

В. М. Брюханов¹, В. П. Булгаков², Я. Ф. Зверев¹, С. А. Федорев³,
В. В. Лампатов¹, М. В. Веселова³, О. В. Азарова¹, О. Н. Зяблова¹,
Ю. В. Инюшкина²

КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА *ERITRICHIMUM SERICEUM* LEHM. (BORAGINACEAE) – ИСТОЧНИК ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

¹ Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул;

² Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток;

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

В культуре клеток незабудочника шелковистого *Eritrichium sericeum* Lehm. обнаружены полифенольные соединения, представленные олигомерами кофейной кислоты: (-)- рабдозином, (+)-розмариновой кислотой и эритрохином, и определено количественное содержание индивидуальных полифенолов. Суммарное содержание полифенольных соединений в биотехнологическом материале составило 6,9 % от сухой массы ткани, что в 26,5 раз выше содержания в корнях нативного растения. При изучении фармакологической активности экспериментального препарата клеточной культуры *Eritrichium sericeum* Lehm., содержащего комплекс полифенольных соединений, обнаружено усиление экскреторной функции почек и угнетение экссудативной стадии воспаления в результате длительного применения фитокомплексов клеточной культуры в дозе 100 мг/кг.

Род Незабудочник *Eritrichium* Lehm. (сем. Boraginaceae) содержит 65 видов, из которых на территории России встречается 31 [1]. К числу недостаточно изученных растений данного рода принадлежит незабудочник шелковистый *Eritrichium sericeum* Lehm., представляющий собой многолетник с сильно облиственными укороченными побегами, произрастающий на каменистых склонах Колымского, Камчатского, Анюйского и Чукотского флористических районов [2]. В подземной части двух видов *E. sichotense* M. Pop. и *E. incanum* DC., принадлежащих роду *Eritrichium*, обнаружено присутствие групповых для семейства *Boraginaceae* хиноидных пигментов,

производных шиконина [3]. На основании принципа филогенетического родства представляется перспективным поиск и изучение других групп биологически активных веществ (БАВ), репрезентативных для растений близкородственных видов, в частности, полифенольных соединений — олигомеров кофейной кислоты [4].

В рамках программы по сохранению природных ресурсов редких видов дальневосточной флоры расширение источников получения БАВ незабудочника реализуется за счет создания клеточных культур данного вида — продуцента биологически активных веществ с выраженной фармакологической активностью.

Настоящая работа посвящена определению содержания в клеточной культуре незабудочника шелковистого полифенольных соединений — олигомеров кофейной кислоты и изучению фармакологической активности препарата, приготовленного из этой клеточной культуры.

Экспериментальная химическая часть

Объектом исследования являлись препараты из каллусов незабудочника шелковистого, культура Ег-1. Клеточная культура незабудочника получена в Биолого-почвенном институте Дальневосточного отделения РАН из проростков семян дикорастущих растений, заготовленных на Камчатке. Культивирование проводили на питательной среде $W_{B/NA}$ описанным ранее способом [5]. После тридцатисуточного цикла выращивания каллусы извлекали из культуральных сосудов и высушивали. Для полного удаления пигментов и растительных восков сухие каллусы *E. sericeum* исчерпывающе экстрагировали гексаном в экстракторе Зайцева. Полученную клеточную биомассу *E. sericeum* (100 мг) для проведения хроматографических исследований полифенольного комплекса обрабатывали 3 мл 50 % этанола, содержащего следовые количества 2 % хлористоводородной кислоты в течение 12 ч, и центрифугировали суспензию на высокоскоростной центрифуге типа 310 b (Польша) в течение 10 мин (7000 g). К

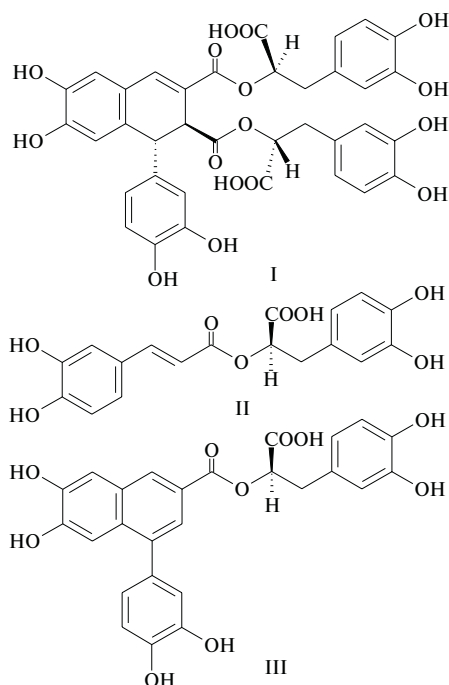


Рис. 1. Олигомеры кофейной кислоты из клеточной культуры и растения *E. sericeum*.

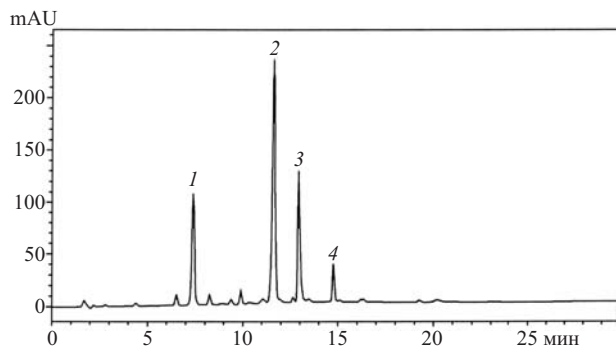


Рис. 2. ВЭЖХ водно-спиртового экстракта клеточной культуры *E. sericeum*: 1 — стандартный образец кофейной кислоты, 2 — (-)-рабдозиин (I), 3 — (+)-розмариновая кислота (II), 4 — эритрихин (III).

450 мкл супернатанта добавляли 50 мкл раствора кофейной кислоты (1 мг/мл) в качестве внутреннего стандарта. Отфильтрованный через нейлоновый фильтр (Agilent) с диаметром пор 0,45 мкм раствор анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [5]. Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке ZORBAX Eclipse® XDB-C8, 150 × 4,6 мм, 5 мкм (США) с УФ-детектированием при $\lambda = 254$ нм. Подвижная фаза состояла из смеси 1 % уксусной кислоты и ацетонитрила с линейным градиентом содержания последнего 10 – 70 % при скорости потока 1 мл/мин. Оборудование: хроматограф Agilent Technologies 1100 с УФ-детектором с переменной длиной волны VWD G1314A, оснащенный насосом Quart Pump G1311A, дегазатором DEGASSER G1322A и мануальным инжектором G1328B. Полученные данные анализировали с помощью программы ChemStation® var. 09 (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Германия).

Но основании анализа полученных данных ВЭЖХ полифенольных соединений клеточной культуры *E. sericeum* и сопоставления их качественных характеристик с таковыми для стандартных образцов идентифицированных веществ, а также с литературными данными [6, 7], в культуре клеток обнаружены полифенолы, представленные олигомерами кофейной кислоты: (-) — рабдозином (I), (+) — розмариновой кислотой (II) и тримером кофейной кислоты — эритрихином (III) [5] (рис. 1).

Установлено содержание полифенольных соединений в пересчете на массу сухого сырья в культуре клеток *E. sericeum* и в корнях нативного растения (рис. 2, табл. 1).

Таблица 1

Содержание полифенольных соединений в корнях и клеточных культурах *Eritrichium sericeum* Lehm.

| Объект исследования | Сумма полифенольных соединений, % | (-)-Рабдозиин, % | Розмариновая кислота, % | Эритрихин, % |
|------------------------------------|-----------------------------------|------------------|-------------------------|--------------|
| Культура клеток <i>E. sericeum</i> | 6,90 ± 0,84 | 1,50 ± 0,15 | 4,5 ± 0,8 | 0,09 ± 0,02 |
| Корни <i>E. sericeum</i> | 0,26 ± 0,03 | 0,20 ± 0,02 | 0,04 ± 0,01 | 0,02 ± 0,005 |

Суммарное содержание полифенольных соединений в биотехнологическом материале составило 6,9 % от сухой массы ткани, что в 26,5 раз выше содержания в нативном источнике. Содержание индивидуальных полифенолов рабдозиина и розмариновой кислоты в 7,5 и 112 раз соответственно превышает аналогичные показатели для корней дикорастущего растения. Высокая эффективность штамма культивируемых клеток незабудочника позволяет сократить время выращивания его вторичных метаболитов при реализации возможности получения стандартного по содержанию полифенолов сырья незабудочника.

Следует отметить наличие у препаратов растений, содержащих розмариновую кислоту и другие олигомеры кофейной кислоты, выраженной фармакологической активности, в частности, диуретической и противовоспалительной [8, 9].

Экспериментальная биологическая часть

Используемый в фармакологических исследованиях неофициальный экспериментальный препарат клеточной культуры *E. sericeum*, содержащий олигомеры кофейной кислоты, для простоты изложения в дальнейшем будет именоваться препаратом клеточной культуры незабудочника (ПККН). Фармакологические исследования проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 180 – 210 г. ПККН, содержащий комплекс полифенольных соединений, вводили внутривентрикулярно через зонд в смеси с 2 % крахмальной взвесью однократно в течение двух недель в суточной дозе 100 мг/кг массы.

При исследовании диуретического действия у группы животных предварительно определяли исходный уровень показателей функции почек. В собранной за сутки моче (суточный диурез) определяли содержание креатинина, экскреция которого служила мерой клубочковой фильтрации, фотокolorиметрическим способом, основанном

Таблица 2

Влияние препарата клеточных культур *Eritrichium sericeum* Lehm. ПККН (100 мг/кг) на функцию почек у крыс

| Показатель, в сутки | Контроль | Дни введения препарата | | | | | | Через 2 дня |
|---------------------|-----------|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | |
| Диурез | 7,4 ± 0,5 | 10,1 ± 1,3 | 12,0 ± 1,3* | 13,1 ± 1,5* | 15,1 ± 1,6* | 13,8 ± 1,3* | 14,6 ± 1,6* | 13,5 ± 1,2* |
| Натрий | 56 ± 4,0 | 56 ± 10,8 | 73 ± 10,0 | 77 ± 9,8 | 81 ± 6,2* | 71 ± 6,2 | 71 ± 5,2* | 75 ± 5,0* |
| Калий | 640 ± 36 | 763 ± 67 | 722 ± 77 | 755 ± 77 | 898 ± 82* | 929 ± 101* | 950 ± 86* | 900 ± 81* |
| Креатинин | 42 ± 4,2 | 45 ± 5,8 | 51 ± 6,1 | 64 ± 6,3* | 65 ± 5,7* | 63 ± 5,0* | 67 ± 7,1* | 60 ± 5,2* |

Примечание: Диурез — мл; натрий, калий, креатинин — мкмоль. Здесь и в табл. 3: * — достоверное изменение по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

на фотометрической реакции с пикриновой кислотой (реакция Яффе) по модифицированной методике Поппера. Для расчета суточной экскреции электролитов в собранной моче устанавливали содержание ионов Na^+ и K^+ (мкмоль) методом пламенной фотометрии.

Для оценки противовоспалительной активности ПККН определяли его влияние на разные стадии процесса воспаления [10, 11]. Антиэкссудативное действие препарата изучали, моделируя острый воспалительный отек субплантарным введением крысам флогенного агента каррагинина (0,1 мл 1 % раствора). Измерение объема правой задней конечности проводили с помощью плетизмометра после курса применения ПККН до введения, а также через 60, 120 и 240 мин после флогистика. Животные контрольной группы на протяжении 14 дней получали эквивалентное количество воды в идентичном режиме. На основании данных среднего прироста конечности животных, полученных в результате трех параллельных измерений, рассчитывали степень противовоспалительной активности (X) по формуле:

$$X = \frac{E_k - E_0}{E_0} \times 100\%,$$

где E_k — средний прирост конечности в контроле; E_0 — средний прирост конечности в опыте.

Препарат считается эффективным в противовоспалительном отношении, если степень противовоспалительной активности превышает 30 % [12].

Антипролиферативные свойства ПККН изучали на модели хлопчатобумажной гранулемы [11]. Наркотизированным крысам в асептических условиях имплантировали стерильные хлопчатобумажные тампоны массой 20 мг. Ежедневно со дня операции в течение двух недель прооперированные животные получали ПККН. Контрольной группе животных вводили эквивалентные количества дистиллированной воды в аналогичном режиме. По окончании курса введения препарата тампоны с образовавшейся вокруг них грануляционной тканью извлекали и определяли массу влажной и высушенной до постоянной массы гранулемы. Массу грануляционно-фиброзной ткани определяли по разнице между массами гранулемы и марлевого имплантата. Разница между массами сухой и влажной гранулемы оценивалась как один из показателей экссудативного компонента воспаления.

Статистическую обработку результатов исследования проводили методом вариационных рядов с использованием парного критерия Стьюдента [13].

Диуретическое действие ПККН проявилось в достоверном увеличении суточного диуреза, сопровождающегося ростом экскреции креатинина и электролитов. Препарат способствовал увеличению уровня суточного мочеотделения уже через день после его первого введения (табл. 2). Статистическую достоверность рост суточного диуреза приобрел к пятому дню применения ПККН, превышая исходный уровень мочеотделения на 62 % ($p < 0,001$). Вызванная препаратом полиурия достигала максимума к девятому дню введения, превышая исходный уровень в 2 раза, и стабилизировалась на высоких значениях вплоть до прекращения его введения. Через два дня после отмены препарата уровень суточного диуреза все еще на 86 % превышал контрольные показатели.

Начиная с 5–7 дня эксперимента, к диуретическому действию присоединялась натрийуретическая реакция с превышением исходных показателей содержания Na^+ на 30–38 %. Наибольшая выраженность натрийуреза была зарегистрирована на девятый день применения препарата: экскреция натрия в 1,5 раза выше аналогичного показателя в контроле. Стабильно повышенным уровнем экскреции Na^+ оставался до конца периода наблюдения, что, по-видимому, связано с угнетением его канальцевой реабсорбции.

Аналогичная динамика прослеживалась и в отношении калийуретической реакции. Начиная с девятого дня и далее на протяжении всего эксперимента, экскреция калия с мочой достоверно превосходила контрольный уровень на 40–48 %. Однако прирост экскреции электролитов значительно уступал по степени выраженности диуретическому действию. Так, двукратное возрастание суточного диуреза сопровождалось менее выраженным натрийурезом (+44 %) и калийурезом (+48 %). Развитие калийуреза можно отнести к нежелательным эффектам изученного препарата.

Длительное использование препарата незабудочника приводило к некоторому увеличению скорости клубочковой фильтрации, о чем свидетельствует появившаяся тенденция к усилению экскреции креатинина. К концу первой недели приема препарата умеренный рост данного показателя достигал своего максимума, оставаясь статистически достоверным всю вторую неделю.

Возрастание диуреза, сопровождающееся уменьшением реабсорбции электролитов, на фоне увеличения экскреции креатинина позволяет связать мочегонное действие препарата незабудочника с усилением скорости клубочковой фильтрации и угнетением канальцевой реабсорбции при доминировании последнего, о чем сви-

Таблица 3
Влияние препарата клеточных культур *Eritrichium sericeum* Lehm. ПККН (100 мг/кг) на развитие каррагининового отека конечностей крыс

| Вариант эксперимента | Срок наблюдения | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| | 1 ч | | 2 ч | | 4 ч | |
| | Прирост, см ³ | Противовоспалительная активность, % | Прирост, см ³ | Противовоспалительная активность, % | Прирост, см ³ | Противовоспалительная активность, % |
| Контроль | 0,49 ± 0,04 | – | 0,55 ± 0,04 | – | 0,67 ± 0,05 | – |
| ПККН | 0,35 ± 0,03* | 28,6 | 0,35 ± 0,04* | 36,4 | 0,50 ± 0,05* | 25,3 |

детельствует более существенный рост диуретической реакции.

При изучении противовоспалительной активности введение раствора каррагинина контрольным животным приводило к быстрому и последовательному формированию воспалительного отека. Длительное введение ПККН приводило к ослаблению формирования воспалительного отека лапы крыс (табл. 3). Наиболее активно антиэкссудативное действие ПККН проявилось в период энергичного нарастания отека. Из данных табл. 3 видно, что эффект препарата приобретал статистическую значимость уже через час после инъекции флогистика, достигая максимума через 2 ч. На пике воспалительной реакции угнетение экссудации составило 36,4 % и несколько ослабевало к окончанию эксперимента, не утрачивая при этом статистической достоверности.

Известно, что формирование каррагининового отека в первые 10 – 20 мин связано с дегрануляцией тучных клеток и высвобождением таких медиаторов воспаления, как гистамин и серотонин; в течение 1 – 2 ч флогистический эффект поддерживается накапливающимися в очаге воспаления брадикинином и другими кининами, после этого — простагландинами типа E [14]. Учитывая эффективность ПККН в период энергичного нарастания отека, его действие, по-видимому, обусловлено вмешательством в пусковые механизмы воспалительного процесса с угнетением сосудистого компонента воспаления.

Антиэкссудативное действие ПККН можно связать с наличием в его составе комплекса полифенольных соединений, представленных олигомерами кофейной кислоты, противовоспалительное действие которых реализуется за счет стабилизации мембран клеток [15].

При изучении антипролиферативных свойств установлено, что ПККН в данных экспериментальных условиях не оказывал существенного влияния на антипролиферативный компонент воспаления, поскольку показатели сухой и влажной массы воспалительной гранулемы достоверно не отличались от таковой у животных контрольной группы, не получавших исследуемый препарат.

Таким образом, обнаруженное в эксперименте усиление экскреторной функции почек и угнетение экссудативной стадии воспаления под действием препарата клеточной культуры *Eritrichium sericeum* Lehm., содержащего сумму олигомеров кофейной кислоты, делают препарат перспективным при воспалительных заболева-

ниях почек, в лечении которых установленные нами фармакологические эффекты могут иметь патогенетическое значение.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 06-04-48068 и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Сосудистые растения советского Дальнего Востока*, Т. 5, Наука, Санкт-Петербург (1991), сс. 271 – 273.
2. В. М. Старченко, *Бурчанниковые (Boraginaceae G. Don) советского Дальнего Востока*, Изд-во ДВНЦ АН СССР, Владивосток (1985), с. 108.
3. С. А. Федореев, О. Е. Кривошекова, В. А. Денисенко и др., *Химия природ. соедин.*, № 1, 625 – 630 (1979).
4. *Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование: Семейства Caprifoliaceae-Plantaginaceae*, Наука, Ленинград (1990), сс. 254 – 276.
5. S. A. Fedoreyev, M. V. Veselova, M. V. Krivoschekova, et al., *Planta Med.*, **71**, 446 – 451 (2005).
6. C. J. Kelley, R. C. Harruff, and M. Carmack, *J. Org. Chem.*, **41**(3), 449 – 454 (1976).
7. I. Agata, T. Hatano, S. Nishibe, and T. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.*, **8**(36), 3223 – 3225 (1988).
8. M. R. Al-Sereiti, K. M. Abu-Amer, P. Sen, *Ind. J. Exper. Biol.*, **37**, 124 – 130 (1999).
9. Г. П. Яковлев, К. Ф. Блинова (ред.), *Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения*, Специальная литература, Санкт-Петербург (1999), с. 407.
10. C. Winter, E. Risley, G. Nuss, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **3**(3), 544 – 547 (1962).
11. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2000).
12. Ф. П. Тринус, Б. М. Клебанов, В. И. Кондратюк, *Методические рекомендации по экспериментальному изучению нестероидных противовоспалительных фармакологических веществ*, Минздрав СССР, Москва (1983), с. 16.
13. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Изд-во АН ЛатвССР, Рига (1971), с. 151.
14. Г. Я. Шварц, Р. Д. Слюбаев, *Фармакол. и токсикол.*, **45**(1), 46 – 49 (1982).
15. В. А. Барабой, *Растительные фенолы и здоровье человека*, Наука, Москва (1984).

Поступила 16.11.06

CALLUS CULTURE OF *ERITRICHIMUM SERICEUM* AS THE SOURCE OF PHARMACOLOGICALLY ACTIVE POLYPHENOLS

V. M. Bryukhanov¹, V. P. Bulgakov², Ya. F. Zverev¹, S. A. Fedoreev³, V. V. Lampatov¹, M. V. Veselova³, O. V. Azarova¹, O. N. Zyblova¹, and Yu. V. Inyushkina²

¹ Altai State Medical University, Barnaul, 656038 Russia;

² Institute of Biology and Soil Science, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia;

³ Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

Polyphenols, represented by caffeic acid oligomers including (-)-rabdosiin, (+)-rosmarinic acid and eritrchin, have been found in the cell culture of *Eritrichium sericeum* Lehm. and the content of particular polyphenols has been determined. The total content of polyphenols in biotechnological material amounts to 6.9% of the dry mass, which is 26.5 times higher than in roots of the native plant. Long-term administration of the cell culture phytocomplex in a dose of 100 g/kg led to an increase in the renal excretory function and to inhibition of the exudative inflammation.