

**ВЛИЯНИЕ ПЕКТИНОВЫХ НАНО- И СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ  
НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ  
СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР *VINCA SP. IN VITRO***

**О.В. Молчан, П.А. Драгун\*, В.М. Юрин\***

*ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф.Купревича НАН Беларуси» Минск,  
Республика Беларусь*

*\*Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь*

*e-mail: yurin@bsy.by*

**Введение**

Важным направлением биотехнологии, которое интенсивно и успешно разрабатывается в последнее время, является получение и последующее изучение клеточных культур лекарственных растений как продуцентов ценных вторичных метаболитов. При этом наиболее перспективным является введение в культуру лекарственных растений, обладающих уникальными фармакологическими свойствами. К ним относят и различные виды рода *Vinca*. В настоящее время препараты, полученные из сырья растений рода *Vinca*, используют для улучшения мозгового кровообращения, в качестве средств с сосудорасширяющим, гипотензивным и слабым седативным действием [1]. В Республике Беларусь дикорастущие представители рода отсутствуют, в культуре выращивают 3 вида: *V. minor*, *V. major* и *V. herbacea*. [2]. На территории нашей страны сырье растений данных видов не заготавливают и не используют.

Источниками сырья для получения фармакологически ценных веществ могут являться культуры клеток и тканей. Однако содержание биологически активных соединений в каллусных и суспензионных культурах, как правило, меньше по сравнению с нативными растениями [3-5]. В связи с показанным рядом авторов положительным воздействием наноматериалов на некоторые биологические процессы [6, 7], представлялось целесообразным использовать их как инструмент для повышения биопродуктивности клеточных культур.

В промышленной биотехнологии с целью получения фармакологически активных веществ преимущественно используются суспензионные культуры, которые и послужили объектом изучения в данной работе. В связи с тем, что биосинтетические свойства клеток в культуре в значительной степени зависят от активности прироста биомассы и физиолого-биохимических процессов, требуется проведение детального физиологического исследования культуры *in vitro* с последующим биохимическим анализом. Данная область науки только развивается, поэтому экспериментально обоснованных данных, полученных в результате изучения влияния различных наночастиц на биохимические и физиологические процессы в растениях, очень мало [6, 7].

**Методы исследования**

В качестве объектов исследования были использованы клетки суспензионных культур растений рода *Vinca*. Детальное описание получения суспензионной культуры приведено в работах [8, 9].

Были использованы 4 линии клеточных культур:

*Vinca minor*:

линия 1 – листового происхождения, характеризуется средней активностью ростовых процессов, светло-коричневой окраской;

линия 2 – корневого происхождения, характеризуется средними ростовыми показателями, светло-коричневой окраской;

линия 3 – листового происхождения с повышенным содержанием фенольных соединений, характеризуется средней активностью ростовых процессов, ярко-желтой окраской.

*Vinca major*:

линия 4 – листового происхождения, характеризуется высокими ростовыми показателями, светло-желтой окраской.

Клеточные суспензии культивировали с пектиновыми нано- и субмикронными частицами в концентрациях 0,01%; 0,5%; 1%. в течение ростового цикла. Пектиновые нано- и субмикронные частицы были получены на базе ГНУ «Институт химии новых материалов НАН Беларуси» в лаборатории микро- и наноструктурируемых систем.

Для оценки активности ростовых процессов определяли индекс роста и время удвоения биомассы. Расчет параметров проводили с помощью стандартных формул. Физиологическое состояние клеток оценивали по накоплению суммы фенольных соединений (ФС) и веществ с антирадикальной активностью. Для определения суммы ФС и антирадикальной активности клетки на стационарной фазе роста отфильтровывали от питательной среды, высушивали при 40 °С, измельчали и использовали для экстракции. Экстракцию проводили 80% этанолом при 80°С в течение 30 минут трехкратно. Полученные экстракты объединяли и использовали для анализа. Содержание суммы ФС определяли по стандартной методике с использованием реактива Фолина-Чокальтеу [10]. Антирадикальную активность - по реакции с DPPH [11].

Анализ ростовых и биохимических параметров проводили в течение 5 пассажей. Для обработки полученных результатов были использованы стандартные методы вариационной статистики, рассчитанной с помощью пакета статистического анализа данных *Microsoft Excel*. Данные на рисунках представлены в виде средней арифметической величины и ошибки средней величины.

#### **Результаты и обсуждение**

Прежде всего была проведена оценка ростовых параметров линий суспензионных культур *Vinca minor* (линии 1-3) и *Vinca major* (линия 4), культивируемых в присутствии пектиновых нано- и суб-микронных частиц. Было изучено влияние частиц на индекс роста клеток в культуре. Как показано на рисунке 1, наночастицы не оказывали существенного влияния на интенсивность ростовых процессов в исследуемых клеточных линиях.

Так, индекс роста клеточных линий 1 и 2 незначительно возрастал только при их культивировании с наночастицами в концентрации 0,5% и 1%. Индекс роста суспензии клеток *V. minor* линии 3 также увеличивался при концентрации пектиновых частиц 0,01%. Более выраженный эффект нано- и субмикронных частиц был отмечен при культивировании суспензионной культуры *Vinca major* (линия 4). Значение параметра индекса роста данной суспензионной культуры увеличивалось в среднем на 18 и 21%, при концентрации пектиновых частиц 0,5% и 1%, соответственно.

Далее была проведена оценка времени удвоения биомассы клеточных линий *Vinca* при их культивировании с пектиновыми нано- и субмикронными частицами. По данным представленным на рисунке 2 видно, что время удвоения биомассы суспензии клеток линии 1 уменьшается в среднем от 7,1 сут до 6,7 сут и 6,6 сут при концентрации наночастиц 0,5% и 1%, соответственно. Данный показатель у культуры линии 2 снижается при таких же условиях от 8,0 сут до 7,3 сут и 7,2 сут. Под влиянием пектиновых нано-и субмикронных частиц, происходит снижение времени удвоения биомассы у суспензии клеток линии 3 от 7,3 сут до 6,2 сут. Среднее значение данного параметра снижается и у суспензионной культуры линии 4 от 5,3 сут до 4,5 сут в присутствии 1 % пектиновых частиц.

Таким образом, важно отметить, что культивирование суспензионной культуры *Vinca* с пектиновыми нано- и субмикронными частицами в целом, не только не снижает скорости ростовых процессов, но даже несколько стимулирует рост суспензии клеток. В большинстве случаев, интенсификация ростовых процессов происходит при культивировании с пектиновыми нано- и субмикронными частицами в концентрации 0,5% и 1%.

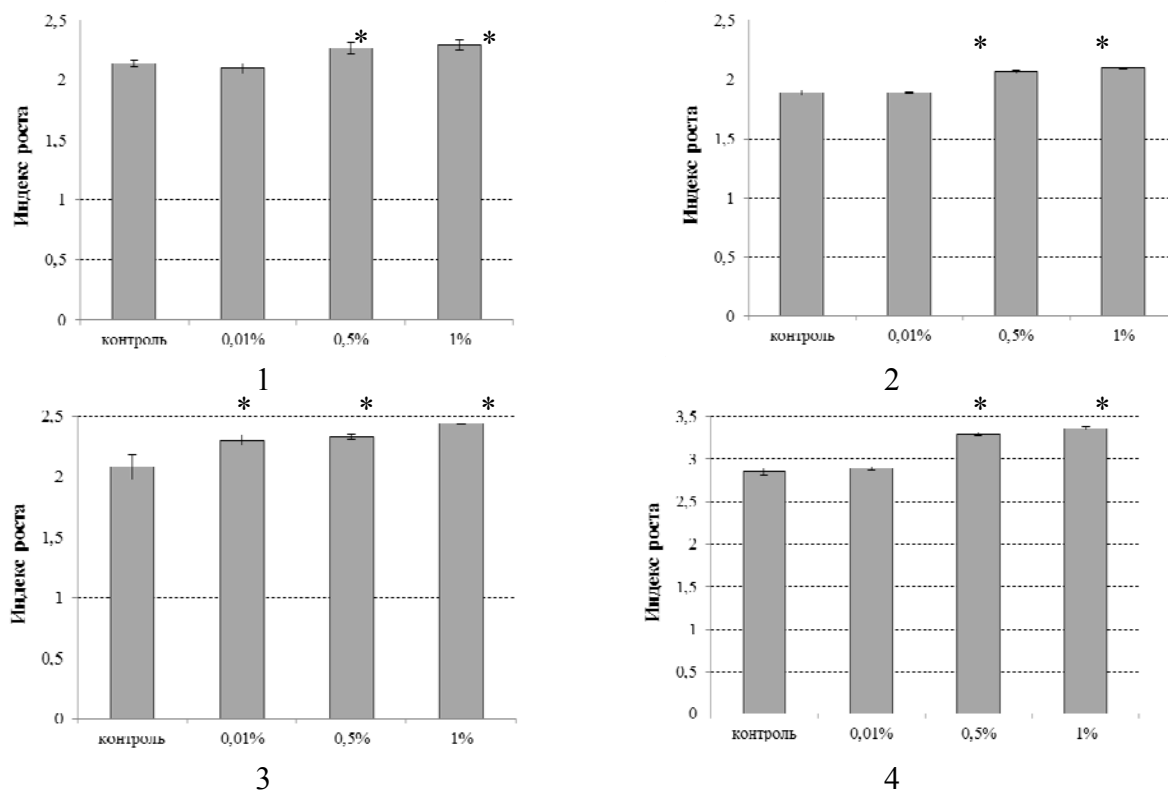


Рисунок 1 – Влияние пектиновых нано- и субмикронных частиц на индекс роста суспензионной культуры *Vinca*: 1-4 – линии 1-4, соответственно; \* – различия достоверны по сравнению с контролем при  $p \leq 0,05$

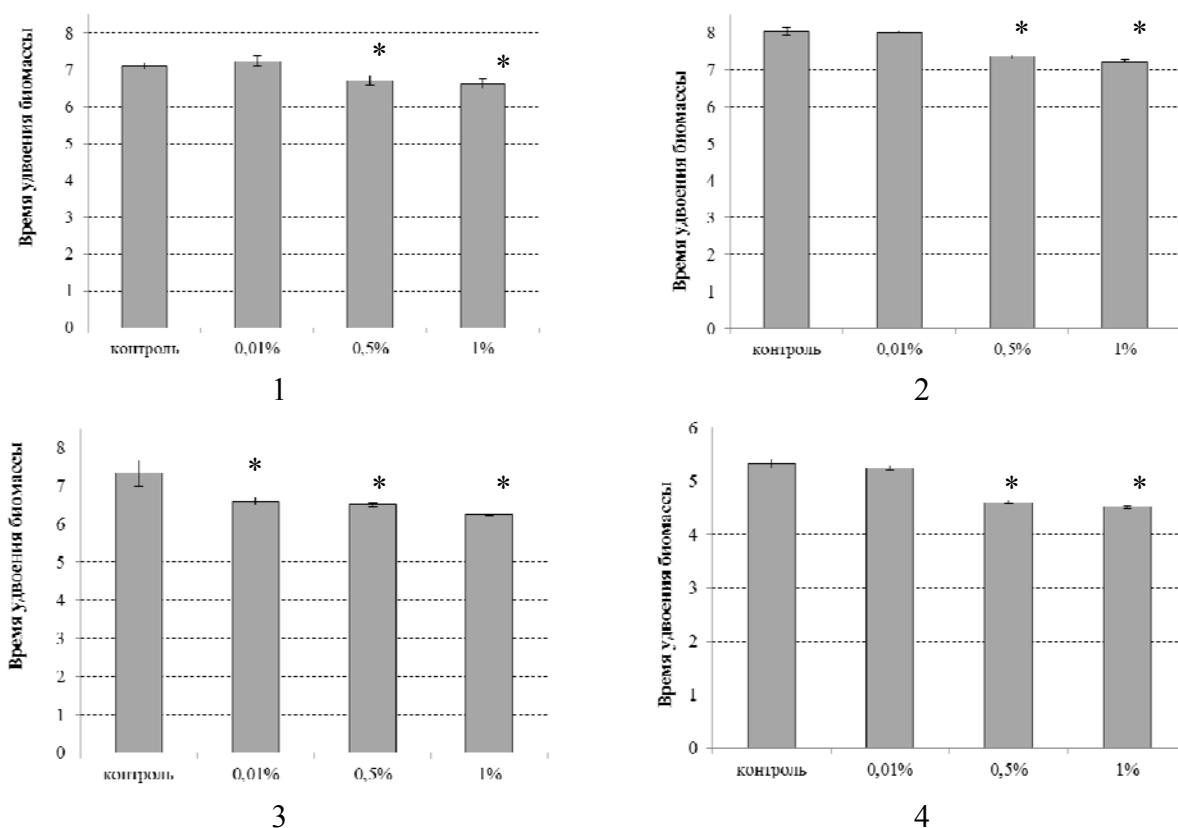


Рисунок 2 – Влияние пектиновых нано- и субмикронных частиц на время удвоения биомассы суспензионной культуры *Vinca*: 1-4 – линии 1-4, соответственно; \* – различия достоверны по сравнению с контролем при  $p \leq 0,05$

Наночастицы в концентрации 0,01% активировали рост только одной из исследованных линий, линии 3, характеризующейся повышенным уровнем накопления ФС.

На следующем этапе было исследовано влияние пектиновых частиц на содержание суммы ФС в клетках суспензионных культур. На рисунке 3 представлены полученные результаты. Как видно на данном рисунке, общее содержание метаболитов фенольной природы в суспензии клеток всех исследованных линий достоверно увеличивается при концентрации пектиновых нано-и субмикронных частиц, равной 0,05% и 1%. Сумма ФС под действием пектиновых частиц в концентрации 1% возрастает в среднем на 35, 27, 17 и 28% в клетках линий 1, 2, 3 и 4, соответственно.

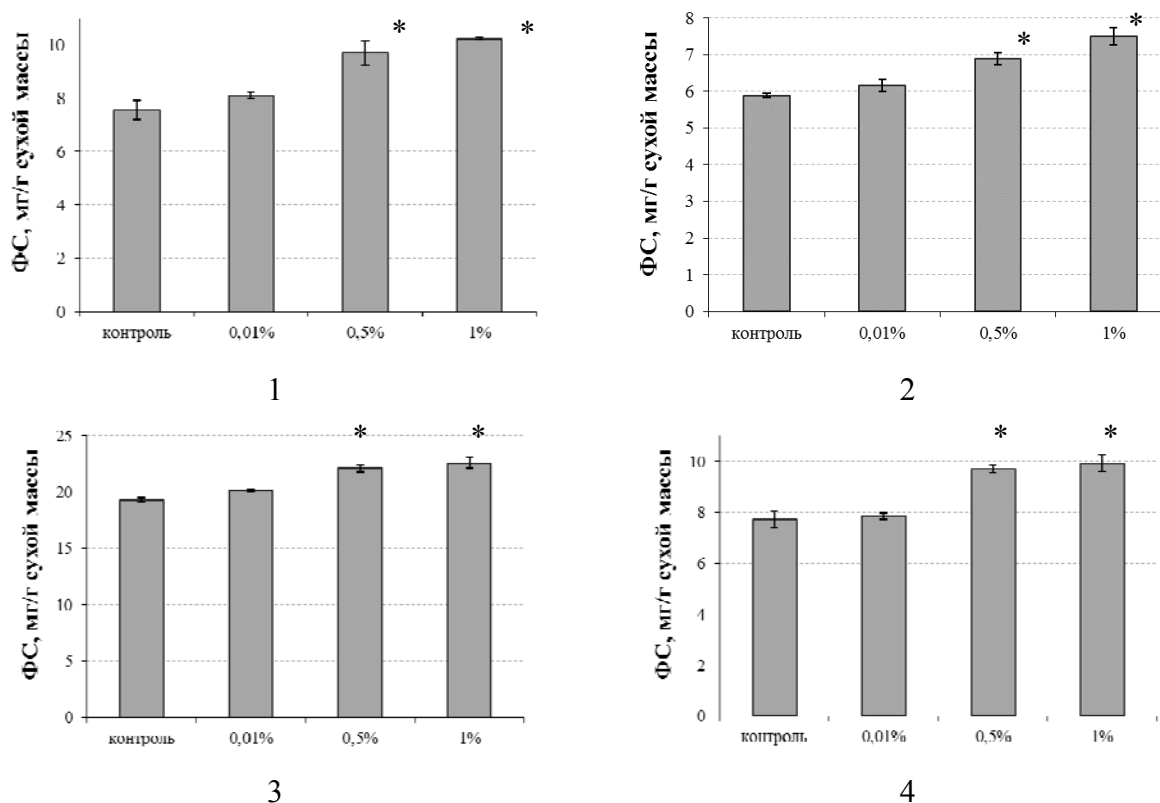


Рисунок 3 – Влияние пектиновых нано- и субмикронных частиц на общее содержание фенольных соединений в суспензионной культуре *Vinca*: 1-4 – линии 1-4, соответственно; \* – различия достоверны по сравнению с контролем при  $p \leq 0,05$

Интересно отметить, что наименьший прирост накопления суммы ФС показан в суспензионной культуре с повышенным уровнем данных метаболитов. ФС принимают участие во многих ключевых физиологических процессах растительной клетки, являясь компонентами фотосинтеза и дыхания, элементами антиоксидантной системы, регулируя рост, развитие и формирование различных структур [12]. Возможно поэтому содержание ФС в клеточных линиях повышается с интенсификацией ростовых процессов. Как было нами показано ранее процессы биосинтеза вторичных метаболитов фенольной природы в клетках каллусных линий листового и корневого происхождения существенно отличаются, о чем свидетельствуют различия в содержании, как суммы ФС, так и индивидуальных соединений [13]. Так, например, феруловая кислота была обнаружена только в каллусных линиях листового происхождения *V. minor* [13].

В данной работе, несмотря на различия в уровнях ФС в исследуемых клеточных линиях, эффект действия пектиновых наночастиц был сходным. Таким образом, скорее всего, стимуляция накопления ФС клетками культур под влиянием пектиновых нано- и субмикронных частиц обусловлена интенсификацией ростовых процессов.

Важным биохимическим параметром, определяющим физиологическое состояние растительной клетки при воздействии экзогенных факторов является активность антиоксидантных систем. Поэтому в данной работе оценивали изменение антирадикальной активности при культивировании суспензионных культур *Vinca* с пектиновыми нано- и субмикронными частицами. Как видно на рисунке 4, антирадикальная активность водно-спиртовых экстрактов суспензии линии 1 снижается при концентрации 0,5 и 1% пектиновых наночастиц.

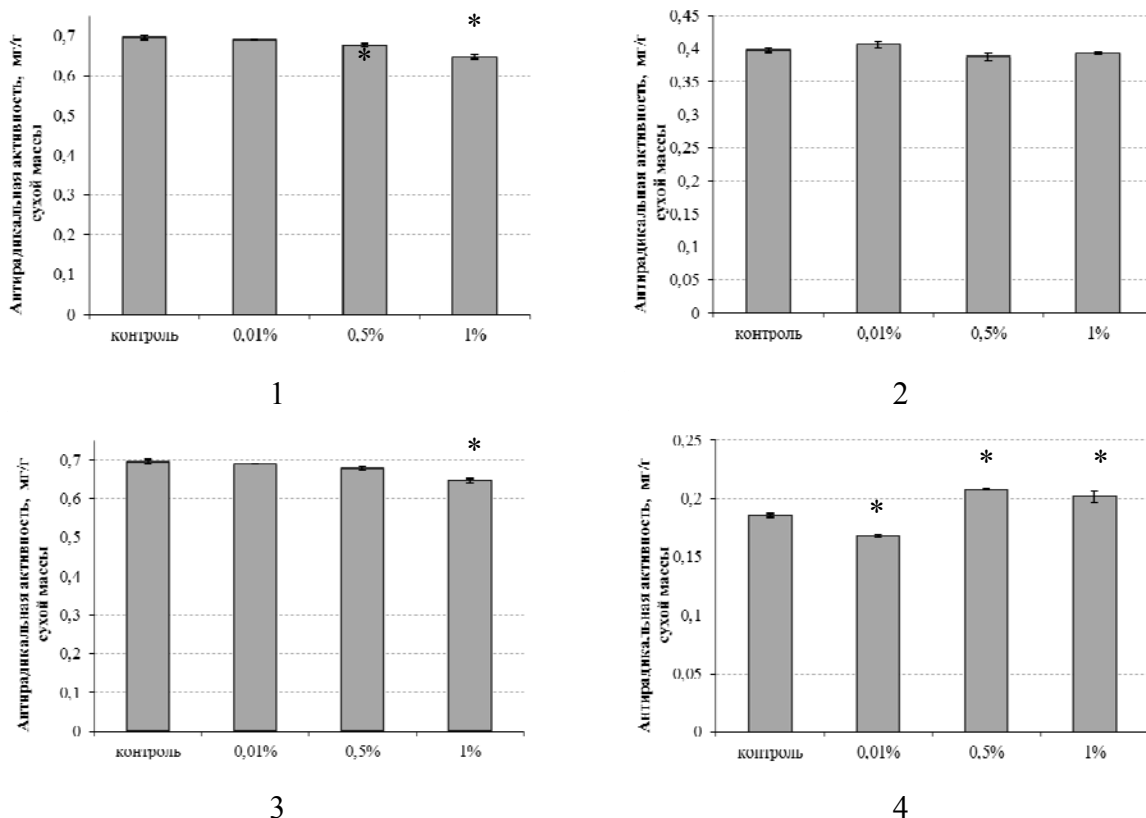


Рисунок 4 – Влияние пектиновых нано- и субмикронных частиц на антирадикальную активность суспензионной культуры *Vinca*: 1-4 – линии 1-4, соответственно;

\* – различия достоверны по сравнению с контролем при  $p \leq 0,05$

В суспензии клеток линии 2 не происходит существенных изменений в антирадикальной активности. В суспензионной культуре линии 3 антирадикальная активность снижается только под действием самой высокой из исследованных концентраций частиц – 1%. Только культивирование суспензии линии 4 в присутствии наночастиц в концентрации 0,5 и 1 % приводит к незначительному повышению антирадикальной активности от 0,18 мг/г сухой массы до 0,20 мг/г сухой массы. Более низкая концентрация пектиновых нано- и суб-микронных частиц уменьшает содержание в клетках соединений с антирадикальной активностью.

### Выводы

Таким образом, культивирование суспензии клеток растений рода *Vinca* четырех исследованных линий с различными исходными физиолого-биохимическими параметрами в присутствии пектиновых нано- и субмикронных частиц в концентрациях 0,5 и 1% стимулирует активность ростовых процессов в среднем на 15-20%. При этом отмечается увеличение содержания в клеточных культурах суммы ФС на 20-30%. В большинстве исследованных линий под действием пектиновых частиц отмечено снижение общей антирадикальной активности. Только в клеточной культуре барвинка большие пектиновые

наночастицы в концентрациях 0,5 и 1% вызывали рост содержания соединений с антирадикальной активностью. Несоответствие количества исследуемых вторичных метаболитов антирадикальной активности может быть связано с активацией пектиновыми частицами синтеза ФС, не обладающих такими свойствами.

### Список литературы

1. Регистрация лекарственных средств России / Г.А Вышковский[и др.] ; под общ. ред. Г.А. Вышковского. – 11-е изд. – М. – 2004. – 195 с.
2. Джус, М.А. Род *Vinca L.* (Аросупасеае) во флоре Беларуси. / Джус М.А., Молчан О.В., Кухарева Л.В., Спиридович Е.В., Юрин В.М. // Украинский ботанический журнал. – 2009. – Т. 66. – № 6. – С.783–793.
3. Носов, А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений / А.М. Носов / Биология культивируемых клеток и биотехнол. растений. – М: Наука, 1991. – С. 5-18.
4. Verpoorte, R. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites / R. Verpoorte, A. Contin, J. Memelink // *Phytochem. Rev.* – 2002. – Vol. 1. – P. 13–25.
5. Moreno, P.R.H. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: A literature survey: II. Updating from 1988 to 1993 / P.R.H. Moreno [et al.] // *Plant cell tissue and organ culture.* – 1995. – Vol. 42. – P. 1–25.
6. Юрин В.М., Молчан О.В. Наноматериалы и растения – взгляд на проблему // Труды БГУ. – 2015. – Т. 10, часть 1. – С. 9-12.
7. Юрин В.М., Молчан О.В. Нанофитофизиология – одно из перспективных направлений современной биологии // Известия НАН Б. Серия биологическая. – 2015. – № 4. – С. 122–128.
8. Юрин, В.М. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза / В.М. Юрин [и др.] Труды БГУ. – 2009. – Т. 4, Ч. 2. – С. 168-182.
9. Юрин, В.М. Экзогенная регуляция вторичного метаболизма в культуре клеток и тканей растений / В.М. Юрин [и др.] // Труды БГУ Сер. «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2008. – Т.3, ч.2. – С. 118–126.
10. Folin, O. Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins / O. Folin, V. Ciocalteu // *J. Biol. Chem.* - 1927. - V. 73. - №2. - P. 627-650.
11. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical / M.S. Blois // *Nature.* - 1958. - V. 181. - P. 1199-1200.
12. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях / М.Н. Запрометов. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
13. Молчан О.В., Фатыхова С.А., Шабуня П.С., Юрин В.М. Содержание феруловой кислоты в интродуцированных растениях и каллусных культурах *Vinca minor L.* Труды БГУ. – 2015. – Т. 10, часть 1. – С. 203-208.

## EFFECTS OF PECTIN NANOPARTICLES ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS OF *VINCA SP.* SUSPENSION CULTURES

O.V. Molchan, P.A. Dragun\*, V.M. Yurin\*

*Institute of experimental botany NAS of Belarus*

*\*Belarussian State University*

*e-mail: yurin@bsu.by*

Influence of pectin nanoparticles on growth activity, phenolic compounds accumulation and antiradical activity of *Vinca sp.* suspension cultures were studied. According to our experimental data, pectin nanoparticles (0,5 and 1%) stimulate growth parameters by 15-20% as well as the level of phenolic compounds content by 20-30% in *Vinca sp.* suspension cells.