

# СОДЕРЖАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И АНТИОКСИДАНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КАЛЛУСНЫХ ЛИНИЙ И НАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ *TRIGONELLA FOENUM-GRAECUM*

А.О. Логвина

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

## Введение

Пажитник греческий (*Trigonella foenum-graecum* L.) – ценное лекарственное растение, демонстрирующее широкий спектр терапевтических эффектов, среди которых противораковое, антидиабетическое, противовоспалительное, гепатопротекторное, иммуномодулирующее и противогипертензивное действие [1, 2, 3]. Это богатый источник разнообразных биологически активных веществ, в том числе фенольных соединений [4]. Метаболиты фенольной природы являются одной из важнейших групп природных антиоксидантов. По своей активности они опережают такие мощные антиокислители, как витамины С, Е и *b*-каротин [5, 6]. В связи с возрастающей популярностью натуральных антиоксидантных препаратов профилактического и лечебного действия культура клеток пажитника греческого, унаследовавшая биосинтетические свойства нативного растения, может стать экономически выгодным альтернативным источником получения метаболитов фенольной природы с целью изготовления указанных лекарственных средств [7]. Поэтому исследование биосинтетической способности клеточных культур пажитника греческого в отношении метаболитов фенольной природы и установление их антиоксидантного потенциала представляет значительный интерес. При этом известно, что по уровню накопления вторичных метаболитов, клетки и ткани, культивируемые *in vitro*, часто уступают интактным растениям [8]. Также необходимо учитывать, что происхождение культур *in vitro*, в частности тип первичных эксплантов и сорт растения, как и световые условия выращивания, могут в значительной степени определять их биосинтетический потенциал, поэтому для обнаружения наиболее продуктивной культуры целесообразным является увеличение числа тестируемых клеточных линий.

Целью данного исследования было проведение сравнительного анализа активности синтеза фенольных соединений и антиоксидантного потенциала гетеротрофных и фотомиксотрофных каллусных линий различного происхождения и интактных растений пажитника греческого.

## Методы исследования

Объектами изучения служили интактные растения и гетеротрофные и фотомиксотрофные линии листовых и стеблевых каллусов пажитника греческого ярового сорта Ovarі 4 (далее ГЛКЯС и ФЛКЯС, ГСКЯС и ФСКЯС соответственно) и озимой разновидности сорта PSZ.G.SZ. (далее ГЛКОС и ФЛКОС, ГСКОС и ФСКОС соответственно). Культивирование каллусных тканей осуществляли на агаризованной питательной среде Мурасиге и Скуга, дополненной 4% сахарозы и фитогормонами 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д), кинетином, индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) в различных комбинациях [9]. Гетеротрофные каллусные линии выращивали в темноте в условиях микробиологического термостата при температуре 24°C. Фотомиксотрофные линии культивировали на свету в условиях фитостата (14 ч свет/10 ч темнота) при комнатной температуре и интенсивности освещения 3000 лк. Растения получали из семян пажитника ярового сорта Ovarі 4 (урожай 2006 г.) и озимого сорта PSZ.G.SZ (урожай 2009 г.). Выращивали в грунте в условиях фитостата (14 ч света/10 ч темнота) при комнатной температуре и интенсивности освещения 3000 люкс.

Общее содержание фенольных соединений (ОСФС) в объектах устанавливали по методу Фолина-Чокальтеу и выражали в мг/г сухой массы в эквиваленте галловой кислоты

(мг ГК/г сух. м.) [10]. С целью оценки антиоксидантных свойств вытяжек сравнивали антирадикальную, общую антиоксидантную и хелатирующую активности. Для определения антирадикальной активности (АРА) экстрактов использовали метод DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил) [11], общей антиоксидантной активности (ОАА) – фосфомолибденовый метод [12], хелатирующей активности (ХА) – метод, основанный на реакции ингибирования формирования феррозин-Fe<sup>2+</sup>–комплекса [13]. Показатели антиоксидантного потенциала выражали в мг/г сухой массы в эквиваленте аскорбиновой кислоты (мг АК/г сух. м.).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. Данные представлены в виде средних значений и стандартной ошибки средней. Оценку линейной связи между количественными переменными проводили с помощью коэффициента Пирсона ( $r_{xy}$ ). Гипотезу о наличии достоверной положительной корреляции считали подтвержденной при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение**

Изучение биосинтетического потенциала каллусных линий и растений пажитника греческого показало, что наиболее высоким содержанием фенолов среди всех исследуемых линий клеток, максимально близким к их уровню в нативных растениях, характеризовался ГЛКЯС (8,7 мг ГК/г сух. м.) (рисунок 1). Причем какой-либо связи данной биохимической характеристики с происхождением каллусов – сортом исходного растения или типом эксплантов, а также со световыми условиями культивирования, не обнаруживается.

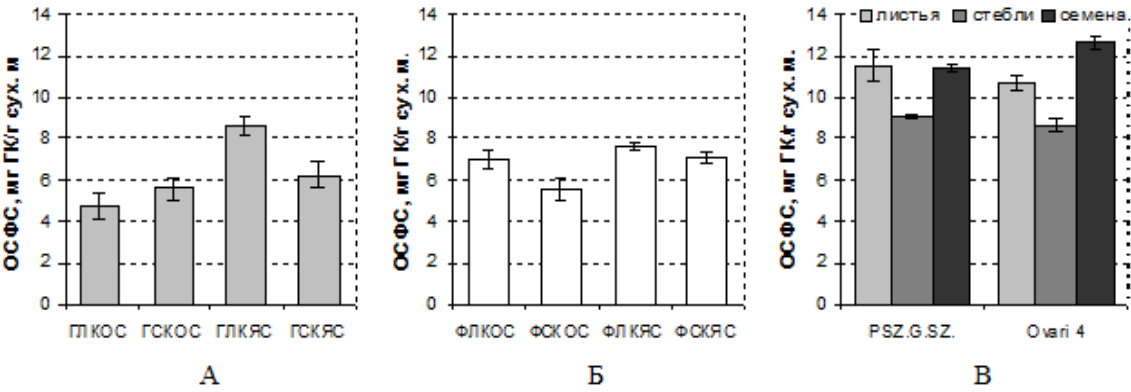


Рисунок 1 – Общее содержание фенольных соединений в гетеротрофных (А) и фотомиксотрофных (Б) каллусных линиях и растениях (В) пажитника греческого ярового сорта Ovari 4 и озимого сорта PSZ.G.SZ.

Из результатов, представленных на рисунке 2, видно, что вытяжки листьев, стеблей и семян пажитника ярового сорта Ovari 4 и озимой разновидности сорта PSZ.G.SZ., обнаруживали более выраженную способность нейтрализовать свободные радикалы (0,76–0,91 мг АК/г сух. м.) относительно экстрактов каллусов, из которых наиболее значительными антирадикальными свойствами характеризовалась гетеротрофная линия ГЛКЯС (0,65 мг АК/г сух. м.) (рисунок 2). И только значение антирадикальной активности ее экстракта приближается к результатам, полученным для органов пажитника греческого.

Корреляционный анализ показал, что общее содержание фенольных соединений положительно коррелирует с антирадикальной активностью экстрактов гетеротрофных ( $r_{xy}=0,98$ ,  $p \leq 0,05$ ,  $n=4$ ) и фотомиксотрофных ( $r_{xy}=0,99$ ,  $p \leq 0,05$ ,  $n=4$ ) каллусных тканей, как и органов пажитника греческого обоих сортов ( $r_{xy}=0,92$ ,  $p \leq 0,01$ ,  $n=6$ ) – во всех случаях связь сильная, прямая. Вероятное доминирование в составе экстрактов фенольных соединений с выраженными антирадикальными свойствами может служить объяснением положительной корреляции между содержанием фенолов и антирадикальной активностью исследуемых объектов, что согласуется с результатами, полученными Ястержебски с соавторами (2007) [11].

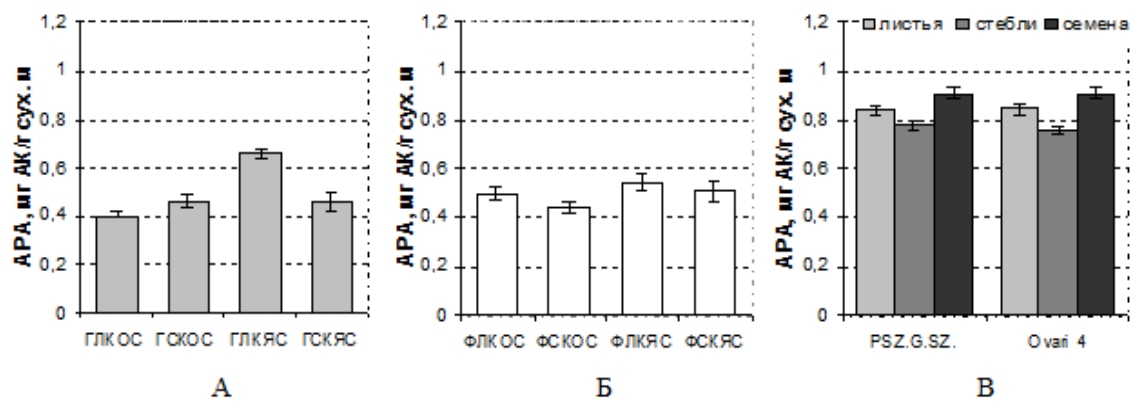


Рисунок 2 – Антирадикальная активность экстрактов гетеротрофных (А) и фотомиксотрофных (Б) каллусных линий и органов растений (В) пажитника греческого ярового сорта Ovari 4 и озимого сорта PSZ.G.SZ.

Определение общей антиоксидантной активности позволило оценить восстановительную, или электрондонорную, способность образцов (рисунок 3).

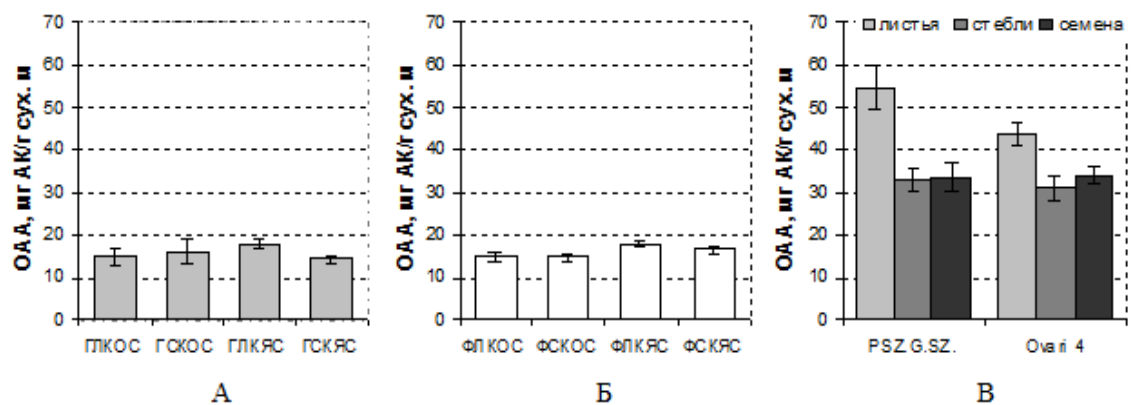


Рисунок 3 – Общая антиоксидантная активность экстрактов гетеротрофных (А) и фотомиксотрофных (Б) каллусных линий и органов растений (В) пажитника греческого ярового сорта Ovari 4 и озимого сорта PSZ.G.SZ.

Установлено, что значения общей антиоксидантной активности экстрактов клеточных линий изменяются в сравнительно небольших пределах – от 14,3 мг АК/г сух. м. в случае ГСКЯС до 17,9 мг АК/г сух. м. для ФЛКЯС. Пробы, полученные из листьев пажитника греческого ярового сорта Ovari 4 и озимой разновидности сорта PSZ.G.SZ., имели наиболее высокую восстановительную способность – 43,6 мг АК/г сух. м. и 54,4 мг АК/г сух. м. соответственно. И хотя общая антиоксидантная активность экстрактов стеблей и семян обоих сортов пажитника греческого была ниже и составляла в среднем 32,8 мг АК/г сух. м., тем не менее, восстановительная способность экстрактов всех исследуемых каллусных тканей в разы уступает по данному показателю вытяжкам надземных органов и семян.

Несмотря на различия в содержании фенольных соединений в клеточных линиях, восстановительная способность их экстрактов варьировала в относительно небольших пределах, что отразилось на корреляционных отношениях данных биохимических характеристик. Так, коэффициент Пирсона в случае экстрактов гетеротрофных и фотомиксотрофных каллусов составляет 0,802 и 0,796 (n=4) соответственно, что свидетельствует о наличии средней положительной связи между содержанием полифенолов и общей антиоксидантной активностью тестируемых проб.

Незначительная взаимосвязь наблюдается между уровнем накопления метаболитов фенольной природы и восстановительной способностью экстрактов листьев, стеблей и семян пажитника греческого обоих сортов. В то же время, корреляционный анализ только для наземных органов растений (листьев и стеблей) обнаруживает прямую сильную связь ( $r_{xy}=0,98$ ,  $p<0,05$ ,  $n=4$ ), что свидетельствует о том, что в указанных пробах общая антиоксидантная активность может вполне определяться содержанием фенольных соединений. Существенное понижение коэффициента корреляции показателями семян вызвано несоответствием восстановительной способности их экстрактов и уровнем фенольных соединений. За восстановительную способность экстрактов семян могут быть ответственны либо только отдельные группы фенолов в полифенольном комплексе, либо вещества иной природы. Известно, что значительной восстановительной способностью характеризуются многие первичные и вторичные метаболиты [14; 15].

Хелатирующая способность экстрактов, являясь важным самостоятельным типом фармакологической активности, также может рассматриваться как одно из проявлений антиоксидантного потенциала. Связывая ионы металлов, хелатирующие вещества не оказывают прямого антиоксидантного действия, однако предотвращают генерацию перекисных радикалов и, как следствие, перекисное окисление липидов, вызываемое ионами переходных металлов [16].

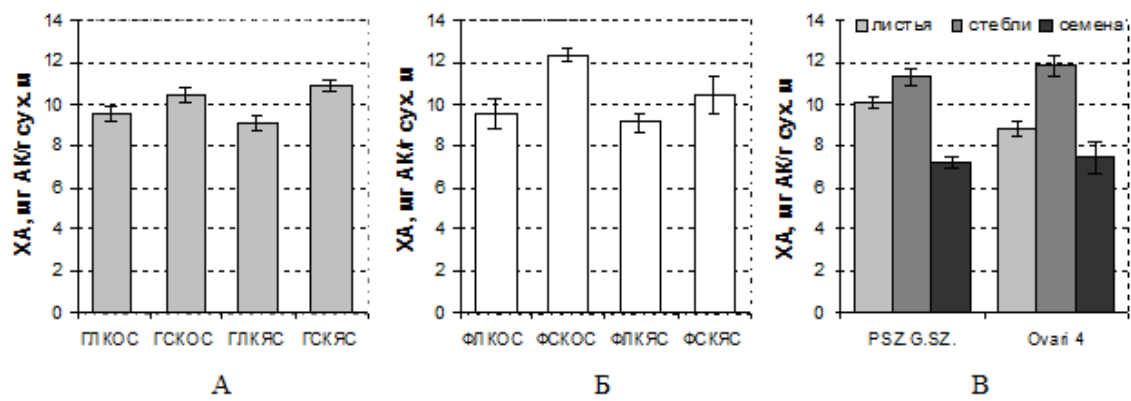


Рисунок 4 – Хелатирующая активность экстрактов гетеротрофных (А) и фотомиксотрофных (Б) каллусных линий и органов растений (В) пажитника греческого ярового сорта Ovari 4 и озимого сорта PSZ.G.SZ.

Вопреки тому, что антирадикальная и общая антиоксидантная активности водно-спиртовых экстрактов растений пажитника греческого были выше, чем у вытяжек каллусных тканей, по хелатирующей активности последние не уступали извлечениям из органов растений. При этом самая низкая способность связывать ионы железа была показана для экстрактов ГЛКЯС и ФЛКЯС (9,1 мг АК/г сух. м.), а самая высокая – для ФСКОС (12,3 мг АК/г сух. м.), что даже превышает хелатирующую активность вытяжек стеблей (11,4–11,9 мг АК/г сух. м.), характеризующихся наиболее выраженным хелатирующим эффектом среди проб, полученных из органов растений пажитника греческого, независимо от сортовой принадлежности.

Корреляционный анализ выявил отрицательную связь между содержанием фенольных соединений и металлсвязывающей способностью водно-спиртовых экстрактов гетеротрофных ( $r_{xy}=-0,46$ ,  $n=4$ ) и фотомиксотрофных ( $r_{xy}=-0,96$ ,  $n=4$ ) каллусных тканей и извлечений органов пажитника греческого разных сортов ( $r_{xy}=-0,869$ ,  $n=6$ ). Похожие данные были получены и другими авторами. Так, несмотря на установленную сильную положительную корреляцию между содержанием фенольных соединений и антиоксидантной активностью экстрактов различных частей *Hypericum foliosum*, связи с хелатирующей способностью вытяжек обнаружено не было [17].

В исследовании, проведенном Псотовой с соавторами (2003), оценивали хелатирующую активность ряда фенольных соединений. Было показано, что металлсвязывающие свойства тестируемых фенолов определялись их структурой [18]. Среди протестированных авторами метаболитов фенольной природы, наиболее эффективными хелаторами оказались фенольные кислоты и их эфиры, содержащие катехоловую группу (наличие ОН-групп у атомов углерода С3 и С4) и двойную связь в боковой цепи. Поэтому хелатирующая активность не будет зависеть от суммарного содержания фенолов в том случае, если эффективные хелаторы составляют лишь долю от суммы всех присутствующих в экстрактах метаболитов данной группы. Также авторами установлено, что при взаимодействии тестируемых фенольных соединений с ионами меди и железа могут образовываться различные по стехиометрии комплексы с соотношением металл–лиганд 1:1 и 1:2, причем структуры обоих типов являются стабильными. Следовательно, если равновероятно могут образовываться комплексы с разной стехиометрией, то есть на связывание одного иона металла может расходоваться более чем одна молекула фенольных соединений, то прямая положительная связь между содержанием данных метаболитов и хелатирующей активностью экстракта наблюдаться не может. Наряду с чем хелатирующие свойства экстрактов могут быть обусловлены не только метаболитами фенольной природы, но и другими соединениями, такими как полисахариды, белки или пептиды [19].

### Выводы

Таким образом, в соответствии с представленными данными антирадикальная активность экстрактов большинства исследуемых каллусов значительно ниже, чем у растений пажитника, за исключением гетеротрофного штамма ГЛКЯС, протондонорные свойства которого достигают уровня, характерного для экстрактов стеблей. При этом антирадикальная активность вытяжек каллусных тканей достоверно взаимосвязана с содержанием фенолов. По хелатирующим свойствам экстракты каллусных тканей не уступают вытяжкам органов пажитника греческого. И даже отмечается фотомиксотрофная линия ФСКОС, металлсвязывающая способность которой превышает демонстрируемую органами растений. Общая антиоксидантная способность экстрактов различных каллусов варьирует в небольшом диапазоне значений, но при этом она в два раза ниже по сравнению с семенами и стеблями, и в три раза меньше выражена по сравнению с листьями, хотя и выявляется средняя связь с содержанием фенольных соединений. Основываясь на данных о содержании фенольных соединений и суммарном антиоксидантном потенциале каллусных линий пажитника греческого, можно заключить, что ГЛКЯС является наиболее перспективной для проведения дальнейших исследований.

### Список литературы

1. Rajagopalan, M.S. Fenugreek, what this herb can offer? / M.S. Rajagopalan // Naturally. – 1998. – Vol. 1. – P. 1–4.
2. Fenugreek seed (*Trigonella foenum-graecum*) polyphenols inhibit ethanol-induced collagen and lipid accumulation in rat liver / S. Kaviarasan [et al.] // Cell Biol Toxicol. – 2007. – Vol. 23. – P. 373–380.
3. Antibacterial and anti-oxidant activities of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) Leaves / R. Premanath [et al.] // Research Journal of Medicinal Plant. – 2011. – Vol. 5, № 6. – P. 695–705.
4. Barnes, J., Herbal medicines (3rd ed.) / J. Barnes, L.A. Anderson, J.D. Philipson. – London: Pharmaceutical Press, 2007. – 710 p.
5. Antioxidant properties of phenolic compounds / C. Rice-Evans [et al.] // Trends Plant Sci. – 1997. – Vol. 2. – P. 152–159.
6. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables / J.A. Vinson [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 1998. – Vol. 46. – P. 3630–3634.

7. Chawla, H.S. Introduction to plant biotechnology (2nd ed.) / H.S. Chawla. – Enfield: Science Publishers, 2002. – 538 p.
8. Yoshimatsu, K. Tissue culture of medicinal plants: micropropagation, transformation and production of useful secondary metabolites / K. Yoshimatsu // Studies Nat Products Chem. – 2008. – Vol. 34. – P. 647–752.
9. Induction of callus from leaves and stems of *Trigonella foenum-graecum* varieties / H.O. Lohvina [et al.] // Acta Agronomica Óváriensis. – 2012. – Vol. 54, № 2. – P. 29–37.
10. Slinkard, K. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods / K. Slinkard, V.L. Singleton // AJEV. – 1977. – Vol. 28. – P. 49–55.
11. *In vitro* studies of polyphenol compounds, total antioxidant capacity and other dietary indices in a mixture of plants (Prolipid) / Z. Jastrzebski [et al.] // International Journal of Food Sciences and Nutrition. – 2007. – Vol. 58, № 7. – P. 531–541.
12. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E / P. Prieto [et al.] // Anal. Biochem. – 1999. – Vol. 269. – P. 337–341.
13. Huang, S. Concentrations and antioxidant activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain / S. Huang, J.C. Kuo // Proc. Natl. Sci. Counc. ROC. – 2000. – Vol. 24, № 4. – P. 193–201.
14. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity / Y.H. Chu [et al.] // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2000. – Vol. 80. – P. 561–566.
15. Antioxidant activities of extracts and main components of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) leaves / N. Wu [et al.] // Molecules. – 2009. – Vol. 14. – P. 1032–1043.
16. Michalak, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress / A. Michalak // Polish J. of Environ. Stud. – 2006. – Vol. 15, № 4. – P. 523–530.
17. Antioxidant properties, total phenolic, total carotenoid and chlorophyll content of anatomical parts of *Hypericum foliosum* / N. Rainha [et al.] // Journal of Medicinal Plants Research. – 2011. – Vol. 5, № 10. – P. 1930–1940.
18. Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics / J. Psotová [et al.] // Biomed. Papers. – 2003. – Vol. 147, № 2. – P. 147–153.
19. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds / T. Wang [et al.] // Food Chem. – 2009. – Vol. 116, № 1. – P. 240–248.