

© Коллектив авторов, 2004

В. П. Пчелкин, М. А. Шаталова, В. Д. Цыдендамбаев, А. М. Носов,
А. Г. Верещагин

ВИДОВОЙ СОСТАВ ЛЕЦИТИНОВ КЛЕТОК КОРНЯ ЖЕНЬШЕНЯ В КУЛЬТУРЕ

Институт физиологии растений РАН, Москва

Как известно, главными компонентами мембран живой клетки являются различные классы липидов, каждый из которых представляет собой набор нескольких индивидуальных видов, отличающихся друг от друга разными сочетаниями жирнокислотных остатков в его молекулах; свойства этих мембран определяются не только составом индивидуальных кислот, но и соотношением между такими видами [1]. Видовой состав глицерофосфолипидов растений сейчас лучше всего изучен в случае запасующих органов *in vivo*, где содержание данной группы липидов обычно на порядок выше, чем в оводненных тканях; исследования видового состава таких липидов в соматических растительных клетках пока еще крайне немногочисленны [2]. В значительно большей мере это можно отнести ко всем объектам, культивируемым сейчас *in vitro*, ибо до сих пор имеется явно недостаточно сведений о количественном видовом составе ацилсодержащих глицерофосфолипидов наиболее широко известных лекарственных растений, имеющих большое значение в повседневной терапевтической практике. Такое положение полностью характерно и для главного класса данных липидов — лецитина (фосфатидилхолина). В данной работе установлен видовой состав его препарата, выделенного в результате количественной экстракции стандартного образца двухнедельной суспензионной культуры женьшеня *Panax ginseng* Meу (сем. *Araliaceae*) корневого происхождения.

Экспериментальная часть

Объектом исследования служила суспензионная культура клеток женьшеня *Panax ginseng* С. А. Меу., штамм ИФР-Ж1, хранящийся во Всероссийской коллекции клеточных культур высших растений под номером 3 [3]. Культуру клеток выращивали в колбах объемом 0,5 л в стандартных условиях [3]. Точную навеску (~12 г) сырой биомассы двухнедельного возраста фиксировали в 100 мл кипящего изопропанола; сумму липидов корневых клеток женьшеня выделяли из полученной биомассы с выходом 98,6 % путем ступенчатой экстракции [4]. Для дальнейших расчетов определяли процент влажности сырой биомассы культуры клеток. Обычно используемая навеска (12 г сырой массы) соответствовала 0,7 г сухого вещества клеточной биомассы, содержащей около 79 мг этерифицированных жирных кислот.

Фосфатидилхолины (9,9 мг) аликвоты экстракта очищали от других липидов с помощью препаративной тонкослойной хроматографии и подвергали ферментативному гидролизу с фосфолипазой *C ex Clostridium perfringens* в 0,1 М растворе Трис-буфера с pH 7,3 [5, 6]. Образовавшиеся в результате реакции с выходом 97,9 % 7,5 мг смеси 1,2-диацил-*sn*-глицеринов экстрагировали очищенным хлороформом и подвергали фракционированию посредством адсорбционной тонкослойной хроматографии на силикагеле, пропитанном нитратом серебра [7].

Для расчета абсолютного количества этерифицированных жирных кислот в аликвоте фосфатидилхолинов и в отдельных фракциях 1,2-диацил-*sn*-глицеринов, которые содержали от 0,5 до 3 мг этерифицированных жирных кислот, к пробам добавляли по 50 мкг маргариновой кислоты, отсутствовавшей в нативных липидах женьшеня и потому использованной в качестве подходящего внутреннего стандарта [8]. Смеси подвергали метанолизу; из продуктов этерификации выделяли композиции метиловых эфиров жирных кислот, которые разделяли на индивидуальные компоненты методом газожидкостной хроматографии в стандартных условиях [7, 8]. Идентификацию метиловых эфиров индивидуальных жирных кислот проводили по времени их относительного удерживания [8].

Жирнокислотный состав рассчитывали методом внутреннего нормирования (по S пиков) с помощью пакета программного обеспечения Nelson 3000 ("Nelson Analytical", США) на компьютере IBM XT (Великобритания). Для проведения на основе полученных данных автоматизированного расчета абсолютного содержания и статистического видового состава липидов были использованы программы TurboBasic, а также Fortran 77, version 3.31 и 8086 Object Linker, version 3.04, 1985 ("Microsoft", США).

Результаты и их обсуждение

Данные жирнокислотного состава исходных фосфатидилхолинов культуры клеток женьшеня и полученных из них 1,2-диацил-*sn*-глицеринов приведены в табл. 1. Можно видеть, что главными жирными кислотами фосфатидилхолинов были линолевая (*цис*, *цис*-октадека-9,12-диеновая, 18:2), пальмитиновая (гексадекановая, 16:0) и олеиновая (*цис*-9-октадецен-овая, 18:1); кроме того, эти фосфатидилхолины включа-

ли в заметном количестве стеариновую (октадекановую, 18:0) и линоленовую (*цис,цис,цис*-октадека-9,12,15-триеновую, 18:3) кислоты. Препарат свободных 1,2-диацил-*sn*-глицеринов, полученных в результате мягкого ферментативного гидролиза фосфатидилхолинов, почти не отличался от последних по общему составу жирных кислот. Таким образом, косвенно подтверждена близость обоих липидных классов между собой по качественному видовому составу.

Общее содержание фосфатидилхолинов в культуре клеток женьшеня, рассчитанное нами по суммарному количеству свободных 1,2-диацил-*sn*-глицеринов, которые образовались в результате ферментативного гидролиза, составляло 24,9 мкМ на г сухой массы. Концентрация фосфатидилхолинов в этой культуре (1,07 мг/г сырой ткани) была выше обычно наблюдаемой для большинства растительных тканей с той же степенью оводненности [2]. Так, их содержание в культурах клеток моркови и табака не превышало 0,15 и 0,49 мг/г сырой ткани соответственно [12, 13]. Тем не менее, эта концентрация лишь немного ниже найденной в культуре клеток раувольфии [13]. Кроме того, содержание главных индивидуальных видов фосфатидилхолинов в культуре клеток женьшеня весьма близко к найденному ранее в плодах земляного ореха [9]. Следовательно, по данному показателю исследуемая культура не слишком резко отличается от других представителей растительного мира. Результаты определения видового состава изучаемого класса липидов даны в табл. 2.

Видно, что всего обнаружено девять индивидуальных видов, для которых был установлен только состав жирных кислот, а не позиционное положение остатков последних в молекулах таких видов; это число значи-

Таблица 1
Жирнокислотный состав фосфатидилхолинов культуры клеток корня женьшеня двухнедельного возраста и продуктов их гидролиза (диацилглицеринов)

Класс липидов	Этерифицированные жирные кислоты в составе липидов, мол.%				
	пальмитиновая	стеариновая	олеиновая	линолевая	линоленовая
Фосфатидилхолины	30,4	1,8	8,1	58,4	1,2
1,2-Диацил- <i>sn</i> -глицерины	32,3	1,6	7,1	58,1	0,9

тельно ниже того вероятного их количества, которое можно было бы ожидать согласно теории статистического распределения остатков жирных кислот между молекулами фосфатидилхолинов. Все эти девять индивидуальных видов весьма характерны для запасующих органов таких широко распространенных культурных растений, как подсолнечник, хлопчатник и рис. Вместе с тем лишь пять из данных видов всегда свойственны фосфатидилхолинам оводненных тканей вегетативных органов некоторых других культурных растений (картофель, соя и горох [2]).

По качественному видовому составу фосфатидилхолины культуры клеток женьшеня в целом весьма близки к тому же классу липидов и имеют аналогичный набор жирных кислот, который был ранее выделен из запасующих органов иных растительных объектов [6, 10, 11]. Кроме того, этот состав в случае фосфатидилхолинов женьшеня лишь незначительно отличается от того, который весьма характерен для других оводненных тканей иных объектов растительного происхождения [2]. Попутно следует отметить,

Видовой состав фосфатидилхолинов некоторых растений, в % от суммы всех видов*

Виды фосфатидилхолинов	Культура клеток				Семена			Клубень картофеля [2]	Проростки сои [2]	Листья гороха [2]
	женьшеня	моркови [12]	табака [13]	раувольфии [13]	подсолнечника [11]	хлопчатника [6]	риса [10]			
16:0\16:0	2,4	—	—	—	0,4	3,1	—	—	0,4	—
	9,4	5,2	14,1	14,2	1,1	5,5	3,8	7,0	4,0	7,9
18:0\16:0	0,2	—	—	—	0,4	0,4	—	—	—	—
	1,1	—	3,0	4,0	1,1	0,7	—	—	1,3	1,0
16:0\18:1	6,4	2,2	11,5	—	3,7	14,8	18,5	—	3,2	—
	4,9	3,2	6,6	1,6	3,2	10,9	16,8	—	3,0	1,7
18:0\18:1	—	—	—	следы	1,8	1,2	—	—	0,4	1,5
	0,3	—	0,7	0,2	1,6	0,7	—	—	0,5	0,1
18:1\18:1	0,5	—	—	2,1	2,3	5,6	19,6	—	0,4	—
	0,6	0,6	0,8	следы	2,4	5,5	18,7	—	0,6	0,1
16:0\18:2	50,9	43,3	48,0	73,7	15,6	23,3	20,3	35,5	26,8	28,0
	35,3	27,9	26,2	40,6	14,1	22,1	14,5	32,1	25,0	27,0
18:0\18:2	2,9	—	—	9,9	7,6	1,4	—	6,9	5,4	1,3
	3,0	—	2,8	5,7	6,8	1,5	—	4,7	3,9	1,7
18:1\18:2	6,8	11,8	3,0	—	20,3	17,6	28,9	—	9,2	3,2
	9,5	8,6	6,2	2,3	20,9	22,1	32,3	—	9,2	2,9
18:2\18:2	27,8	25,1	8,2	12,1	44,6	23,7	12,7	31,8	35,1	21,2
	34,1	37,8	12,2	29,1	45,6	22,1	13,9	37,5	32,0	23,0
16:0\18:3	2,1	—	8,1	0,6	—	—	—	10,1	5,9	16,0
	0,7	—	1,2	0,1	—	—	—	3,0	1,3	5,7

* Верхняя цифра — состав, найденный экспериментально; нижняя цифра — состав, вычисленный нами из данных жирнокислотного состава согласно теории статистического распределения остатков жирных кислот между молекулами глицерофосфохолинов [7].

что в таком объекте, как зерно риса, обнаружено пять индивидуальных видов фосфатидилхолинов [10], а в ткани картофеля — только шесть их видов [2].

Главные виды фосфатидилхолинов женьшеня — пальмитоиллинолеоил- и дилинолеоилфосфатидилхолины, содержание которых в совокупности составляет около 80 мол.% от суммы всех видов, весьма характерны для культур клеток моркови, табака и раувольфии [12, 13]. Найденные нами концентрации этих индивидуальных видов в смеси фосфатидилхолинов женьшеня резко отличались от ожидаемых согласно теории статистического распределения ацильных остатков между их отдельными молекулами (см. табл. 2). Для пальмитоил-линолеоилфосфатидилхолина женьшеня диапазон различий между его экспериментальными и статистическими концентрациями был более 15 мол.%. Тем не менее, при статистическом составе сумма долей пальмитоиллинолеоил- и дилинолеоилфосфатидилхолинов культуры клеток женьшеня была тоже ниже 80 мол.% и близка к найденной экспериментально. В тех же видах фосфатидилхолинов культуры клеток моркови, табака и раувольфии различия между их экспериментально найденными и статистическими концентрациями доходили до 33 %. Наконец, для насыщенных видов фосфатидилхолинов всех оводненных тканей характерно весьма значительное расхождение между статистическими и наблюдаемыми концентрациями.

Из табл. 2 также следует, что для большинства других возможных индивидуальных видов фосфатидилхолинов запасяющих органов иных растений абсолютные отклонения найденных величин относительного содержания этих видов в их смеси от вычисленных согласно теории статистического распределения минимальны и находятся на уровне 1–3 %. Для фосфатидилхолинов других оводненных объектов *in vivo* близ-

кого общего жирнокислотного состава (картофель, соя, горох) диапазон расхождений между экспериментально найденными и вычисленными величинами содержания данных видов, как правило, тоже составляет несколько процентов; во всех упомянутых выше примерах он никогда не превышает 12 %.

По-видимому, обнаруженная близость качественного видового состава структурных ацилсодержащих глицерофосфолипидов является общим свойством данных липидов, а не только тех их представителей, которые весьма характерны для дальневосточного региона.

ЛИТЕРАТУРА

1. C. Demandre, A. Trémolières, A. M. Justin, et al., *Phytochem.*, **24**(3), 481–486 (1985).
2. A. M. Justin, C. Demandre, and P. Mazliak, *Biochim. Biophys. Acta*, **922**(3), 364–371 (1987).
3. Н. В. Шамков, Г. В. Зайцева, И. М. Белоусова и др., *Биотехнология*, № 3, 32–34 (1991).
4. A. V. Zhukov, A. G. Vereshchagin, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**(1), 1–7 (1976).
5. Г. Ф. Шеманова, Т. М. Постникова, В. В. Чупов и др., *Прикл. биохим. и микробиол.*, **24**(3), 305–318 (1988).
6. А. Ш. Исамухамедов, Л. А. Шустанова, С. Т. Акрамов, *Химия природ. соедин.*, № 3, 324–328 (1977).
7. В. П. Пчелкин, *Журн. аналит. химии*, **48**(9), 1442–1449 (1993).
8. В. П. Пчелкин, *Хим.-фарм. журн.*, **33**(8), 32–33 (1999).
9. J. A. Singleton, L. F. Stickereather, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **72**(4), 485–488 (1995).
10. Y. Fujino, *Cereal Chem.*, **55**(5), 559–571 (1978).
11. Л. А. Шустанова, А. Т. Умаров, А. Л. Маркман, *Химия природ. соедин.*, № 2, 137–147 (1971).
12. H. D. Gregor, *Chem. Phys. Lipids*, **20**, 77–83 (1977).
13. Y. Yamada, Y. Hara, M. Senda, et al., *Phytochem.*, **18**, 423–430 (1979).

Поступила 04.02.03.