

СОДЕРЖАНИЕ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК СОЛОДКИ ГОЛОЙ

А.Н. Акулов

КИББ ФИЦ КазНЦ РАН Казань, Россия

Введение

Наряду с традиционным источником растительного сырья, альтернативным источником может быть культура клеток, позволяющая получать сырье в достаточных количествах в более короткие, по сравнению с выращиванием в естественных условиях, сроки, а также в экологически безопасных условиях. Солодка голая является лекарственным растением и входит во все издания отечественной фармакопеи, начиная с 1778 года. (Шретер 1972). К настоящему моменту уже разработаны методы размножения *Glycyrrhiza glabra* L. верхушечными меристемами и почками боковых корней (Badkhane et al., 2014, Panday, 2018), а также описано получение эмбриогенного каллуса *Glycyrrhiza glabra* (Fu et al 2010). Однако получение культуры клеток длительнопассируемой и способной к синтезу различных биологически активных соединений остается все еще актуальной задачей, особенно с точки зрения развития отечественной фармакологии. Основными биологически активными компонентами солодки голой являются глицирризиновая кислота и комплекс флавоноидов.

Использованная в работе каллусная культура солодки голой *Glycyrrhiza glabra* L. была получена из корневых эксплантов (Акулов, Костюкова, 2021). Каллусную культуру поддерживали на подобранной питательной среде при регулярных пересадках в течение 2 лет.

Цель работы – определение содержания и антиоксидантной активности фенольных соединений каллусной культуры солодки голой.

Материалы и методы

Для проведения биохимического анализа образцы каллусной культуры отбирали дважды, в начале (7 сут) и в конце (35 сут) пассажа. Клеточную массу отделяли от среды культивирования, лиофильно высушивали и растирали в порошок.

Для выделения растворимых фенольных соединений к навеске 25 мг добавляли 500 мкл 80 % метанола и инкубировали на водяной бане при температуре 80 °С в течение 30 мин. Полученный экстракт центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Супернатант отделяли и использовали для дальнейшего анализа.

Определение содержания растворимых фенольных соединений проводили по методу Фолина-Чокальтеу в модификации Sigleton and Rossi (1965). К 0.1 мл спиртового экстракта фенольных соединений добавляли 0,5 мл реактива Фолина-Чокальтеу (Sigma-Aldrich, Германия), через 3 мин приливали 0.4 мл водного раствора Na₂CO₃ (75 г./л) (Татхимпрепарат, Россия). В контрольные пробирки вместо экстракта вносили 0.1 мл 80 % метанола. Пробирки с реакционной смесью хорошо встряхивали и оставляли на 2 часа в темноте. Измерение оптической плотности проводили в микрокуветах на спектрофотометре при длине волны 765 нм. Содержание фенольных соединений в экстракте определяли с помощью калибровочной кривой, построенной по галловой кислоте. Содержание фенольных соединений выражали в мг-экв галловой кислоты (Astor, США) на 1 г сухого веса. Для расчета содержания внутриклеточных фенольных соединений в образце использовали формулу: $ФС = (С \cdot V_{\text{экстракта}}) / (М \cdot 1000)$, где ФС – общее содержание фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты/г сухого веса, С – концентрация фенольных соединений, полученная по калибровочной кривой, исходя из оптической плотности образцов, мг-экв галловой кислоты/л, V_{экстракта} – общий объем экстракта, мл, М – масса навески, г, 1000 – коэффициент перевода л в мл (объема экстракта).

Для определения суммарного содержания флавоноидов к 150 мкл полученного спиртового экстракта фенольных соединений добавляли 450 мкл 80 % этанола и 30 мкл 5 % раствора AlCl₃ (Татхимпрепарат, Россия), в 2 %-ном спиртовом растворе уксусной кислоты. Перемешивали и оставляли на 30 минут. Затем измеряли оптическую плотность при 415 нм используя спектрофотометр Lambda 25 (Perkin Elmer, США). Калибровочную кривую строили по известным концентрациям кверцетина (Alfa Aesar, США).

Хроматографический анализ фенольных соединений. Разделение фенольных соединений проводили на хроматографической системе высокого давления Breeze (Waters, США). Использовали оригинальную колонку Symmetry® C18, 100Å, размер пор 5 µm, размеры колонки 3,9 x 150 мм (Waters, США). Детекцию пиков флавоноидов осуществляли посредством УФ ВЭЖХ детектора Waters 2489 (Waters, США) при длине волны 360 нм. В качестве подвижной фазы использовали следующие растворы: раствор А – 2,5 % уксусная кислота: ацетонитрил (40:1) и раствор Б – 2,5 % уксусная кислота, метанол, ацетонитрил (20:80:1). Скорость потока – 0,5 мл/мин. Подвижная фаза была сделана по следующей схеме: 0–2 мин раствор Б 5 %, 2–18 мин раствор Б 5–60 %; 18–23 мин раствор Б 60 %; 23–28 мин раствор Б 60–75 %; 28–32 мин раствор Б 75 %; 32–40 мин раствор Б 75–100 %; 40–45 мин раствор Б 100 %; 45–46 мин раствор Б 100–5 %; 46–50 мин раствор Б 5 %. На колонку вносили по 20 мкл спиртового экстракта фенольных соединений. Идентификацию пиков проводили, используя набор стандартных флавоноидов (рутин, кверцитрин, кверцетин, кемпферол).

Определение антиоксидантной активности проводили согласно Sembiring и соавт. (2018), используя в качестве стандарта известные концентрации Тролокс.

Результаты

Навески каллусной ткани светло-желтого цвета и рыхлой структуры массой 150–200 мг переносили на свежую питательную среду. Через 7 суток обирали первый образец (Рис. 1а). Второй образец отбирали в конце пассажа (35 сут), при этом цвет и структура каллуса существенно изменялись.

Характерной особенностью, полученной каллусной культуры, являлось то, что через 10–12 сут, высаженный на свежую питательную среду белый каллус, желтел и становился более плотным, при дальнейшем культивировании желтый каллус темнел, приобретал коричневую окраску и плотную структуру. Содержание фенольных соединений в каллусной культуре солодки голой увеличивалось в процессе культивирования, в начале пассажа составляло 3,55 мг/г сухого веса, а в конце пассажа 10,05 мг/г сухого веса (Табл. 1.) В начале пассажа, доля флавоноидов от определяемых фенольных соединений составляла 52,7 %, в то время как в конце пассажа, доля флавоноидов увеличивалась (85,2 %).

Антиоксидантная активность спиртового экстракта каллусной культуры солодки голой в конце пассажа была в 3,2 раза выше по сравнению с началом пассажа (Табл.1).



(а)



(б)

Рис. 1 Каллусная культура солодки голой: (а) – 7 сут, (б) – 35 сут

Табл. 1 Содержание фенольных соединений и антиоксидантная активность экстрактов каллусной культуры солодки

Время отбора образцов	Фенольные соединения (сумма) (мг/г сухого веса)	Флавоноиды (мг/г сухого веса)	Антиоксидантная активность мг экв. Тролокс/г сухого веса
7 сутки	3,55	1,87	1,82
35 сутки	10,05	8,56	5,84

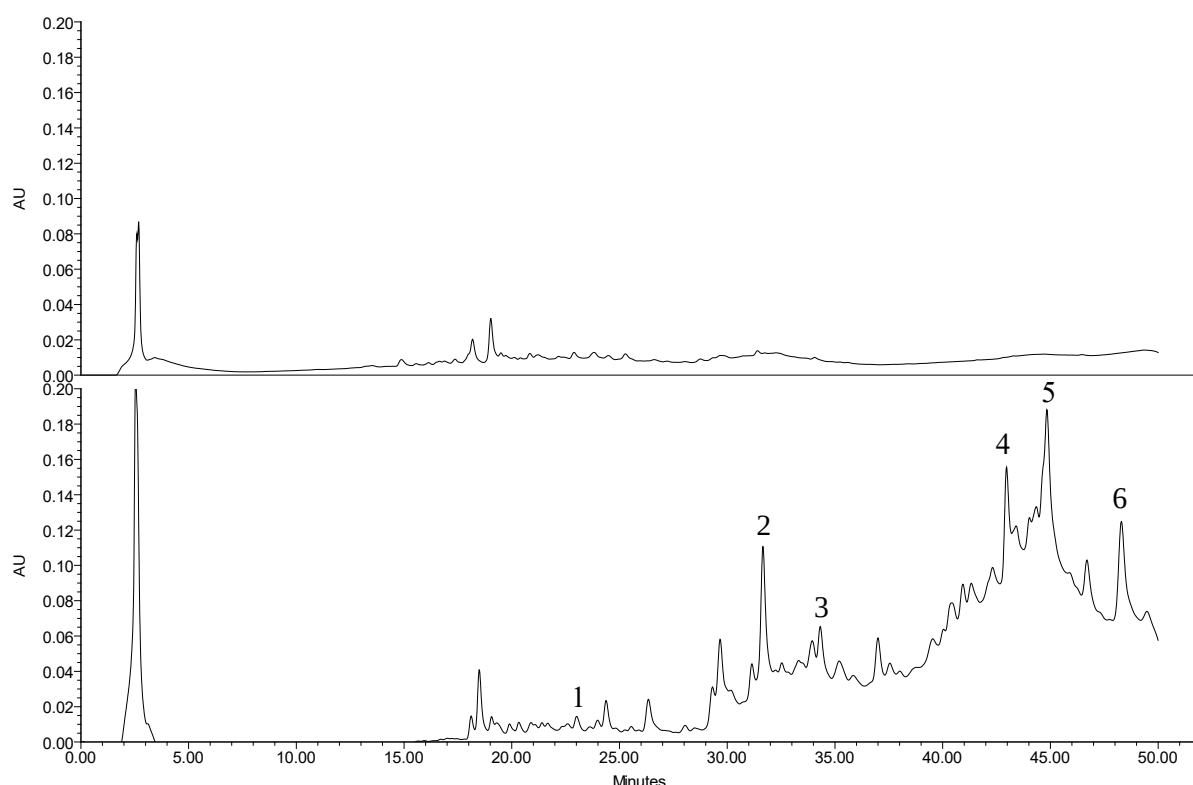


Рис. 2. ВЭЖХ спиртового экстракта каллусной культуры солодки голой: а – 7 сут, б – 35 сут.

В клетках каллусной культуры солодки нами было выявлено присутствие различных флавоноидов только в конце пассажа (Рис. 2). Спектр флавоноидов включал как идентифицированные агликоны (Табл. 2), так и, вероятно, их гликозилированные производные, которые не были идентифицированы.

Таблица 2. Содержание идентифицированных флавоноидов в каллусной культуре солодки голой.

Номер пика	Время удерживания, мин	Соединение	Содержание, мг/г СВ
1	23,25	Рутин	0,003
2	31,32	Кверцетин	0,575
3	34,08	Кемпферол	0,422
4	43,35	Глабридин	0,187
5	44,61	Изоликвиритигенин	2,656
6	48,04	Изоликвиритозид	0,068

Обсуждение

Важно отметить, что в полученной каллусной культуре солодки голой содержание флавоноидов может быть сопоставимо с их содержанием, в корнях растений. Например, содержание суммы флавоноидов в корнях солодки голой, произрастающей в ботаническом саду, собранных в разные месяцы года составляло от 18 до 44 мг/г сухого веса (Cheel et al., 2013).

Синтез и накопление флавоноидов к концу пассажа вероятно связано с увеличением числа дифференцированных структур – нодул, строение которых нами описано ранее (Акулов, Костюкова, 2021). По мнению ряда исследователей, синтез глицирризиновой кислоты в условиях *in vitro* может происходить в клеточных культурах какую-либо дифференцировку (Panday, 2018).

В клетках растений флавоноиды могут выполнять ряд функций, основной из которых является антиоксидантная защита. Так, флавоноиды в клетках растений защищают ДНК клеток от УФ излучения, при этом могут накапливаться как в клеточной стенке, так и в ядре клеток (Hutzler et al., 1998; Peer et al., 2001).

Вероятно, к концу пассажа происходит увеличение содержания активных форм кислорода, о чем свидетельствует темно-коричневый цвет каллуса, который обусловлен окислением и / или полимеризацией фенольных соединений (Hiltunen et al., 2008; Moya et al., 2012). Можно предположить, что синтез флавоноидов является механизмом, позволяющим снижать эффект накопления активных форм кислорода и сохранять способность клеток к пролиферации

Спектр флавоноидов в полученной нами каллусной культуре солодки содержит до 20 различных соединений (Рис. 2), среди которых выявлены флавоноиды, характерные для корней растений (кверцетин, кемпферол, глабридин). Таким образом, наши результаты согласуются с данными литературы, где показано, что основными флавоноидами корней солодки являются ликвиритин, ликвиритигенин, формонетин, кверцетин, кемпферол и лютеолин (Vlaisavljevića et al., 2018). Можно предположить, что обнаруживаемая нами антиоксидантная активность спиртового экстракта, обуславливается присутствием флавоноидов, которые обладают антиоксидантной активностью. С другой стороны, выявленное разнообразие флавоноидов может быть связано как с необходимостью антиоксидантной защиты, так и с другими функциями, например регуляторными. Показано, что флавоноиды ингибируют протеинкиназу, регулирующую активность транскрипционных факторов, необходимых для синтеза белков-транспортеров ИУК (Grandmaison, Ibrahim, 1996). Кроме того флавоноиды могут являться ингибиторами различных гидролитических ферментов (Franco et al., 2020).

Заключение

Таким образом, полученная каллусная культура солодки голой способна к синтезу различных флавоноидов, обладающих антиоксидантной активностью и может рассматриваться как потенциальный продуцент биологически активных соединений.

Работа выполнена в рамках Госзадания Казанского института биохимии и биофизики ФИЦ Казанского научного центра РАН.

Литература

- Акулов А.Н., Костюкова Ю.А. Условия культивирования, гистологический и биохимический анализ каллусной культуры солодки голой *Glycyrrhiza glabra* L. Цитология, 2021, Т. 63, № 6, С. 590–604.
- Шретер А.И., Валентинов Б.Г., Наумова Э.М. Природное сырье китайской медицины. Справочник (в 3-х томах). Т.1. – М.: «Теревинф», 2004 – с. 506. 128.
- Badkhane, Y., Yadav, A.S., Bajaj, A., Sharma, A.K., and Raghuwanshi, D.K. 2014. *Glycyrrhiza glabra* L. a miracle medicinal herb. Indo American Journal of Pharmaceutical Research. V. 4. P. 5808–5816.
- Cheel J., et al., Neugebauerová J. Variations in the chemical profile and biological activities of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.), as influenced by harvest times. Acta Physiologiae Plantarum. 2012. P. 35. 10.1007/s11738–012–1174–9.
- Fu C., Lei C. Gan L., Li M., Yang Y., Yu L. Optimization of embryogenic-callus induction and embryogenesis of *Glycyrrhiza glabra*. // African Journal of Biotechnology. 2010. V. 9. P. 5823–5829.
- Grandmaison J., Ibrahim R.K. Evidence for Nuclear Protein Binding of Flavonol Sulfate Esters in *Flaveria chloraefolia*. Journal of Plant Physiology. 1996. V. 147. P. 653–660 [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81474-4](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81474-4)
- Hiltunen E., et al. Discolouration of birch wood: analysis of extractives from discoloured surface of vacuum-dried european white birch (*Betula pubescens*) board. Wood Sci. Technol. 2008. V. 42. P. 103. DOI: 10.1007/s00226–007–0143–8.
- Hutzler P. et al Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser microscopy. Journal of Experimental Botany. 1998. V.49. P. 953–965 DOI:10.1093/jexbot/49.323.953
- Franco E., et al. 2020. Enzyme-assisted modification of flavonoids from *Matricaria chamomilla*: antioxidant activity and inhibitory effect on digestive enzymes. Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry. V. 35. P. 42–49. <https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1681989>.
- Moya R., Fallas, R.S., Bonilla P.J., Tenorio C. Relationship between wood color parameters measured by the CIELab system and extractive and phenol content in *Acacia mangium* and *Vochysia guatemalensis* from fast-growth plantations. Molecules. 2012. V. 17. P. 3639–3652. DOI: 10.3390/molecules17043639.
- Pandey D.K., Ayangla N.W. Biotechnological aspects of the production of natural sweetener glycyrrhizin from *Glycyrrhiza* sp. Phytochem Rev. 2018. V.17. P. 397–430 <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9540-2>.
- Peer W., Brown D., Tague B., Muday G., Taiz L., Murphy A. Flavonoid Accumulation Patterns of Transparent Testa Mutants of *Arabidopsis*. Plant Physiology. 2001. V. 126. P. 536–548.
- Sembiring E.N., Elya B., Sauriasari R. Phytochemical screening, total flavonoid and total phenolic content, and antioxidant activity of different parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. Pharmacog J. 2018. V.10. P. 123–127.
- Singleton V.L. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phoungstic acid reagent / V.L. Singleton, J.A. Rossi // Am. J. Enol. Vitic. 1965. V. 16. P. 144–158.
- Vlaisavljevića S. et al. Chemical composition, antioxidant and anticancer activity of licorice from Fruska Gora locality. Industrial Crops & Products. 2018. V.112. P. 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.050>.