

**ПРОДУКЦІЯ ФАРМАКОЛОГІЧНО АКТИВНОГО
МЕРОТЕРПЕНУ БАКУЧІОЛУ В АСЕПТИЧНИХ
РОСЛИНАХ РОДІВ *CULLEN* І *OTHOLOBIUM*
(FABACEAE)**

**К.В. Листван, Н.П. Рибальченко, А.М. Остапчук,
М.О. Борецька**

*Інститут клітинної біології і генетичної інженерії
НАН України*

*Інститут мікробіології і вірусології ім.Д.К.Заболотного
НАН України*

Вступ

Бакучіол - природний меротерпен, що виявляє широкий спектр різноманітної біологічної активності. Зокрема, він та його похідні є активними імуномодуляторами. Так, бакучіол має значну антизапальну дію, що показано як на рівні організму - при вивченні його комплексного впливу на експериментально викликані запальні процеси шкіри морських свинок та мишей [1,2], так і на рівні окремих складових запального процесу [2,3]. Зокрема, показано, що цей меротерпен здатний контролювати деякі аспекти функціонування лейкоцитів (продукцію ейкозаноїдів, міграцію і дегрануляцію в сайті запалення) [2]; інгібує продукцію нітроген-оксиду та простагландину E2, штучно викликану ліпополісахаридами в клітинах мишачих макрофагів лінії RAW 264.7 [3]. Крім того, бакучіол та 24 його хімічно синтезовані похідні тестували на цитотоксичність для мишачих лімфоцитів Т- і В-типів, індукованих лектином конканаваліном А і ліпополісахаридом відповідно. Бакучіол цитотоксичності стосовно лімфоцитів не виявив, однак низка хімічно синтезованих його похідних виявили значну імуносупресорну дію [4]. Також даний меротерпен є одним з найсильніших рослинних антибіотиків, котрий діє на грам-позитивні бактерії і гриби-дерматофіти [5-7], йому притаманна антипухлинна, гепа-

топротекторна, цукрознижуюча, гіпотензивна, естрогенна, антиоксидантна тощо активності.

Отже, бакучіол без сумніву є перспективним кандидатом для створення нових лікарських та косметичних засобів.

Втім, впровадження бакучіолу в українську практику охорони здоров'я гальмується неможливістю забезпечити виробництву надійне джерело сировини. Бакучіол можна отримувати з біомаси надземної частини або насіння дикорослих рослин окремих видів триби *Psoraleeae* (Fabaceae). Проте, як показала світова практика, природні запаси при їх інтенсивному використанні швидко вичерпуються, культивування ж даних видів пов'язане з труднощами, зокрема, поганим проростанням насіння та загибеллю сіянців. Не можна забувати і про географічні та кліматичні чинники, від яких безпосередньо залежить кількість отриманої біомаси та вміст потрібної нам речовини в ній. Зокрема, в кліматичних умовах України культивування рослин триби *Psoraleeae* практично неможливе.

Культура *in vitro* є альтернативою використанню дикорослих рослин при необхідності отримання з їх біомаси корисних для людини речовин (а в ряді випадків - єдиною можливістю їх отримання). Є підстави вважати, що рослини триби *Psoraleeae* могли б бути основою для створення біотехнологічного джерела отримання даного меротерпену. Відомо, що окремі види триби містять бакучіол у значних кількостях. Проте деяка інформація про вміст бакучіолу існує лише для 6 видів триби з майже 200 існуючих. Тому очевидно, що це питання потребує подальшого вивчення.

В даній роботі нами досліджувалось питання вмісту бакучіолу в асептичних пагонах низки видів триби *Psoraleeae* (Fabaceae) - родів *Cullen* та *Otholobium*, а саме *Cullen drupaceum*, *C.leucanthum*, *Otholobium spissum*, *O.rubicundum*, *O.caffrum*. Асептичні пагони даних видів отримано вперше нами. Питання наявності та вмісту бакучіолу в даних видах (за винятком *Cullen drupaceum*) дотепер також не вивчалось.

Зв'язок роботи з науковими планами, темами. Робота виконувалась у відділі генетичної інженерії Інституту клітин-

ної біології та генетичної інженерії НАН України в рамках тем НДР "Отримання антимікробних, фунгіцидних та протипухлинних речовин рослинного походження з використанням колекції клітинних ліній і рослин світової флори" (№ держ. реєстрації 0104U007552, 2004-2006 рр.), "Створення та застосування клітинних культур - продуцентів для отримання цінних біологічно-активних речовин рослинного походження" (№ держреєстрації 0107U004770, 2007-2009 рр.).

Матеріали та методи дослідження

Індукція асептичних рослин проводилась шляхом отримання їх з поверхнево-стерилізованого насіння. Насіння промивали 70% етанолом протягом 30 с, стерилізували в 10% розчині "Білизни" протягом 7-10 хвилин, відмивали від стерилізуючого розчину витриманням у стерильній дистильованій воді (5 хвилин, 3 зміни води), після чого висаджували на живильне середовище Мурашіге-Скуга (MS) [8], і культивували при 250С і 16-годинному фотоперіоді. Рослини субкультивували шляхом перенесення апікальної або бічних бруньок на свіже середовище. При необхідності насіння скарифікували витриманням протягом 30-60 хв у концентрованій сірчаній кислоті з наступним відмиванням у дистилаті. Вивчення якісного та кількісного місту бакучіолу здійснювали на хроматографі Agilent 1200, з використанням колонки Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6x250 мм, 5мкм, Agilent) і діодноматричного детектора (довжина хвилі - 254 нм); швидкість потоку мобільної фази - 1 мл/хв.; мобільна фаза - ацетонітрил/вода (початкове співвідношення 20%/80%, градієнт - до 100% ацетонітрилу за 30 хв). Бакучіол в екстрактах ідентифікували на підставі порівняння зі стандартом. Стандартну речовину було люб'язно надано к.б.н. Приходько В.А. (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України).

Статистичну обробку результатів виконували з використанням показників описової статистики за допомогою пакету програм Statistica 6.0. При описі вмісту бакучіолу в різних видах рослин значення вмісту представлені у вигляді $M \pm m$, де M - середнє значення вмісту меротерпену, m - стандартна помилка середнього значення.

Отримані результати та їх обговорення

Асептичні рослини досліджуваних видів отримували шляхом вирощування їх в асептичних умовах з поверхнево-стерилізованого насіння (плодів). Для ефективної стерилізації насіння достатньою обробкою виявилось витримувannya його в 10-15% розчині "Білизни" протягом 10-12 хвилин з подальшим трикратним відмиванням стерильною дистильованою водою. Виявилось, що пророщування насіння для рослин даних родів - одна з проблемних стадій їх культивування, оскільки насіння вкрите щільною, непроникною для води захисною оболонкою. Значно покращувались показники проростання при використанні механічної та, частково, хімічної скарифікації. Так, при витримувannya насіння *Cullen drupaceum* протягом 0,5 - 1 години в концентрованій сірчаній кислоті відсоток проростання насіння збільшувався з 5-10% до 50 - 75%.

Отримані нами проростки культивували на живильному середовищі (MS), доповненому 30 г/л сахарози, а в подальшому - на середовищі на основі середовища MS, проте із вдвічі зменшеною концентрацією макросолей і додаванням 15 мг/л сахарози. Така зміна умов культивування пояснюється тим, що при високому вмісті сахарози (30 г/л) спостерігається пригнічення росту проростків, зниження вмісту хлорофілу, в ряді випадків - утворення калусу на корінцях та гіпокотиліях проростків.

З'ясовано, що рослини досліджуваних видів досить легко культивувати в асептичних умовах тривалий час, переносючи на свіже живильне середовище верхівки пагонів або мікропагони, що розвиваються з бічних бруньок після зняття апікального домінування (зрізання чи засихання верхівкової бруньки). Розмноження асептичних пагонів традиційно досягається культивуванням верхівкових чи бічних бруньок (вузлів) на середовищі, збагаченому цитокініном. Так, для *C.drupaceum* хороші результати отримані при культивуванні бруньок на середовищі, доповненому 0,2 мг/л бензиламінопурину (БАП). При цьому спостерігається утворення 2-6 добре розвинених пагонів з однієї бруньки. Збільшення концентрації БАП до 1 мг/л не призводить до збільшення числа пагонів, але значно сповільнює їх ріст.

Питання вмісту бакучіолу було досліджено для 5 видів рослин, в тому числі - для 4 видів, інформації про наявність чи відсутність бакучіолу в яких на даний час не було. Досліджувались хлороформні екстракти асептичних пагонів даних видів. Бакучіол визначали за допомогою вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) при порівнянні характеристик зі стандартом (Рис. 1); його кількість виражали у % від сухої ваги рослини, представляли у вигляді $M \pm m$, де M - середнє значення вмісту меротерпену, m - стандартна помилка середнього значення. Результати визначення наявності та кількісного вмісту бакучіолу подано у таблиці 1.

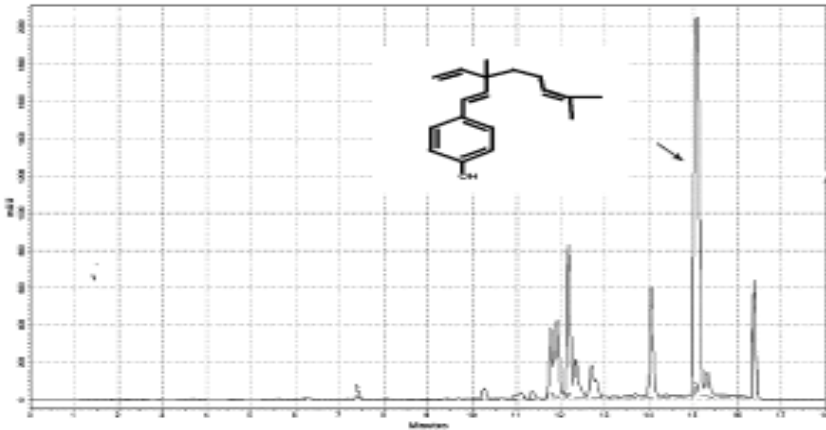


Рис 1. ВЕРХ-хроматограма хлороформного екстракту пагонів *Cullen d'uraseum*, вирощених в умовах *in vitro*. У врізці зображено структурну формулу бакучіолу.

Отримані дані дають змогу констатувати, що асептичні пагони всіх п'яти досліджених видів бакучіол містять, отже, здатні до його біосинтезу в умовах *in vitro*. Кількість синтезованого пагонами меротерпену значна - від 2 до 5,6 % сухої маси рослини, залежно від досліджуваного виду.

Як уже згадувалось, на даний час інформація про наявність та кількісний вміст бакучіолу існує лише для п'яти видів триби *Psoraleae*. Два з них продукують бакучіол у незначних кількостях. Так, показано, що з *Otholobium pubescence* виділено 0,35 % (сухої ваги рослини) цього меротерпену [9].

**Вміст бакучіолу в асептичних пагонах низки видів
родів *Cullen* та *Otholobium***

Вид рослини	Вміст бакучіолу, % сухої ваги	
	М	± m
<i>Cullen drupaceum</i>	5,6	± 1,25
<i>Cullen leucanthum</i>	2,05	± 0,5
<i>Otholobium caffrum</i>	2,0	± 0,2
<i>Otholobium spissum</i>	5,6	± 1,4
<i>Otholobium rubicundum</i>	2,4	± 1,1

Інші три види рослин відомі як продуценти значних кількостей меротерпену. Так, з *Psoralea glandulosa* (синонім - *Otholobium glandulosum*) виділено бакучіол в кількості 1,33% - 2,6% від сухої ваги рослини [10,11]. Бакучіол також є одним з головних компонентів екстрактів *Cullen drupaceum*. Хлороформні і ацетонові екстракти з надземних частин даного виду містять близько 65% бакучіолу [12], що добре корелює з отриманими нами даними для цього виду. Інші досліджені нами види - *Cullen leucanthum*, *Otholobium spissum*, *O.rubicundum*, *O.caffrum* - за вмістом бакучіолу також не поступаються відомим продуцентам бакучіолу, що дозволяє пропонувати асептичні пагони даних видів як високопродуктивне джерело цього біологічно-активного меротерпену.

Висновки

1. Меротерпен бакучіол виявляє широкий спектр різноманітної біологічної активності і є перспективним кандидатом для створення нових лікарських та косметичних засобів. Однак впровадження цієї речовини в практику охорони здоров'я України стримується відсутністю надійної сировинної бази.

2. Нами проведено порівняльне вивчення вмісту бакучіолу у рослинах двох родів родини Бобові (*Fabaceae*) і показана перспективність застосування низки видів рослин родини (зокрема, *Cullen drupaceum*, *C.leucanthum*, *Otholobium spissum*, *O.rubicundum*, *O.caffrum*) як джерела бакучіолу. З'ясовано, що асептичні пагони даних видів здатні накопичувати значні кількості бакучіолу - в середньому 2-6 % сухої ваги рослини.

Література

1. Backhouse C. Active constituents isolated from *Psoralea glandulosa* L. with anti-inflammatory and antipyretic activities / C. Backhouse, C. Delporte, R. Negrete [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* - 2001. - Vol.78, № 1. - P. 27-31.
2. Ferrandiz M. Effect of bakuchiol on leukocyte functions and some inflammatory responses in mice / M. Ferrandiz, B. Gil, M. Sanz [et al.] // *J. Pharm. Pharmacol.* - 1996. - № 48. - P. 975-980.
3. Choi S. Isolation and anti-inflammatory activity of Bakuchiol from *Ulmus davidiana* var. *japonica* / S. Choi, S. Lee, W. Choi [et al.] // *J. Med. Food.* - 2010. - № 13. - P. 1019-1023.
4. Chen H. Synthesis and structure-immunosuppressive activity relationships of bakuchiol and its derivatives / H. Chen, X. Du, W. Tang [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* - 2008. - № 6. - P. 2403-2411.
5. Приходько В.А. Антимикробная активность и токсичность антибиотика бакучиола / В.А. Приходько, А.С. Бондаренко, Е.Л. Мишенкова // *Микробиол. журнал.* - 1980. - Т. 42, № 5. - С. 646 - 650.
6. Newton S. The evaluation of forty-three plant species for *in vitro* antimicrobial activities. Isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria canadensis* / S. Newton, C. Lau, S. Gurcha [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* - № 79. - P. 57-67.
7. Katsura H. *In vitro* activities of bakuchiol against oral microorganisms / H. Katsura, R. Tsukiyama, A. Suzuki, M. Kobayashi // *Antimicrob. Agents Chemother.* - 2001. - Vol. 45, № 11. - P. 3009 - 3013.
8. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* - 1962. - № 15. - P.473-497.
9. Krenisky J. Isolation and antihyperglycemic activity of bakuchiol from *Otholobium pubescens* (Fabaceae), a Peruvian medicinal plant used for the treatment of diabetes / J. Krenisky, J. Luo, M. Reed, J. Carney // *Biol. Pharm. Bull.* - 1999. - № 22. - P. 1137-1140.

10. Labbe C. Bakuchiol derivatives from the leaves of *Psoralea glandulosa* / C. Labbe, F. Faini, J. Coll, J. Connolly // *Phytochemistry*. - 1996. - Vol. 42, № 5. - P. 1299-1303.

11. Erazo S. Bakuchiol and other compounds from *Psoralea glandulosa* / S. Erazo, R. Garcia, E. Delle Monache // *Rev. Latinoam. Quim.* - 1990. - № 21. - P. 62.

12. *Psoralea drupacea* как перспективный источник антибиотика бакучиола / А.С. Бондаренко, Б.Е. Айзенман, Д.Г. Затула, Л.А. Бакина [и др.] // *Растительные ресурсы*. - 1977. - Т. 13, № 3. - С. 460-463.

Резюме

Листван К.В., Рыбальченко Н.П., Остапчук А.М., Борецька М.О.
Продукція фармакологічно активного меротерпену бакучиола в асептичних рослинах родів Cullen і Otholobium (Fabaceae).

Показана перспективність застосування низки видів рослин триби *Psoraleeae* (зокрема, *Cullen drupaceum*, *C.leucanthum*, *Otholobium spissum*, *O.rubicundum*, *O.caffrum*) як джерела меротерпену бакучиола - речовини з високою і різнобічною біологічною активністю.

Ключові слова: бакучіол, асептичні пагони, Fabaceae.

Резюме

Листван Е.В., Рыбальченко Н.П., Остапчук А.Н., Борецкая М.А.
Продукция фармакологически активного меротерпена бакучиола в асептических растениях родов Cullen и Otholobium (Fabaceae).

Показана перспективность использования ряда видов растений трибы *Psoraleeae* (в частности, *Cullen drupaceum*, *C.leucanthum*, *Otholobium spissum*, *O.rubicundum*, *O.caffrum*) как источника меротерпена бакучиола - вещества с высокой и разносторонней биологической активностью.

Ключевые слова: бакучиол, асептические побеги, Fabaceae.

Summary

Lystvan K.V., Rybalchenko N.P., Ostapchuk A.M, Boretska M.O.
Production of pharmacologically active meroterpene bakuchiol in aseptic plants of Cullen and Otholobium genus (Fabaceae).

The prospects of using of some *Psoraleeae* species (*Cullen drupaceum*, *C.leucanthum*, *Otholobium spissum*, *O.rubicundum*, *O.caffrum*) as a source of biologically-active meroterpene bakuchiol have been demonstrated.

Key words: bakuchiol, aseptic plants, Fabaceae.

Рецензент: д.біол.н., проф.Б.П.Романюк