

**ВЫЯВЛЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ВОЗДЕЙСТВИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА НА
АНТИРАДИКАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ
CATHARANTHUS ROSEUS (L.) G. DON**

С.Н. Филиппова, П.И. Смирнова

Белорусский государственный университет, Минск, FilippSN@bsu.by

Как известно, биомедиаторы играют важнейшую роль нейротрансмиттеров и гормонов у животных организмов. Однако многие из них также обнаружены в растительных организмах. Предполагается, что данные вещества вовлечены в различные регуляторные механизмы, связанные с ростом и развитием растений, а также их биосинтез может регулироваться стрессовыми факторами [1]. Ацетилхолин (АХ), один из наиболее типичных нейротрансмиттеров животных, был обнаружен в бактериях, простейших, водорослях, низших и высших растениях, что свидетельствует о чрезвычайно раннем его появлении в эволюционном процессе и широкой экспрессии в не нейронных клетках. Несмотря на это, знания о биологической роли АХ, например, в высших растениях очень ограничены.

АХ в достаточно высоком количестве был обнаружен в корнях и стебле *Urtica dioica*. Известно, что он стимулирует рост и развитие, регулирует энергетические и метаболические процессы в растительных организмах. Также было показано, что содержание его возрастает при действии на растение биотических и абиотических стрессовых факторов. Механизм действия этого вещества в

растениях пока плохо изучен. Однако есть предположение, что он может заключаться в активации белков, участвующих в ростовых реакциях (в том числе ферментов синтеза фитогормонов). Также предполагается, что АХ может стимулировать фосфорилирование в хлоропластах и таким образом опосредованно влиять на физиолого-биохимические процессы в них [2].

Культура клеток и тканей *in vitro* представляет собой уникальный биотехнологический модельный объект для исследований в области регуляции физиолого-биохимических процессов растений. По сравнению с нативными растениями, клетки культур обладают рядом преимуществ, например, независимостью от климатических условий окружающей среды. В целом, клеточные культуры являются искусственно созданной биологической системой, которая может быть использована для продукции высокоценных лекарственных субстанций, обладающих биологической активностью [3].

Среди известных лекарственных растений можно выделить *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. В его состав входят фармакологически ценные терпеновые индольные алкалоиды, обладающие бактерицидной, антигипертензивной, противоопухолевой и другими типами активностей. В составе данного растения также обнаружен широкий спектр фенольных соединений: 2,3-дигидоксibenзойная кислота, фенилпропаноиды, такие как производные коричной кислоты, а также флавоноиды и антоцианы, которые обладают высокой антиоксидантной активностью [4, 5].

Таким образом, целью настоящей работы являлось исследование влияния АХ в различных концентрациях на антирадикальную активность экстрактов гетеротрофной каллусной культуры *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.

Объектом исследования являлась гетеротрофная каллусная линия каллусной культуры *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Каллусы культивировались на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением ацетилхолина в следующих концентрациях: 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М. Для приготовления плотной питательной среды был использован агар-агар в концентрации 7 г/л. Величина рН питательных сред до автоклавирования составляла 5,7-5,8. Питательную среду стерилизовали в автоклаве при температуре 120 °С и давлении 0,5 атм. Ацетилхолин добавлялся после автоклавирования, так как данное соединение является термолабильным. Культивирование каллусов проводили при 25°С в термостате в темноте. Измерения проводились на 31-е сутки культивирования.

Для определения антирадикальной активности экстрактов использовали метод DPPH. К 1 мл 0,3 ммоль/л свежеприготовленного спиртового раствора DPPH добавляли 2,5 мл 70 % водно-спиртового экстракта. Для приготовления нулевого раствора 1 мл 96 % этанола смешивали с 2,5 мл 70 % этанола. Негативный контроль включал 1 мл 0,3 ммоль/л раствора DPPH и 2,5 мл 70 % этанола. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре « Cary 50 Bio » (Varian, Австралия) при 520 нм через 30 мин после начала реакции. В ходе проведения экспериментов пробы держали в темноте.

Процент ингибирования радикалов DPPH рассчитывали по формуле:

$$S = (A - B) \cdot A^{-1} \cdot 100 \quad (1)$$

где S – ингибирование радикалов DPPH, %;

A – оптическая плотность негативного контроля, отн. ед.;

B – оптическая плотность исследуемого образца, отн. ед.

Антирадикальную активность проб выражали в эквиваленте аскорбиновой кислоты. Для построения калибровочной кривой готовили растворы стандарта различной концентрации (0,001–0,01 мг/мл) с использованием 70 % этанола.

Расчет антирадикальной активности объектов производили по следующей формуле:

$$C = I \cdot V \cdot M^{-1} \quad (2)$$

где C – антирадикальная активность, мг/г сухой массы в эквиваленте аскорбиновой кислоты (мг АК/г сух. м.);

I – антирадикальная активность аликвоты экстракта в эквиваленте аскорбиновой кислоты, соответствующая проценту ингибирования радикалов DPPH и найденная из калибровочного графика, мг/мл;

V – объем экстракта, мл;

M – масса навески растительного материала, взятая для экстракции, г.

Для обработки данных использовался пакет статистического анализа данных программы *Microsoft Office Excel 2010*.

Результаты экспериментов по воздействию ацетилхолина в различных концентрациях на антирадикальную активность экстрактов гетеротрофной каллусной культуры *Catharanthus roseus* (L.) G. Don представлены на рисунке.

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что ацетилхолин в концентрациях 10^{-7} и 10^{-8} М стимулирует антирадикальную активность экстрактов на 13–21 % по сравнению с контрольным вариантом. Так, исследуемый показатель в контрольном варианте составлял $21 \pm 1,5$ мг АК/г сух. м., в то время как при внесении ацетилхолина в среду культивирования в концентрации 10^{-8} М показатель составил $24,0 \pm 0,8$ мг АК/г сух. м., а при добавлении в среду исследуемого биомедиатора в концентрации 10^{-7} М – $26,5 \pm 1,2$ мг АК/г сух. м. Можно предположить, что в данном случае изменения антиоксидантного статуса исследуемых растительных объектов являются следствием специфического дозозависимого эффекта ацетилхолина, который проявляется в стимулировании метаболических путей и, соответственно, влиянии на качественный и количественный состав вторичных метаболитов фенольной и терпеново-индольной природы, проявляющих антирадикальные свойства.

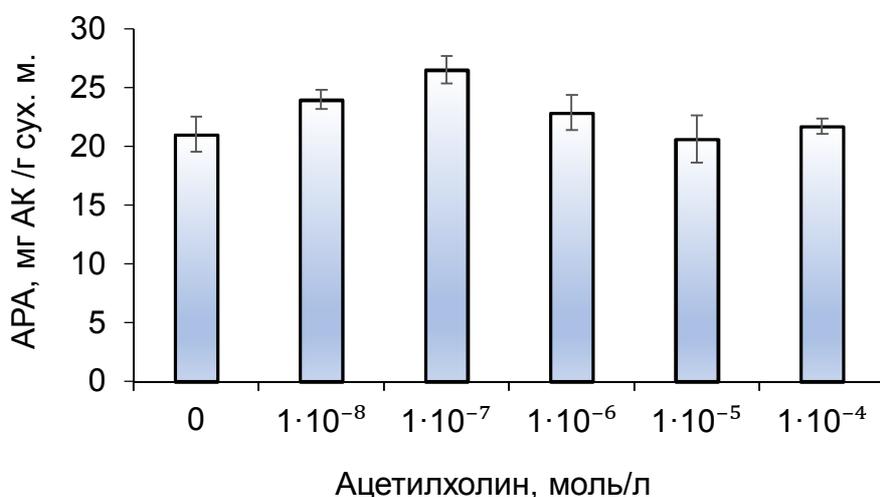


Рисунок – Антирадикальная активность экстрактов гетеротрофной каллусной культуры *Catharanthus roseus* (L.) G. Don при различной концентрации ацетилхолина

При использовании ацетилхолина в более высоких концентрациях – 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М статистически достоверных различий по сравнению с контрольным вариантом не наблюдалось. Так, при внесении в среду инкубации каллусных клеток *Catharanthus roseus* (L.) G. Don ацетилхолина в концентрации 10^{-6} М антирадикальная активность экстрактов составляла $22,9 \pm 1,5$ мг АК/г сух. м., в концентрации 10^{-5} М – $20,6 \pm 2$ мг АК/г сух. м., а в концентрации 10^{-4} М – $21,7 \pm 0,65$ мг АК/г сух. м.

Таким образом, исследуемый биомедиатор в концентрациях 10^{-8} и 10^{-7} М оказывал стимулирующее действие на антирадикальную активность экстрактов гетеротрофной каллусной культуры *Catharanthus roseus* (L.) G. Don на 12,5–20,8 % по сравнению с контролем, причём максимальный стимулирующий эффект был установлен при использовании ацетилхолина в концентрации 10^{-7} М.

Список использованных источников

1. Wessler I. et al. The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans //The Japanese Journal of Pharmacology. – 2001. – Т. 85. – №. 1. – С. 2-10.
2. Tretyn A., Kendrick R. E. Acetylcholine in plants: presence, metabolism and mechanism of action //The Botanical Review. – 1991. – Т. 57. – №. 1. – С. 33-73.
3. Мурашкина, И. А. Использование культуры клеток растений в биотехнологии лекарственных средств : учебное пособие / И. А. Мурашкина, И. Б. Васильев, В. В. Гордеева. — Иркутск : ИГМУ, 2015. – 83 с.
4. Mishra J. N., Verma N. K. A brief study on *Catharanthus roseus*: A review //Intern J Res Pharmacy Pharmaceut Sci. – 2017. – Т. 2. – №. 2. – С. 20-23.

5. Paarakh M. P. et al. *Catharanthus Roseus* Linn – a review // *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*. – 2019. – T. 3. – №. 10. – C. 19-24.