

УДК 577.13, 541.127

DOI: 10.36305/0513-1634-2021-141-64-70

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОКОВ ХВОИ НЕКОТОРЫХ РАСТЕНИЙ
ПОРЯДКА СОСНОВЫЕ (PINALES)**

**Ксения Николаевна Бушмелева, Дмитрий Александрович Теренжев,
Наталья Леонидовна Шаронова, Тимур Геннадьевич Белов,
Анна Павловна Любина**

**ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
«Казанский научный центр Российской академии наук»**

420111, Российская Федерация, Татарстан, г. Казань, ул. Лобачевского, 2/31, а/я 261

E-mail: ks.bushmelewa09@ya.ru, dmitriy.terenzhev@mail.ru, lapanovich@mail.ru,
belofftimur@mail.ru, aplyubina@gmail.com

В статье представлены результаты исследования биологической активности соков хвои ели обыкновенной (*Picea abies* L.), сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и тиса остроконого (*Taxus cuspidata* Siebold et Zucc. ex Endl.). Установлена наибольшая антимикробная активность сока хвои тиса остроконого в отношении патогенов человека и фитопатогенов: значения минимальной ингибирующей концентрации, минимальной бактерицидной концентрации и минимальной фунгицидной концентрации составили 0,0313% и 0,0078% соответственно. Выявлены выраженные антиоксидантные свойства и мембранопротекторная активность сока хвои сосны обыкновенной по сравнению с елью обыкновенной как в зимний, так и в летний периоды. Сок тиса остроконого обладал наиболее выраженными антиоксидантными свойствами. При уменьшении концентрации сока тиса остроконого увеличивалась его способность к защите мембран от перекисного гемолиза. Также установлена его высокая цитотоксичность и отсутствие избирательности по отношению к опухолевым клеткам.

Ключевые слова: порядок сосновые; сок хвои; антимикробная активность; антиоксидантная активность; цитотоксичность; гемолиз эритроцитов

Введение

Окислительный стресс возникает вследствие отсутствия клеточного баланса между прооксидантами и антиоксидантами. Чрезмерное увеличение активных оксигенированных веществ, а также недостаточная антиоксидантная защита и/или неспособность буферной системы клеток поддерживать окислительно-восстановительное равновесие, обуславливает развитие окислительного стресса, приводящего к конформационным и окислительным изменениям в ключевых биомолекулах [9]. Окислительный стресс является основополагающим фактором в индукции ряда дегенеративных заболеваний, таких как рак, старение, ревматоидный артрит, аутоиммунные расстройства, нейродегенеративные расстройства, сердечно-сосудистые заболевания и катаракта [11]. В организме человека и животных существует множество способов борьбы с окислительным стрессом путем выработки антиоксидантных соединений, которые либо производятся естественным путем, либо поставляются извне с помощью добавок или пищевых продуктов. Следовательно, антиоксидантные соединения могут улучшить иммунный ответ и снизить риск дегенеративных заболеваний [10]. К антиоксидантам относят соединения, способные препятствовать или замедлять окисление, действуя при более низкой концентрации по сравнению с концентрацией защищенного субстрата [12].

В последнее годы наблюдается повышенный интерес к природным компонентам, экстрагируемым из растений, в качестве эффективной альтернативы

промышленно синтезированным химическим веществам вследствие их высокой биологической активности, экономической рентабельности, экологической и биологической безопасности. Известно, что соки и экстракты растений представляют собой многокомпонентные системы, содержащие множество биологически активных соединений [1,8]. Растения порядка сосновые являются важным источником вторичных метаболитов и находят широкое применение в различных областях промышленности [3,13]. Для представителей семейства сосновые установлена фунгицидная, антибактериальная, антиоксидантная, инсектицидная виды биологической активности. Некоторые виды сосны (например, *Pinus pinaster* Aiton, *P. halepensis* Mill, *P. brutia* Ten, *P. radiata* D.Don, *P. pinea* L., *P. nigra* J.F.Arnold) были тщательно исследованы [7,16]. Сравнительно мало исследований биологической активности и фитохимического состава других видов [15].

Целью данной работы была сравнительная характеристика биологической активности соков хвои некоторых растений порядка сосновые.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись – сок хвои ели обыкновенной (*Picea abies* L.), сок хвои сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), собранных в зимний и летний периоды 2019-2020 гг. в Республике Чувашия; сок хвои тиса остроконечного (*Taxus cuspidata* Siebold et Zucc. Ex Endl.), собранной 2019-2020 гг. в Краснодарском крае, Супсехский сельский округ, заказник «Большой Утриш».

Соки получали путем измельчения замороженной хвои (фракция 0,1-3мм), последующего прессования и фильтрации выделившейся жидкости.

Для оценки антимикробной активности были использованы следующие штаммы фитопатогенных микроорганизмов – бактерии (*Clavibacter michiganensis* BKM Ac-1404, *Xanthomonas arboricola* S3, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia amylovora*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas syringae* pv. *Atrofacience*), грибы (*Alternaria solani* K-100054, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Phytophthora* sp.), штамм патогена человека – *Staphylococcus aureus* 209P. Микроорганизмы культивировали в стандартных стерильных питательных средах. Концентрацию бактерий определяли с помощью денситометра «DEN-1B» (Biosan, Латвия) по стандартным протоколам. В экспериментах определяли минимальную ингибирующую концентрацию методом двукратного последовательного разведения [4]. Фунгистатическую активность определяли методом серийного разведения [5] в жидкой среде.

Уровень генерации активных форм кислорода и интегральную оценку состояния антиоксидантной системы оценивали с помощью хемилюминесцентного анализа [18] с использованием хемилюминометра «Lum-100» («DISoft», Россия). Раствор люминола (AlfaAesar, Великобритания) 1 ммоль/л готовили путем растворения в 0.1 М NaOH; перед анализом его разбавляли дистиллированной водой 4 раза. В состав реакционной смеси входили: 400 мкл 250 мкМ люминола, 500 мкл 0.5 М Трис-буферного раствора (FisherChemical, Великобритания) pH 8,6 и 100 мкл 40 мМ раствора AAPH 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида (AcrosOrganics, США) в дистиллированной воде. Реакционную смесь инкубировали при 30°C. Основной уровень хемилюминесценции измеряли в течение 10 минут. Затем к реакционной смеси добавляли 10 мкл раствора исследуемого соединения, уровень хемилюминесценции измеряли в течение 20-30 минут. Соки хвои разбавляли в дистиллированной воде до концентрации 10, 1, 0,1 и 0,01 мг/мл. Тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота) (Sigma-AldrichCo., США) и кверцетин использовались в качестве стандартных антиоксидантов. Для оценки величины хемилюминесценции исследуемых

образцов были рассчитаны показатели TAR (общая антиоксидантная активность) и TRAP (общий реактивный антиоксидантный потенциал) [11].

На основе измерения площади кривых хемилюминесценции оценивали относительную ингибирующую активность каждого образца. Коэффициент ингибирования рассчитывали в соответствии с Уравнением 1:

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{100 \cdot \text{AUC}_1}{\text{AUC}_0} \quad (1),$$

где AUC_0 и AUC_1 представляют собой площадь под кривой, наблюдаемую для контроля и в присутствии исследуемого раствора соответственно.

Результаты были обработаны с помощью программы PowerGraph (<http://www.powergraph.ru>) и OriginLab.

Для оценки токсичного действия компонентов сока тиса остроконечного на внутреннюю среду организма провели скрининг-тест гемолитической активности согласно методике [2].

Цитотоксичность и противоопухолевую активность сока тиса остроконечного оценивали в отношении условно-нормальной клеточной линии Ch.Liver (клетки печени человека) и опухолевой линии M-Hela – (карцинома шейки матки человека) с использованием Cell Viability BioApp protocol (Cytell cell imaging system) [6].

Все анализы были выполнены в трехкратной повторности, результаты выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD). Значимые различия между средними значениями определяли с помощью дисперсионного анализа с использованием статистического пакета GraphPad Prism 5.

Результаты и обсуждение

По критериям оценки антимикробной активности растительных препаратов [17], соки хвой ели обыкновенной и сосны обыкновенной проявили низкую антимикробную активность в отношении патогена человека и фитопатогенов: значения минимальных ингибирующих концентраций составили 0,125-0,25%, минимальных бактерицидных и минимальных фунгицидных концентраций – 0,25% и более. Сок хвой тиса остроконечного проявил умеренную антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* 209-P и значительную антимикробную активность в отношении *Clavibacter michiganensis* VKM Ac-1404: значения минимальной ингибирующей концентрации, минимальной бактерицидной концентрации и минимальной фунгицидной концентрации составили 0,0313 и 0,0078% соответственно. В литературе имеются сведения об антимикробном действии побочных химических продуктов из разных видов сосны (например, *Pinus brutia* Ten, *P. roxburghii* Sarg, *P. ponderosa* P.Lawson & C.Lawson, *P. resinosa* Sol ex Aiton, *P. strobus* L. и др.), ели обыкновенной (*Picea abies* L.), можжевельника обыкновенного (*Juniperus communis* L.), можжевельника колючего (*Juniperus oxycedrus* L.), пихты киликийской (*Abies cilicica* (Antoine & Kotschy) Carrière), кедра ливанского (*Cedrus libani* A.Rich), криптомерии японской (*Cryptomeria japonica* (Thunb. ex L.f.) D. Don) [13].

Соки хвой растений семейства сосновые, полученные в зимний период, обладали большими способностями реагировать со свободными радикалами. Для сосны обыкновенной выявлены более выраженные антиоксидантные свойства по сравнению елью обыкновенной как в зимний, так и в летний периоды. Так, значение общей антиоксидантной активности в августе и феврале при концентрации 10 мг/мл в случае сосны обыкновенной составило 95,88 и 98,72%, ели обыкновенной – 85,18 и 96,20% соответственно. Аналогичные закономерности были выявлены и для концентрации 1

мг/мл. Уровень антиоксидантной активности исследованных соков по показателям TRAP был сопоставим с активностью антиоксиданта средней силы Тролоксом, а по показателям TAR даже превосходил его. Согласно литературным данным, высокая антиоксидантная активность компонентов, извлекаемых из растений порядка сосновые, обуславливается наличием в их составе широкого спектра полифенольных соединений, таких как процианидины, антоцианы, катехины, кверцетин, кемпферол и др. [13].

Выявлено мембранопротекторное действие соков хвои растений порядка сосновые, проявляющееся в большей степени на модели перекисного гемолиза и более выраженное у соков хвои *Pinus sylvestris* как в зимний, так и в летний периоды сбора (табл. 1). Наиболее выраженное мембранопротекторное действие на перекисный гемолиз исследуемые соки хвои сосны и ели в летний вегетационный период проявляли в концентрации сухих веществ 0,1 и 1,0 мг/мл, при которых отмечалось снижение гемолиза на 46,9% и 20,3%; 64,8% и 53,5% относительно контроля соответственно. Под действием исследованных концентраций соков хвои также наблюдали снижение интенсивности осмотического гемолиза до 40%.

Наибольшую радикал-связывающую активность проявил сок хвои тиса остроконечного: в концентрации 0,1 мг/мл 95,68% гашения интенсивности свечения хемилюминесценции в течение 20000 с. Также установлена мембранопротекторная активность сока хвои тиса остроконечного: с уменьшением концентрации сока хвои тиса остроконечного увеличивалась его способность к защите мембран от перекисного гемолиза и в концентрации 0,0156 мг/мл степень ингибирования гемолиза составляла 81% (табл. 1).

Таблица 1

Влияние соков хвои сосны обыкновенной и ели обыкновенной на процессы перекисного и осмотического гемолиза эритроцитов в модельной системе (гемолиз выражен в процентах относительно контроля без добавления тестовых субстанций)

Показатель		Концентрация, мг/мл	Сосна обыкновенная (<i>Pinus sylvestris</i> L.)		Ель обыкновенная (<i>Picea abies</i> L.)	
			лето	зима	лето	зима
Ингибирование гемолиза, % к контролю	перекисный	0,0001	23,05±0,39	8,59±1,56	18,75±2,34	41,41±0,78
		0,001	41,80±1,95	20,70±6,64	18,75±0,78	55,47±1,56
		0,01	33,98±0,39	26,56±9,38	44,92±3,52	30,47±0,78
		0,1	20,31±0,78	14,06±4,69	53,52±0,39	88,67±8,98
		1	46,88±3,13	-5,08±4,30	64,84±14,84	66,41±2,34
	осмотический	0,0001	69,48±0,40	57,83±3,03	58,63±9,08	63,86±1,84
		0,001	72,29±5,02	54,22±3,87	61,45±1,06	51,81±3,03
		0,01	48,20±6,38	66,27±0,40	84,34±0,40	77,11±0,40
		0,1	68,67±1,61	67,47±1,75	71,08±1,39	62,65±3,14
		1	73,49±2,81	67,47±2,44	61,45±1,75	69,88±4,87

В таблице 2 приведены показатели IC50 (концентрация вещества, при которой наблюдается гибель 50% клеток) и SI (индекс селективности, характеризующий специфичность сока хвои тиса остроконечного в отношении опухолевых клеток по сравнению со здоровыми).

Таблица 2

Цитотоксичность сока тиса остроконечного в отношении опухолевой клеточной линии M-Hela

Название	M-Hela* IC ₅₀	Ch.Liver** IC ₅₀	SI индекс селективности	HC50
Сок тиса остроконечного	0,05%	0,031%	0,62	0,045%
Арглабин ***	41,6 µM	41,6 µM	1	

*M-Hela – опухолевая линия – карцинома шейки матки человека;

**Ch.Liver – условно-нормальная клеточная линия (клетки печени человека).

*** Препарат сравнения растительного происхождения.

Установлена его высокая цитотоксичность и отсутствие избирательности. Так, HC50 и IC50 сока хвой тиса по отношению к клеткам печени меньше или равна значениям его антимикробных концентраций для *Rathayibacter iranica*. На основании анализа показателя индекса селективности противоопухолевая активность сока хвой тиса остроконечного не установлена.

Выводы

Исследована биологическая активность соков хвой трех видов растений порядка сосновые – семейства сосновые (ель обыкновенная (*Picea abies*), сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*) и семейства тисовые (тис остроконечный (*Taxus cuspidata*)).

Сок хвой тиса остроконечного проявил умеренную и значительную антимикробную активность в отношении патогенов человека и фитопатогенов, соки ели обыкновенной и сосны обыкновенной – низкую.

Установлены выраженные антиоксидантные свойства и мембранопротекторная активность сока хвой сосны обыкновенной по сравнению елью обыкновенной как в зимний, так и в летний периоды. Сок хвой тиса остроконечного обладал наиболее выраженными антиоксидантными и мембранопротекторными свойствами. Также установлена его высокая цитотоксичность и отсутствие избирательности по отношению к опухолевым клеткам.

По результатам комплексной оценки биологической активности изученных соков хвой растений порядка хвойные сок хвой тиса остроконечного следует рекомендовать для дальнейшего приоритетного изучения и возможного использования в качестве перспективного источника антимикробных и антиоксидантных компонентов растительного происхождения.

Список литературы

1. Варданын Л.Р., Варданын Р.Л., Галстян А.Г., Атабекян Л.В. Антиоксидантная активность экстрактов некоторых лекарственных растений и их смесей // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2019. – №4. – С. 5-12.
2. Ковалев И., Данилова Н., Андронати С., Жеребин Ю. Влияние эномеланина на гемолиз эритроцитов, вызываемый свободно радикальными реакциями и другими факторами // Фармакология и токсикология. – 1986. – №7. – С. 709-718.
3. Самбукова Т.В., Овчинников Б.В., Гананольский В.П., Ятманов А.Н., Шабанов П.Д. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии // Фитофармакология. – 2017. – Т. 15(2). – С. 56-63.
4. Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. CLSI standard M07. In 11th ed. [Electronic]. Wayne, Pennsylvania. USA: 2018. P. 112.

5. Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. CLSI standard M27. In 4th ed. Wayne, Pennsylvania, USA: 2017. P. 31.
6. Lyubina A., Gumerova S., Sharonova N., Ermakova A., Terezhev D., Shatalina E., Bushmeleva K. Cytotoxicity of potassium salts of terpenic acids conifer oleoresins // European Journal of Clinical Investigation. – 2020. – 50(Suppl. 1):10–107. – P. 75.
7. Mitić Z.S., Jovanović B., Jovanović S.Č., Stojanović-Radić Z.Z., Mihajilov-Krstev T., Jovanović N.M., Nikolić B.M., Marin P.D., Zlatković B.K., Stojanović G.S. Essential oils of *Pinus halepensis* and *P. heldreichii*: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity // Industrial Crops and Products. – 2019. – Vol. 140. – 111702.
8. Mohareb A.S.O., Kherallah I.E.A., Badawy M.E.I., Salem M.Z.M., Yousef H.A. Chemical composition and activity of bark and leaf extracts of *Pinus halepensis* and *Olea europaea* grown in AL-Jabel AL-Akhdar region, Libya against some plant phytopathogens // Journal of Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2017. – Vol. 3. – P. 331–342.
9. Mukherjee K., Chio T.I., Sackett D.L., Bane S.L. Detection of oxidative stress-induced carbonylation in live mammalian cells // Free Radic. Biol. Med. – 2015. – Vol. 4. – P. 11–21.
10. Nurcholis W., Putri D.N. S., Husnawati H., Aisyah S.I., Priosoeryanto B.P. Total flavonoid content and antioxidant activity of ethanol and ethyl acetate extracts from accessions of *Amomum compactum* fruits // Annals of Agricultural Sciences. – 2021. – Vol. 66. – I. 1. – P. 58–62.
11. Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. Free radicals, antioxidants in disease and health (Review) // International Journal of Biomedical Science. – 2008. – Vol. 4. – I. 2. – P. 89–96.
12. Pisoschi A.M., Pop A., Iordache F., Stanca L., Predoi G., Serban A.I. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2021. – Vol. 209. – 112891.
13. Salem M.Z.M., EL-Hefny M., Ali H.M., Abdel-Megeed A., El-Settawy A.A.A., Böhm M., Mansour M.M.A., Salem A.Z.M. Plants-derived bioactives: Novel utilization as antimicrobial, antioxidant and phyto-reducing agents for the biosynthesis of metallic nanoparticles // Microbial Pathogenesis. – 2021. – Vol. 158. – 105107.
14. Sharonova N., Nikitin E., Terenzhev D., Lyubina A., Amerhanova S., Bushmeleva K., Rakhmaeva A., Fitsev I., Sinyashin K. Comparative assessment of the phytochemical composition and biological activity of extracts of flowering plants of *Centaurea cyanus* L., *Centaurea jacea* L. and *Centaurea scabiosa* L. // Plants. – 2021. – Vol. 10(7). – 1279.
15. Terenzhev D., Sharonova N., Ermakova A., Gumerova S., Bushmeleva K., Lyubina A., Nikitin E., Belov T. Potassium salts of terpene acids of Siberian pine resin as an effective drug in the cultivation of potatoes in the conditions of organic farming // Asian Journal of Chemistry. – 2020. – №32(9). – P. 2329–2334.
16. Uluhanli Z., Karabörklü S., Bozok F., Ates B., Erdogan S., Cenet M., Karaaslan M.G. Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean *Pinus brutia* and *Pinus pinea* resin essential oils // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2014. – Vol. 12. – I. 12. – P. 901–910.
17. Van Vuuren, S., Holl, D. Antimicrobial natural product research: A review from a South African perspective for the years 2009–2016. Journal of Ethnopharmacology. – 2017. – Vol. 208. – P. 236–252.
18. Vyshtakalyuk A.B., Semenov V.E., Sudakov I.A., Bushmeleva K.N., Gumarova L.F., Parfenov A.A., Nazarov N.G., Galyametdinova I.V., Zobov V.V. Xymedon conjugate with biogenic acids. Antioxidant properties of a conjugate of Xymedon with L-ascorbic acid // Russ. Chem. Bull. – 2018. – Vol. 67. – P. 705–711.

Статья поступила в редакцию 20.08.2021 г.

Bushmelewa K.N., Terenzhev D.A., Sharonova N.L., Belov T.G., Lyubina A.P. Biological activity of needle sap of some plants of the order of Pine (Pinales) // Bull. Of the State Nikita Botan. Gard. – 2021. – № 141. – P. 64-70

The article presents the results of a study of the biological activity of the sap of the needles of Norway spruce (*Picea abies* L.), Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Japanese yew (*Taxus cuspidata* Siebold et Zucc. Ex Endl.). The highest antimicrobial activity of the Japanese yew's needle sap against human pathogens and phytopathogens was established: the values minimum inhibitory concentration, the minimum bactericidal concentration and the minimum fungicidal concentration were 0.0313 and 0.0078%, respectively. Expressed antioxidant properties and membrane-protective activity of Scots pine needles sap were revealed in comparison with Norway spruce both in winter and in summer. The Japanese yew needle sap had the most pronounced antioxidant properties. With a decrease in the concentration of Japanese yew needle sap, its ability to protect membranes from peroxide hemolysis increased. Its high cytotoxicity and lack of selectivity in relation to tumor cells have also been established.

Key words: *order of Pine; pine needles sap; antimicrobial activity; antioxidant activity; cytotoxicity; erythrocyte hemolysis*