УДК 615.32: 547.9

А.В. ВОРОНИН, Д.Е. РЕДКОКАШИН

Самарский государственный медицинский университет

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАЗ ВЕГЕТАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ГРЕЧИШНЫЕ

В статье обсуждается способ определения фаз вегетации лекарственных растений горца птичьего, горца перечного и горца почечуйного методом электрофореза в полиакриамидном геле по набору молекулярных форм малатдегидрогеназы.

Ключевые слова: ***фаза цветения, фаза вегетации, электрофорез, горец птичий, горец перечный, горец почечуйный, малатдегидрогеназа***

Воронин Александр Васильевич *– доцент кафедры химии фармацевтического факультета. E-mail: dimmu2000@mail.ru*

Редкокашин Дмитрий Евгеньевич *– ассистент кафедры химии фармацевтического факультета. E-mail: redkokashin@inbox.ru*

A.V. VORONIN, D.E. REDKOKASHIN

Samara State Medical University

THE METHOD FOR DETERMINATION OF VEGETATION PHASES OF POLYGONACEAE PLANTS

The article describes the method of determination vegetation phases. Medicinal plants of Polygonum aviculare L., Polygonum hydropiper L., Polygonum persicaria L. are studied by means of polyacrylamide gel electrophoresis on malate dehydrogenase molecular forms.

Key words: ***flowering phase, vegetation phases, electrophoresis, Polygonum aviculare L., Polygonum hydropiper L., Polygonum persicaria, malate dehydrogenase***

Alexander Vasilievich Voronin *– Associate Professor, Chemistry Department of Pharmaceutical Faculty. E-mail: dimmu2000@mail.ru*

Dmitriy Evgenievich Redkokashin *– Assistant, Chemistry Department of Pharmaceutical Faculty. E-mail: redkokashin@inbox.ru*

Лекарственные препараты на основе сырья горца птичьего (Polygonum aviculare L., сем. Гречишных – Polygonaceae), горца перечного (Polygonum hydropiper L., сем. Гречишных – Polygonaceae) и горца почечуйного (Polygonum persicaria L., сем. Гречишных – Polygonaceae) обладают диуретическим, кровоостанавливающим, противовоспалительным, бактерицидным и обезболивающим эффектами [4]. Широкий спектр фармакологической активности данных растений обусловлен целым рядом веществ, в том числе флавоноидами [3].

Сроки, способы заготовки и сушки лекарственного растительного сырья определяют количественное содержание биологически активных веществ и качество получаемых на его основе лекарственных препаратов [10].

Оптимальной фазой для заготовки сырья растений семейства гречишные является фаза цветения [8], так как в этот период травы горца птичьего, горца перечного и горца почечуйного содержат максимальное количество действующих биологически активных соединений – флавоноидов [2].

Если лекарственное растительное сырье будет собрано на более ранней фазе вегетации (бутонизация) или более поздней (плодоношение), то сырье не будет содержать необходимого количества биологически активных соединений, определяющих фармакологическую активность самого сырья и препаратов на его основе [3].

Однако способы определения фаз вегетации для травы горцев нормативно-технической документацией не предусмотрены. Раздел «Внешние признаки» в фармакопейных статьях на горцы регламентирует определение самого вида растения, но не фазы вегетации [5]. В условиях промышленного культивирования необходимая фаза цветения у горцев определяется по совокупности анатомо-морфологических признаков растений, а именно, по наличию цветков на цветоносах. Следует отметить, что данный спо-

соб определения фазы не может быть достоверным, так как цветы и цветоносы у горцев присутствуют вплоть до отмирания растений поздней осенью, но в редуцированном состоянии [4].

Цель исследования: разработка объективного способа определения фаз вегетации: бутонизации, цветения и плодоношения горца птичьего, горца перечного и горца почечуйного. Разработанный способ позволит контролировать заготовку лекарственного растительного сырья вышеуказанных растений и обеспечит качество препаратов на его основе.

В качестве маркера для определения фазы вегетации использована малатдегидрогеназа (МДГ) [6]. Малатдегидрогеназа (L-малат: NAD-оксидоредуктаза, 1.1.1.37, МДГ) – ключевой фермент цикла трикарбоновых кислот, катализирующий обратимую реакцию окисления малата (яблочной кислоты) в оксалоацетат (щавелево-уксусную кислоту) [1]. МДГ представляет собой мультифункциональный фермент [7].

Известно, что малат играет существенную роль в поддержании внутренних физиологических условий растительных клеток [6]. Двойной путь утилизации малата с помощью МДГ и малик-энзимов позволяет организму уменьшить зависимость от гликолиза при синтезе энергии и углеродных скелетов [9]. Растительная МДГ представляет собой динамическое равновесие белков, способное четко реагировать на физиологическое состояние и потребности растительного организма, а также на изменение окружающей среды [6]. Малатдегидрогеназный комплекс представлен четырьмя дегидрогеназами, две из которых обладают оксидоредуктазной активностью, а две другие – декарбоксилирующие МДГ. Благодаря работе данной ферментной системы, осуществляется стыковка и сопряжение отдельных метаболических процессов в клетках [11]. Наиболее изученным ферментом МДГ комплекса является НАД$^+$-зависимая оксидоредуктазная МДГ (К.Ф. 1.1.1.37), катализирующая превращение малата в оксалоацетат в цикле Кребса. Кроме того, данная МДГ отвечает за синтез малата и оксалоацетата [12].

Исходя из этого, информация о структурной организации и динамике относительной активности молекулярных форм (МФ) МДГ – одного из ключевых ферментов цикла Кребса – может быть использована для определения фазы вегетации [6, 11].

Объектами исследования являлись образцы свежесобранного лекарственного сырья травы горца птичьего, горца перечного и горца почечуйного на территории Самарской области в разные фазы вегетации: бутонизация, цветение и плодоношение в течение 2014-2016 гг.

Для выявления структурных особенностей маладегидрогеназы на разных фазах вегетации исследуемых растений использовали метод электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле.

Пробоподготовка лекарственного растительного сырья

Навеску свежего растительного сырья 1,0 г дезинтегрировали в фарфоровой ступке с 5,0 мл охлажденного до 4°С 1/15 М фосфатного буферного раствора рН 7,2 в течение 5 мин.

Далее дезинтеграт количественно переносили в колбу, добавляли 5,0 мл 1/15 М фосфатного буфера рН 7,2 и 10 капель тритона Х-100 в конечной концентрации 20 мг/мл. Колбу помещали на магнитную мешалку для солюбилизации фермента на 1 час.

Гомогенат из колбы количественно переносили в центрифужную пробирку, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант помещали в пробирку с пробкой и хранили в замороженном виде не более 6 суток.

В супернатанте определяли молекулярные формы малатдегидрогеназы.

Электрофоретическое разделение проб проводили в камере для вертикального электрофореза VE-10 (компания «Хеликон»).

Для приготовления полиакриламидного геля использовали акриламид и метиленбисакриламид фирмы «Sigma», с целью удаления акриловой кислоты проводили перекристаллизацию указанных компонентов. Заранее приготовленные и хранимые в холодильнике реактивы перед работой выдерживали некоторое время при комнатной температуре. Для электрофореза готовили 7,5 % полиакриламидный гель. Полученный раствор разделяющего геля заливали в кюветы прибора, далее шприцом на поверхность наслаивали холодную воду. Окончание полимеризации фиксировали по образованию хорошо видимой границы раздела между гелем и наслоенной водой. После удаления воды на поверхность мелкопористого геля наслаивали раствор крупнопористого геля, на который осторожно наносили охлажденный верхний электродный буфер. Фотополимеризацию крупнопористого геля проводили с помощью ультрафиолетового излучения. Окончание полимеризации крупнопористого концентрирующего геля устанавли-

вали по образованию чётко видимой границы между гелем и наслоенным буферным раствором.

После окончания полимеризации гелей камеры заливали верхним и нижним буферными растворами. В качестве электродного буфера использовали 1 М трис-ЭДТА-боратный буфер pH 9,2.

Анализируемые образцы супернатанта непосредственно перед началом электрофореза смешивали с 40% раствором сахарозы в соотношении 2:1 и 0,5 мл полученной смеси наносили на линию старта.

Режим электрофореза подбирали опытным путем в предварительных экспериментах. Первые 30 мин электрофорез проводили при силе тока 5,0 мА/см, затем 10,0 мА/см до окончания электрофореза. Индикатор окончания процедуры электрофореза – положение зоны красителя бромфенолового синего.

По окончании электрофореза буферные растворы сливали, гели из кювет извлекали путем введения шприцем дистиллированной воды между поверхностью геля и стенкой кюветы.

Выявление на пластинках геля молекулярных форм малатдегидрогеназы проводили феназинметасульфат-тетразолиевой реакцией в чашках Петри в оптимизированной инкубационной среде: водный раствор никотинамидаденина динуклеотида (1 мг/мл) – 40 мл; раствор нитросинего тетразолиевого (1 мг/мл) – 30 мл; 1 М раствор натрия малата (pH=7,0) – 10 мл; раствор феназинметасульфата (1 мг/мл) – 4 мл; 0,2 М трис-HCl буферный раствор (pH =7,1) – до 100 мл.

Гелевые пластины инкубировали 12 ч при 37°С. Молекулярные формы МДГ выявлялись в виде темно-синих полос. Регистрацию проявленных зон на электрофореграммах проводили методом денситометрии с помощью компьютерной программы «ТСХ – менеджер 4.00» (разработчик – И.Н. Плахотний).

В результате проведенных исследований были определены наборы МФ МДГ в разные фазы вегетации: бутонизации, цветения, плодоношения для свежесобранного растительного сырья горца птичьего, горца перечного и горца почечуйного.

Количество МФ является качественной характеристикой, присущей конкретным видам горцев при вышеописанных условиях электрофореза в 7,5% полиакриламидном геле.

Для горца птичьего в фазе бутонизации обнаруживается одна МФ МДГ-1 со значением относительной электрофоретической подвижности (ОЭП) 0,83±0,05, в фазе цветения одна МФ МДГ 1 со значением ОЭП 0,50±0,06 и в фазе плодоношения обнаруживаются две МФ МДГ: МДГ 1 с ОЭП 0,65±0,05 и МДГ 2 с ОЭП 0,45±0,06 (таблица 1).

Для горца перечного в фазе бутонизации обнаруживается две МФ МДГ: МДГ 1 с ОЭП 0,63±0,07 и МДГ 2 с ОЭП 0,42±0,05. В фазе цветения обнаруживается только МДГ 1 с ОЭП 0,60±0,06 и в фазе плодоношения обнаруживаются все три МФ МДГ: МДГ 1 с ОЭП 0,64±0,05, МДГ 2 с ОЭП 0,44±0,05 и МДГ 3 с ОЭП 0,12±0,07 (таблица 2).

Для горца почечуйного в фазе бутонизации обнаруживается одна МФ МДГ: МДГ 1 с ОЭП 0,63±0,05. В фазе цветения обнаруживается только МДГ 1 с ОЭП 0,76±0,05. В фазе плодоношения обнаруживаются все три МФ МДГ: МДГ 1 с ОЭП 0,64±0,05, МДГ 2 с ОЭП 0,42±0,05 и МДГ 3 с ОЭП 0,10±0,05 (таблица 3).

Как видно из таблиц 1-3, в сырье горцев может обнаруживаться как одна, так и все три МФ МДГ. Количество МФ МДГ зависит от фазы вегетации растения и его физиологического состояния.

Обнаружение МДГ 1 возможно, начиная с ранних стадий развития растений, до цветения на стадии бутонизации. Это свидетельствует о том, что происходит активный рост растения, накопление массы и биосинтез биологически активных веществ.

МДГ 2 в большей степени свидетельствует о стабилизации обменных процессов в растении. Обнаружение возможно в разные фазы вегетации.

МДГ 3 появляется в растениях, когда начинают преобладать окислительные процессы в растительном организме, поэтому обнаружение этой МФ возможно после цветения растений до отмирания включительно.

Набор МФ МДГ на разных физиологических стадиях можно использовать для описания и характеристики различных процессов как генетический и физиологический маркер. МДГ со всей совокупностью изоферментных систем и их белковых кофакторов представляют собой важнейшую область биологического и генетического маркирования растительного организма.

Кроме того, в динамике активность МДГ разных видов растений, в том числе горцев, имеет качественную основу. Набор МФ МДГ растений обладает видовой и тканевой специфичностью. Установлено, что характер изоферментного спектра зависит от типа метаболизма, от физиологического состояния и от возраста организма.

Таблица 1

Молекулярные формы МДГ травы горца птичьего в разные фазы вегетации

Фазы вегетации								
Бутонизация			Цветение			Плодоношение		
ОЭП (M+m)	МФ МДГ	ОА, %	ОЭП (M+m)	МФ МДГ	ОА, %	ОЭП (M+m)	МФ МДГ	ОА, %
0,83±0,05	МДГ1	100	0,50±0,06	МДГ1	100	0,65±0,05	МДГ1	50±5
						0,45±0,06	МДГ2	50±5

Таблица 2

Молекулярные формы МДГ травы горца перечного в разные фазы вегетации

Фазы вегетации								
Бутонизация			Цветение			Плодоношение		
ОЭП (M+m)	МФ МДГ	ОА, %	ОЭП (M+m)	МФ МДГ	ОА, %	ОЭП (M+m)	МФ МДГ	ОА, %
0,63±0,07	МДГ1	50±5	0,60±0,06	МДГ1	100	0,64±0,05	МДГ1	50±5
0,42±0,05	МДГ2	50±5				0,44±0,05	МДГ2	25±5
						0,12±0,07	МДГ3	25±5

Таблица 3

Молекулярные формы МДГ травы горца почечуйного в разные фазы вегетации

Фазы вегетации								
Бутонизация			Цветение			Плодоношение		
ОЭП (M+m)	МФ МДГ	ОА, %	ОЭП (M+m)	МФ МДГ	ОА, %	ОЭП (M+m)	МФ МДГ	ОА, %
0,63±0,05	МДГ1	100	0,76±0,05	МДГ1	100	0,64±0,05	МДГ1	50±5
						0,42±0,05	МДГ2	25±5
						0,10±0,05	МДГ3	25±5

В предлагаемом способе определение фазы вегетации, например, фазы цветения горцев, проводится по физиологическим маркерам – МФ МДГ. Количество МФ и значения ОЭП являются качественными характеристиками, присущими конкретному виду горцев при стандартизированных условиях электрофореза.

Для фазы цветения характерным диагностическим признаком является обнаружение одной молекулярной формы МДГ 1 со значениями ОЭП в диапазоне 0,50-0,76 для различных видов горцев. Следует отметить, что наиболее доказательным этот способ является в случае определения фазы цветения горца перечного, так как в предшествующую фазу бутонизации выявляются МДГ 1 и МДГ 2, а в последующую фазу плодоношения – все три МФ МДГ. Ключевым моментом для дифференциации фаз бутонизации и цветения горца птичьего следует считать значимое отличие величины ОЭП МДГ 1 – 0,83 и 0,50 соответственно.

Наименее достоверным является определение фазы цветения у травы горца почечуйного – в фазы бутонизации и цветения выявляется только МДГ 1 с близкими по величине значениями ОЭП.

В результате проведенных исследований разработан и предложен объективный способ определения фаз вегетации: бутонизации, цветения и плодоношения растительного сырья горца птичьего травы, горца перечного травы и горца почечуйного травы методом электрофореза в 7,5% полиакриамидном геле. Установлены объективные критерии определения фаз вегетации (бутонизация, цветение и плодоношение) вышеуказанных растений по количеству МФ МДГ и их значениям ОЭП.

Разработанный способ определения фаз вегетации вышеуказанных растений семейства гречишные позволяет контролировать качество заготавливаемого лекарственного растительного сырья и может быть использован предприятиями, осуществляющими его культивирование и заготовку.

Список литературы

1. Активность и изоферментный спектр пероксидаз некоторых видов растений, произрастающих на берегах озера Байкал, при абиотическом стрессе / М.А. Живетьев, Е.И. Раченко, Т.Е. Путилина [и др.] // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». – 2010. – Т.3. – № 3. – С. 3-12.
2. Актуальные вопросы совершенствования стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов, содержащих фенольные соединения / В.А. Куркин // Современные наукоемкие технологии. – 2016. – № 8-2. – С. 247-250.
3. Биохимия фенольных соединений / под ред. Дж. Харборна. – М.: Изд-во «Мир», 1968. – 450 с.
4. Куркин В.А. Основы фитотерапии: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава», 2009. – 963 с.
5. Куркин В.А., Авдеева Е.В. Проблемы стандартизации растительного сырья и препаратов, содержащих фенилпропаноиды // Фармация. 2009. – Т. 57. – № 1. – С. 51-54.
6. Малатдегидрогеназа высших растений: свойства, функции и регуляция: автореф. дис. ...канд. биол.наук: 03.01.04: 03.00.12 / Пинейру де К. Мигель Анжело А. – Воронеж, 1991. – 24 с.
7. Молекулярные формы малатдегидрогеназы лекарственных растений семейства Сложноцветные / И.Ф. Шаталаев, Н.В. Расцветова // Известия Самарского научного центра РАН. – 2014. – Т.16. – №5 (2). – С.1033-1035.
8. Основы биохимии фенольных соединений / М.Н. Запрометов. – М.: Высшая школа, 1974. – 214 с.
9. Фенольные соединенния и активность оксидоредуктаз лекарственных растений (обзор) / А.В. Воронин, Д.Е. Редкокашин // Аспирантский вестник Поволжья. – 2015. – №5-6 (2). – С. 330-334.
10. Флавоноиды лекарственных растений: прогноз антиоксидантной активности / В.А. Куркин, В.В. Поройков, А.В. Куркина, Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2-2. –С.517.
11. Function of malatdehyrogenase complex of Maize mesophyll and bundle sheath cells under salt stress condition / A.T. Eprintsev, O.S. Fedorina // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2006. – Vol. 2. – № 2. – P.4-9.
12. Light influence on succinate dehydrogenase activity in Maize leaves / V.N. Popov, A.T. Eprintsev, D.N. Fedorin [et al.] // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2005. – Vol.1. – № 1. – P.30-36.