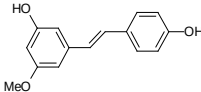
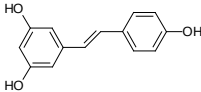
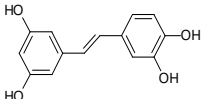
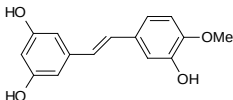
Известно, что многие фармакологически активные органические вещества одновременно проявляют повышенную химическую активность – легко вступают во взаимодействие с сорбентами и вспомогательными веществами, трансформируются на воздухе, разрушаются на свету, в тепле и т.п. Стильбеноиды, или производные 1,2-дифенилэтилена, имеющие в составе молекул активные функциональные группы (например, гидрокси- и метокси-группы) и π-сопряженную дифенилэтиленовую цепочку легко окисляются, изомеризируются, димеризуются и полимеризуются, проявляют термо- и фотохимическую активность, склонны к образованию водородных связей, ассоциатов и комплексов с ионами металлов, некоторые из них обладают нелинейно-оптическими свойствами. Таким образом, следует ожидать, что молекулы стильбеноидов будут взаимодействовать с другими компонентами лекарственных препаратов.

Целью данной работы было исследование взаимодействия синтетических гидрокси- и метоксипроизводных *транс*-стильбена,

полученных от фирмы Acrus (табл.1) с высокодисперсными непористыми аэрогелями оксидов кремния и титана, используемыми в фармацевтической промышленности: аэросил А-300 и TiO₂ Р-25 от фирмы Degussa.

Таблица 1.

Структура и свойства *транс*-стильбеноидов

Название	Структурная формула	Т.пл., °С
4-гидроксистильбен		195-196
4-метоксистильбен		134-135
4,4'-дигидроксистильбен (стильбэстрол)		288-289
α,α'-диэтил-4,4'-дигидроксистильбен (диэтилстильбэстрол)		169-171
3,5-дигидроксистильбен (пиносильвин)		157-158
3,4'-дигидрокси-5-метоксистильбен (пиносистильбен)		112-114
3,5,4'-тригидроксистильбен (резвератрол)		265-267
3,5,4',5'-тетрагидроксистильбен (пицеатаннол)		320-322
3,5,5'-тригидрокси-4'-метоксистильбен (рапонтигенин)		186-187

Адсорбционными методами, методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ТСХ и ВЭЖХ) с нормальными фазами, Фурье-ИК-спектроскопии диффузионного отражения и хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) было

установлено, что взаимодействие метоксистильтенов с оксидами кремния и титана является полностью обратимым и сопровождается образованием водородных связей с гидроксильными группами поверхности оксидов. Десорбирующиеся с поверхности сорбентов метоксистильтены проявляют те же физико-химические свойства и ту же биологическую активность, что и чистые вещества, т.е. не подвергаются биотрансформации в результате процессов адсорбции и десорбции.

Гидроксистильтены, по данным ИК-спектроскопии, способны не только к физическому, но и химическому взаимодействию с поверхностными ОН группами амфотерных оксидов титана и алюминия, а также координационному взаимодействию с координационно-ненасыщенными ионами этих металлов. Величина адсорбции гидроксистильтенов на оксидах увеличивается с увеличением количества функциональных ОН групп, однако существенно влияние на адсорбционное взаимодействие оказывает расположение ОН групп в структуре молекулы. Так адсорбция 4,4'-дигидроксистильтена несколько выше, чем адсорбция 3,5-дигидроксистильтена, содержащего 2 ОН группы в одном кольце, а адсорбция 3,4',5-тригидроксистильтена выше, чем адсорбция 3,4,4'-тригидроксистильтена, вследствие лучшего сопряжения полиеновой структуры стильтена с тремя электронодонорными ОН группами. Наличие алифатических заместителей при этиленовой связи диэтилстильбэстрола затрудняет реализацию эффекта сопряжения электронной системы стильтеноида, поэтому адсорбционное взаимодействие диэтилстильбэстрола с поверхностью оксидов значительно ниже, чем взаимодействие стильтэстрола. Обнаружено также, что наличие метоксигрупп в составе молекул пиностильтена и рапонтигенина практически не влияет на адсорбцию этих соединений, которая зависит только от количества и расположения ОН групп в их структуре.

При сравнении адсорбционных свойств гидроксистильтенов и гидроксibenзолов установлено, что адсорбция фенолов меньше, чем адсорбция стильтенов, однако в обоих случаях их адсорбция увеличивается с увеличением количества ОН групп. Влияние ароматического фрагмента молекул (фенила и 1,2-дифенилэтилена) проявляется таким образом, что хроматографическое удерживание гидроксистильтена на кремнеземе несколько больше, чем фенола, а удерживание флороглюцина больше, чем резвератрола, содержащего те же три ОН группы, но в разных бензольных кольцах. Однако адсорбционное поведение стильтеноидов довольно хорошо

моделируется с помощью гидроксибензолов, что позволяет проводить первоначальные поисковые исследования межфазных взаимодействий в композиционных материалах с помощью значительно более дешевых и доступных полифенолов.

Наиболее сильно гидроксистильбены взаимодействуют с поверхностью оксида титана, образуя окрашенные хиноидные соединения и поверхностные солеобразные формы. Методом ИК-спектроскопии обнаружен необратимый характер адсорбции гидроксистильбенов на оксиде титана, что приводит к неполной десорбции стильбеноидов с поверхности, их трансформации на поверхности оксида и утрате ими своей физиологической активности.

Методом хромато-масс-спектрометрии обнаружено также, что в результате воздействия солнечного света на *транс*-резвератрол, адсорбированный на аэросиле, появляется небольшое количество *цис*-резвератрола, тригидроксифенантрена, бензальдегида и гидроксипроизводных тетрафенилциклобутана. Последние вещества образуются в результате окисления, окислительной деструкции и каталитической полимеризации молекул стильбеноидов. Причем эти процессы существенно усиливаются в присутствии аэросила. Биологическая активность вновь образуемых соединений мало исследована, но в литературе имеются сведения о том, что *цис*-форма стильбеноидов не обладает полезными свойствами их *транс*-изомеров и даже может стимулировать развитие рака. Однако этот факт требует дополнительного подтверждения, т.к. *цис*-форма стильбеноидов в небольших количествах всегда присутствует в натуральных продуктах, состоящих из *транс*-изомеров. Фармакологическая активность других десорбированных соединений также мало исследована, поэтому их присутствие не желательно в лекарственных формах.

Таким образом, показано, что использование оксида титана в лекарственных формах на основе стильбеноидов допустимо только в случае использования метоксистильбенов и не желательно при использовании гидроксистильбенов, которые химически трансформируются на поверхности адсорбента и изменяют свою физиологическую активность. Аэросил является сравнительно индифферентным наполнителем, который может пролонгировать лекарственное действие стильбеноидов, разделив десорбцию гидрокси-, гидроксиметокси- и метоксипроизводных во времени. Одновременно использование аэросила повышает фотохимическую активность гидроксистильбенов и тем самым снижает сроки хранения лекарственных препаратов. Особенно

сильное дестабилизирующее действие на стильбеноиды оказывает оксид титана, обладающий собственной фотохимической активностью и способный поглощать ионизирующее излучение не только в УФ области, как стильбеноиды, но и в области видимого света.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты 12-08-01168 и 11-08-01083).

УДК 615.542;616-006.085

ПРЕПАРАТЫ ИЗ ТОПОЛЯ БАЛЬЗАМИЧЕСКОГО (*POPULUS BALZAMIFERA*), СОДЕРЖАЩИЕ ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ОПЫТ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В МЕДИЦИНЕ

Поляков В.В.¹, Адекенов С.М.², Альжанов А.Е.¹

¹Северо-Казахстанский государственный университет, Петропавловск, Казахстан, vpolyakov44@rambler.ru

²АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия», Караганда, Казахстан

В Северо-Казахстанском государственном университете совместно с АО «Международным научно-производственным холдингом «Фитохимия» и АО «Кызылмай» ведутся исследования по изучению химического состава растительного сырья Республики Казахстан с целью применения полученных из него препаратов в области медицины и сельского хозяйства. Из почек тополя бальзамического получен ряд эффективных препаратов, не уступающих и даже превосходящих по степени действия применяемых на практике лекарственных средств. Субстанция «Тополин» (промежуточный продукт, с выходом ~ 35%) получен баротермическим способом без использования органических растворителей (спирт, бензол, ацетон, эфир). Далее на основе субстанции получены следующие препараты: спиртовая настойка (для лечения пародонтита, стоматита), мазь (микозы, экзема, пиодермия), эфирное масло, лечебные сигареты (туберкулез), суппозитории (кольпит, эрозия, простатит), жевательная резинка (воспаление полости рта), лечебные сигареты, фибриновые пленки (новый перевязочный материал для хирургии), пищевые продукты (защита кроветворной системы от ионизирующего облучения; применимы в онкологии при облучении онкологических больных).

Густая субстанция, содержит: 30 терпеноидных соединений, 21 карбоновую кислоту, 17 жирных кислот, 14 флавоноидов – 6,78%

(пиностробин, пиноцембрин, тектохризин, хризин, апигенин и др.), 6 фенолокислот, 5 микроэлементов, 6 углеводов, 4 аминокислоты, витамины (А, С, Р, Е), простагландины и др. биологически активные соединения [1].

Экстракт тополя «Тополин», применяемый в виде 3%-го раствора перорально, обладает выраженным иммуномодулирующим действием, а также выраженной активностью по отношению пяти – тест штаммов, особенно *Staphylococcus* и *Bacillus Subtilis*, *Candida albicans* и *Echerichia coli* и *Ps. alruginea* [2].

На базе Областного противотуберкулезного диспансера г. Петропавловска проводились клинические испытания суппозиторий «КМ-Бальзамические» № 10 (экстракт тополя – 0,05 г, масло полифитовое «Кызыл май» 0,50 г., основа для суппозиторий до 1,86 г.) с целью исследования противовоспалительного, антимикробного действия в лечении бактериального хронического простатита [3]. Клинические исследования проводились у больных с туберкулезом мочеполовых органов в сочетании с простатитом. Применялись суппозитории «КМ-Бальзамические» № 10 ректально по 1 свече 2 раза в день в течение 10 дней. После лечения свечами отмечен клинический эффект – купирован дискомфорт при мочеиспускании, болевой синдром в промежности купирован на вторые, третьи сутки; больший эффект отмечен у больных с хроническим простатитом до 3-х лет и в возрасте до 40 лет.

Следовательно, лечение хронического простатита в сочетании с суппозиториями «КМ-Бальзамические» позволяет улучшить результаты лечения хронического простатита:

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что суппозитории «КМ-Бальзамические» являются высокоэффективным антимикробным препаратом в комплексном лечении хронического бактериального простатита и демонстрирует значительную активность в отношении грамотрицательных возбудителей, ответственных за развитие в предстательной железе бактериального воспаления.

Создание благоприятных условий для заживления гнойных ран открытых переломов длинных костей конечностей

Проводят вторичную хирургическую обработку гнойной раны открытого перелома. Из раны эвакуируют гнойное отделяемое, детрит, иссекают по возможности некротические ткани. Рану промывают антисептическими растворами. После тщательной санации на раневую поверхность накладывают поливиниловую пленку с лекарственной частью. Лекарственная часть выполнена в

виде плотного желеобразного брикета плоской конфигурации. Размеры лекарственной части также соизмеряется с размерами раны, а толщина колеблется от 2 до 5 мм в зависимости от анатомо-топографического расположения раны. Лекарственная часть обработана спиртовым экстрактом фитопрепарата «Тополин» [3, 4]. Края поливиниловой пленки фиксируются на коже, и поврежденная конечность укладывается в управляемую абактериальную среду. Перевязки в первые сутки осуществляются дважды, а в последующем один раз в 24 часа до получения клинического эффекта.

Радиопротекторное действие препарата «Тополин»

Препарат «Тополин» широко применяется в лечебной практике в области хирургии, травматологии, гинекологии, а также при лечении ожогов и обморожений, как ранозаживляющее, противовоспалительное и антибактериальное средство.

Опыты с «Тополином» проводились на 30 подопытных мышах-альбиносах, самцах, массой от 20,5-27,4 г, подвергшихся облучению в дозе 300 Гр за 105 секунд на аппарате Агат-с, в качестве радиоактивного элемента в установке используется кобальт-60 (^{60}Co) [5].

Результаты анализа крови мышей достоверно подтверждают количественное уменьшение лейкоцитов в крови облученных животных на 30% по сравнению с количеством лейкоцитов до облучения. В то же время, количество лейкоцитов в крови мышей, которым в пищу добавляли «Тополин», практически осталось неизменным. Количество эритроцитов во второй группе уменьшилось на 52%, в то время как в первой группе осталось в пределах нормы.

Методика лучевой терапии проводилась в стационарном режиме, т.е. разовая доза, подводимая на очаг, составляла 2 Грея. Суммарная очаговая доза, как правило, равнялась 60-65 Грей. В эксперименте участвовало 49 мужчин и 28 женщин в возрасте от 40 до 70 лет.

Группу контроля составили 38 больных с онкологической патологией, которые получали лучевую терапию без фитопрепарата «Тополин». Все больные имели гистологическое подтверждение диагноза рака. Средний возраст больных составил 60 лет.

Лучевая терапия с фитопрепаратом «Тополин» проведена с впервые установленным диагнозом рака у всех пациентов. Первая и вторая стадия опухолевого процесса диагностированы у 30 пациентов, а третья стадия у 47 больных. Все больные имели цитогистологическую верификацию плоскоклеточного рака.

Средний возраст больных составил 61 год.

В качестве радиопротекторного препарата применяли печень, содержащее 0,1% «Тополина» по массе без проявления побочного эффекта. На фоне проводимой дистанционной, гамма-терапии 77 больным при одновременном получении печени с содержанием «Тополина» мы наблюдали в 54 случаях рост уровня лейкоцитов до 70%. Несмотря на относительно низкий уровень лейкоцитов ($3,7-4,4 \cdot 10^9/\text{л}$) в начале лучевого лечения с приемом печени, содержащего в своем составе «Тополин», во всех случаях наблюдается стабилизация биохимических показателей и рост уровня лейкоцитов (до $7,8-10,3 \cdot 10^9/\text{л}$) без приема гемостимуляторов и гормональных препаратов.

Дистанционная гамма-терапия проводилась на аппарате «Рокус АМ» обычным фракционированием дозы по 2 Грея на первичную опухоль и области регионарного метастазирования в два этапа. На первом этапе суммарная очаговая доза равнялась 40 Грей, после которого следовал перерыв две недели до стихания лучевой реакции, и на втором этапе суммарную очаговую дозу доводили до 64-66 Грей.

Выраженной лейкопении при получении «Тополина» в качестве пищевой добавки в составе печени не наблюдали.

Таким образом, полученные результаты по применению в клинике отечественного фитопрепарата «Тополин» позволили отказаться от курса гормональной терапии и рекомендовать указанный препарат в практике лечения онкологических больных.

Препарат «Тополин» сочетает антимикробные, антиоксидантные, ранозаживляющие, гепатопротекторные, антигрибковые и других полезные фармакологические эффекты при низкой токсичности находит широкое применение в разнообразных направлениях медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Поляков В.В., Адеkenов С.М. Биологически активные соединения растений *Populus L.* и препараты на их основе. – Алматы: Гылым, 1999. – 160 с.
2. Джанузаков М.Б. Изучение иммунол. активности фитопрепарата «Тополин» при экспериментальном цистите // Астана мед. журнал. – 2002. – № 3. – С. 113-116
3. Оригинальные препараты из тополя бальзамического (*Populus balsamifera*) и опыт их применения в медицине / Под редакцией д.х.н., профессора В.В. Полякова. – Петропавловск, 2011. – 175 с.
4. Предпатент 19675 РК. Способ лечения и профилактика гнойных ран открытых переломов длинных костей / В.В. Поляков, Ш.А. Баймагамбетов, Е.Т. Жунусов [и др.]. - Зарегистрировано в Гос. реестре изобретений РК 22.05.2008; опубл. 15.07.2008, бюл. № 7. – 4 с.

-
5. Подгорная С.И., Поляков В.В., Казбекова А.Т., Сейтеметбетова А.Ж. Тополин – природный радиопротектор // Астана мед. журн. – 2008. – № 1. – С. 184-185.
-

УДК [631.563:634.21]:678.048

ДИНАМИКА ФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ХРАНЕНИИ ПЛОДОВ КАБАЧКА И ОГУРЦА С ПРИМЕНЕНИЕМ АНТИОКСИДАНТОВ

Присс О.П.

Таврический государственный агротехнологический университет,
Мелитополь, Украина, тел. +380503229450, e-mail: olesyapris@mail.ru

Большое количество исследований указывают на антиоксидантные свойства фенольных веществ растений, что является важным аргументом для увеличения доли плодов и овощей в питании человека [1-3]. Фенольные вещества также играют существенную роль и для поддержания иммунитета самого плода при его хранении. Однако при хранении плодов и овощей содержание этих соединений существенно уменьшается [4]. Поэтому проблема стабилизации содержания фенольных веществ при хранении плодоовощной продукции является актуальной.

Плоды огурцов и кабачков характеризуются невысоким уровнем фенольных веществ, в небольшом количестве содержатся кукурбитацины, лютеолин, кемпферол, кверцетин, феландрен, кариофиллен, фенольные кислоты -кофеиновая, ванилиновая, синрингиновая, феруловая, протокатехиновая, транс- Р-кумариновая [3-5].

Целью исследований было изучение влияния обработки антиоксидантными препаратами фенольного характера на динамику фенольных веществ в кабачках и огурцах при хранении.

Исследования проводились на кафедре технологии переработки и хранения продукции сельского хозяйства Таврического государственного агротехнологического университета в 2006-2011 годах. На хранение закладывали плоды огурцов гибрида Маша F1 двух размерных групп: длиной 9...11 и 11...14 см., плоды кабачков гибридов Кавили и Тамино F1 в технической степени зрелости длиной от 16 до 26 см. Для хранения отбирали плоды без механических повреждений, отвечающие требованиям стандартов.

Хранили плоды огурцов при температуре $8\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, кабачков

при температуре $7 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, относительная влажность $95 \pm 1\%$. В качестве контроля принимали необработанные плоды. Опытные варианты плодов обрабатывали комплексным антиоксидантным препаратом на основе водного экстракта хрена, дистилола, лецитина (Хр+Д+Л) [6]. Содержание полифенолов в препарате 112 ± 10 мг/100 г.

Сумму фенольных веществ определяли по ДСТУ 4373:2005, используя реактив Фолина-Дениса.

Гибрид кабачка Тамино имеет темно-зеленую окраску, и содержание фенольных веществ в этих плодах значительно выше, чем у белоплодного гибрида Кавили (табл.1).

Таблица 1.

Содержание фенольных веществ в плодах кабачка при хранении с использованием антиоксидантов, мг/100г.

Гибрид	Вариант	Период хранения, сутки				
		1	5	10	15	20
Кавили	контроль	4,68	15,48	16,44	24,64	29,16
	Хр+Д+Л		4,96	12,20	18,24	18,76
Тамино	контроль	7,15	10,55	16,37	17,70	24,60
	Хр+Д+Л		9,40	14,88	17,40	22,93

При хранении кабачков обоих гибридов содержание фенольных веществ постоянно возрастает. Как контрольные, так и опытные плоды стабильно накапливали полифенолы, и снижения их уровня не происходило даже при съеме с хранения. Такая особенность плодов кабачка объясняется образованием огрубевшей кожицы, содержащей лигнин и суберин [6]. Однако, плоды обработанные антиоксидантным комплексом демонстрируют снижение темпов накопления фенольных веществ.

Такая же зависимость отмечена и для плодов огурца размерной группы 11..14 см (табл. 2). В конце хранения количество полифенольных соединений превышает начальное значение практически вдвое. Применение антиоксидантной композиции также ингибирует накопление фенольных веществ.

Динамика фенольных веществ при хранении огурцов размером 9...11 см имеет совершенно противоположную направленность. Более мелкие плоды неспособны к дозреванию и уровень фенольных веществ в таких овощах от начала хранения снижается стремительными темпами. В плодах опытной группы темпы разрушения полифенолов замедляются.

Таблица 2.

Содержание фенольных веществ в плодах огурцов при хранении с использованием антиоксидантов, мг/100г

Длина плода	Вариант	Период хранения, сутки				
		1	5	10	15	20
9...11 см	контроль	27,02	17,40	10,56	5,88	2,81
	Хр+Д+ Л		23,25	21,17	14,34	12,15
11...14 см	контроль	15,55	21,65	22,69	24,84	28,40
	Хр+Д+ Л		18,74	21,36	23,12	24,82

В результате исследований выявлены закономерности в динамике фенольных соединений при хранении плодов кабачка и огурца с применением антиоксидантов. Использование комплексных антиоксидантов позволяет стабилизировать процессы накопления полифенолов в плодах кабачка и огурцов длиной более 11 см., и распада фенольных веществ в огурцах длиной до 11 см., что свидетельствует о замедлении процессов старения плода и возможности получения продукции высшего качества после хранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Scalbert Augustin. Polyphenols: antioxidants and beyond/Augustin Scalbert, Ian T Johnson, and Mike Saltmarsh//Am. J. Clinical Nutrition. – 2005. – vol. 81, no. –P. 215-217.
2. Yi-Fang Chu. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables / Yi-Fang Chu, Jie Sun, Xianzhong Wu, Rui Hai Liu // J. Agric. Food Chem. – 2002. –№ 50 (23). – P. 6910–6916.
3. Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants / Boskou Dimitrios //Trends in Food Science & Technology. – 2006. –№17. – P. 505–512.
4. Tomás-Barberan F.A. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing / Tomás-Barberan F.A., Ferreres F., Gil M.I. // J. Studies in Natural Products Chemistry. –2000. –vol. 23. Bioactive natural Products (Part D). –P. 739-795.
5. Chu, Y-H., Chang, C-L., and Hsu, H-F. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. J. Sci. Food Agric. –2000. –vol. 80. –P. 561-566.
6. Пат. 31090 UA, A23B 7/14. Спосіб підготовки ягід і плодових овочів до зберігання / В.В. Калитка, О.П. Прісс, М.Є. Сердюк, В.В. Коляденко, Т.Ф. Прокудіна, В.Ф. Жукова. – № и 2007 13185; заявл. 27.11.2007; опубл. 25.03.08; Бюл. № 6.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПОБЕГОВ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Рязанова Т.К., Куркин В.А.

ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, Самара, Россия, тел.:
89093441095, e-mail ryazantatyana@mail.ru

Фенольные соединения являются одними из основных продуктов вторичного метаболизма растений, обладающих различной фармакологической активностью. Из биологически активных фенольных соединений в растениях наиболее распространены флавоноиды, фенилпропаноиды (гидроксикоричные кислоты, спирты, флаволигнаны и др.), часто встречаются дубильные вещества. К растениям, являющимся богатым источником фенольных соединений, относится черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L., семейство Вересковые *Ericaceae*) [1]. Фармакопейным сырьем являются плоды и побеги черники обыкновенной [2]. В плодах черники в значительных количествах накапливаются дубильные вещества и наиболее уязвимые к различным неблагоприятным факторам окружающей среды антоцианы, с наличием которых связывают благотворное влияние препаратов на основе плодов черники при различных офтальмологических заболеваниях. Побеги черники содержат дубильные вещества, флавоноиды, фенилпропаноиды, простые фенолы [3]. Они используются в производстве противодиабетического сбора «Арфазетин-Э» [2].

Одной из актуальных проблем на данный момент является разработка объективных методик стандартизации лекарственного растительного сырья по содержанию действующих веществ. В настоящее время побеги черники анализируются по содержанию дубильных веществ, что, на наш взгляд, не может в полной мере характеризовать качество сырья. Однако известная для побегов фармакологическая активность (гипогликемическое, противовоспалительное действие, недавно выявленная ноотропная активность) в большей степени характерна для других групп фенольных соединений (флавоноидов, фенилпропаноидов) [1, 4].

В связи с этим целью настоящего исследования являлось изучение химического состава побегов и разработка методик стандартизации на основе полученных знаний.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использовали тонкослойную хроматографию (ТСХ), адсорбционную жидкостную колоночную хроматографию и метод спектроскопии в УФ- и видимой области спектра. В методе ТСХ разделение проводили на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ». Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena) в диапазоне длин волн 190-500 нм.

Объектом исследования являлись побеги черники обыкновенной, заготовленные в Пензенской области и Республике Марий Эл в 2010-2011 гг. Для дальнейшего изучения химического состава нами было получено извлечение из сырья методом дробной модифицированной мацерации на 70% спирте, который по предварительным оценкам на основании данных тонкослойной хроматографии позволяет извлекать весь комплекс биологически активных соединений (БАС) и обеспечивает наибольшую полноту экстракции. Полученное извлечение упаривали под вакуумом и наносили на сорбент силикагель L40/100. Разделение веществ проводили методом адсорбционной колоночной хроматографии на этом же сорбенте с использованием в качестве элюентов хлороформа, спирто-хлороформных смесей в различных соотношениях. Элюаты делили на фракции примерно равного объема (200 мл), которые затем упаривали под вакуумом. В дальнейшем для выделения индивидуальных веществ отдельные фракции рехроматографировали на полиамиде (Woelm) и силикагеле L40/100. Дополнительную очистку проводили перекристаллизацией из спирта и воды. Ход хроматографического разделения и очистки веществ контролировали методом тонкослойной хроматографии в системе *n*-бутанол - ледяная уксусная кислота - вода (4:1:2). Пятна на пластинке детектировали по свечению в УФ-свете при длине волны 254 и 366 нм и по окраске после обработки хроматограмм щелочным раствором диазобензолсульфокислоты.

Выделенные вещества были исследованы с помощью УФ-, ¹H-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, различных химических превращений, ТСХ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате колоночного хроматографического разделения нами были выделены вещества, которые предварительно идентифицированы как кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозид, кофейная кислота, даукостерин, упоминаемые в литературных источниках [3]. Кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозид является доминирующим флавоноидом по данным хроматографического

анализа в тонком слое сорбента. Его структура была подтверждена данными УФ-, ^1H -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, идентификацией агликона методом ТСХ в присутствии веществ-стандартов, а также характером сдвигов кривой поглощения после добавления различных реагентов (растворов натрия ацетата, кислоты борной, алюминия хлорида и др.).

Установлено, что вклад в кривую поглощения извлечения из побегов могут вносить кверцетин-3-О- β -D-ксилопиранозид, кофейная кислота и другие присутствующие в сырье фенольные соединения (рис. 1 и 2).

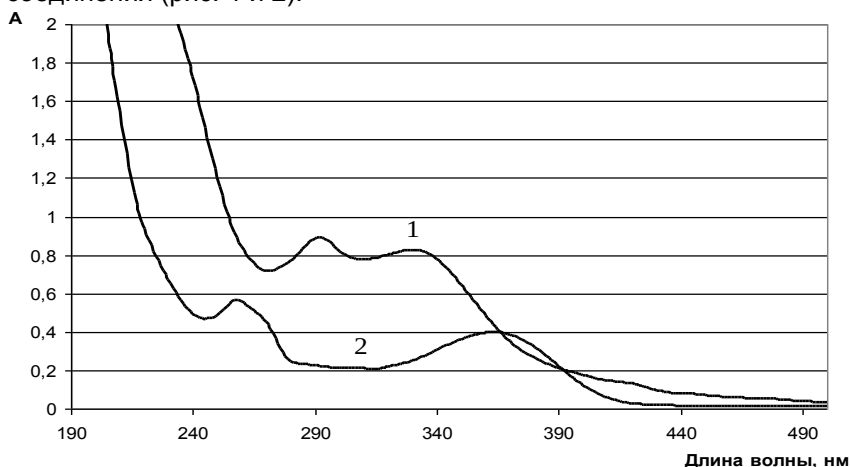


Рис. 1. Спектры поглощения извлечения на 70% спирте из побегов черники обыкновенной (1) и раствора кверцетин-3-О- β -D-ксилопиранозид (2).

Для качественного анализа побегов черники обыкновенной нами предложен метод ТСХ в системе растворителей этилацетат - безводная муравьиная кислота - вода (80:8:12), применяемая для побегов черники [5] и метод электронной спектроскопии в диапазоне длин волн 190-500 нм. Подлинность побегов черники подтверждается наличием на хроматографической пластинке пятен с R_s относительно пятна ГСО рутина 2,2-2,4 (доминирующий флавоноид - кверцетин-3-О- β -D-ксилопиранозид) и наличием максимумов поглощения извлечения при длинах волн 292 ± 2 нм и 331 ± 2 нм (рис. 1 и 2).

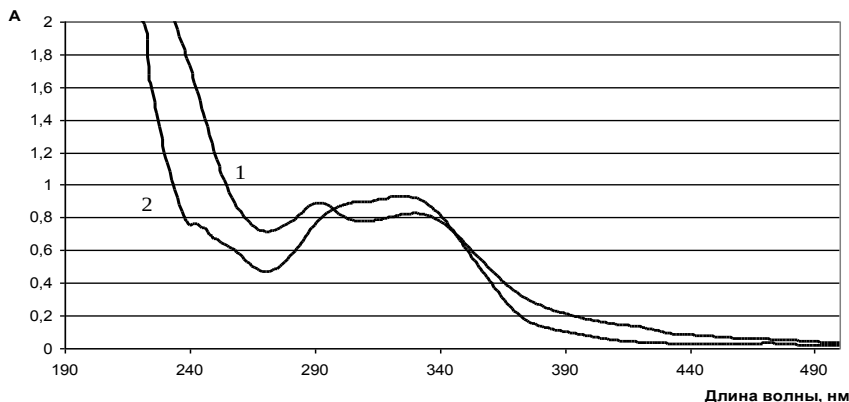


Рис. 2. Спектры поглощения извлечения на 70% спирте из побегов черники обыкновенной (1) и раствора кофейной кислоты (2).

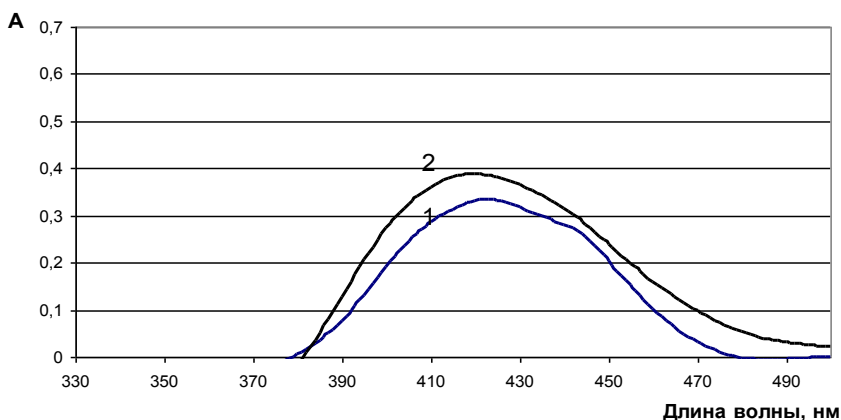


Рис. 3. Электронные спектры поглощения извлечения из побегов черники обыкновенной на 70% этиловом спирте с алюминия хлоридом на фоне исходного извлечения (1) и раствора кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозида с алюминия хлоридом на фоне исходного раствора кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозида (2).

Количественное определение содержания суммы флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии с алюминия хлоридом в пересчете на рутин. Для оптимизации подходов к стандартизации флавоноидов в побегах черники обыкновенной нами сравнивалась экстракционная способность водно-спиртовых смесей различных концентраций; влияние времени экстракции и соотношения «сырье : экстрагент»

на полноту извлечения действующих веществ. Расчет проводили при аналитической длине волны 420 нм, соответствующей максимальной разнице оптических плотностей извлечения после добавления алюминия хлорида и исходного извлечения (рис. 3). Эта же длина волны близка к максимуму поглощения кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозид с алюминия хлоридом на фоне исходного раствора кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозид (рис. 3).

В ходе исследования было установлено, что оптимальным экстрагентом является 70% этиловый спирт, позволяющий наиболее полно извлечь флавоноиды из сырья по сравнению с другими концентрациями; оптимальным является соотношение «сырье – экстрагент» - 1:50; время экстракции - 30 мин после закипания экстрагента на кипящей водяной бане. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в побегах черники при использовании данной методики составляет ±3,56% (с доверительной вероятностью 95%). Содержание флавоноидов варьировало от 0,62% до 1,02% в пересчете на рутин.

Таким образом, в ходе исследования были выделены вещества побегов черники обыкновенной: кверцетин-3-О-β-D-ксилопиранозид, кофейная кислота. На основании полученных данных были обоснованы подходы к стандартизации сырья по содержанию флавоноидов. Предложены методы качественного анализа, заключающиеся в использовании при идентификации побегов тонкослойной хроматографии в присутствии стандартного образца рутина и электронной спектроскопии. Количественное определение предложено проводить по содержанию флавоноидов как наиболее лабильной группы БАС методом дифференциальной спектрофотометрии с алюминия хлоридом при длине волны 420 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Куркин Фармакогнозия, изд. 2-е, перераб. и доп. Самара: ООО «Офорт», ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2007. 1239 с.
2. Государственный реестр лекарственных средств // Мин-во здравоохранения и социального развития Российской Федерации. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/default.aspx> (дата обращения: 10.02.2012 г.)
3. Zushang, Su. Anthocyanins and Flavonoids of Vaccinium L. // Pharmaceutical Crops. 2012. V. 3. P. 7-37.
4. И.В. Шилова, Н.И. Суслов, И.А. Самылина. Химический состав и ноотропная активность растений. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2010. 236 с.
5. ФСП 42-8635-07 «Черники обыкновенной побегов» (ОАО «Красногорсклексредства»).

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА СОКОВ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ КАЛАНХОЕ

Сажина Н.Н.¹, Лапшин П.В.², Загоскина Н.В.²

¹Институт биохимической физики им Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия,
8(495)9397318, e-mail: Natnik48s@yandex.ru

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия,
8(499)9779433, e-mail: phenolic@ippras.ru

Род Каланхоэ (*Kalanchoe* Adans.) насчитывает около 130 различных видов. Эти растения широко культивируются по всему миру. Представители рода Каланхоэ - суккулентные растения с сочными водозапасающими листьями разнообразной формы. Широко используются как декоративные, но некоторые виды применяются и в лечебных целях, т.к. в их листьях содержатся полезные минеральные соли, органические кислоты и различные полифенольные соединения [1, 2]. Образование и накопление этих соединений в процессе вторичного метаболизма зависит от многочисленных факторов окружающей среды и от генетических особенностей растений. Фенольные соединения обуславливают, главным образом, биологическую, в том числе и антиоксидантную, активность (АОА) того или иного вида растения, то есть способность его компонентов ингибировать окислительные свободнорадикальные процессы. Особенно хорошо изучены в настоящее время биохимический состав и целебные свойства соков и экстрактов двух видов: Каланхоэ перистое (*Kalanchoe pinnata*) и Каланхоэ дегремона (*Kalanchoe daigremontiana*) [1-3]. Однако результатов целенаправленных научных исследований антиоксидантных свойств этих и других видов каланхоэ практически нет [4,5].

В настоящей работе проведен сравнительный анализ результатов измерений АОА соков различных видов каланхоэ тремя методами: амперометрическим, вольтамперометрическим и хемилюминесцентным с целью выявления среди них наиболее активных продуцентов биологически активных соединений. Объектами исследования явились 34 представителя рода Каланхоэ (*Kalanchoe* L.), выращиваемые в коллекции суккулентов в Институте физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН в Москве в условиях оранжереи при естественном освещении. Соки были выжаты из листьев этих растений, хранились в холодильнике при температуре -12⁰С, а для измерений размораживались до комнатной температуры.

Амперометрический метод, реализованный в приборе «Цвет-Яуза-01-АА», позволяет определить суммарную активность АО фенольной природы [6]. Сущность его заключается в измерении электрического тока, возникающего при окислении исследуемого вещества на поверхности рабочего электрода при величине электрического потенциала 0 – 1,3 В. При таких значениях потенциала происходит окисление –ОН групп природных фенольных АО (R–ОН). Электрохимическое окисление, протекающее по схеме $R-OH \rightarrow R-O^{\bullet} + e^{-} + H^{+}$, может быть использовано, по предположению авторов [7], как модельное при измерении активности поглощения свободных радикалов. Захват свободных радикалов осуществляется в соответствии с реакцией $R-OH \rightarrow R-O^{\bullet} + H^{\bullet}$. В этом случае способность к захвату свободных радикалов фенольными соединениями может измеряться величиной их окисляемости на рабочем электроде амперометрической ячейки [6, 7]. При прохождении пробы через ячейку регистрируется ток электрохимического окисления АО, который сравнивается с током, полученным в тех же условиях для эталонного образца с известной концентрацией (галловой кислотой ГК). Суммарная активность фенольных АО, степенью которой служит площадь под кривой тока окисления, определяется по калибровочной зависимости окисляемости ГК от ее концентрации, т.е. в единицах содержания ГК. Погрешность измерения величины АОА (или суммарного содержания АО в мг/л ГК) с учетом воспроизводимости результатов составила 10%.

В вольтамперометрическом методе [8] в качестве модельной реакции используется процесс электровосстановления кислорода (ЭВ O_2) на ртутно-пленочном электроде, идущий по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в живых клетках, а за критерий АОА исследуемых образцов принимается величина А, отражающая концентрацию кислорода и его активных радикалов ($O_2^{\bullet-}$, $HO_2^{\bullet}$), прореагировавших с АО в процессе ЭВ O_2 : $A = C_0(1 - I/I_0)$, где I, I_0 – максимальные токи ЭВ O_2 в присутствии I и в отсутствие I_0 АО в растворе, C_0 — исходная концентрация кислорода (мкмоль/л) [8]. Для каждого образца было проведено 3-4 замера, и результаты усреднялись. Среднеквадратичное отклонение А от среднего значения для всех исследованных образцов составило не более 30%.

В хемилюминесцентном (ХЛ) методе измерения АОА использовалась схема окисления системы «гемоглобин - пероксид водорода - люминол» [9]. Отличительной особенностью этой системы от других окислительных систем является то, что образующиеся в ней радикалы могут инициировать

свободнорадикальные реакции *in vivo*. Взаимодействие H_2O_2 с метHb сопровождается разрушением гема и выходом из него ионов железа, которое участвует в образовании $\text{OH}^\bullet$. Кроме того, в результате этого взаимодействия образуются еще феррил-радикалы ($\text{Hb}(\bullet)-\text{Fe}^{4+}=\text{O}$). Образующиеся радикалы инициируют окисление люминола, в процессе которого образуется эндопероксид люминола LO_2^{2-} , а далее 3-аминофталат дианион в возбужденном состоянии $(\text{AP}^{2-})^*$, при переходе которого в основное состояние высвечивается квант света с длиной волны 425 нм.

Таблица 1.

Суммарная АОА проб соков Каланхое, измеренная амперометрическим методом

№ пробы	Видовое название Каланхое	Ампером. С, мг/л ГК	№ пробы	Видовое название Каланхое	Ампером. С, мг/л ГК
1	<i>K.pinnata</i>	294	17	<i>K.gastonis-bonnierei</i>	403
2	<i>K.beauverdii</i>	730	18	<i>K.millotii</i>	1070
3	<i>K.orgyalis</i>	393	19	<i>K.fedtschenkoii</i>	604
4	<i>K.imperialis</i>	878	20	<i>K.serrata</i>	383
5	<i>K.tomentosa</i>	593	21	<i>K.rhombopilosa</i>	1911
6	<i>K.daigremontiana</i>	550	22	<i>K.kalandiva</i>	505
7	<i>K.thyrsiflora</i>	220	23	<i>K.laciniata</i>	358
8	<i>K.hildebrandtii</i>	1265	24	<i>K.tubiflora</i>	423
9	<i>K.velutina</i>	545	25	<i>K.longiflora</i>	330
10	<i>K.beharensis v.aureo-aeneus</i>	368	26	<i>K.bracteata</i>	265
11	<i>K.scapigera</i>	1981	27	<i>K.crenata</i>	380
12	<i>K.citrina</i>	328	28	<i>K.nyikae</i>	514
13	<i>K.X kewensis</i>	301	29	<i>K.sedoides</i>	342
14	<i>K.serratifolia</i>	355	30	<i>K.blossfeldiana</i>	205
15	<i>K.germanae</i>	321	31	<i>K.blossfeldiana mini</i>	278
16	<i>K.syncephala</i>	247	32	<i>K.laetivirens</i>	186
17	<i>K.gastonis-bonnierei</i>	403	33	<i>K.figuereidoi</i>	505
			34	<i>K.pubescens</i>	388

Введение в систему Hb-H₂O₂-люминол антиоксиданта приводило к изменению кинетики ее ХЛ и увеличению латентного периода t , который увеличивался прямо пропорционально концентрации добавляемого АО [9]. Для реализации данного метода в настоящей работе был использован прибор «Lum-5773».

За критерий АОА исследуемых образцов принималось значение тангенса угла наклона прямой (k , мкг^{-1}), описывающей зависимость относительного латентного периода (t/t_0) ХЛ свечения от массы образца (m , мкг), вводимой в ХЛ ячейку: $t/t_0 = km + 1$, t_0 - латентный период в отсутствие образца. Погрешность измерения АОА данным методом с учетом повторяемости результатов составила 15%.

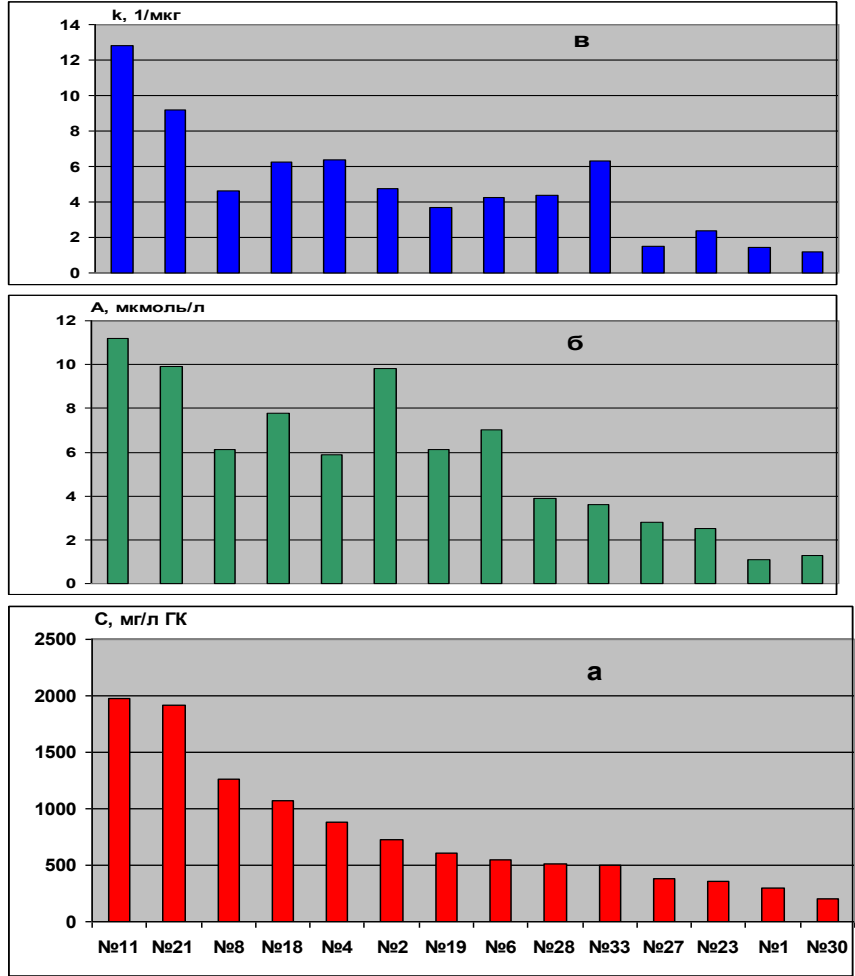


Рис.1: 1а – суммарная активность (С) фенольных АО в соках Каланхое (амперометрический метод), 1б – суммарная активность (А) соков к кислороду и его радикалам (вольтамперометрический метод), 1в – АОА соков (k) - (ХЛ метод)

В таблице 1 представлены результаты измерений

суммарной АОА фенольных антиоксидантов амперометрическим методом для 34 образцов соков Каланхое. Наибольшей активностью обладают соки таких видов Каланхое, как *K.scapigera* - №11 и *K.rhombopilosa* - №21 (1981 и 1911 мг/л ГК, соответственно), наименьшей – соки *K.blossfeldiana* и *K.laetivirens* (205 и 186 мг/л ГК). Наиболее распространенные и изученные виды Каланхое, такие как *K.pinnata* и *K.daigremontiana* показали относительно низкие относительно других видов уровни накопления и активности фенольных АО (294 и 550 мг/л ГК, соответственно).

Для сопоставления результатов измерений АОА образцов соков Каланхое, представленных в таблице, с результатами других методов были выбраны 14 образцов, имеющих разный спектр значений С (в таблице они выделены). На рис. 1а приведена диаграмма значений АОА для выделенных образцов соков, построенная в порядке убывания С. Рис. 1б представляет результаты измерений активности этих образцов по отношению к кислороду и его радикалам в процессе ЭВ O_2 (А, мкмоль/л), полученные вольтамперометрическим методом. Монотонность убывания АОА нарушают образцы №18, №2, №19, №6, демонстрируя достаточно высокие значения АОА. Коэффициент корреляции результатов, полученных этими методами, составил $r=0,83$. На рис.1в приведены результаты измерений степени ингибирования окисления системы «Hb-H₂O₂-люминол» указанными соками Каланхое ХЛ методом (к, мкг⁻¹). Видно, что монотонность уменьшения активности на этой диаграмме несколько лучше, чем на рис.1б, а корреляция с амперометрическим методом выше и составила $r=0,89$. Меньшее значение имеет коэффициент корреляции между результатами вольтамперометрического и ХЛ методов ($r=0,81$).

Выводом из настоящей работы является тот факт, что все три метода демонстрируют значительно более высокую активность не двух популярными и широко используемыми в лечебных целях представителей рода Каланхое: *K.pinnata* и *K.daigremontiana* (№1, 6);, а двух других видов, которые до сих пор имели только декоративную ценность: это *K.scapigera* и *K.rhombopilosa*. Первое это довольно крупное и выносливое растение, быстро формирующее большую биомассу. Для расширения возможности использования указанных видов Каланхое как источников биологически активных соединений необходимо проведение дополнительных исследований соков этих растений на предмет изучения их биохимического состава, а также антибактериальных, противомикробных, фиторегулирующих и других свойств компонентов этих растений. Возможно, они окажутся более

перспективными и для использования их в медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волжанова М.И. и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2010, N7, с. 14-20.
2. Волжанова М.И., Суслина С.Н., Быков В.А. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2011, N8, с3-6.
3. Анисимов М.М., Герасименко Н.И., Чайкина Е.Л., Серебряков Ю.М. // Известия РАН. Серия биологическая, 2009, №6, с.669-676
4. Мисин В.М., Сажина Н.Н., Вандышев В.В. и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, 2010, №12, с. 1-5
5. Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н. и др. // Химия растительного сырья, 2008, №4, с. 95-100
6. Яшин А.Я. Рос. хим. журн. – 2008. – Т. LII, № 2. – С. 130-135.
7. Peyrat-Maillard M.N, Bonnely S., Berset C. // Talanta. 2000. V. 51. P. 709-715.
8. Korotkova E.I., Karbainov Y.A., Avramchik O.A. // Anal. and Bioanal. Chem. 2003. V. 375. №. 1-3. P. 465-468
9. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б. и др. // Вопр. мед. химии, 1998. Т. 44, №1. С. 70-76.

УДК [631.56:634.22]:678.048

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ РУТИНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ АДАПТОСТАТУСА ПЛОДОВ СЛИВЫ ПРИ ХРАНЕНИИ

Сердюк М.Е., Гогунская П.В.

Таврический государственный агротехнологический университет,
Мелитополь, Украина, тел.:+380671633371, igorserduk@mail.ru

В последние годы в Украине сложилась неблагоприятная экологическая ситуация, обусловленная необычными климатическими аномалиями и чрезмерным использованием синтетических средств защиты плодовых растений. На фоне загрязнения окружающей среды химическими агентами, растениям все труднее становится преодолеть негативные последствия биотических и абиотических стрессов. Действие стресс-факторов интенсифицирует обменные процессы, происходящие в плодах, наблюдается высокий расход тканевых биологически активных веществ, в результате чего снижается качество продукции и ее лежкоспособность [1].

Одним из негативных последствий этих процессов является

образование свободных радикалов. Из литературных источников известно, что свободные радикалы являются чрезвычайно активными соединениями, возникающими в процессе жизнедеятельности организма, а также вследствие воздействия неблагоприятных факторов окружающей среды. Такие молекулы стремятся забрать электрон у других "полноценных молекул", вследствие чего "пострадавшая молекула" сама становится свободным радикалом - развивается разрушительная цепная реакция, которая негативно действует на живую клетку. Проявляется это негативное действие в быстром старении растительного организма, провокации неправильного функционирования различных систем организма и в повреждении клеточных мембран. В научной литературе этот процесс называется перекисным окислением липидов, а результат разрушительного действия - оксидативным стрессом [1].

Обычно здоровый растительный организм сам справляется со свободными радикалами, возникающими в процессе естественного метаболизма клеток. Однако неблагоприятные агроклиматические условия нарушают механизмы устойчивости растений и возникают ситуации, когда защитные силы организма уже не в состоянии нейтрализовать избыток агрессивных частиц [2]. Поэтому повышение устойчивости плодов к негативному воздействию биотических факторов, основанное на активизации естественных механизмов устойчивости с помощью экзогенных обработок антиоксидантами является актуальным.

Многие авторы предлагают использовать с этой целью антиоксидантные композиции, в состав которых входят фенольные соединения [3,4]. Известно, что фенольные соединения играют активную физиологическую роль в растительном организме. Их окислительно-восстановительный потенциал показывает, что они активно участвуют в обмене веществ, будучи субстратами оксидаз. Фенольные соединения, главным образом в восстановленной форме, выполняют функции дыхательных катализаторов и участвуют в окислительно-восстановительных процессах при дыхании растительной клетки. Практически все фенольные соединения обладают высокой антиоксидантной активностью и являются главными регуляторами внутриклеточных ферментативных и не ферментативных свободнорадикальных процессов [5].

Целью наших исследований было исследование влияния антиоксидантной композиции на качество и лежкоспособность плодов.

В состав исследуемой композиции входят такие известные

антиоксиданты, как аскорбиновая кислота и лецитин. Фенольные вещества представлены рутином. По данным А.Я. Герчикова [6], природный рутин проявляет свойства как эффективного акцептора пероксильных радикалов, так и активного гасителя синглетного кислорода. Он увеличивает депонирование аскорбиновой кислоты в тканях и является ее синергистом.

Исследования проводились в 2008-2011 годах на базе лаборатории «Технология первичной переработки и хранения продукции растениеводства» НИИ «Агротехнологий и экологии» Таврического государственного агротехнологического университета г. Мелитополя и ДПДГ «Мелитопольское», Мелитопольского района, Запорожской области. Объектами исследований были выбраны плоды районированных в южной Степной зоне Украины сортов сливы Волошка и Венгерка итальянская. На хранение закладывались плоды технической степени зрелости. Товарную обработку проводили при сборе, выделяя целые, крепкие, чистые, не пораженные плоды и удаляя нестандартные экземпляры. Обработку плодов антиоксидантной композицией проводили в хранилище путем погружения их в свежеприготовленные рабочие растворы. Время экспозиции 10 секунд. Хранили плоды сливы в холодильной камере при температуре 0 ± 1 °C и относительной влажности воздуха 95%. Повторность опыта пятикратная.

Результаты хранения плодов сливы (средние данные 2008 – 2011 г.г.) с применением антиоксидантной композиции аскорутин – лецитин (АКРЛ) приведены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1

Динамика содержания эндогенных антиоксидантов при хранении плодов сливы с применением антиоксидантной композиции АКРЛ

Сорт	Вариант опыта	Срок хранения, сутки	Содержание витамина С, мг/100г		Сумма фенольных веществ, мг/100г	
			начало хранения	конец хранения	начало хранения	конец хранения
Волошка	контроль	30	8,70±0,01	5,36±0,07	264,61±0,01	186,12±0,15
	АКРЛ	70	8,70±0,01	7,33±0,03	264,61±0,01	215,12±0,31
Венгерка итальянская	контроль	40	7,51±0,05	5,06±0,01	246,17±0,23	196,32±0,61
	АКРЛ	90	7,51±0,05	6,89±0,02	246,17±0,23	223,21±0,52

Экспериментальные данные, приведенные в таблице 1, свидетельствуют о том, что послеуборочная обработка плодов сливы антиоксидантной композицией АКРЛ снижает темпы разрушения эндогенных антиоксидантов в процессе хранения. Так, на конец хранения потери витамина С у плодов сливы сорта Волошка были в 2,5 раза ниже, чем плодов контрольного варианта,

а у плодов сливы сорта Венгерка итальянская, соответственно, в 4 раза. Что касается фенольных веществ, то их потери были в 1,7 раза для сорта Волошка и 2,2 раза для сорта Венгерка итальянская ниже чем в плодах контрольных вариантов. Существует теория, которая объясняет биологические эффекты полифенолов растений их функциональной связью с аскорбиновой кислотой.

Таблица 2

Товарные качества плодов сливы при хранении с применением антиоксидантной композиции АКРЛ

Сорт	Вариант опыта	Срок хранения, сутки	Выход стандартной продукции, %	Технический брак, %	Абсолютный отход, %	Убыль массы, %
Волошка	контроль	30	82,99±2,12	10,42±0,67	1,1±0,34	5,49±0,09
	АКРЛ	70	94,74±0,27	1,25±0,38	0,51±0,56	3,50±0,12
Венгерка итальянская	контроль	40	85,3±0,56	6,35±0,09	2,1±0,13	6,25±0,21
	АКРЛ	90	94,77±0,34	0,31±0,04	0,81±0,07	4,11±0,28

Эта теория рассматривает основные проявления действия полифенолов, как результат стабилизации ими аскорбиновой кислоты, что обеспечивает накопление ее в органах. В растении фенолы и аскорбиновая кислота содержатся вместе и функционируют в единой антиоксидантной системе защиты организма. Участие в неферментативной регуляции обмена веществ - основное свойство этих веществ, при недостатке которых возникают сложные нарушения в редокс-цепи дыхательного газообмена [3]. Таким образом, обработка плодов антиоксидантной композицией АКРЛ, способствует торможению окислительно-восстановительных процессов, регулируя неферментативные и ферментативные системы антиоксидантной защиты. Одновременно, сохраняющийся запас тканевых антиоксидантов, способствует сохранению резистентности плодов сливы в период хранения. В результате, продолжительность хранения плодов сливы опытных вариантов с выходом стандартной продукции 95%, была 2,3 раза выше, чем контроля.

Таким образом, проводимые исследования позволят в дальнейшем усовершенствовать существующую технологию хранения, что не только поможет плодам преодолеть высокую стрессовую нагрузку, но и повысит качество плодов сливы с точки зрения содержания в них антиоксидантных соединений и позволит с минимальными потерями довести собранный урожай до потребителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гудковский В.А. Физиолого-биохимические показатели оценки устойчивости плодовых и ягодных культур к окислительному стрессу / В.А. Гудковский, Е.М. Цуканова, Н.Я. Каширская // Мичуринские чтения, посвященные юбилею И. В. Мичурина / ВНИГ и СПР им. И. В. Мичурина. – 2000.- С. 54-57.
2. Чиркова Т.В. Клеточные мембраны и устойчивость растений к стрессовым воздействиям / Т.В. Чиркова // Сорос. образовательный журнал. – 1997. - № 9. – С. 12-17.
3. Барабой В.А. Механизм антистрессового и протилучевого действия растительных фенольных соединений / В.А. Барабой, Ю.В. Хомчук // Укр. биохим. журнал. – 1988. – Т. 70, № 6. – С. 13-23.
4. Тюкавкина Н.А. Природные флавоноиды как пищевые антиоксиданты и биологически активные добавки / Н.А. Тюкавкина, И.А. Руленко И.А., Ю.А. Колесник // Вопр. питания. – 1996. - № 2. – С. 33 -38.
5. Барабой В.А. Растительные фенолы и здоровье человека / В.А. Барабой. – М.: Наука, 1984.- 160 с.
6. Герчиков А.Я. Антиокислительная эффективность кверцетина в реакции радикально-цепного окисления этилбензола / А.Я. Герчиков, Г.Г. Гарифуллина, Л.Т. Хайруллина // Биантиоксидант: VI Междун. конф.; Москва, 16 – 19 апреля. – М., 2002. – С. 36-39.

УДК 615.322:616.36:547.412.133

ПРОФИЛАКТИКА ОЛИГОМЕРНЫМИ ПРОАНТОЦИАНИДИНАМИ НАРУШЕНИЙ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ПОРАЖЕНИИ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТЫМ УГЛЕРОДОМ

Спрыгин В.Г.

Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток,
Россия, (423)-2-313-061, vsprygin@poi.dvo.ru.

Токсические поражения печени, обусловленные загрязнением окружающей среды профессиональными и бытовыми факторами, являются широко распространенной причиной заболеваемости и смертности населения [1]. Ранее нами было показано, что комплекс олигомерных проантоцианидинов (КОПЦ), выделенный из отжима калины, является эффективным гепатопротектором, восстанавливающим метаболизм в печени после поражения четыреххлористым углеродом (ЧХУ) [2]. Однако многие болезни печени, заканчивающиеся выздоровлением, оставляют «след» метаболического нарушения, который

сохраняется на многие годы и нередко переходит в болезнь, требующую лекарственной терапии [3]. Данный факт обуславливает необходимость профилактического применения гепатопротекторов, способных предотвратить или максимально облегчить патологические изменения в печени при воздействии токсикантов. Олигомерные проантоцианидины являются одними из наиболее удачных препаратов для использования в качестве профилактических средств. Это связано с тем, что они в значительных количествах встречаются в растениях (виноград, яблоки, различные ягоды, какао бобы), традиционно употребляемых в пищу человеком, организм которого эволюционно адаптирован к данной группе растительных полифенолов, что делает их пригодными для длительного применения в качестве компонента ежедневной диеты.

Целью настоящей работы явилось изучение профилактического применения КОПЦ, выделенного из отжима калины (*Viburnum sargentii*), на показатели липидного обмена и антирадикальную активность печени и плазмы крови крыс при поражении ЧХУ. В качестве препарата сравнения использовали эталонный полифенольный гепатопротектор «Легалон»® (MADAUS AG, Германия).

Комплекс олигомерных проантоцианидинов из экстракта отжима калины выделяли на колонке с обращеннофазовым сефадексом LH-20 (GE Healthcare AB, Sweden) по описанной нами методике [4]. Содержание проантоцианидинов в полученном препарате составляло 80% от сухого веса.

В эксперименте использовали белых крыс-самцов линии Вистар массой 180-200 г, содержавшихся в стандартных условиях вивария. В течение 7 дней крысам внутрижелудочно через зонд один раз в день вводили водный раствор КОПЦ из калины в дозе 100 мг проантоцианидинов на 1 кг массы тела. Легалон вводили через зонд в дозе, соответствующей 100 мг общих полифенолов на 1 кг массы тела животных в виде взвеси в 1% крахмальном клейстере. Доза в 100 мг/кг соответствует рекомендованной дозе для проведения доклинических испытаний полифенольных гепатопротекторов [5]. Начиная с 8-го дня, животным в дорзальную шейную складку вводили 50% раствор ЧХУ на оливковом масле в дозе 2,0 мл/кг на протяжении 4-х дней [5]. Параллельно продолжали введение растительных препаратов в той же дозе один раз в день. Животные были разделены на 4 группы по 10 крыс в каждой: 1-я группа – контроль (интактные животные); 2-я группа – ЧХУ; 3-я группа – КОПЦ+(ЧХУ+КОПЦ); 4-я группа – легалон+(ЧХУ+легалон). Крыс выводили из эксперимента

декапитацией под легким эфирным наркозом с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986).

Экстракт общих липидов из ткани печени готовили традиционным методом [6]. Разделение и количественное определение фракций фосфолипидов (ФЛ) проводили в соответствии с методиками описанными нами ранее [7]. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от суммы ФЛ. Вторичные продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) - малоновый диальдегид (МДА), определяли по методу [8]. Уровень свободно-радикальных процессов оценивали по величине антирадикальной активности (АРА) печени и плазмы крови [9].

Таблица

Влияние профилактического введения растительных препаратов (КОПЦ, пикногенол, легалон) на содержание фракций фосфолипидов в печени крыс при токсическом поражении четыреххлористым углеродом (в % от суммы всех фракций, М±m)

Фракции липидов	1-я группа Контроль (интактные)	2-я группа ЧХУ	3-я группа КОПЦ + (ЧХУ+ КОПЦ)	4-я группа легалон + (ЧХУ+ легалон)
ФХ	43,83±1,36	37,11±1,19 ²	42,20±1,08 ⁰	41,56±1,08 ^a
ЛФХ	3,29± 0,32	6,73±0,27 ³	3,46±0,62 ^B	4,15±0,26 ^B
СМ	9,49± 0,27	7,31±0,47 ³	11,85±0,16 ^{3,B}	13,11±0,34 ^{2,B}
ФЭ	24,40± 0,38	19,32±0,87 ²	23,45±1,12 ⁰	23,38±1,17 ⁰
ЛФЭ	2,87± 0,4	6,31±0,53 ³	2,79±0,13 ^B	2,14±0,43 ^B
ФС	2,98± 0,11	3,75±0,41	3,40±0,49	2,40±0,51
ФИ	7,25± 0,24	9,04±0,68 ¹	6,39±0,20 ^{1,a}	6,76±0,45 ^a
ФК	1,46± 0,17	3,96±0,24 ³	2,02±0,35 ^B	2,12±0,62 ^a
ДФГ	4,65± 0,35	6,48±0,18 ³	4,46±0,31 ^B	4,58±0,73 ^B

Примечание. Различия статистически достоверны при: ¹- p<0,05; ²- p<0,01 – по сравнению с контролем, ^a- p<0,05; ⁰- p<0,01; ^B- p<0,001 – по сравнению со 2-й группой. ФХ – фосфатидилхолин, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, СМ – сфингомиелин, ФЭ – фосфатидилэтаноламин, ЛФЭ – лизофосфатидилэтаноламин, ФС – фосфатидилсерин, ФИ – фосфатидилинозит, ФК – фосфатидная кислота, ДФГ – дифосфатидилглицерин.

Введение ЧХУ в течение 4-х дней в дорзальную шейную складку крыс приводило к развитию типичной картины токсического гепатита со значительными изменениями биохимических

показателей, характеризующих липидный обмен печени и уровень свободно-радикальных процессов. Активизация процессов ПОЛ сопровождалась повышенным образованием МДА, содержание которого в печени было увеличено в 2,7 раза ($78,9 \pm 3,6$, против $28,5 \pm 1,9$ нмоль/г в контроле, $p < 0,001$), что является характерным признаком токсического действия ЧХУ. Снижение величины антирадикальной активности (АРА) плазмы крови на 44% ($2,25 \pm 0,10$, против $4,01 \pm 0,13$ мкмоль тролокса/мл в контроле, $p < 0,001$) и печени на 31% ($3,05 \pm 0,17$, против $4,4 \pm 0,18$ мкмоль тролокса/г в контроле, $p < 0,001$) свидетельствует об истощении антиоксидантной и антирадикальной защиты организма.

Интоксикация ЧХУ вызывала изменения в содержании фракций ФЛ: снижение количества основных структурных компонентов мембран – фосфатидилхолина (ФХ) на 15% ($p < 0,01$) и фосфатидилэтаноламина (ФЭ) на 21% ($p < 0,01$) при одновременном увеличении количества их лизоформ – лизофосфатидилхолина (ЛФХ) и лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) в 2 раза ($p < 0,001$), а также фосфатидной кислоты (ФК) в 2,7 раза ($p < 0,001$) (табл.). Считается, что такая деградация ФЛ обусловлена активацией фосфолипазы A_2 в условиях воздействия ЧХУ. Кроме того, отмечалось снижение содержания сфингомиелина (СМ) на 23% ($p < 0,01$), являющегося стабилизатором мембран. Обращает на себя внимание повышение количества метаболически активных фракций – фосфатидилинозита (ФИ) на 25% ($p < 0,05$), фосфатидилсерина (ФС) на 26% ($p < 0,05$) и дифосфатидилглицерина (ДФГ) на 39% ($p < 0,001$), что, по мнению некоторых авторов, связано с адаптивными реакциями, направленными на поддержание функционирования мембраносвязанных транспортных АТФаз и аденилатциклазы [10].

Профилактическое применение (до интоксикации) и последующее введение КОПЦ и легалона одновременно с интоксикацией ЧХУ (3-я и 4-я группы) существенным образом изменило картину метаболических нарушений в печени. Так, величина АРА в печени крыс 3-й и 4-й групп составляла $4,15 \pm 0,20$ и $3,95 \pm 0,21$ мкмоль тролокса/г, соответственно, а в плазме крови – $3,95 \pm 0,18$ и $3,61 \pm 0,15$ мкмоль тролокса/мл, что не отличалось достоверно от таковой у контрольных животных. То есть, отмечалось снижение уровня свободнорадикальных процессов и снятие напряжения в системе антиоксидантной защиты. В пользу этого свидетельствует и более низкое, чем во 2-й группе, содержание МДА в печени животных, получавших растительные препараты. Так у крыс 3-й группы содержание МДА в печени достоверно не отличалось от контрольного уровня и составляло

33,6±2,4 нмоль/г. В то же время в печени крыс, получавших легалон, величина МДА была выше, чем в контроле на 28% (36,5±2,5 нмоль/г, $p<0,001$).

Профилактическое применение КОПЦ и легалона способствовало сохранению содержания основных структурных компонентов биологических мембран ФХ и ФЭ, а также снижению соответствующих лизоформ этих ФЛ. В то же время при введении легалона содержание ЛФХ было выше контрольного уровня на 26% ($p<0,05$). При этом необходимо отметить, что изучаемые препараты способствовали увеличению содержания СМ на 26-29% ($p<0,001$) по сравнению с контролем. Содержание метаболически активных фракций ФЛ (ФИ, ДФГ и ФК) достоверно не отличалось от соответствующих показателей у контрольных животных. Таким образом, профилактическое применение КОПЦ из калины с его последующим введением в процессе интоксикации способствовали сохранению метаболических реакций в печени и защищало от действия радикалов, образующихся при метаболизме ЧХУ. Профилактическое применение легалона и его последующее введение в период интоксикации ЧХУ также способствовало сохранению метаболической картины у экспериментальных животных, однако действие его было менее эффективным.

Так как в основе поражающего действия ЧХУ лежит свободнорадикальная деструкция мембран, то основным результатом профилактического применения проантоцианидинов является их мембранопротекторное действие. Известно, что проантоцианидины, образуя водородные связи с полярными группами ФЛ, способны аккумулироваться как на внешней, так и на внутренней поверхности бислоя [11]. Это создает дополнительную защиту полиненасыщенных жирных кислот ФЛ мембран от свободно радикальной деструкции и затрудняет прохождение активных форм кислорода в мембранный матрикс.

Полученные результаты позволяют заключить, что профилактическое применение КОПЦ дает возможность противостоять радикальной патологии в условиях интоксикации ЧХУ. Проантоцианидины, выступая в качестве ловушек свободных радикалов, обеспечивают сохранение основных показателей липидного обмена и антирадикальной активности печени и плазмы крови экспериментальных животных при поражении ЧХУ. Эффективность профилактического применения КОПЦ у крыс в условиях поражения печени ЧХУ превосходит таковую от применения эталонного гепатопротектора «Легалон».

ЛИТЕРАТУРА

1. Измеров, Н.Ф., Концепция долгосрочного социально-экономического развития Российской Федерации на период до 2020 г. («Стратегия 2020») и сохранение здоровья работающего населения России // Мед. труда и пром. экология. 2012. № 3. С. 1-9.
 2. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Рахманин Ю.А. Антиоксидантное действие олигомерных проантоцианидинов, выделенных из калины, при поражении печени четыреххлористым углеродом и профилактике его токсического эффекта // Гиг. и сан. 2003. № 3. С. 57-60.
 3. Ушкалова Е.А. Проблемы применения гепатопротекторов // Фарматека. 2004. № 6. С. 45-55.
 4. Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф. Калина - новый нетрадиционный источник олигомерных проантоцианидинов // Хим.-фарм. ж. 2004. Т.38, № 2. С. 41-45.
 5. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств // Ведомости фарм. комитета. 1999. № 2. С. 9.
 6. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226, N 1. P. 497-509.
 7. Кушнерова Т.В., Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Лесникова Л.Н., Хотимченко Ю.С. Антиоксидантные и мембранопротекторные свойства экстракта из бурой водоросли *Laminaria japonica* // Биология моря. 2010. Т.36, № 5. С. 390-395.
 8. Гончаренко М.С., Латинава А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов.// Лабораторное дело. 1985. № 1. С. 60-61.
 9. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay // Free Radic. Biol. Med. 1999. V. 26, N 9-10. P. 1231-1237.
 10. Ciarald T.P., Marinetti G.V. Hormone action at the membrane level. VIII. Adrenergic receptors in rat heart and adipocytes and their modulation by thyroxine.// Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 541, N 3. P. 334-346.
 11. Verstraeten S.V., Keen C.L., Schmitz H.H., Fraga C.G., Oteiza P.I. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure // Free Radic. Biol. Med. 2003. Vol. 34, N 1. P. 84-92.
-

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА ИЗ БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ *LAMINARIA JAPONICA*

Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Сизова Л.А.

Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева
Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток,
Россия, (423)-2-313-061, vsprygin@poi.dvo.ru.

Морские водоросли являются перспективным источником получения биологически активных веществ, в целях создания новых субстанций лекарств и ценных пищевых компонентов [1]. Наиболее интересны в этом отношении бурые водоросли, которые имеют большую биомассу, являются важным объектом марикультуры, а также представляют собой ценный пищевой биоресурс. Длительная история использования в пищу бурых водорослей позволяет говорить об эволюционной биохимической адаптированности человеческого организма к комплексам веществ, содержащихся в них. Это предполагает низкую токсичность и высокую биологическую активность препаратов из водорослей. Несмотря на то, что изучению свойств различных соединений, выделенных из водорослей, посвящено довольно большое количество работ, лишь незначительная их часть связана с исследованием биологической активности полифенольных комплексов. Известно, что растительные полифенолы являются основным источником эффективных и малотоксичных гепатопротекторов. При этом изучению гепатопротекторных свойств полифенолов бурых водорослей посвящены лишь единичные работы [2]. Целью настоящей работы явилось изучение гепатопротекторных свойств экстракта из ламинарии японской с повышенным содержанием полифенольных соединений при интоксикации четыреххлористым углеродом (ЧХУ).

Бурую водоросль *Laminaria japonica* собирали в б. Западная о. Попова залива Петра Великого Японского моря, высушивали при температуре, не превышающей 50°C. Измельченное сырье экстрагировали 70% раствором водного ацетона при соотношении сырье:экстрагент (1:2). Полученный экстракт упаривали в вакууме до полного удаления ацетона и экстрагировали хлороформом для удаления липофильных веществ и пигментов. Водную фракцию сушили в вакууме досуха и ресуспендировали в воде. Содержание общих полифенолов (ОПФ) [3] составляло 35% от сухого остатка экстракта. В эксперименте использовали белых крыс-самцов линии Вистар (питомник Столбовая, Московская область) массой 180-200

г. Применяли экспериментальную модель интоксикации ЧХУ на животных описанную в руководстве Венгеровского и соавт. (Венгеровский и др., 1999). Животным в дорзальную шейную складку вводили 50% раствор ЧХУ на оливковом масле в дозе 2 мл/кг на протяжении 4-х дней. В качестве препарата сравнения использовали коммерческий полифенольный гепатопротектор «Легалон». Экстракт из ламинарии вводили внутрижелудочно через зонд в виде водного раствора в дозе 100 мг ОПФ на 1 кг массы тела животного, что соответствует рекомендованной терапевтической дозе для полифенольных гепатопротекторов [4]. Легалон вводили через зонд в той же дозе в виде взвеси в 1% крахмальном клейстере. Животным контрольной группы вводили эквивалентное количество физиологического раствора. Животные были разделены на 5 групп по 10 крыс в каждой: 1-я группа - контроль (физраствор, стандартный рацион); 2-я группа – ЧХУ; 3-я группа – отмена ЧХУ (прекращение введения токсиканта) в течение 7 дней; 4-я группа – отмена ЧХУ + экстракт из ламинарии в течение 7 дней; 5-я группа – отмена ЧХУ + легалон в течение 7 дней. Состояние антиоксидантной защиты печени крыс определяли по величине антирадикальной активности [5], уровень ПОЛ - по содержанию МДА [6]. Экстракты общих липидов из ткани печени готовили с использованием системы растворителей хлороформ: метанол (2:1 по объему) [7]. Разделение и количественное определение фракций нейтральных липидов (НЛ) проводили в соответствии с методами, описанными нами ранее [8]. Количественное содержание отдельных фракций выражали в процентах от общей суммы НЛ.

Интоксикация ЧХУ сопровождалась увеличением относительной массы печени на 50% ($4,72 \pm 0,24$ против $3,14 \pm 0,15$ г/100 г массы тела в контроле; $p < 0,001$), сплошной зернистостью жировых включений, то есть проявлялась выраженная жировая инфильтрация. Это объясняется увеличением содержания триацилглицеринов (ТАГ), холестерина (ХС) и свободных жирных кислот (СЖК), в среднем, на 15% ($p < 0,01$) (табл.). Одним из факторов повышения содержания ТАГ и СЖК является усиление периферического липолиза (стрессовая реакция на поступление ксенобиотика), в результате которого происходит выход жирных кислот и глицерина в печень из жировых депо с последующим их ресинтезом в ТАГ. Увеличение количества ХС обусловлено угнетением митохондриального окисления Ац-КоА в цикле Кребса. Одновременно происходило снижение количества эфиров жирных кислот (ЭЖК) на 16% ($p < 0,01$) и эфиров холестерина (ЭХС) на 25% ($p < 0,001$). Такое соотношение липидных фракций свидетельствует

о нарушении этерифицирующей функции печени.

Известно, что под действием свободных радикалов, образующихся при восстановительной дегалогенации ЧХУ цитохромом Р450, формируется структурная дезорганизация мембран эндоплазматического ретикулаума. При этом запускается механизм ПОЛ, о чем свидетельствует почти трехкратное увеличение содержания МДА ($81,3 \pm 3,0$ нмоль/г, $p < 0,001$). В результате избыточного образования свободных радикалов происходит перенапряжение системы антиоксидантой защиты. Формируется дисбаланс прооксидантных и антиоксидантных параметров, что выражается в снижении антирадикальной активности (АРА) печени на 47% ($2,98 \pm 0,15$ мкмоль тролокса/г, $p < 0,01$).

Таблица 1.

Содержание нейтральных липидов печени крыс-самцов линии Вистар с токсическим ЧХУ-гепатитом после курсового лечения экстрактом бурой водоросли *LAMINARIA JAPONICA* и легалоном ($M \pm m$)

Параметры	1 группа Контроль (интактные)	2 группа ЧХУ	3 группа Отмена ЧХУ	4 группа Отмена ЧХУ + ламинария	5 группа Отмена ЧХУ + легалон
ТАГ	$23,8 \pm 0,3$	$26,5 \pm 0,7^{**}$	$29,2 \pm 1,0^{***}$	$24,0 \pm 1,0^2$	$25,8 \pm 0,8^{*,3}$
СЖК	$14,26 \pm 0,44$	$16,55 \pm 0,53^{**}$	$17,90 \pm 0,54^{***}$	$13,06 \pm 0,58^3$	$15,15 \pm 0,71^3$
ЭЖК	$16,16 \pm 0,51$	$13,55 \pm 0,52^{**}$	$13,19 \pm 0,62^{**}$	$16,12 \pm 0,90^1$	$14,69 \pm 0,41^{*,1}$
ХС	$17,55 \pm 0,48$	$20,16 \pm 0,40^{***}$	$19,54 \pm 0,55^{**}$	$17,68 \pm 0,74$	$18,68 \pm 0,42^1$
ЭХС	$17,24 \pm 0,33$	$12,89 \pm 0,59^{***}$	$13,14 \pm 0,68^{***}$	$17,15 \pm 0,75^2$	$15,09 \pm 0,77^{*,3}$
ОФ	$10,95 \pm 0,23$	$10,34 \pm 0,51$	$7,05 \pm 0,89$	$11,99 \pm 0,54$	$10,59 \pm 0,82$

Примечание. Различия статистически достоверны при: $^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$, $^{***}p < 0,001$ по сравнению с контролем; $^1p < 0,05$, $^2p < 0,01$, $^3p < 0,001$ по сравнению с 3-й группой. ТАГ – триацилглицерины, СЖК – свободные жирные кислоты, ЭЖК – эфиры жирных кислот, ХС – холестерин, ЭХС – эфиры холестерина, ОФ – остаточная фракция.

Через 7 дней после отмены ЧХУ в печени опытных животных (3-я группа) большинство исследуемых биохимических параметров не восстановилось до контрольных значений, что свидетельствует о продолжающемся токсическом стрессе и недостаточности собственных защитных сил организма противостоять развитию токсической патологии. Относительная масса печени животных достоверно превышала контрольный уровень ($4,10 \pm 0,13$ г/100 г массы тела; $p < 0,05$), при вскрытии имелись зернистые включения липидов. Содержание МДА превышало контрольный уровень более, чем в два раза ($68,3 \pm 2,9$ нмоль/г, $p < 0,001$), что определяет продолжающуюся высокую активность ПОЛ. В спектре НЛ заметен

дальнейший рост содержания ТАГ и СЖК, а также сохранение высокого значения ХС при одновременно низком уровне ЭХС и ЭЖК. Следовательно, в период отмены ЧХУ сохраняется низкая этерифицирующая функция печени, продолжается развитие жировой инфильтрации. Величина АРА оставалась на 42% ниже контроля ($3,26 \pm 0,19$ мкмоль тролокса/г; $p < 0,05$), что указывает на углубление развития свободно-радикальных процессов.

При введении животным экстракта из ламинарии в период отмены ЧХУ (4-я группа) отмечалось восстановление исследуемых параметров до контрольных значений. Так, относительная масса печени снизилась до $3,26 \pm 0,18$ г/100 г массы тела, а количество общих липидов - до $42,65 \pm 2,26$ мг/г печени. То есть, препарат обладает выраженным гепатопротекторным эффектом, проявляющимся в снятии жирового перерождения печени. В то же время при сравнении исследованных биохимических показателей в печени крыс 4-й группы по сравнению с таковыми у животных 3-й группы (отмена ЧХУ), отмечались статистически достоверные отличия. Так, в составе фракций нейтральных липидов следует отметить снижение количества ТАГ на 18% ($p < 0,01$), СЖК на 25% ($p < 0,001$), а также увеличение содержания ЭЖК и ЭХС, соответственно, на 22% ($p < 0,05$) и 30% ($p < 0,01$), что указывает на восстановление этерифицирующей функции печени. Величина АРА была выше на 59% ($5,18 \pm 0,29$ мкмоль тролокса/г, $p < 0,001$) при одновременном снижении содержания МДА на 48% ($35,5 \pm 2,8$ нмоль/г, $p < 0,001$).

При применении препарата сравнения «Легалон» (5-я группа) отмечалась однонаправленность изменений изученных биохимических показателей, как и в 4-й группе, однако степень их выраженности была различной, что проявлялось в сохранении достоверных отличий от контроля. Так, масса печени животных составляла $3,64 \pm 0,16$ г/100 г массы тела, что на 16% ($p < 0,05$) превышало контрольные значения. Это согласуется с достоверно более высоким уровнем ТАГ (на 8%; $p < 0,05$), сниженным ЭЖК (на 9%; $p < 0,05$) и ЭХС (на 13%; $p < 0,05$). Кроме того, было отмечено на 18% более низкое значение АРА ($4,63 \pm 0,32$ мкмоль тролокса/г; $p < 0,05$) и на 46% более высокое содержание МДА ($44,8 \pm 3$ нмоль/г; $p < 0,01$) по сравнению с контролем. То есть, при введении легалона нарушенные токсикантом метаболические реакции полностью не восстановились и сохранились остаточные явления жировой инфильтрации печени.

Полученные результаты позволяют заключить, что экстракт из ламинарии, содержащий комплекс флоротаннинов, проявляет выраженный защитный эффект в условиях воздействия

гепатотоксического агента ЧХУ. Он способствует ускоренному восстановлению каскадов метаболических реакций липидного обмена и антирадикальной активности печени крыс, обладая при этом большей эффективностью, чем эталонный гепатопротектор «Легалон». Антиоксидантное действие флоротанинов определяется способностью напрямую улавливать активные формы кислорода [9]. Мембраностабилизирующий эффект объясняется как прямым ингибирующим действием флоротаннинов на активность фософлипаз и липоксигеназ [10], так и их способностью образовывать флоротаннин-протеиновые комплексы на поверхности мембран [11], защищая их от действия свободных радикалов.

Таким образом, морская бурая водоросль *Laminaria japonica* является перспективным сырьевым источником для получения эффективных гепатопротекторов полифенольной группы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ngo D.-H., Wijesekara I., Vo T.-S., Van Ta Q., Kim S.-K. Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview// Food Res. Int. 2011. **44**,N 2. P. 523-529.
2. Kim S.M., Kang K., Jeon J.-S., Jho E.H., Kim C.Y., Nho C.W., Um B.-H. Isolation of Phlorotannins from *Eisenia bicyclis* and Their Hepatoprotective Effect against Oxidative Stress Induced by tert-Butyl Hydroperoxide// Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. **165**,N 5-6. P. 1296-1307.
3. Parys S., Rosenbaum A., Kehraus S., Reher G., Glombitza K.W., König G.M. Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts// J. Nat. Prod. 2007. **70**,N 12. P. 1865-1870.
4. Венгеровский А.И., Марков И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств// Ведомости Фармкомитета. 1999. № 2. С. 9-12.
5. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay// Free Radic. Biol. Med. 1999. **26**,N 9-10. P. 1231-1237.
6. Гончаренко М.С., Латинова А.М. Метод оценки перекисного окисления липидов// Лабораторное дело. 1985. № 1. С. 60-61.
7. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues// J. Biol. Chem. 1957. **226**,N 1. P. 497-509.
8. Кушнерова Т.В., Фоменко С.Е., Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Лесникова Л.Н., Хотимченко Ю.С. Антиоксидантные и мембранопротекторные свойства экстракта из бурой водоросли *Laminaria japonica*// Биология моря. 2010. **36**,№ 5. С. 390-395.
9. Shibata T., Ishimaru K., Kawaguchi S., Yoshikawa H., Hama Y. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae// J. Appl. Phycol. 2008. **20**,N 5. P. 705-711.
10. Shibata T., Nagayama K., Tanaka R., Yamaguchi K., Nakamura T. Inhibitory effects of brown algal phlorotannins on secretory phospholipase

-
- A(2)s, lipoxygenases and cyclooxygenases.// J. Appl. Phycol. 2003. **15**,N 1. P. 61-66.
11. Stern J.L., Hagerman A.E., Steinberg P.D., Mason P.K. Phlorotannin-protein interactions.// J. Chem. Ecol. 1996. **22**,N 10. P. 1877-1899.
-

УДК 547.9 581.1

ПОЛИФЕНОЛЬНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ ИЗ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ РАСТЕНИЯ *IRIS PSEUDACORUS*

Тарбеева Д.В., Федореев С.А., Веселова М.В., Калиновский А.И., Мазурок Т.И., Селецкая Л.Д.

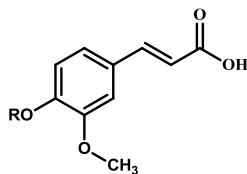
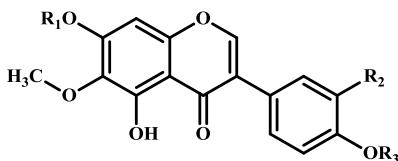
ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова и Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения РАН, Владивосток, Россия, тел. : (423) 2311-430 tarbeeveva1988@gmail.com

Растения рода *Iris* известны человечеству с древнейших времён благодаря богатому химическому составу и декоративным качествам. Многие метаболиты растений рода *Iris* обладают антиоксидантной, противоопухолевой, антибактериальной и противовирусной активностью. В этой связи особое внимание уделяется веществам полифенольной природы [1,2]. Известно, что растения рода *Iris* биосинтезируют различные флавоноиды и изофлавоноиды [3,4,5]. Однако сведения о биосинтезе этих полифенольных метаболитов клеточными культурами этих растений ограничены. Изучение биосинтеза полифенольных соединений в клеточных культурах растений, а также использование различных методов биотехнологии позволяют существенным образом увеличить продукцию этих метаболитов [6,7].

Объектом данного исследования послужила клеточная культура, полученная из листьев растения *Iris pseudacorus* L. Культура каллусов выращивалась на среде W_{B/A} [7] в накопительном режиме в течение 30 сут.

Из спиртовых экстрактов клеточных культур *I. pseudacorus* методом колоночной хроматографии на сорбентах с обращённой фазой были выделены и структурно идентифицированы 3 известных изофлавоноида: 5,7,4'-тригидрокси-6-метоксиизофлавоон (1) (текторигенин), 7-О-β-D-глюкопиранозид 5,7,4'-тригидрокси-6-метоксиизофлавоона (2) (текторидин), 5,7,3'-тригидрокси-4'-метоксиизофлавоон (3) (иристекторигенин А), а также производное коричной кислоты: 4-О-β-D-глюкопиранозид 4-гидрокси-3-

метоксикоричной кислоты (4) (лавандозид).



1. $R_1=H$; $R_2=H$; $R_3=H$ 4. $R = \beta\text{-D-Glc}$
2. $R_1 = \beta\text{-D-Glc}$; $R_2 = H$; $R_3= H$
3. $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=CH_3$

Структуры выделенных соединений были установлены методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C с применением экспериментов COSY, HMBC, HSQC, NOESY, а также с помощью ВЭЖХ-МС. Текторигенин (1), текторидин (2) и иристекторигенин А (3) ранее были выделены из растения *I. pseudacorus* и из других видов рода *Iris* [4,5]. Соединение 4, ранее выделенное из цветков *Lavandula spica* [8], было впервые идентифицировано нами в клеточной культуре *I. pseudacorus*. Литературные данные о наличии этого соединения в растениях рода *Iris* отсутствуют.

Анализ фракций и количественное определение содержания выделенных веществ в культивированных клетках *I. pseudacorus* проводили методом ВЭЖХ с использованием дегидрохверцетина в качестве внутреннего стандарта. Содержания выделенных соединений определены в пересчёте на сухую массу культивированных клеток *I. pseudacorus*. Для всех выделенных веществ данный показатель не превышал 0,3%. В наибольшем количестве клеточные культуры продуцировали текторигенин – 0,28%. Содержание текторидина (2), иристекторигенина А (3) и лавандозида (4) составило 0,18%, 0,089% и 0,24% соответственно.

Было изучено влияние 6-бензоаминопурпурина, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, фенилаланина и глицерата меди на продукцию полифенолов 1 – 4 клеточными культурами *I. pseudacorus*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Conforti F., Menichini F., Rigano D., Senatore F. Antiproliferative activity on human cancer cell lines after treatment with polyphenolic compounds isolated from *Iris pseudopumila* flowers and rhizomes // Verlag der Zeitschrift für Naturforschung. 2009. V. 64. P. 490-494.
2. Nadaroglu H., Demir Y., Demir N. Antioxidant and radical scavenging properties of *Iris germanica* // Medicinal plants. 2007. V. 41. P. 13-18.
3. Hanawa F., Tahara S., Mizutani J. Flavonoids produced by *Iris*

-
- pseudacorus leaves treated with cupric chloride // *Phytochemistry*. 1991. V. 30. P. 2197-2198.
4. Hanawa F., Tahara S., Mizutani J. Isoflavonoids produced by *Iris pseudacorus* leaves treated with cupric chloride // *Phytochemistry*. 1991. V. 30. P. 157-163.
 5. Shawl A.S., Kumar T. Isoflavonoids from *Iris crocea* // *Phytochemistry*. 1992. V. 31. P. 1399-1401.
 6. Fedoreyev S.A., Pokushalova T.V., Veselova M.V., Glebko L.I., Muzarok T.I. Seletskaya L.D., Bulgakov V.P., Zhuravlev Yu.N. Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis* // *Fitoterapia*. 2000. Vol. 71. P. 365-372.
 7. Bulgakov V.P., Veselova M.V., Tchernoded G.K., Kiselev K.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Yu.N. Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes* rolC gene on rabdosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures // *Planta*. 2005. Vol. 221. P. 471-478.
 8. Куркин В.А., Ламрини М., Ключков С.Г. Лавандозид цветков *Lavandula spica* // *Химия природных соединений*. 2008. № 2. С. 133-134.
-

УДК 547.972

ФЛАВОНОИДЫ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ *SCUTELLARIA GUTTATA*

Ташматов З.О., Эшбакова К.А.

Институт химии растительных веществ им.акад. С.Ю. Юнусова АН РУз,
Ташкент, Узбекистан, факс: (99871) 120 64 75, e-mail: e_komila@yahoo.com

Систематика рода *Scutellaria* (сем. *Lamiaceae*) – шлемник в целом насчитывает более 350 видов, широко распространенное в Европе, Южной Америке и восточной Азии [1]. Во флоре Средней Азии насчитывается 54 вида шлемника. Они являются богатым источником флавоноидов, терпеноидов, алкалоидов и других групп биологически активных соединений, используемых для приготовления лекарственных препаратов. Некоторые из них издавна широко используется в народной медицине, особенно в Китае, Корее и Японии для лечения опухолей, а также как антивирусное, успокоительное, ингибирующее, антитромбическое, антибактериальное средства и как природный антиоксидант [2-5].

Scutellaria guttata Nevski ex Juz. (сем. *Lamiaceae*) – Шлемник капельный многолетнее полукустарник эндемичное растение высотой до 7–12 см, цветет в июне – июле, плодоносит в июле – августе, произрастает на скалах в верхнем поясе гор.

Распространено в Средней Азии [1]

Ранее данное растение химическому исследованию не подвергалось.

Цель настоящей работы изучение и выделение флавоноидов надземной части растений *Scutellaria guttata*. Флавоноиды – наиболее многочисленный класс природных фенольных соединений, которым характерно структурное многообразие, высокая и разносторонняя активность и малая токсичность. В связи с этим изучение флавоноидов шлемника капельного является актуальной задачей.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Экстракция и выделение флавоноидов надземной части. Высушенную и измельченную надземную часть (900 г.) *Scutellaria guttata*, заготовленную в период цветения в горах Бабатага в Сурхандарьинской области Республики Узбекистан, экстрагировали при комнатной температуре 5 раз 70% -ным этанолом.

Объединенный спиртовой экстракт отгоняли в вакууме, густой остаток разбавляли водой в соотношении 1:1 и последовательно обрабатывали экстракционным бензином (3 раза по 0.5 л), хлороформом (4 раза по 0.5 л), этилацетатом (6 раз по 0.5 л), *n*-бутанолом (5 раз по 0.5 л). После отгонки растворителя получили 5 г, 10 г, 20 г, 22 г соответствующих фракций. При исследовании полученных фракций методом ТСХ (система 9:1, 4:1 хлороформ : метанол) установлено, что содержание флавоноидов больше в этилацетатной фракции. Этилацетатную фракцию (20 г) хроматографировали на колонке (110 x 2.5 см) с силикагелем в градиенте растворителей: экстракционный бензин – хлороформ и хлороформ – метанол. При элюировании колонки смесью экстракционный бензин – хлороформ (7:1) выделили 0.22 г хризина (1), а при элюировании смесью экстракционный бензин – хлороформ (6:1) 0.12 г вогонина (2), 0.38 г ороксиллина (3). При дальнейшем элюировании колонки смесью экстракционный бензин – хлороформ (3:1) получили 0.20 г апигенина (4), при элюировании смесью экстракционный бензин – хлороформ (1:1) выделили 0.15 г гиспудулина (5). Дальнейшее элюирование колонки чистым хлороформом дало 0.27 г скутелларина (6). При элюировании колонки смесью хлороформ – метанол (9:1) выделили 0.33 г апигенин-7-О-гликозид (7), а при элюировании системой хлороформ – метанол (4:1) получили фракцию, состоящую из смеси двух веществ. При рехроматографировании фракции, в градиентной системе хлороформ – метанол (6:1) выделили скутелларин-7-О-β-D-глюкопиранозид (8) и хризин-7-О-метилглюкуронида (9).

УФ-спектры измеряли на спектрофотометре Lambda-16 (Perkin -Elmer). Температуру плавления веществ определяли на нагревательном столике Boetius. ИК-спектр снимали на Фурье-спектрометре фирмы "Perkin-Elmer" модели 2000 (KBr), спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре UNITY-400plus (Varian) с рабочей частотой 400 МГц. Образцы готовили на растворе DMSO- d_6 . В спектрах ^1H ЯМР в качестве внутреннего эталона использовался гексаметилдисилоксан (ГМДС) (0 м.д.). В спектрах ^{13}C ЯМР в качестве внутреннего стандарта использовался химический сдвиг DMSO- d_6 39.5 м.д. по ТМС. Для анализа ТСХ использовали хроматографические пластинки Silufol UV 254, для проявления пластинок – пары йода, пары аммиака, 1% раствор ванилина в концентрированной серной кислоте, УФ-лампу при 254 и 365 нм. Бумажную хроматографию проводили на бумаге марки Filtrak № 11 в системах растворителей *n*-бутиловый спирт – уксусная кислота – вода 4:1:5 (1), *n*-бутиловый спирт – пиридин – вода 6:4:3 (2). Свободные моносахариды обнаруживали анилинфталатом.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выделенные вещества идентифицировали на основании химических превращений и данных спектров УФ-, ИК- и ^1H , ^{13}C ЯМР, которые сравнивали с литературными данными, а также непосредственным сравнением с достоверными образцами.

Хризин (5,7-дигидроксифлавоны) (1). $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_4$, желтый кристаллический порошок, растворим в хлороформе, ацетоне, этилацетате, этаноле, не растворим в воде. Т.пл. 289–292°C (хлороформ). УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 271, 310. УФ-спектр рассматриваемого соединения характерен для флавоны [6]. ^1H ЯМР-спектр (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д., J/Гц): 6.46 (1H, д, J=2.0, H-6), 6.87 (1H, д, J=2.0, H-8), 6.98 (1H, с, H-3), 7.57 (3H, м, H-3',4',5'), 8.21 (2H, дд, J=1.2; 7.9, H-2'6'), 12.77 (1H, с, 5-OH). На основании спектральных данных и непосредственным сравнением с подлинным образцом установлена идентичность флавоны 1 с хризином [7].

Вогонин (5,7-дигидроксигидрокси-8-метоксифлавоны) (2) $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$, порошок желтого цвета, растворим в хлороформе, ацетоне, этилацетате, этаноле, не растворим в гексане, воде. Т.пл. 201–202°C, УФ-спектр (MeOH, λ_{max} нм): 246, 277, 315; + CH_3COONa -292, 395; +NaOH- 296, 402; + $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{H}_3\text{BO}_3$ -276, 315; + ZrOCl_2 -295, 336, 417. В ИК-спектре (ν , cm^{-1}) обнаруживаются характерные полосы поглощения флавонов: 3462–3230 (ОН-группа), 1661 (α,β -ненасыщенная СО-группа), 1614 и 1585 (ароматические C=C-связи)

и метоксильная группа 2925 (ОСН₃). ¹Н ЯМР-спектр (400 МГц, CDCl₃, δ, м.д., J/Гц, 0-ГДМС): 3.88 (3Н, с, ОСН₃), 6.71 (1Н, с, Н-3), 6.94 (1Н, с, Н-6), 7.47 (3Н, м, Н-3',4',5'), 7.97 (2Н, д, J=8.0, Н-2'6'), 12.97 (1Н, с, 5-ОН). Из данных спектра ¹Н ЯМР следует, что вещество относится к 5,7-диоксизамещенным флавоном и содержит одну метоксильную группу. Использование метода дифференциальной УФ-спектроскопии с ионизирующими и комплексообразующими реагентами (+CH₃COONa, +NaOH, +CH₃COONa/H₃BO₃, +ZrOCl₂) указывает на расположение метоксильной группы в кольце А, при С-8.

На основании спектральных данных и непосредственным сравнением с подлинным образцом установлена идентичность флавона 2 с вогонином [8].

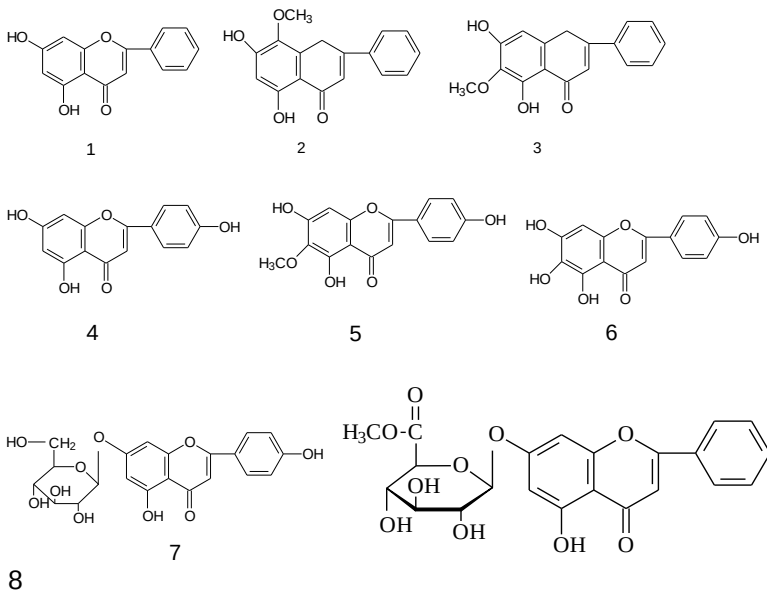
Ороксилан (5,7-дигидрокси-6-метоксифлаван) (3) C₁₆H₁₂O₅, т.пл. 215-217°С. Желтые кристаллы, растворимые в спирте, хлороформе, ацетоне, этилацетате, не растворимые в гексане, воде. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} нм): 271, 320; +CH₃COONa -374; +NaOH -378; + CH₃COONa/H₃BO₃ -321; +ZrOCl₂ -368. ИК-спектр (ν, см⁻¹): 3480 – 3290 (ОН), 2933 (ОСН₃), 1685 (С=О), 1605 и 1510 (С=С). В ¹Н ЯМР-спектре (CDCl₃, 400 МГц, δ, м.д., J/Гц, 0-ГДМС) наблюдаются сигналы, характерные для производных флавонов: 3.93 (3Н, с, ОСН₃), 6.37 (1Н, с, Н-8), 6.63 (1Н, с, Н-3), 7.47 (3Н, м, Н-3',4',5'), 7.86 (2Н, д, J=8.2, Н-2'6'), 12.45 (1Н, с, 5-ОН). На основании УФ-, ИК-, ¹Н ЯМР - спектральных данных и непосредственным сравнением с подлинным образцом установлена идентичность флавона 3 с ороксидином [8].

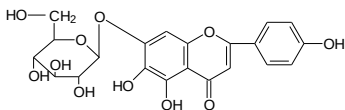
Апигенин (5,7,4'-тригидроксифлаван) (4). Желтые кристаллы состава C₁₅H₁₀O₅ с т.пл. >340°С. УФ-спектр соединения 4 (MeOH, λ_{max} нм): 294, 348, характерен для флавонов [8]. ИК-спектр (ν, см⁻¹): 3119 (ОН), 1669 (С=О), 1606 и 1507 (С=С). В ¹Н спектре ЯМР (CDCl₃, 400 МГц, δ, м.д., J/Гц) проявляются сигналы, относящиеся к семи ароматическим протонам: 6,15 (1Н, д, J=2.5, Н-6), 6.44 (1Н, д, J=2.5, Н-8), 6.72 (1Н, с, Н-3), 6.87 (2Н, д, J=8.8, Н-3'5'), 7.86 (2Н, д, J=8.8, Н-2'6'), 10.36 (1Н, у.с, 4'-ОН), 10.8 (1Н, у.с, 7-ОН), 12.92 (1Н, с, 5-ОН), которые характерны для спектра апигенина [7]. Следовательно, рассматриваемое вещество 4 является апигенином.

Гиспудилин (5,7,4'-тригидрокси-6-метоксифлаван) (5). C₁₆H₁₂O₆, Т.пл. 286–289°С. Желтоватый порошок, хорошо растворим в спирте, хлороформе, ацетоне, этилацетате, не растворим в гексане, воде. УФ-спектр (MeOH, λ_{max}, нм): 275, 334; +NaOCH₃ -277, 326, 393; +AlCl₃ -264, 281, 301, 363; + AlCl₃/HCl -262,

285, 301, 357: +CH₃COONa -273, 306, 328, 388; +CH₃COONa/H₃BO₃ - 272, 341. ИК-спектр (ν , см⁻¹): 3552–3532 (ОН), 2928 (ОСН₃), 1667 (С=О γ -пирона), 1612, 1569, 1517 (ароматические С=С связи). ¹Н ЯМР-спектр (400 МГц, CDCl₃, δ , м.д., J/Гц): 6.21 (1H, с, Н-8), 6.67 (1H, с, Н-3), 7.57 (2H, дд J=1.6; 7.8, Н-3'5'), 7.96 (2H, дд, J=1.6; 7.8, Н-2'6'), 3.88 (3H, ОМе), 10.37 (1H, у.с, 4'-ОН), 12.65 (1H, с, 5-ОН). Данные УФ-спектра, снятом с добавками указывает на расположение метоксильной группы в кольце А, при С-6. Таким образом, выделенное вещество 5 идентифицировали с гиспидулином [7].

Скутелларин (5,6,7,4'-тетрагидроксифлавоон) (6). C₁₅H₁₀O₆, т.пл. >340°С, УФ-спектр (МеОН, $\lambda_{\max}$ нм): 279, 338. ИК-спектр (ν , см⁻¹): 3300 (ОН), 1672 (С=О γ -пирона), 1603, 1508 (ароматические С=С связи). ¹Н ЯМР -спектр (400 МГц, CDCl₃, δ , м.д., J/Гц): 6.58 (1H, с, Н-8), 6.76 (1H, с, Н-3), 6.91 (2H, д, J=8.8, Н-3'5'), 7.94 (2H, д, J=8.8, Н-2'6'), 12.30 (1H, с, 5-ОН). Принадлежность вещества 6 к флавоном подтверждается наличием данных УФ-, ИК-, ¹Н ЯМР-спектров. Сравнительное изучение спектральных данных и физико-химических свойств с литературными данными позволило идентифицировать вещество 6 с скутелларинном, которое характерно для рода *Scutellaria* [7].





9

Космосин (апигенин -7-О-гликозид) (7). $C_{21}H_{20}O_{10}$ с т.пл. 202–204°C, УФ-спектр (MeOH, $\lambda_{\max}$ нм): 270, 330; + CH_3COONa 268, 339. Вещество 7 является флавоноидным гликозидом, о чём свидетельствуют данные ^1H ЯМР-спектра. В спектре ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО, δ , м.д., J/Гц) наблюдаются сигналы, относящиеся к семи ароматическим протонам 6.13 (1H, д, $J=2.2$, H-6), 6.42 (1H, д, $J=2.2$, H-8), 6.72 (1H, с, H-3), 6.88 (2H, дд, $J=1.96$; 8.8, H-3'5'), 7.88 (2H, дд, $J=1.96$; 8.8, H-2'6'), аномерному протону 5.55 (1H, д, $J=7.8$, H-1'') и протонам углеводной части 3.5-4.2 (6H сахарной части), 12.90 (1H, с, 5-OH). Спектр ^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО, δ): 163.61 (C-2), 103.15 (C-3), 182.12 (C-4), 161.42 (C-5), 99.86 (C-6), 163.21 (C-7), 95.07 (C-8), 157.39 (C-9), 105.69 (C-10), 120.92 (C-1'), 128.99 (C-2'), 116.53 (C-3'), 162.12 (C-4'), 116.53 (C-5'), 128.99 (C-6'), 100.24 (C-1''), 73.47 (C-2''), 77.14 (C-3''), 69.97 (C-4''), 76.3 (C-5''), 60.85 (C-6'').

В результате кислотного гидролиза гликозида 7 получили агликон с т.пл. 347.2°C, который сравнением с истинным образцом идентифицировали как апигенин [7]. В углеводной части гидролизата методом бумажной хроматографии обнаружили D-глюкозу.

В спектре ^1H ЯМР гликозида 7, аномерный протон сахарного остатка резонирует в виде дублета при δ 5.55 м.д. с КССВ $J=7.8$ Гц (H-1 D-глюкозу). Это свидетельствует о том, что моносахаридные остатки имеют пиранозную форму, $^4C_1$ -конформацию и обладают β -конфигурацией [9].

На основании вышеизложенных данных соединение 7 идентифицировали с космосином [7].

Скутелларин-7-О- β -D-глюкопиранозид (8). $C_{21}H_{20}O_{11}$, т.пл. 194–196°C, УФ-спектр (EtOH, $\lambda_{\max}$ нм): 225, 279, 309. 338; + CH_3COONa - 279, 309, 338. В ИК-спектре соединения 8 имеются полосы поглощения, свидетельствующие о наличии гидроксильных групп (3200–3450), карбонила γ -пирона (1655.94), ароматических C=C связей (1607, 1503) и C-O колебания гликозидов (1187, 1134, 1106, 1076, 1044). В спектре ^1H ЯМР флавоноида 8, снятом в $DMCO-d_6$ (400 МГц, δ , м.д., J/Гц), проявляются сигналы характерные для скутелларина 6.62 (1H, с, H-8), 6.81 (1H, с, H-3), 6.95 (2H, д, $J=8.9$, H-3'5'), 7.96 (2H, д, $J=8.8$, H-2'6'), 8.78 (1H, с, 6-OH), 10.45 (1H, с, 4'-OH), 12.35 (1H, с, 5-OH) и аномерного протона 4.92 (1H, д, $J=7.3$,

H=1" глюкозы), а также сигналы других протонов углеводной части 3.15-3.73 (протоны сахарной части). ^{13}C ЯМР-спектр (100 МГц, ДМСО, δ): 164.18 (C-2), 102.74 (C-3), 182.6 (C-4), 147.08 (C-5), 127.04 (C-6), 151.27 (C-7), 98.71 (C-8), 152.41 (C-9), 105.21 (C-10), 121.36 (C-1'), 128.71 (C-2'), 116.11 (C-3'), 161.39 (C-4'), 116.11 (C-5'), 128.71 (C-6'), 101.31 (C-1''), 73.27 (C-2''), 75.82 (C-3''), 69.79 (C-4''), 77.33 (C-5''), 60.75 (C-6'') [7].

Хроматографическая подвижность и данные ИК-, ^1H - и ^{13}C ЯМР-спектров свидетельствуют о том, что выделенное соединение 8 является гликозидом. Это подтверждено получением skutellarina [7] и D-глюкозу в результате кислотного гидролиза гликозида 8.

Таким образом, вещество 8 идентифицировали с skutellarin-7-O- β -D-глюкопиранозидом [7].

Хризин-7-O-метилглюкуронид (9) $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$, т.пл. 184–186°C. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} нм): 271, 306. В ИК-спектре обнаруживается, кроме характерных полос поглощения флавонов (ОН), 1669 (C=O γ -пирона), полосы поглощения карбонила от сложного эфира 1725 (C=O), а также метоксильной группы 2925 (OCH₃). Спектр ^1H ЯМР (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д., J/Гц, 0-ГДМС): 3.61 (3H, OCH₃), 6.45 (1H, д, J=2.0, H-6), 6.86 (1H, д, J=2.0, H-8), 7.01 (1H, с, H-3), 7.55-7.57 (3H, м, H-3', 4', 5'), 8.05 (2H, дд, J=1.24; 8.0, H-2', 6'), 4.17 (1H, д, J=9.2, H-1''), 3.27-3.53 (4H, H-2'', 3'', 4'', H-5''), 12.77 (1H, с, 5-ОН). Спектр ^{13}C ЯМР (100 МГц, ДМСО, δ): 164.66 (C-2), 105.51 (C-3), 182.56 (C-4), 161.20 (C-5), 99.51 (C-6), 163.79 (C-7), 94.78 (C-8), 157.15 (C-9), 105.76 (C-10), 130.59 (C-1'), 126.53 (C-2'), 129.19 (C-3'), 132.25 (C-4'), 129.19 (C-5'), 126.53 (C-6'), 99.06 (C-1''), 72.72 (C-2''), 75.16 (C-3''), 71.32 (C-4''), 77.98 (C-5''), 171.14 (C-6''), 52.00 (OCH₃).

Вещество 9, судя по спектральным данным, относится к гликозиду хризина. В ИК-спектре присутствие полосы поглощения карбонила от сложного эфира и метоксильной группы, а также в спектре ^{13}C ЯМР присутствие сигнал от COOCH₃-группы при δ 171.14 м.д., все эти данные позволили идентифицировать вещество 9 с хризин-7-O- β -D-метилглюкуронидом [8]. Кислотный гидролиз гликозида 9, как следовало ожидать, привел к образованию хризина [7].

Соединения 1–9 из *Scutellaria gutata* выделены впервые.

ЛИТЕРАТУРА

1. Флора СССР, т. 20, Издательство Академии наук СССР, Ленинград, Москва, 1954, 223 с.
2. Chi, Y.S., Kim, H.P., Suppression of cyclooxygenase-2 expression of skin fibroblasts by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix* //Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2005, 72, pp. 59–

-
- 66.
3. Yin, X.L., Zhou, J.B., Jie, C.F., Xing, D.M., Zhang, Y. Anticancer activity and mechanism of *Scutellaria barbata* extract on human lung cancer cell line A549 //Life Sciences 2004, 75, pp. 2233.
 4. Tan, Y., Lv, Z.P., Bai, X.C., Liu, X.Y., Zhang, X.F. Traditional Chinese medicine Bao Gan Ning increase phosphorylation of CREB in liver fibrosis in vivo and in vitro. //Journal of Ethnopharmacology 2006, 105, pp. 69–75.
 5. Johan, G., de Boer, Quiney, B., Walter, P.B., Thomas, C., et al., Protection against aflatoxin-B1-induced liver mutagenesis by *Scutellaria baicalensis*. Mutation Research. 2005, 578, pp. 15–22.
 6. T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, *The systematic identification of Flavonoids*. Springer Verlag, New York, 1970, pp. 146, 329
 7. З.О.Ташматов, К.А.Эшбакова, Х.М.Бобакулов, Н.Д.Абдуллаев, Флавоноиды надземной части *scutellaria schachristanica* // *Химия природ.соедин.*, 2009, с. 737
 8. З.О. Ташматов, К.А.Эшбакова, Х.М.Бобакулов, Химические компоненты надземной части *scutellaria schachristanica* // *Химия природ.соедин.*, 2011, с. 392
 9. З.О. Ташматов, К.А.Эшбакова, Х.М.Бобакулов, Новый флавоновый гликозид из надземной части *scutellaria schachristanica* // *Химия природ.соедин.*, 2011, с. 487
-

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КАК ДЕЙСТВУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ С СЕДАТИВНОЙ И АНКСИОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Товчига О.В., Степанова С.И., Штрыголь С.Ю.

Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина, тел.
(057)7063069, e-mail: olga_234@mail.ru

Распространенность нарушений деятельности ЦНС с повышенной тревожностью и/или возбудимостью велика. Фармакотерапия этих нарушений проводится с помощью седативных и анксиолитических препаратов, которые являются одними из наиболее широко применяемых. У анксиолитиков с доказанной активностью, прежде всего бензодиазепинов, имеются побочные эффекты (зависимость, синдром отмены, угнетение ЦНС), поэтому расширение ассортимента таких средств актуально [2, 19]. Привлекают внимание препараты на основе лекарственных растений (ЛР), многие из которых наделяют седативными и/или анксиолитическими свойствами. У значительного числа ЛР эти свойства верифицированы [2,4,13,15,19]. Изучение действующих веществ ЛР важно как для создания монокомпонентных

препаратов, так и для определения биофармацевтических закономерностей суммарных фитопрепаратов. Цель данной публикации – обобщение данных о фенольных соединениях как действующих веществах седативных и анксиолитических ЛР.

Анксиолитические свойства флавоноидов впервые выявлены в 1990 г. [11] и значительно менее известны по сравнению с другими видами их активности. В то же время, флавоноиды как анксиолитики изучены значительно подробнее, чем другие группы БАВ. Лигандами бензодиазепиновых сайтов ГАМК-рецепторов (БР) являются аментофлавоны, байкалин, байкалеин, вогонин, гиспидуллин, лютеолин-7-диглюкуронид, флавоны, 6-гидроксифлавоны; 6,2'-дигидрокси-5,7,8,6'-тетраметоксифлавоны; 6-метилапигенин. Хризин и апигенин к тому же активны *in vivo* и приближаются к диазепаму по выраженности анксиолитического действия, отличаясь большим интервалом между анксиолитическими и седативными дозами [7,11,19,20]. Халкон изоликвиритигенин аллостерически усиливает реакции через БР [16]. Аффинность производных аментофлавона (бифлавоноидов гинкго), кверцетина, кемпферола, лютеолина к данным рецепторам невелика. Лютеолин обеспечивает анксиолитический эффект *in vivo* (возможно влияние его метаболитов и/или вовлечение иных нейротрансмиссивных систем) [8,20].

Возможен и агонистическое, и антагонистическое влияние флавоноидов на БР, а также селективность к их подтипу. Так, байкалин, активный и достаточно безопасный анксиолитик *in vivo*, преимущественно аффинен к α -2 и α -3 подтипам ГАМК-А рецепторов (в отличие от диазепама, влияющего в основном на α -1 и α -5 подтипы) [12]. Цирсильол относительно селективен к БР типа I; 5,7,2'-тригидрокси-6,8-диметоксифлавоны и вогонин – частичные агонисты БР типа I, ороксиллин А – специфичный антагонист БР типа II, скрофулеин и динамин – антагонисты и частичные агонисты БР [11,12,20]. Миристицин проявляет анксиогенные свойства, блокируя БР – подобно флумазенилу уменьшает анксиолитический эффект мидазолама [10]. L-теанин, *per se* не вызывающий анксиолиз через ГАМК-А рецепторы, – синергист мидазолама (аддитивное действие *in vivo*) [6].

В одном ЛР могут присутствовать соединения с разнонаправленным психотропным действием. Так, среди флавоноидов *Scutellaria baicalensis* Georgi есть как агонисты, так и антагонисты БР [20]. Мишенью флавоноидов могут являться и иные аллостерические сайты ГАМК-А-бензодиазепин-барбитурового рецепторного комплекса. Байкалеин снижает тревожность *in vivo*

через ГАМК-ергический механизм, не опосредованный БР [9]. 2'-метокси-6-метилфлаван потенцирует действие ГАМК через $\alpha 2\beta 1\gamma 2L$ ГАМК(A)-рецепторы и все подтипы ГАМК(A)-рецепторов, содержащие $\alpha 1$ -субъединицу, влияет на рецепторы, содержащие $\alpha 2/\gamma 2$ -субъединицу, а также непосредственно активирует $\alpha 2\beta 2/\gamma 2L$ ГАМК(A)-рецепторы [3]. Кверцетин, апигенин, морин, хризин и флаван ингибируют реакции через $\alpha(1)\beta(1)\gamma(2s)$ ГАМК(A)- и $\rho(1)$ ГАМК(C)- рецепторы. Хризин и апигенин являются антагонистами $\alpha(1)\beta(1)\gamma(2s)$ ГАМК(A)-рецепторов. Увеличивают ГАМК-ергическую нейротрансмиссию через модуляцию действия лигандов ГАМК-A рецепторов 3-ацетокси-4'-метоксифлаван ($\alpha(1,2,3,5)\beta(2)\gamma(2L)$ та $\alpha(1)\beta(2)$ ГАМК-A рецепторы), гиспидулин и гесперидин, реализующий действие также через аденозиновые рецепторы [14].

Седативное действие проявляют аморфин, гесперидин, линарин, скутелларин, цирсилиол, анксиолитическое – диокленол, ориентин и изориентин (в больших дозах действие изменяется на седативное, что характерно для многих фитоанксиолитиков) [5,15].

С флавоноидами в определенной степени ассоциируют анксиолитическое действие следующих ЛР: *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (апигенин), *Turnera aphrodisiaca* Ward. (апигенин), *Valeriana officinalis* L. та *Valeriana wallichii* DC (6-метилапигенин, гесперидин, линарин), *Scutellaria lateriflora* L. (байкалин и байкалеин), *Tilia americana* var. *mexicana* (Schltdl) Hardin (тилирозид, кверцетин, кверцитрин, кемпферол и их гликозиды), *Sesoplia glazoui* Sneth (ориентин, изоориентин), *Croton celtidifolius* (проантоцианидины), а также *Cissus sicyoides* L. (CS), *Stachys lavandulifolia* Vahl., *Passiflora incarnata* L., *Erythrina velutina* Willd., *Aethusa cynapium* L., *Apocynum venetum* L. [2,7,14,15].

Среди простых фенолов анксиолитические свойства присущи пеонолу, розавину, сирингину, седативно-гипнотические – салидрозиду, антидепрессивные и анксиолитические – розмариновой и кофейной кислотам [1,13,17,18]. Механизм действия последних связан с модуляцией $\alpha 1_A$ -адренорецепторной сигнальной трансдукции [17]. Этиловый эфир кофейной кислоты является лигандом БР [20]. 4-гидроксibenзильовый спирт и 4-гидроксibenзальдегид вызывают анксиолиз через БР, ГАМК-A и 5-HT(1a)-рецепторы [13].

У фуранокумаринов феллоптерина, бьякангеликола, императорина выявлена аффинность к ГАМК-A-рецепторам, наиболее активен феллоптерин – частичный агонист бензодиазепиновых рецепторов [4].

Седативный эффект проявляет лигнан янгамбин,

анксиолитический – обоватол, анксиолитический и седативный – гонокиол, магниол. Обоватол и гонокиол активируют СГ-каналы, связанные с ГАМК-А-бензодиазепин-барбитуровым рецепторным комплексом [4]. Аффинность к БР установлена у лигнана гидроксипиnoreзинола [15].

Таким образом, фенольные соединения – важные компоненты ряда лекарственных растений, влияющих на ЦНС. Они являются существенным резервом совершенствования ассортимента анксиолитических и седативных лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анксиолитическая активность некоторых фитопрепаратов и фенилпропаноидов / Куркин В.А., Дубищев А.В., Ежков В.Н., Титова И.Н. // Растительные ресурсы. – 2007. – Т.43, №3. – С. 130–139.
2. Лікарські рослини, що мають седативну, анксиолітичну та спряжені види фармакологічної активності, їх біологічно активні речовини та механізми їхньої дії / Данилов С.А., Товчига О.В., Степанова С.І., Штриголь С.Ю. // Фармаком. – 2011. – №4. – С. 68–87.
3. 2'-Methoxy-6-methylflavone: a novel anxiolytic and sedative with subtype selective activating and modulating actions at GABA(A) receptors / N. Karim, J. Curmi, N. Gavande et al. // Br. J. Pharmacol. – 2012. – Vol. 165, №4. – P. 880–896.
4. Ai J. Medicinal plants as a source of novel brain GABAA/benzodiazepine receptor ligands: thesis dissertation Ph.D. / J. Ai. – Roskilde, Denmark, 1999. – 167 p.
5. Anxiolytic and anticonvulsant effects of dioclenol flavonoid isolated from stem bark of *Dioclea grandiflora* on mice / E.R. De Almeida, H.S. Xavier, T.M. Chaves et al. // Intern. J. of Appl. Res. in Nat. Prod. – 2009–2010. – Vol. 2, №4. – P. 44–51.
6. Anxiolytic effects of L-theanine--a component of green tea--when combined with midazolam, in the male Sprague-Dawley rat / T. Heese, J. Jenkinson, C. Love // AANA J. – 2009. – Vol. 77, №6. – P. 445–449.
7. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects // H. Viola, C. Wasowski, M. Levi de Stein et al. // Planta Med. – 1995. – Vol. 61, №3. – P. 213–216.
8. Assessment of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity / M. Coleta, M.G. Campos, M.D. Cotrim et al. // Behav. Brain. Res. – 2008. – Vol. 189, №1. – P. 75–82.
9. de Carvalho R.S. Involvement of GABAergic non-benzodiazepine sites in the anxiolytic-like and sedative effects of the flavonoid baicalein in mice / R.S. de Carvalho, F.S. Duarte, de Lima T.C. // Behav. Brain Res. – 2011. – Vol. 221, №1. – P. 75–82.
10. Evaluation of the anxiolytic properties of myristicin, a component of nutmeg / E. Leiter, G. Hitchcock, S. Godwin et al. // AANA J. – 2011. – Vol. 79, №2. – P. 109–114.

-
11. Flavonoids and the CNS: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds / A.C. Paladini, M. Marder, H. Viola et al. // J. Pharm. Pharmacol. – 1999. – Vol. 51, №5. – P. 519–526.
 12. GABA A receptor subtype selectivity underlying selective anxiolytic effect of baicalin / F. Wang, Z. Xu, L. Ren et al. // Neuropharmacology. – 2008. – Vol. 55, №7. – P. 1231–1237.
 13. Gilhotra N. A review on antianxiety plants / N. Gilhotra, D. Dhingra // Natural product radiance. – 2008. – Vol. 7, №5. – P. 476–483.
 14. Guzmán-Gutiérrez S.L. Pharmacological exploration of the sedative mechanism of hesperidin identified as the active principle of *Citrus sinensis* flowers / S.L. Guzmán-Gutiérrez, A. Navarrete // Planta Med. – 2009. – Vol. 75, №4. – P. 295–301.
 15. Houghton P.J. The scientific basis for the reputed activity of Valerian / P.J. Houghton // J. Pharm. Pharmacol. – 1999. – Vol. 51, №5. – P. 505–512.
 16. Isoliquiritigenin, a chalcone compound, is a positive allosteric modulator of GABAA receptors and shows hypnotic effects / S. Cho, S. Kim, Z. Jin et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – Vol. 413, №4. – P. 637–642.
 17. Pharmacological characterization and mechanisms of the novel antidepressive- and/or anxiolytic-like substances identified from *Perillae Herba* / M. Tsuji, K. Miyagawa, T. Takeuchi, H. Takeda // Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi. – 2008. – Vol. 28, №4. – P. 159–167.
 18. PHARMACOLOGICAL STUDIES ON THE SEDATIVE AND HYPNOTIC EFFECT OF SALIDROSIDE FROM THE CHINESE MEDICINAL PLANT *RHODIOLA SACHALINENSIS* / T. LI, G. XU, L. WU, C. SUN // PHYTOMEDICINE. – 2007. – VOL. 14, №9. – P. 601–604.
 19. Spinella M. The psychopharmacology of herbal medicine : plant drugs that alter mind, brain, and behavior / Spinella M. – Cambridge, Massachusetts, London: MIT Press, 2001. – 578 p.
 20. Tsang S.Y. Development of effective therapeutics targeting the GABAA receptor: naturally occurring alternatives / S.Y. Tsang, H. Xue // Curr. Pharm. Design. – 2004. – Vol 10. – P. 1035–1044.
-

ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОРТОВ И СОРТОТИПОВ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

Трубников А.А.

ГОУ ВПО Ярославская государственная медицинская академия,
Ярославль, Россия, тел.: +79038250838, atrub@rambler.ru

Календула лекарственная (*Calendula officinalis* L.) – одно из самых популярных и широко используемых в мире лекарственных растений. Разнообразие ее химического состава обуславливает разносторонние фармакологические эффекты препаратов календулы. Известно более 100 ее сортов и сортотипов

отечественной и зарубежной селекции. В литературе описаны различия в содержании фармакологически активных веществ, в том числе каротиноидов и фенольных соединений в зависимости от окраски соцветий [3,4,6]. Однако, полного сравнительного изучения сортов и сортотипов календулы лекарственной, выращенных в условиях Центрально-нечерноземного региона РФ не проводилось. В связи с этим, целью нашего исследования явилось сравнительное фитохимическое изучение доступных нам сортов и сортотипов календулы.

Всего в условиях учебно-практической базы «Скобыкино» ЯГМА нами выращено 47 сортов и сортотипов селекции РФ, Великобритании и Японии. Уход за растениями заключался в регулярной прополке и при длительном отсутствии дождей – в поливе. Сырье заготавливали в июле-августе и высушивали в тени при комнатной температуре.

Для количественного определения суммы каротиноидов в цветках календулы мы использовали известную методику [7], модифицированную применительно к объекту исследования. Кратность и длительность экстракций существенно сказываются на выходе действующих веществ из лекарственного растительного сырья, поэтому одной из задач исследования явилась разработка методики количественного определения суммы каротиноидов. При этом отмечено, что наиболее полное извлечение суммы каротиноидов достигалось при трехкратном экстрагировании в течение 15 минут.

Методика количественного определения суммы каротиноидов: 0,5 г измельченных цветков календулы (точная навеска) заливали 30 мл 100% ацетона и нагревали в колбе с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Вытяжку охлаждали, фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяли 3 раза, фильтруя в ту же колбу, и после охлаждения доводили объем извлечения ацетоном до метки. Оптическую плотность раствора определяли на спектрофотометре СФ – 56 при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали 100% ацетон. Содержание суммы каротиноидов в цветках календулы вычисляли с использованием удельного показателя поглощения β -каротина-стандарта (2773) [7].

При анализе полученных данных нами выявлено, что больше всего суммы каротиноидов накапливалось в цветках календулы сорта «Красный дракон» - 118,5 мг%, а меньше всего – 16,3 мг% в цветках сортосмеси «Арт Шейдс» (бело-желтая окраска).

При анализе полученных данных отмечено, что максимум

каротиноидов содержался в сортах календулы, имеющих ярко-желтую или золотистую окраску, а не оранжевую.

Для количественного определения содержания суммы флавоноидов нами разработана спектрофотометрическая методика. При ее разработке определяли оптимальные условия экстракции суммы флавоноидов из сырья календулы. Выявлено, что максимальное количество суммы флавоноидов извлекается из цветков календулы 40% этиловым спиртом при трехкратной экстракции в течение 15 минут.

Согласно литературным источникам [4,5,8] основными флавоноидами календулы являются производные изорамнетина. Однако ряд авторов предлагает пересчитывать содержание суммы флавоноидов календулы либо на кверцетин [2], либо на рутин [1,9,11]. В связи с этим, нами предприняты исследования по изучению спектра поглощения комплекса сумма флавоноидов календулы - алюминия хлорид в уксусно-уротропиновом буфере.

Максимум поглощения комплекса наблюдался при $\lambda=407\pm2$ нм, что по литературным данным соответствует рутину [9]. В связи с этим, пересчет содержания суммы флавоноидов в цветках календулы проводили с использованием удельного показателя комплекса рутин – алюминия хлорид в уксусно-уротропиновом буфере, который равен 187,36.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в цветках календулы: Около 1 г сырья (точная навеска) сырья помещали в колбу вместимостью 100 мл, заливали 30 мл 40% этилового спирта, закрывали обратным холодильником и нагревали на водяной бане в течение 15 мин. Извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл через бумажный фильтр. Экстракцию описанным способом повторяли еще два раза. Сырье на фильтре промывали 10 мл горячего 40% этилового спирта. После охлаждения доводили объем колбы 40% этиловым спиртом до метки.

5 мл извлечения переносили в мерную колбу на 25 мл, добавляли 10 мл 96% спирта, 0,5 мл 33% уксусной кислоты, 1,5 мл 10% раствора алюминия хлорида, 2 мл 5% раствора гексаметилентетрамина и доводили до метки дистиллированной водой. Через 40 минут определяли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-56 в видимой области спектра при длине волны 425 нм, в кювете с длиной рабочего слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали смесь, состоящую из 5 мл извлечения, 10 мл 96% спирта, 0,5 мл 33% уксусной кислоты и воды дистиллированной до 25 мл.

Количественное содержание суммы флавоноидов

рассчитывали с использованием удельного показателя поглощения рутин-алюминиевого комплекса в уксусно-уротропиновом буфере, равному 187,36.

Содержание суммы флавоноидов в изученных сортах и сортотипах варировало в пределах от 1,29% (сорт Неон, «Аэлита») до 2,33% (сорт Языки пламени).

Сортами и сортотипами с достаточно большим содержанием суммы флавоноидов явились: Абрикос (2,16%), Патио (2,12%), Гейша (2,11%) и Солнце Египта (2,08%). Низкое содержание суммы флавоноидов отмечено в следующих сортах и сортотипах: Фиеста Гитана желтая (1,47%), Тач оф ред (1,38%), Индийский принц (1,33%).

Для количественного определения суммы гидроксикоричных кислот нами использована прямая спектрофотометрия спиртового извлечения. При разработке оптимальных условий экстракции выявлено, что максимальное количество суммы гидроксикоричных кислот извлекается из сырья 70% этиловым спиртом при трехкратной экстракции в течение 30 мин.

Методика количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в цветках календулы: Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, заливали 30 мл этилового спирта, закрывали обратным холодильником и нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл через бумажный фильтр. Экстракцию описанным способом повторяли еще два раза. После охлаждения доводили объем колбы 70% этиловым спиртом до метки. 1 мл извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки 70% этиловым спиртом. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-56, при $\lambda=325$ нм, в кювете с толщиной рабочего слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали чистый 70% этиловый спирт.

Количественное содержание суммы гидроксикоричных кислот рассчитывали по формуле, с использованием удельного показателя поглощения хлорогеновой кислоты (504,425)[10].

Содержание суммы гидроксикоричных кислот в изученных сортах и сортотипах варировало в пределах от 3,65% (сорт Голден бьюти) до 2,03% (сорт Шелковый путь).

Сортами и сортотипами с достаточно большим содержанием суммы гидроксикоричных кислот явились: Гейша (3,35%), розовый сюрприз (3,34%), Болс Суприм (3,33%). Низкое содержание суммы гидроксикоричных кислот отмечено в следующих сортах и

сортотипах: Пигми золотая (2,17%) и Щербет (2,18%). Сопоставив окраску цветков и содержание гидроксикоричных кислот, выявлено отсутствие какой-либо зависимости между этими показателями, в отличие от каротиноидов и флавоноидов.

На основании полученных данных было рассчитано среднее содержание веществ во всех сортах в целом. Для каротиноидов это значение составило 41,7628 мг%, для флавоноидов – 1,7765 % и гидроксикоричных кислот – 2,7682 %. Опираясь на эти данные, мы попытались найти сорта с достаточно большим содержанием всех трех групп веществ. Из всех 47 сортов, только в трех содержание каротиноидов, флавоноидов и гидроксикоричных кислот превысило среднее значение. К этим сортам относятся: Голден Бьюти, Принцесса Миксед и Желтый Леденец. Эти сорта можно использовать для получения комплексных лекарственных препаратов. Выделены также сорта с содержанием всех групп веществ ниже среднего значения: Фиеста Гитана смесь, Фиеста Гитана желтая и Янтарная тайна, которые не рекомендуются для выращивания в качестве лекарственного сырья.

Установлена некоторая зависимость содержания фенольных соединений и окраски цветков календулы. Так, наименьшее количество суммы каротиноидов и суммы фенольных соединений накапливалось в цветках сортов и сортотипов календулы с кремовой и розовой окраской.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллабекова, В.Н. Разработка метода количественного анализа цветков календулы лекарственной / В.Н. Абдуллабекова, А.А. Тулганов // Хим.- фармац. журнал.- 2001.- № 10.- С. 25-26.
2. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд.-е, 1990. – 333 с.
3. Ивасенко, С.А. Содержание каротиноидов и флавоноидов в соцветиях некоторых сортов *Calendula officinalis* L. / С.А. Ивасенко, Л.Н. Прибыткова, С.М. Адекенов и др. // Растит. ресурсы. – 2000. – Вып. 2. – С. 107-110.
4. Исмагилов, Р.Р. Календула / Р.Р. Исмагилов, Д.А. Костылев. – Уфа, 2000. – 102 с.
5. Коновалова, О.А. Биологически активные вещества *Calendula officinalis* / О.А. Коновалова, К.С. Рыбалко // Растительные ресурсы. - 1990. - Вып.3.- С. 448-463.
6. Омельчук, М.А. Влияние режимов сушки на качество сырья ноготков лекарственных / М.А. Омельчук, Б.А. Кривут, А.И. Ворошилов и др. // Хим. – фармац. журн. - 1984.- № 3. – С. 329-331.
7. Первушкин, С.В. Методики идентификации различных пигментов и количественного спектрофотометрического определения суммарного содержания каротиноидов и белка в фитомассе *Spirulina platensis*

-
- (Nords) Geilt. / С.В. Первушкин, В.А. Куркин, А.В. Воронин и др. // Растительные ресурсы. - 2002.- Вып. 1.- С. 113-114.
8. Сампиев, А.М. К вопросу о действующих веществах и проблеме стандартизации препаратов Календулы лекарственной (Обзор) / А.М. Сампиев // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. – Материалы IV Международного съезда. - Великий Новгород, 2000. - С. 310-313.
 9. Слеува, Е.К. Оценка содержания суммы флавоноидов в настойке календулы / Е.К. Слеува, Е.Н. Жукович, Л.А. Шарикова и др. // Фармация. – 2003. - №3. – С. 13-15.
 10. Трубников А.А. Фармакогностическое изучение цикория дикорастущего и культивируемого в Ярославской области: Автореферат дисс. ... канд. фармац. наук /А.А. Трубников. – Пермь, 2000. – 23 с.
 11. Шарова, О.В. Флавоноиды календулы лекарственной / О.В. Шарова, В.А. Куркин // Химия растительного сырья. – 2007. – №1. – С. 65 – 68.
-

УДК 615.322

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ КАЛИНЫ В СОСТАВЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Фоменко С.Е.

Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева
Дальневосточное отделение Российской академии наук, Владивосток,
Россия, тел. (423)-2-370-302, sfomenko@poi.dvo.ru

На современном этапе развития общества в производстве продуктов здорового питания широко используются пищевые добавки, которые влияют на функции тех или иных систем организма [1]. Отсюда растущая популярность функциональных ингредиентов, повышающих резистентность организма человека к различным заболеваниям, способные сохранять и стабилизировать метаболические процессы в организме и тем самым участвовать в сохранении его активности. В последнее время особое внимание уделяется соединениям природного происхождения, обладающим антиоксидантными свойствами. Это обусловлено, с одной стороны, их постоянным и выраженным дефицитом в питании, а с другой – исключительной эффективностью в предотвращении развития стресс-индуцированных состояний, которые могут привести к срыву адаптации и развитию болезней стресса (язва желудочно-кишечного тракта, гипертоническая болезнь, инфаркт миокарда,

сахарный диабет и др.) [2].

Среди соединений антиоксидантного действия наиболее перспективными являются комплексы природных полифенолов, которые входят в состав растительных продуктов, традиционно употребляемых человеком в пищу и являются эволюционно-адаптированными для человеческого организма. Растущий интерес к использованию растительных полифенолов определен их фармакологическими свойствами: они обладают широким спектром биологической активности, включая антибактериальную, противораковую, противовоспалительную, сосудорасширяющую, ингибируют процессы перекисного окисления липидов, агрегацию тромбоцитов, снижают хрупкость и проницаемость капилляров [3]. Природные соединения в отличие от синтезированных имеют крайне низкую токсичность, не вызывают побочных реакций (аллергия, отторжения организмом, эффект привыкания, накопления).

В ранее проведенных исследованиях на животных мы установили, что суммарный полифенольный комплекс, выделенный из отвара калины (гребни, косточки, кожица ягод), обладает гепатопротекторными свойствами в условиях экспериментального стресс-воздействия [4]. Экстракт калины (*Viburnum Sargentii Koehne*) зарегистрирован как биологически активная добавка (БАД) к пище под торговой маркой «Калифен»TM (свидетельство на товарный знак - RU № 228327, ТУ 9168-079-00480052-07) и запатентован как средство, обладающее антирадикальной активностью (патент № 2220614). Химический состав водно-спиртового комплекса был исследован с помощью жидкостного хроматографа LKB (Bromma, Sweden). БАД включает широкий диапазон полифенольных соединений: катехины, лейкоантоцианы, флавонолы, процианидины, олигомерные танины и лигнин, а также ряд других классов органических соединений (органические кислоты, свободные аминокислоты, сахара). Полифенолы флавоноидной природы составляют свыше 60% от сухого веса экстракта.

Крайне низкая токсичность «Калифена» ($LD_{50} = 36$ мл/кг) и отмеченный высокий биологический эффект послужили основанием для изучения природного комплекса из калины на организм человека в условиях сочетанного воздействия стрессовых факторов. Для этого было проведено комплексное исследование состояния организма студентов младших курсов, испытывающих умственное и психолого-эмоциональное напряжение в период учебы и экзаменов на фоне не всегда благоприятных условий жизни (несбалансированный рацион питания, нарушение режима

труда и отдыха, вредные привычки, низкая физическая активность и др.).

Целью работы явилось использование полифенольного комплекса из калины в составе функционального продукта мармелада желейного (торговое название «БИОЛАД», ТУ 9128-152-02067936-2006) для адаптации студентов к учебной нагрузке.

В исследовании участвовали юноши-добровольцы в возрасте 19-20 лет, которые были здоровы и дали информированное согласие на участие. После биохимического исследования крови натошак им было предложено ежедневно утром принимать в течение 6-ти недель по 100 г мармелада желейного, в который входит БАД «Калифен» в дозе, равноценной 100 мг общих полифенолов, что соответствует допустимой терапевтической дозе [5]. В контрольную группу включено 20 здоровых мужчин-доноров сопоставимого возраста.

Состояние антиоксидантной системы оценивали по величине антирадикальной активности крови [6], активности супероксиддисмутазы [7], глутатионпероксидазы [8], уровня восстановленного глутатиона [9], малонового диальдегида [10]. Осмотическую резистентность эритроцитов определяли по общепринятому методу, активность лизосомальной β -галактозидазы и β -глюкозидазы - по методу Р.В. Меркурьевой и соавт. [11].

Биохимическое исследование плазмы крови (таблица) при первичном обследовании студентов (2-я группа) показало снижение уровня восстановленного глутатиона на 29 % ($p<0,01$) по отношению к контролю и, соответственно, на 14% ($p<0,001$) ниже нормы зафиксирована активность ключевого фермента глутатионпероксидазы (ГП). Активность супероксиддисмутазы (СОД), которая, как известно, ускоряет реакцию дисмутации супероксид-аниона и переход его в протонированную форму, была повышена на 7% ($p<0,05$) по сравнению с контролем. В то же время уровень общей антирадикальной активности (АРА) плазмы крови был снижен на 27% ($p<0,001$). Это свидетельствует о напряжении системы антиоксидантной защиты мембранных структур клеток в связи с разрушительным действием активных форм кислорода, что говорит о начале развития дисбаланса в соотношении прооксидантных и антиоксидантных параметров, и в дальнейшем может привести к развитию состояния, называемого оксидативным стрессом.

Таблица 1.

Влияние полифенольного комплекса из калины в составе мармелада на биохимические показатели в крови студентов ($M \pm m$)

Показатели	1-я группа Контроль (здоровые доноры)	2-я группа (студенты) До приема мармелада	3-я группа (студенты) После приема мармелада
СОД (усл. ед. активности)	842 $\pm$ 12	899 $\pm$ 24 [*]	854 $\pm$ 12
ГП (нмольНАДФН/ мин/мл)	61,21 $\pm$ 2,7	53,87 $\pm$ 1,84 [*]	62,88 $\pm$ 5,5
Г-SH (мкмоль/г Hb)	4,73 $\pm$ 0,22	3,66 $\pm$ 0,30 ^{**}	4,33 $\pm$ 0,50
АРА (мкмоль тролокса/мл)	12,30 $\pm$ 16	8,96 $\pm$ 74 ^{***}	11,65 $\pm$ 43
МДА (мкмоль/мл)	3,54 $\pm$ 0,11	4,02 $\pm$ 0,18 [*]	3,54 $\pm$ 0,22
β -галактозидаза (нмоль/мин/мл)	6,62 $\pm$ 0,15	7,26 $\pm$ 0,11 ^{**}	6,42 $\pm$ 0,14
β -глюкозидаза (нмоль/мин/мл)	5,21 $\pm$ 0,14	6,53 $\pm$ 0,12 ^{***}	5,60 $\pm$ 0,18

Примечание: Различия статистически значимы по сравнению с контролем:

* – $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$. МДА – малоновый диальдегид, СОД – супероксиддисмутаза, АРА – антирадикальная активность, ГП – глутатионпероксидаза, Г-SH – восстановленный глутатион.

Достоверное увеличение в крови испытуемых (2-я группа) концентрации малонового диальдегида на 14% ($p < 0,05$) определяет активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ), и, как следствие, нарушается пространственно-структурная целостность мембран и повышается их проницаемость. Подтверждением этого является снижение порога окончания гемолиза эритроцитов до 0,40 $\pm$ 0,01% NaCl, в то время как начало гемолиза соответствовало норме (в норме гемолиз эритроцитов начинается при концентрации 0,45% NaCl, завершается при 0,35% NaCl). Иными словами, мембрана эритроцитов обладает пониженной устойчивостью к гемолизирующему агенту. Также в пользу вывода о повышении проницаемости мембран свидетельствует увеличение в плазме крови активности матричного фермента лизосом β -галактозидазы на 10% ($p < 0,01$) и мембраносвязанного β -глюкозидазы на 25% ($p < 0,001$) по отношению к контролю.

Таким образом, исследованные биохимические параметры крови говорят о том, что под действием учебной нагрузки в организме студентов активируются свободно-радикальные процессы, которые истощают антиоксидантную систему организма, что обуславливает повышение ПОЛ и проницаемости мембран.

Ежедневный прием «Калифена» в составе мармелада в течение 1,5 месяцев (3-я группа) сопровождался нормализацией показателей антиоксидантной и антирадикальной защиты организма в крови испытуемых (таблица). Начало гемолиза эритроцитов снизилось до $0,40 \pm 0,01\%$ NaCl, а завершение гемолиза происходило при $0,30 \pm 0,01\%$ NaCl. Обращает на себя внимание факт более сильной устойчивости эритроцитов к понижению концентрации NaCl. Границы устойчивости повысились на $0,05\%$ NaCl по сравнению с таковыми величинами в контроле. В свою очередь активность лизосомальных ферментов снизилась до контрольных величин.

Выраженный эффект «Калифена» обусловлен входящими в его состав растительными полифенолами, которые играют важную роль в защите организма от повреждающего действия активных форм кислорода [12]. Являясь «ловушками» свободных оксигенных и пероксильных радикалов, они образуют относительно стабильный феноксил-радикал, обеспечивая «обрыв» цепи свободно-радикального процесса. При этом сдерживаются процессы ПОЛ и снимается состояние оксидативного стресса [13].

Таким образом, внедрение в практику пищевых добавок с полифенольными комплексами и функциональных продуктов питания на их основе позволит не только эффективно бороться с последствиями воздействия на организм неблагоприятных факторов, связанных с учебной и профессиональной деятельностью, но и сделать организм более устойчивым к их действию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нечаев А. П. Производство продуктов здорового питания требует государственной поддержки // Пищевые ингредиенты: сырье и добавки. 2005. № 1. С. 5-7.
2. Тутьянь В. А. Биологически активные добавки к пище как элемент оптимального питания // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения / Материалы VIII Международного съезда «Фитофарм 2004», 21-23 июня 2004 г., Миккели, Финляндия, С-Пб.: ВВМ, 2004. С.595-598.
3. Manach C., Williamson G, Morand C., Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies // Amer. J. Clin. Nutr. 2005. V.81, N 1. P. 230-242.
4. Кушнерова Н.Ф., Спрыгин В.Г., Фоменко С.Е., Рахманин Ю. А. Влияние

-
- стресса на состояние липидного и углеводного обмена печени, профилактика // Гигиена и сан. 2005. № 5. С. 17-21.
5. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Доклиническое изучение гепатозащитных средств // Вестник фарм. комитета. 1999. № 2. С. 9.
 6. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay // Free Radic. Biol. Med. 1999. V. 26, N 9-10. P. 1231-1237.
 7. Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. A sensitive spectrophotometric methods for the determination of superoxide dismutase activity in the tissue extract // Anal. Biochem. 1986. V. 154, N 2. P. 536-541.
 8. Lawrence R. A., Burk R. F. Glutathion peroxidase activity in selenium-deficient rat liver // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976. V. 71. P. 952-958.
 9. Новгородцева Т. П., Эндакова Э. А., Янькова В. И. Руководство по методам исследования параметров в системе «перекисное окисление липидов - антиоксидантная защита» в биологических жидкостях. - Владивосток: Изд-во Дальневост. гос. ун-та. 2003. 80с.
 10. Buege J. A. , Aust S. D. Microsomal lipid peroxidation // Methods in Enzymology. 1978. V. 52. P.302-310.
 11. Меркурьева Р. В., Билич Г. Л., Нарциссов Р. П. Биохимические и цитохимические методы определения активности ферментов и фермент-субстратных систем различной клеточной локализации. - М.: Йошкар-Ола. 1982. – 40с.
 12. Rodrigo R., Bosco C. Oxidative stress and protective effect of polyphenols: comparative studies in human and rodent kidney. A review // Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. 2006. V. 142, N 3-4. P. 317-327.
 13. Sanz M. J., Ferrandiz M. L., Cejudo M. Influence of a series of natural flavonoids on free-radical generating systems and oxidative stress // Xenobiotica. 1994. V. 24, N 7. P. 689-699.
-

ГРУЗИНСКОЕ (КАХЕТИНСКОЕ) ВИНО КАК ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ПИЩА

**Шалашвили А.Г., Угрехелидзе Д.Ш., Митаишвили Т.И.,
Таргамадзе И.Л., Замбахидзе Н.Е.**

Грузинский Аграрный Университет, Тбилиси, Грузия, тел. 995-595 474 056,
e-mail armazsh@yahoo.com

Функциональной пищей являются продукты питания улучшающие здоровье человека, снижающие риск заболеваний и способствующие увеличению продолжительности жизни [1,2].

Одними из основных компонентов функциональной пищи,

являются антиоксиданты, представляющие собой вещества различной химической природы. Антиоксиданты, обладая разнообразными лечебными свойствами, значительно снижают повреждения клеток и тканей. К антиоксидантам относятся, широко распространенные в растительном мире фенольные соединения, которые обладают физиологической активностью. Интерес к фенольным соединениям значительно возрос, после того, как была установлена их высокая антиоксидантная активность и способность защищать организм человека от разрушительного воздействия свободных радикалов [3]. Фенольные соединения вина обуславливают т.н. французский парадокс, суть которого заключается в снижении риска развития коронарного атеросклероза в случае одновременного приема с жирной пищей красного вина. В связи с вышесказанным, особое значение приобретает выявление таких пищевых продуктов, которые в большом количестве содержат фенольные соединения. В этом аспекте, привлекают к себе особое внимание белые и красные вина, приготовленные по кахетинской технологии, в которых содержание фенольных соединений составляет соответственно 1,330 – 2,430 мг/л и 2,898 – 4,416 мг/л [4].

Целью нашей работы явилось изучение методом ВЭЖХ качественного состава и количественного содержания фенольных соединений в белых и красных винах, приготовленных по кахетинской технологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ:

Анализируемые образцы вин приготовили осенью 2010 года из культивируемых в Грузии автохтонных сортов винограда белого Ркацители и красного Саперави (Кахетия, соответственно села Чумлаки и Велисцихе). Виноград Ркацители (80 кг) и Саперави (70 кг), без отделения гребней, подвергли дроблению на валковой дробилке, после чего по отдельности мезга с гребнями была помещена в 70-ти литровые, закопанные в землю, глиняные кувшины квеври. В случае винограда Ркацители сбраживание мезги проводили с погруженной шапкой и последующей выдержкой виноматериала на мезге в течение 120 дней. Брожение мезги винограда Саперави проводили с плавающей шапкой в течение 9 дней с перемешиванием несколько раз в сутки. В обоих случаях были применены местные дрожжи. После отделения от мезги и гребней виноматериалы хранили в стеклянных бутылках.

Для фракционирования фенольных соединений применили метод экстракции жидкость-жидкость [5]. Для этого по 1000 мл каждого вина подвергли деалкоголизации на ротационном вакуум-испарителе при 40°C. Деалкоголизированные вина (рН довели до

2) исчерпывающе экстрагировали этилацетатом. Этилацетатные экстракты объединили, выпарили в вакууме при 30°C и растворили в воде. Водные растворы довели до pH 7 и вновь экстрагировали этилацетатом. Полученные органические фазы выпарили в вакууме при 30°C, до сухих остатков, растворили в метаноле и обозначили: белое вино Ркацители - фракция X1 и красное вино Саперави - X3. Водные фазы подкислили до pH 2, проэкстрагировали этилацетатом и выпарили до сухих остатков в вакууме при 30°C. Остатки растворили в метаноле и обозначили: белое вино Ркацители - фракция X2 и красное вино Саперави - X4. Идентификацию фенольных соединений осуществили методом ВЭЖХ („Gilson 116"), с ультрафиолетовым детектором. Хроматографию провели на колонке „Zorbax ODS" с высотой 24 см и диаметром 4,6 мм. В качестве растворителя применили систему: метанол - 4% уксусная кислота, максимум поглощения 280 нм, температура 24°C. Объем анализируемого образца 20 мкл, скорость вытекания 0,2 мл/мин. Идентификацию веществ осуществили в сравнении с временами удерживания аутентичных фенольных соединений. В качестве аутентичных образцов были применены: (+)-катехин, (-)-эпикатехин, (-)-галлокатехин, кемпферол и галловая кислота („Sigma"), кверцетин и рутин („Chemapol"), резвератрол („Bio-Tech Co.") протокатеховая, сиреневая, о-кумаровая и кофейная кислоты („Reachim").

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Как следует из полученных данных (таблица), белое вино Ркацители (фракция X1) содержит: (+)-катехин – 32 мг/л, (-)-эпикатехин – 58,6 мг/л, (-)-галлокатехин – 43,7 мг/л, красное вино Саперави - (фракция X3) соответственно – 115,4 мг/л, 29,7 мг/л и 174,5 мг/л. Таким образом, по содержанию катехинов, белые и красные вина существенно отличаются друг от друга. Красное вино Саперави содержит соответственно в 3.6 раз и в 4 раза больше (+)-катехина и (-)-галлокатехина, в то время как в белом вине Ркацители (-)-эпикатехин в 2 раза преобладает над таковым в красном вине Саперави. Флавонолы вина Саперави (фракция X3) представлены кемпферолом - 13.2 мг/л, кверцетином - 7.3 мг/л и рутином – 2.6 мг/л. Следует отметить, что определенное количество кверцетина (3.9 мг/л) содержит и фракция X4 красного вина Саперави. В фракции X1 белого вина Ркацители эти соединения не обнаружены, также не найден резвератрол, который в красном вине Саперави (фракция X3) содержится в количестве 1.47 мг/л.

Из оксобензойных кислот в вине Ркацители (фракция X2) обнаружены протокатеховая – (12.8 мг/л) и галловая (26.7 мг/л)

кислоты - 26.7 мг/л, в вине Саперави их количество соответственно составляет 14.5 мг/л и 21.8 мг/л. Оксикоричные кислоты в вине Саперави (фракция X4) представлены кофейной кислотой - 7.4 мг/л, о-кумаровая и сиреневая кислоты находятся в виде следов. В вине Ркацители (фракция X2) эти кислоты не обнаружены. Таким образом, по качественному составу и количественному содержанию фенольных соединений, красное вино из винограда Саперави значительно богаче белого вина из винограда Ркацители.

Таблица

Содержание фенольных соединений в винах из винограда
Ркацители и Саперави (мг/л)

Аутентичные фенольные соединения	Время удерживания в мин	Фракции белого вина Ркацители	
		X1	X2
(+)-Катехин	19.7	32±0.169	
(-)-Эпикатехин	32.3	58.6±0.365	
(-)-Галлокатехин	9.1	43.7±0.204	
Кемпферол	57.5	не обнаружен	
Кверцетин	53.9	не обнаружен	
Рутин	50.6	не обнаружен	
Резвератрол	51.8	не обнаружен	
Протокатеховая кислота	14.37		12.8±0.219
Галловая кислота	9.15		26.7±0.288
о-Кумаровая кислота	37.7		не обнаружена
Кофейная кислота	25.1		не обнаружена
Сиреневая кислота	29.8		не обнаружена

Аутентичные фенольные соединения	Фракции красного вина Саперави	
	X3	X4
(+)-Катехин	115.4±0.292	
(-)-Эпикатехин	29.7±0.438	
(-)-Галлокатехин	174.5±0.432	
Кемпферол	13.2±0.373	
Кверцетин	7.3±0.279	3.9±0.274
Рутин	2.6±0.392	
Резвератрол	1.47±0.323	
Протокатеховая кислота		14.5±0.396
Галловая кислота		21.8±0.287
о-Кумаровая кислота		следы
Кофейная кислота		7.4±0.357
Сиреневая кислота		следы

Значительный интерес представляет сравнение количественного содержания фенольных соединений вин из винограда Ркацители и Саперави с винами из винограда различных географических зон. В белых французских винах количественное содержание (+)-катехина и (–)-эпикатехина составляет в среднем соответственно 9.8 и 5.3 мг/л, тогда как в красных французских винах количество (+)-катехина и (–)-эпикатехина - колеблется в пределах 22.1-130.7 и 7.8-39.1 мг/л [6]. В красных винах [7] приготовленных из культивируемых в Испании сортов винограда (Темпранильо, Грасиано, Каберне и Мерло) содержание (+)-катехина составляет, соответственно – 16.01, 32.78, 41.76 и 27.09 мг/л, а (–)-эпикатехина – 9.89, 33.66, 19.74 и 19.33 мг/л, тогда как в красном вине Саперави эти соединения обнаружены в количествах, соответственно 115.5 и 29.7 мг/л (таблица). Количество (+)-катехина в красном вине Саперави в 7 раз, 3.6 раза, 2.8 раза и 4 раза больше чем в вышеприведенных испанских винах. Та же тенденция наблюдается и в случае (–)-эпикатехина. Его количество в красном вине Саперави в 3 раза выше, чем в вине из винограда сорта Темпранильо и 1.5 раза больше чем в винах из Каберне и Мерло. Из перечисленных красных сортов только вино из винограда Грасиано содержит больше (–)-эпикатехина (33.66 мг/л), чем красное вино Саперави (29.7 мг/л). Содержание кверцетина в перечисленных выше испанских красных винах, соответственно 1.88, 6.90, 5.00 и 4.67 мг/л, тогда как в красном вине Саперави эта величина достигает 11.2 мг/л. Резвератрол в красном вине Саперави содержится в количестве 1.47 мг/л, в красных винах Темпранильо и Грасиано соответственно 0.73 и 1.36 мг/л, а в красном Каберне обнаружен лишь в виде следов. В красном вине Саперави количество галловой и протокатеховой кислот составляет соответственно 21.8 и 14.5 мг/л, в четырех испанских красных винах их содержание колеблется в пределах 12.20 – 15.29 мг/л для галловой и 0,81 – 1.52 мг/л для протокатеховой кислоты. Сиреневая кислота в Саперави обнаружена в следовых количествах, тогда как в перечисленных испанских красных винах она встречается в пределах 2.60 – 5.76 мг/л.

Таким образом, вина, приготовленные по кахетинской технологии, из грузинских автохтонных сортов винограда белого Ркацители и красного Саперави, содержат в значительном количестве биологически активные катехины, флавонолы, оксibenзойные и оксикоричные кислоты и представляют собой прекрасную функциональную пищу.

ЛИТЕРАТУРА

1. Functional food, Concept to Product. ed. by Gilson G.R., Williams C.M. CRC Press, 2000, 379 p.
 2. Oke M., Paliyath G., Fisher K. H. Biotechnology in Wine Industry, in: Functional Food and Biotechnology, ed. By Shetty K., Palivath G., Pometto A. L., Levin R. E. Taylor and Francis, 2007, pp. 311-326.
 3. Shahidi F., Naczek M. Phenolics in Food and Nutraceuticals, CRC Press, 2006, 565p.
 4. Shalashvili A., Ugrekhelidze D., Targamadze I., Zambakhidze N., Tsereteli L. Phenolic Compounds and Antiradical Efficiency of Georgian (Kakhetian) Wines // Journal of Science and Engineering, 2011, V.1, N5, p. 361-365.
 5. Roussis I. G., Lambropoulou I., Soulti K. Scavenging Capacities of Some Wines and Wine Phenolic Extracts // Food Technol. Biotechnol., 2005, V.43, N4, p. 351-358.
 6. Carando S., Teissedre P.L., Pascual-Martinez L., Cabanis J.C. Levels of Flavan-3-ols in French Wines // J. Agric. Food Chem., 1999, V.47 (10), p. 4161-4166.
 7. Monagas M., Suarez R., Gomez-Cordoves C., Bartolome B. Simultaneous Determination of Nonanthocyanin Phenolic
 8. Copounds in Red Wines by HPLC-DAD/ESI-MS // Am. J. Enol. Vitic., 2005, V.56, N2, p.139-147.
-

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ РАСТЕНИЙ *RUMEX* L.

Шерматова Г.Д., Шамуратов Б.А.

Институт биоорганической химии им. акад. А.С.Садыкова, АН РУз,
Ташкент, Узбекистан, тел. (99871) 262-35-40; e-mail: ibchem@uzsci.net

Растения рода *Rumex* L. (щавель) входят в семейство гречишных (*Polygonaceae*) и широко распространены в Северной Америке, Центральной Европы, России и Восточной Азии [1]. В мире насчитывается более 200 видов этих растений и большинство из них хорошо известны в народной медицине как средства от разных недугов. Отвары и настоики из листьев и корней щавеля используются в традиционной медицине как желчегонные, антидиарейные средства, а также при лечении различных наружных кожных заболеваний [2]. В некоторых странах свежие листья щавеля используются как важный ингредиент при приготовлении салатов и супов [3].

Нами начато изучение полифенолов двух видов этого растения - *Rumex confertus* Willd (щавель конский) и *Rumex patiricus* Rech. f. (щавель памирский), произрастающих на окраинах Ташкента.

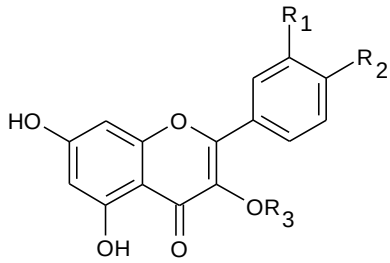
Последовательной экстракцией листьев и корней

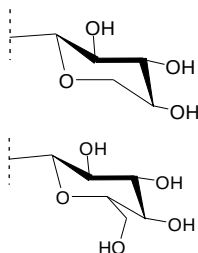
исследуемых видов растений хлороформом, 70% водным ацетоном, концентрированием экстракта под вакуумом до удаления ацетона, обработкой водного остатка этилацетатом, сгущением этилацетатного экстракта под вакуумом и добавлением концентрату гексана выделили суммы полифенолов.

Этилацетатную фракцию, выделенную из надземной части *Rumex confertus* Willd, подвергли хроматографированию на колонке с силикагелем (silica gel 200/300 mesh) и получили несколько фракции, каждая из которых содержит различные полифенолы. Затем, рехроматографированием отдельных фракций на колонке ODS Develosil и разделением их с помощью гель-фильтрации (LH-20), получили фракции, состоящие из несколько фенольных компонентов. Далее, полученные фракции были разделены с помощью ВЭЖХ (Shimadzu RID-10A) на препаративной колонке и очищены. В результате были выделены несколько флавоноидных гликозидов, которые ранее не выделялись из этого растения: (I) кверцетин 3-О-глюкоза (изокверцитрин), (II) кемпферол 3-О-глюкоза (астралин), (III) кверцетин 3-О-ксилоза (рейнонтин) и (IV) кверцетин 3-О-[β-D-ксилопиранозил-(1→2)-β-D-глюкопиранозид] [4-6].

Аналогичным методом из корней растения *Rumex pamiricus* Rech. f. были выделены три галлотаннина: 1,2,6-три-О-галлоил-β-D-глюкоза, 1,2,3,6-тетра-О-галлоил-β-D-глюкоза и 1,2,3,4,6-пента-О-галлоил-β-D-глюкоза [7,8].

Химические структуры выделенных веществ были установлены на основе спектральных данных (¹³C-¹H-ЯМР, COSY, ESIMS) и сравнением с литературными данными.

	вещество	R ₁	R ₂	R ₃
	I	OH	OH	Glc
	II	H	OH	Glc
	III	OH	OH	Xyl



IV

OH OH Xyl(1→2)Glc

Xyl Glc

Рисунок 1. Химические структуры выделенных флавоноидных гликозидов из листьев растения *Rumex confertus* Willd.

В настоящее время проводятся исследования биологической активности выделенных соединений. По предварительным результатам скрининга, выделенные галлотаннины обладают антибактериальной (*S. aureus*) активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rechner K.H. Vorarbeiten zu einer Monographie der Gattung *Rumex*. VII. Rumices asiatici. Candollea, 1949, 12: 9-152.
2. Wegiera M., Smolarz H.D., Wianowska D., and Dawidowicz A.L. Anthracene derivatives in some *Rumex* L. species. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 2007, 76: 103–108.
3. Łuczaj Ł. and Szymański W.M., Wild vascular plants gathered for consumption in the Polish countryside: a review. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2007 (17) 1–22.
4. Hashaw Diane, Nahar Lutfin, Vadla Brahmachari, Saif-E-Naser Gatria M., Sarker Satyajit D. Bioactivity of *Rumex obtusifolius* (Polygonaceae). Archives of Biological Sciences, 2010, vol. 62, (2) 387-392.
5. Markham, K.R. et al., Tetrahedron, 1976, 32, 2607.
6. Nakaoki, T. et al., Yakugaku Zasshi, 1956, 76, 323-324; 1961, 81, 1158-1159
7. Gen-ichiro Nonaka et al., Tannins and related compounds. I. *Rhubarb*. Chem. Pharm. Bull., 1981, 29(10) 2862-2870.
8. Makoto Nishizawa et al., Tannins and related compounds. XII. Isolation, characterization of galloglucoses from *Paeoniae Radix* and their effect on urea-nitrogen concentration in Rat Serum. Chem. Pharm. Bull., 1983, 31(8) 2593-2600.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИРОДНЫХ АНТИОКСИДАНТОВ-ПОЛИФЕНОЛОВ В ЗЛАКАХ, КРУПАХ И ПРОРОСШИХ ЗЕРНАХ

Яшин А.Я., Черноусова Н.И., Яшин Я.И., Шаскольская Н.Д.
НТЦ «Хроматография», ОАО НПО «Химавтоматика», Москва, Россия;
yashinchrom@mail.ru
¹НПЦ «Росток», Москва, Россия

В последние годы возрос интерес к определению антиоксидантов-полифенолов в злаках, крупах, хлебных продуктах и проросших зернах. Это очень важно, т.к. хлеб и хлебные продукты составляют существенную часть рациона питания человека. Так в средиземноморской диете, отмеченной ЮНЕСКО как культурное наследие человечества, доля злаковых составляет 30 %.

Большая часть антиоксидантов содержится во внешней оболочке зерен злаков, поэтому в отрубях их содержание достигает 80 % от общего содержания антиоксидантов, витаминов и микроэлементов в зерне. По мнению диетологов Японии хлебобулочные изделия из самой белоснежной муки являются самыми бесполезными продуктами. Неслучайно в последние годы большой интерес вызывают хлебобулочные продукты из цельных зерен. Потребление цельнозерновых продуктов снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний, опухолей желудочно-кишечного тракта, диабета II типа и других опасных болезней.

Основные антиоксиданты цельных зерен – фенольные ароматические кислоты – производные бензойной и коричной кислот. Гидроксibenзойные кислоты: галловая, ванилиновая, сиреневая, протокатеховая, п-гидроксibenзойная и гидроксикоричные кислоты: феруловая, кофейная, о-, м-, и п-кумаровая, коричная, синаповая в зернах пшеницы, ржи, ячменя, риса, проса, овса, кукурузы определяются в основном методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Больше всего в злаках содержится феруловой и п-кумаровой кислот. Значительно меньше в хлебных злаках содержится флавоноидов, за исключением антоцианов, содержащихся в окрашенных зернах. В незначительных количествах были обнаружены флавоны, флавононы, флавонолы. В озимых сортах пшеницы, ячменя обнаружены лигнаны и алкилрезорцинолы.

Нами определено суммарное содержание антиоксидантов (ССА) в отечественных образцах злаков на приборе «ЦветЯуза-01-АА» (проточно-инжекционная система с амперометрическим детектором). Определение ССА проводилось на образцах пшеницы, ржи, ячменя, овса, кукурузы, проса, риса, полученных от самых известных производителей. Кроме того определено ССА в зерновых продуктах : хлебе (белом, черном, зерновом), крупах, муке, отрубях. В цельнозерновом хлебе ССА оказалось в несколько раз выше, чем в обычных сортах хлеба. Весьма интересные результаты получены при определении ССА в проросших зернах. В них ССА оказался в 10 раз выше, чем в сухих зернах. Через пять дней, когда появляются первые листочки, скорость синтеза антиоксидантов снижается, а после десяти дней практически прекращается. Эти результаты убедительно доказывают, что растения защищаются антиоксидантами от неблагоприятных факторов внешней среды.

Впервые кроме хлебных злаков исследованы проросшие зерна чечевицы, гороха нут и маш, тыквы, кукурузы, льна, амаранта, расторопши. Самый высокий рост ССА наблюдался при проращивании семян амаранта.

Потребление хлебных продуктов с высоким содержанием антиоксидантов будет вносить существенный вклад в ежедневную норму потребления антиоксидантов для защиты населения от опасных болезней и преждевременного старения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. М., ТрансЛит, 2009, с. 192.
2. Яшин А.Я., Яшин Я.И., Черноусова Н.И., Федина П.А. Определение природных антиоксидантов в пищевых злаках и бобовых культурах, Аналитика, 2012, т.1, №2, с.32-36.
3. Jones J.M. Grain – based foods and health. Cerals Food World, 2006, v.51, p.108.
4. Dykes L., Rooney L.N. Phenolic Compounds in Cereal Grains and Their Health Benefits. Cerals Food World, 2007, v.32, p.105-111.

СОЗДАНИЕ БАНКА ДАННЫХ СОДЕРЖАНИЯ АНТИОКСИДАНТОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И НАПИТКАХ

Яшин А.Я., Яшин Я.И., Черноусова Н.И.

НТЦ «Хроматография», ОАО НПО «Химавтоматика», Москва, Россия,
yashinchrom@mail.ru

Интерес к антиоксидантам особенно возрос в последнее десятилетие. Их влияние на здоровье и продолжительность жизни человека активно исследуется медиками, пищевиками, фармацевтами. Антиоксиданты признаны необходимой частью здорового питания наряду с белками, жирами, углеводами, витаминами и микроэлементами. Необходимое содержание антиоксидантов в пище помогает следовать завету Гиппократа: «Пусть ваша еда будет для вас лекарством, а лекарство – едой».

В разных странах разрабатываются ежедневные нормы потребления антиоксидантов. Однако, содержание антиоксидантов во многих продуктах неизвестно. Нами в НПО «Химавтоматика» определено суммарное содержание антиоксидантов (ССА) практически во всех ежедневно употребляемых продуктах (всего проанализировано более 1400 продуктов). Причем определялись как водорастворимые, так и жирорастворимые антиоксиданты по аттестованным методикам.

С 2012 года введены в действие два ГОСТа по определению антиоксидантов, разработанных на основе аттестованных нами методик и с использованием нашего прибора.

Для создания банка данных необходимо измерить содержание антиоксидантов в основных пищевых продуктах: овощах, фруктах, ягодах, соках, орехах, корнеплодах, специях, зернах, семенах, растительных маслах, рыбных продуктах, меде, чае, кофе, вине, пиве, коньяке и многих других.

Полученная информация, сформированная в виде банка данных, должна стать достоянием населения, в первую очередь, врачей, биохимиков, диетологов, специалистов оздоровительных центров и др.

Эта информация предназначена и должна использоваться:

- широкими слоями населения (располагая данными о количественном содержании антиоксидантов в различных продуктах, каждый человек будет иметь возможность составлять свою диету таким образом, чтобы максимально эффективно

поддерживать свое здоровье);

- производителями пищевой продукции (в частности, эти данные будут стимулировать создание новых продуктов высокого качества на научной основе);
- врачами (позволит обоснованно назначать антиоксидантную терапию разным больным, онкологическим пациентам до и после операции, после и во время химиотерапии и облучения);
- работающими в тяжелых и вредных условиях;
- подвергающимися частым стрессам, перегрузкам и т.д.
- спортсменами перед ответственными соревнованиями.

Создание банка данных имеет большое социальное значение.

Практическое использование информации об антиоксидантной активности пищевых продуктов, напитков, БАДов, лекарственных препаратов позволит не только обоснованно осуществлять «лечение» окислительного стресса, но и проводить его профилактику. Это обеспечит, во-первых, снижение заболеваемости населения РФ, в первую очередь, наиболее опасными болезнями, во-вторых – предупреждение преждевременного старения, что в свою очередь, позволит увеличить продолжительность жизни в целом и продолжительность трудоспособного периода в частности.

В экономическом аспекте – это прежде всего сокращение затрат на лечение.

ЛИТЕРАТУРА

1. МВИ 31-07 Методика выполнения измерений содержания антиоксидантов в напитках и пищевых продуктах, биологически активных добавках, экстрактах лекарственных растений амперометрическим методом.
2. МВИ 120-08 Методика выполнения измерений суммарного содержания жирорастворимых антиоксидантов в пищевых продуктах амперометрическим методом.
3. ГОСТ Р 54037-2010 Продукты пищевые. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов амперометрическим методом в овощах, фруктах, продуктах их переработки, алкогольных и безалкогольных напитках.
4. ГОСТ Р 54036-2010 Продукты пищевые. Определение содержания водорастворимых антиоксидантов в клубнях картофеля амперометрическим методом.

Указатель авторов

- Beckett R.P. 210, 393
Bertani A. 216
Choudhary M. Iqbal 610, 615
Faustova N.M. 210
Galambosi B. 210
Kosman V.M. 210
Makarov V.G. 210
Mapelli S. 216
Minibayeva F.V. 210
Pozharitskaya O.N. 210
Ross S.A. 159
Shikov A.N. 210
Абдулладжанова Н.Г. 6
Абдуллин М.И. 624
Абилов Ж.А. 47, 537, 610, 615
Абилова Г.А. 218
Абильдаева А.Ж. 78
Авальбаев А.М. 388
Авдеева Е.В. 567
Авксентьева О.А. 221
Агеева М.Н. 251
Адамовская В.Г. 394
Адекенов С.М. 75, 78, 634
Азарова О.В. 513
Алания М.Д. 11
Александрова В.А. 15
Алексеева О.М. 18
Алинкина Е.С. 22
Альжанов А.Е. 634
Алявина А.К. 427
Аммосов А.С. 369
Антропова И.Г. 627
Атажанова Г.А. 75
Ахатова А.Р. 501
Бабаева Е.Ю. 516
Бабоша А.В. 359
Бажанов Д.П. 270
Байков А.А. 225
Байчева О. 466
Батраев Р.А. 506
Бахтенко Е.Ю. 229
Баширова Р.М. 27
Башкирова С.А. 143
Баяндина И.И. 233, 542
Безкровная Л.Я. 394
Безрукова М.В. 238
Бей М.П. 55
Бектемисова А.У. 621
Бекузарова С.А. 240
Белостоцкая И.С. 18, 137
Белых Д.В. 191
Березина Е.В. 241, 251
Билык В.В. 154
Богатырев А.И. 233, 542
Борисова А.В. 519
Борисова Г.Г. 314
Боярских И.Г. 244
Брилкина А.А. 241, 251
Брюханов В.М. 513
Бубенчикова В.Н. 31, 592
Будкевич Т.А. 270
Булатова А.А. 253
Булатова С.В. 229
Буравлёв Е.В. 105, 110, 191
Бурлакова Е.Б. 18, 71, 170, 175, 179
Бурмистрова Н.А. 347
Бурыгин Г.Л. 301
Буцанец П.А. 258
Валуева М.И. 35
Ванидзе М. 36

Васильев В.Г. 233, 244, 542
Веселова М.В. 666
Власов П.С. 59
Волков В.А. 40
Володченко И.И. 44, 522
Вольева В.Б. 18, 137
Высочина Г.И. 341
Гадецкая А.В. 47
Галкин Е.Г. 27
Гареева Г.Б. 506
Гафуров Р.Г. 587
Герасимова Н.Г. 466
Гиль Т.В. 547
Гинс В.К. 225
Гинс М.С. 225
Гишкаева Л.С. 240
Глыбина А.А. 364
Гогунская П.В. 651
Голембиовская Е.И. 525
Головина Е.Ю. 263
Головко Т.К. 265
Голощанов А.Н. 18, 71, 170,
175, 179
Гомаа А.М. 439
Гончарук Е.А. 275, 282, 295
Горовой П.Г. 159
Григорьева О.В. 533
Грицаенко Д.И. 27
Гудзенко А.В. 529
Гурьянов О.П. 393
Гусева Н.В. 353
Давренбеков С.Ж. 78
Дамянова А. 466
Дашченко А.В. 66
Дейнека В.И. 51, 708
Дейнека Л.А. 51
Джалмаханбетова Р.И. 159
Джан Т.В. 533

Джапаридзе И. 36
Дзарданов Д.В. 629
Дикусар Е.А. 55
Дихтярев С.И. 369
Дмитрук А.Ф. 44, 522
Домнина Н.С. 18, 59, 91
Дубищев А.В. 567
Дубровина А.С. 62, 310
Дубровина Н.И. 127
Дудкин Р.В. 159
Дудник Л.Б. 110
Дунич А.А. 66
Дутова С.В. 616
Дымова О.В. 265, 278
Евтеева Н.М. 40
Живухина Е.А. 282
Жигачева И.В. 71
Жмурко В.В. 221
Жусупова Г.Е. 47, 537
Забелина С.К. 459
Заболотный А.И. 270
Завадская М.И. 270
Заварзин А.А. 275
Заварзина А.Г. 275, 405
Завьялова М.С. 59
Загоскина Н.В. 275, 295, 364,
400, 405, 427, 587, 646
Загуменников В.Б. 516
Загурская Ю.В. 233, 542
Задорожная О.А. 487
Заикина Е.А. 501
Зайцев П.М. 143
Замбахидзе Н.Е. 689
Запесочная Г.Г. 567
Зарипова Н.Р. 434
Захожий И.Г. 278
Зверев В.В. 513
Зеленков В.Н. 582

Зенков Н.К. 127
Зиновьева С.В. 466
Зиявитдинов Ж.Ф. 6
Зияев Х.Л. 145
Зубова М.В. 282
Иванова А.Н. 606
Иванова Р.А. 288
Ивлева Т.Н. 121
Игнатенко В.А. 547
Исмаилов А.И. 145
Кавтарадзе Н.Ш. 11
Кадоркина Г.К. 492
Казанцева Д.С. 145
Казанцева Л.М. 233, 542
Казбекова А.Т. 75
Каландия А. 36
Калашникова Е.А. 293, 295
Калимуллина З.Ф. 506
Калиновский А.И. 666
Камададзе Е. 36
Кандалинцева Н.В. 127
Каневский М.В. 301
Карпец Ю.В. 323
Карпова Е.А. 304
Касенов Б.К. 78
Касенова Ш.Б. 78
Катанская В.М. 587
Кесаев А.Т. 551
Ким Ю.А. 166, 201
Киселев К.В. 62, 310, 463,
498
Кислицина М.Н. 314
Клейменова Ю. 282
Клименко И.В. 132, 709
Клименко С.В. 533, 553
Книга О.П. 81
Ковалицкая Ю.А. 317
Козлова З.Г. 87

Колупаев Ю.Е. 323
Комаров А.А. 328
Комарова Е.А. 91
Комиссарова Н.Л. 18, 137
Компанец Т.А. 420
Кондратьева В.В. 333
Коннова С.А. 301
Корулькин Д.Ю. 94, 557, 605
Корчагин А.В. 337
Корчагина А.В. 337
Корытько Л.А. 384
Костикова В.А. 341
Костина О.В. 606
Костяновский Р.Г. 492
Кот А.А. 547
Крамор Р.В. 116
Красавина М.С. 347
Кривандин А.В. 179
Крупянский Ю.Ф. 100
Крутиус О.Н. 492
Крылова Е.И. 482
Кудашкина Н.В. 27
Кузнецов Вл.В. 434
Кузнецова С.М. 166, 201
Кузовкина И.Н. 353
Кукушкина Т.А. 244
Кумахова Т.Х. 359
Курапова Т.Н. 529
Куркин В.А. 96, 561, 567, 641
Куркина А.В. 571
Курковская Л.Н. 137
Кухарева Л.В. 547
Кучин А.В. 110, 116
Кушнерова Н.Ф. 577, 601,
661
Лавренчук А.В. 482
Лампатов В.В. 513
Ланцев В.Л. 430

Лапин А.А. 582
Лапина Г.П. 40
Лапшин П.В. 364, 405, 427,
587, 646
Лапшова М.С. 51, 708
Ларин А.В. 629
Ларина Л.И. 140
Латыпова Г.М. 592
Лебедев В.Г. 368
Лесишина Ю.О. 44, 522
Литвиненко В.И. 369, 409
Лойко Н.Г. 100
Лосев В.О. 55
Лубянов А.А. 506
Луканина Ю.К. 116
Мавлянов С.М. 6
Мазалецкая Л.И. 105, 110
Мазурок Т.И. 666
Май Дык Чунг, 293
Макаревич С.Л. 51, 708
Макаров О.Е. 187
Макарова Л.Е. 375
Макарова Н.В. 519
Макеева И.Ю. 430
Малкова А.В. 137
Манжелесова Н.Е. 380, 384
Маняхин А.Ю. 62
Маракулина К.М. 116
Марей М.М. 439
Маркелова Е.М. 506
Масленников П.В. 597
Масленникова Д.Р. 388
Маслова В.Ю. 121
Медведева С.А. 140
Меньщикова Е.Б. 127
Мерзляков В.Ю. 601
Мечикова Г.Я. 389
Минибаева Ф.В. 393

Мисин В.М. 40, 132, 709
Митаишвили Т.И. 689
Мишарина Т.А. 22
Мищенко Л.Т. 66
Молодченкова О.О. 394
Момот Т.В. 577
Музафаров Е.Н. 166, 201
Музычкина Р.А. 94, 557, 605
Муравник Л.Е. 606
Мурзабаев А.Р. 238
Мурзагулова К.Б. 537
Мынбаева Ж.Т. 610, 615
Мяделец М.А. 616
Назаренко Л.В. 282, 364
Назарова В.Д. 621
Нечаева Т.Л. 282, 400, 587
Никитина В.Е. 187
Никитина В.С. 624
Николаева В.В. 627
Николаева Т.Н. 405, 492, 587
Николаевский А.Н. 81, 121
Ниязова Р.Е. 75
Носкова Ю.С. 241
Овсянникова М.Н. 137
Октябрьский О.Н. 150
Олейник А.С. 127
Олтаржевская Н.Д. 35
Осипова И.Ю. 553
Павлова Е.Е. 241, 251
Пермяков Е.Г. 328
Петкевич С.К. 55
Петрова А.Л. 516
Петрова И.Г. 375
Петросян А.С. 15
Плюснина С.Н. 191
Погодаева Н.Н. 140
Подрезов А.С. 317
Полунин К.Е. 629

Полунина И.А. 629	Сейте́мбетова А.Ж. 75
Поляков А.В. 337	Селецкая Л.Д. 666
Поляков В.В. 634	Семёнова М.В. 333
Полякова Л.В. 409	Сёмин И.А. 455
Полякова Н.В. 415	Сергеева О.Ю. 59
Полякова Т.А. 304	Сердюк М.Е. 651
Помазенкова С.С. 430	Середа А.В. 66, 154
Попова Н.В. 369	Середа Л.А. 154
Попова Т.П. 369	Сизова Л.А. 661
Попова Э.В. 91	Скрыпник Л.Н. 477
Постое́нко О.М. 420	Смагулова Ф.М. 159
Потапов В.В. 582	Смирнова Г.В. 150
Поткин В.И. 55	Снисаренко Т.А. 455
Правдивцева О.Е. 96	Спрыгин В.Г. 655, 661
Присс О.П. 638	Старчак Ю.А. 31
Проворная Т.В. 51, 708	Степанова С.И. 675
Прокофьева М.Ю. 353, 422	Степанова Т.А. 389
Прудников Г.А. 347	Сулеймен Е.М. 159
Прядехина Е.В. 427	Сурина О.Б. 501
Пузина Т.И. 430	Сутиашвили М.Г. 11
Радюкина Н.Л. 434	Суханов П.А. 328
Ралдугина Г.Н. 439	Сухов Б.Г. 140
Ратькин А.В. 444	Табаленкова Г.Н. 278
Рахимова Б.Б. 78	Тарабукина И.С. 105, 191
Рахмадиева С.Б. 610, 615	Тарасов О.В. 482
Ревина А.А. 143	Тараховский Ю.С. 166, 201
Режепов К.Ж. 145	Тарбеева Д.В. 666
Романова З.Р. 592	Таргамадзе И.Л. 689
Рябченко А.С. 359	Ташенов Е.О. 159
Рязанова Т.К. 641	Ташлицкий В.Н. 492
Сагареишвили Т.Г. 11	Ташматов З.О. 668
Сагинтаева Ж.И. 78	Тихонова Г.А. 121
Сажина Н.Н. 40, 646	Тихонова И.Г. 459
Салихов Ш.И. 6	Тоайма В. 434
Салмин С.А. 450	Товчига О.В. 675
Самойлова З.Ю. 150	Трещенкова Ю.А. 170, 175
Сахно А.Б. 91	Трошина Н.Б. 501
Сейте́мбетов Т.С. 75	Трубников А.А. 679

Тулеуханов С.Т. 166, 201
Тюнин А.П. 310, 463
Угрехелидзе Д.Ш. 689
Удалова Ж.В. 466
Упадышев М.Т. 472
Фаткуллина Л.Д. 22, 179
Фатхутдинова Р.А. 238, 388
Федоненко Ю.П. 301
Федореев С.А. 666
Фёдорова А.В. 35
Федорова И.В. 110
Федураев П.В. 477
Фенин А.А. 35, 184
Филенко С.В. 66
Фоменко С.Е. 661, 684
Фурса Н.С. 459
Хижан Е.И. 121
Храмова Е.П. 482
Хрипач В.А. 270
Христенко В.С. 62
Цивилева О.М. 187
Цисельская Л.Й. 394
Часов А.В. 393
Черноусова Н.И. 697, 699
Чигрин Т.В. 487
Чукичева И.Ю. 105, 110, 116,
191
Чупахина Г.Н. 477
Шаварда А.Л. 606
Шакирова Ф.М. 238, 388
Шалашвили А.Г. 689
Шалашвили К.Г. 11

Шамуратов Б.А. 694
Шапчиц М.П. 253
Шаскольская Н.Д. 697
Шаталова О.В. 179
Шевченко О.Г. 191
Шелудченко Н.И. 105, 110
Шерматова Г.Д. 694
Шестибратов К.А. 317
Широкова А.В. 492
Шишкина Л.Н. 110, 116, 170,
175, 195
Шкопоров А.Н. 62
Штрыголь С.Ю. 675
Шугаев А.Г. 258
Шумакова О.А. 310, 498
Шумкова Г.А. 439
Эль-Регистан Г.И. 100
Эрматов А.М. 145
Эшбакова К.А. 668
Ювченко А.П. 55
Юлдашев Р.А. 388
Юрьева Н.О. 427
Ягольник Е.А. 166, 201
Яппаров И.Ф. 506
Яременко Ю.В. 263
Яруллина Л.Г. 501
Ястреб Т.О. 323
Яхин И.А. 506
Яхин О.И. 506
Яшин А.Я. 207, 697, 699
Яшин Я.И. 207, 697, 699

Оглавление

РАЗДЕЛ 1. ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ (СТРУКТУРА, РЕАКЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА)

Абдулладжанова Н.Г., Мавлянов С.М., Зиявитдинов Ж.Ф., Салихов Ш.И. Масс-спектрометрический метод установления структур новых эллаготаннинов сем. <i>Euphorbiaceae</i>	6
Алания М.Д., Шалашвили К.Г., Кавтарадзе Н.Ш., Сагарейшвили Т.Г., Сутиашвили М.Г. Фенольные соединения некоторых растений флоры Грузии: структура, физико-химические свойства, биологическая активность	11
Александрова В.А., Петросян А.С. Создание эффективных антимутагенных систем на основе хитозана и атиоксидантов растительного происхождения	15
Алексеева О.М., Вольева В.Б., Комиссарова Н.Л., Белостоцкая И.С., Домнина Н.С., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б. Некоторые аспекты взаимодействия гидрофильных и гидрофобных производных фенозана с клетками животного происхождения	18
Алинкина Е.С., Мишарина Т.А., Фаткуллина Л.Д. Антирадикальные свойства эфирных масел, содержащих карвакрол и тимол	22
Баширова Р.М., Кудашкина Н.В., Грицаенко Д.И., Галкин Е.Г. Производные бензолдикарбоновой кислоты в корнях <i>Adenophora lilifolia</i> (L.) A. DC.	27
Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. Фенольные соединения растений рода Тимьян флоры Центрального Черноземья	31
Валуева М.И., Фёдорова А.В., Фенин А.А., Олтаржевская Н.Д. Радиопротекторная активность металлокомплексов фенольных соединений в присутствии альгината натрия	35
Ванидзе М., Каландия А., Джапаридзе И., Камададзе Е. Изменение фенольных соединений черники (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.) в процессе переработки	36
Волков В.А., Сажина Н.Н., Евтеева Н.М., Лапина Г.П., Мисин В.М. Использование различных модельных тест-	40

систем при анализе антиоксидантов в виноградных винах	
Володченко И.И., Лесишина Ю.О., Дмитрук А.Ф.	44
Сравнительная характеристика антирадикальной активности растительных экстрактов, полученных в среде субкритической воды и методом мацерации	
Гадецкая А.В., Жусупова Г.Е., Абилов Ж.А.	47
Соединения, идентифицированные в растениях <i>Limonium myrianthum</i>	
Дейнека В.И., Лапшова М.С., Макаревич С.Л., Проворная Т.В., Дейнека Л.А.	51
Комплексообразование дигидрокверцетина с β -циклодекстрином	
Дикусар Е.А., Поткин В.И., Петкевич С.К., Ювченко А.П., Лосев В.О., Бей М.П.	55
Бензальдегиды ванилинового ряда в качестве линкеров для получения биоконъюгатов на основе малеопимаровой кислоты и фармакофорных аминов	
Домнина Н.С., Завьялова М.С., Власов П.С., Сергеева О.Ю.	59
Гибридные макромолекулярные антиоксиданты на основе кверцетина	
Дубровина А.С., Шкопоров А.Н., Маняхин А.Ю., Христенко В.С., Киселев К.В.	62
Биосинтез резвератрола, ценного растительного полифенола в <i>Escherichia coli</i> с помощью методов метаболической инженерии	
Дунич А.А., Дашенко А.В., Серeda А.В., Филенко С.В., Мищенко Л.Т.	66
Фенольные соединения яконо (<i>Polymnia sonchifolia</i> Poir. & Endl.) украинской интродукции	
Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Голощанов А.Н.	71
Пространственно-затрудненные фенолы как адаптогены к стрессовым воздействиям	
Казбекова А.Т., Атажанова Г.А., Сейтембетова А.Ж., Сейтембетов Т.С., Ниязова Р.Е., Адекенов С.М.	75
Взаимосвязь между уровнем полифенолов и антиоксидантной активностью эфирных масел тимьяна, распространенного на территории Казахстана	
Касенова Ш.Б., Абиляева А.Ж., Касенов Б.К., Рахимова Б.Б., Сагинтаева Ж.И., Давренбеков С.Ж., Адекенов С.М.	78
Оценка термодинамических свойств ряда полифенольных соединений - флавоноидов	
Книга О.П., Николаевский А.Н.	81
Антиоксидантное действие фенольных соединений при гетерофазном окислении	
Козлова З.Г.	87
Количественная оценка антиоксидантной	

активности фенолов в дикорастущих лекарственных растениях	
Комарова Е.А., Сахно А.Б., Домнина Н.С., Попова Э.В. Сравнительная активность низкомолекулярных и гибридных макромолекулярных антиоксидантов	91
Корулькин Д.Ю., Музычкина Р.А. Направленные трансформации природных оксиантрахинонов	94
Куркин В.А., Правдивцева О.Е. Антраценпроизводные травы зверобоя продырявленного	96
Лойко Н.Г., Крупянский Ю.Ф., Эль-Регистан Г.И. Участие алкилоксибензолов в модуляции активности и функциональной стабильности ферментных белков	100
Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Тарабукина И.С., Буравлев Е.В., Чукичева И.Ю. Конъюгаты 2-изоборнилфенола и порфиринов в реакции с перокрадикалами	105
Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н., Дудник Л.Б., Буравлев Е.В., Кучин А.В., Федорова И.В., Чукичева И.Ю. Реакционная способность терпенофенолов в различных модельных системах	110
Маракулина К.М., Луканина Ю.К., Крамор Р.В., Чукичева И.Ю., Кучин А.В., Шишкина Л.Н. Роль структуры изоборнилфенолов и полярности растворителя в комплексообразовании с лецитином	116
Маслова В.Ю., Николаевский А.Н., Тихонова Г.А., Ивлева Т.Н., Хижан Е.И. Влияние pH водной фазы на активность фенольных соединений в эмульсии	121
Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Дубровина Н.И., Олейник А.С., Кандалинцева Н.В. Фенолы как активаторы редокс-чувствительной сигнальной системы keap1/nrf2/are: геронтологический аспект	127
Мисин В.М., Клименко И.В. Метрологические исследования галловой кислоты и амбиол гидрохлорида с целью использования их в качестве стандартных образцов состава антиоксиданта	132
Овсянникова М.Н., Вольева В.Б., Белостоцкая И.С., Комисарова Н.Л., Малкова А.В., Курковская Л.Н. Метрологические исследования галловой кислоты и амбиол гидрохлорида с целью использования их в качестве стандартных образцов состава антиоксиданта	137

антибактериальная антиоксидантная	активность	фенольных	
Погодаева Н.Н., Медведева С.А., Сухов Б.Г., Ларина Л.И.	Особенности поведения флавонолов в водных растворах углеводов		140
Ревина А.А., Башкирова С.А., Зайцев П.М.	Новые германийорганические комплексы с поликарбоновыми кислотами: полифункциональные антиоксиданты		143
Режепов К.Ж., Зияев Х.Л., Казанцева Д.С., Эрматов А.М., Исмаилов А.И.	Синтез и биологическая активность производных госсипола - растительного полифенола		145
Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.	Микробные тест-системы для изучения механизмов антиоксидантного действия полифенолсодержащих биосубстратов		150
Середа А.В., Середа Л.А., Билык В.В.	Состав флаволигнанов коллекционных образцов расторопши		154
Сулеймен Е.М., Ташенов Е.О., Смагулова Ф.М., Джалмаханбетова Р.И., Дудкин Р.В., Горовой П.Г., Ross S.A.	Фенольные соединения <i>Artemisia umbrosa</i>		159
Тараховский Ю.С., Ягольник Е.А., Кузнецова С.М., Тулеуханов С.Т., Музафаров Е.Н., Ким Ю.А.	Влияние комплекса кверцетин:железо на фазовые переходы в бислойных липидных мембранах		166
Трещенкова Ю.А., Голощапов А.Н., Шишкина Л.Н., Бурлакова Е.Б.	Чувствительность альдолазы и микровязкости мембран клеток мозга к малым дозам фенозана и облучения		170
Трещенкова Ю.А., Голощапов А.Н., Шишкина Л.Н., Бурлакова Е.Б.	Влияние малых доз фенозана, облучения на активность лактатдегидрогеназы и микровязкость мембран клеток мозга		175
Фаткуллина Л.Д., Кривандин А.В., Шаталова О.В., Голощапов А.Н., Бурлакова Е.Б.	Исследование действия антиоксиданта ИХФАНа на структурную организацию гемоглобина в эритроцитах		179
Фенин А.А.	Активность металлокомплексов фенольных соединений в условиях окислительного стресса		184
Цивилева О.М., Макаров О.Е., Никитина В.Е.	Пара-гидроксиэтилфенол - ауторегуляторный метаболит		187

мицелиальных культур	
Шевченко О.Г., Плюснина С.Н., Белых Д.В., Буравлёв Е.В., Чукичева И.Ю., Тарабукина И.С. Антиоксидантные, мембранопротекторные и мембранотропные свойства новых терпенофенол-хлориновых конъюгатов	191
Шишкина Л.Н. Ингибирующая эффективность фенольных соединений <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	195
Ягольник Е.А., Тараховский Ю.С., Кузнецова С.М., Тулеуханов С.Т., Музафаров Е.Н., Ким Ю.А. Действие растительных полифенолов на физические свойства липидного слоя биологических мембран	201
Яшин А.Я., Яшин Я.И. Определение полифенолов методом ВЭЖХ с амперометрическим детектированием	207

РАЗДЕЛ 2. УЧАСТИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЖИЗНИ РАСТЕНИЙ

Beckett R.P., Minibayeva F.V. Ecological roles of lichen secondary metabolites	210
Kosman V.M., Faustova N.M., Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarov V.G., Galambosi B. Variation of flavonoid and coumarins content in <i>Trigonella foenum-graecum</i> cultivated in Finland	210
Mapelli S., Bertani A. Walnut trees during soil hypoxia and involvement of phenolic compounds as stress factor and tree resistance	216
Абилова Г.А. Влияние CuSO ₄ на содержание пролина в проростках огурца, преадаптированных салициловой кислотой	218
Авксентьева О.А., Жмурко В.В. Участие фенолов в регуляции темпов развития изогенных по генам <i>Vrn</i> линий пшеницы <i>Triticum aestivum</i> L.	221
Байков А.А., Гинс М.С., Гинс В.К. Особенности накопления низкомолекулярных антиоксидантов в листьях капусты пекинской на ранних этапах развития	225
Бахтенко Е.Ю., Булатова С.В. Зависимость содержания фенольных соединений в сабельнике болотном (<i>Comarum palustre</i> L.) от эколого-ценотических факторов и обработок	229

регуляторами роста	
Баяндина И.И., Загурская Ю.В., Васильев В.Г., Богатырев А.И., Казанцева Л.М. Фенольные соединения <i>Hypericum perforatum</i> при выращивании в различных регионах Западной Сибири	233
Безрукова М.В., Фатхутдинова Р.А., Мурзабаев А.Р., Шакирова Ф.М. Участие лектина пшеницы в укреплении барьерных свойств клеточных стенок в ответ на воздействие ионов кадмия	238
Бекузарова С.А., Гишкаева Л.С. Фенольные соединения Амброзии полыннолистной – стимуляторы роста Клевера лугового	240
Березина Е.В., Носкова Ю.С., Павлова Е.Е., Брилкина А.А. Двухлетняя динамика содержания фенольных соединений в листьях брусники и клюквы	241
Боярских И.Г., Васильев В.Г., Кукушкина Т.А. Изменчивость содержания биологически активных фенольных соединений <i>Lonicera caerulea</i> в связи с условиями произрастания	244
Брилкина А.А., Павлова Е.Е., Агеева М.Н., Березина Е.В. Содержание фенольных соединений и аскорбиновой кислоты в растениях рода <i>Vaccinium</i> в периоды цветения, плодоношения и полупокоя	251
Булатова А.А., Шапчиц М.П. Содержание фенольных соединений в культуре клеток и тканей Каллизии душистой в ростовом цикле	253
Буцанец П.А., Шугаев А.Г. Разобщающее и ингибирующее действие салициловой кислоты на метаболическую активность митохондрий Люпина желтого (<i>Lupinus luteus</i>)	258
Головина Е.Ю., Яременко Ю.В. Содержание рутина, антоцианов и аскорбиновой кислоты у газонных растений семейства Бобовые	263
Дымова О.В., Головкин Т.К. Антоцианы – внепластидные пигменты флавоноидной природы в листьях растений бореальной зоны	265
Заболотный А.И., Будкевич Т.А., Хрипач В.А., Завадская М.И., Бажанов Д.П. Роль 24-эпибрассинолида в регуляции симбиотической азотфиксации у бобовых растений на почвах, загрязненных тяжелыми металлами	270
Заварзина А.Г., Заварзин А.А., Гончарук Е.А., Загоскина	275

Н.В.	Растворимые фенольные соединения и почвообразование	
Захожий И.Г., Табаленкова Г.Н., Дымова О.В.	Сезонная динамика накопления веществ фенольной природы в листьях <i>Rubus chamaemorus</i> L.	278
Зубова М.В., Нечаева Т.Л., Гончарук Е.А., Клейменова Ю., Живухина Е.А., Назаренко Л.В.	Изменение уровня ПОЛ, образования фенольных соединений и активности пероксидазы по мере роста каллусной культуры стебля чайного растения	282
Иванова Р.А.	Содержание фенольных соединений в листьях самшита в нормальных и некомфортных температурных условиях	288
Калашникова Е.А., Май Дык Чунг	Содержание вторичных метаболитов в репродуктивных органах <i>Brassica. oleracea</i> L. и <i>B. Napus</i> L.	293
Калашникова Е.А., Гончарук Е.А., Загоскина Н.В.	Особенности накопления фенольных соединений в суспензионных культурах и растениях-регенерантах моркови при действии экзометаболитов гриба <i>Alternaria radicina</i>	295
Каневский М.В., Коннова С.А., Федоненко Ю.П., Бурыгин Г.Л.	Участие флавоновых соединений в адаптации бактерий <i>Azospirillum lipoferum</i> sp59b к существованию в ассоциации с растениями	301
Карпова Е.А., Полякова Т.А.	Фенольные соединения <i>Spiraea</i> L. из природных и интродукционных популяций азиатской России	304
Киселев К.В., Дубровина А.С., Тюнин А.П., Шумакова О.А.	Регуляция биосинтеза резвератрола в клеточных культурах дикого винограда <i>Vitis amurensis</i> Rupr.	310
Кислицина М.Н., Борисова Г.Г.	Исследование влияния тяжелых металлов и экзогенных фенолов на содержание флавоноидов в листьях водных растений	314
Ковалицкая Ю.А., Подрезов А.С., Шестибратов К.А.	Влияние экспрессии рнк-интерференционной конструкции с инвертированными повторами гена 4CL (4-кумарат-КоА-лигазы) на фенотип трансгенных растений осины	317
Колупаев Ю.Е., Ястреб Т.О., Карпец Ю.В.	Активные формы кислорода как посредники при индуцировании	323

теплоустойчивости растительных клеток действием экзогенных салициловой и 4-оксибензойной кислот	
Комаров А.А., Суханов П.А., Комаров А.А., Пермьяков Е.Г.	328
Опыт применения разных гуминовых препаратов в управлении биопродуктивностью растений	
Кондратьева В.В., Семёнова М.В.	333
Динамика содержания салициловой и абсцизовой кислот в тканях луковичных чешуй тюльпана в период сухопокоя	
Корчагина А.В., Корчагин А.В., Поляков А.В.	337
Влияние аскорбиновой кислоты на образование фенолов и морфогенез эксплантов Пеларгонии королевской (<i>P. grandiflorum</i>) in vitro	
Костикова В.А., Высочина Г.И.	341
Хемотаксономический анализ состава фенольных соединений дальневосточных представителей рода <i>Spiraea</i> L.	
Красавина М.С., Бурмистрова Н.А., Прудников Г.А.	347
Первичное действие экзогенной салициловой кислоты может не затрагивать метаболические процессы	
Кузовкина И.Н., Гусева Н.В., Прокофьева М.Ю.	353
Перспективы использования культивируемых in vitro корней Шлемника байкальского как источника селективного цитотоксического флавонола	
Кумахова Т.Х., Бабоша А.В., Рябченко А.С.	359
Флуоресцирующие компоненты клеточной стенки перикарпия <i>Malus</i> Mill. (<i>Rosaceae</i>), произрастающих в горах	
Лапшин П.В., Глыбина А.А., Назаренко Л.В., Загоскина Н.В.	364
Растения рода <i>Anacampseros</i> L. (<i>Portulacaceae</i>) и образование в них фенольных соединений	
Лебедев В.Г.	368
Содержание фенольных соединений в плодах трансгенной груши обыкновенной	
Литвиненко В.И., Попова Т.П., Аммосов А.С., Попова Н.В., Дихтярев С.И.	369
Природные халканоиды, их классификация, распространение и применение	
Макарова Л.Е., Петрова И.Г.	375
Роль п-фенил-2-нафтиламина в регуляции симбиотических взаимодействий бобового растения с <i>Rhizobium</i> в ризосфере	
Манжелесова Н.Е.	380
Изменение фенольного и ауксинового статуса формирующихся семян ячменя под влиянием	

эпибрассинолида	
Манжелесова Н.Е., Корытько Л.А. Влияние фенольных соединений штамма бактерии рода <i>Bacillus</i> (биопрепарат «Миколин») на болезнеустойчивость ячменя	384
Масленникова Д.Р., Фатхутдинова Р.А., Авальбаев А.М., Юлдашев Р.А., Шакирова Ф.М. Сравнительный анализ влияния метилжасмоната и цитокинина на процесс отложения лигнина в базальной части корней проростков пшеницы	388
Мечикова Г.Я., Степанова Т.А. Содержание фенольных соединений в побегах некоторых видов рода <i>Vaccinium</i> L. флоры Дальнего Востока	389
Минибаева Ф.В., Часов А.В., Гурьянов О.П., Beckett R.P. Фенольные соединения апопласта регулируют анти- и прооксидантную активности экстраклеточных пероксидаз растений	393
Молодченкова О.О., Адамовская В.Г., Цисельская Л.Й., Безкровная Л.Я. Сопряженность и динамика изменения активности фенилаланинаммиакилазы, ее специфических ингибиторов и фенольных соединений в защитном ответе растений при грибной инфекции и действии салициловой кислоты	394
Нечаева Т.Л., Загоскина Н.В. Кратковременное действие салициловой кислоты на накопление фенольных соединений в фотомиксотрофной каллусной культуре чайного растения	400
Николаева Т.Н., Заварзина А.Г., Лапшин П.В., Загоскина Н.В. О фенольных соединениях различных видов лишайников	405
Полякова Л.В., Литвиненко В.И. Динамика первичных и вторичных метаболитов при инфицировании семян Дуба черешчатого мучнистой росой	409
Полякова Н.В. Влияние салициловой кислоты на развитие патологического процесса у ячменя при поражении возбудителем сетчатого гельминтоспориоза	415
Постоенко О.М., Компанец Т.А. Влияние антропогенной нагрузки на синтез фенольных соединений при фитовирусной инфекции	420
Прокофьева М.Ю. Влияние света на биосинтез фенольных соединений в культивируемых <i>in vitro</i> корнях шлемника	422

байкальского (<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi)	
Прядехина Е.В., Лапшин П.В., Юрьева Н.О., Алявина А.К., Загоскина Н.В. Об образовании фенольных соединений в растениях картофеля, трансформированных геном $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерии <i>Synechocystis</i>	427
Пузина Т.И., Ланцев В.Л., Макеева И.Ю., Помазенкова С.С. Влияние салициловой и гидроксикоричных кислот на ростовые реакции <i>Solanum tuberosum</i>	430
Радюкина Н.Л., Тоайма В., Зарипова Н.Р., Кузнецов Вл.В. Влияние последовательного действия UV-b облучения и засоления на динамику содержания фенольных соединений в растениях различных экофизиологических групп	434
Ралдугина Г.Н., Марей М.М., Гомаа А.М., Шумкова Г.А. Сравнение накопления фенольных соединений при действии CuSO_4 и низкой положительной температуры на трансгенные растения рапса со встроенным геном трансфакторного белка <i>Osmyb4</i>	439
Ратькин А.В. Супрессия биосинтеза антоцианов у растений горошка душистого (<i>Lathyrus odoratus</i> L.)	444
Салмин С.А. Участие оксикоричных кислот в морфогенезе корневой системы проростков кукурузы	450
Сёмин И. А., Снисаренко Т. А. Влияние фенольных соединений герани луговой (<i>Geranium pratense</i>) на рост и развитие семян биотестов	455
Тихонова И.Г., Фурса Н.С., Забелина С.К. Влияние микроэлементов на содержание действующих веществ в листьях валерианы лекарственной	459
Тюнин А.П., Киселев К.В. Регуляция биосинтеза резвератрола посредством цитозинового метилирования днк генов <i>sts</i> в клеточных культурах <i>Vitis amurensis</i> Rupr.	463
Удалова Ж.В., Зиновьева С.В., Герасимова Н.Г., Байчева О., Дамянова А. Повышение элиситорной активности хитозана салициловой кислотой в системе томаты-галловая нематода	466
Упадышев М.Т. Применение салициловой кислоты при оздоровлении от вирусов и микроразмножении садовых культур	472
Федураев П.В., Чупахина Г.Н., Скрыпник Л.Н. Влияние экзогенных фенольных соединений на пул	477

биофлавоноидов в листьях клевера лугового (<i>Trifolium pratense</i> L.)	
Храмова Е.П., Тарасов О.В., Крылова Е.И., Лавренчук А.В.	482
Влияние радиации на состав и содержание флавоноидов <i>Pentaphylloides fruticosa</i>	
Чигрин Т. В., Задорожная О. А.	487
Активность некоторых ферментов подсолнечника в связи с устойчивостью к паразите	
Широкова А.В., Николаева Т.Н., В.Н. Ташлицкий, Костяновский Р.Г., Кадоркина Г.К., Крутиус О. Н.	492
Влияние химических мутагенов на изменчивость окраски и образование антоцианов и флавонолов в цветках <i>Petunia hybrida hort.</i>	
Шумакова О.А., Киселев К.В.	498
Влияние предшественников фенольных соединений растений на продукцию резвератрола в культуре клеток винограда амурского <i>Vitis amurensis</i> Rupr.	
Яруллина Л.Г., Трошина Н.Б., Заикина Е.А., Сурина О.Б., Ахатова А.Р.	501
Индукцированное накопление лигнина в системе «растение - грибной патоген»	
Яхин О.И., Лубянов А.А., Гареева Г.Б., Батраев Р.А., Маркелова Е.М., Яхин И.А., Калимуллина З.Ф., Яппаров И.Ф.	506
Влияние абиотических стрессовых факторов и регуляторов роста на содержание фенольных соединений у высших растений	

РАЗДЕЛ 3. ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ В ВЫСШИХ РАСТЕНИЯХ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В МЕДИЦИНЕ И ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Азарова О.В., Брюханов В.М., Зверев В.В., Лампатов В.В.	513
Полифенольные комплексы клеточных культур дальневосточных растений как потенциальные диуретические средства	
Бабаева Е.Ю., Петрова А.Л., Загуменников В.Б.	516
К вопросу о содержании биологически активных веществ в продуктах переработки свежего сырья Эхинацеи пурпурной	
Борисова А.В., Макарова Н.В.	519
Фенольные вещества овощей	

как показатель функциональности питания	
Володченко И.И., Лесишина Ю.О., Дмитрук А.Ф.	522
Экстракция фенольных соединений из лекарственного растительного сырья в среде субкритической воды	
Голембиовская Е.И. Фенольные соединения соцветий Черноголовки обыкновенной <i>Prunella vulgaris</i> L.	525
Гудзенко А.В., Курапова Т.Н. Разработка подходов к стандартизации травы душицы обыкновенной (<i>Origanum vulgare</i> L.) в многокомпонентных растительных смесях	529
Джан Т.В., Клименко С.В., Григорьева О.В. Фенольные соединения листьев Азимины трехлопастной (<i>Azimina triloba</i> (L.) Dunal)	533
Жусупова Г.Е., Мурзагулова К.Б., Абилов Ж.А. Получение препарата на основе полифенолов корней Кермека гмелина	537
Загурская Ю.В., Баяндина И.И., Васильев В.Г., Богатырев А.И., Казанцева Л.М. Фенольные соединения <i>Leonurus quinquelobatus</i> при выращивании в различных регионах Западной Сибири	542
Игнатенко В.А., Кухарева Л.В., Гиль Т.В., Кот А.А. Полифенольные вещества ряда представителей рода <i>Potentilla</i> L. в условиях Беларуси	547
Кесаев А.Т. Применение сероводородных минеральных вод для увеличения селена в чесноке	551
Клименко С.В., Осипова И.Ю. Фенольные соединения вегетативных органов растений видов семейства <i>Cornaceae</i> Dumort.	553
Корулькин Д.Ю., Музычкина Р.А. Биологическая активность антраценсодержащих растений	557
Куркин В.А. Фенольные соединения как источник импортозамещающих лекарственных растительных препаратов	561
Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Дубищев А.В. Нейротропные свойства фенилпропаноидов	567
Куркина А.В. Флавоноиды как критерий качества лекарственного сырья и препаратов фармакопейных растений	571
Кушнерова Н.Ф., Момот Т.В. Комплекс олигомерных проантоцианидинов как компонент терапии хронического	577

алкоголизма

- Лапин А.А., Зеленков В.Н., Потапов В.В.** Фенольные соединения водорослей-макрофитов - биоиндикаторы экологического состояния вод под влиянием различных загрязнений в условиях санитарной плантации 582
- Лапшин П.В., Нечаева Т.Л., Николаева Т.Н., Катанская В.М., Гафуров Р.Г., Загоскина Н.В.** Влияние соединения со стресс-протекторной активностью на содержание фенольных соединений, активность СОД и уровень ПОЛ в проростках пшеницы 587
- Латыпова Г.М., Бубенчикова В.Н., Романова З.Р.** Изучение фенольных соединений растений рода Первоцвет (*Primula*) 592
- Масленников П.В.** Определение суммы фенольных соединений в лекарственных растениях Калининградской области 597
- Мерзляков В.Ю., Кушнерова Н.Ф.** Растительные комплексы полифенолов в профилактике здоровья медицинских работников 601
- Музычкина Р.А., Корулькин Д.Ю.** Полифенолы корней казахстанских видов растений *Rumex* и их биоактивность 605
- Муравник Л.Е., Костина О.В., Иванова А.Н., Шаварда А.Л.** Секреторные структуры – места синтеза и аккумуляции фенольных соединений 606
- Мынбаева Ж.Т., Абилов Ж.А., Рахмадиева С.Б., М. Igbal Choudhary** Антиоксидантная активность фитопрепарата из *Tamarix arceuthoides* Bge 610
- Мынбаева Ж.Т., Абилов Ж.А., Рахмадиева С.Б., М. Igbal Choudhary** Новый изопреноид из *Reaumuria soongarica* 615
- Мяделец М.А., Дутова С.В.** Фенольные соединения *Coluria geoides* (*Rosaceae*) 616
- Назарова В.Д., Бектемисова А.У.** Новый фитопрепарат «витин» и его биологическая активность 621
- Никитина В.С., Абдуллин М.И.** Извлечение водорастворимых полисахаридов и флавоноидов из лекарственных растений 624
- Николаева В.В., Антропова И.Г.** Радиоллиз и радиопротекторная активность экстрактов из Донника лекарственного и Багульника болотного 627

Полунина И.А., Полунин К.Е., Дзарданов Д.В., Ларин А.В.	629
Взаимодействие стильбеноидов с неорганическими компонентами лекарственных форм	
Поляков В.В., Адекенов С.М., Альжанов А.Е.	634
Препараты из тополя бальзамического (<i>Populus balsamifera</i>), содержащие фенольные соединения и опыт их применения в медицине	
Присс О.П.	638
Динамика фенольных веществ при хранении плодов кабачка и огурца с применением антиоксидантов	
Рязанова Т.К., Куркин В.А.	641
Исследование фенольных соединений побегов Черники обыкновенной	
Сажина Н.Н., Лапшин П.В., Загоскина Н.В.	646
Антиоксидантные свойства соков различных видов Каланхое	
Сердюк М.Е., Гогунская П.В.	651
Использование антиоксидантной композиции на основе рутина для повышения адаптостатуса плодов сливы при хранении	
Спрыгин В.Г.	655
Профилактика олигомерными проантоцианидинами нарушений липидного обмена в печени крыс при поражении четыреххлористым углеродом	
Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., Фоменко С.Е., Сизова Л.А.	661
Гепатопротекторные свойства экстракта из бурой водоросли <i>Laminaria japonica</i>	
Тарбеева Д.В., Федореев С.А., Веселова М.В., Калиновский А.И., Мазурок Т.И., Селецкая Л.Д.	666
Полифенольные метаболиты из клеточной культуры растения <i>Iris pseudacorus</i>	
Ташматов З. О., Эшбакова К. А.	668
Флавоноиды надземной части <i>Scutellaria guttata</i>	
Товчига О.В., Степанова С.И., Штрыголь С.Ю.	675
Фенольные соединения как действующие вещества лекарственных растений с седативной и анксиолитической активностью	
Трубников А.А.	679
Фитохимическое изучение сортов и сортотипов Календулы лекарственной	
Фоменко С.Е.	684
Использование полифенольного комплекса из калины в составе функциональных продуктов питания	
Шалашвили А.Г., Угрехелидзе Д.Ш., Митаишвили Т.И., Таргамадзе И.Л., Замбахидзе Н.Е.	689
Грузинское (Кахетинское) вино как функциональная пища	
Шерматова Г.Д., Шамуратов Б.А.	694
Фенольные соединения	

растений <i>Rumex</i> L.	
Яшин А.Я., Черноусова Н.И., Яшин Я.И., Шаскольская Н.Д.	697
Определение природных антиоксидантов-полифенолов в злаках, крупах и проросших зернах	
Яшин А.Я., Яшин Я.И., Черноусова Н.И.	699
Создание Банка данных содержания антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках	
Указатель авторов	701

**ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ:
ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ**

**МАТЕРИАЛЫ ДОКЛАДОВ
VIII МЕЖДУНАРОДНОГО СИМПОЗИУМА**

Москва, 2-5 октября 2012 года

Издание подготовлено в авторской редакции

Оригинал-макет: *П.В. Лапшин*
Технический редактор *Н.А. Ясько*

Подписано в печать 25.09.2012 г. Формат 60х84/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Таймс.
Усл. печ. л. 42,08. Тираж 300 экз. Заказ 1230.

Российский университет дружбы народов
115419, ГСП-1, г. Москва, ул. Орджоникидзе, д. 3

Типография РУДН
115419, ГСП-1, г. Москва, ул. Орджоникидзе, д. 3, тел. 952-04-41