

На правах рукописи



Глаголева Елена Сергеевна

**Закономерности накопления тритерпеновых гликозидов в
суспензионной культуре клеток женьшеня**

Panax japonicus var. repens

03.01.05 — физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва — 2021

Работа выполнена на кафедре физиологии растений биологического факультета Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

кандидат биологических наук

Кочкин Дмитрий Владимирович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Повыдыш Мария Николаевна, д.б.н., к.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург.

Заварзин Игорь Викторович, д.х.н., заведующий Лабораторией химии стероидных соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук, г. Москва.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Восточный федеральный университет имени М. К. Аммосова», Россия, Республика Саха (Якутия), г. Якутск.

Защита состоится « 18 » мая 2021 г. в 11 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 — «Физиология и биохимия растений» (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35.
Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@mail.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва, и на сайте <https://ippras.ru>.

Автореферат разослан « ___ » _____ 202 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

 **Азаркович Марина Ивановна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Химическое разнообразие и особенности накопления вторичных метаболитов в растениях неизменно привлекают внимание исследователей, поскольку многие из этих соединений обладают выраженной биологической активностью (Носов, 1994; Pott et al., 2019). Композиция вторичных метаболитов уникальна для каждого вида растений. При этом их качественный и количественный состав может в значительной степени различаться в разных тканях и органах растения, а также меняться в зависимости от времени и внешних условий (Court, 2003; Erb & Kliebenstein, 2020).

Особый интерес представляет изучение закономерностей образования и накопления вторичных метаболитов в культурах клеток высших растений — искусственно созданной биологической системе, которую можно использовать для продукции ценных для человека соединений (Paek et al., 2014). Клетки культуры и исходного растения могут значительно различаться по составу вторичных метаболитов. Часто это выражается в подавлении образования характерных для интактного растения вторичных метаболитов, однако известны примеры, когда клеточные культуры превосходят по содержанию целевых веществ интактные растения. Также в культуре клеток могут накапливаться соединения, нехарактерные для интактного растения или присутствующие в растении в следовых количествах. Сопоставление закономерностей накопления вторичных метаболитов в клетках *in vitro* и в целом растении может помочь в понимании отдельных этапов и механизмов регуляции их формирования и накопления, а также их функционального значения. Преимуществом использования культур клеток для изучения физиологических процессов является возможность прямого (при отсутствии организменного контроля) воздействия на клетки различными факторами (Носов, 1994, 1999).

Растения рода женьшень (*Panax* spp.) являются представителями семейства Аралиевых (Araliaceae Juss.) (Грушвицкий, 1961). Женьшень имеет высокую фармацевтическую и экономическую значимость. При этом в дикой природе практически все виды женьшеня находятся под угрозой исчезновения (Журавлев и Гапонов, 2003; Zuo et al., 2011). Выращивание женьшеня в искусственных условиях сопряжено со значительными трудностями. Поэтому интерес представляет

исследование биосинтетических возможностей культур клеток женьшеня (Paek et al., 2014).

Степень разработанности темы. Для видов женьшеня (*Panax* spp.) характерно значительное разнообразие тритерпеновых гликозидов — гинзенозидов, некоторые из которых уникальны для данного рода. В настоящее время число индивидуальных гинзенозидов, идентифицированных в интактных растениях, достигает уже нескольких сотен (Christensen, 2009; Yang et al., 2012). Среди них по структурному типу агликона можно выделить производные олеаноловой кислоты (OL) и гликозиды даммаранового ряда: производные 20(S)-протопанаксадиола (PPD) и 20(S)-протопанаксатриола (PPT). Образование тритерпеновых гликозидов показано и для культур клеток женьшеня (Paek et al., 2014). Число клеточных линий и видов женьшеня, вводимых в культуру *in vitro*, неуклонно растет. Много работ посвящено изучению роста культур клеток, оптимизации условий выращивания и накопления гинзенозидов. Однако исследование вторичного метаболизма в полученных культурах, как правило, ограничивается анализом нескольких основных гинзенозидов даммаранового ряда (обычно 6-8 соединений) (Решетняк и др., 2003; Смоленская и др., 2005; Демидова и др., 2006), что может давать только частичное представление о сложной композиции тритерпеновых гликозидов, характерной для растений женьшеня.

В связи с этим актуальной задачей является расширение набора анализируемых в культурах клеток женьшеня тритерпеновых гликозидов. Перспективным для таких исследований представляется использование различных вариантов жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС или УЭЖХ-МС) (Yang et al., 2012; Sun et al., 2016). Вместе с более полным пониманием биосинтетических возможностей клеток *in vitro* детальный фитохимический анализ позволит на новом уровне исследовать взаимосвязь накопления гинзенозидов в клетках с их ростовыми и физиологическими характеристиками, а также более подробно изучить зависимость состава гинзенозидов от внешних факторов, таких, например, как гормональный или углеводный состав питательной среды.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы — изучить особенности роста суспензионной культуры клеток *Panax japonicus* var. *repens* и закономерности накопления в ней тритерпеновых гликозидов при различных условиях выращивания культуры в колбах.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Провести анализ ростовых и физиологических характеристик суспензионной культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* при стандартном выращивании в колбах (согласно коллекционному паспорту штамма).

2. С помощью хромато-масс-спектрометрии исследовать закономерности изменения качественного и количественного состава тритерпеновых гликозидов при стандартном выращивании культуры в колбах.

3. Изучить ростовые и биосинтетические (накопление тритерпеновых гликозидов) характеристики культуры при изменении условий выращивания в колбах (изменение гормонального или углеводного состава среды выращивания).

Научная новизна. Впервые с помощью УЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС проведен подробный анализ качественного и количественного состава тритерпеновых гликозидов в культуре клеток одного из видов женьшеня (*P. japonicus* var. *repens*). Использование УЭЖХ-МС позволило провести идентификацию в данной культуре клеток более 20 разных гликозидов, при этом впервые в клетках женьшеня *in vitro* обнаружены некоторые «редкие» гинзенозиды (малонил-гинзенозид Rg1, нотогинзенозиды R1 и R2, гинзенозид F2, зингиброзид R1 и др.). Выявлены некоторые закономерности изменения качественного и количественного состава гинзенозидов основных структурных типов при периодическом выращивании культуры клеток японского женьшеня в колбах.

Научная и практическая значимость. Полученные в настоящей работе результаты расширяют представления о биосинтетических возможностях культуры клеток ценного лекарственного растения — женьшеня и вносят вклад в понимание процессов формирования гинзенозидов в клетках *in vitro*. Показана возможность эффективного использования сред выращивания с разным составом (в т.ч. среды с упрощенным по сравнению с контрольным вариантом составом фитогормонов (без цитокининов)) для получения биомассы культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* с разным соотношением индивидуальных гинзенозидов. Эти результаты могут быть

использованы для дальнейшей оптимизации биотехнологических способов получения биомассы культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* с различными фармакологическими свойствами.

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных экспериментальных данных. Автор принимал участие в подготовке статей к публикации и представлял результаты исследований на конференциях.

Методология и методы исследования. Исследования выполнены с применением современных методов и оборудования. Идентификация и количественное определение тритерпеновых гликозидов проводилось с использованием хромато-масс-спектрометрии. Работа с культурами клеток проводилась с использованием общепринятых и отработанных биотехнологических и цитофизиологических методов и методик. Результаты исследования проходили статистическую обработку.

Положения, выносимые на защиту. На защиту выносятся результаты исследования закономерностей накопления тритерпеновых гликозидов в культуре клеток *P. japonicus* var. *repens* — продуцента ценных биологически активных веществ. В частности:

1. Проведено подробное фитохимическое исследование состава тритерпеновых гликозидов в культуре клеток на протяжении ростового цикла и в разных циклах выращивания в колбах.

2. Выявлена взаимосвязь между физиологическими характеристиками культуры и накоплением тритерпеновых гликозидов определенных структурных типов.

3. Выдвинута гипотеза, позволяющая объяснить различия в содержании индивидуальных гинзенозидов на разных стадиях выращивания культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* в колбах.

4. Определена целесообразность изменения фитогормонального и углеводного состава питательных сред для регуляции накопления тритерпеновых гликозидов в культуре клеток *P. japonicus* var. *repens*.

Степень достоверности результатов. Для выполнения работы использовали актуальные методы и современное научное оборудование. Анализ результатов проведен с применением различных подходов/приемов статистической обработки и с привлечением достаточного числа биологических и аналитических повторностей.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на всероссийской научной конференции с международным участием VIII Съезд общества физиологов растений России, Петрозаводск, 2015; всероссийской научной конференции с международным участием, V Съезд Биохимиков России, Сочи, 2016; международной конференции XIth International conference "The biology of plant cells *in vitro* and biotechnology", Минск, Беларусь, 2018; всероссийской научной конференции с международным участием IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений — основа создания растений будущего», Казань, 2019; всероссийской научной конференции с международным участием II Объединенный научный форум, включающий VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Дагомыс, 2019.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из них 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 179 страницах машинописного текста, включают 47 рисунков и 10 таблиц. Диссертационная работа состоит из разделов: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы и приложение. Список цитируемой литературы включает 313 источников, из них 282 — на иностранном языке.

Принятые сокращения и обозначения. α -НУК — α -нафтилуксусная кислота, РРД — гинзенозиды группы 20(S)-протопанаксадиола, РРТ — гинзенозиды группы 20(S)-протопанаксатриола, ОЛ — гинзенозиды олеананового ряда. ВЭЖХ-ИЭР-МС и УЭЖХ-ИЭР-МС — высокоэффективная и ультраэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением соответственно. МС-спектр — масс-спектр. Ст. откл. — стандартное отклонение. Обозначения названий идентифицированных гликозидов представлены на Рис. 2.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Обзор литературы включает информацию по систематике и биологии видов *Panax* spp., структурному многообразию, метаболизму и физиологическим свойствам тритерпеновых гликозидов женьшеня, по культивированию клеток высших растений *in vitro* и особенностям вторичного метаболизма в клеточных культурах, в частности в культурах женьшеня.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Объект исследования. Суспензионная культура клеток женьшеня *Panax japonicus* С. А. Меу. var. *repens* Maxim., полученная из каллуса корня интактного двухлетнего растения (Чайко и др., 1999) — штамм №62 во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений (ВККК ВР ИФР РАН).

2.2. Условия культивирования. Суспензионную культуру выращивали на модифицированной среде Мурасиге-Скуга (Murashige & Skoog, 1962), с добавлением сахарозы, витаминов и регуляторов роста в соответствии с паспортом ВККК ВР, в темноте, при 26°C, в колбах Эрленмейера на 250 мл при постоянном перемешивании 90 об/мин. Цикл субкультивирования составлял 21 сутки (Kochkin et al., 2013).

2.3. Определение ростовых характеристик культуры клеток. Анализ ростовых характеристик культур клеток проводили по стандартным методикам (Бутенко, 1964; Носов, 2012).

2.5. Подготовка образцов для анализа тритерпеновых гликозидов. Биомассу для анализа гинзенозидов высушивали при 40°C. Экстрагировали гинзенозиды 70% водным раствором метанола с помощью ультразвука и проводили очистку на патронах для твердофазной экстракции SupelClean ENVI-18 (Supelco, США).

2.6.1. Качественный анализ тритерпеновых гликозидов. Качественный анализ тритерпеновых гликозидов проводили методом УЭЖХ-ИЭР-МС на приборе Waters Acquity UPLC (Waters, США), оснащенный гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVO QTOF (Waters, США). Хроматографическое разделение проводили на колонке ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50×2,1 мм, 1,7 мкм; Waters, США) в режиме градиентного элюирования, используя в качестве подвижной фазы 0,1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде и

ацетонитриле. Анализ осуществляли в режиме детекции положительных и отрицательных ионов (Kochkin et al., 2017). Обработку полученных результатов производили с помощью программы MassLynx (Waters, США). Работа проведена совместно с Галишевым Б.А. (кафедра экспериментальной биологии и биотехнологий ИЕН УрФУ, Екатеринбург).

2.6.2. Количественный анализ тритерпеновых гликозидов. Количественный анализ проводили методом ВЭЖХ-ИЭР-МС на приборе Agilent 1260 (США). Хроматографическое разделение осуществляли в градиентном режиме на колонке Poroshell 120 EC-C18 (3 × 100 мм, 2,7 мкм; Agilent, США). В качестве компонентов подвижной фазы использовали 0,05% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде и ацетонитрил. Анализ осуществляли в режиме регистрации выделенных отрицательных ионов. Обработку полученных результатов производили с помощью программы OpenChrom (Lablicate GmbH, Германия). Количественное определение содержания индивидуальных гинзенозидов проводили методом внешней калибровки.

2.9. Обработка результатов. Анализ и статистическую обработку данных проводили в программе LibreOffice и с использованием языка программирования R.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Ростовые характеристики культуры при выращивании на «стандартной» среде. На первом этапе работы было проведено изучение закономерностей изменения ростовых характеристик культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* при выращивании в колбах на «стандартной» среде, которая, согласно коллекционному паспорту, содержит 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л кинетина (Решетняк и др., 2003). Исследуемая линия суспензионной культуры непрерывно культивируется на данной среде с 1998 г. Определение ростовых параметров проводили в 6 циклах субкультивирования. Средняя начальная плотность составляла $0,9 \pm 0,2$ г/л по сухой массе. Во всех циклах рост описывался характерной для суспензионных культур клеток S-образной кривой.

В разных субкультивированиях фазы ростового цикла несколько отличались по длительности. По сухой массе лаг-фаза обычно отсутствовала, начало стационарной фазы приходилось на 13-17 сутки. Стационарная фаза в разных циклах продолжалась от 0 до 10 дней. Максимальное накопление сухой биомассы в разных циклах составляло 6 - 10 г/л. Ростовые кривые двух циклов, в которых проводили

определение содержания гинзенозидов, приведены на Рис. 1. Усредненные по 6 циклам ростовые характеристики представлены в Табл. 1. Индекс роста по сухой массе составил 7,4, что является достаточно высоким показателем для суспензионной культуры клеток женьшеня, выращиваемой в колбах (Wu & Ho, 1999; Кунах и др., 2003).

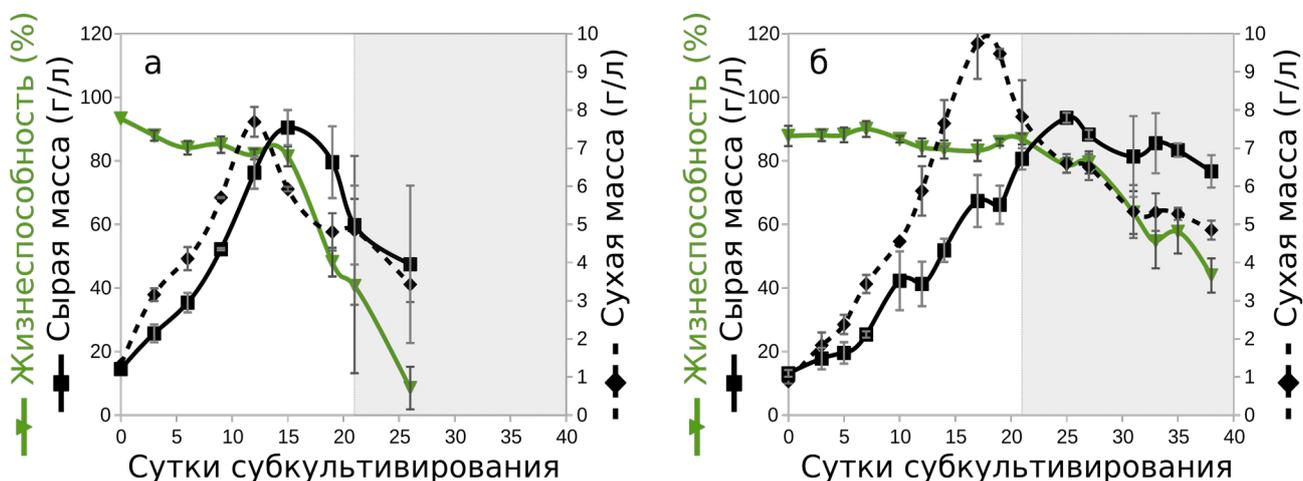


Рисунок 1. Динамика ростовых характеристик суспензионной культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* в цикле выращивания в колбах на «стандартной» среде. (а) и (б) — два независимых цикла субкультивирования. На графиках представлены средние значения по 3 колбам \pm ст. откл.

Полученные результаты вполне согласуются с данными других авторов, работавших с данной культурой клеток (Смоленская и др., 2005; Демидова и др., 2006). Обнаруженные в настоящей работе вариации параметров роста изучаемой культуры клеток, по всей видимости, являются проявлением гетерогенности исследуемой популяции клеток.

Таблица 1. Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* при выращивании в колбах на «стандартной» среде. Представлены средние значения по 6 циклам \pm ст. откл. Удельная скорость роста и время удвоения определены для экспоненциальной фазы роста.

	Индекс роста	Удельная скорость роста, сут ⁻¹	Время удвоения, сут	Экономический коэффициент	Продуктивность, г/(л×сут)
По сухой биомассе	7,38 \pm 2,06	0,13 \pm 0,04	5,67 \pm 1,58	0,23 \pm 0,06	0,42 \pm 0,12
По сырой биомассе	6,46 \pm 1,77	0,10 \pm 0,02	6,79 \pm 1,08	—	3,23 \pm 0,83

Анализ содержания тритерпеновых гликозидов при выращивании культуры клеток на «стандартной» среде. На следующем этапе работы с помощью хромато-масс-спектрометрии был проведен подробный качественный и количественный анализ состава тритерпеновых гликозидов женьшеня в спиртовых экстрактах из биомассы культуры клеток *P. japonicus* var. *repens*, выращенной в колбах на «стандартной» среде. Идентификацию гликозидов осуществляли с помощью расшифровки соответствующих МС-спектров, сопоставления хроматографического поведения и МС-спектров обнаруженных соединений со стандартными образцами и данными литературы (Yang et al., 2012; Sun et al., 2016).

Установлено, что в биомассе культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* присутствуют более 20 гликозидов, в качестве агликонов которых выступают тритерпеноиды 20(S)-протопанаксатриол (PPT), 20(S)-протопанаксадиол (PPD) и олеаноловая кислота (OL). Структурные формулы и расшифровка названий некоторых идентифицированных гинзенозидов приведены на Рис. 2.

Наряду со стандартно определяемыми в культурах клеток женьшеня основными гинзенозидами Rg1, Re, Rf, Rb1, Rc, Rb2/Rb3 и Rd были выявлены малонильные производные PPD гинзенозидов (MalRb1, MalRc, MalRb2/Rb3, MalRd) и гликозиды олеаноловой кислоты — R0 и ChIVa, содержание которых редко анализируется в культурах клеток, несмотря на значительное их количество в растениях женьшеня (Yamaguchi et al., 1988). Также были идентифицированы встречающиеся в интактных растениях нерегулярно или в относительно малых количествах 20-глюкозилгинзенозид Rf, NTR1 и NTR2, MalRg1, Rh1, Rg2 (тип PPT); GypXVII, F2, Fe, Fd и Rd2 (тип PPD); ZinR1, PSRT1 и MonoGlcAO1 (тип OL).

Полученные результаты свидетельствуют о сохранении в культуре клеток *P. japonicus* var. *repens*, которая поддерживается в активно растущем состоянии более 20 лет (Чайко и др., 1999), весьма сложного состава тритерпеновых гликозидов, вполне сопоставимого с их составом в интактных растениях женьшеня.

На основании качественного анализа были выбраны гинзенозиды, детекцию которых осуществляли в дальнейшем при количественном анализе методом ВЭЖХ-МС (выполнен в режиме детектирования выделенных ионов на приборе Agilent 1260 Infinity). Количественный анализ гинзенозидов в культуре проводили для 2-3 отдельных колб (биологические повторности) на разных фазах ростового цикла в течение двух независимых субкультивирований и на 21-е сутки семи циклов

выращивания. Стоит отметить (Рис. 1), что по мере вступления культуры в фазу деградации увеличивался разброс по физиологическим показателям между отдельными биологическими повторностями. Поэтому результаты анализа гинзенозидов представлены для каждой колбы/биологической повторности отдельно.

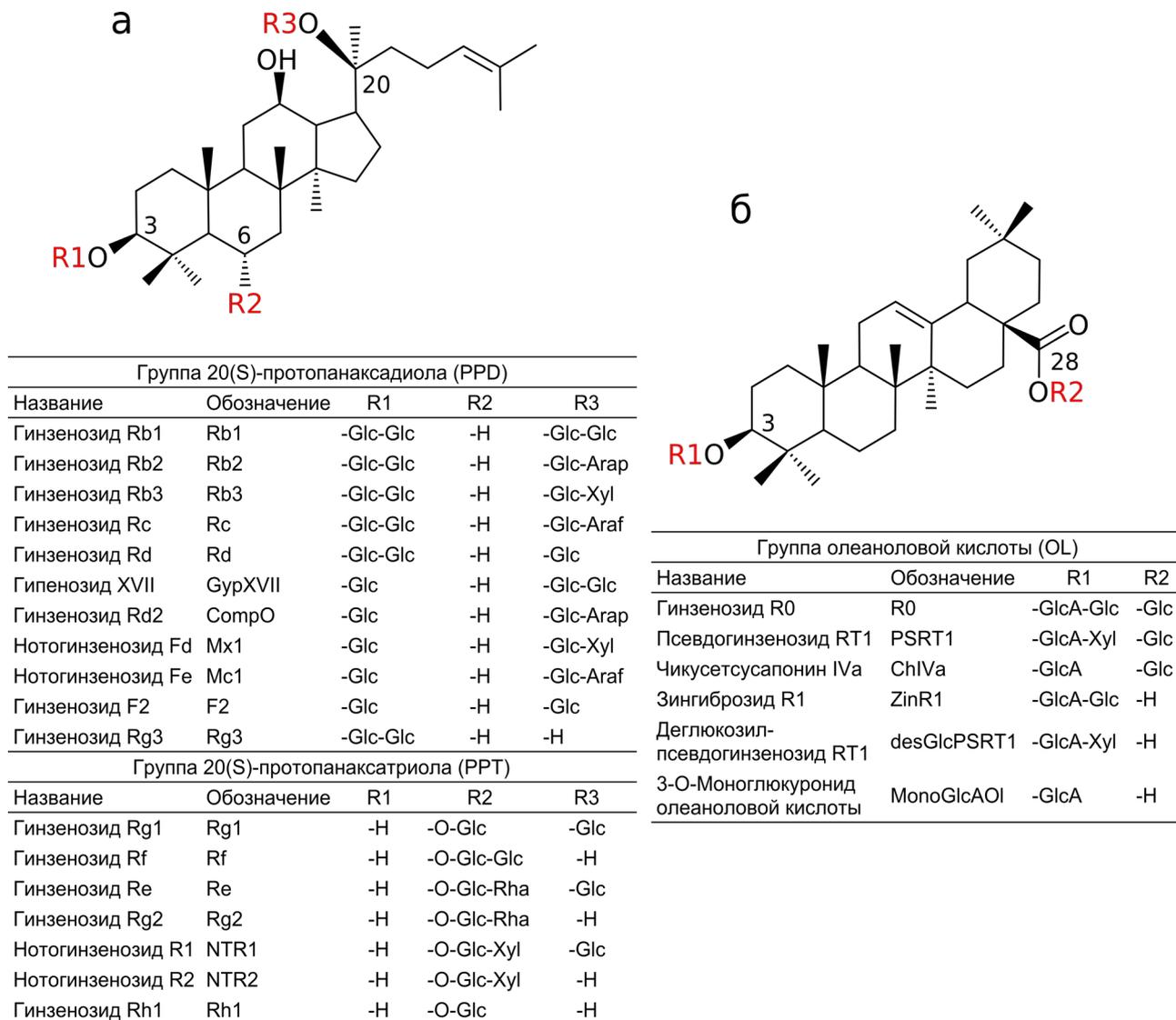


Рисунок 2. Структурные формулы и расшифровка названий гинзенозидов, идентифицированных в культуре клеток *P. japonicus* var. *repens* с помощью хромато-масс-спектрометрии. (а) Гинзенозиды даммаранового ряда: группа 20(S)-протопанаксадиола (PPD) и группа 20(S)-протопанаксатриола (PPT). (б) Группа олеаноловой кислоты (OL). Glc — β -D-глюкопиранозил, Xyl — β -D-ксилопиранозил, Arap — α -L-арабинопиранозил, Araf — α -L-арабинофуранозил Rha — α -L-рамнопиранозил, GlcA — β -D-глюкуроновая кислота.

Максимальное суммарное содержание гинзенозидов наблюдалось в стационарной фазе роста, примерно соответствовало максимуму накопления сырой биомассы и для двух проанализированных циклов (Рис. 1а и 1б) составило 104 мг/г сухой массы на 15 сутки цикла и 159 мг/г сухой массы на 38 сутки цикла

выращивания соответственно. Среднее за 7 циклов содержание гинзенозидов на 21-е сутки ростового цикла составляло 83 ± 19 мг/г сухой массы. Следует отметить, что это достаточно высокое значение для суспензионной культуры клеток *Panax spp.*, вполне сопоставимое с содержанием гинзенозидов в растениях женьшеня (Wang et al., 2016).

Минимальное содержание гинзенозидов наблюдалось на 6-7 сутки для обоих циклов, т.е. приходилось на начало экспоненциальной фазы роста, и составило 59 мг/г сухой массы и 47 мг/г сухой массы соответственно.

По количеству в биомассе преобладали гинзенозиды группы OL — до 74% от общего содержания гинзенозидов (в основном представлены R0 (до 53 мг/г), PSRT1 (до 11 мг/г) и ChIVa (до 7 мг/г)) и малонильные производные гинзенозидов группы PPD — до 53% от общего содержания гинзенозидов (в основном представлены гинзенозидами MalRb1 (до 39 мг/г), MalRc (до 9 мг/г), Mal(Rb2+Rb3) (до 10 мг/г), и MalRd (до 5 мг/г)) (Рис. 3). Суммарное содержание нейтральных гликозидов даммаранового ряда не превышало 22% от общего содержания гинзенозидов и составляло максимально 28 мг/г сухой массы (в основном представлены гинзенозидами Rg1 (до 7 мг/г) и Rb1 (до 13 мг/г)). Содержание остальных гинзенозидов по отдельности не превышало 2 мг/г сухой массы, однако их суммарное содержание было достаточно высоким — до 20% от общего содержания гинзенозидов (Рис. 3). В среднем 85% PPD гинзенозидов и только 15% PPT-производных находились в биомассе в малонилированной форме. Эти результаты вполне согласуются с данным литературы для интактных корней растений рода женьшень (Kitagawa et al., 1983) и позволяют предположить важную роль малонилирования в запасании/транспорте гликозидов PPD-группы (Kochkin et al., 2013).

Для более детального выявления закономерностей накопления индивидуальных гинзенозидов в биомассе исследуемой культуры клеток результаты количественного анализа были нормализованы (метод стандартизованной оценки Z-score (Мелник, 1983)) и представлены в виде тепловой карты (Рис. 4). Динамика содержания в течение цикла выращивания отличалась для разных гинзенозидов. С использованием кластерного анализа гинзенозиды по характеру накопления были разделены на три основные группы: группа I (Rd, Rh1 и ChIVa), группа III (ZinR1, desGlcPSRT1 и MonoGlcAO1, GypXVII, F2, Mc1, CompO+Mx1) и группа II (остальные гинзенозиды, в т.ч. R0, Rb1, Mal-Rb1 и Rg1) (Рис. 4).

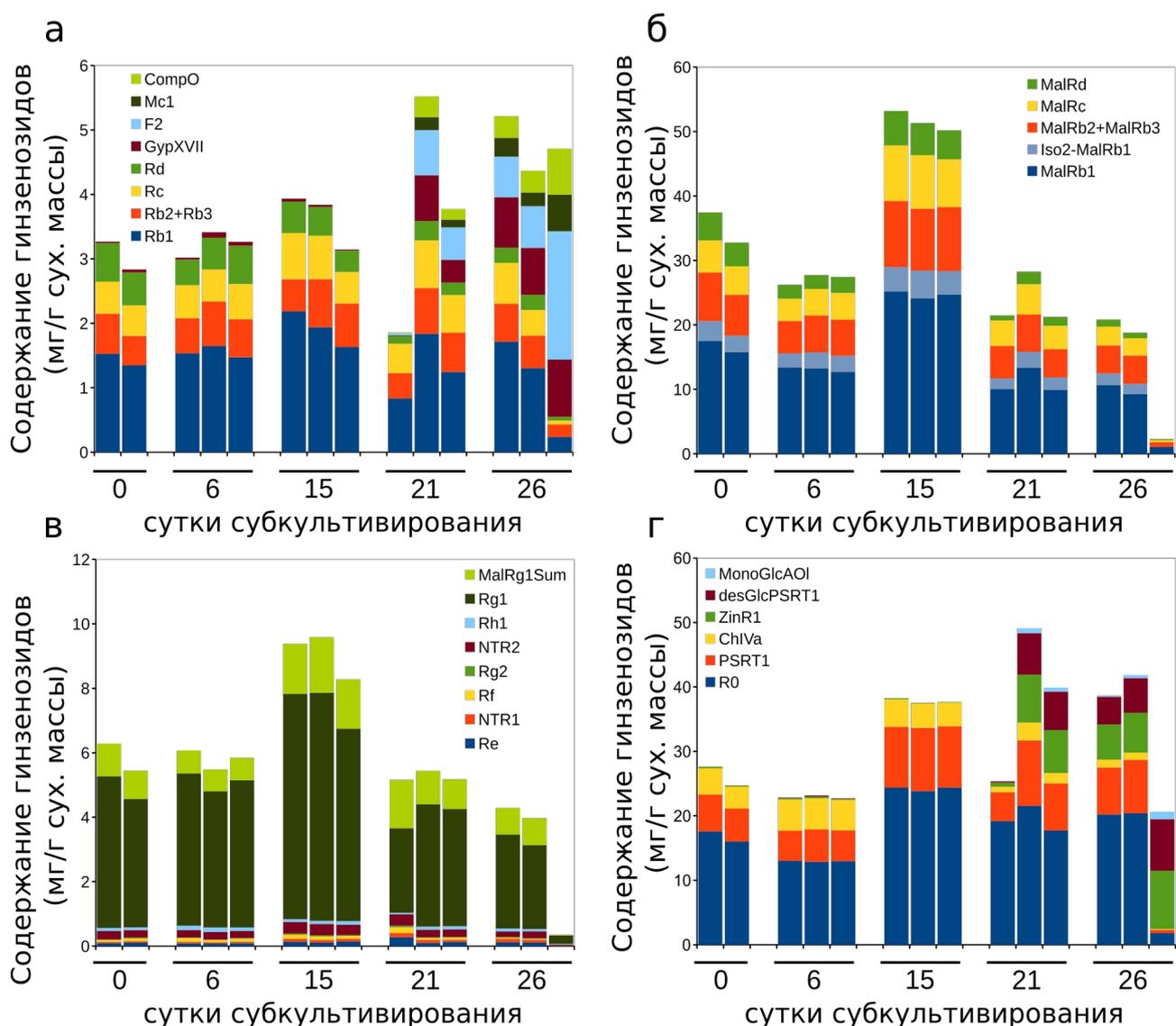


Рисунок 3. Динамика содержания индивидуальных гинзенозидов в культуре клеток *P. japonicus* var. *repens* в течение ростового цикла на «стандартной» среде в колбах. (а) Гинзенозиды группы 20(S)-протопанаксадиола. (б) Малонильные производные гинзенозидов группы 20(S)-протопанаксадиола. (в) Гинзенозиды группы 20(S)-протопанаксатриола. (г) Производные олеаноловой кислоты. Каждый столбик представляет содержание гинзенозидов в сухой биомассе в отдельной колбе (по 2-3 колбы на каждую временную точку). Ростовая кривая для данного цикла представлена на Рис. 1а. Расшифровка названий гинзенозидов дана на Рис. 2. Mal — малонилированные производные соответствующих гинзенозидов.

Содержание гликозидов группы I во время активного роста культуры было максимальным, а в стационарной фазе, по мере накопления более гликозилированных гинзенозидов, снижалось. Содержание большинства гинзенозидов (группа II), наоборот, снижалось во время экспоненциальной фазы роста (по сравнению с началом цикла), достигало максимума в стационарной фазе и заново снижалось при значительном (до менее чем 20%) уменьшении жизнеспособности культуры.

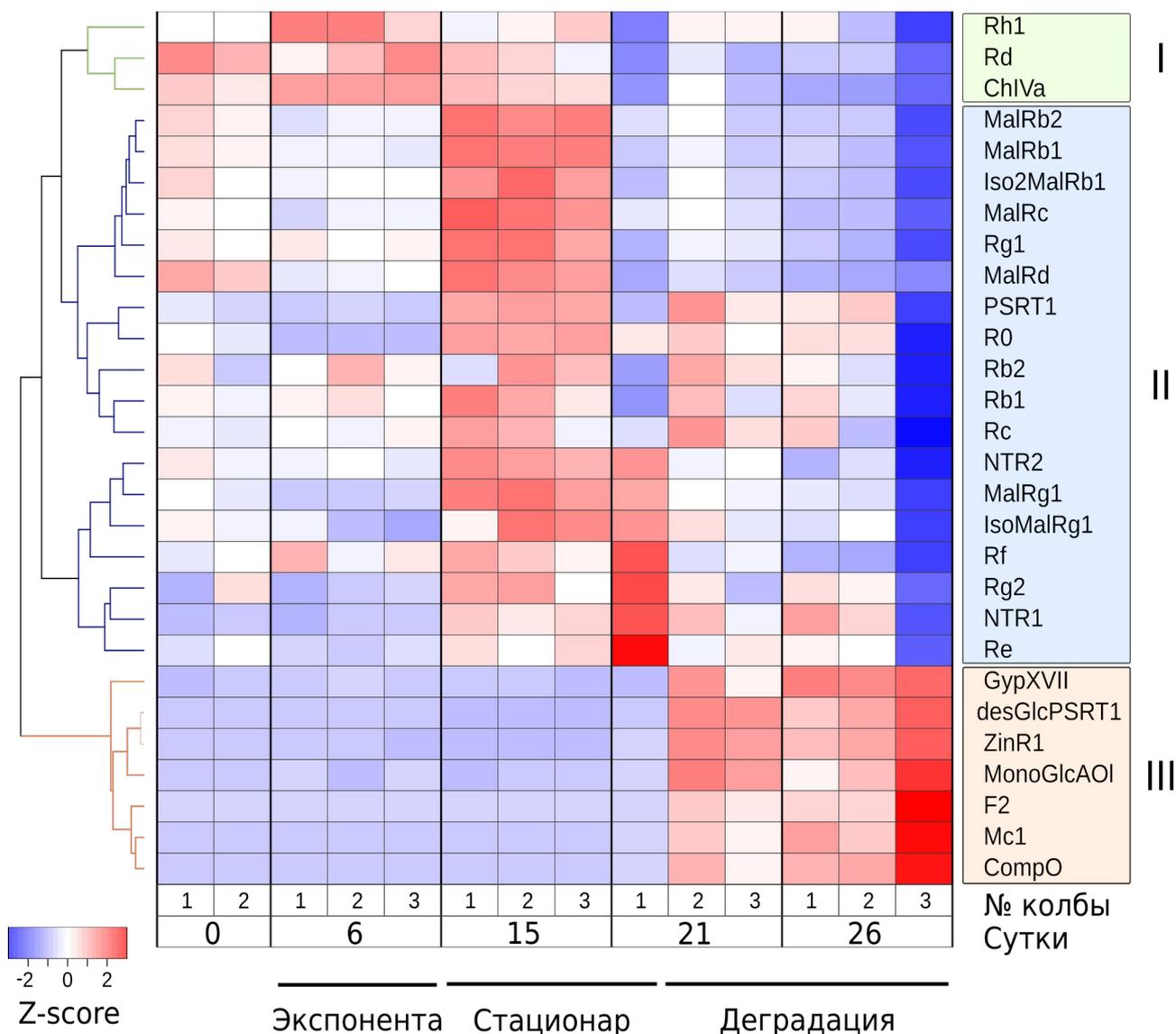


Рисунок 4. Анализ изменения содержания индивидуальных гинзенозидов в клеточной биомассе культуры *P. japonicus* var. *repens* в течение ростового цикла при выращивании на «стандартной» среде в колбах. Показана тепловая карта содержания индивидуальных гинзенозидов на разные сутки цикла субкультивирования (по 2-3 отдельные колбы на каждую временную точку). Гинзенозиды, содержание которых в течение цикла выращивания менялось сходным образом, объединены в группы с помощью кластерного анализа. Соответственно, синим цветом показывается уменьшение, а красным — увеличение содержания гинзенозида относительно среднего содержания этого гинзенозида для данного цикла. Ростовая кривая для данного цикла представлена на Рис. 1а. Экспонента — фаза экспоненциального роста, Стационар — стационарная фаза роста, Деградация — фаза дегградации (фазы ростового цикла, которым соответствуют представленные временные точки данного субкультивирования). Расшифровка названий гинзенозидов дана на Рис. 2.

В группу III были выделены гинзенозиды, содержание которых, наоборот, значительно увеличивалось при наступлении стадии дегградации. Так, на стадии дегградации культуры происходило резкое (более чем в 20 раз) увеличение

содержания гинзенозидов олеанолового типа со свободной С28 карбоксильной группой (ZinR1, desGlcPSRT1 и MonoGlcAO1). Кроме того, наблюдалось значительное увеличение (в некоторых случаях более чем в 3 раза) содержания частично дегликозилированных гинзенозидов PPD группы (гинзенозида F2, GypXVII, Ms1 и CompO). На более ранних фазах цикла эти гинзенозиды не детектировались или обнаруживались в следовых количествах (< 0,3-0,1 мг/г).

Представленные результаты позволяют выдвинуть некоторые предположения об особенностях метаболизма гинзенозидов в клетках культуры-объекта исследования. Приуроченность максимума содержания гликозидов группы I к фазе экспоненциального роста культуры, по всей видимости, свидетельствует о роли этих соединений в качестве интермедиатов образования гинзенозидов соответствующих структурных групп: Rd — интермедиат биосинтеза гликозидов PPD-группы, Rh1 и ChIVa — гликозидов PPT и OL группы соответственно. Эти результаты вполне согласуются с данными литературы (<http://ginsengdb.snu.ac.kr/pathway.php>; Yang et al., 2018; Tang et al., 2019; Zhao et al., 2019). Гликозиды группы II (максимальное содержание отмечается в стационарной фазе — период перехода клеток к растяжению и/или дифференциации), вероятнее всего, являются продуктами гликозилирования (и/или малонилирования) гликозидов группы I и могут рассматриваться как конечные продукты биосинтеза тритерпеновых гликозидов в клетках *P. japonicus* var. *repens* *in vitro*. Гинзенозиды группы III являются характерными для стадии деградации культуры и, по всей видимости, их образование связано с частичным гидролизом гинзенозидов, накопленных в клетках на предыдущих этапах ростового цикла. Стоит отметить, что такие гликозиды, согласно литературе, обладают выраженным цитотоксическим действием (Popov, 2002; Zheng et al., 2019).

Известно, что физиологические характеристики культур клеток высших растений сильно зависят от внешних условий и, прежде всего, от состава среды выращивания (Бутенко, 1991). Поэтому для более подробного изучения особенностей накопления гинзенозидов в культуре клеток *P. japonicus* var. *repens* были проведены эксперименты по выращиванию данной культуры клеток на средах с измененным (по сравнению с контрольным вариантом) составом: варьирование гормонального (исключение кинетина) и углеводного (замена сахарозы на мальтозу) состава среды.

Влияние исключения кинетина из состава среды выращивания на ростовые и биосинтетические характеристики культуры клеток *P. japonicus* var. *repens*.

Для исследования влияния гормонального состава среды на физиологические и биосинтетические характеристики культуры было проведено определение ростовых параметров и содержания гинзенозидов в суспензионной культуре, выращиваемой в колбах на среде без экзогенных цитокининов (вариант 2Н-0К), но с таким же, что и в контрольном варианте, составом ауксинов (2 мг/л α -НУК). Определение ростовых параметров, указанных в Табл. 2, проводили для 24-го цикла субкультивирования на модифицированной среде. Для остальных субкультивирований определяли плотность по сырой и сухой массе на 21-е сутки цикла роста. Индекс роста варианта 2Н-0К составил 11,8 по сухой массе, что выше индекса роста контрольного варианта на 38 % (Табл. 2 сравнение с Табл. 1).

Таблица 2. Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* в 24-ом цикле выращивания в колбах на среде 2Н-0К. Удельная скорость роста и время удвоения определены для экспоненциальной фазы роста.

	Индекс роста	Удельная скорость роста, сут ⁻¹	Время удвоения, сут	Экономический коэффициент	Продуктивность, г/(л×сут)
По сухой биомассе	11,84	0,16	4,33	0,36	0,60
По сырой биомассе	9,50	0,14	4,98	---	6,35

Накопление сырой биомассы к 21-м суткам ростового цикла на среде без кинетина было выше, чем в контроле, начиная с 3-го цикла выращивания на модифицированной среде (Рис. 5 а, д) и составляло в среднем (с 3 по 35-й цикл) 154±14 г/л (максимально — 175 г/л), а для контроля 83±14 г/л (максимально — 112 г/л). При этом для 2Н-0К была характерна большая оводненность биомассы (снижение доли сухого вещества) и больший размер клеток (Рис. 5 в, г).

Накопление сухой биомассы к 21-м суткам ростовых циклов также было повышено на среде без кинетина в среднем (с 3 по 35-й цикл) в 1,3 раза (Рис. 5, б).

Таким образом, исключение кинетина из состава среды выращивания привело к повышению ростовых характеристик культуры. При этом, исходя из высокой оводненности клеток варианта 2Н-0К, можно предположить, что данная модификация среды в наибольшей степени повлияла на процессы роста клеток растяжением.

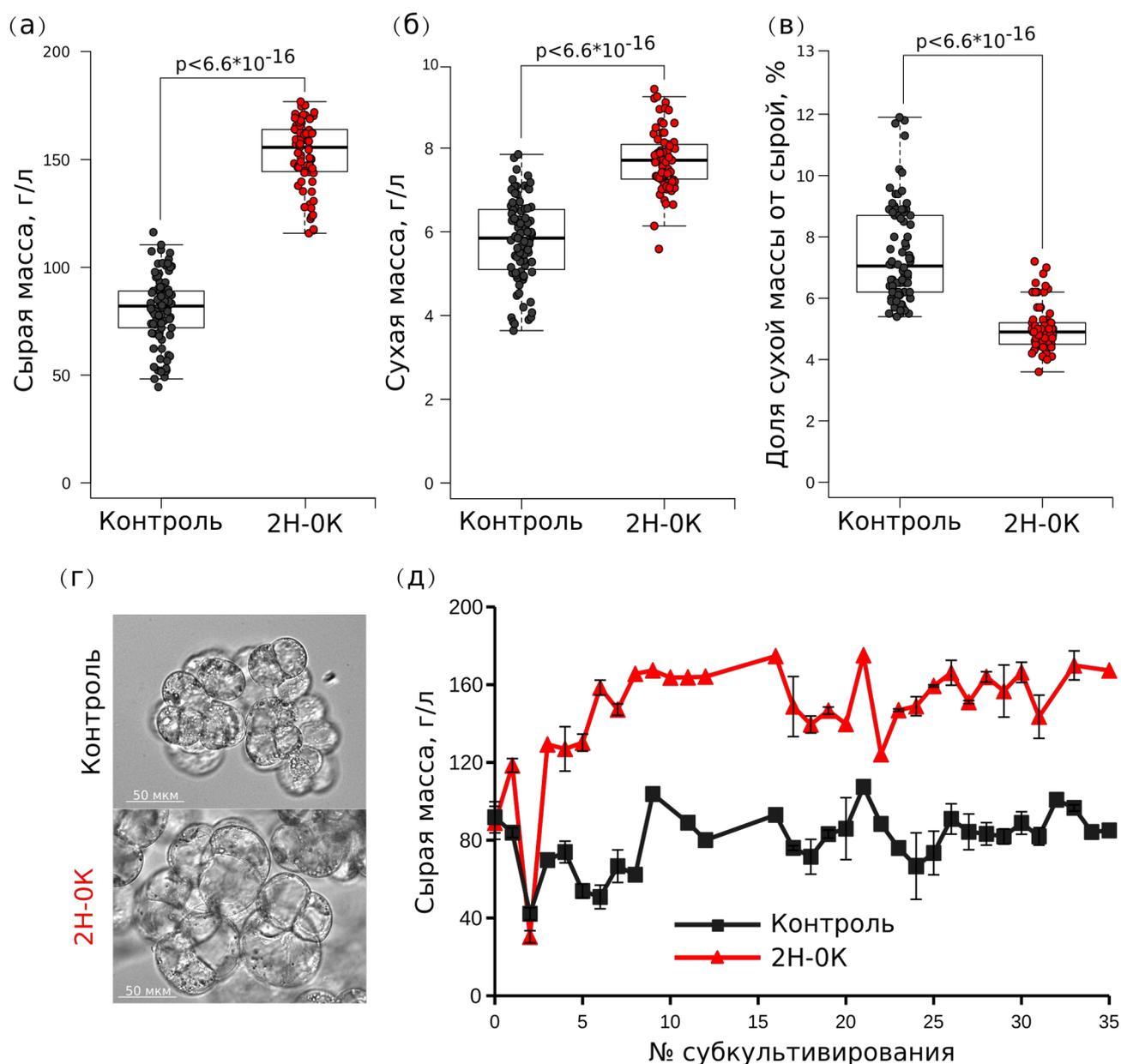


Рисунок 5. Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* на «стандартной» среде и среде без кинетина. (а), (б), (в) Точки представляют значения ростовых параметров в отдельных колбах на 21-е сутки разных циклов субкультивирования. (а) Плотность культуры по сырой массе. (б) Плотность культуры по сухой массе. (в) Содержание сухого вещества. (г) Световая фотография клеточных агрегатов на 21 сутки цикла роста. (д) Плотность культуры по сырой массе на 21-е сутки цикла роста в течение 35-ти последовательных субкультивирований. Точки представляют средние значения \pm ст.откл. **Контроль:** 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л кинетина. **2Н-0К:** 2 мг/л α -НУК, 0 мг/л кинетина. p - значение подсчитано с помощью критерия Уилкоксона-Манна-Уитни.

Количественный ВЭЖХ-МС анализ гинзенозидов проводили в биомассе варианта 2Н-0К (по 3 колбы — биологические повторности) в течение 24-го цикла субкультивирования и на 21-е сутки 4-6-го, 24-го и 28-30-го циклов выращивания на модифицированной среде. Анализ показал наличие в варианте 2Н-0К всех гинзенозидов, характерных для контрольного варианта. Среднее за семь циклов

суммарное содержание гинзенозидов на 21-е сутки не отличалось в двух вариантах (Табл. 3). Существенно различалось, однако, количественное соотношение между отдельными гинзенозидами (Табл. 3). Так, снизилось содержание всех (в т.ч. малонилированных) гинзенозидов PPD группы (например, содержание гинзенозида Rd в варианте без кинетина было в среднем в 21 раз ниже, чем в контроле). Изменения, произошедшие в группе PPT и OL, можно описать как повышение доли менее гликозилированных гинзенозидов (предполагаемых интермедиатов синтеза) по отношению к более гликозилированным. Наиболее заметно при изменении состава среды увеличилось накопление ChIVa — его содержание в варианте без кинетина было в среднем в 9 раз выше, чем в контроле. Кроме того, наблюдалось сниженное по сравнению с контролем содержание гинзенозидов, характерных для стадии деградации культуры. Похожие результаты (в отношении общего содержания гликозидов PPD и PPT групп) ранее были получены для суспензионной культуры клеток *P. ginseng* (Lian et al., 2002).

На основании полученных результатов можно предположить, что в культуре, выращиваемой на среде без кинетина, снижена интенсивность гликозилирования и малонилирования тритерпенов. Изменения в гликозилировании могут быть, например, следствием перераспределения в клетках сахаров при изменении ростовых процессов клеток или процессов запасания углеводов (Halmer & Thorpe, 1976; Carpita et al., 1982; Ehness & Roitsch, 1997). Косвенным свидетельством иного распределения сахаров в клетках культуры, выращиваемой на среде без кинетина, может являться заметное снижение в них количества крахмальных гранул. Наблюдаемые различия в изменении содержания гинзенозидов разных типов агликонов могут объясняться различием в их структуре и физико-химических свойствах (Popov, 2002). Например, уменьшение накопления гинзенозидов PPD группы в культуре при выращивании на среде 2H-0K можно объяснить мембранолитическими свойствами и соответственно токсичностью для клеток продуцента соответствующих прогенинов (гинзенозидов Rh2, F2, Rg3) (Popov, 2002). Накопление этих гликозидов, вероятно, может приводить к нарушению гомеостаза клеток *in vitro*, поэтому в эксперименте наблюдается перераспределение метаболических потоков в пользу образования гликозидов, прогенины которых менее токсичны — производные PPT (Rh1, NTR2 и Rf) и OL (ChIVa) (Popov, 2002; Zheng et al., 2019).

Длительное культивирование на среде без кинетина показало, что изменения в профиле содержания гинзенозидов наблюдаются уже в 4-м цикле на модифицированной среде и сохраняются на протяжении по крайней мере 30-ти субкультивирований. Суммарное содержание гинзенозидов при выращивании на среде без кинетина снизилось незначительно, что показывает возможность продукции тритерпеновых гликозидов культурой клеток женьшеня при выращивании на среде без экзогенных цитокининов.

Таблица 3. Содержание гинзенозидов в культуре клеток *P. japonicus var. repens* при выращивании на средах с разным гормональным составом.

	Гинзенозид	Содержание, мг/г сух.массы	
		Контроль	2Н-0К
PPD	Rb1	3.02 ± 1.39	1.38 ± 1.06***
	Rb2+Rb3	1.03 ± 0.48	0.30 ± 0.23*
	Rd	0.85 ± 0.61	0.04 ± 0.03***
	Rc	0.83 ± 0.27	0.27 ± 0.20***
	GypXVII	0.27 ± 0.41	0.05 ± 0.03*
	F2	0.19 ± 0.32	0.01 ± 0.02*
	Malonyl	MalRb1	15.10 ± 4.25
MalRb2		5.28 ± 1.29	1.57 ± 1.28***
MalRc		4.08 ± 1.03	0.92 ± 0.82***
malRd		2.72 ± 0.86	0.17 ± 0.19***
Iso2MalRb1		2.65 ± 0.65	0.93 ± 0.68
IsoMalRb1		1.49 ± 0.26	1.36 ± 1.06
MalRg1		0.89 ± 0.28	0.24 ± 0.14***
IsoMalRg1		0.24 ± 0.06	0.08 ± 0.06***
PPT	Rg1	6.43 ± 1.83	6.88 ± 2.16
	NTR2	0.41 ± 0.10	0.67 ± 0.23***
	Rf	0.15 ± 0.04	0.42 ± 0.12***
	Rh1	0.15 ± 0.06	0.23 ± 0.09*
	Re	0.12 ± 0.05	0.11 ± 0.05
	NTR1	0.08 ± 0.02	0.04 ± 0.02***
	Rg2	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02
OL	R0	21.31 ± 9.63	17.98 ± 6.49*
	PSRT1	7.20 ± 4.15	3.26 ± 1.83*
	ChiVa	3.85 ± 1.67	34.15 ± 8.03***
	ZinR1	2.68 ± 3.60	0.70 ± 0.94*
	desGlcPSRT1	1.46 ± 2.37	0.07 ± 0.21*
	MonoGlcAOI	0.25 ± 0.49	0.86 ± 1.69*
Сумма		82.8 ± 18.6	77.9 ± 21.9

В таблице представлены усредненные значения содержания гинзенозидов в сухой биомассе культуры клеток на 21 сутки семи разных циклов субкультивирования на «стандартной» среде и среде без кинетина (по 3 колбы на каждый цикл). Красным и зеленым цветом выделены гинзенозиды, содержание которых было соответственно меньше или больше, чем в контроле. *** — различия достоверны ($p < 0.01$) согласно критерию Уилкоксона-Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на множественность сравнений ($=p*30$). ** — различия достоверны ($p < 0.05$) согласно критерию Уилкоксона-Манна-Уитни с поправкой Бонферрони на множественность сравнений ($=p*30$). * — различия достоверны ($p < 0.01$) согласно критерию Уилкоксона-Манна-Уитни без поправки на множественность сравнений. **Контроль:** 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л кинетина. **2Н-0К:** 2 мг/л α -НУК, 0 мг/л кинетина. Значения — среднее \pm ст.откл. Расшифровка названий гинзенозидов дана на Рис. 2.

Влияние углеводного состава среды культивирования на ростовые характеристики культуры клеток и содержание гинзенозидов. Для исследования влияния углеводного состава среды на ростовые и биосинтетические характеристики культуру клеток *P. japonicus* var. *repens* в течение 26-ти субкультивирований выращивали на среде, в которой сахароза (25 г/л) была заменена на D(+)-мальтозу (25 г/л). Несмотря на то, что накопление сырой биомассы было ниже (на 17 %) в варианте с мальтозой (Рис. 6), в целом мальтоза поддерживала нормальный рост культуры.

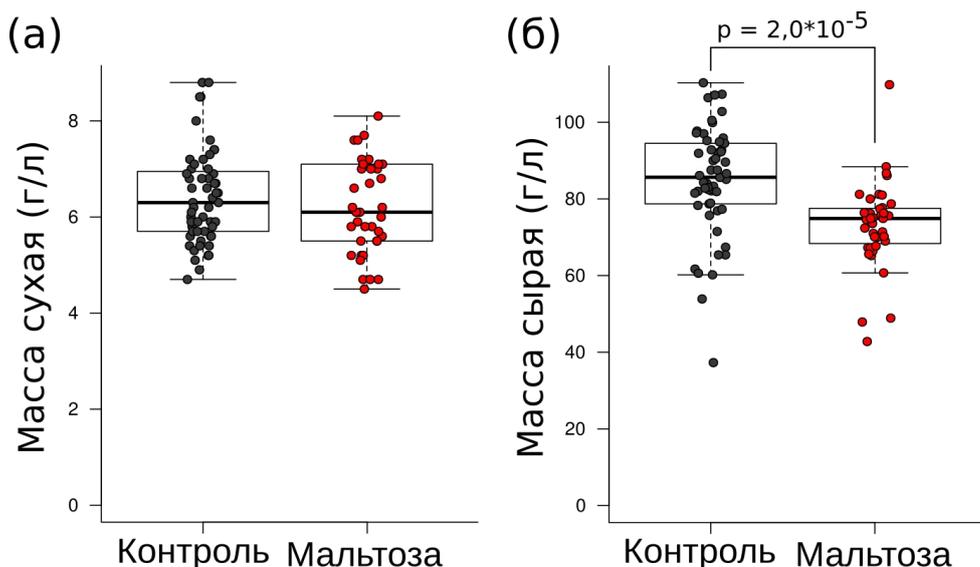


Рисунок 6. Накопление биомассы культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* при выращивании на средах с разным углеводным составом. Точки представляют значение плотности по сухой (а) и сырой (б) массе в отдельных колбах на 21-е сутки ростовых циклов. p - значение подсчитано с помощью критерия Уилкоксона-Манна-Уитни. Контроль: 25 г/л сахарозы, Мальтоза: 25 г/л мальтозы вместо сахарозы.

Количественный ВЭЖХ-МС анализ гинзенозидов в биомассе проводили в течение 24-го цикла выращивания на среде с мальтозой. Рост культуры на среде с мальтозой в течение цикла в целом соответствовал росту на контрольной среде, но максимальное накопление биомассы в контроле было немного выше (Рис. 7).

В клетках, культивируемых на среде с мальтозой, наблюдалось снижение (в $\sim 1,5$ раза) общего содержания гинзенозидов по сравнению с вариантом на «стандартной» среде, содержащей сахарозу. Различие обуславливалось более низким содержанием гинзенозидов PPD группы (Rb1, Rb2, Rc, Rd, GypXVII, F2) в среднем по циклу в 1,7 раз, малонильных производных гинзенозидов PPD и PPT групп (MalRg1, MalRb1, MalRb2, MalRc, MalRd) в среднем по циклу в 2,3 раза и гликозидов олеаноловой кислоты (R0, PSRT1, ChIVa, ZinR1, desGlcPSRT1, MonoGlcAOI) в среднем по циклу в 1,5 раза.

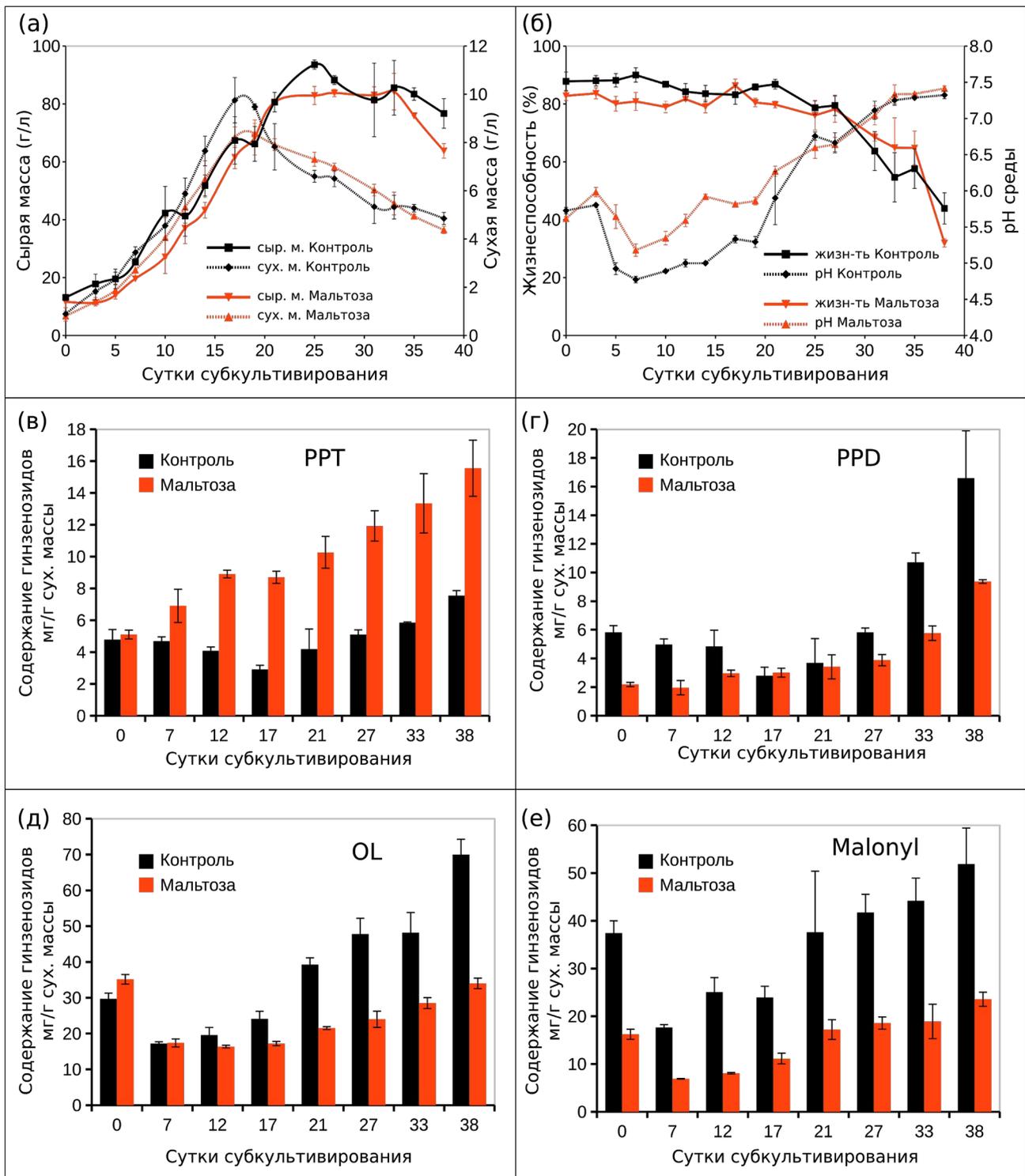


Рисунок 7. Динамика ростовых характеристик и содержание гинзенозидов в культуре клеток *P. japonicus* var. *repens* в течение цикла субкультивирования в колбах на «стандартной» среде и на среде с мальтозой. Показаны динамика сырой и сухой массы (а), жизнеспособности клеток и pH среды культивирования (б), суммарного содержания гинзенозидов группы протопанаксатриола (PPT) (в), группы протопанаксадиола (PPD) (г), олеанановой группы (OL) (д) и малонилированных форм гинзенозидов (Malonyl) (е). Представлены средние значения (по 2-3-м колбам) ± ст.откл на протяжении 24-го цикла субкультивирования на модифицированной среде. Контроль: 25 г/л сахарозы, Мальтоза: 25 г/л мальтозы вместо сахарозы.

Суммарное содержание гинзенозидов РРТ группы (Rg1, Re, NTR1, Rf, Rg2, NTR2, Rh1), напротив, было в среднем по циклу в 2 раза выше в варианте с мальтозой (Рис. 7). Внеклеточный гидролиз, поглощение и метаболизм мальтозы в клетке происходит медленнее по сравнению с сахарозой (Kumar et al., 2015). Это может являться причиной снижения общего содержания гликозидов и перераспределения метаболизма гинзенозидов в сторону РРТ группы.

Наши результаты показывают, что углеводный состав среды оказывает влияние на биосинтетические характеристики культуры клеток *P. japonicus* var. *repens*, при этом происходит изменение соотношения между содержанием гинзенозидов разных структурных групп, т.е. перераспределение метаболических потоков в клетках. Следует подчеркнуть, что культура, выращиваемая на среде с мальтозой, тем не менее, обладает достаточно высокими и стабильными показателями роста и накопления гинзенозидов, т.е. мальтоза может использоваться как углеводный ресурс для культивирования данной линии клеток и продукции гинзенозидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведено подробное хромато-масс-спектрометрическое изучение качественного состава и закономерностей накопления тритерпеновых гликозидов, гинзенозидов, в суспензионной культуре клеток одного из видов женьшеня — *Panax japonicus* var. *repens*, выращиваемой в колбах. Установлено, что несмотря на длительное выращивание (культура поддерживается в активно растущем состоянии более 20 лет), в клетках *P. japonicus* var. *repens* сохраняется способность к образованию весьма сложной композиции гинзенозидов (идентифицировано более 20 гликозидов), вполне сопоставимой с составом гликозидов в интактных растениях *Panax* spp. Кроме того, был проведен анализ количественного содержания достаточно большого набора (не менее 29) гинзенозидов при выращивании культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* в колбах в разных условиях (в т.ч. при изменении гормонального и углеводного состава среды выращивания). При этом показано, что накопление гинзенозидов разных структурных групп подчиняется определенным закономерностям. В частности, для разных стадий ростового цикла культуры характерно преобладание определенных гликозидов, что, по всей видимости, отражает последовательность метаболизма гинзенозидов (образование предшественников гинзенозидов основных структурных типов, накопление основных продуктов биосинтеза и их гидролиз на стадии деградации культуры) при периодическом выращивании в колбах. Установлено также, что варьирование условий культивирования (например, изменение состава фитогормонов в среде выращивания) приводит к закономерным и воспроизводимым изменениям в содержании гинзенозидов разных структурных групп. Эти изменения могут быть объяснены на основе сведений (в т.ч. впервые полученных в настоящей работе) о последовательности образования гинзенозидов и данных о связи химической структуры гинзенозидов с их физико-химическими свойствами. Суммарное содержание гинзенозидов в биомассе культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* в разных условиях выращивания в колбах колеблется в пределах 3-8% от сухой массы клеток, что свидетельствует о ее значительном биотехнологическом потенциале.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о возможности использования культуры клеток *P. japonicus* var. *repens* для выяснения закономерностей накопления гинзенозидов в клетках женьшеня *in vitro*. Эти результаты могут быть полезными как для фундаментального изучения биохимии гинзенозидов, так и для прикладных работ по созданию и оптимизации биотехнологий получения биомассы женьшеня, содержащей физиологически активные тритерпеновые гликозиды.

ВЫВОДЫ

1. Суспензионная культура клеток *Panax japonicus* var. *repens* (штамм №62) в стандартных условиях обладает высокими и стабильными показателями роста. (Индекс роста по сухой массе составил 7,4; продуктивность — 0,4 г/(л×сут)).

Штамм является цитокинин-независимым, т.е. может длительное время поддерживаться без добавления цитокининов. Исключение кинетина из состава среды выращивания вызывает увеличение продуктивности, размера клеток культуры и оводненности биомассы. (Индекс роста на среде без кинетина составил 11,8; продуктивность — 0,6 г/(л×сут)).

2. Несмотря на длительное (более 20 лет) культивирование *in vitro*, клетки *Panax japonicus* var. *repens* сохраняют способность к синтезу широкого спектра (не менее 30) тритерпеновых гликозидов, сопоставимого со спектром тритерпеновых гликозидов интактных растений. Впервые с помощью хромато-масс-спектрометрии было показано наличие в культуре клеток малонильных производных гинзенозидов группы протопанаксатриола и некоторых минорных неполярных гинзенозидов группы протопанаксадиола и олеаноловой кислоты.

3. В течение ростового цикла количественное соотношение между индивидуальными гинзенозидами меняется характерным образом. В начале экспоненциальной фазы роста повышено содержание гликозидов Rd, Rh1, ChIVa — вероятных интермедиатов биосинтеза. В стационарной фазе происходит накопление гликозидов — основных продуктов биосинтеза (Rg1, Rb1, R0, малонил-Rb1 и других). На стадии деградации культуры увеличивается количество неполярных частично дегликозилированных тритерпеновых гликозидов (ZinR1, desGlcPSRT1, MonoGlcAOI, GypXVII, F2, Mc1, CompO), которые предположительно являются продуктами гидролиза основных гинзенозидов олеананового ряда и группы протопанаксадиола, накопленных на предыдущих стадиях.

4. Варьирование состава среды выращивания позволяет изменять соотношение между индивидуальными гинзенозидами и разными структурными группами тритерпеновых гликозидов. Например, исключение кинетина из состава среды выращивания приводит к увеличению содержания чикусетсусапонина IVa (гликозид олеаноловой кислоты) и уменьшению содержания гликозидов 20(S)-протопанаксадиола.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в международных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. Титова М.В., Шумило Н.А., Решетняк О.В., Глаголева Е.С., Носов А.М. (2015). Физиологические характеристики суспензионной культуры клеток *Panax japonicus* при масштабировании процесса выращивания. *Биотехнология*, (3):71-80.

2. Kochkin D.V., Galishev B.A., Glagoleva E.S., Titova M.V., Nosov A.M. (2017). Rare Triterpene Glycoside of Ginseng (Ginsenoside Malonyl-RG1) Detected in Plant Cell Suspension Culture of *Panax japonicus* var. *repens*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(5), 649-656.

3. Кочкин Д.В., Глаголева Е.С., Галишев Б.А., Спиридович Е.В., Носов А.М., Решетников В.Н. (2018). Анализ гинзенозидов в корнях женьшеня настоящего (*Panax ginseng*), интродуцированного в центральном ботаническом саду НАН Беларуси. *Доклады Национальной академии наук Беларуси*, 62(4), 447-454.

Публикации в сборниках конференций

1. Глаголева Е.С., Кнорре Д.А. (2014). Гетерогенность трансмембранного потенциала митохондрий в суспензионной культуре клеток *Panax japonicus*. В сб: *Материалы Всероссийской научной конференции «Механизмы регуляции функций растительных органелл»*. Иркутск: НЦРВХ СО РАНН, с.18-20.

2. Глаголева Е.С., Кочкин Д.В. (2015). Динамика агрегированности суспензионной культуры клеток женьшеня японского *Panax japonicus* var. *repens* при выращивании в колбах. В сб: *VIII Съезд общества физиологов растений России «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий»*. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, с.128.

3. Глаголева Е.С., Кочкин Д.В. (2016). Влияние гормонального состава среды на накопление гинзенозидов в суспензионной культуре клеток женьшеня японского *Panax japonicus* var. *repens* при выращивании в колбах. В сб: *Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России, Acta Naturae Спецвыпуск Том 1*. Сочи: Союз физиологических обществ стран СНГ, с. 221.

4. Glagoleva E.S., Konstantinova S.V., Titova M.V., Kochkin D.V. (2018). The effect of growth media phytohormones composition on ginsenosides profile in *Panax japonicus*. In: *XIth International conference: The biology of plant cells in vitro and biotechnology*. Minsk: Medisont, pp. 46-47.

5. Глаголева Е.С., Суханова Е.С., Кочкин Д.В. (2019). Влияние гипоксии на накопление гинзенозидов в суспензионной культуре клеток *Panax japonicus* var. *repens*. В сб: *IX Съезд общества физиологов растений России «Физиология растений — основа создания растений будущего»*. Казань: Изд-во Казанского ун-та, с. 119.

6. Кочкин Д.В., Глаголева Е.С., Глоба Е.Б., Демидова Е.В., Ключин А.Г., Галишев Б.А., Носов А.М. (2020). Особенности образования дитерпеноидов и тритерпеноидов в культурах клеток высших растений (на примере *Dioscorea deltoidea*, *Panax* spp. и *Taxus* spp. В сб: *Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии*. Екатеринбург: Изд-во АМБ., с. 570-572.