

На правах рукописи



Томилова Светлана Вячеславовна

Особенности ростовых и биосинтетических характеристик культур клеток, полученных из растений-продуцентов стероидных и сердечных гликозидов

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре физиологии растений биологического факультета Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» и в лаборатории биологии культивируемых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор

Носов Александр Михайлович

Официальные оппоненты:

Калашникова Елена Анатольевна,

доктор биологических наук, заведующий кафедрой биотехнологии, профессор,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.Тимирязева», г. Москва.

Овчинникова Вера Николаевна,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», г. Москва.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева», Институт естественных наук и биотехнологии, г. Орел.

Защита состоится 22 декабря 2020 г. в 15 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 Института 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 « »

2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время значительно увеличился интерес к использованию биологически активных веществ растений для создания лекарственных препаратов, пищевых добавок, косметических и парфюмерных средств. Достаточно часто лекарственные растения относятся к редким и эндемичным видам, к тому же для них характерен нестабильный химический состав и высокая вероятность естественного и антропогенного загрязнения, зависящие от условий произрастания. Поэтому поиск экологически чистого возобновляемого растительного сырья с высоким содержанием целевых веществ независимо от климатических и погодных условий является весьма актуальной задачей. Одним из перспективных подходов к решению этой проблемы считается использование культур клеток высших растений.

Большинство работ, направленных на изучение вторичного метаболизма в растительных клетках *in vitro*, обычно акцентируют внимание на поиске конкретных биологически активных субстанций, которые интересны с точки зрения создания тех или иных лекарственных средств. Поэтому длительное время считалось, что продукция вторичных соединений в культуре клеток высших растений – это скорее исключение, чем правило, что подтверждалось наличием ряда веществ, синтез которых было сложно или практически невозможно получить в этой биологической системе. Сейчас взгляд на вторичный метаболизм в клетках *in vitro* начал изменяться из-за более детальных исследований спектра фитохимических соединений в культурах клеток. В настоящее время становится ясно, что большинство растительных клеток *in vitro* способны продуцировать вторичные метаболиты, но данный процесс имеет существенные особенности, определяющиеся свойствами этой биологической системы.

Наиболее обширным классом веществ вторичного обмена растений считаются изопреноиды, к которым относятся стероидные и сердечные гликозиды, обладающие широким спектром биологических активностей. Известным примером стабильного синтеза и сверхпродукции стероидных гликозидов в культуре клеток высших

растений является суспензионная культура *Dioscorea deltoidea* Wall. Содержание этих соединений в ней существенно выше, чем в интактном растении, к тому же во всех полученных штаммах и линиях культуры клеток они представлены преимущественно в виде олигофуранозидов. Альтернативным вариантом образования стероидных веществ в системе *in vitro* является формирование сердечных гликозидов. Исследованием этой проблемы занимались многие группы ученых, которые использовали в качестве объекта преимущественно культуры клеток, тканей и органов разных видов рода *Digitalis*. В подавляющем большинстве случаев образования сердечных гликозидов в клетках *in vitro* либо не происходило, либо было зафиксировано наличие незначительных количеств этих соединений сразу после получения культуры клеток, однако в ходе длительного культивирования их содержание там падало вплоть до полного исчезновения.

Исходя из вышесказанного, изучение особенностей формирования фармацевтически ценных групп изопреноидов в культурах клеток растений имеет как существенное фундаментальное (выяснение общих и индивидуальных закономерностей вторичного метаболизма в растительных клетках *in vitro*), так и прикладное (получение штаммов-продуцентов биологически активных соединений) значение.

Цель и задачи. Целью работы стало исследование ростовых и биосинтетических характеристик культур клеток, полученных из растений-продуцентов стероидных и сердечных гликозидов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести качественный и количественный анализ стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. при стандартном выращивании в колбах.
2. Изучить влияние состава фитогормонов на образование стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris*.

3. Исследовать влияние стрессовых факторов (повышенные концентрации ионов меди) на синтез стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris*.
4. Получить культуры клеток растений-продуцентов сердечных гликозидов (*Digitalis* spp., *Asclepias* spp.).
5. Исследовать ростовые и биосинтетические характеристики полученных культур клеток наперстянки *Digitalis* spp. и ваточника *Asclepias* spp.
6. Провести идентификацию обнаруженных вторичных метаболитов в культурах клеток *Tribulus terrestris*, *Digitalis* spp. и *Asclepias* spp. методом УЭЖХ ЭР МС.
7. Сравнить особенности образования вторичных метаболитов в различных культурах клеток растений-продуцентов стероидных и сердечных гликозидов.

Научная новизна. Впервые получены культуры клеток *Digitalis ciliata*, *D. grandiflora*, *Asclepias latifolia*, *A. tuberosa* и изучены их ростовые и биосинтетические характеристики. Установлены закономерности влияния ряда химических факторов культивирования (изменение состава фитогормонов, стрессовые воздействия – повышенные концентрации ионов меди) на ростовые характеристики и синтез стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Tribulus terrestris*. Выявлены общие и индивидуальные особенности формирования вторичных метаболитов в различных культурах клеток растений-продуцентов стероидных и сердечных гликозидов.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Результаты исследования имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Разработаны условия культивирования и химического анализа вторичных метаболитов культур клеток высших растений-продуцентов стероидных и сердечных гликозидов. Выявлены некоторые закономерности вторичного метаболизма в растительных клетках *in vitro*. Получены новые культуры клеток растений *Digitalis* spp., содержащие стероидные гликозиды фураностанолового ряда и фенилэтаноиды. Оптимизированы синтез и накопление фураностаноловых гликозидов в суспензионной культуре клеток *Tribulus terrestris*. Материалы диссертации могут быть использованы

в области фитобиотехнологии и фармакогнозии, а также при изучении фундаментальных проблем физиологии растений.

Методология и методы исследования. Методология исследования включала общепринятые протоколы и методики из специализированных источников информации. Работа выполнена с применением современных биотехнологических, цитофизиологических и физико-химических методов.

Положения, выносимые на защиту. В рамках специальности 03.01.05 «Физиология и биохимия растений» решены задачи получения культур клеток растений-продуцентов ценных биологически активных веществ и изучения специфики вторичного метаболизма в дедифференцированных растительных клетках *in vitro*, в частности:

1. Получение культур клеток растений-продуцентов сердечных гликозидов, таких как *Digitalis* spp. и *Asclepias* spp. Исследование ростовых и биосинтетических особенностей данных объектов.
2. Оптимизация условий культивирования (изменение состава фитогормонов, стрессовые факторы – повышенные концентрации ионов меди) для суспензионной культуры клеток якорцев стелющихся *T. terrestris* с целью регуляции синтеза и накопления стероидных гликозидов.
3. Изучение и сравнение особенностей образования биологически активных соединений – вторичных метаболитов в различных культурах клеток высших растений-продуцентов стероидных и сердечных гликозидов.

Степень достоверности результатов и апробация работы. При выполнении работы были использованы современные и адекватные биотехнологические, цитофизиологические и физико-химические методы. Эксперименты проведены в достаточной биологической и аналитической повторностях. Выводы обоснованы экспериментальными данными и отражены в печатных работах. Результаты исследования были представлены в стендовых и устных докладах на следующих международных конференциях: PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы:

биотехнология будущего» (Уфа, 2018), XI Международная конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Минск, Республика Беларусь, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ, из которых 4 – в международных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 162 страницах машинописного текста. Содержит 20 таблиц и 59 рисунков. Список цитируемой литературы включает 159 наименований, в том числе 143 на иностранном языке.

Принятые сокращения и обозначения. MS – питательная среда Мурасиге и Скуга; 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; БАП – 6-бензиламинопурин; α -НУК – α -нафтилуксусная кислота. ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией; ТСХ – тонкослойная хроматография; УЭЖХ ЭР МС – ультраэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы.

Обзор литературы состоит из 7 разделов и включает в себя общую информацию по стероидным и сердечным гликозидам, биологии, химии и применению некоторых растений-продуцентов этих групп изопреноидов (*Tribulus terrestris*, *Digitalis* и *Asclepias* spp.), культивированию растительных клеток *in vitro* и особенностям вторичного метаболизма в этой биологической системе.

Глава 2. Материалы и методы.

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были использованы:

1. Суспензионная культура клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. (штамм Tter 8 коллекционный №81 во Всероссийской коллекции культур клеток высших

растений), получена в 2014 г. М.Т. Ханды с соавт. в ИФР РАН из каллусной культуры клеток *T. terrestris*.

2. Культуры клеток и тканей растений-продуцентов сердечных гликозидов, полученные автором в 2017 – 2019 годах (ризогенная, каллусные и суспензионные культуры *Digitalis* и *Asclepias* spp.) во время выполнения настоящей работы.

2.2. Условия получения и выращивания культур клеток и ризогенных тканей *in vitro*

Для получения и выращивания культур клеток и ризогенных тканей высших растений применяли среды с минеральной основой по Мурасиге и Скугу (MS) с добавлением гидролизата казеина (0,5 г/л), мио-инозитола (0,1 г/л), тиамин (0,1 мг/л), пиридоксина (0,1 – 0,5 мг/л), никотиновой кислоты (0,5 мг/л), 3% сахарозы и регуляторов роста – 2,4-Д, α -НУК, БАП и кинетин в различных соотношениях и концентрациях (0,5 – 2,5 мг/л). Для ризогенной и каллусных культур использовали агаризованные среды с добавлением 0,8% агара. Для экспериментов по влиянию ионов меди использовали раствор сульфата меди.

Культивирование осуществляли в темноте при $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Ризогенную и каллусные культуры выращивали на чашках Петри, цикл культивирования 35 – 40 суток, суспензионные культуры клеток – в колбах на ротационных шейкерах (100 об./мин.), циклы культивирования для суспензионных культур *T. terrestris* и *Asclepias* spp. составляли 14 суток, для суспензионных культур клеток *Digitalis* spp. – 21 сутки.

2.3. Методы получения и определения ростовых характеристик культур клеток и ризогенных тканей *in vitro*

Для получения культур клеток и тканей *Digitalis* spp. и *Asclepias* spp. использовали асептические проростки и растения, полученные из семян, которые стерилизовали хлор-содержащими реагентами. Для получения суспензионных культур клеток использовали каллусные культуры, которые помещали в колбы с жидкой питательной средой на ротационный шейкер.

Для характеристики роста и физиологического состояния культур использовали сухую и сырую биомассу, для суспензионных культур клеток – дополнительно концентрацию и жизнеспособность клеток. На основании полученных результатов

строили кривые роста в стандартной и полулогарифмической системах координат и рассчитывали по общепринятым методикам (Носов, 2012) производные параметры роста: индекс роста (I), удельную скорость роста (μ), время удвоения биомассы (τ), экономический коэффициент (Y), продуктивность по биомассе (P).

2.4. Качественный и количественный анализ вторичных метаболитов в культурах клеток и ризогенных тканей *in vitro*

Для исследования фитохимического состава культур клеток и тканей *in vitro* использовали методы ТСХ, высокоэффективной и ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС и УЭЖХ ЭР МС) и спектрофотометрического анализа. Для приготовления проб проводили экстракцию биомассы 70% этанолом на ультразвуке (УЗ-ванна «Сапфир», Россия).

Разделение стероидных гликозидов методом ТСХ проводили в системе хлороформ : метанол : вода в соотношении 65 : 35 : 10 , для проявления хроматограмм применяли 1% раствор реактива Эрлиха.

УЭЖХ ЭР МС-анализ проводили в режиме детектирования положительных ионов (диапазон m/z 100 – 1500) на хроматографе Waters Acquity UPLC (Waters, США), колонка ACQUITY UPLC VEN Phenyl (50×2,1 мм, 1,7 мкм; Waters, Ирландия. ВЭЖХ-МС анализ осуществляли в режиме детектирования отрицательных ионов (диапазон m/z 100 – 1300) на приборе Agilent 1260 Infinity («Agilent Technologies», США). Колонка: Poroshell 120 EC-C18 (100 мм × 3 мм, 2,7 мкм, «Agilent», США). Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования. В качестве компонентов подвижной фазы использовали растворы муравьиной кислоты (в разных концентрациях) в воде и ацетонитрил.

ВЭЖХ-МС количественное определение содержания индивидуальных гликозидов фенилэтаноидов проводили методом внешней калибровки против стандартного образца эхинакозида (Sigma, США).

Для количественного анализа стероидных гликозидов использовали спектрофотометр «Униплан» (ЗАО «Пикон», Россия). К спиртовым экстрактам добавляли реактив Эрлиха, инкубировали смесь в термостате при $50 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 2

часов и измеряли оптическую плотность при 520 нм. Концентрацию соединений вычисляли по калибровочному графику, построенному по препарату «Дельтостим».

2.5. Статистическая обработка результатов

Определение ростовых характеристик и жизнеспособности клеток проводили в 2 – 3 биологических повторностях. Качественное и количественное определение вторичных метаболитов осуществляли в индивидуальном экстракте. Анализ данных проводили с помощью программы Excel, входящей в состав офисного пакета приложений Microsoft Office 2010. На графиках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Глава 3. Результаты и обсуждение.

3.1. Особенности вторичного метаболизма и оптимизация синтеза стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Tribulus terrestris*

Для исследования физиолого-биохимических характеристик суспензионной культуры клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* было осуществлено ее выращивание при стандартных условиях. Установлено, что культура *T. terrestris* характеризовалась значительной разнородностью клеточного состава и содержала небольшие агрегаты из меристемоподобных и паренхимоподобных клеток, а также существенное количество одиночных удлинённых и аномальных клеток (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Микрофотография суспензионной культуры клеток *T. terrestris* (увеличение – 360х).

Кривая роста и жизнеспособность культуры представлены на Рисунке 2 (контрольный вариант), производные параметры роста – в Таблице 1.

Таблица 1 – Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *T. terrestris*

| Показатель роста | Производные параметры роста | | | | | |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------|------------------|-------------|--------------|
| | I | μ , сут ⁻¹ | τ , сут | M_{\max} , г/л | Y | P, г/(л×сут) |
| Концентрация клеток | 8,3 ± 0,4 | 0,31 ± 0,02 | 2,23 ± 0,11 | 15,8 ± 0,8 | 0,48 ± 0,02 | 1,49 ± 0,07 |
| Сырая биомасса | 11,6 ± 0,6 | 0,39 ± 0,02 | 1,77 ± 0,09 | | | |
| Сухая биомасса | 11,4 ± 0,6 | 0,32 ± 0,02 | 2,16 ± 0,11 | | | |

Параметры: I – индекс роста, μ – удельная скорость роста, τ – время удвоения биомассы, M_{\max} – максимальное накопление сухой биомассы, Y – экономический коэффициент, P – максимальная продуктивность по сухой биомассе.

Как следует из представленных результатов, суспензионную культуру клеток *T. terrestris* можно отнести к хорошо растущим культурам.

Было проведено исследование влияние состава ауксинов на ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *T. terrestris*. Для этого в течение трех последовательных циклов культивирования клетки выращивали на средах, в которых 2,4-Д был заменен на α -НУК, при этом использовали два варианта сред, содержащих 2 мг/л α -НУК + 1 мг/л БАП, или 1 мг/л α -НУК + 1 мг/л 2,4-Д + 1 мг/л БАП.

Для варианта, который выращивали на среде с 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л БАП, наблюдали значительное изменение ростовых и цитофизиологических характеристик. Стоит отметить, что на третьем цикле культивирования рост культуры практически прекращался, и происходило сильное падение жизнеспособности клеток (ниже 50%), кроме того наблюдалось образование крупных, плотных агрегатов (Рисунок 2).

Для варианта культуры клеток на среде с одновременным присутствием 2,4-Д и α -НУК на фоне повышения агрегированности культуры значимого ухудшения ростовых и физиологических характеристик отмечено не было (Рисунок 3).

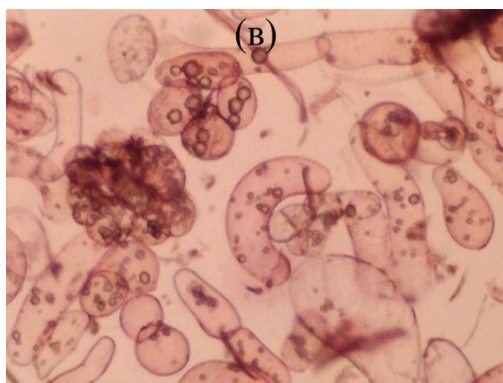
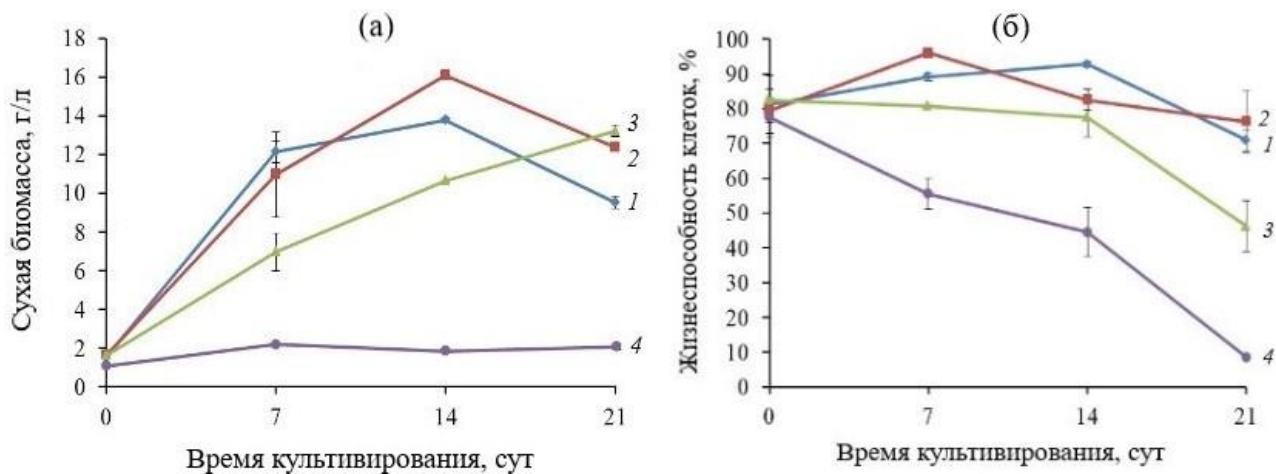


Рисунок 2 – Кривые роста по накоплению сухой биомассы (а), жизнеспособность клеток (б) и микрофотография (в; увеличение – 360х) суспензионной культуры *T. terrestris* на среде с 2 мг/л α -НУК и 1 мг/л БАП:

- 1 – контроль (2 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП);
- 2 – 1-й цикл культивирования;
- 3 – 2-й цикл культивирования;
- 4 – 3-й цикл культивирования.

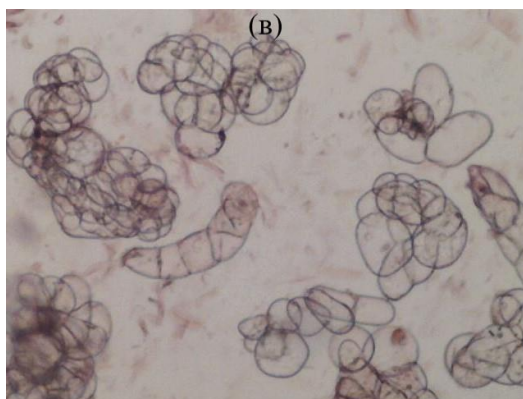
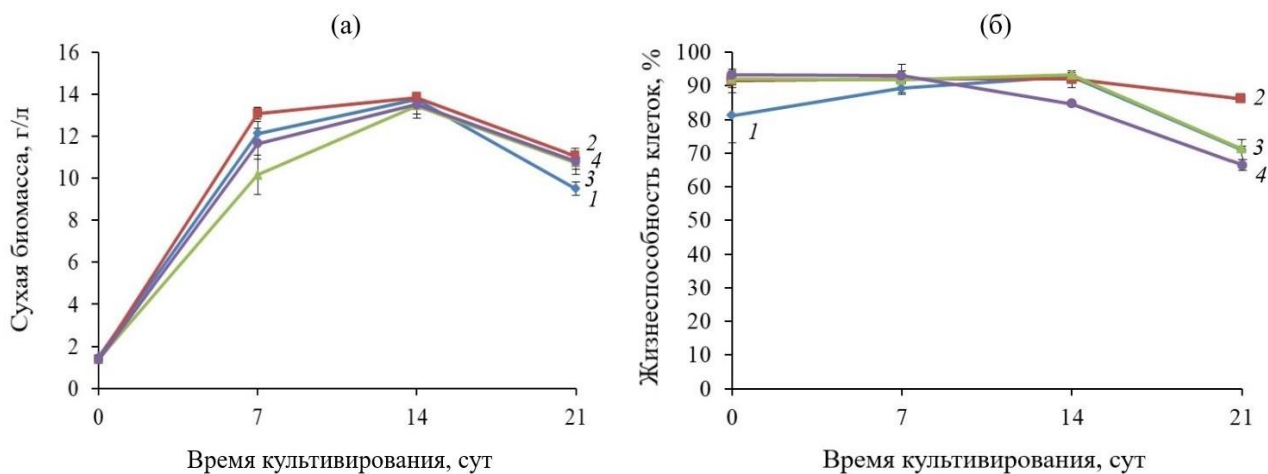


Рисунок 3 – Кривые роста по накоплению сухой биомассы (а), жизнеспособность клеток (б) и микрофотография (в; увеличение – 360х) суспензионной культуры *T. terrestris* на среде с 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л α -НУК и 1 мг/л БАП:

- 1 – контроль (2 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП);
- 2 – 1-й цикл культивирования;
- 3 – 2-й цикл культивирования;
- 4 – 3-й цикл культивирования.

Для изучения влияния стрессовых воздействий на характеристики суспензионной культуры клеток *T. terrestris* были исследованы особенности ее роста при выращивании на питательных средах с повышенными концентрациями ионов меди (0,5, 1, 2, 3, 5, 10 мкМ; контроль – 0,1 мкМ ионов меди в среде MS). Отмечено, что увеличение содержания ионов меди в питательной среде существенно не влияло на накопление биомассы культуры клеток. Повышение концентрации ионов меди в среде в 5, 10, 20 и 30 раз не приводило к заметному падению жизнеспособности клеток. Значительное снижение жизнеспособности культуры (ниже 50%) наблюдали лишь при повышении содержания ионов меди в питательной среде в 50 и 100 раз по сравнению с контролем (Рисунок 4).

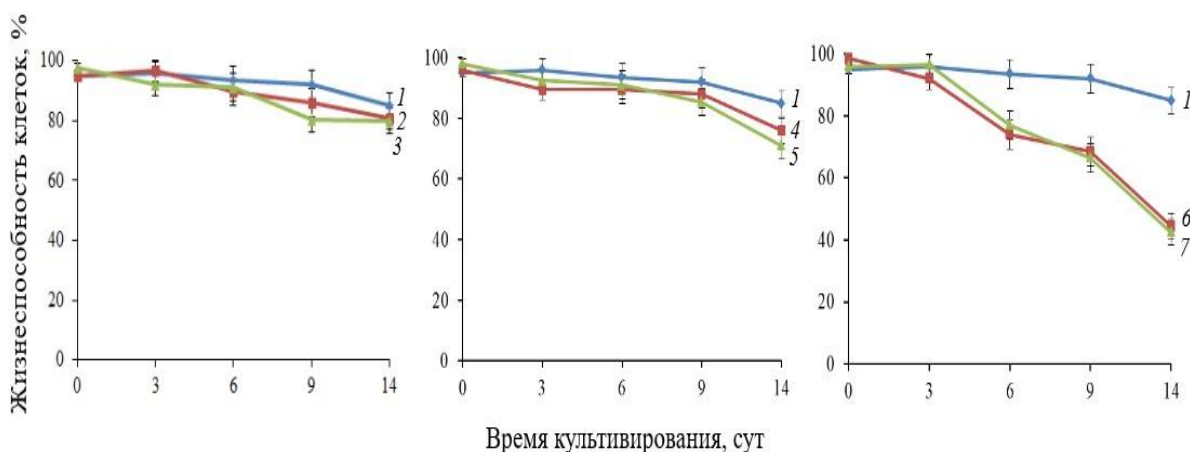


Рисунок 4 – Жизнеспособность суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращиваемой на средах с повышенной концентрацией ионов меди: 1 – 0,1 мкМ (контроль); 2 – 0,5 мкМ; 3 – 1 мкМ; 4 – 2 мкМ; 5 – 3 мкМ; 6 – 5 мкМ; 7 – 10 мкМ.

Фитохимический анализ методом УЭЖХ ЭР МС показал, что наибольшее структурное разнообразие стероидных гликозидов (в общей сложности 9 соединений) было обнаружено в экстракте из биомассы культуры клеток *T. terrestris*, выращенной на среде с α -НУК в качестве ауксина. При этом в биомассе контрольного варианта культуры (на среде с 2,4-Д) было найдено только 5 гликозидов с относительно низкой интенсивностью сигнала. В свою очередь, при анализе экстрактов из биомассы культуры клеток, выращенной на среде с повышенными концентрациями ионов меди, было отмечено наличие пиков лишь двух соединений, относящихся к стероидным гликозидам (Рисунок 5).

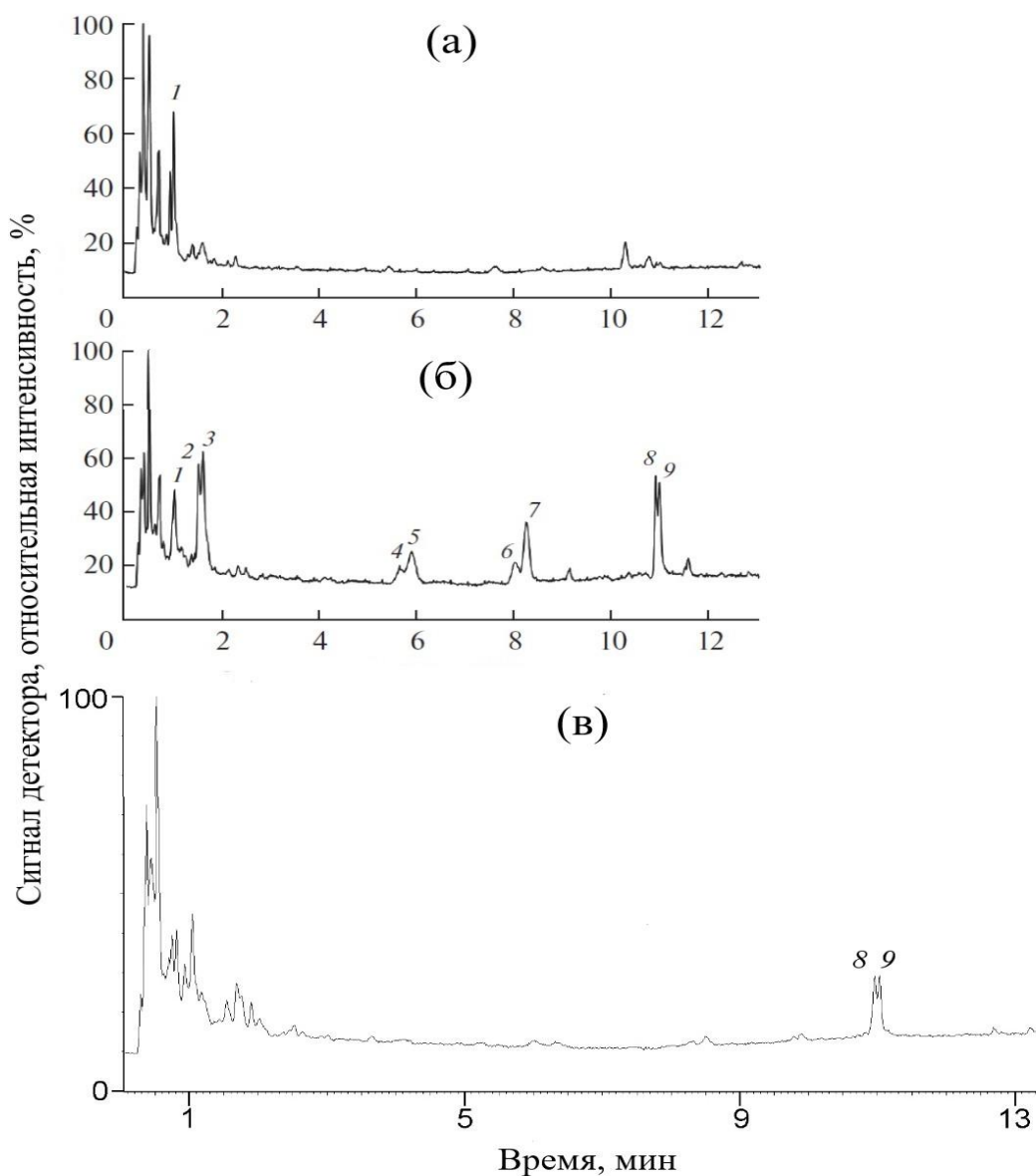


Рисунок 5 – УЭЖХ ЭР МС-хроматограммы (записаны в режиме полного ионного тока при регистрации положительных ионов) экстрактов из биомассы суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращенных на средах с 2,4-Д (а), α -НУК (б) и 10 мкМ ионов меди (в). Номера 1 – 9 – пики идентифицированных гликозидов.

Обнаруженные соединения являлись производными трех агликонов – гидрокси-диосгенина (соединение 1), гитогенина/неогитогенина (соединения 2 – 3), тигогенина/неотигогенина (соединения 4 – 9) и имели фураностаноловую структуру (Рисунок 6).

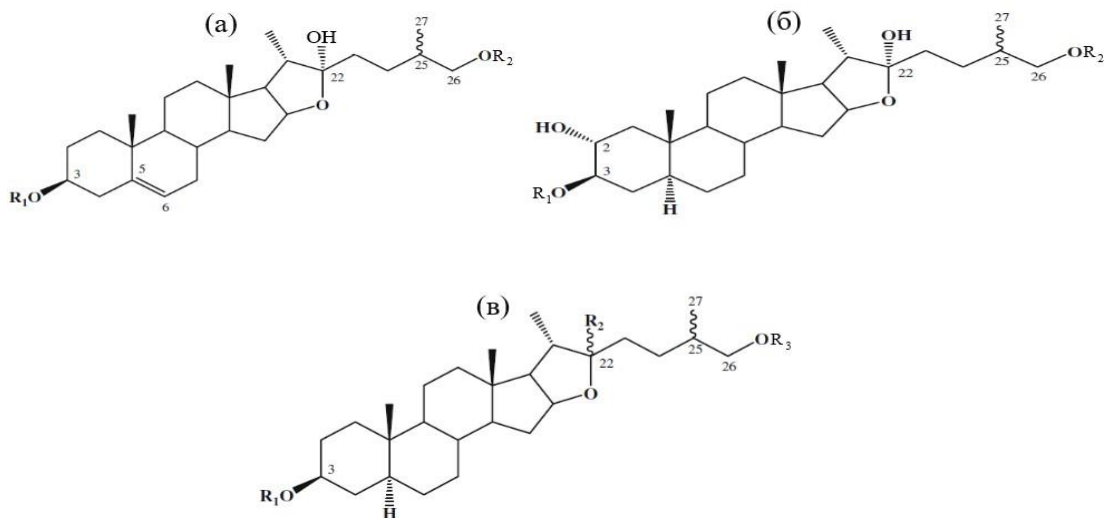


Рисунок 6 – Химические структуры агликонов фурастаноловых гликозидов суспензионной культуры клеток *T. terrestris* (Kostova, Dinchev, 2005): (а) – гидроксидиосгенин (дополнительная гидроксильная группа расположена у C1 или C2); (б) – гитогенин/неогитогенин; (в) – тигогенин/неотигогенин.

Количественный анализ стероидных гликозидов показал, что максимальное повышение концентрации соединений – в 6,6 раза – зафиксировано на средах с α -НУК, для сред с α -НУК и 2,4-Д (Таблица 2), а также при стрессовом воздействии (повышенные концентрации ионов меди) отмечено возрастание содержания примерно в 3 раза по сравнению с контролем.

Таблица 2 – Количественное содержание фурастаноловых гликозидов (ФГ) в биомассе суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращенной на средах с различным составом регуляторов роста

| Комбинация фитогормонов в среде культивирования | Период культивирования | Содержание ФГ, мг/г сухой массы |
|---|------------------------|---------------------------------|
| Контроль: 2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л БАП | 14 сут | 1,02 ± 0,01 |
| 2 мг/л α -НУК, 1 мг/л БАП | 1 цикл, 7 сут | 3,41 ± 0,02 |
| | 1 цикл, 14 сут | 6,79 ± 0,03 |
| | 2 цикл, 14 сут | 1,59 ± 0,01 |
| | 3 цикл, 14 сут | 1,31 ± 0,01 |
| 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л α -НУК, 1 мг/л БАП | 1 цикл, 7 сут | 0,99 ± 0,01 |
| | 1 цикл, 14 сут | 1,75 ± 0,01 |
| | 2 цикл, 14 сут | 2,88 ± 0,01 |
| | 3 цикл, 14 сут | 1,93 ± 0,01 |

3.2. Получение и ростовые характеристики культур клеток *Digitalis* spp. и *Asclepias* spp.

В качестве эксплантов для получения культур клеток и ризогенной ткани *Digitalis* spp. использовали семядольные листья и гипокотили асептических проростков, для получения культур клеток *Asclepias* spp. – листья, стебли и корни стерильных растений. Суспензионные культуры клеток получали из хорошо растущих рыхлых каллусных культур.

Суспензионные культуры клеток *Digitalis* spp. содержали преимущественно крупные агрегаты, состоящие из мелких меристемоподобных и паренхимоподобных клеток, а также одиночные паренхимоподобные, удлинённые и аномальные клетки (Рисунок 7).

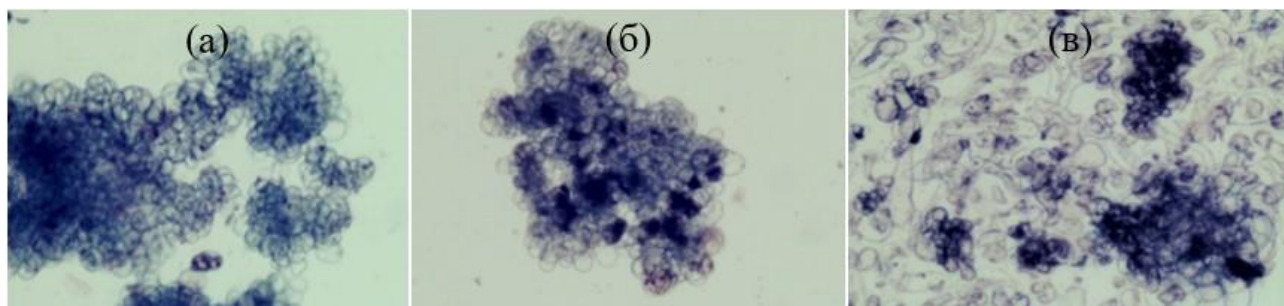


Рисунок 7 – Микрофотографии суспензионных культур клеток *D. ciliata* (а), *D. grandiflora* (б) и *D. lanata* (в) (увеличение – 360х).

Суспензионные культуры клеток *Asclepias* spp. состояли из небольших агрегатов из крупных меристемоподобных, паренхимоподобных и удлинённых клеток, также встречалось много одиночных меристемоподобных, паренхимоподобных и удлинённых аномальных клеток (Рисунок 8).

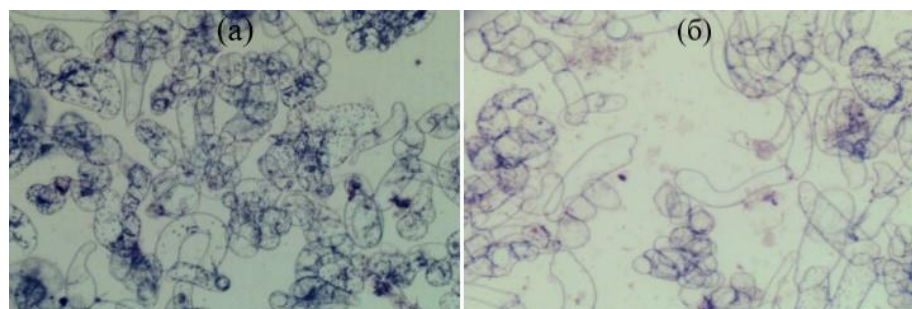


Рисунок 8 – Микрофотографии суспензионных культур клеток *A. latifolia* (а) и *A. tuberosa* (б) (увеличение – 360х).

Все полученные суспензионные культуры имели удовлетворительные, либо хорошие ростовые характеристики. Стоит отметить, что для культур клеток *Digitalis* spp. был характерен более медленный, стабильный рост с периодами длительных лаг-фаз и низким приростом биомассы, тогда как для культур клеток *Asclepias* spp. наблюдался быстрый переход к активной экспоненциальной фазе роста (Рисунок 9, Таблица 3). Жизнеспособность клеток для большинства культур на протяжении периода выращивания (14 – 21 сутки) сохранялась на уровне 70 – 80%, только в случае с суспензионной культурой *D. lanata* она была 60 – 70%.

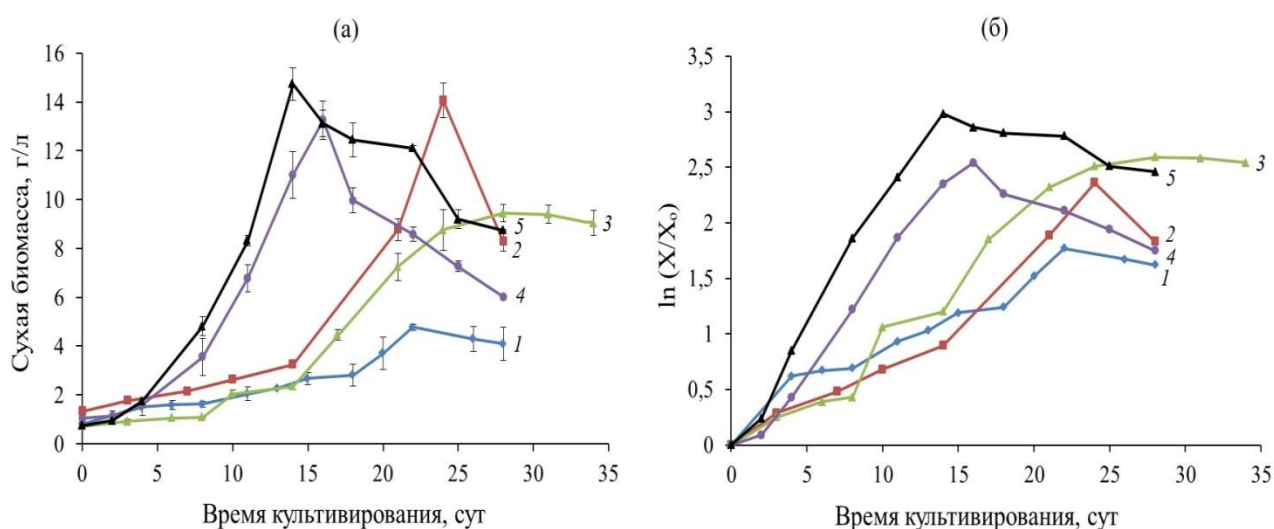


Рисунок 9 – Кривые роста по накоплению сухой биомассы в обычной (а) и полулогарифмической (б) системе координат полученных суспензионных культур клеток: 1 – *D. ciliata*; 2 – *D. grandiflora*; 3 – *D. lanata*; 4 – *A. latifolia*; 5 – *A. tuberosa*.

Таблица 3 – Индексы роста (I) по сырой и сухой биомассе полученных суспензионных культур клеток

| Суспензионная культура клеток | I по сырой биомассе | I по сухой биомассе |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|
| <i>D. ciliata</i> | 6,4 ± 0,3 | 5,9 ± 0,3 |
| <i>D. grandiflora</i> | 10,2 ± 0,5 | 10,6 ± 0,5 |
| <i>D. lanata</i> | 12,3 ± 0,6 | 13,3 ± 0,7 |
| <i>A. latifolia</i> | 12,8 ± 0,6 | 12,7 ± 0,6 |
| <i>A. tuberosa</i> | 15,3 ± 0,8 | 19,6 ± 0,9 |

3.3. Вторичный метаболизм в культурах клеток и ризогенной ткани *Digitalis* spp. и *Asclepias* spp.

Фитохимический анализ методами ВЭЖХ-МС и УЭЖХ ЭР МС в культурах клеток и ризогенной ткани *Digitalis* spp. и *Asclepias* spp. показал отсутствие во всех экстрактах сердечных гликозидов (карденолидов), которые являются основными вторичными метаболитами интактных растений.

В свою очередь, в культурах клеток и ризогенной ткани *Digitalis* spp. были найдены фенилэтаноиды и стероидные гликозиды фуростанолового ряда. В ходе анализов обнаружено порядка 10 фенилэтаноидных (пурпуреазид Е, максозид, дигицилизид А, дигицилизид В и их производные) и 5 фуростаноловых гликозидов (производные гитогенина и тигогенина) (Рисунок 10).

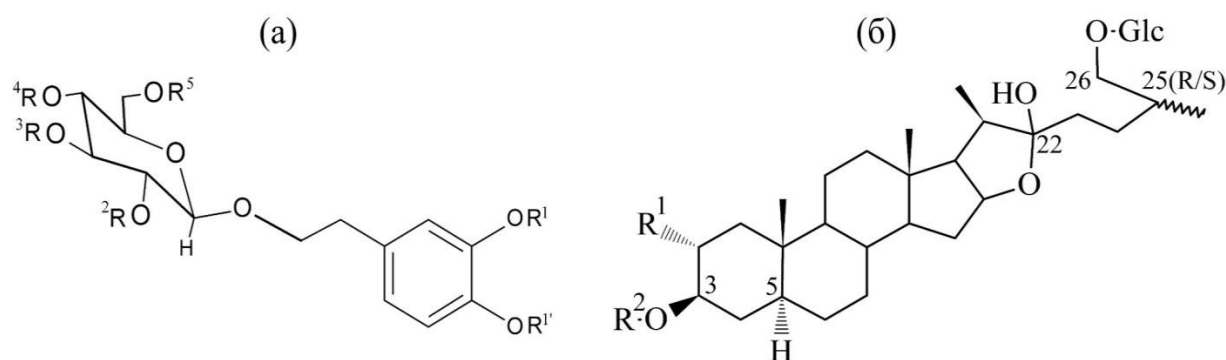


Рисунок 10 – Общие химические структуры фенилэтаноидных соединений (а) и фуростаноловых гликозидов (б) (Clemente et al., 2011; Kirmizibekmez et al., 2017), обнаруженных в культурах клеток и ризогенной ткани *Digitalis* spp.

Следует отметить, что максимальное разнообразие фуростаноловых гликозидов было характерно для культур клеток и ризогенной ткани *D. lanata*, тогда как в каллусных и суспензионных культурах *D. ciliata* и *D. grandiflora* встречались преимущественно фенилэтаноиды.

Количественный анализ методом ВЭЖХ-МС гликозидов фенилэтаноидов в культурах клеток *Digitalis* spp. показал, что во всех представленных образцах содержание этих соединений достигало 0,5 – 1% к сухой массе клеток, при этом содержание различных соединений было индивидуально для каждой культуры (Таблица 4).

Таблица 4 – Количественный анализ гликозидов фенолэтанойдов в биомассе культур клеток *Digitalis* spp.

| Название соединения | Содержание гликозидов фенолэтанойдов в культурах клеток <i>Digitalis</i> spp., мг/г сухой биомассы | | | |
|---------------------------------|--|--|---|---|
| | каллусная культура клеток <i>D. lanata</i> | суспензионная культура клеток <i>D. lanata</i> | суспензионная культура клеток <i>D. ciliata</i> | суспензионная культура клеток <i>D. grandiflora</i> |
| деметил-пурпуреазид Е | 0,89 ± 0,09 | 1,16 ± 0,12 | 6,51 ± 0,65 | 4,67 ± 0,47 |
| пурпуреазид Е | 0,07 ± 0,01 | 0,08 ± 0,01 | 1,56 ± 0,16 | 1,87 ± 0,19 |
| изомер пурпуреазида Е | 0,10 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 0,31 ± 0,03 | – |
| максозид | 2,68 ± 0,27 | 2,81 ± 0,28 | 1,87 ± 0,19 | 0,31 ± 0,03 |
| дигицилизид А | 0,04 ± 0,004 | 0,07 ± 0,01 | 0,32 ± 0,03 | 0,03 ± 0,003 |
| изомер дигицилизид А | 0,05 ± 0,005 | 0,06 ± 0,01 | – | – |
| метил-максозид | 0,37 ± 0,04 | 0,36 ± 0,04 | 0,39 ± 0,04 | – |
| изомер метил-максозид | 0,12 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 0,44 ± 0,04 | 0,22 ± 0,02 |
| деметил-дигицилизид В | 0,37 ± 0,04 | 0,27 ± 0,03 | – | 1,05 ± 0,11 |
| диметил-дигицилизид В | – | 0,03 ± 0,003 | – | – |
| Сумма гликозидов фенолэтанойдов | 4,70 ± 0,47 | 5,15 ± 0,52 | 11,40 ± 1,14 | 8,14 ± 0,81 |

В случае с культурами клеток *Asclepias* spp. стероидные гликозиды и фенолэтанойды, которые встречались в культурах клеток и тканей *T. terrestris* и *Digitalis* spp., обнаружены не были. На хроматограммах отмечен ряд пиков, которые могут относиться к вторичным метаболитам, но в связи с тем, что интенсивность сигнала веществ достаточно низкая, на данном этапе их не удалось надежно идентифицировать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были получены каллусные и суспензионные культуры клеток высших растений-продуцентов сердечных гликозидов *Digitalis* spp. и *Asclepias* spp., ряд из которых, судя по доступным информационным источникам, впервые (*Digitalis*

ciliata и *D. grandiflora*, *Asclepias latifolia* и *A. tuberosa*). Был оптимизирован рост полученных культур клеток, в результате чего все исследованные объекты имели удовлетворительные, либо хорошие ростовые характеристики. Были изучены особенности вторичного метаболизма в полученных культурах клеток и ризогенной ткани *Digitalis* spp. и *Asclepias* spp. Во всех исследуемых культурах показано отсутствие сердечных гликозидов (основных вторичных метаболитов растений), при этом фитохимический анализ соединений в культурах клеток и ризогенной ткани *Digitalis* spp. выявил наличие в них гликозидов фенилэтаноидов (дигицилизид А, дигицилизид В, пурпуреазид, максозид и их производные) с содержанием порядка 0,5 – 1% к сухой массе клеток и стероидных гликозидов фуростанолового ряда производных двух агликонов – гитогенина и тигогенина.

Для сопоставления обнаруженных закономерностей была исследована культура клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* – продуцент другой группы изопреноидов – стероидных гликозидов. Установлено, что важным моментом вторичного метаболизма для этой культуры является образование в ней только стероидных гликозидов фуростанолового ряда. Ранее образование фуростаноловых гликозидов установлено для культур клеток *Dioscorea deltoidea* Wall. (Nosov et al., 2014), что свидетельствует об универсальности этого явления. Изучено влияние различных факторов (изменение состава фитогормонов, стрессовое воздействие – повышенные концентрации ионов меди) на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *T. terrestris*. Изменение в среде выращивания культуры клеток состава синтетических аналогов ауксинов, а именно замена 2,4-Д на α -НУК, влияло как на количественное содержание фуростаноловых гликозидов (повышение до 6 раз), так и на их качественный состав (9 соединений на среде с α -НУК по сравнению с 5 на среде с 2,4-Д), но при этом на средах с α -НУК наблюдалось изменение морфологии клеток, их агрегированности и постепенное снижение жизнеспособности культуры вплоть до ее гибели. В свою очередь совместное присутствие в среде 2,4-Д и α -НУК также увеличивало концентрацию стероидных гликозидов, но в меньшей степени (до 3 раз), однако культура клеток

сохраняла удовлетворительные ростовые характеристики и высокую жизнеспособность. Результаты работы хорошо согласуются с данными, полученными с культурой клеток женьшеня *Panax ginseng* С.А.Меу, для которой замена 2,4-Д на α -НУК приводила к аналогичным изменениям: повышение агрегированности культуры, постепенное снижение ростовых характеристик, интенсификация образования гинзенозидов (Смоленская и др., 2007), что может свидетельствовать об универсальном механизме этого влияния. Стрессовое воздействие на суспензионную культуру клеток *T. terrestris* (высокие концентрации ионов меди в питательной среде) серьезно не ухудшало ростовые характеристики клеток *in vitro*, но увеличивало накопление стероидных гликозидов без изменения их качественного состава.

Проведенные исследования позволили установить ряд закономерностей в образовании изопреноидов в дедифференцированных клетках высших растений и подтвердить гипотезу о наличии специфических особенностей вторичного метаболизма в клетках *in vitro*. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейших исследований в данной области физиологии и биохимии растений, а также для разработки биотехнологий получения возобновляемого растительного сырья редких видов лекарственных растений.

ВЫВОДЫ

1. Для суспензионной культуры клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris*, которая является продуцентом стероидных гликозидов, показано образование данных соединений, причем исключительно в фураностаноловой форме, что согласуется с известными результатами, полученными на культурах клеток диоскореи дельтовидной *Dioscorea deltoidea*.
2. Изменение в среде выращивания суспензионной культуры *T. terrestris* состава синтетических аналогов ауксинов (замена 2,4-Д на α -НУК) влияет как на количественное содержание фураностаноловых гликозидов (повышение до 6 раз), так и на их качественный состав (9 олигофураностанозидов на среде с α -НУК по сравнению с 5 на среде с 2,4-Д).

3. Использование повышенных концентраций ионов меди в питательной среде в качестве стрессового воздействия на суспензионную культуру *T. terrestris* оказывает влияние на накопление стероидных гликозидов (увеличение концентрации примерно в 3 раза) без изменения их качественного состава.
4. Во всех исследуемых культурах клеток и ризогенной ткани *Digitalis* spp. и *Asclepias* spp. показано отсутствие сердечных гликозидов, которые являются основными вторичными метаболитами интактных растений.
5. Фитохимический анализ вторичных метаболитов в культурах клеток и ризогенной ткани *Digitalis* spp. выявил наличие в них гликозидов фенилэтаноидов (дигицилизид А, дигицилизид В, пурпуреазид, максозид и их производные) и стероидных гликозидов фураностанолового ряда производных двух агликонов – гитогенина и тигогенина.
6. Количественный анализ фенилэтаноидов в культурах клеток *Digitalis* spp. показал, что содержание этих соединений в них достигало 0,5 – 1% к сухой массе клеток.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в международных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК

1. Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Томилова С.В., Галишев Б.А., Суханова Е.С., Ключин А.Г., Иванов И.М., Носов А.М. (2016) Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. – продуцента стероидных гликозидов. *Биотехнология*, **32(4)**, 21–30.
2. Томилова С.В., Кочкин Д.В., Галишев Б.А., Носов А.М. (2019) Влияние повышенных концентраций ионов меди на ростовые характеристики и синтез стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Tribulus terrestris* L. *Биотехнология*, **35(3)**, 42–49.
3. Томилова С.В., Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Галишев Б.А., Ключин А.Г., Носов А.М. (2020) Влияние синтетических аналогов ауксинов – 2,4-Д и α -НУК – на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris* L. *Физиология растений*, **67(4)**, 389–399.

4. **Lagunin A., Povydysh M., Ivkin D., Luzhanin V., Krasnova M., Okovityi S., Nosov A., Titova M., Tomilova S., Filimonov D., Poroikov V.** (2020) Antihypoxic action of *Panax japonicus*, *Tribulus terrestris* and *Dioscorea deltoidea* cell cultures: in silico and animal studies. *Molecular informatics*, **39**, 1–12.

Публикации в сборниках конференций

1. **Томилова С.В., Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Иванов И.М., Носов А.М.** (2016) Влияние синтетических ауксинов на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионных культур клеток якорцев стелющихся и пажитника греческого. В сб: *Годичное собрание общества физиологов растений России, научная конференция с международным участием «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма»*. Санкт-Петербург: Изд-во Санкт-Петербургского государственного университета, с. 142–143.
2. **Томилова С.В., Кочкин Д.В., Носов А.М.** (2017) Влияние повышенных концентраций ионов меди на рост и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris* L. В сб: *Материалы докладов Годичного собрания Общества физиологов растений России, научной конференции и школы для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты»*. Москва: Изд-во АНО Центр содействия научной, образовательной и просветительской деятельности Соцветие, с. 332.
3. **Томилова С.В.** (2018) Культура клеток *Digitalis* spp. как продуцент сердечных гликозидов. В сб: *Материалы VIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего»*. Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, с. 316–318.
4. **Глаголева Е.С., Лабунская Е.А., Тухтаманова А.С., Томилова С.В.** (2018) Особенности каллусогенеза разных видов наперстянки *Digitalis lanata* Ehrh., *D. grandiflora* Mill., *D. ciliata* Trautv. В сб: *Материалы III научно-практической конференции с международным участием и научной школы по клеточной биотехнологии «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на Севере»*. Якутск: Издательский дом СВФУ, с. 122–124.
5. **Томилова С.В., Глаголева Е.С., Лабунская Е.А., Тухтаманова А.С., Галишев Б.А., Кочкин Д.В.** (2018) Культура клеток *Digitalis* spp. как источник сердечных гликозидов с противоопухолевой активностью. В сб: *Материалы международной*

научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». Уфа: АНО Центр поддержки академических инициатив, с. 236.

6. **Томилова С.В., Глаголева Е.С., Лабунская Е.А., Тухтаманова А.С., Галишев Б.А., Кочкин Д.В., Носов А.М.** (2018) Получение и характеристика культур клеток эндемичного вида наперстянки *Digitalis ciliata* Trautv. – продуцента сердечных гликозидов. В сб: *Тезисы докладов XI Международной конференции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология»*. Минск, Республика Беларусь: ООО «Медисонт», с. 240–241.