

УДК 577.3

DOI: 10.25684/0513-1634-2023-147-90-95

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТКИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АЗУЛЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

Виктория Владимировна Рощина¹, Галина Александровна Солтани²,
Валентина Витальевна Фатерыга³, Надежда Константиновна Призова¹,
Любовь Михайловна Хайбулаева¹

¹Институт биофизики клетки, Пущинский биологический центр РАН,
142290, Россия, г. Пущино Московской области, Институтская, 3

²ФГБУ «Сочинский национальный парк»,

354002, Россия, г. Сочи, Курортный проспект, 74

³Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник РАН –
филиал Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН,
Курортное, Феодосия, Россия

E-mail: roshchinavic@mail.ru¹, soltany2004@yandex.ru², valentina_vt@mail.ru³

Рассмотрена возможность применения спектральных методов исследования для определения азуленов на поверхности клеток растений, перспективных в качестве фармакологического сырья. Исследована поверхность листьев с голубой или серебристой окраской у *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth., *Hippophae rhamnoides* L., хвои и шишкоягод *Juniperus excelsa* M. Bieb. и *Juniperus × pfitzeriana* (Späth) P.A.Schmidt 'Blue Cloud'. С помощью микроспектрофлуориметре/микроспектрофотометра в спектрах поглощения листьев и шишкоягод отмечены характерные для азуленов и хлорофилла максимумы 580-620 н.м и 660-666 н.м, соответственно. Для подтверждения присутствия азуленов в образцах получали 10 минутные экстракты с поверхности интактных клеток 100% ацетоном или 95% этанолом. Содержание азуленов в таких экстрактах составило в мг/г сырой массы в листьях *Eucalyptus cinerea* 12.5±0.02 и *Hippophae rhamnoides* – 1.0±0.1, а в хвое и шишкоягодах можжевельников *Juniperus excelsa* – 1.76/1.46±0.3/0.2 и *Juniperus × pfitzeriana* 'Blue Cloud' 0.55/2.96/±0.01/0.3, соответственно. Все исследованные древесные культуры могут быть источниками азуленов.

Ключевые слова: клеточная стенка; кутикула; поглощение; секреторные клетки; флуоресценция

Введение

Растения содержат большое количество автофлуоресцирующих молекул, которые могут быть использованы для биохимических, физиологических исследований или визуализации [6]. Поверхность разных типов клеток растений отличается чувствительностью к изменениям концентрации тропосферного озона, засолению, травмирующим факторам. Внешние сигналы в первую очередь воспринимают компоненты клеточной стенки и плазмалеммы, и они должны создавать защиту от проникновения токсичных веществ к плазмалемме и вглубь клетки. В одних и тех же тканях может присутствовать несколько типов автофлуоресцирующих молекул, и, таким образом, источник автофлуоресценции следует интерпретировать в сочетании с гистохимическим окрашиванием и другими формами анализа [6]. Начиная со второй половины XX века внимание научного сообщества было обращено на синие пигменты – азулены, с присутствием которых связан голубой цвет поверхностей листьев и плодов [3, 5]. У таких растений, содержащих азулен в слоях кутикулы и клеточной стенки поверхностных клеток листьев, отмечена повышенная устойчивость к негативному влиянию тропосферного озона [3].

Азулены обладают заметной антиоксидантной и антиаллергенной активностью в клетках животных. Благодаря физико-химическим свойствам азулен и его производные

нашли множество потенциальных применений в технике, особенно в оптоэлектронных устройствах. В медицине ингредиенты этих растений широко использовались в течение сотен лет в противоаллергической, антибактериальной и противовоспалительной терапии [4]. В данной статье рассмотрена возможность применения спектральных методов исследования для определения азуленов на поверхности клеток растений, перспективных в качестве фармакологического сырья.

Объекты и методы исследования

Группа моделей включала образцы с голубыми поверхностными структурами, собранные в 2021-2022 гг. Исследованы поверхности листьев с голубой или серебристой окраской у эвкалипта пепельного *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth. (Myrtaceae) из сочинского «Дендрария» и облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L., собранной на побережье реки Оки ботанического заказника г. Пушино; листья и шишкоягоды можжевельника высокого *Juniperus excelsa* M. Bieb. из Карадагского заповедника (Феодосия, Крым) и можжевельника × Пфизера 'Блю Клауд' *Juniperus* × *pfitzeriana* (Späth) P.A.Schmidt 'Blue Cloud' (Cupressaceae) из парка "Дендрария" Сочинского национального парка (рис. 1). По мнению Krussman's этот сорт *Juniperus* × *pfitzeriana* (синоним *J.* × *media* Melle, либо причисляемый к *J. sabina* L.) является спонтанным гибридом *J. sabina* и *J. virginiana*, полученный в 1955 г. в Голландии [2].



А



Б



В



С

Рис. 1 А - *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth., Б- *Hippophae rhamnoides* L.,
В - *Juniperus excelsa* M. Bieb. В - *Juniperus* × *pfitzeriana* (Späth) P.A. Schmidt 'Blue Cloud'

Поглощение, собственную флуоресценцию клеток до и после гистохимической обработки (см. гистохимический анализ) измеряли непосредственно на предметных стеклах с помощью спектрофотометров *Specord M-40* (Германия), *Unicam Helios-epsilon* (США), микроспектрофотометра/флуориметра МСФ-15 (ЛОМО, Россия), спектрофлуориметра *Perkin-Elmer 350 MPF-44B* (UK) и лазер-сканирующего конфокального микроскопа *Leica TCS SP-5* (Германия – Австрия – США). Фотографировали образцы с помощью люминесцентного микроскопа *Leica DM 6000 B*, выше упомянутого конфокального микроскопа и микроспектрофотометра/флуориметра МСФ-15 с камерой *Levenhuk M300 Base* (Россия). Спектры поглощения и флуоресценции экстрактов 100% ацетоном или 95% этанолом из клеток (1:10 вес/объем в течение от 5 мин до 1 часа и более) в 1-0.5 см-кюветах или на бумажных хроматограммах регистрировали с помощью выше упомянутых спектрофотометров и спектрофлуориметра. Для выявления азуленов экстракты хроматографировали на бумаге Whatman № 1 без или после пропитки вазелиновым маслом или на тонкослойных пластинках силикагеля *Silufol*, как описано ранее для пыльцы ряда семенных растений и микроспор хвоща [3]. Затем регистрировали их спектры поглощения и флуоресценции, чтобы сравнить с данными, полученными на intactных клетках. Среднюю ошибку опыта из трех-четырех повторностей вычисляли для каждого варианта и контроля, соответственно.

Концентрацию азуленов (A в молях, молекулярный вес азулена 128, 18) оценивали в растворах этанола или ацетона по формуле:

$$A = D_{580} / \varepsilon \times l,$$

где D_{580} – оптическая плотность при 580 нм, ε – коэффициент молярной экстинкции $328 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, l – толщина слоя жидкости в кювете, см. В работе использовали азулен фирмы “Fluka” (Германия).

Результаты и обсуждение

Поверхность клетки является первичным сенсором любого внешнего сигнала и может также быть защитным барьером, если включает соответствующие компоненты, защищающие клетку от любого повреждения. Из отобранных нами растений с голубой и серебристой окраской листьев, два вида древесных растения относились к Голосеменным, а два вида – к Покрытосеменным. Более голубыми являлись листья эвкалипта пепельного и хвоя можжевельника Пфитцера 'Блю Клауд'.

С помощью микроскопии в проходящем свете и люминесцентной микроскопии, включая микроспектрофлуориметрию/микроспектрофотометрию, мы исследовали листья и шишкоягоды древесных растений, получая их фотоизображения и спектры поглощения (рис. 2, 3).

В спектре поглощения поверхности можно обнаружить максимумы, свойственные различным соединениям (400-460 н.м и 500-530 н.м – фенолы, 570-620 н.м – азулены и 660-666 н.м – хлорофилл) [3]. Для определения максимумов в спектроскопии отражения в микроспектрофлуориметре/микроспектрофотометре имеется опция дифференцирования для выявления максимумов в спектрах поглощения согласно работе В.М. Золотарева [1].

С помощью этого прибора в спектрах поглощения листьев и шишкоягод различных видов (рис. 2) отмечены характерные для азуленов и хлорофилла максимумы 580-620 н.м и 660-666 н.м, соответственно.

Первая производная от спектра внешнего отражения для полос малой интенсивности позволяет непосредственно определить положение максимума полосы поглощения.

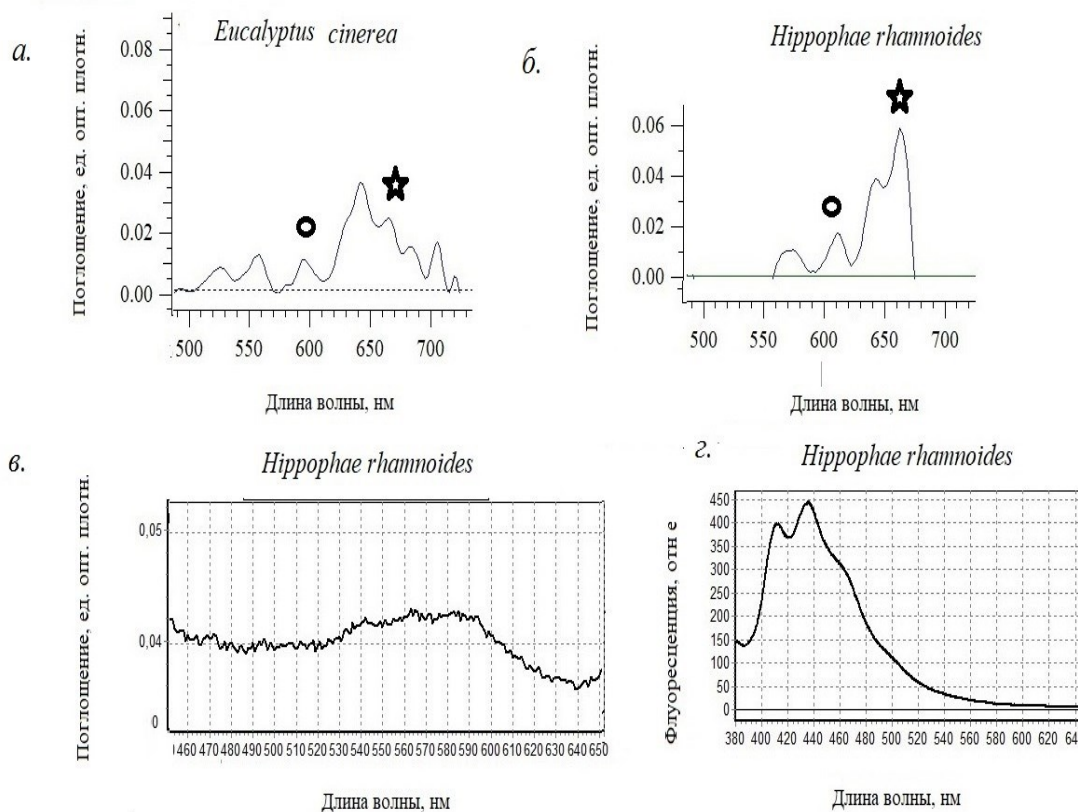


Рис. 2 Спектры поглощения поверхности листьев эвкалипта пепельного (а) и облепихи крушиновидной (б), в и г – спектры поглощения и флуоресценции этанольного экстракта после 10-минутной экспозиции листьев. Кружки – максимумы, свойственные азуленам 580-615 нм, звездочки – максимум 660 нм

У развитых листьев исследованных видов в диапазоне 500-700 н.м видны максимумы поглощения в области 550-560 н.м, 580-610 н.м (область азуленов), 625 и 660-666 н.м (характерны для хлорофилла) (рис. 3).

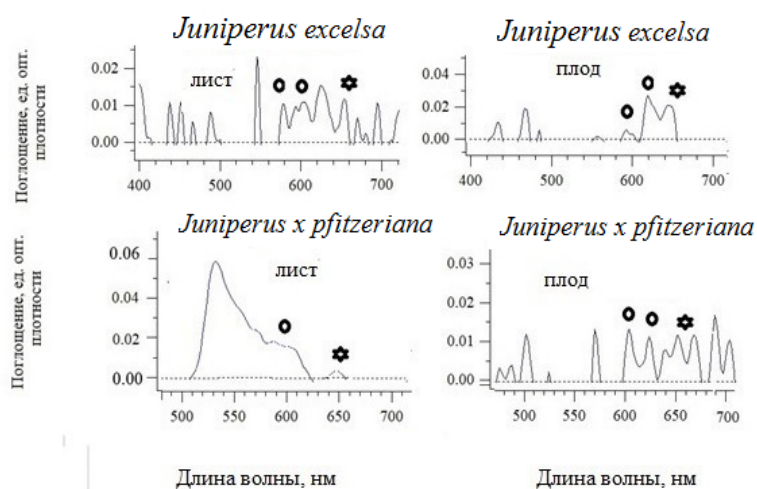


Рис. 3 Спектры поглощения поверхности листьев и шишкочког можжевельников высокого и м. Пфизера 'Блю Клауд'.

Кружки – максимумы, свойственные азуленам 580-615 нм, звездочки – максимум 660 нм

Показано присутствие азуленов в 10-минутных спиртовых или ацетоновых экстрактах листовой поверхности у эвкалипта и облепихи. Микросканирование поверхности позволило увидеть азуленсодержащие соединения на поверхностях (см. рис. 3).

Содержание азуленов в 10-минутных этаноловых экстрактах представлено в таблице 1.

Таблица 1

Содержание азуленов на поверхности листьев и шишкочагод, полученное 10-минутным спиртовым экстрагированием.

Название растения	Сырьё	Азулены, мг/г сырой массы
<i>Eucalyptus cinerea</i>	листья	12,5 ± 0,02
<i>Hippophae rhamnoides</i>	листья	1,0 ± 0,1
<i>Juniperus excelsa</i>	листья/шишкочагоды	1,76/1,46 ± 0,3/0,2
<i>Juniperus × pfitzeriana</i> 'Blue Cloud'	листья/шишкочагоды	0,55/2,96/ ± 0,01/0,3

Выводы

Было выяснено, что у эвкалипта пепельного поверхность содержит наибольшее количество азуленов из этих четырех видов. Сравнение листьев и шишкочагод у можжевельников показало, что у можжевельника высокого наибольшая концентрация в листьях, несколько меньшая – в шишкочагодах, тогда как у можжевельника Пфизера 'Блю Клауд' в шишкочагодах значительно больше азуленов, чем на поверхности листьев. В листьях облепихи больше азуленов, чем в листьях можжевельника Пфизера 'Блю Клауд'.

Все исследованные древесные культуры могут быть источниками азуленов, но промышленное производство азуленов удобнее осуществлять путем экстракции с поверхности шишкочагод, не повреждая растения. Спектральные методы предварительного тестирования присутствия азуленов могут быть рекомендованы в лабораторной практике и не требуют большого количества фармацевтического материала для анализа.

Список литературы

1. Золотарев В.М. Применение дифференцирования в спектроскопии отражения // Оптика и спектроскопия. – 2012. – № 112 (1). – С. 150-154.
2. Матюхин Д.Л., Манина О.С., Королева Н.С. Виды и формы хвойных, культивируемые в России. Часть 1. *Juniperus* L., *Cephalotaxus* Sieb. Et Zucc, *Taxus* L., *Toreya* Arn. – Москва: Товарищество научных изданий КМК. – 2009. – 259 с.
3. Рощина В.В., Кучин А.В., Куньев А., Солтани Г.А., Хайбулаева Л.М., Призова Н.К. Присутствие азуленов на поверхности растительных клеток как тест на чувствительность к озону // Биологические мембраны. – 2022. – № 39 (1). – С. 54-62.
4. Bakun P., Czarzynska-Goslinska B., Goslinski T., Lijewski S. In vitro and in vivo biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine // Medicinal Chemistry Research. – 2021. – Vol. 30. – P. 834-84. – [Elektronnyy resurs] – URL: <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02701-0>.
5. Binsch G., Heilbronner E., Jankow R., Schmidt D. On the fluorescence anomaly of azulene // Chem. Phys. Lett. – 1967. – Vol. 1. – P. 135-138.
6. Donaldson L. Autofluorescence in Plants Molecules. – 2020. – Vol. 25 (10). – p. 2393. – [Elektronnyy resurs] – URL: <https://doi.org/10.3390/molecules25102393>

Статья поступила в редакцию 15.04.2023 г.

Roschina V.V., Soltani G.A., Fateryga V.V., Prizova N.K., Khaibulaeva L.M. Spectral studies of the cell surface to detect azulenes in plants // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2023. – № 147. – P. 90-95

Possible application of spectral research methods for the determination of azulenes on the surface of plant cells promising as pharmacological raw materials has been considered. Leaf surfaces with blue or silver color in *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex Benth., *Hippophae rhamnoides* L., needles and cypress cones (berry-cones) *Juniperus excelsa* M. Bieb. and *Juniperus* × *pfitzeriana* (Späth) P.A. Schmidt 'Blue Cloud' were investigated. The peaks of 580-620 nm and 660-666 nm characteristic of azulenes and chlorophyll, respectively, have been recorded in the absorption spectra of leaves and cypress cones using a microspectrofluorimeter/ microspectrophotometer. 10 minute extracts from the surface of intact cells with 100% acetone or 95% ethanol have been analyzed to confirm the presence of azulenes in the samples. The content of azulenes in such extracts was in mg/g of wet weight in the leaves of *Eucalyptus cinerea* 12.5 ± 0.02 and *Hippophae rhamnoides* – 1.0 ± 0.1 , and in the needles/cypress cones of juniper *Juniperus excelsa* – $1.76/1.46 \pm 0.3/0.2$ and *Juniperus* × *pfitzeriana* 'Blue Cloud' $0.55/2.96/ \pm 0.01/0.3$, accordingly. All the studied woody plants can be sources of azulenes.

Key words: cell wall; cuticle; absorption; secretory cells; fluorescence