

УДК 578.083; 577.15.04; 615.01

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ИЗ БИОМАССЫ ЖЕНЬШЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*PANAX GINSENG* C.A. MEY) С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *IN VITRO*

И.А. Лупанова^{1*}, Н.С. Цыбулько¹, Т.А. Савина¹, Е.В. Ферубко¹

Резюме. Настоящая работа посвящена оценке адаптогенной активности суспензионной культуры женьшеня обыкновенного, штамм Pa.g(B)05ВИЛАР, в сравнении со спиртовым экстрактом из корней женьшеня обыкновенного (*Panax Ginseng* C.A. Mey) с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro*, основанных на ферментах антиоксидантной защиты, каталазы и глутатионредуктазы. Были выявлены выраженные адаптогенные свойства изученных образцов. Суспензионная культура женьшеня обыкновенного может быть использована как альтернативный источник сырьевой базы биологически активных веществ.

Ключевые слова: экстракт из биомассы женьшеня обыкновенного, специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, биологическая активность.

STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE EXTRACT OF PANAX GINSENG (*PANAX GINSENG* C.A. MEY) BIOMASS EXTRACT USING SPECIFIC ENZYMATIC TEST SYSTEMS *IN VITRO*

I. A. Lupanova^{1*}, N. S. Tsibulko¹, T. A. Savina¹, E. V. Ferubko¹

Abstract. The objects of study are *Panax ginseng* suspension culture, strain Pa.g(B)05ВИЛАР in comparison with the dry extract of *Panax ginseng* (*Panax Ginseng* C.A. Mey). To study the extract of *Panax ginseng* biologically active properties, we were using the specific enzyme biotest systems *in vitro* glutathione reductase- and catalase-base. These biotest systems administration can detect respectively compounds with antioxidant, antimicrobial and adaptogenic activity can be detected using complex of these specific enzyme biotest systems. It was found the adaptogenic activity of biologically active substances contained in a dry extract of *Panax ginseng*.

Keywords: extract of *Panax ginseng* biomass, specific enzymatic biotest systems, biological activity.

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, 7

1 – National Institute of Herbal and Aromatic Plants, 7, Grina str., Moscow, 117216, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: iriss86@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Женьшень обыкновенный (*Panax ginseng* C.A. Mey) принадлежит к многочисленному роду *Panax* семейства аралиевых (Araliaceae). Обнаруженные в нем биологически активные вещества (сапонины, активные полиацетилены, полисахариды, различные макро- и микроэлементы, витамины, эфирные масла и другие) оказывают противовоспалительное действие, благотворно влияют на сердечно-сосудистую систему, углеводный обмен, повышают физическую и умственную работоспособность [1].

Однако культивирование женьшеня очень сложно и трудоемко, запасы данного вида сырья невелики. В связи с этим широко разрабатывается получение продуктов метаболизма женьшеня обыкновенного из клеточных культур растений. В

ФГБНУ «ВИЛАР» получен клеточный штамм женьшеня обыкновенного с высокими ростовыми и биосинтетическими характеристиками. Определение целесообразности проведения с данным штаммом дальнейших исследований достаточно актуально. Поэтому оценка биологической активности метаболитов данной клеточной культуры может являться ключевым показателем перспективности проводимых исследований.

Для оптимизации выявления биологической активности растительных экстрактов целесообразно применение специфических ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro*. Информативность разработанных в ФГБНУ «ВИЛАР» специфических ферментных биотест-систем определяется в условиях опытов *in vitro* средством изучаемых биологически активных веществ (БАВ) к соответствующим ферментам, играющим

ключевую роль в проявлении целевой биологической активности. Используемые в данной работе ферментные биотест-системы входят в состав биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС) ФГБНУ ВИЛАР. Они многофункциональны, позволяют оценить основной вектор биологической активности БАВ, механизм и характер их действия в зависимости от дозы, возможность негативно влияния БАВ на организм и др. Так, адаптогенные свойства экстрактов изучаются в условиях опытов *in vitro* с помощью каталазной (КАТ) ферментной биотест-системы в комбинации с глутатионредуктазной (ГР) биотест-системой [2–4]. Глутатионредуктазная реакция является лимитирующим звеном восстановленного внутриклеточного глутатионового цикла, играющего исключительно важную роль в защите белков, нуклеиновых кислот, липидов, внутриклеточных мембран от окислительного стресса. А каталаза катализирует разложение образующегося в процессе биологического окисления пероксида водорода на воду и молекулярный кислород ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), а также окисляет в присутствии пероксида водорода низкомолекулярные спирты и нитриты [5].

Биологическую активность суспензионной культуры женьшеня обыкновенного линии Pa.g(S)14ВИЛАР, полученной в результате селекции из исходного штамма Pa.g(B)05ВИЛАР, изучали в условиях опытов *in vitro* с помощью глутатионредуктазной и каталазной специфических ферментных биотест-систем [2–4]. Исследованная в данной работе культура женьшеня обыкновенного входит в состав биологической коллекции клеточных культур лекарственных растений ФГБНУ ВИЛАР.

Методы выявления искомой биологической активности по влиянию БАВ на скорость каталазной, глутатионредуктазной реакций *in vitro* отличаются высокой специфичностью и чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, меньшей трудоемкостью, чем известные методики, не требуют наличия гомогената клеток и дорогостоящих реактивов.

Цель настоящей работы заключалась в изучении биологической активности спиртового экстракта из биомассы женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* С.А. Мей) в сравнении с образцом спиртового экстракта из корней женьшеня обыкновенного с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы: глутатион окисленный, высокоочищенные ферменты – глутатионредуктаза (ГР), каталаза (КАТ), НАДФН (все реактивы фирмы Sigma-Aldrich, США); соляная кислота класса «ос.ч.», фосфат натрия

и калия, хлорид калия и магния, перекись водорода – отечественные реактивы.

Объекты исследования: суспензионная культура женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* С.А. Мей) – линия Pa.g(S)14ВИЛАР, полученная в результате селекции из исходного штамма Pa.g(B)05ВИЛАР (СК), с содержанием экстрактивных веществ до 30% и образец сравнения (ОС) – 70% спиртовой экстракт из корней женьшеня обыкновенного.

Скорость глутатионредуктазной реакции определяли спектрофотометрически [6] по убыли поглощения при 340 нм за счет окисления НАДФН эквивалентным количеством восстановленного глутатиона. Измерения проводились на анализаторе для клинической химии Clima MC-15. Объем пробы 0,5 мл. Исследования проводили при 24 °С.

Для определения скорости каталазной реакции использовали метод [7], основанный на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс, то есть измерения вели по убыли перекиси водорода в процессе реакции. Измерения проводились на анализаторе для клинической химии Clima MC-15.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ статистического анализа *Statistica 6,0* (StatSoft, США). Для оценки значимости отличий между выборками с распределением, приближающимся к нормальному, использовался *t*-критерий Стьюдента [8]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Данные в тексте и таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая величина, m – ошибка средней арифметической.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В начале экспериментальной работы нами было показано, что скорость изучавшихся ферментативных реакций зависит от концентрации объектов исследования и описывается кривой с максимумом. Далее везде – результаты комплексного исследования влияния образца сухого экстракта из биомассы женьшеня обыкновенного и препарата сравнения в наиболее эффективных концентрациях (3,3 мкг/мл и 6,6 мкг/мл) на активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты в опытах *in vitro*.

Результаты определения прямого влияния изучавшихся образцов на скорость глутатионредуктазной и каталазной реакций в условиях опытов *in vitro* представлены на рисунке 1.

Из рисунка видно, что согласно [2] все образцы проявляли адаптогенные свойства, ускоряя ГР-реакцию и снижая скорость КАТ-реакции. При этом

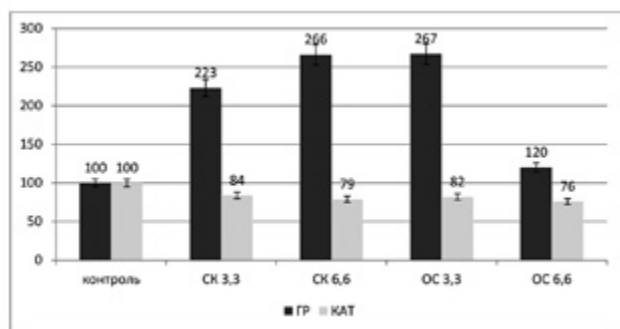


Рисунок 1. Влияние образцов на скорость глутатионредуктазы и каталазы *in vitro*

Примечание: *статистическая значимость отличий от контроля при $p < 0,05$

спиртовая настойка суспензионной культуры женьшеня обыкновенного в большей концентрации ускорила ГР-реакцию в 2,2 раза сильнее, чем образец сравнения.

Таким образом, суспензионная культура женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* С.А. Мей) обладает адаптогенной активностью и может быть использована как альтернативный источник сырьевой базы биологически активных веществ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При изучении экстракта из биомассы женьшеня обыкновенного и образца сравнения с известными адаптогенными свойствами с применением КАТ и ГР – специфических биотест-систем в условиях опытов *in vitro* – были выявлены выраженные адаптогенные свойства изученных образцов. Экстракт суспензионной культуры женьшеня обыкновенного проявлял более выраженные адаптогенные свойства, ускорял ГР-реакцию в 2,2 раза сильнее, чем образец сравнения.

Применение чувствительных и специфичных ферментных биотест-систем, разработанных на основе взаимодействия БАВ с биологическими мишенями в условиях *in vitro*, является новым инновационным подходом к проведению доклинических испытаний, а также к экспресс-оценке качества биотехнологического сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г.Р. Бушуева, Ю.А. Леонидова, Т.А. Савина, Е.В. Ферубко. Изучение биологической активности 30% настойки из клеточной культуры женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* С.А. Мей) // Сборник научных трудов второй научно-практической конференции. Молодые ученые и фармацевтика XXI века. 2014. С. 338–340.
2. Патент РФ № 2181890. Способ выявления веществ, обладающих адаптогенными свойствами, *in vitro* / В.А. Быков, М.Ф. Минеева, В.А. Дубинская, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир; заявитель и

патентообладатель ФГБНУ ВИЛАР. – № 2001115328/14; заявл. 06.06.01; опубл. 27.04.02.

3. Патент РФ № 2181891. Способ выявления веществ, обладающих противомикробными и противовирусными свойствами, *in vitro* / В.А. Быков, М.Ф. Минеева, В.А. Дубинская, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир; заявитель и патентообладатель ФГБНУ ВИЛАР. – № 2001115329/14; заявл. 06.06.01; опубл. 27.04.02.
4. Патент РФ № 2181892. Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, *in vitro* / В.А. Быков, М.Ф. Минеева, В.А. Дубинская, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир; заявитель и патентообладатель ФГБНУ ВИЛАР. – № 2001115330/14; заявл. 06.06.01; опубл. 27.04.02.
5. И.А. Лупанова, М.Ф. Минеева, В.К. Колхир, Л.Б. Стрелкова, Т.А. Сокольская. Применение специфических ферментных биотест-систем *in vitro* для исследования биологической активности некоторых природных соединений // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012. Т. 10. № 1. С. 172–177.
6. H. Aebi. Glutathione reductase // Methods in enzymatic analysis / Ed. by H.V. Bergmeyer. 2nd ed. – 1974. P. 673–678.
7. М.А. Королюк, М.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – М.: Медицина. 1988. № 1. С. 1–8.
8. Р.У. Хабриев. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ // 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. 832 с.