

УДК 581.143.6+581.192+581.1+81.6

КОМПОНЕНТНЫЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК *JUSSA GLORIOSA* (AGAVACEAE)

© М.А. Стрелкова, Н.В. Кириллова*, Л.И. Слепян

Санкт-Петербургская химико-фармацевтическая академия,
ул. проф. Попова, 14, Санкт-Петербург, 197376 (Россия),
e-mail: margarita.strelkova@pharminnotech.com

Проведен комплексный фитохимический и биохимический анализ биомассы культивируемых клеток Юкки славной (*Jussia gloriosa* L. Agavaceae). Проведена оценка таких показателей как влажность, зола, содержание веществ, экстрагируемых водой и спиртом. Представлена качественная и количественная характеристика стероидных гликозидов (фураностанозидов) и общих липидов. Определен уровень некоторых антиоксидантных (супероксиддисмутаза, пероксидаза) и протеолитических ферментов (кислые, щелочные протеиназы). Изучено влияние водных экстрактов из сухой биомассы культивируемых клеток Юкки славной на начальные ростовые процессы семян гороха (*Pisum sativum* L.). Гиполипидемические свойства биологически активных веществ из биомассы клеток Юкки славной были продемонстрированы на модели эритроцита в опытах *in vitro*.

Ключевые слова: культура ткани, *Jussia gloriosa* L., компонентный состав, биологическая активность

Введение

В настоящее время в современной биотехнологии успешно разрабатываются инновационные технологии культивирования штаммов лекарственных растительных клеток и проводятся исследования по разработке перспективных лекарственных препаратов и БАД для нужд медицинской практики. Культуры клеток высших растений могут служить источником ценных вторичных метаболитов: алкалоидов, фенольных соединений, изопреноидов, в том числе и стероидных гликозидов [1]. Эти соединения привлекли внимание исследователей прежде всего тем, что они обладают высокой биологической и фармакологической активностью: иммуномодулирующей, анаболической, антиоксидантной, фунгицидной, антивирусной, антибактериальной, противоопухолевой, противогрибковой и другими видами активности [2, 3]. В связи с этим является целесообразным проведение комплексных исследований по фитохимическому и биохимическому анализу основных продуктов первичного и вторичного метаболизма в культивируемых растительных клетках, так как многочисленными исследованиями последних лет показано, что в условиях *in vitro* культивируемые штаммы лекарственных растений способны синтезировать ценные биологически активные вещества подобно интактным растениям [3–5].

Стрелкова Маргарита Андреевна – научный сотрудник кафедры биологической химии, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, тел.: (812) 234-90-33,

e-mail: margarita.strelkova@pharminnotech.com

Кириллова Надежда Васильевна – заведующая кафедрой биологической химии, доктор биологических наук, профессор, тел.: (812) 234-90-33,

e-mail: nadezhda.kirillova@pharminnotech.com

Слепян Лариса Ивановна – старший научный сотрудник кафедры технологии фитопрепаратов, лаборатория культуры тканей, кандидат биологических наук, . тел.: (812) 234-90-34,

e-mail: larisa.slepyan@pharminnotech.com

Целью нашей работы является проведение стандартного фитохимического анализа воздушно-сухой биомассы культивируемых клеток Юкки славной, качественная и количественная характеристика фураностаноловых гликозидов, общих липидов и некоторых биохимических показателей клеточной биомассы, в частности содержания белка и уровня ферментов с выраженной антиоксидантной и протеолитической активностью. Наряду с этим, в задачи нашего исследования входила оценка биологической

* Автор, с которым следует вести переписку.

активности различных биополимеров из культивируемых клеток Юкки по их влиянию на рост проростков сельско-хозяйственного растения и на адсорбционные и гемолитические характеристики в опытах *in vitro* на модели эритроцита.

Экспериментальная часть

Объектом исследования выбрана культура ткани и клеток Юкка славная (*Jucca gloriosa* L. семейство Agavaceae), полученная в Институте биохимии растений АН Грузии и культивируемая в течение длительного времени в СПХФА. Ткань выращивали на твердой агаризованной среде Мурасиге и Скуга [6] с некоторыми модификациями [7]. Культуру пассировали каждые 30 сут. и выращивали в темноте при температуре 26 °С с относительной влажностью 70%. Сухую массу клеток получали после высушивания биомассы в стеклянных бюксах до постоянного веса в термостате при 60 °С. Исследование фитохимического состава воздушно-сухой биомассы культивируемых клеток проводили в стационарной фазе роста (30-е сут. культивирования). Количество экстрактивных веществ и оценку таких параметров, как влажность, общая зола, проводили по [8]. Суммарный белок определяли по методу О. Lowry [9]. Активность каталазы оценивали перманганатометрическим методом [10], активность супероксиддисмутазы (СОД) – дианизидиновым методом [11], и пероксидазы – спектрофотометрическим методом с использованием о-фенилендиамина в качестве субстрата [12]. Активность протеиназ и эстераз проводили с использованием синтетических субстратов: активность кислой фосфатазы оценивали по ее способности гидролизовать *n*-нитрофенилфосфат, для кислой протеиназы – BOC-GLYCINE-pNA и для щелочной – SUC-ALA-ALA-PRO-PHE – pNA [13]. Для анализа олигофуростанозидов в биомассе культивируемых клеток использовали цветную реакцию с реактивом Эрлиха [14]. Для качественного анализа стероидных гликозидов в культуре клеток Юкки использованы спектрофотометрические и хроматографические методы анализа [15]. Количественную оценку общих липидов оценивали гравиметрическим методом [8]. Фракционирование липидов проводили методом дифференциальной обработки сухой биомассы различными органическими растворителями полярной и неполярной природы, содержание фосфолипидов определяли по методу [16].

Для изучения влияния биологически активных веществ из культивируемых клеток Юкки на ростовые показатели в качестве объекта исследования использовали семена гороха (*Pisum sativum* L.). Семена растений перед прорастанием предварительно обрабатывали водным экстрактом (1 : 50) из воздушно-сухой биомассы культивируемых клеток Юкки, выдерживали в растворе 4 ч, после чего контрольные (преинкубированные в воде) и опытные образцы помещали в чашки Петри на влажный фильтр. Всхожесть семян и величину проростков контролировали в течение 5 сут.

Наряду с этим, проводили изучение сорбционных и гемолитических свойств различных эффекторов из каллуса культивируемых клеток Юкки.

В качестве эффекторов использованы водные и спиртовые экстракты из воздушно-сухой биомассы культивируемых клеток из расчета 2 мг на 1 мл экстрагента, а также водные изотонические растворы гликозидов и фосфолипидов с содержанием действующих веществ 0,5–1,0 мг в анализируемом образце. Гиполипидемическую активность в опытах *in vitro* изучали с использованием модели экспериментальной гиперлипидемии на крысах. Для индуцирования гиперлипидемии вводили детергент (третон WR-1339) из расчета 50 мг на крысу веса 200 г. Через 16 ч после введения индуктора наблюдали 4-кратное увеличение холестерина в крови животных. Для оценки адсорбционной и гемолитической активности отбирали по 0,5 мл гепаризированной крови крыс с экспериментальной гиперлипидемией. Смешивали с различными сорбентами из биомассы каллуса Юкки славной, инкубировали 30 мин при комнатной температуре при осторожном взбалтывании, после чего кровь центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, отделяли плазму и определяли в ней содержание холестерина и гемоглобина. Определение содержания холестерина проводили со стандартным набором «Chol 150» в образцах плазмы крови с добавлением (E) и без сорбентов (E₀). Количественно величину сорбции холестерина рассчитывали по формуле $(100 - E/E_0)$, где отношение E/E₀ в процентах характеризовало сорбцию холестерина в присутствии эффектора по отношению к его исходному содержанию в плазме крови. Определение гемоглобина в образцах крови проводили по методу [17]. За единицу гемолиза принимали содержание гемоглобина в плазме крови без сорбции. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Для анализа фитохимических характеристик биомассы культивируемых клеток Юкки славной исследовали образцы воздушно-сухой биомассы, а также ее водные и спиртовые экстракты. В качестве экстрагентов использовали воду, этиловый спирт 40, 70 и 96% в соотношении 1 : 50, m/v). Экспериментальные данные представлены в таблице 1.

Количество экстрактивных веществ в биомассе Юкки в различных условиях экстрагирования практически оставалось на одном уровне и составляло 49,9–44%. Содержание влажности в воздушно-сухой биомассе составило 12%. Наряду с этими показателями, проведено исследование водных и спиртовых экстрактов сухой биомассы каллусной культуры на наличие в ней гликозидов фураностанолового ряда – основного действующего вещества Юкки. Исследование выхода фураностаноловых гликозидов в водных и спиртовых экстрактах показало, что наилучшими экстрагентами являются вода и этиловый спирт 40% – содержание суммы гликозидов составило 0,2 и 0,17% соответственно к сухой биомассе, а при использовании в качестве экстрагентов этилового спирта 70% и этилового спирта 96% эти показатели снижались до 0,075 и 0,031% соответственно.

Методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в экстракте воздушно-сухой биомассы клеток Юкки обнаружили 4 фураностаноловых гликозида, дающих красную окраску с реактивом Эрлиха: $R_f=0,17$; $R_f=0,21$; $R_f=0,29$; $R_f=0,46$. После полного кислотного гидролиза экстракта проводили идентификацию стероидных генинов. Выявлено 5 отчетливых зон, дающих характерную окраску с 1% раствором ванилина и соответствующих следующим генинам: хлорогенин, гитогенин, гекогенин, тигогенин и смиллагенин. Количественное содержание фураностанолоидов в воздушно-сухой биомассе Юкки составляло 0,2% (экстрагент вода).

Одним из основных продуктов биосинтеза растений являются липиды, которые в зависимости от состава обладают различной биологической активностью. Количество фосфолипидов рассчитывали исходя из содержания общего фосфора в исследуемой навеске. Разница между содержанием общих липидов и фосфолипидов составляла содержание нейтральных липидов (табл. 2).

В системе антиоксидантной защиты клеток немаловажная роль принадлежит фосфолипидам, содержание которых в воздушно-сухой биомассе Юкки составило 2,7%.

Многие культивируемые клетки являются продуцентами важных биологически активных веществ белковой природы, в частности антиоксидантных и протеолитических ферментов. Известно, что интенсивность свободнорадикальных процессов в клетке находится под контролем ферментных систем. Ключевым ферментом антирадикальной защиты является СОД – эффективный акцептор супероксидных анион-радикалов, которая превращает их в менее реакционно-способные молекулы перекиси водорода и молекулярного кислорода. Последующее разрушение перекиси водорода осуществляется каталазой и пероксидазами различной специфичности. В связи с этим нами проводилась оценка антиоксидантной ферментативной активности в воздушно-сухой биомассе Юкки. Экспериментальные данные представлены в таблице 3.

Как видно из экспериментальных данных, в сухом сырье отмечен высокий уровень основных ферментов антирадикальной защиты СОД и пероксидазы, при этом максимальная ферментативная активность показана при экстракции водой и этиловым спиртом 40%.

Использование в качестве экстрагента этилового спирта 70 и 96% приводило к значительной потере ферментативной активности, в большей степени это выражено для пероксидазы, активность которой падала на 90%.

Таблица 1. Анализ образцов воздушно-сухой биомассы Юкки славной, %

Показатели	Экстрагент			
	Вода	Этанол, 40%	Этанол, 70%	Этанол, 96%
Экстрактивные вещества, %	49,3±2,0	46,7±3,0	44,5±2,5	44,1±2,0
Гликозиды, %	0,2±0,02	0,17±0,015	0,075±0,002	0,031±0,001
	Воздушно-сухая биомасса			
Влажность, %	12,0±1,5			
Общая зола, %	12,2±1,0			

Интересно отметить тот факт, что в процессе тепловой сушки культивируемых клеток происходит полная инактивация одного из важнейших ферментов мультиферментного антиоксидантного комплекса – каталазы, активность которой в нативной сырой биомассе находилась на очень высоком уровне.

Таблица 2. Содержание липидов в культивируемых клетках Юкки

Показатели	% к воздушно-сухой биомассе
Общие липиды	8,0 ±0,3
Нейтральные липиды	4,8 ±0,2
Фосфолипиды	2,7 ±0,15

Таблица 3. Биохимические характеристики биомассы культуры Юкки славной

Индексы	Экстракт (1 : 50)			
	Вода	Этанол, 40%	Этанол, 70%	Этанол, 96%
СОД, Ед/г воздушно-сухой биомассы	6000,0±800,0	5610,0±600,0	3900,0±400,0	1290,0±300,0
Пероксидаза Ед/г воздушно-сухой биомассы	187500,0±5000,0	192430,0±3500,0	12130,0±600,0	1290,0±300,0
Кислая фосфатаза, Ед/г воздушно-сухой биомассы	2500,0±200,0	500,0±50,0	–	–
Щелочная протеиназа, Ед/г воздушно-сухой биомассы	15,0±2,0	1,25±0,2	–	–
Кислая протеиназа, Ед/г воздушно-сухой биомассы	6,25±0,5	2,5±0,4	7,5±0,4	3,0±0,3
Белок, мг/г воздушно-сухой биомассы	102,5±5,0	55,5±8,0	43,7±6,0	9,5±1,0

Известно, что протеолиз является одним из ключевых звеньев регуляции клеточного метаболизма. Биосинтетическая способность клеток, как правило, коррелирует с уровнем и спектром протеолитических ферментов, играющих ведущую роль в поддержании уровня внутриклеточного белка и переходе культуры из одной фазы развития в другую. Тепловая обработка сырой биомассы (сушка) приводила к снижению количественных показателей активности и для протеолитических ферментов. При обработке сухой биомассы 70% и 96% спиртом этиловым не выявлялась активность кислой фосфатазы и щелочной протеиназы. Активность этих ферментов в большей степени проявляется в водных экстрактах биомассы и составляла 2500 и 15 Ед в пересчете на 1 г сухой биомассы. Активность кислой протеиназы сохранялась на низком уровне при экстракции как водой, так и спиртовыми растворами. Содержание белка в анализируемых экстрактах было традиционным: максимальные значения в водных, минимальные – в спиртовых экстрактах (табл. 3).

Биологическую активность различных экстрактов из биомассы Юкки испытывали на растительных и животных организмах. Для изучения влияния водного экстракта (1 : 50) из биомассы Юкки (эффектора) на ростовые характеристики использовали семена гороха (табл. 4). Как видно из представленных данных, предварительное замачивание семян (4 ч) в присутствии эфффектора приводило к заметной стимуляции всхожести и прорастания семян. Применение препарата ускоряло всхожесть семян на 2–3 дня, а величина проростков у обработанных семян возрастала на 170% по сравнению с контрольными (на 5-е сут. роста). В данном исследовании установлено, что время инкубации опытных проб с эфффектором существенно влияет на степень стимуляции ростовых показателей семян гороха. Так, при увеличении времени обработки семян эфффектором до 24 ч, на 5-е сут. роста величина проростков в опытных образцах была выше контрольных на 30%.

Среди биорегуляторов стероидной природы выявлены соединения, обладающие выраженным гипохолестеролемическим эфффектом, что позволяет их использовать в качестве антисклеротических средств [2]. В связи с этим проводили изучение сорбционных и гемолитических свойств различных сорбентов из биомассы каллусной культуры Юкки (табл. 5).

Как видно из представленных данных, наибольшая эфффективность по связыванию холестерина показана для гликозидных и фосфолипидных сорбентов, содержание холестерина в крови (в опытах *in vitro*) снижалось практически на 50%.

Эфффективность сорбции в случае использования гликозидов зависела от их концентрации, причем увеличение концентрации гликозидов в инкубационной среде приводило к снижению эфффективности сорбции холестерина. Наибольшую степень связывания холестерина отмечали при внесении в среду 0,5 мг гликозидов на 0,5 мл гепаризированной крови. Высокая связывающая активность по отношению к холестерину показана и для фосфолипидных препаратов из биомассы Юкки, которые связывали в исходной пробе 59% холестерина.

Таблица 4. Ростовые характеристики семян гороха до и после обработки водным экстрактом из биомассы Юкки славной

Образцы	Всхожесть, %		Величина проростков, см	
	2-е сутки	5-е сутки	2-е сутки	5-е сутки
Контроль	20,0	80,0	0,2±0,05	1,4±0,3
Опыт	100,0	100,0	0,8±0,05*	3,8±0,5*

Примечание. * - P < 0,05 в сравнении с контролем.

Таблица 5. Сорбционные и гемолитические свойства различных эффекторов из биомассы культивируемых клеток Юкки

Тип эффектора	Содержание, мг	Холестерин ммоль/мл	Сорбция холестерина, %	Гемоглобин усл. ед	Гемолиз, Ед.
Контроль (без эффектора)	–	8,6±0,05	–	2,3±0,05	1,0
Воздушно-сухая биомасса	1,0	7,0±0,06	18,7	2,85±0,08	1,23
Водный экстракт биомассы*	1,0	8,2±0,07	4,7	2,82±0,05	1,22
Спиртовый экстракт биомассы*	1,0	8,5±0,05	1,2	2,85±0,05	1,23
Гликозиды	0,5	4,1±0,05	52,4	1,03±0,03	0,44
	1,0	5,45±0,04	36,7	1,36±0,05	0,59
Фосфолипиды	1,0	3,5±0,06	59,3	0,58±0,03	0,25

Примечание:* – водные и спиртовые экстракты биомассы лиофильно высушивались.

Содержание гемоглобина в среде инкубации несколько превышало контрольные значения при использовании в качестве эффекторов образцов воздушно-сухой биомассы, а также водных и спиртовых (40%) экстрактов, что мы связываем с их повышенной гемолитической активностью. Остальные сорбенты снижали гемолиз эритроцитов в пробах по сравнению с контрольными: для гликозидов гемолитическая активность была ниже контрольных значений на 40–60%, а для фосфолипидов этот показатель был снижен до 75%.

Данный эффект может быть связан с наличием в эффекторе липидного компонента, который мог оказывать стабилизирующее действие на мембранные структуры за счет формирования соответствующего микроокружения мембранных белков и ферментов, при этом регулируются их микровязкость и проницаемость.

Выводы

В ходе выполненных исследований проведены фитохимический и биохимический анализ биомассы культивируемых клеток Юкки славной. Определено содержание общей золы и экстрактивных веществ при использовании экстрагентов различной полярности с последующим анализом соответствующих экстрактов. Проведены качественный и количественный анализы стероидных гликозидов фураностанолового ряда с идентификацией агликонов. Представлена общая характеристика липидов биомассы Юкки. Дана количественная оценка основных ферментов антиоксидантной системы (СОД, пероксидазы) и протеолитических ферментов с различной специфичностью (кислые и щелочные протеиназы). Наличие в биомассе ферментов с высокой антиоксидантной и протеолитической активностью расширяет спектр ее фармакологического действия. Экспериментальные данные по оценке биологической активности эффекторов из биомассы культивируемых клеток Юкки создают предпосылки для использования биологически активных веществ фосфолипидной и стероидной природы (фураностанозиды) для удаления избыточного холестерина из плазмы крови при гемосорбции, а также для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Наряду с этим, установлено, что водные экстракты из культивируемых клеток Юкки оказывают стимулирующее действие на ростовые процессы сельскохозяйственных растений (семена гороха).

Таким образом, комплекс биологически активных веществ в культивируемых клетках Юкки славной представляет интерес для научных исследований как источник получения новых эффективных лекарственных средств разнообразного спектра действия.

Список литературы

1. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. 2010. №5. С. 8–28.
2. Кинтя П.К., Лазурьевский Г.В., Балашова Н.Н., Балашова И.Т., Суружиу А.И., Лях В.А. Строение и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фураностана. Кишинев, 1987. 141 с.
3. Васильева И.С., Пасешниченко В.А. Стероидные гликозиды и культуры клеток докореи, их метаболизм и биологическая активность // Успехи биологической химии. 2000. Т. 40. С. 153–204.
4. Frens D. Taxanes: perspectives for biotechnological production // Appl. microbiol. biotechnol. 2007. Vol. 73. Pp. 1233–1240.

5. Wu.J., Zhang J. Production of ginseng and bioactive components in plants cell culture: current technological and applied aspects // J. Biotechnology. 1999. Vol. 62. Pp. 89-99.
6. Murachige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tissue culture // *Physiol. Plantarum*. 1962. Vol. 15, N5. Pp. 473-497.
7. Писецкая Н.Ф. К вопросу о подборе питательной среды для культуры ткани женьшеня // *Растительные ресурсы*. 1970. Т. 6, вып. 4. С. 516-522.
8. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. М., 1987. Вып. 1, 2. 398 с.
9. Lowry O., Rosenbrough N., Forr F., Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem*. 1951. Vol. 193, N1. Pp. 115-123.
10. Комов В.П., Шмелев В.К. О некоторых особенностях кинетики ферментативных реакций на примере каталазы // *Биохимия*. 1975. Т. 40, вып. 4. С. 21-24.
11. Misra H.P., Fridovich J. The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and Quinones // *J. Biol. Chem*. 1972. Vol. 49, N4. Pp. 188-192.
12. Bovaird J.H., Ngo T.T., Jenhott Y.M. Optimizing the o-phenilendiamine assay for horseradish peroxidase: effect of phosphate and pH, substrate and enzyme concentrations and stopping reagents // *Clin. Chem*. 1982. Vol. 28. Pp. 2423-2426.
13. Стрелкова М.А., Синдеева Л.В. Протеолитическая активность в культивируемых клетках штаммов двух видов *Rapax L.* // *Растительные ресурсы*. 2001. Вып. 3. С. 97-103.
14. Гринкевич Н.И., Сафронич Л.Н. Химический анализ лекарственных растений : учебное пособие для фармацевтических вузов. М., 1983. 176 с.
15. Финдлей Дж., Эванз У. Биологические мембраны. Методы. М., 1990. 423 с.
16. Данилова А. Справочник по лабораторным методам исследования. СПб., 2003. 733 с.
17. Стрелкова М.А., Кириллова Н.В., Слепян Л.И. Характеристика стероидных гликозидов в культивируемых клетках Юкки славной // *Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. научн. тр. Пятигорск*, 2009. С. 108-109.

Поступило в редакцию 24 июня 2013 г.

Strelkova M.A., Kirillova N.V.*^{*}, Slepian L.I. COMPONENT COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY IN THE CELL CULTURE OF JUCCA GLORIOSA L. AGAVACEAE.

Saint-Petersburg State Chemical – pharmaceutical Academy, prof. Popova st., 14, Saint-Petersburg, 197376 (Russia), e-mail: margarita.strelkova@pharminnotech.com

The main phytochemical characteristics such as moisture, total ash, water- and spirit extractive compounds in *Jucca gloriosa* L. Agavaceae grown on standard medium have been studied. The steroid glycosides (furostanol analogs) were isolated from cell culture for quantitative and qualitative analysis. Lipids fractionation and total lipids quantitative estimation were carried out. The level of the antioxidant enzymes (superoxide dismutase, peroxidase) and proteolytic potential of the cell culture (acid and alkaline proteinases) have been investigated. Biological activity of different samples from dry biomass was estimated in experiment in vitro. It is shown that these samples stimulated seed germination and seedling growth of *Pisum sativum*. Hypolipidemic properties of these samples have been determined in experimental hyperlipidemic model. It was established that biologically active substances from cultivated cells decreased the content of total cholesterol and going out haemoglobin from erythrocytes membranes in experience in vitro. So, then the higher plant cell culture can serve as a source valuable of biologically active compounds in medicine and agriculture practice.

Keyword: cell culture, *Jucca gloriosa*, component composition, biological activity.

References

1. Nosov A.M. *Biotehnologiya*, 2010, no.5, pp. 8–28. (in Russ.).
2. Kintia P.K., Lazur'evskii G.V., Balashova N.N., Balashova I.T., Suruzhiu A.I., Liakh V.A. *Stroenie i biologicheskaya aktivnost' steroidnykh glikozidov riada spirostana i furostana*. [Structure and biological activity of a number of steroidal glycosides spirostana and furostana]. Kishinev, 1987, 141 p. (in Russ.).
3. Vasil'eva I.S., Paseshnichenko V.A. *Uspekhi biologicheskoi khimii*, 2000, vol. 40, pp. 153–204. (in Russ.).
4. Frens D. *Appl. microbiol. biotechnol.*, 2007, vol. 73, pp. 1233–1240.
5. Wu J., Zhang J. *Biotechnology*, 1999, vol. 62, pp. 89–99.
6. Murachige T., Skoog F.A. *Physiol. Plantarum.*, 1962, vol. 15, no. 5, pp. 473–497.
7. Pisetskaia N.F. *Rastitel'nye resursy*, 1970, vol. 6, no. 4, pp. 516–522. (in Russ.).
8. Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR. [State Pharmacopoeia of the USSR.]. 11 ed. Moscow, 1987, issue 1, 2, 398 p. (in Russ.).
9. Lowry O., Rosenbrough N., Forr F., Randall R. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 115–123.
10. Komov V.P., Shmelev V.K. *Biokhimiia*, 1975, vol. 40, no. 4, pp. 21–24. (in Russ.).
11. Misra H.P., Fridovich J. *J. Biol. Chem.*, 1972, vol. 49, no. 4, pp. 188–192.
12. Bovaird J.H., Ngo T.T., Jenhott Y.M. *Clin. Chem.*, 1982, vol. 28, pp. 2423–2426.
13. Strelkova M.A., Sindeeva L.V. *Rastitel'nye resursy*, 2001, no. 3, pp. 97–103. (in Russ.).
14. Grinkevich N.I., Safronich L.N. *Khimicheskii analiz lekarstvennykh rastenii*. [Chemical analysis of medicinal plants]. Moscow, 1983, 176 p. (in Russ.).
15. Findlei Dzh., Evanz U. *Biologicheskie membrany. Metody*. [Biological membranes. Methods]. Moscow, 1990, 423 p. (in Russ.).
16. Danilova A. *Spravochnik po laboratornym metodam issledovaniia*. [Handbook of Laboratory Methods]. St. Petersburg, 2003, 733 p. (in Russ.).
17. Strelkova M.A., Kirillova N.V., Slepian L.I. *Razrabotka, issledovanie i marketing novoi farmatsevticheskoi produktii: sb. nauchn. tr.* [Development, research and marketing of new pharmaceutical products: collection of scientific papers]. Pyatigorsk, 2009, pp. 108–109. (in Russ.).

Received June 24, 2013

* Corresponding author.

