

*На правах рукописи*



**Суханова Елена Сергеевна**

**Сравнительный анализ содержания вторичных метаболитов и  
ростовых характеристик культур клеток *Polyscias fruticosa* и  
*Polyscias filicifolia***

03.01.05 – физиология и биохимия растений  
03.01.06 – биотехнология

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории физиологии культивируемых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук и на кафедре физиологии растений биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, Москва.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук,  
профессор

**Носов Александр Михайлович**

**Официальные оппоненты:**

**Калашникова Елена Анатольевна,**

доктор биологических наук, профессор  
кафедра генетики и биотехнологии, Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А.Тимирязева, г.Москва, профессор.

**Слепян Лариса Ивановна,**

кандидат биологических наук,  
кафедра промышленной технологии лекарственных препаратов, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, г. Санкт-Петербург, старший научный сотрудник.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва.

Защита состоится 23 апреля 2013 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 специальностям 03.01.05 – Физиология и биохимия растений и 03.01.06 – Биотехнология (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@ippras.ru](mailto:m-azarkovich@ippras.ru); [ifr@ippras.ru](mailto:ifr@ippras.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

**Автореферат разослан «22» марта 2013 г.**

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время наблюдается повышение интереса медицинской науки и практики к фитопрепаратам: в разных странах доля лекарств, содержащих растительное сырье, варьирует от 25% (США) до 50% (Китай, Индия, Пакистан); в России их доля превышает 30%. Активное использование дикорастущих растений в качестве сырья приводит не только к сокращению природных растительных ресурсов, но и ставит многие виды растений под угрозу исчезновения. Таким образом, поиск альтернативного возобновляемого растительного сырья для медицины, ветеринарии, парфюмерии и пищевой промышленности весьма актуален.

Использование культур клеток высших растений в качестве альтернативного источника растительной биомассы имеет ряд преимуществ: экологическая чистота производства и получаемого продукта, гарантированное производство биомассы независимо от сезонных и погодных условий, высокая продуктивность, отсутствие в биомассе токсичных веществ. В то же время, клетки высших растений *in vitro* по своим свойствам существенно отличаются от клеток в составе растительного организма. Культура клеток представляет собой популяцию дедифференцированных соматических клеток, в которой процессы образования биологически-активных веществ (вторичных метаболитов) значительно отличаются от таковых в интактных растениях. Следовательно, для создания эффективных биотехнологий получения биомассы культур клеток лекарственных растений требуется значительный объем как фундаментальных, так и прикладных исследований. К первым следует отнести работы по получению культур клеток, оптимизации их роста и регулированию образования клетками биологически-активных веществ. Важнейшими прикладными задачами являются разработка систем хранения и поддержания штаммов-продуцентов, а также выяснения их промышленной ценности - определение продуктивности по целевым веществам и, в случае использования биомассы для получения экстрактов («галеновых препаратов»), определение биологической активности.

Растения семейства Аралиевых (*Araliaceae*), к которым относятся такие известные виды как женьшень, элеутерококк, аралия, широко используются в современной медицине. В то же время, как правило, они имеют очень

ограниченный ареал распространения, некоторые виды растут в тропическом климате. Одними из наименее исследованных растений этого семейства являются представители рода полисциас (*Polyscias*). Растения этого рода, полисциас папоротниколистный (*P.filicifolia*) и полисциас кустарникрвый (*P.fruticosa*), применяются в народной медицине; показаны тонизирующее, противовоспалительное, антимуtagenное, ранозаживляющее и другие свойства этих растений. В 1970-х годах была получена культура клеток *P.filicifolia*, показаны антитератогенные и стимулирующие свойства ее экстрактов, на ее базе создана биологически-активная пищевая добавка «Витагмал». В то же время, состав и биологическая активность экстрактов этой культуры клеток изучена недостаточно.

Проблема воспроизводимости свойств культур клеток одного и того же вида растений, а также стабильности их сохранения при длительном культивировании имеет как теоретическую, так и практическую важность. В связи с этим, достаточно актуальным является сравнение характеристик независимо полученных культур клеток одного вида, а также свойств культур клеток близких видов растений, полученных в одно время и в одинаковых условиях.

**Цель исследования.** Получить культуры клеток *Polyscias fruticosa* и *Polyscias filicifolia*, изучить их ростовые и биосинтетические характеристики (содержание в клетках тритерпеновых гликозидов; биологическую активность экстрактов биомассы) и сопоставить их с коллекционным штаммом *Polyscias filicifolia*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- Получить культуры клеток двух видов полисциаса: *Polyscias fruticosa* и *Polyscias filicifolia*
- Исследовать ростовые и биосинтетические характеристики (содержание тритерпеновых гликозидов) полученных культур клеток, а также сравнить их с коллекционным штаммом *Polyscias filicifolia*, используемого для производства нутрицевтика «Витагмал».
- Разработать тест-системы для быстрого скрининга стимулирующей и адаптогенной биологической активности растительных экстрактов и индивидуальных биологически-активных веществ (тритерпеновых гликозидов).

- Исследовать биологическую активность экстрактов полученных культур клеток и коллекционного штамма полисциаса и сопоставить биологическую активность экстрактов с содержанием в них тритерпеновых гликозидов.

**Научная новизна работы.** Получены новые линии культур клеток *Polyscias fruticosa* и *Polyscias filicifolia*, при этом культура клеток *Polyscias fruticosa* – впервые. В полученных линиях показано наличие тритерпеновых гликозидов с олеаноловой кислотой в качестве агликона. Исследована динамика накопления этих соединений в процессе цикла субкультивирования. Установлено, что полученные линии значительно отличаются от коллекционного штамма *Polyscias filicifolia* как по ростовым характеристикам, так и по содержанию тритерпеновых гликозидов.

Разработаны оригинальные тест-системы для определения стимулирующей и адаптогенной биологической активности экстрактов: для исследования стимулирующей активности – тест на проращивание пыльцевых зерен, для оценки адаптогенной активности – влияние экстрактов на пролиферацию культур клеток человека под действием токсического, низко- и высокотемпературных стрессов. С использованием разработанных тест-систем впервые продемонстрировано адаптогенное действие экстрактов всех исследуемых культур клеток полисциаса. Исследована биологическая активность индивидуальных гинзенозидов, при этом малонил-Rb1 (выделенного из культуры клеток *Panax japonicus*) и полисциазидов (выделенных из листьев *Polyscias filicifolia*) – впервые. Впервые показано, что максимальной активностью обладают наиболее низкомолекулярные тритерпеновые гликозиды: ладигинозид А и гинзенозиды Rb-группы с гликозилированием только по С3 атому агликона.

**Научно-практическая ценность работы.** Получены новые штаммы культур клеток растений *Polyscias filicifolia* и *Polyscias fruticosa*, биомасса которых содержит тритерпеновые гликозиды, и которые могут быть использованы в фармацевтической, пищевой и косметической промышленности. Разработаны тест-системы для определения адаптогенной и стимулирующей активности растительных экстрактов и индивидуальных БАВ (тритерпеновых гликозидов), которые могут быть использованы как для скрининга биологической активности экстрактов (в том числе при оптимизации условий выращивания), так и для

изучения свойств отдельных веществ. Полученные результаты могут быть использованы при исследовании прикладных вопросов биотехнологии, фармакологии и фундаментальных проблем физиологии растений.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены в стендовых и устных докладах на следующих международных конференциях: I (IX) Международная конференция молодых ботаников (Санкт-Петербург, 2006), VI съезд Общества Физиологов Растений России «Современная физиология растений: от молекул до экосистем» (Сыктывкар, 2007), IX конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 2008), 1<sup>st</sup> Workshop on Plant Molecular Biotechnology XV Biotechnology Summer School (Гданьск, 2009), Международная конференция «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на севере» (Якутск, 2010).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из них – 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК, 1 патент.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения и обсуждения результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на \_\_\_ страницах машинописного текста. Содержит 14 таблиц и 47 рисунков. Список цитируемой литературы включает 213 наименований, в том числе 169 на иностранном языке.

**Принятые сокращения и обозначения.** 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; НУК –  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота; БАП – 6-бензинаминопурин; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ТСХ – тонкослойная хроматография; ДМСО – диметилсульфоксид; ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

Обзор литературы состоит из 4 разделов и включает в себя информацию по культивированию изолированных растительных клеток, биологии видов *Panax spp.* и *Polyscias spp.*, вторичному метаболизму этих растений, их биологической активности и методам ее исследования.

## **Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.**

### **2.1. Получение культур клеток *Polyscias fruticosa* и *Polyscias filicifolia*.**

Для работы были взяты растения *Polyscias fruticosa* (L.) Harms и *Polyscias filicifolia* Bailey из коллекции Отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН. В качестве эксплантов использовали сформированные листья среднего яруса.

Для выращивания культур использовали среду MS (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением гидролизата казеина (0,5 г/л), инозита (0,1 г/л), 3% сахарозы. Для приготовления твердых сред использовали пластинчатый агар Serva (0,5%). Использовали 15 вариантов сред, отличающихся по составу регуляторов роста, в качестве которых использовали НУК, 2,4-Д, кинетин, БАП.

### **2.2. Выращивание и изучение ростовых характеристик клеточных культур**

Культивирование проводили в стерильных условиях, в темноте, при 26°C. Цикл субкультивирования для каллусных культур составлял 4 недели, для суспензионных культур – 2 недели. Суспензионные культуры выращивали в колбах объемом 250 мл (30-40 мл суспензии в колбе), на качалке (100 об/мин.). Для выращивания каллусных культур использовали чашки Петри (d=60 мм).

Для характеристики суспензионных культур определяли содержание сухой и сырой биомассы в литре среды, концентрацию клеток в среде и жизнеспособность культуры. По полученным результатам рассчитывали индекс роста (I), удельную скорость роста в экспоненциальной фазе ( $\mu$ ), экономический коэффициент (Y), время удвоения ( $\tau$ ) по стандартным методикам (Носов, 2008).

### **2.3. Химический анализ экстрактов из биомассы культур клеток**

Выяснение наличия в культуре клеток полисциаса тритерпеновых гликозидов проводили с использованием тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) хроматографии. Для ТСХ использовали пластинки Kieselgel 60 (Merck, Германия) и систему растворителей этилацетат : ледяная уксусная кислота : вода (50:25:25, по объему). ВЭЖХ проводили на приборе Perkin Elmer Series 200 (США). Разделение гликозидов проводили на колонках Pecosphere 3CR C18 (834,6 мм, 3 мкм, PerkinElmer, США) и Hypersil BDS C18 (250×4,6мм, 5 мкм, Thermo Hypersil-Keystone Inc., США) при скорости потока элюента 1,5 мл/мин и детектирование на длине волны 207 нм. Элюирование

осуществляли смесью ацетонитрила и 4 мМ водного раствора  $\text{KН}_2\text{PО}_4$  в различных градиентных режимах. Содержание индивидуальных тритерпеновых гликозидов в биомассе культур клеток определяли методом внешней калибровки.

#### **2.4. Определение биологической активности экстрактов культур клеток аралиевых**

Экстракцию биомассы культур растительных клеток проводили водой в течение 24 ч. Для анализа биологической активности индивидуальных веществ использовали гинзенозиды Rf, Rh1, Rh2, Rg1, Rb1 (Sigma, США), гинзенозид малонил-Rb1 и полисциазиды PolA, Pol3, PolE, LadA, выделенные из биомассы культуры клеток женьшеня и листьев интактного растения *Polyscias filicifolia* (Кочкин и др., 2012). Гликозиды Rh1, Rh2 и LadA предварительно растворяли в ДМСО. Все остальные соединения растворяли в воде.

Для определения адаптогенной активности экстрактов использовали суспензионные культуры раковых клеток человека (Т-лимфобластная лейкемия, линия Jurkat: родительский штамм и штамм E-6.1), которые выращивали при 37°C, 6%  $\text{CO}_2$  на стандартной среде (Schneider *et al.*, 2006). Цикл субкультивирования составлял 3 дня, начальная концентрация клеток –  $4 \cdot 10^5$  кл/мл. После добавления исследуемого экстракта клетки лимфоцитов подвергали стрессовому воздействию (токсическому, низко- или высокотемпературному), после чего инкубировали при оптимальных условиях выращивания. Оценку жизнеспособности Т-клеток проводили после 24 ч. инкубации, при помощи МТТ-теста (Niks, 1990). Результаты выражали в относительных единицах по отношению к контролю (число клеток после 24 ч. инкубации без добавления экстрактов и воздействия стрессов было принято за 1).

Для определения стимулирующего действия в качестве тест-системы использовали пыльцу *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana SR1, выращенного из семян в климатической камере. Для проращивания пыльцевых зерен использовали стандартную среду (Benito Moreno *et al.*, 1988). Процент прорастания пыльцевых зерен определяли после 40 и 50 мин. инкубации при 25°C.

#### **2.5. Статистическая обработка результатов**

Для получения представленных в работе данных было проведено от 3 до 5 независимых экспериментов. На графиках представлены средние арифметические

значения биологических повторностей и их стандартные отклонения. Обработку данных проводили при помощи программы Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, США).

### **Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.**

#### **3.1 Получение и характеристика культур клеток *P.fruticosa* и *P.filicifolia***

В качестве эксплантов для получения культур клеток использовали сформированные листья среднего яруса. Исследовали 6 вариантов сред, отличающихся между собой по гормональному составу.

В результате проведенных работ было установлено, что каллусные культуры исследуемых видов полисциаса формируются только на средах, содержащих 2.4-Д. Подобный эффект был ранее описан в литературе для некоторых видов растений (Гамбург, 1990). При сопоставлении интенсивности каллусогенеза у двух видов можно отметить, что бóльшую интенсивность каллусогенеза наблюдали у *P.fruticosa*, по сравнению с *P.filicifolia*.

Для получения суспензионных культур клеток был применен прямой способ – непосредственно из эксплантов. Были использованы среды, индуцировавшие каллусогенез; для дальнейшей оптимизации гормонального состава было исследовано еще 15 вариантов питательных сред. В результате были получены несколько линий суспензионных культур для *P.fruticosa* и *P.filicifolia*, отличающихся по морфологии клеток, жизнеспособности и ростовым характеристикам.

Полученные хорошо растущие суспензионные культуры клеток выращивали в течение более ста циклов культивирования (с 2005 года по настоящее время). В результате постоянного мониторинга состояния культур было установлено, что жизнеспособность суспензионных культур в процессе выращивания постепенно повышалась: с 50% в первые месяцы культивирования до 85-97% в последующие. В течение первого года выращивания отмечено постепенное улучшение ростовых характеристик, что скорее всего обусловлено автоселекцией активно растущих клеток. Обе культуры представлены меристемоподобными клетками, собранными в агрегаты.

Таким образом, были впервые получены каллусная и суспензионная культуры клеток *P. fruticosa*, а также новая линия культуры клеток *P. filicifolia*.

В качестве особенностей формирования суспензионных культур клеток для исследуемых видов полисциаса необходимо отметить высокий морфогенный потенциал клеток *in vitro*. Через 1-2 месяца культивирования на средах, содержащих НУК, наблюдали явление ризогенеза. При замене в среде НУК на 2,4-Д происходил процесс дедифференциации корневых структур в суспензионную культуру. Была показана возможность длительной пролиферации корневых структур, а также образования растений-регенерантов при перенесении морфогенных культур на свет. В то же время на средах, содержащих в качестве ауксина 2,4-Д, было отмечено эмбриогенез: появление в суспензионных культурах круглых глобул с гладким краем, состоящих из мелких клеток, способных к длительной пролиферации – проэмбриогенных масс (Kreuger, 1996). Причем более активно образование проэмбриогенных масс (ПЭМ) происходило на средах, содержащих кинетин. Для сформировавшихся ПЭМ была отмечена интенсивная пролиферация в течение 8-10 месяцев, затем их содержание в суспензии постепенно снижалось. Таким образом, направление морфогенеза определялось типом ауксина в среде: 2,4-Д стимулировал эмбриогенез, а НУК – ризогенез.

### **3.2. Исследование ростовых характеристик полученных штаммов *Polyscias spp.* и их сопоставление с коллекционным штаммом *Polyscias filicifolia*.**

Одной из основных задач работы было исследование ростовых характеристик полученных культур клеток полисциаса. На рис. 1а, 1б представлены кривые роста полученных линий на 43 цикл выращивания. Из данных литературы известно, что молодые и длительно культивируемые суспензионные культуры клеток могут значительно отличаться по характеру роста и биосинтетическим показателям. Поэтому сопоставление ростовых характеристик вновь полученных линий с длительно культивируемым коллекционным штаммом *P. filicifolia* принципиально важно. На рис. 1в. представлены ростовые кривые коллекционного штамма на стадии 168 цикла выращивания. Для сопоставления воспроизводимости свойств культур клеток одного вида необходимо сравнение ростовых характеристик культур разного времени введения после одинакового времени выращивания. На рис 1.г представлена кривая роста коллекционного

штамма *P.filicifolia* в соответствующий период его культивирования - 45-й цикл выращивания, 1999 год (Клюшин, 2000).

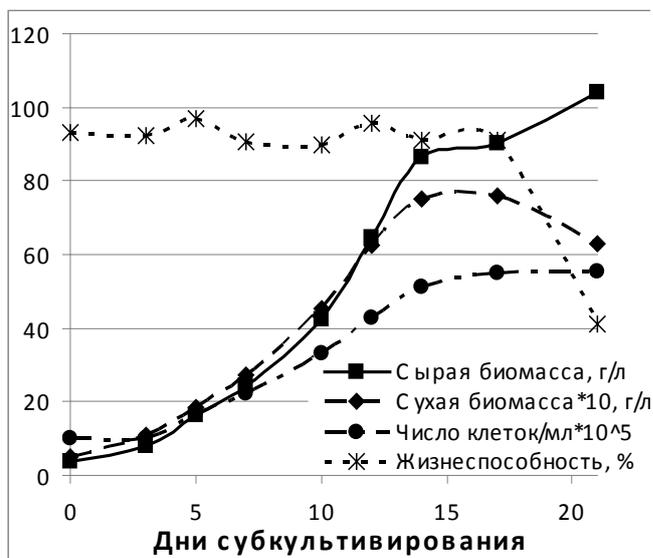


Рис. 1а. Ростové характеристики суспензионной культуры *P.fruticosa*, («новый» штамм, 43 цикл выращивания)

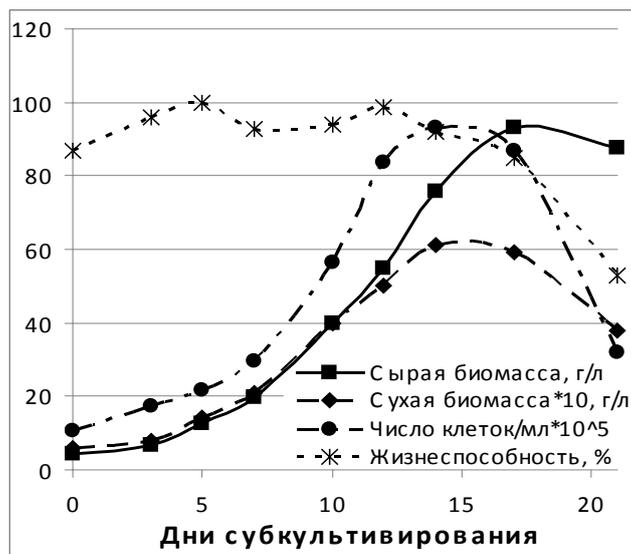


Рис. 1б. Ростové характеристики суспензионной культуры *P.filicifolia*, («новый» штамм, 43 цикл выращивания)

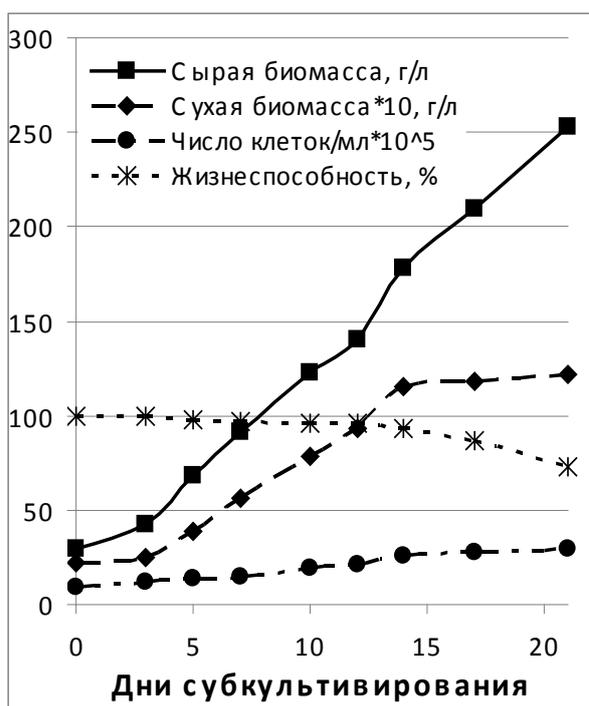


Рис. 1в. Ростové характеристики суспензионной культуры *P.filicifolia*, (коллекционный штамм, 168 цикл выращивания)

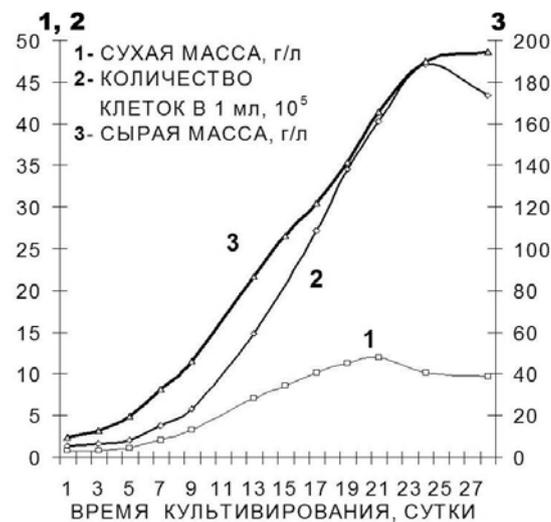


Рис. 1г. Ростové характеристики суспензионной культуры *P.filicifolia* (коллекционный штамм, 45 цикл выращивания, 1999 г.)

Из представленных графиков следует, что рост как коллекционного, так и вновь полученного штамма культуры клеток *P.filicifolia* характеризуется наличием

лаг-фазы по сухому и сырому весу биомассы продолжительностью около 3 суток (рис. 1б, 1в, 1г). В то же время, рост культуры клеток *P.fruticosa* характеризуется отсутствием лаг-фазы по этим параметрам (рис. 1а). Кривые роста вновь полученных штаммов выходят на стадию стационара на 14 сутки (рис. 1а, 1б). Молодые штаммы отличались короткой фазой стационара (около 2 суток) и после 17 суток вступали в фазу деградации (рис. 1а, 1б), в то время как у коллекционного штамма на 168 цикле на 21 сутки еще продолжается фаза стационара (рис. 1в). Таким образом, по характеру роста штаммы разных видов, но одного введения в культуру имели больше сходства, чем штаммы одного вида, но разных введений.

Следует отметить, что коллекционный штамм представлен более крупными клетками, чем молодые, что следует из соотношения сухого веса и числа клеток, а также по данным микроскопии.

Параметры роста полученных клеточных культур и коллекционного штамма *P.filicifolia* разного возраста по ростовым параметрам представлены в табл.1. Из данных таблицы следует, что показатели удельной скорости роста полученных культур и коллекционного штамма схожи ( $0,20-0,27 \text{ сут}^{-1}$ ), минимальным значением этого параметра обладает длительно культивируемый коллекционный штамм. В то же время экономический коэффициент и максимальное накопление биомассы значительно выше у коллекционного штамма.

Табл.1. Параметры роста «новых» штаммов *P.filicifolia* и *P.fruticosa* и коллекционного штамма *P.filicifolia* на разных стадиях выращивания.

Культура	I	$\mu, \text{сут}^{-1}$	T, сут.	Y	$X_{\max}, \text{г/л}$
<i>P.filicifolia</i> («новый», 43 цикл)	11,5	0,23	3,02	0,19	6,1
<i>P.fruticosa</i> («новый», 43 цикл)	15,5	0,27	2,61	0,24	7,6
<i>P.filicifolia</i> (коллекц., 45 цикл)	15,5	0,27	2,6	0,55	12,0
<i>P.filicifolia</i> (коллекц., 168 цикл)	5,5	0,20	3,42	0,34	12,2

где I – индекс роста,  $\mu$  – удельная скорость роста в экспоненте, T – время удвоения в экспоненте, Y – экономический коэффициент,  $X_{\max}$  – максимальное накопление биомассы; значения рассчитаны по сухой биомассе.

Таким образом, по интенсивности роста все молодые штаммы относительно схожи между собой, тогда как характер роста коллекционного штамма и вновь полученных отличается.

Для оценки возможных изменений в популяции клеток *in vitro* одним из эффективных критериев является содержания ДНК в клетках, в частности, явление полиплоидизации. Для оценки возможных изменений цитогенетического статуса исследуемых популяций было проведено сравнение полученных культур с коллекционным штаммом по количеству ДНК в клетках. Результаты измерения содержания ДНК в клетках суспензионных культур представлены в табл. 2.

Как следует из представленных результатов, в молодых культурах практически не наблюдалось явления полиплоидии, в то время как длительно культивируемый коллекционный штамм характеризуется более высокой ploidy клеток, что, возможно, связано с его меньшими ростовыми параметрами по сравнению с молодыми штаммами. Таким образом, были выявлены отличия по содержанию ДНК в клетках длительно культивируемого и «новых» штаммов.

Табл. 2. Распределение клеток по содержанию ДНК суспензионных культур «новых» штаммов *Polyscias fruticosa* и *Polyscias filicifolia* и коллекционного штамма *P. filicifolia*.

Культура	Фаза роста	1C	1C/2C	2C	2C/4C	4C	4C/8C	8C
<i>P. fruticosa</i> («новый»)	начало эксп. фазы	4%	4%	52%	6%	24%	4%	6%
	конец эксп. фазы	-	2%	35%	6%	53%	1%	1%
<i>P. filicifolia</i> («новый»)	начало эксп. фазы	2%	16%	76%	2%	4%	-	-
	конец эксп. фазы	2%	-	72%	-	22%	2%	2%
<i>P. filicifolia</i> (коллекц.)	начало эксп. фазы	-	-	-	6%	50%	12%	32%
	конец эксп. фазы	-	-	-	2%	46%	12%	40%

«-» – клеток с указанным содержанием ДНК не обнаружено;

1C – содержание ДНК в нереплицированном гаплоидном наборе хромосом

### 3.3. Биосинтетические характеристики культуры клеток *Polyscias fruticosa*.

Основной характеристикой культур клеток–продуцентов является образование ими целевых продуктов – вторичных метаболитов. Совместно с Д.В. Кочкиным (каф. физиологии растений Биологического факультета МГУ) с использованием методов ВЭЖХ был проведен химический анализ экстрактов биомассы культуры клеток полученных штаммов *P. fruticosa* и *P. filicifolia*, а также коллекционного штамма *P. filicifolia*. В результате было установлено, что культуры клеток полученных штаммов содержат 4 тритерпеновых гликозида с олеаноловой

кислотой в качестве агликона: полисциазид Е, 28-О-β-D-глюкопиранозильный эфир 3-О-β-D-глюкопиранозил-(1→4)-О-β-D-глюкуронопиранозид олеаноловой кислоты (в дальнейшем - полисциазид З), полисциазид А и ладигинозид А. В коллекционном штамме *P.filicifolia* этих соединений обнаружено не было.

Было проведено исследование динамики накопления тритерпеновых гликозидов в процессе цикла выращивания культуры клеток *P.fruticosa*, результаты которого представлены на рис. 2. Установлено, что мажорными гликозидами в данной культуре клеток являются полисциазид Е и ладигинозид А. Максимальное накопление суммы гликозидов наблюдали на 16 сутки, но динамика накопления индивидуальных гликозидов различна. Содержание полисциазид А характеризовалось двумя пиками – на 12 и 16 сутки (1,4 и 1,8 мг/г, соответственно), в то время как максимум накопления ладигинозида А приходился на 14-16 сутки (2,05-2,2 мг/г).

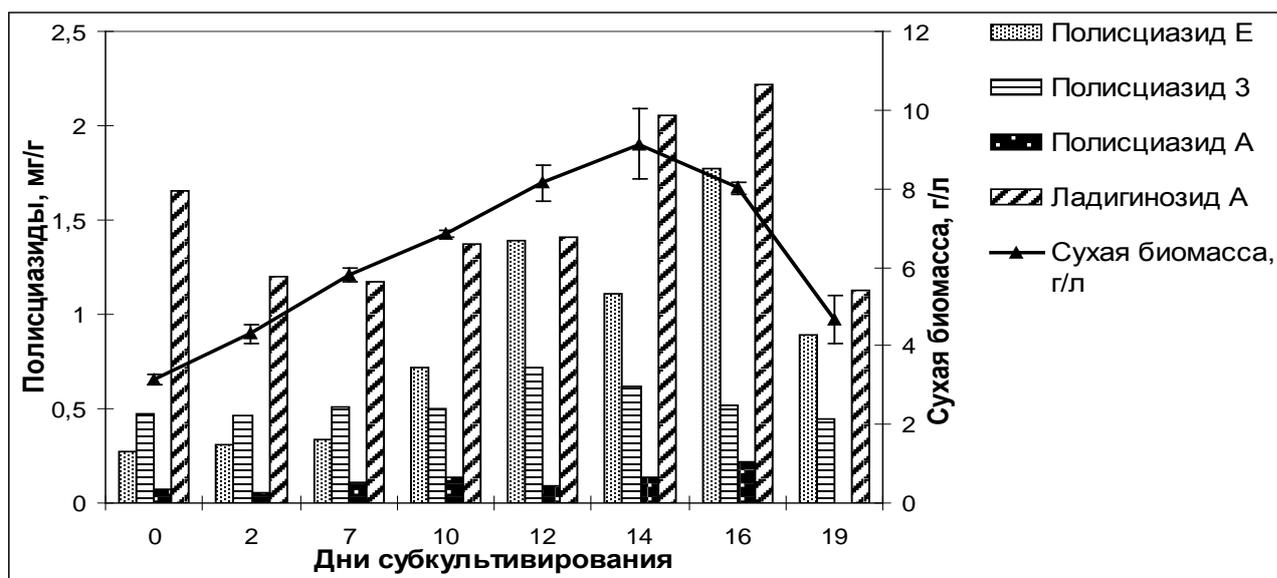


Рис. 2. Динамика накопления тритерпеновых гликозидов в суспензионной культуре клеток *P.fruticosa*.

Для исследования возможности регуляции синтеза тритерпеновых гликозидов был проведен эксперимент с использованием предшественника их синтеза - 2-С-метил-D-эритритол-2,4-циклопирофосфата (МЭЦ). Установлено, что увеличение концентрации МЭЦ до 100 мг/л заметно повышало ростовые характеристики, прежде индекс роста (с 2,27 до 2,97), и экономический коэффициент Y (с 0,16 до 0,21). Наибольшее накопление полисциазидов (А, Е и З) отмечалось на среде, содержащей 100 мг/л 2-метил-эритритол-2,4-циклопирофосфата.

### 3.4. Биологическая активность экстрактов культур клеток.

Основной задачей прикладного аспекта работы была разработка методов скрининга адаптогенной и стимулирующей биологической активности и изучение с использованием разработанных методов свойств экстрактов культур клеток. Для исследования были взяты экстракты биомассы полученных культур клеток *P.fruticosa* и *P.filicifolia*, содержащих тритерпеновые гликозиды с олеаноловой кислотой в качестве агликона, а также экстракт биомассы коллекционного штамма *P.filicifolia*, не содержащей этих соединений. Для сопоставления биологической активности экстрактов с действием индивидуальных гликозидов были использованы гликозиды, выделенные из листьев *P.filicifolia*. Для этих же целей исследовали тритерпеновые гликозиды другого типа – даммаранового ряда и содержащие их экстракты из биомассы культуры клеток *Panax japonicus*. Содержание биологически активных веществ в исследуемых экстрактах представлены в таблице 3 и 4. Таким образом, для исследования и сопоставления биологической активности были взяты экстракты, содержащие разные типы тритерпеновых гликозидов, а также экстракт, не содержащий этих соединений.

Табл. 3. Содержание тритерпеновых гликозидов (полисциазидов) в экстракте из биомассы культуры клеток *Polyscias fruticosa* и *Polyscias filicifolia*.

Гликозид	Содержание гликозидов, мг/г сухой биомассы	
	<i>Polyscias filicifolia</i>	<i>Polyscias fruticosa</i>
Полисциазид E	1,4	1,1
Полисциазид 3	0,5	0,5
Полисциазид A	следы	0,1
Ладигинозид A	0,2	1,9
<b>Сумма</b>	<b>2,1</b>	<b>3,6</b>

Табл. 4. Содержание гинзенозидов в экстракте из биомассы культуры клеток *Panax japonicus*, выращенной в колбах и 630-литровом ферментере. (анализ проведен с.н.с. О.В. Решетняк)

Гинзенозид	Содержание гинзенозидов, мг/г сухой биомассы	
	ферментер	колбы
Rg1	0,85	1,33
Re		2,17
R0	6,09	-
Mal-Rb1	6,79	-
Rf	0,07	0,29
Rb1	17,46	1,28
Rb2	-	0,57
Rc	0,89	0,45
Rd	0,63	0,14
Gyp17	0,05	-
<b>Сумма</b>	<b>32,83</b>	<b>6,23</b>

### **3.5.1. Разработка тест систем для скрининга адаптогенной активности экстрактов.**

Для выбора тест системы были использованы различные культуры клеток животных (эмбриональные фибробласты мыши, клетки раковой опухоли шейки матки человека, клетки раковой опухоли кожного эпителия человека, клетки Т-лейкемии). В результате проведенных экспериментов в качестве оптимальной была выбрана тест-система на основе двух штаммов культуры Т-лимфоцитов человека Jurkat: родительский и E-6.1, так как эти клетки оказались наиболее чувствительны к действию растительных экстрактов

В результате работ по оптимизации способа экстрагирования и концентрации экстрактов из биомассы исследуемых культур клеток были выбраны водные экстракты из расчета 2,5 мг сухой биомассы на 1 мл растворителя.

Для определения адаптогенной активности растительных экстрактов анализировали их влияние на восстановление роста тест-культур после воздействия различных стрессов. В результате работ по оптимизации условий экспериментов для низкотемпературного стресса выбрали 2-часовую инкубацию клеток лимфоцитов при  $4^{\circ}\text{C}$  или 24-часовую инкубацию при  $+25^{\circ}\text{C}$ , для высокотемпературного стресса – 30-минутную инкубацию при  $40^{\circ}\text{C}$ , и для токсического стресса – 24-часовую инкубацию с циклогексимидом (0,001 мг/мл). В качестве контроля исследовали влияние растительных экстрактов на клетки человека при оптимальных условиях роста. Результаты проведенных экспериментов представлены на рис. 4а (родительский штамм) и на рис. 4б. (штамм E-6.1).

Из полученных результатов следует, что без стрессового воздействия растительные экстракты по-разному влияли на два используемых штамма клеток Т-лимфоцитов. Если на модифицированный штамм все используемые экстракты заметного влияния не оказывали, то на родительский штамм они действовали угнетающе. Наибольшей активностью обладал экстракт культуры клеток *Polyscias fruticosa* (рис. 4а, 4б).

Под действием стрессов влияние экстрактов на разные штаммы Т-лимфоцитов так же было различным. На родительский штамм во всех случаях экстракты культур клеток полисциаса и женьшеня действовали угнетающе, причем экстракт *Polyscias fruticosa* проявил бóльшую активность (рис. 3а). Аналогичная

картина была показана и при высокотемпературном стрессе для штамма Е-6.1. В то же время при низкотемпературных и токсическом стрессах на клетках штамма Е-6.1 было выявлено адаптогенное свойство экстрактов. Наибольшей активностью обладал экстракт *Panax japonicus*, а в случае токсического стресса – и экстракт *Polyscias fruticosa* (рис. 3б).

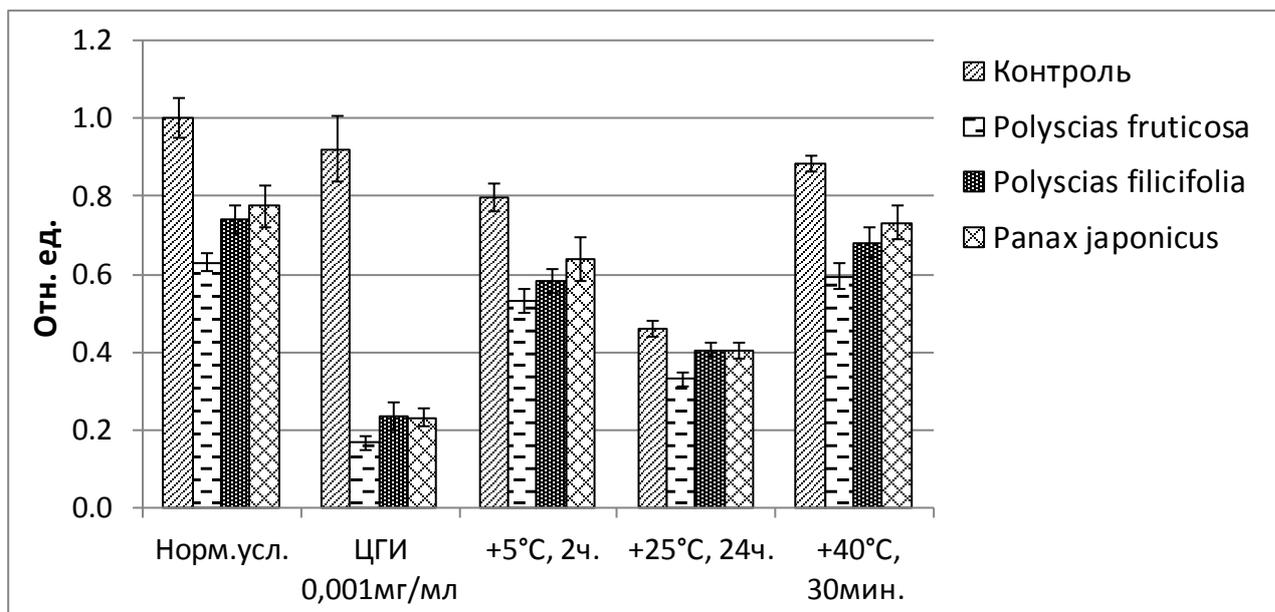


Рис. 3а. Влияние экстрактов на пролиферацию Т-лимфоцитов родительского штамма при нормальных условиях роста и при стрессовых воздействиях.

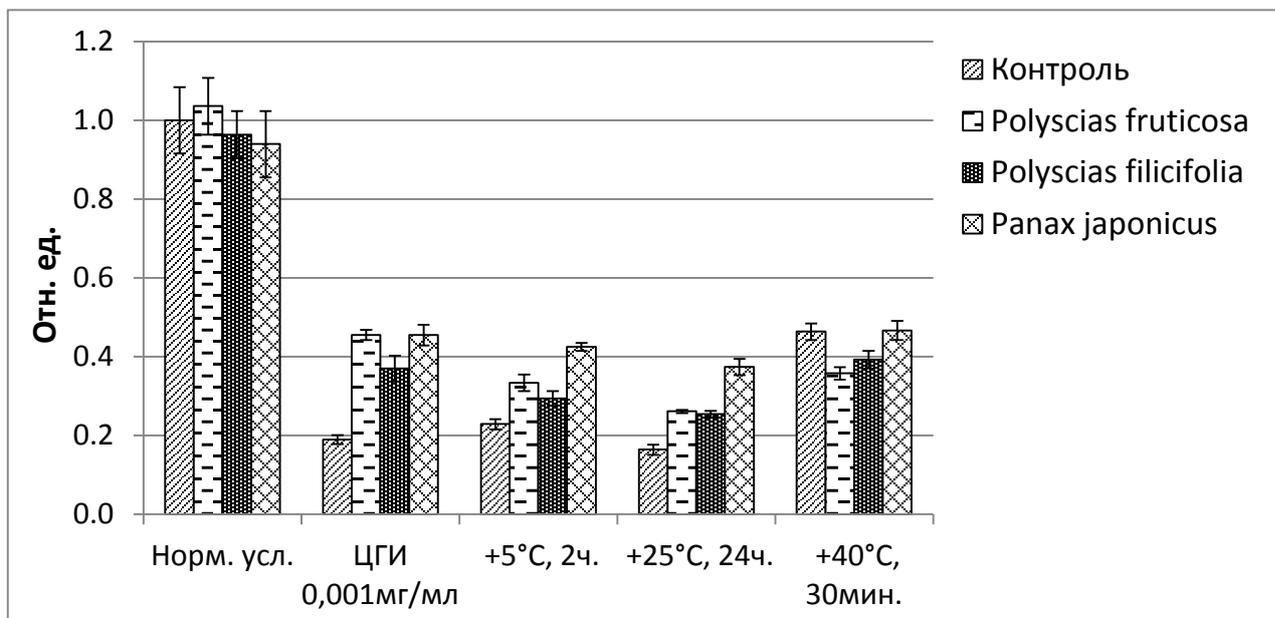


Рис. 3б. Влияние экстрактов на пролиферацию Т-лимфоцитов штамма Е-6.1 при нормальных условиях роста и при стрессовых воздействиях.

Из полученных результатов можно заключить, что наибольшее угнетающее действие оказывал экстракт, содержащий гликозиды олеаноловой кислоты (*Polyscias fruticosa*), а наибольшее адаптогенное – гликозиды даммаранного ряда (*Panax japonicus*). Однако биологическая активность в данной тест-системе была выявлена и у экстракта, не содержащего этих соединений (*Polyscias filicifolia*), что может свидетельствовать о присутствии в экстрактах других активных компонентов. Также не исключено, что различные компоненты экстракта могут оказывать противоположное действие, накладывающееся друг на друга в смеси.

### 3.5.2. Разработка тест систем для скрининга стимулирующей активности экстрактов.

Удобным модельным объектом для выявления биологической активности растительных экстрактов являются пыльцевые зерна. Была проведена работа по возможности использования этой тест системы для определения стимулирующей активности экстрактов и индивидуальных полисциазидов и гинзенозидов.

В результате проведенных экспериментов установлено, что гликозиды культур клеток полисциаса проявили ингибирующее действие на прорастание пыльцевых зерен, наибольшей активностью из них обладал самый низкомолекулярный гликозид – ладигинозид А (рис. 4).

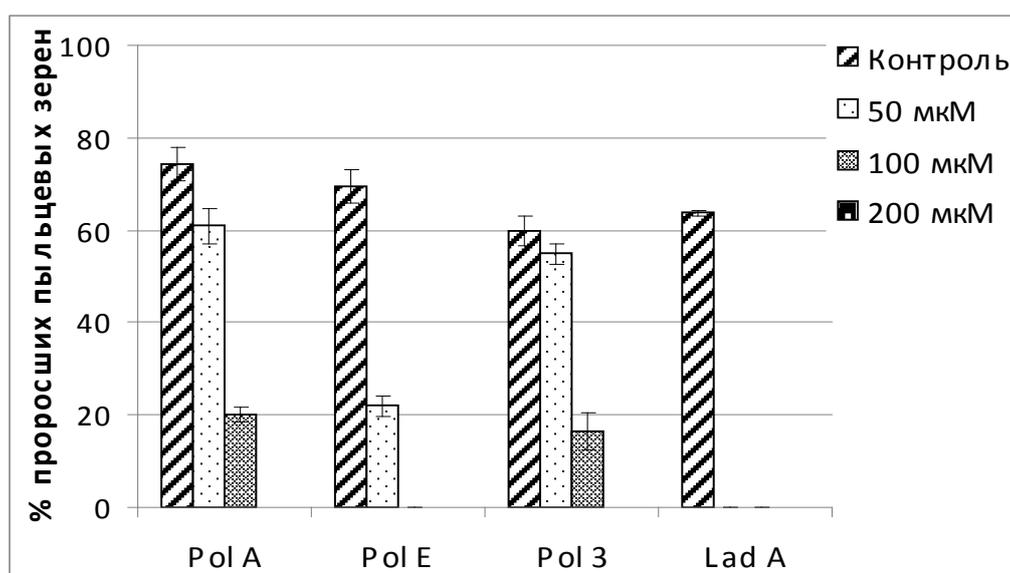


Рис. 4. Влияние основных тритерпеновых гликозидов полисциаса на прорастание пыльцевых зерен;

\*в концентрации 200 мкМ все полисциазиды вызывали полное ингибирование прорастания пыльцевых зерен.

Изучение активности индивидуальных гинзенозидов выявило определенную корреляцию между их структурой и биологической активностью. Значительное влияние на прорастание пыльцевых зерен оказывали гинзенозиды Rb-группы (агликон – протопанаксадиол). При этом гинзенозид Rb1 – бисдесмозид, в котором агликон имеет два углеводных фрагмента (при C3 и C20 атомах) оказывал стимулирующее влияние (рис. 5), тогда как наиболее низкомолекулярный гинзенозид Rh2 (монодесмозид с одним остатком глюкозы при C3 атоме агликона) – ингибирующее (рис. 6). Гинзенозид Rh2 близок по структуре к гликозидам фитостерина (необходимым компонентам мембран растительных клеток) и, возможно, его ингибирующее действие обусловлено влиянием на структуру мембран. Особо следует отметить, что ацилирование гинзенозидов Rb-группы может полностью лишать их биологической активности, что было показано на примере малонил-гинзенозида Rb1 (рис. 5). Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы по определению биологической активности с использованием модельных систем животного происхождения, по которым наибольшей цитотоксичностью обладают именно гидрофобные, низкомолекулярные гинзенозиды протопанаксадиола (Qi et al, 2011).

Согласно полученным результатам, гинзенозиды Rg-группы (агликон протопанаксатриол) обладают существенно меньшей биологической активностью. Среди исследованных гинзенозидов этой группы только для гинзенозида Rg1 было показано ингибирующее действие (рис. 6).

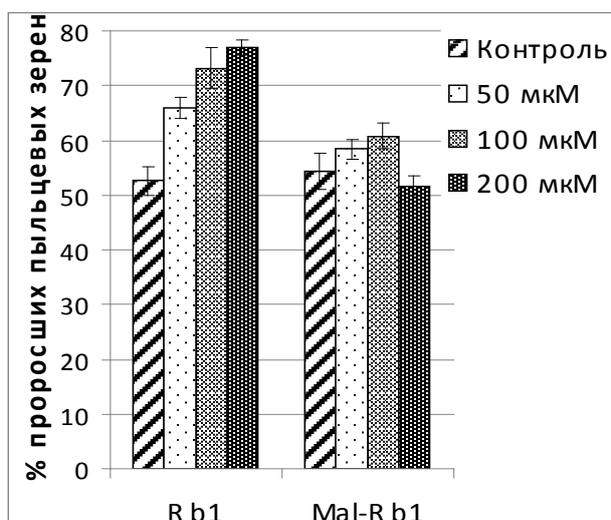


Рис. 5. Влияние растворов Rb1 и Mal-Rb1 на прорастание пыльцевых зерен.

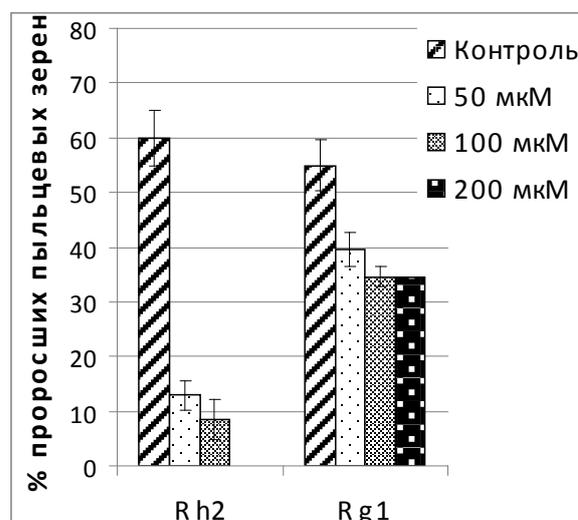


Рис. 6. Влияние растворов Rh2 и Rg1 на прорастание пыльцевых зерен.

Стоит отметить, что гинзенозид Rh1, имеющий, аналогично гинзенозиду Rh2, только один остаток глюкозы, не оказывал влияния на прорастание пыльцы.

Важным этапом работы было исследование биологической активности экстрактов полисциаса – как культуры клеток коллекционного штамма *Polyscias filicifolia*, не содержащего детектируемых количеств тритерпеновых соединений, так и вновь полученных линий культур клеток *Polyscias fruticosa* и *Polyscias filicifolia*, различающихся по составу тритерпеновых гликозидов. Результаты их действия на прорастание пыльцевых зерен представлены на рис. 7.

Ранее выявленное ингибирующее действие тритерпеновых гликозидов полисциаса на прорастание пыльцы коррелирует с результатами, полученными для экстрактов из различных культур клеток *Polyscias filicifolia*. Для экстракта, не содержащего этих соединений, было показано стимулирующее действие, возрастающее с увеличением концентрации экстракта. В то же время для экстракта из новой линии *P.filicifolia*, содержащего полисциазиды, была показана биологическая активность, зависящая от дозы препарата – стимулирующее действие (до 14% от контроля), которое снижалось с увеличением концентрации.

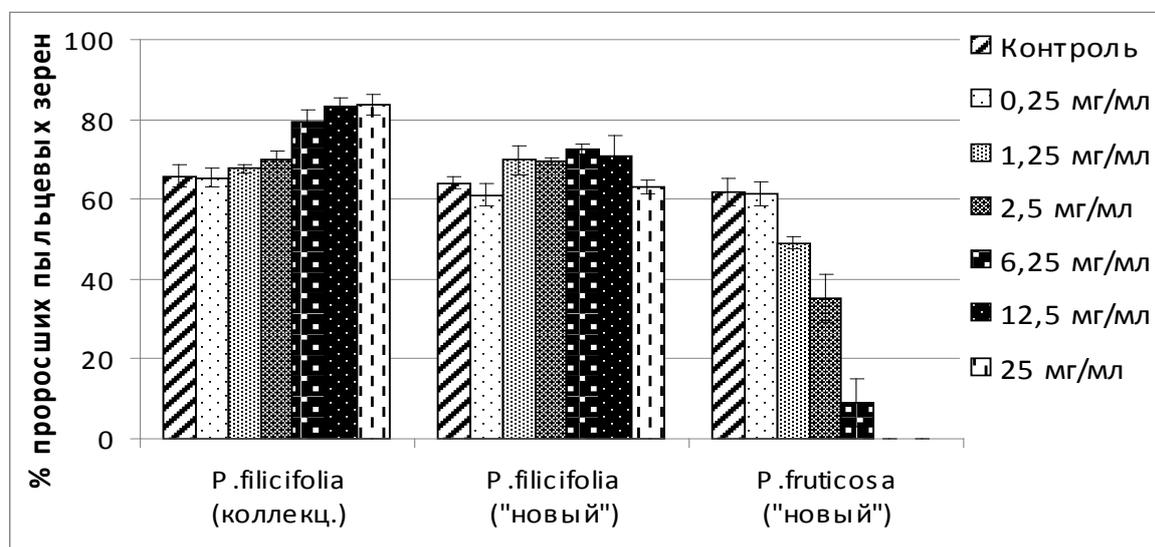


Рис. 7. Влияние экстрактов биомассы коллекционного и «новых» штаммов культур клеток *Polyscias filicifolia* и *Polyscias fruticosa* на прорастание пыльцевых зерен.

На основании полученных результатов, можно сделать вывод о наличии в экстракте компонентов, стимулирующая активность которых может перекрываться действием полисциазидов. По данным литературы можно предполагать присутствие полиацетиленовых соединений (Lutowski *et al.*, 1992).

Были рассчитаны действующие концентрации гликозидов в экстрактах полисциаса и проведено сопоставление биологической активности экстрактов с биологической активностью индивидуальных гликозидов.

Экстракт биомассы «нового» штамма *P.filicifolia* (25 мг сухой биомассы на 1 мл растворителя) суммарно содержал столько же тритерпеновых соединений (0,053 мг/мл), сколько растворы индивидуальных соединений концентрацией 50 мкМ (0,041-0,057 мг/мл для разных полисциазидов). Однако этот экстракт не оказывал заметного влияния на прорастание пыльцевых зерен. Это можно объяснить присутствием в экстракте компонентов со стимулирующим действием, нивелирующим ингибирующую активность полисциазидов. Экстракт *P.fruticosa* проявил более высокую ингибирующую активность, чем экстракт культуры клеток *P.filicifolia*, полностью подавляя прорастание пыльцы, при концентрациях экстракта 12,5 мг/мл и выше. Это хорошо согласуется с более высоким содержанием в нем тритерпеновых соединений (0,090 мг/мл), причем мажорным среди них был наиболее активный – ладигинозид А (0,048 мг/мл).

Важным этапом работы явилось исследование биологической активности экстрактов биомассы культуры клеток *Panax japonicus*, выращенной в различных условиях (в колбах и ферментере), и различающихся по составу синтезируемых тритерпеновых гликозидов (табл 4). Биологическая активность этих экстрактов оказалась различной (рис. 8).

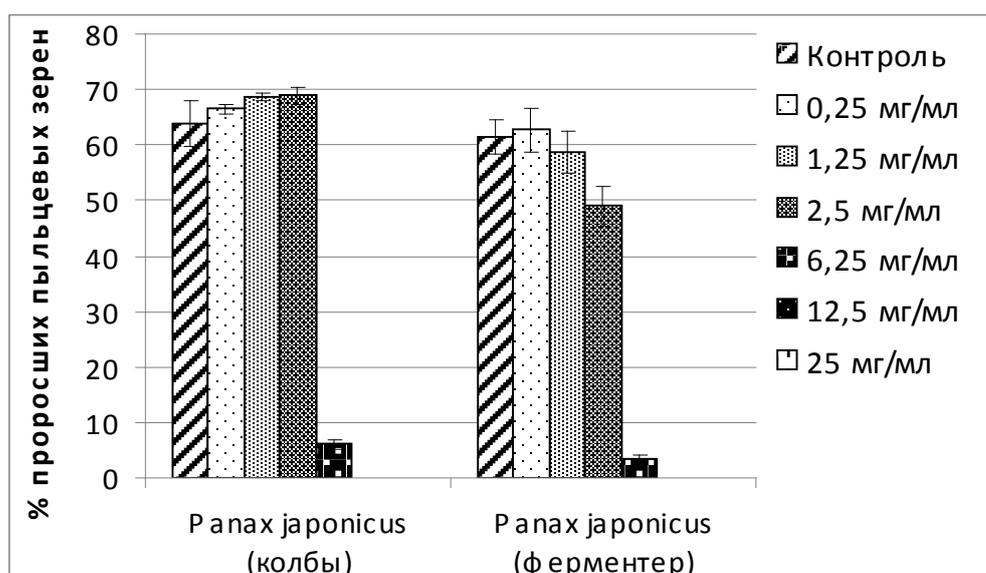


Рис. 8. Влияние экстрактов биомассы культуры клеток *Panax japonicus*, выращенной в колбах и ферментере.

Биомасса, выращенная в колбах, проявила небольшую стимулирующую активность при низких концентрациях экстракта. Для биомассы, выращенной в ферментере, этот эффект отсутствовал. Более концентрированные экстракты (6,25 мг/мл и выше) обеих культур клеток оказывали сильное ингибирующее действие на прорастание пыльцевых зерен, причем гораздо более сильное, чем соответствующие концентрации «ингибирующих» гинзенозидов.

Поиск корреляции биологической активности экстрактов культуры клеток *Panax japonicus* с содержанием в них индивидуальных гинзенозидов не привел к обнаружению каких-либо закономерностей, что может свидетельствовать о наличии в экстрактах значительных количеств других биологически-активных веществ. В частности, менее концентрированные экстракты (1,25-2,5 мг/мл) культуры клеток, выращенной в колбах, проявившие стимулирующую активность, содержали равное количество как «стимулирующего» гинзенозида Rb1, так и «ингибирующего» Rg1 (для экстракта 2,5 мг/мл – по 0,003 мг/мл). В то же время экстракт биомассы, выращенной в ферментере, содержащий значительное количество Rb1, и гораздо меньшую концентрацию Rg1 (для экстракта 2,5 мг/мл – 0,044 и 0,001 мг/мл, соответственно) не оказывал стимулирующего действия на пыльцевые зерна.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что биологическая активность экстракта не всегда коррелирует с содержанием в нем тритерпеновых гликозидов. При наличии корреляции, интенсивность действия может отличаться от активности индивидуальных соединений в ту или иную сторону.

Эти результаты свидетельствуют о наличии в экстрактах других, отличных от тритерпеновых гликозидов, биологически-активных компонентов, которые могут модулировать активность основных биологически-активных веществ. Это подтверждает необходимость исследования активности не только отдельных соединений, но и комплексного экстракта.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате проведенных исследований было показано, что в процессе длительного выращивания культура клеток может существенно изменяться: в клетках могут появляться генетические изменения (в частности, увеличение

степени плоидности), может меняться характер роста культур клеток – молодые культуры могут обладать более высокими ростовыми показателями. Кроме того, «молодые» культуры клеток могут иметь высокий морфогенный потенциал, на направление которого можно влиять соотношением и типом фитогормонов, стимулируя органогенез, соматический эмбриогенез, а также повторную дедифференциацию клеток. Содержание в биомассе культур клеток вторичных метаболитов также сильно зависит от условий выращивания и возраста культуры. Исходя из полученных результатов можно сделать заключение о необходимости строгого контроля как условий выращивания культуры, так и качества биомассы штаммов-продуцентов. Однако, как было показано в работе, биологическая активность экстрактов биомассы культур клеток не всегда зависит от содержания в ней основных вторичных метаболитов, поэтому более целесообразным является мониторинг именно биологической активности экстрактов биомассы, для чего необходимы тест-системы на конкретные свойства различных экстрактов, позволяющие провести быстрый скрининг качества биомассы.

## ВЫВОДЫ

1. Получены культуры клеток двух видов полисциаса: *Polyscias fruticosa* и *Polyscias filicifolia* и выявлен их высокий морфогенный потенциал в течение первого года культивирования; установлено, что тип морфогенеза зависит от используемого ауксина – на средах с НУК происходит ризогенез, на средах с 2,4-Д – эмбриогенез.
2. Проведен анализ физиологических характеристик полученных культур клеток в сопоставлении с коллекционным штаммом *Polyscias filicifolia*, показаны более высокие ростовые характеристики вновь полученных культур.
3. Анализ содержания ДНК в культурах клеток *Polyscias spp.* показал, что «новые» штаммы представлены преимущественно диплоидными клетками, тогда как коллекционной штамм – клетками более высокой плоидности, что, возможно, связано с его длительным культивированием.
4. Установлено, что полученные культуры клеток *Polyscias fruticosa* и *Polyscias filicifolia* содержат тритерпеновые гликозиды (полисциазиды А, Е, 3 и

ладигинозид А), тогда как в коллекционном штамме их не обнаружено, что может быть следствием длительного выращивания этого штамма.

5. Разработаны методы экспресс-оценки (скрининга) адаптогенной и стимулирующей биологической активности растительных экстрактов и с их помощью проведен анализ как экстрактов из культур клеток *Polyscias spp.* и *Panax japonicus*, так и содержащихся в экстрактах индивидуальных тритерпеновых гликозидов.

6. Установлено, что биологическая активность индивидуальных гинзенозидов зависит от особенностей их химической структуры. Наличие дополнительной ОН-группы (у протопанаксодиола, по сравнению с протопанаксотриолом), как и присоединение остатка малоновой кислоты, может лишать эти соединения биологической активности.

7. Для всех исследуемых экстрактов выявлена адаптогенная активность, тогда как стимулирующее действие установлено только для экстрактов *Polyscias filicifolia* и *Panax japonicus*. Показано, что определяемая биологическая активность экстракта не всегда коррелирует с содержанием в нем тритерпеновых гликозидов и их характером активности, что указывает на наличие в экстрактах других биологически активных веществ

8. Поскольку биологическая активность экстрактов биомассы культур клеток не строго зависит от содержания в них основных вторичных метаболитов, для определения практической ценности штамма-продуцента, наряду с анализом биологически-активных веществ, необходим мониторинг биологической активности экстрактов.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Суханова Е.С.**, Черняк Н.Д., Носов А.М. (2010) Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia* и *Polyscias fruticosa*. *Биотехнология*, **4**, 44-50.
2. **Суханова Е.С.**, Кочкин Д.В., Гафиятова Э.И., Носов А.М. (2011) Влияние предшественника синтеза изопреноидов на ростовые и биосинтетические характеристики культуры клеток *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. *Вестник СВФУ им. М.К. Амосова*, **8**, № 4, 40-44.

3. Смоленская И.Н., Решетняк О.В., **Суханова Е.С.**, Воевудская С.Ю., Носов А.М. (2012) Увеличение синтеза гинзенозидов в суспензионной культуре клеток женьшеня настоящего при действии регуляторов роста. *Вестник МарГТУ, Серия «Лес. Экология. Природопользование»*, **1 (14)**, 96-100.
4. Титова М.В., Решетняк О.В., Осипова Е.А., **Суханова Е.С.**, Осипьянц А.И., Шумило Н.А., Орешников А.В., Носов А.М. (2012) Глубинное культивирование клеток *Stephania glabra* (Roxb) Miers: оптимизация гормонального состава питательных сред. *Вестник МарГТУ, Серия «Лес. Экология. Природопользование»*, **1 (14)**, 101-107.
5. **Суханова Е.С.**, Кочкин Д.В., Титова М.В., Носов А.М. (2012) Ростовые и биосинтетические характеристики разных штаммов культур клеток растений рода *Polyscias*. *Вестник ПГТУ, Серия «Лес. Экология. Природопользование»*, **2 (16)**, 57-66.
6. **Суханова Е.С.**, Кочкин Д.В., Черняк Н.Д., Носов А.М. (2012) Штамм культивируемых клеток растения полисциас кустарниковый ба №2 (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) в условиях *in vitro* – продуцент изопреноидов: А.с. № 2460784 (РФ), Б.И. №25.
7. **Суханова Е.С.**, Князьков И.Е., Черняк Н.Д., Носов А.М. (2006) Изучение процесса каллусогенеза и получение культур клеток двух видов полисциаса: *Polyscias fruticosa* (L.) Harms и *Polyscias filicifolia* Bailey (Araliaceae). *Материалы I (IX) Международной конференции молодых ботаников в Санкт-Петербурге*, СПб, Россия, с. 125.
8. **Суханова Е.С.**, Черняк Н.Д., Носов А.В., Носов А.М. (2007) «Получение и исследование суспензионных культур клеток двух видов полисциаса: *Polyscias fruticosa* (L.) Harms и *Polyscias filicifolia* Bailey (Araliaceae)». *Материалы VI съезда Общества Физиологов Растений России*, Сыктывкар, Россия, с. 142-143.
9. **Суханова Е.С.**, Осипьянц А.И., Черняк Н.Д., Носов А.М. (2008) «Получение и исследование культур клеток двух видов полисциаса: *Polyscias filicifolia* и *Polyscias fruticosa*». *Материалы IX конференции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология»*, Звенигород, Россия, с. 372-373.
10. **Суханова Е.С.**, Мойсенович М.М., Носов А.М. (2008) «Разработка методов скрининга биологической активности экстрактов из культур клеток высших растений». *Материалы IX конференции «Биология клеток растений in vitro и биотехнология»*, Звенигород, Россия, с. 374-375.
11. **Suhanova E.S.** (2009) «The new strains of *Polyscias filicifolia* and *Polyscias fruticosa* and the biological activity of their extracts», 1<sup>st</sup> Workshop on Plant Molecular Biotechnology XV Biotechnology Summer School, Gdansk, Poland, p.55.

12. **Суханова Е.С.**, Титова М.В., Носов А.М. (2010) Исследование суспензионных культур клеток *Polyscias fruticosa* (L.) Harms и *Polyscias filicifolia* Bailey. *Материалы Международной конференции «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на севере»*, Якутск, Россия, с. 117-121.
13. Кочкин Д.В., **Суханова Е.С.**, Носов А.М. (2010) Тритерпеновые гликозиды в культуре клеток *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. *Материалы Международной конференции «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на севере»*, Якутск, Россия, с. 101-104.
14. Титова М.В., **Суханова Е.С.**, Куличенко И.Е., Решетняк О.В., Носов А.М. (2010) Влияние ингибиторов мевинолина и фомидомицина на биосинтез стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Dioscorea deltoidea* Wall. *Материалы Международной конференции «Перспективы фитобиотехнологии для улучшения качества жизни на севере»*, Якутск, Россия, с. 121-125.
15. Соловьева Л.В., Гафиятова Э.И., **Суханова Е.С.**, Кочкин Д.В. (2011) Особенности ультраструктуры клеток суспензионной культуры *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. в связи с синтезом изопреноидов. *Тезисы докладов XVIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011»*. М.: МАКС Пресс, с. 224.
16. Соловьева Л.В., Гафиятова Э.И., **Суханова Е.С.**, Кочкин Д.В., Абдрахимов Ф.А., Абдрахимова Й.Р., Носов А.М. (2011) Ультраструктура клеток суспензионной культуры *Polyscias fruticosa* при переходе к стационарной фазе роста. *XV Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология-наука XXI века"*. Пущино: Пущинский научный центр Российской Академии Наук, с. 287.
17. Гафиятова Э.И., Соловьева Л.В., **Суханова Е.С.**, Кочкин Д.В., Абдрахимов Ф.А., Абдрахимова Й.Р., Носов А.М. (2011) Характеристика клеток суспензионной культуры *Polyscias fruticosa* (L.) Harms в связи с биосинтезом тритерпеновых сапонинов. *Тезисы 4-го Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов "Симбиоз-Россия"*. Воронеж: ВГУ, с. 8-10.