

УДК 581.1

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-СИСТЕМЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТА ПО ПРОРАСТАНИЮ ПЫЛЬЦЕВЫХ ЗЁРЕН ТАБАКА

Е. С. Суханова¹, Д. В. Кочкин¹, М. В. Титова², Р. В. Сергеев³, А. М. Носов^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, 1
E-mail: mushilda@mail.ru

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
Российская Федерация, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35
E-mail: titomirez@mail.ru

³Поволжский государственный технологический университет,
Российская Федерация, 424000, Йошкар-Ола, пл. Ленина, 3
E-mail: sergeyevrv@volgatech.net

*Тест на прорастание пыльцевых зёрен широко применяется в косметической и медицинской промышленности для анализа токсичности веществ на клеточном уровне. Однако до сих пор не было найдено информации о его использовании для изучения биологической активности изолированных вторичных метаболитов. Была проведена работа по анализу возможности использования этой тест-системы для определения стимулирующей активности индивидуальных полисциазидов и гинзенозидов. Для исследования использовали пыльцу *Nicotiana tabacum* L. Растворы тритерпеновых гликозидов добавляли перед началом инкубации пыльцевых зёрен. Процент прорастания пыльцевых зёрен определяли после 40 и 50 мин. инкубации.*

Ключевые слова: тест на прорастание пыльцевых зёрен; гинзенозиды; полисциазиды; *Rapax*; *Polyscias*; тритерпеновые гликозиды; биологическая активность.

Введение. При изучении свойств растительной биомассы и вторичных метаболитов важно исследовать их биологическую активность. При этом исследование свойств экстрактов растительной биомассы ведётся в основном на биохимическом уровне отдельных клеток, либо в системе целого организма (в том числе медицинские исследования), но эти эксперименты зачастую трудоёмки и времязатратны, поэтому они малопригодны в качестве систем быстрого скрининга для промышленного мониторинга свойств биомассы. А большинство «скрининговых» исследований влияния экстрактов растительной биомассы на культуру клеток животных ограничивается изучением их угнетающего (антимикробного, противоракового и

др.) действия, не охватывая других аспектов биологической активности.

Для оценки токсического эффекта различных веществ в лабораториях часто используют тест на прорастание пыльцевых зёрен. Эта тест-система довольно чувствительна и указывает уровень токсичности веществ на клеточном уровне. Последние 30 лет пыльцевые зёрна различных растений используют для выявления цитотоксического эффекта веществ, загрязняющих окружающую среду [1]. Также этот метод широко используется в косметической и медицинской промышленности [2,3]. Пыльцевые трубки представляют собой систему, совершенно отличную от корня, листа или целого растения. Преимущества метода – в его просто-

те исполнения и быстрой скорости роста пыльцевых трубок. Были показаны его чувствительность и корреляция с другими методами определения токсичности, такими как тест Дрейза [2]. Пыльцевая трубка не содержит хлоропласты и не способна к фотосинтезу, исключая действие токсинов, направленных на фотосинтетический аппарат, что может быть полезно, например, при изучении вреда пестицидов на животные клетки [1].

Однако в литературе не было найдено информации по использованию тест-системы пыльцевых зёрен для изучения биологической активности растительных экстрактов и изолированных вторичных метаболитов.

Цель работы – оценить возможность использования этой тест-системы для определения стимулирующей активности индивидуальных полисциазидов и гинзенозидов.

Условия эксперимента. Для проверки пригодности этого метода для анализа биологической активности вторичных метаболитов использовали гинзенозиды Rf, Rh1, Rh2, Rg1, Rb1 (Sigma, США), гинзенозид малонил-Rb1 и полисциазиды PolA, Pol3, PolE, LadA, выделенные из биомассы культуры клеток женьшеня и листьев интактного растения *Polyscias filicifolia* [4,5]. Гликозиды Rh1, Rh2 и LadA предварительно растворяли в диметилсульфоксиде. Все остальные соединения растворяли в воде.

Для определения активности тритерпеновых гликозидов использовали пыльцу *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana SR1, выращенного из семян в климатической камере (25°C, 16 ч. световой день) в вермикулите вспученном. Растения через день поливали питательным раствором [6].

Пыльники извлекали из цветков накануне их раскрытия и помещали в термостат (25°C) на двое суток. Пыльцу из раскрывшихся пыльников собирали в пробирки и хранили при –20°C. Перед ис-

пользованием её размораживали, отмывали от липофильных компонентов трифины гексаном и выдерживали во влажной камере в течение 2 ч. Стандартная среда для инкубации пыльцы *in vitro* включала 0,3 М сахарозу, 1,6 мМ H₃BO₃, 3 мМ Ca(NO₃)₂, 0,8 мМ MgSO₄ и 1 мМ KNO₃ в 50 мМ MES-Tris - буфере, pH 5, 9 [7].

Растворы тритерпеновых гликозидов добавляли перед началом инкубации пыльцевых зёрен. Процент прорастания пыльцевых зёрен определяли после 40 и 50 мин. инкубации (25°C). По окончании культивирования пробы фиксировали, добавляя равный объём охлаждённого 2 % раствора параформальдегида в 100 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,4.

Проросшими считали пыльцевые зёрна с трубками длиной не менее радиуса пыльцевого зерна. В каждой пробе просчитывали по 500 пыльцевых зёрен. Все опыты проводили не менее чем в пяти биологических повторностях. На рисунках приведены средние значения и их стандартные отклонения.

Результаты и обсуждение. Для исследованных тритерпеновых гликозидов тест на прорастание пыльцевых зёрен оказался высокочувствительным, показав как стимулирующую, так и ингибирующую активность веществ.

На рис. 1–3 представлены результаты влияния на прорастание пыльцевых зёрен различных концентраций полисциазидов А, Е и лидигинозида А, соответственно.

В результате проведённых экспериментов установлено, что гликозиды культур клеток полисциаса проявили ингибирующее действие на прорастание пыльцевых зёрен, причём их активность была различной. Наибольшей активностью обладал самый низкомолекулярный гликозид – лидигинозид А (рис. 3) – при наименьшей из выбранных концентраций (50 мкМ) происходило 100 % подавление прорастания.

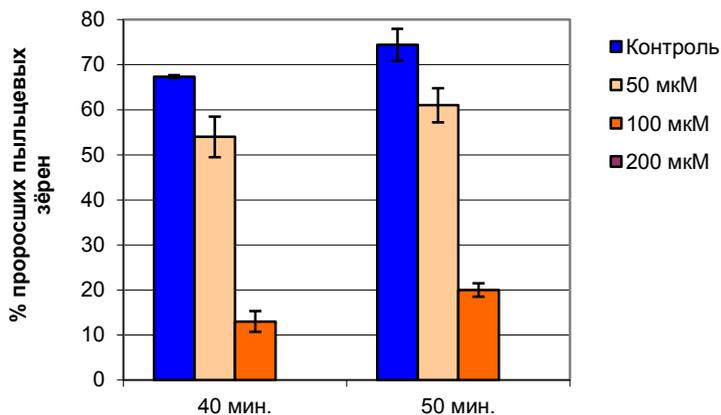


Рис. 1. Влияние полисциазида А на прорастание пыльцевых зёрен (в концентрации 200 мкМ полисциазид А вызывал полное ингибирование прорастания пыльцевых зёрен)

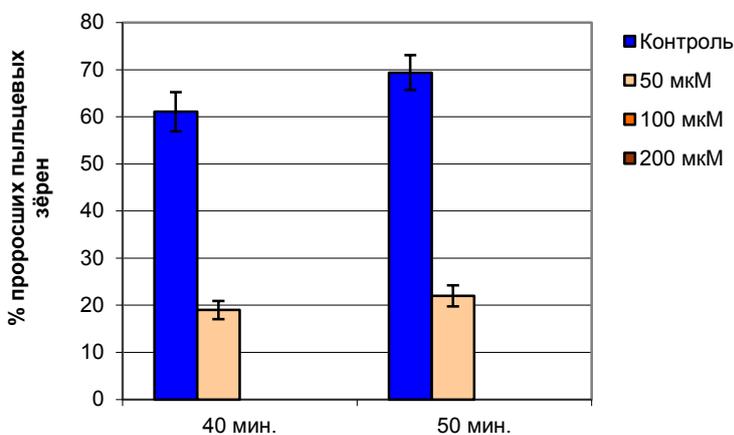


Рис. 2. Влияние полисциазида Е на прорастание пыльцевых зёрен (в концентрациях 100 и 200 мкМ полисциазид Е вызывал полное ингибирование прорастания пыльцевых зёрен)

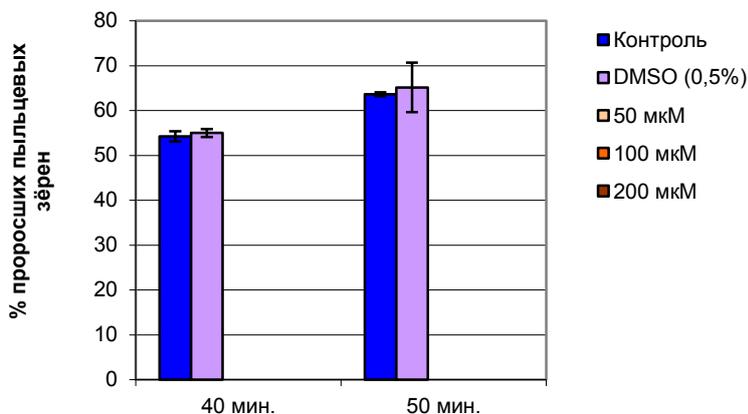


Рис. 3. Влияние ладигинозида А на прорастание пыльцевых зёрен (во всех исследуемых концентрациях полисциазид А вызывал полное ингибирование прорастания пыльцевых зёрен)

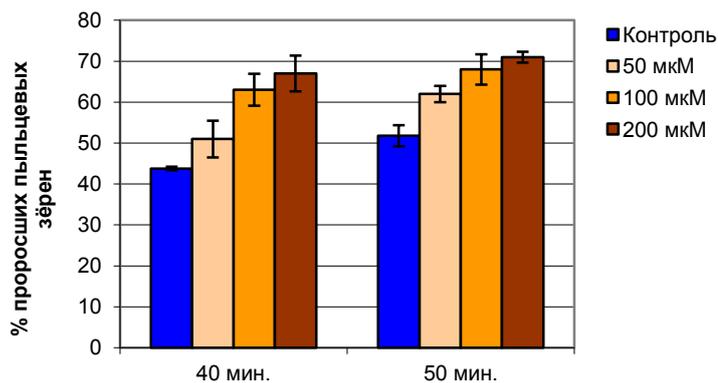


Рис. 4. Влияние гинзенозида Rb1 на прорастание пыльцевых зёрен

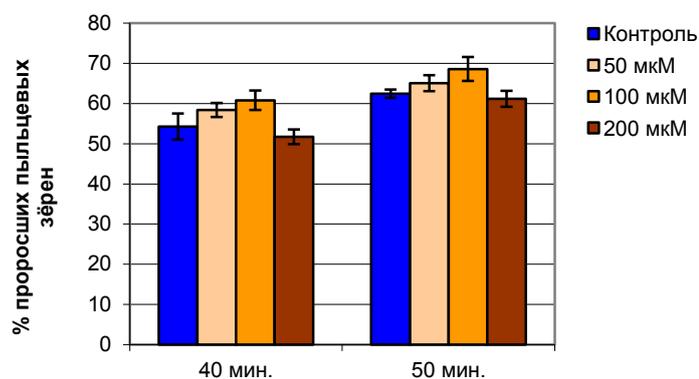


Рис. 5. Влияние малонил-Rb1 на прорастание пыльцевых зёрен

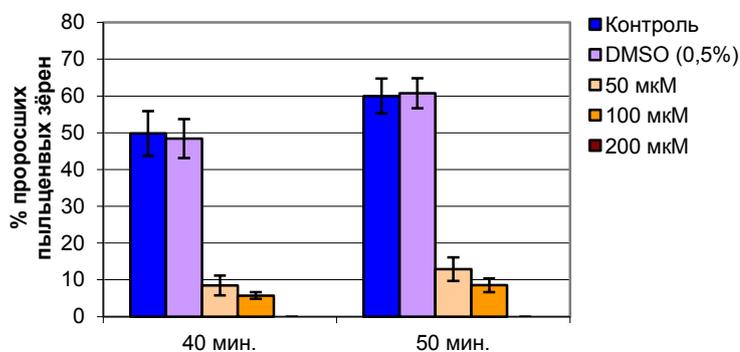


Рис. 6. Влияние гинзенозида Rh2 на прорастание пыльцевых зёрен

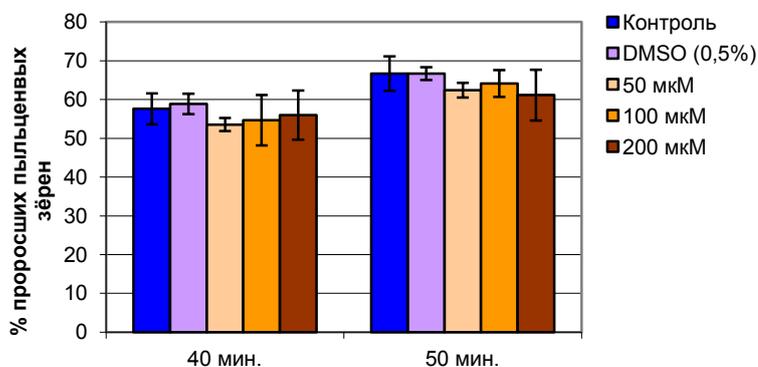


Рис. 7. Влияние гинзенозида Rh1 на прорастание пыльцевых зёрен

В то же время для гинзенозидов было показано как ингибирующее, так и стимулирующее действие. На рис. 4–7 представлены результаты для гинзенозидов Rb1, Mal-Rb1, Rh2 и Rh1.

Для гинзенозида Rb1 было показано стимулирующее действие на прорастание пыльцевых зёрен (рис. 4), которое не проявилось у его малонильного производного (рис. 5). Для гинзенозида Rh2 из группы протопанактодиолов было показано сильное ингибирующее действие (рис. 6), в то время как аналогичный ему гинзенозид Rh1 из группы протопанаксотриолов не оказал существенного влияния

на прорастание пыльцевых зёрен (рис. 7).

Вывод. Представленная тест-система выявила различия в активности гинзенозидов, вызванные как наличием дополнительной ОН-группы (у Rh1 по сравнению с Rh2), так и присоединением остатка малоновой кислоты (у mal-Rb1 по сравнению с Rb1).

Разработан метод экспресс-оценки стимулирующей биологической активности индивидуальных тритерпеновых гликозидов. Данный метод является высокочувствительным, выявляющим зависимость биологической активности индивидуальных гинзенозидов от особенностей их химической структуры.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы» (государственный контракт № 16.552.11.7089 от 12 июля 2012 г.) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «ПГТУ» и Межгосударственной целевой программы ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии» (государственный контракт № 16.M04.12.0003).

Список литературы

1. Kristen, U. The pollen tube growth test / U. Kristen, R. Kappler // *Methods in Molecular Biology*, O'Hare S., Atterwill C.K. (eds.). – Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1995. – Pp. 189-198.
2. Kristen, U. The pollen tube growth test: a new alternative to the Draize eye irritation assay / U. Kristen, U. Hoppe, W. Pape // *Journal-Society of Cosmetic Chemists*. – 1993. – No 44. – Pp. 153-153.
3. Kristen, U. Toxicity screening of mouthwashes in the pollen tube growth test: safety assessment of recommended dilutions / U. Kristen, R.E. Friedrich // *Brazilian Dental Journal*. – 2006. – No 17(1). – Pp. 58-62.
4. Кочкин, Д.В. Обнаружение малонилгинзенозида rb1 в суспензионной культуре клеток женьшеня *Panax japonicus* var. *repens* / Д. В. Кочкин, В. В. Качала, А. М. Носов // Доклады Российской академии наук. – 2011. – Т. 441, № 6. – С. 837–840.
5. Кочкин, Д. В. Тритерпеновые гликозиды культур клеток *Polyscias* spp. / Д.В. Кочкин, Е. С., Суханова, Р. В., Сергеев, А. М. Носов // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. – 2014. – № 1 (21). – С.69-76.
6. Nitsch, J.P. Deux especes photoperiodiques de jours courts: *Plumbago indica* L. et *P. zeylanica* L. // *Bull Soc Bot Fr.* – 1965. – No 9. – Pp. 517-522.
7. Benito Moreno R.M. In situ seed production with *in vitro* matured, isolated pollen. / R.M. Benito Moreno, F. Macke, A. Alwen, E. Heberle-Bors // *Planta*. – 1988. – No 176. – Pp. 145-148.

Статья поступила в редакцию 21.11.13.

Ссылка на статью: Суханова Е. С., Кочкин Д. В., Титова М. В., Сергеев Р. В., Носов А. М. Разработка экспресс-системы определения биологической активности тритерпеновых гликозидов с использованием теста по прорастанию пыльцевых зёрен табака // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. – 2014. – № 2 (22). – С. 77-83.

Информация об авторах

СУХАНОВА Елена Сергеевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры физиологии растений биологического факультета, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. Область научных интересов – культура клеток, вторичный метаболизм высших растений. Автор 20 публикаций.

КОЧКИН Дмитрий Владимирович – кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры физиологии растений биологического факультета, Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова. Область научных интересов – физиология растений. Автор 15 публикаций.

ТИТОВА Мария Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – физиология растений, биотехнология. Автор 25 публикаций.

СЕРГЕЕВ Роман Владимирович – кандидат сельскохозяйственных наук, старший преподаватель кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологий, Поволжский государственный технологический университет. Область научных интересов – биотехнология. Автор 20 публикаций.

НОСОВ Александр Михайлович – доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии растений, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, зав. отделом биологии клетки и биотехнологии, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – биотехнология. Автор более 100 публикаций.

DEVELOPMENT OF EXPRESS-SYSTEM OF BIOACTIVITY DETERMINATION OF TRITERPENOID GLYCOSIDES WITH THE HELP OF THE TEST ON GERMINATION OF POLLEN-GRAINS OF AN INDIAN WEED

E. S. Sukhanova¹, D. V. Kochkin¹, M. V. Titova², R. V. Sergeev³, A. M. Nosov^{1,2}

¹Moscow State University named after M. V. Lomonosov,
1, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russian Federation
E-mail: mushilda@mail.ru

²Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, RAS,
35, Ul.Botanicheskaya, Moscow, 127276, Russian Federation
E-mail: titomirez@mail.ru

³Volga State University of Technology,
3, Pl.Lenina, Yoshkar-Ola, 424000, Russian Federation
E-mail: sergeyevrv@volgatech.net

Key words: *test on germination of pollen-grains; ginsenosides; polysciasides; Panax; Polyscias; triterpenoid glycosides; bioactivity.*

ABSTRACT

*The test on germination of pollen-grains is widely used in beauty and medical industry to analyze toxic potential substances at the cellular level. However, no information about its use for study of biological activity of isolated secondary metabolites has been found yet. A study of possibility of use of this test-system for definition of stimulating activity of individual polysciasides and ginsenosides was carried out. Pollen of *Nicotiana tabacum* L was chosen for the research. Solutions of triterpenoid glycosides were added before incubation of pollen-grains. Percentage of germination of pollen-grains was determined in 40 and 50 minutes after incubation. A stimulating action aimed at pollen-grains germination is necessary for Rb1 ginsenoside, it was not revealed in its derivant. A strong inhibiting action is necessary for Rh2 ginsenoside of the protopanaktodiol's group, while Rh1 ginsenoside from the protopanaksotriol's group (it is similar to Rh2 ginsenoside) did not have a serious impact on germination of pollen-grains. The offered test-system showed differences in activity of ginsenosides, caused by presence of additional OH-group (Rh1 in comparison with Rh2) and addition of remains of malonic acid (mal-Rb1 in comparison with Rb1). A method of express-assessment of stimulating biological activity of individual triterpenoid glycosides was elaborated. This method is supersensitive, it reveals dependence of biological activity of individual ginsenosides on peculiarities of their chemical structure.*

The work was carried out with financial support of Ministry of Education and Science of the Russian Federation within Federal Targeted Programme «Research and Elaboration (Priority Areas) of Russian Science and Technology Sector Development for 2007-2013 years» (government contract № 16.552.11.7089 dated July, 12 2012) with the use of equipment of CUC «EBEE» Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Volga Tech» and Intergovernment targeted programme EvrAzES «Innovative Biotechnologies» (government contract № 16.M04.12.0003).

REFERENCES

1. Kristen U., Kappler R. The pollen tube growth test. *Methods in Molecular Biology*, O'Hare S., Atterwill C.K. (eds.). Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1995. Pp. 189-198.
2. Kristen U., Hoppe U., Pape W. The pollen tube growth test: a new alternative to the Draize eye irritation assay. *Journal-Society of Cosmetic Chemists*. 1993. No 44. Pp. 153-153.
3. Kristen U., Friedrich R.E. Toxicity screening of mouthwashes in the pollen tube growth test: safety assessment of recommended dilutions. *Brazilian Dental Journal*. 2006. No 17(1). Pp. 58-62.
4. Kochkin D.V., Kachala V.V., Nosov A.M. Obnaruzhenie malonil-ginzenozida rb1 v suspenzionnoy kulture kletok zhenshenya [Detection of Malonyl - Ginsenosides rb1 in Suspension Culture of Ginseng Cells (*Panax japonicus* var. *repens*)]. *Doklady Rossiyskoy Akademii nauk* [Reports of Russian Academy of Sciences]. 2011. Vol. 441, №6. Pp. 837-840.
5. Kochkin D.V., Sukhanova E.S., Sergeev R.V., Nosov A.M. Triterpenovye glikozidy kultur kletok [Triterpenoid Glycosides of Cell Culture (*Polyscias* spp.)]. *Vestnik Povolzhskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo universiteta. Ser. Les. Ecologiya. Prirodopolzovanie* [Vestnik of Volga State University of Technology. Ser.: Forest. Ecology. Nature Management]. 2014. № 1(21). Pp. 69-76.
6. Nitsch J.P. Deux especes photoperiodiques de jours courts: *Plumbago indica* L. et *P. zeylanica* L. *Bull Soc Bot Fr*. 1965. No 9. Pp. 517-522.
7. Benito Moreno R.M., Macke F., Alwen A., Heberle-Bors E. In situ seed production with in vitro matured, isolated pollen. *Planta*. 1988. No 176. Pp. 145-148.

The article was received 21.11.13.

Citation for an article: Sukhanova E.S., Kochkin D.V., Titova M.V., Sergeev R.V., Nosov A.M. Development of express-system of bioactivity determination of triterpenoid glycosides with the help of the test on germination of pollen-grains of an indian weed. *Vestnik of Volga State University of Technology. Ser.: Forest. Ecology. Nature Management*. 2014. No 2(22). Pp. 77-83.

Information about the authors

SUKHANOVA Elena Sergeyevna – Candidate of Biological Sciences, Research officer at the Chair of Plant Physiology, Biological Faculty, Moscow State University named after M. V. Lomonosov. Research interests – cell culture, secondary metabolism of higher plants. The author of 20 publications.

KOCHKIN Dmitry Vladimirovich – Candidate of Biological Sciences, Researcher at the Chair of Plant Physiology, Biological Faculty, Moscow State University named after M. V. Lomonosov. Research interests – plant physiology. The author of 15 publications.

TITOVA Maria Vladimirovna – Candidate of Biological Sciences, Researcher at the Laboratory of Physiology of Cultured Cells, Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, RAS. Research interests – plant physiology, biotechnology. The author of 25 publications.

SERGEEV Roman Vladimirovich – Candidate of Agricultural Sciences, Senior Lecturer at the Chair of Wood Selection, Non-Woody Resources and Biotechnology, Volga State University of Technology. Research interests – biotechnology. The author of 20 publications.

NOSOV Alexander Mikhaylovich – Doctor of Biological Sciences, Professor at the Chair of Plant Physiology, Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Head at the Department of Cytobiology and Biotechnology, Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, RAS. Research interests – biotechnology. The author of more than 100 publications.