

УДК 579.61+615.322

КЛОНОВАНІ *IN VITRO* РОСЛИНИ РОДУ *DESCHAMPSIA* ЯК ДЖЕРЕЛО ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК З ПРОТИПУХЛИННИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ

О.О. ПОРОННИК¹, А.В. КУЗЬМЕНКО², А.В. ВОЛОВИК³, Л.В. ШВАЧКО³,
О.В. ВОЙЦЕХІВСЬКА³, Г.Ю. МИРЮТА¹, Т.А. РУБАН¹, І.Ю. ПАРНІКОЗА¹,
В.А. КУНАХ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03680, Київ, вул. Акад. Заболотного, 150
e-mail: oksana_poronnik@ukr.net

² Національний авіаційний університет
Україна, 03680, Київ, просп. Космонавта Комарова, 1

³ Київський національний університет, ННЦ «Інститут біології»
Україна, 04033, Київ, вул. Володимирська, 64

Мета. Порівняльне дослідження біомаси клонованих *in vitro* рослин роду *Deschampsia* за вмістом фенольних сполук та екстрактів із цих клонів за протипухлинною активністю.

Методи. Визначали вміст загальних фенолів (за галовою кислотою) та флавоноїдів (за рутином) у сухій біомасі клонів. Протипухлинну активність екстрактів визначали на тест-системі CellTiter 96® з лінією злоякісних клітин людини *Leukemia myelogenous K-562*. Досліджували біомасу та екстракти з клонів рослин *D. antarctica*, отриманих з насіння, зібраного з п'яти островів архіпелагу Аргентинські острови (Прибережна Антарктика), та з насіння *D. caespitosa*, зібраного з Вишгородського полігону поблизу Києва (Україна). **Результати.** Встановлено, що виявлена протипухлинна активність екстрактів із клонованих *in vitro* рослин роду *Deschampsia* прямо пов'язана із загальною кількістю в них фенольних сполук. **Висновки.** Клони рослин роду *Deschampsia*, культивовані *in vitro*, є перспективними для розробки біотехнології отримання протипухлинних препаратів.

Ключові слова: щучник, *D. antarctica*, *D. caespitosa*, флавоноїди, протипухлинна активність.

Вступ. Останнім часом все більшу увагу привертають рослинні сполуки фенольної природи. Це пов'язують з їхньою високою терапевтичною ефективністю та низькою токсичністю для організму людини. Наразі, антипроліферативний ефект, наприклад, флавоноїдів порівнюють з дією сучасних протипухлинних агентів. При цьому вони здатні пригнічувати канцерогенез, впливаючи на процеси не тільки ініціації, прогресивного зростання, але й метастазування пухлини [1–3].

Потенційним об'єктом у цьому аспекті є щучник антарктичний *Deschampsia antarctica* – представник судинних рослин Антарктики, що пристосував свій метаболізм до жорстких кліматичних умов цього регіону [4]. Як показують попередні дослідження, вторинні метаболіти *D. antarctica* включають сполуки фенольної природи, здатні інгібувати проліферацію клітин меланоми [5]. Вирощу-

вання рослин щучника в умовах *in vitro* у вигляді клонів, ініційованих з насіння, в контрольованих умовах дасть змогу розробити біотехнологію отримання протипухлинних сполук. Тому, виявлення зв'язку біологічної активності екстрактів, отриманих з цих клонів, з наявністю в них фенольних сполук є актуальним завданням. Цікавим є також порівняння протипухлинної активності клонів рослин роду *Deschampsia* полярних та помірних регіонів.

Матеріали і методи

Рослинний матеріал. Досліджували клони, отримані з насіння рослин роду *Deschampsia* з полярного регіону Прибережної Антарктики з островів, описаних у [6], та помірного регіону – Вишгородського полігону поблизу Києва (Україна). Останній матеріал був зібраний к.б.н. Парнікозою І.Ю. у 2012 р. Клони видів *D. antarctica* та *D. caespitosa* були отримані за методикою [6]. Аналізували по одному генотипу з кожної географічної точки.

Екстрагування, вміст фенольних сполук. Рослинні екстракти отримували у вигляді 45 %-них спиртових настоек (на 400 мг висушеної рослинної біомаси брали 40 мл водно-спиртової суміші). Екстракти випарювали за допомогою вакуум-ротаційного випарювача при температурі 40 °С до сухого залишку і розчиняли в дистильованій воді до вихідного об'єму, що відповідає за масовою часткою 1 %-му розчину. Вміст фенольних сполук у сухій біомасі клонів визначали за методикою [7].

Тест-система. Для визначення протипухлинної активності екстрактів застосували нерадіоактивну тест-систему на проліферацію клітин CellTiter 96® з лінією злякисних клітин людини Leukemia myelogenous K-562. Тестували 0,5 %-ні водні рослинні екстракти.

Статистичну обробку даних проводили за [8].

Результати та обговорення

Отримані дані про відмінності, що були виявлені між клонами видів *D. antarctica* та *D. caespitosa*, наведені у таблиці. Найпродуктивнішими за вмістом галової кислоти виявились клони, отримані з насіння *D. antarctica* з островів, які знаходяться поряд, – Скуа (2009/10) та Галіндеза (2006/07) і віддаленого від них на 5 км Ялур (2004/05). Найменш продуктивним є клон з насіння, зібраного на о. Расмуссен у 2004/05 рр; різниця складає 6 разів. За вмістом флавоноїдів у перерахунку на рутин найменш продуктивним виявився клон *D. caespitosa*, отриманий з насіння, зібраного у помірній зоні на Вишгородському полігоні поблизу Києва у 2012 р. Найбільшу ж кількість рутину містив клон *D. antarctica* походженням з о. Ялур (2004/05). Це явище можна пояснити наявністю в Антарктиці цілої мозаїки кліматичних мікроумов [4] і, вірогідно, різною потребою цих рослин у фотозахисті в період росту досліджених зразків рослин *in vivo* [9]. Відомо, що значним стресовим фактором для рослин цього регіону є жорстке ультрафіолетове опромінення [4].

Усі вибірково протестовані на протипухлинну активність екстракти виявились активними у концентрації 0,5 %. При цьому спостерігали повне руйнування пухлинних клітин. Гомеопатичні дози цих екстрактів (розведення ≥ 15 і більше) виявили протилежну – стимулюючу дію. Слід підкреслити, що наявність протипухлинної активності пов'язана не тільки з рутином, а й з іншими фенольними сполуками, тому найменш продуктивний за рутином клон *D. caespitosa* (2012) показав таку ж активність, як і клон *D. antarctica* з о. Галіндез (2006/07). Вивчення повного складу цих екстрактів рослин є завданням наших подальших досліджень.

У досліджах Gidegel та співавторів [5] також встановлено, що екстракт *D. antarctica* містить вторинні метаболіти, здатні

Таблиця. Вміст фенольних сполук у біомасі клонів рослин роду *Deschampsia* та протипухлинна активність екстрактів з них

№	Географічне положення, вид рослини, рік збору насіння	Вміст фенольних сполук, мг/г сух. біомаси		Реакція на тест-системі з лінією зляжкісних клітин людини <i>Leukemia myelogenous K-562</i>				
		за галовою кислотою	за рутином	1:1	1:3	1:7	1:15	1:31
1	о. Галіндез (Антарктика) <i>D. antarctica</i> 2006/07	44,1±0,38	6,5±0,10	++	±	0	--	--
2	о. Дарбо (Антарктика) <i>D. antarctica</i> 2006/07	27,7±0,06	4,3±0,09					
3	о. Расмуссен (Антарктика) <i>D. antarctica</i> 2004/05	11,2±0,01	2,2±0,23	±	0	--	--	--
4	о. Скуа (Антарктика) <i>D. antarctica</i> 2009/10	63,6±0,18	6,6±0,40					
5	о. Ялур (Антарктика) <i>D. antarctica</i> 2004/05	45,8±0,05	7,1±0,35					
6	Вишгород (Україна) <i>D. caespitosa</i> 2012	29,7±0,05	1,1±0,19	++	±	0	--	--

П р и м і т к а. (++) – повне руйнування пухлинних клітин; (±) – часткове руйнування пухлинних клітин; (0) – рівень контролю; (--) – стимуляція поділу клітин. Максимальні розведення екстрактів (≥ 15) відповідають гомеопатичним дозам біологічно активних речовин.

впливати на проліферацію онкологічних клітин людини. Провідна роль біологічно активних речовин у цьому процесі належить фенольним сполукам, зокрема флавоноїдам, які продукує рослина у відповідь на стресові фактори. Серед них, як визначили дослідники, основною діючою речовиною є орієнтин – похідне лютеоліну.

Для одержання клонів ці дослідники використовували кореневі та стеблові експланти, які пророщували на середовищі Мурасіге і Скуа (MS) з вмістом сахарози 35 мг/л та фітогормону бензиламінопурину (БАП), як стимулятора росту, у концентрації 1 мг/л. При цьому в отриманих екстрактах не було виявлено фенольних сполук. Їх накопичення стимулювали обробкою клонів ультрафіолетовим опроміненням [5].

Отримані нами результати показали, що синтез фенольних сполук *D. antarctica*

може відбуватись і без додаткового опромінення ультрафіолетом (див. таблицю). Це свідчить, що зберегти здатність антарктичної рослини до накопичення фенольних сполук можна культивуючи клони на живильному середовищі Гамборга (B5), розробленому для злаків, яке містить 30 г/л сахарози.

Як показано в дослідженнях біосинтезу фенольних сполук, на рівні фенілаланіну та тирозину у рослинах відбувається розгалуження синтезу на дві гілки: утворення білка або фенольних сполук. Так, при багатому азотному живленні рослинні клітини спрямовують азотисті речовини на формування білкових молекул. При дефіциті азоту і достатній кількості сахарози відбувається стимулювання синтезу фенольних сполук [10].

Таким чином клони, отримані з насіння різних регіонів у різні роки, вирощені в од-

накових умовах, зібрані на однаковій фізіологічній стадії, реалізували свою різну здатність синтезувати фенольні сполуки (див. таблицю). Ця особливість дає змогу відібрати найпродуктивніші рослинні генотипи для подальшої роботи.

Висновки

Встановлено, що виявлена протипухлинна активність екстрактів з клонованих *in vitro* рослин роду *Deschampsia* прямо пов'язана з загальною кількістю в них фенольних сполук. Клони рослин роду *Deschampsia*, культивовані *in vitro*, є перспективними для розробки біотехнології отримання протипухлинних препаратів.

Перелік літератури

1. Brakenchielm E.R., Cao Y. Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes // *FASEB*. – 2001. – № 15. – Р. 1798–1800.
2. Тараховський Ю.С., Ким А.Ю., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. – Пушино: Synchrobook, 2013. – 311 с.
3. Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. Flavonoids: Promising Anticancer Agents // *Med. Res. Rev.* – 2003. – Vol. 23, № 4. – Р. 519–534.
4. Parnikoza I., Kozerecka I., Kunakh V. Vascular plants of the Maritime Antarctic: origin and adaptation // *American Journal of Plant Sciences*. – 2011. – Vol. 2. – Р. 381–395.
5. Gidekel M., Weber H., Cabrera G., Gutierrez A., Osorio J., Becera J., Podhajcer J., Cafferata E., Suncel S., Mihovilovic I. Extracts of *Deschampsia antarctica* Desv. with antineoplastic activity // Patent US 2010/0310686 A1 – 2010. – 18 р.
6. Загричук О.М., Дробик Н.М., Козерецька І.А., Парнікоза І.Ю., Кунах В.А. Введення в культуру *in vitro* *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae) з двох районів Прибережної Антарктики // Український антарктичний журнал. – 2011/2012. – № 10–11. – С. 289–295.
7. Хишова О.М., Бузук Г.Н. Количественное определение процианидинов плодов боярышника // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2006. – Т. 40, № 2. – С. 20–21.
8. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. – Москва: Финансы и статистика. – 1982. – 344 с.

9. Соловченко А.Е., Мерзляк М.Н. Экранирование видимого и УФ излучения как механизм фотозащиты у растений // *Физиол. раст.* – 2008. – Т. 55, № 6. – С. 803–822.
10. Юрин В.М., Дитченко Т.И., Шапчиц М.П., Ромашко С.Н. Экзогенная регуляция вторичного метаболизма в культуре клеток и тканей растений // Труды Белорусского государственного университета. – 2008. – Т. 3, Ч. 2. – С. 118–127.

Представлено Лукаш Л.Л.
Надійшла 12.11.2014

КЛОНЫ РАСТЕНИЙ РОДА *DESCHAMPSIA* КАК ИСТОЧНИК ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМИ СВОЙСТВАМИ

О.А. Поронник¹, А.В. Кузьменко²,
А.В. Воловик³, Е.В. Швачко³,
Е.В. Войцеховская³, А.Ю. Мирюта¹,
Т.А. Рубан¹, И.Ю. Парникоза¹, В.А. Кунах¹

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина, 03680, г. Киев, ул. Акад. Заболотного, 150

e-mail: oksana_poronnik@ukr.net

² Национальный авиационный университет
Украина, 03680, г. Киев, просп. Космонавта Комарова, 1

³ Киевский национальный университет, ННЦ «Институт биологии»
Украина, 04033, г. Киев, ул. Владимирская, 64

Цель. Сравнительное исследование биомассы клонированных *in vitro* растений рода *Deschampsia* по содержанию фенольных соединений и экстрактов из этих клонов по противоопухолевой активности. **Методы.** Определили содержание обцинов фенолов (по галловой кислоте) и флавоноидов (по рутину) в сухой биомассе клонов. Противоопухолевую активность экстрактов определяли на тест-системе CellTiter 96® с линией злокачественных клеток человека *Leukemia myelogenous* K-562. Исследовали биомассу и экстракты из клонов растений *D. antarctica*, полученную из семян, собранных с пяти островов архипелага Аргентинские острова (Прибрежная Антарктика), и из семян *D. caespitosa*, собранного на Вышгородском полигоне вблизи Киева (Украина). **Результаты.** Установлено, что выявленная противоопухолевая активность экстрак-

тов из клонированных *in vitro* растений рода *Deschampsia* прямо связана с общим количеством в них фенольных соединений. **Выводы.** Клоны растений рода *Deschampsia*, культивируемые *in vitro*, являются перспективными для разработки биотехнологии получения противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: щучка, *D. antarctica*, *D. caespitosa*, флавоноиды, противоопухолевая активность.

PLANT CLONES OF DESCHAMPSIA AS A SOURCE PHENOLIC COMPOUNDS WITH ANTITUMOR PROPERTIES

O.O. Poronnik¹, A.V. Kuzmenko², A.V. Volovyk³, L.V. Shvachko³, O.V. Voytsehivska³, G.U. Myryuta¹, T.A. Ruban¹, I.J. Parnikoza¹, V.A. Kunakh¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnoho str., 150
e-mail: oksana_poronnik@ukr.net

² National Aviation University
Ukraine, 03680, Kyiv, Komarova ave., 1

³ Taras Shevchenko National University of Kyiv, NSC «Institute of Biology»
Ukraine, 04033, Kyiv, Volodymyrska str., 64

Aim was the comparative study of phenolic compounds content and antitumor activity of biomass extracts of *Deschampsia* species plants micropropagated *in vitro*. **Methods.** Content of total phenols (by gallic acid) and flavonoids (by rutin) was determined in dry plant biomass. Antitumor activity of plant extracts was determined by the test CellTiter 96® with the use of the chronic myelogenous leukemia cell line K562. Plant biomass and extracts from micropropagated *D. antarctica* plants grown from seeds collected from the Argentine Islands region of Maritime Antarctic and *D. caespitosa* grown from seeds collected from Vyshgorod firing range near Kyiv (Ukraine) were investigated. **Results.** Antitumor activity of the extracts from micropropagated *Deschampsia* species plants was found to be directly dependent on total phenolic content. **Conclusion.** *In vitro* culture of *Deschampsia* species plants are promising for the development of biotechnology for the production of anticancer drugs.

Keywords: hairgrass, *D. antarctica*, *D. caespitosa*, flavonoids, antitumor activity.