УДК 615.32: 547.9

А.В. ВОРОНИН, Д.Е. РЕДКОКАШИН

Самарский государственный медицинский университет

ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И АКТИВНОСТЬ ОКСИДОРЕДУКТАЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР)

В статье (обзоре) рассмотрены вопросы исследования некоторых оксидоредуктаз в лекарственных растениях по фазам вегетации, взаимосвязь их активности и изоферментного спектра с накоплением биологически активных веществ фенольной природы (флавоноидов), возможности использования вышеуказанных характеристик оксидоредуктаз как маркеров сроков заготовки сырья.

Ключевые слова: фенольные соединения, флавоноиды, оксидоредуктазы, малатдегидрогеназа, пероксидаза, каталаза, активность ферментов, лекарственные растения

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

PHENOLIC COMPOUNDS AND OXIDOREDUCTASES ACTIVITY IN MEDICINAL PLANTS (REVIEW)

The review contains data of the research of some oxidoreductases in medicinal plants according to vegetation stages, the relationship of their activity and isozyme spectrum with accumulation of phenolic biologically active compounds (flavonoids), the possibility of using the above mentioned oxidoreductase characteristics as markers of plant harvesting period.

Key words: phenolic compounds, flavonoids, oxidoreductases, malatdehyrogenase, peroxidase, catalase, enzymatic activity, medicinal plants

Alexander Voronin *- associate professor at the Chair of Chemistry of Pharmaceutical Department. E-mail: dimmu2000@mail.ru*

Dmitriy Redkokashin *- assistant at the Chair of Chemistry of Pharmaceutical Department. E-mail: redkokashin@inbox.ru*

Одним из перспективных источников фитопрепаратов являются лекарственные растения, содержащие фенольные соединения, которые вследствие широкого распространения в растениях и структурного разнообразия в настоящее время находятся в центре внимания исследователей в области фармации и медицины [10].

К важнейшим неферментным антиоксидантам относят флавоноиды – группу вторичных соединений фенольной природы. Они способны к быстрому восстановлению наиболее биологически опасных форм свободных радикалов, могут подавлять образование активных форм кислорода через ингибирование окислительно-восстановительных ферментов (монооксигеназы, циклооксигеназы, липоксигеназы, ксантиноксидазы), а также хелатировать ионы металлов с переменной валентностью. Флавоноиды оказывают влияние на баланс всех окислительно-восстановительных процессов в клетках, поскольку препятствуют окислению аскорбиновой кислоты [15].

Известно, что малат играет существенную роль в поддержании внутренних физиологических условий растительных клеток. Двойной путь утилизации малата с помощью малатдегидрогеназ (МДГ) и малик-энзимов позволяет организму уменьшить зависимость от гликолиза при синтезе энергии и углеродных скелетов. Растительная МДГ (малатдегидрогеназная система) представляет собой динамическое равновесие белков, способное четко реагировать на физиологическое состояние и потребности растительного организма, а также на изменение окружающей среды. Малатдегидрогеназный комплекс представлен четырьмя дегидрогеназами, две из которых обладают оксидоредуктазной активностью, а две дру-

гие – декарбоксилирующие МДГ. Благодаря работе данной ферментной системы, осуществляется стыковка и сопряжение отдельных метаболических процессов в клетках. 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. Результаты исследований свидетельствуют об индукции цикла трикарбоновых кислот хлоридом натрия в клетках мезофилла и обкладки кукурузы. Обнаруженные отличия в функционировании малатдегидрогеназной системы мезофилла и обкладки листьев кукурузы при засолении заключается в том, что активность ферментов изучаемого комплекса в обкладке подвержена минимальным изменениям по сравнению с мезофиллом. На основании полученных данных обсуждается роль МДГ - ферментной системы в механизмах адаптивной реакции различных тканей кукурузы к засолению [21].

В лекарственных растениях семейств сложноцветных (в одуванчике лекарственном, ромашке аптечной, тысячелистнике обыкновенном, календуле лекарственной, бессмертнике песчаном), губоцветных (в тимьяне, душице обыкновенной, монарде дудчатой) выявлены две молекулярные формы фермента МДГ – МДГ-1 и МДГ-3. Динамика активности молекулярных форм в сырье вышеуказанных растений в условиях повышенной влажности носит индивидуальный характер [17, 18].

Изучена МДГ у 28 видов растений, среди которых амарант (*AmaranthusL.*), эвкалипт (*EucalyptusL'Herit.*), кукуруза (*Zeamays*) и др. Полученные данные используются для описания и характеристики различных процессов и свидетельствуют о высокой эффективности данного фермента как генетического и физиологического маркера. Ферменты со всей совокупностью изоферментных систем и их белковых кофакторов представляют собой важнейшую область биологического и генетического маркирования организма с большим числом его теоретических и практических аспектов [19].

Получены гомогенные препараты изоформ НАД$^+$-зависимой МДГ из двух видов растений: клещевины (*Ricinuscommunis*) и кукурузы (*Zeamays*). Выделена МДГ из глиоксисом, митохондрий и этиопластов эндосперма клещевины. Из щитка кукурузы получена цитоплазматическая МДГ. Разработан способ длительного хранения препаратов МДГ в среде, содержащей 25% глицерина или 1М сахарозы.

Установлено, что функциональные единицы НАД$^+$-зависимой МДГ являются молекулярными формами с димерной и тетрамерной структурой. Димеры имеют молекулярные массы от 65 до 85 кДа. Этиопластная МДГ представляет собой тетрамер (115 кДа). МДГ из цитоплазмы (кукурузы), глиоксисом и этиопластов (клещевины) имеют изологическую структуру и состоят из идентичных субъединиц с молекулярной массой от 30 до 36 кДа. Митохондриальная МДГ является гетерологическим димером, состоящим из двух неидентичных субъединиц (42 и 35 кДа).

На основании исследований аминокислотного состава, физико-химических и кинетических характеристик установлено, что выделенные изоформы МДГ являются истинными изоферментами, т.е. генетически детерминированными белками. Изучен активный центр и предложена схема механизма каталитического превращения для растительных МДГ. В его состав входят два остатка аргинина и гистидина и по одному радикалу лизина и цистеина. Последняя аминокислота присутствует в активном центре митохондриальных белков.

Активность МДГ обнаружена в органах всех исследованных растений. Установлено, что в онтогенезе растений динамика активности фермента имеет общие и специфичные черты, зависящие от тканей, от характера метаболизма на данном этапе развития, от физиологического состояния, а также видовой принадлежности организма. Сильное возрастание активности МДГ наблюдается через 3-5 дней после прорастания семян.

В органах разных видов растений обнаружены множественные молекулярные формы МДГ, имеющие различную субклеточную локализацию. Изоферменты МДГ локализуются в разных компартментах клетки (цитоплазме, митохондриях, глиоксисомах, пероксисомах, хлоропластах (или этиопластах)). Характер распределения активности МДГ между ними зависит от типа тканей и от вида растений. Установлено, что набольшая доля активности МДГ локализуется в цитоплазме (45-80%) и митохондриях (10-30%) растений.

Показано, что отличия в динамике активности МДГ разных видов растений имеют качественную основу. Изоферментный спектр МДГ растений обладает видовой и тканевой специфичностью. Установлено, что характер изоферментного спектра зависит от типа метаболизма, от физиологического состояния и от

возраста организма. Обнаружена также зависимость изоферментного спектра МДГ от продуктивности (содержания жиров и белков в семенах) и от генетической основы растений.

Экзогенный малат способен вызывать индуцированный синтез изоферментов МДГ в органах высших растений.

Инкубация растений в условиях анаэробиоза способна вызывать возрастание активности и изменение изоферментного спектра МДГ в их органах. Установлено, что возрастание активности МДГ при гипоксии происходит за счет повышения каталитической эффективности некоторых ее изоферментов.

Показано, что в растительных клетках активность МДГ регулируется с помощью различных факторов. Важный вклад в регуляцию активности изоферментов МДГ вносят концентрации и отношения сопрягающих агентов (АТФ/АДФ; $НАД^+$/НАДН) в компартментах клетки. Обнаружено, что некоторые органические кислоты (фумарат и малонат) и ионы металлов (K^+, Na^+, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}) могут принимать участие в регуляции активности изоферментов МДГ [14].

Высокая активность МДГ обнаруживается в растениях полыни широколистной (13,5 и $8{,}19 \cdot 10^{-3}$ ФЕ/мл) и полыни армянской (11,09 и $5{,}78 \cdot 10^{-3}$ ФЕ/мл соответственно). Наименьшая активность МДГ измеряется в полыни обыкновенной и полыни эстрагон, что, возможно, связано с высокими адаптивными возможностями этих видов полыней [8].

Исследования активности и изоферментного спектра пероксидазы в зависимости от внешних условий произрастания растений выявили, что термостабильность и оптимум pH пероксидазы (слабосвязанная с клеточной стенкой и растворимая молекулярные формы) изменяется в зависимости от природных условий и сроков вегетации. Активность пероксидазы также варьируется по сезонам года. Показано, что адаптация растений к гипотермии и сопутствующему ей окислительному стрессу осуществляется за счет повышения активности пероксидазы в ответ на действие стрессора, а также за счет качественного и количественного изменения в составе стрессовых белков – дегидринов [2].

М.Н. Запрометовпоказал, что в побегах чая катехины используются в качестве дыхательного субстрата. Можно предположить, что другие флавоноиды, такие как кверцетин, способны к аналогичному процессу окисления. Необходимо ответить на вопрос, в какой степени растения способны к окислению фенольных соединений[6, 7].

Многие фенольные соединения высших растений образуются в результате дальнейшего метаболизма ароматических аминокислот или синтезируются из промежуточных соединений, участвующих в синтезе ароматических аминокислот. Для ароматических аминокислот характерны два типа реакций: декарбоксилирование, ведущее к накоплению алкалоидов, и отщепление аммиака, обусловливающее образование коричной или п-кумаровой кислот и приводящее к накоплению фенольных соединений. Например, гидроксилирование коричных кислот может привести к образованию либо кумарина, либо лигнина и родственных соединений в зависимости от места введения гидроксильной группы и последующих реакций. Конденсация коричной кислоты с активными ацетатными фрагментами приводит к образованию таких соединений, как изокумарины, флавоноиды и изофлавоны [4].

Изучена динамика содержания диеновых конъюгатов, фенольных соединений, ферментов (каталазы, глутатионредуктазы) в почках и листьях смородины черной (*RibesnigrumL.*), калины обыкновенной (*ViburnumopulusL.*), шиповника коричного (*RosacinnamomeaL.*). На протяжении вегетационных циклов развития растений отмечалось увеличение продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов) в фазе раскрытия листовых почек у калины обыкновенной и смородины черной. Выявлено максимальное накопление количества фенольных соединений в период полного облиственния кустарниковых растений. У всех исследуемых объектов наблюдается низкая активность каталазы в почках по сравнению с листьями. При изучении активности глутатионредуктазы установлено, что в фазу изменения окраски листьев у смородины черной и шиповника коричного достоверно снижается активность фермента.

Сравнительный анализ биохимических показателей позволил выявить фенологические фазы развития с более высоким содержанием антиоксидантов фенольного типа, которые можно рекомендовать для сбора в качестве источников природных антиоксидантов. Содержание вторичных метаболитов (сумма фенольных соединений, сумма флавоноидов) максимально на стадии полного облиственния. Таким образом, заготовку сырья с целью получения флавоноидов целесообразно осуществлять на стадии полного

облиствения. Биохимическим критерием развития почек может служить повышенный уровень диеновых конъюгатов, а критерием начала гибели листьев – повышение активности каталазы [13].

Воздействие биологических стимуляторов при замачивании семян гречихи показало активацию антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы, пероксидазы и снижение каталазной активности, что указывает на высокую жизнеспособность растений [3].

Исследовано количественное содержание антиоксидантов (аскорбиновая кислота, флавоноиды) в листьях лекарственных растений при стрессовых условиях (4-8 ^{0}С, 12 сут, темнота). Отмечено концентрирование антиоксидантов в листьях (содержание флавоноидов увеличивалось в 2 раза), что является адаптивной реакцией на стресс и может быть рекомендовано для практического использования с целью повышения содержания биологически активных веществ в лекарственном сырье [1].

Соли цинка при повышенных концентрациях (10^{-4}-10^{-7}М) являются стрессорным фактором для конопли посевной, вызывающим окислительный стресс. При этом наблюдалось повышение уровня активности полифенолоксидазы в 1,31-3,46 раза по сравнению с контролем [16].

Сукцинатдегидрогеназа – это мембранный белковый комплекс, одновременно обеспечивающий функционирование цикла трикарбоновых кислот и электронтранспортной цепи. В работах В.Н. Попова с соавторами показано падение активности сукцинатдегидрогеназы в интактных листьях кукурузы на свету. Малые концентрации АТФ (2-5 мкМ) активировали сукцинатдегидрогеназу, высокие концентрации (более 30 мкМ) – ингибировали [22].

Интенсивность накопления фенольных соединений зависит от периода развития, органа растения, возрастного состояния и климатических условий лет наблюдений[20].

В холодный и засушливый периоды в сабельнике болотном накапливается больше растворимых фенольных соединений. Наибольшее количество фенольных соединений (общая сумма, флаваны) в надземных органах отмечается в фазу вегетации и цветения, в подземных органах – в фазу плодоношения. В фазу плодоношения в корневищах сабельника содержится больше растворимых фенольных соединений и флаванов по сравнению с надземными органами. В качестве лекарственного растительного сырья сабельника болотного целесообразно использовать надземные органы возрастного состояния в фазу вегетации, подземные органы – в фазу плодоношения. Также целесообразна заготовка растения в фазу цветения, когда характерно высокое содержание фенольных соединений для надземных органов и корневищ [5].

Содержание водорастворимых фенолов в листьях березы повислой в условиях континентального климата обнаруживает отчетливую сезонную динамику с максимумом в первой-второй декаде мая, пониженным количеством до середины июля позднелетним-осенним подъемом. В зависимости от условий года вегетации на фоне типичной динамики прослеживаются существенные количественные различия, обнаружена тенденция снижения данного показателя в засушливый год [9].

Изучено влияние экзогенных фенольных соединений и их предшественников на содержание фенольных соединений и реализацию морфогенетического потенциала в каллусе сирени цветкового происхождения. В процессе исследования установлено, что при культивировании каллуса на средах в присутствии экзогенных фенольных соединений и их предшественников на 20-й день культивирования содержание суммы фенольных соединений в каллусной культуре сирени в 6-10 раз выше по сравнению с контрольной средой. Введение экзогенных фенольных соединений (рутина, фенилаланина) в среду культивирования позволяет сократить время выращивания каллуса для максимального накопления суммы фенольных соединений в три раза [11, 12].

Таким образом, теоретическое и экспериментальное обоснование энзимодиагностики (по структуре и активности оксидоредутаз) лекарственных растений и сырья, содержащего фенольные соединения, является актуальным направлением научных исследований в области фармации.

Список литературы

1. Абдрахимова Й.Р., Цветкова Ю.А. Стресс-индуцированные изменения содержания антиоксидантов в листьях растений разных видов //Ученые записки Казанского государственного университета. Естественные науки. – 2007. Т.149, кн.2. С.75-83.

2. Живетьев М.А. 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.

3. Павловская Н.Е. Антиоксидантная система растений гречихи под влиянием биологических веществ / Н.Е. Павловская, И.В. Горькова, И.Н. Гагарина [и др.] // Ученые записки Орловского государственного университета. – 2013. №3(53). С.49-51.

4. Биохимия фенольных соединений / под ред.Дж. Харборна. – М.: Изд-во «Мир». 1968. – 450 с.

5. Петрова П.И. Динамика накопления фенольных соединений в органах сабельника болотного (ComarumpalustreL.) / П.И. Петрова, Е.Ю. Бахтенко, Н.В. Загоскина [и др.] // Химия растит. сырья. – 2013. №1. С.165-169.

6. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. – М.: Высш. шк., 1974. – 214 с.

7. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и методы их исследования / // Биохимические методы в физиологии растений. – М., 1971. С.185-207.

8. Землянухина О.А. Изучение метаболических особенностей видов полыней региональной флоры, культивируемых в ботаническом саду Воронежского государственного университета / О.А. Землянухина, В.Н. Вепринцев, К.А. Карпеченко [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. №11. С. 13-19.

9. Кавеленова Л.М., Лищинская С.Н., Карандаева Л.Н. Особенности сезонной динамики водорастворимых фенольных соединений в листьях березы повислой в условиях урбосреды в леостепи (на примере Самары) // Химия растит. сырья. – 2001. №3. С.91-96.

10. Куркин В.А., Куркина А.В., Авдеева Е.В. Флавоноиды как биологически активные соединения лекарственных растений // Фундаментальные исследования. – 2013. №11. С.1897-1901.

11. Любаковская Л.А. Влияние экзогенных фенольных соединений на процессы морфогенеза в каллусной культуре сирени (SyringavulgarisL.) // Вестник ВГМУ. – 2010. – Т.9, №3. – С.176-182.

12. Любаковская Л.А. Особенности роста и накопления фенольных соединений в каллусе сирени при различном уровне минерального питания и освещения / Л.А. Любаковская, О.А. Яковлева, В.Н. Решетников и [др.] // Вестник ВГМУ. – 2007. – Т.6, №4. – С.1-8.

13. Отвалко Е.А. Изменение уровня перекисного окисления липидов и активности компонентов антиоксидантной системы защиты растений в различные фенологические фазы развития // Веснік ВДУ. – 2013. – №2(74). – С.32-35.

14. Пинейру К.А. Малатдегидрогеназа высших растений: свойства, функции и регуляция: автореф. дис. ...канд. биол.наук: 03.01.04: 03.00.12. – Воронеж, 1991. – 24 с.

15. Потапович А.И., Костюк В.А. Сравнительное исследование антиоксидантных свойств и цитопротекторной активности флавоноидов // Биохимия. – 2003. Т.68, вып. 5. С.632-638.

16. Солдатова Н.А., Хрянин В.Н. Антиоксидантная система защиты растений CannabissativaL. при действии соли цинка // Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В.Г. Белинского. – 2011. №25. С.632-634.

17. Шаталаев И.Ф. Структурные особенности и активность лактат- и малатдегидрогеназ тимолсодержащих лекарственных растений семейства Губоцветные по фазам вегетации / И.Ф. Шаталаев, З.Е. Мащенко, В.А. Куркин [и др.] // Вестник СамГУ. – 2002. Спец. вып. С.145-149.

18. Шаталаев И.Ф., Расцветова Н.В. Молекулярные формы малатдегидрогеназы лекарственных растений семейства Сложноцветные // Известия Самарского научного центра РАН. – 2014. Т.16, №5(2). С.1033-1035.

19. Юдина Р.С. Генетика и феногенетика малатдегидрогеназы растений // Вестник ВОГис. – 2010. – Т.14, №2. – С. 243-254.

20. Helariutta Y. Duplication and functional divergence in the chalcone synthase gene family of Asteraceae: evolution with substrate change and catalytic simplification / Yrjo Helariutta, Mika Kotilainen, Paula Elomaa [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. Vol.93. P.9033-9038.

21. Eprintsev A.T., Fedorina O.S. Function of malatdehyrogenase complex of Maize mesophyll and bundle sheath cells under salt stress condition // Journal of Stress Physiology & Biochemistry. – 2006. Vol.2, №2. P.4-9.

22. Popov V.N. 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.