

На правах рукописи

Дорофеев Вячеслав Юрьевич

КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА КНЯЖИКА СИБИРСКОГО
(*ATRAGENE SPECIOSA* WEINM.) *IN VITRO*

03.00.25 - гистология, цитология, клеточная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Томск – 2005

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Томский государственный университет»
Федерального агентства по образованию

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Карначук Раиса Александровна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Ильинских Николай Николаевич

доктор биологических наук Уразова Людмила Николаевна

Ведущая организация:

Научно-исследовательский институт цитологии и генетики СО РАН,
г. Новосибирск

Защита состоится « 9 » июня 2005 г. в 15 часов на заседании
диссертационного совета Д 208.096.03 при Сибирском государственном
медицинском университете по адресу: г. Томск, Московский тракт, д. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке
Сибирского государственного медицинского университета

Автореферат разослан « 7 » мая 2005 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

Герасимов А. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Более 25% всех применяемых в медицине лекарств содержат соединения растительного происхождения. Это различные вторичные соединения: алкалоиды, стероиды, тритерпеновые гликозиды и другие. Однако, природные источники лекарственного сырья имеют ограниченные ареалы, либо запасы их быстро оскудевают вследствие антропогенного воздействия.

Поэтому возможный путь получения ценного и дефицитного сырья для медицинской промышленности - это метод культуры тканей и клеток лекарственных растений. Так, успешно культивируются в качестве источников алкалоидов - *Atropa belladonna* L., *Symphytum officinale*, *Aconitum* sp.; алкалоидов и сапонинов - *Nigella* sp.; витамина E - *Carthamus tinctorius* L.; эфирных масел - *Lavandula* sp. и многие другие растения (Shoyama Y. et al., 1991; Schmauder H.-P. et al., 1991). Известно о способности генетически трансформированных культур «бородатых корней» (hairy root) к биосинтезу вторичных соединений (Yamamoto H. et al., 1986, 1991; Кузовкина И.Н., 1992). Например, в трансформированных корнях шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi.) обнаружены флавоноиды: байкалин и байкалеин (Гусева А.В. и др., 1999).

Технология *in vitro* позволяет увеличить выход биологически активных веществ и регулировать их накопление в культуре, получая экологически чистые продукты. Данный метод имеет ряд преимуществ перед использованием интактного растения. Он позволяет получать сырьё независимо от климатических условий, трудностей сбора сырья, даёт возможность поддерживать рост растений круглый год, что важно для имеющих в цикле своего развития периоды покоя.

На основе изучения биосинтетических процессов можно получить наиболее богатые тканевые клоны биологически действующих веществ, а также заменить интактные растения, природный ареал которых недостаточен для использования в практических целях.

К таким растениям относится княжик сибирский - *Atragene speciosa* Weinm. (*A. sibirica* L.), семейство Лютиковые (Ranunculaceae). Княжик сибирский - это ценное лекарственное растение, показано анксиолитическое, антистрессовое, противоневротическое, противоишемическое и антиоксидантное действие экстрактов из травы княжика. Основными группами веществ, ответственными за фармакологическую активность являются тритерпеновые гликозиды (сапонины), высокополярные O-гликозиды органических кислот и производные фенилэтанола. Однако, *Atragene speciosa* Weinm. - вид с азиатским ареалом, природные заросли которого разрежены и занимают небольшие площади. Поэтому, введение *Atragene speciosa* Weinm. в асептическую культуру *in vitro* позволяет, во-первых, сохранить и поддерживать данный вид, во-вторых, получать в стабильных условиях культивирования стандартную биомассу. В Томском государственном университете на кафедре физиологии растений и биотехнологии впервые

получена каллусная культура этого вида *in vitro* (Карначук Р.А. и др., 1997). Но для промышленного использования имеет интерес введение княжика сибирского в условия стерильной суспензионной культуры, разработка способов ее поддержания и определение условий получения продуктивной биомассы клеток. Кроме того, особое внимание должно быть уделено продуктам вторичного метаболизма, в качестве источников физиологически активных веществ, а также способов регулирования их синтеза в суспензии.

Цель и задачи исследования. Целью нашей работы было получение суспензионной культуры клеток княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.), оптимизация режимов культивирования каллусной и суспензионной культур, и исследование влияния условий выращивания на накопление биологически активных веществ.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1) получить суспензионную культуру клеток княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) и подобрать оптимальный состав питательной среды и режим культивирования;

2) изучить динамику роста клеточных (калусной и суспензионной) культур *Atragene speciosa* Weinm. на модифицированных нами питательных средах в темноте и на свету;

3) исследовать влияние экзогенных гормонов и ростстимулирующих веществ (жасмоновая кислота, 24-эпибрассинолид, гуминовые кислоты и препарат «Силк») на ростовую активность клеточных культур (калусной и суспензионной) *Atragene speciosa* Weinm.;

4) изучить динамику накопления физиологически активных веществ (тритерпеновые гликозиды, флавоноиды) в клеточных культурах *Atragene speciosa* Weinm.

5) исследовать влияние экзогенных гормонов и ростстимулирующих веществ (жасмоновая кислота, 24-эпибрассинолид, гуминовые кислоты и препарат «Силк») на накопление физиологически активных веществ (тритерпеновые гликозиды, флавоноиды) в клеточных культурах *Atragene speciosa* Weinm.

Научная новизна. Впервые нами получена суспензионная культура клеток княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) и оптимизированы условия ее культивирования. Показана способность клеточной культуры к активному росту, высокой продуктивности и возможности синтеза тритерпеновых гликозидов (сапонинов), состав которых соответствует таковому в интактном растении. Получен новый штамм калусной культуры, у которого изучены продукционная способность и динамика накопления сапонинов и флавоноидов.

Впервые исследовано влияние ряда физиологически активных веществ: жасмоновой кислоты, 24-эпибрассинолида, гуминовых кислот и препарата «Силк» на рост и накопление тритерпеновых гликозидов и флавоноидов клеточными культурами (калусной и суспензионной) княжика сибирского.

Изучены динамика роста и морфометрические характеристики клеточных культур (калусной и суспензионной) княжика сибирского при культивировании на модифицированных нами питательных средах. Проведена

оценка содержания фотосинтетических пигментов каллусной культуры княжика сибирского при выращивании на свету и в темноте.

Практическая значимость. Полученная нами суспензионная культура княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) может служить основой для коммерческого производства физиологически активных веществ и создания на их основе препарата ноотропного действия.

Результаты исследований используются при чтении курсов «Биотехнология», «Клеточная культура растительных тканей» для студентов - биологов Томского государственного университета.

Положения, выносимые на защиту.

1. Впервые получена суспензионная культура княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) путем введения каллусных клеток на модифицированную питательную среду.

2. Показано, что клеточная культура княжика сибирского является продуцентом тритерпеновых сапонинов и флавоноидов.

3. Физиологически активные соединения (жасмоновая кислота, 24-эпибрассинолид, гуминовые кислоты и препарат «Силк») и свет (белый и красный) активно влияют на рост каллусной и суспензионной культур *Atragene speciosa* Weinm. и накопление высокополярных тритерпеновых гликозидов, суммы флавоноидов *in vitro*, ассортимент которых увеличивается при длительности культивирования. Обнаруженные соединения соответствуют таковым интактного растения.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Всероссийском совещании «Физиология и биотехнология растений», посвященном 120-летию Томского государственного университета (Томск, 1998); IV съезде Общества физиологов растений России и Международной конференции «Физиология растений - наука III тысячелетия» (Москва, 1999); Городской конференции молодых учёных и специалистов «Региональные проблемы экологии и природопользования» (Томск, 1999); Международной научной конференции «Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности» (Томск, 2000); IV Международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования» (Москва, 2001); Международной научной конференции «Биотехнология на рубеже двух тысячелетий» (Саранск, 2001); LX Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2002); I, II и III Московских Международных Конгрессах «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002, 2003, 2005); VI Общероссийской межвузовской конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Наука и образование» (Томск, 2002); VIII Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Саратов, 2003); V съезде Общества физиологов растений России и международной конференции «Физиология растений – основа фитобиотехнологии» (Пенза, 2003); II Международной научно-

практической конференции «Актуальные проблемы экологии» (Караганда, 2003).

Публикации. По теме диссертации было опубликовано 19 печатных работ, из них 2 – в реферируемых изданиях.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 142 страницах, содержит 34 рисунка и 35 таблиц. Работа состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, списка используемой литературы, включающего 166 источников, из них 131 отечественных и 35 зарубежных.

ОБЪЕКТ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Княжик сибирский – *Atragene speciosa* Weinm. (семейство Лютиковые - Ranunculaceae) - лекарственное растение лесной зоны и горнолесного пояса Западной, Средней и Восточной Сибири. Материалом для исследования являлась культура клеток княжика сибирского, полученная на кафедре физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета при использовании в качестве экспланта сегментов черешков молодых листьев интактных растений *A. speciosa* Weinm. из республики Хакасия (Ширинский район) в 1996 году Е.А. Пироговой и Т.В. Клепиковой (штамм 1ПК) и в 2003 году – В.Ю. Дорофеевым (штамм 2Д).

Культивирование клеточных культур княжика сибирского (Atragene speciosa Weinm.). Культивирование каллусной культуры княжика сибирского проводили на модифицированных нами средах по прописи Мурасиге – Скуга, Шенка – Хильдебрандта в условиях белого и красного света (интенсивность 1500 лк, фотопериод 12 ч) и в темноте. Культивирование на свету проводили на среде с уменьшенным в два (1,5%) и три (1%) раза количеством сахарозы (Карначук Р.А. и др., 1999). Концентрацией регуляторов роста (ауксины и цитокинины) варьировали в пределах от 0,6 до 3 мг/л, получив, таким образом, девять вариантов сред. Количество пробирок для одного варианта равно десяти. Суспензионную культуру выращивали на модифицированной среде Мурасиге – Скуга, но без добавления агара. Выращивание проводили в колбах на перемешивающем устройстве при 70-100 об/мин. Использовали конические колбы объёмом 50 мл для индукции суспензии (1-й пассаж), затем колбы Эрленмейера объёмом 250 мл, содержащие 60 мл среды. Культивирование проводили в темноте при температуре 26°C и влажности 67-70%. Для получения 100 мл клеточной суспензии брали 2-3 г каллусных клеток. В экспериментах использовали не менее 10 сосудов для каждого варианта. Субкультивирование проводили через 20-30 дней, в зависимости от скорости роста биомассы. При пересадках вели поддерживающий отбор по признаку «темп роста», визуальнo отбирая для дальнейшего культивирования колбы с лучшим ростом. Исключение из питательной среды ионов кальция (CaCl_2) облегчало суспендирование. Жизнеспособность культуры определяли по стандартной методике, путём окрашивания клеток метиленовым синим (Паушева З.П., 1988; Мигранова И.Г. и др., 2000). Ростовые характеристики

суспензии определяли, измеряя сухую и сырую биомассу, подсчитывая количество клеток в камере Горяева (Головацкая И.Ф., Карначук Р.А., 1999; Паламарчук И.А., Веселова Т.Д., 1969).

Сухую массу определяли, высушивая клетки при температуре 50 - 55°C до воздушно-сухого состояния. Микроскопический анализ крупноагрегированной суспензии проводили после мацерации в смеси 0,2% целлюлазы и 0,2% пектиназы (1:1) в течение 1 часа при 26°C. Для получения изотонического раствора добавляли маннит (90 г/л) и CaCl₂ (1,480 г/л).

Прирост сырой биомассы оценивали по общепринятому показателю - ростовой индекс в %. Определяли средний конечный и средний начальный вес клеток культуры.

Исследования вторичных метаболитов Atragene speciosa Weinm.

Сапонины. Для обнаружения тритерпеновых гликозидов (сапонинов) была использована каллусная и суспензионная культуры княжика сибирского разного возраста и условий выращивания. Навеску сырья (1,0 г) экстрагировали метанолом при температуре 60 – 65°C на водяной бане с обратным холодильником в течение часа. Затем отгоняли растворитель под вакуумом при температуре 40 – 60°C. Обнаружение сапонинов осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV – 254», используя в качестве подвижной фазы системы растворителей: н-бутанол – этанол – вода (7:2:5, 10:2:5). В качестве детектора использовали 25%-ный спиртовой раствор фосфорно–вольфрамовой кислоты. Хроматограммы проявляли при нагревании в течение 5 – 10 минут при температуре 100 – 105°C.

Флавоноиды. Количественное определение суммы флавоноидов в экстракте из клеток культуры (извлечении 70% спиртом) производили спектрофотометрически в присутствии комплексообразователя AlCl₃ в виде 2% спиртового раствора при длине волны 415 нм с использованием в качестве стандарта рутина (Минаева В.Г., 1991).

Фотосинтетические пигменты каллусной культуры Atragene speciosa Weinm. Исследовали влияние света на накопление фотосинтетических пигментов, которые определяли количественно спектрофотометрически в навеске свежей клеточной массы 30-50 мг (Шлык А.А., 1971).

Морфометрические исследования клеточных культур Atragene speciosa Weinm. Для определения размеров клеток каллуса использовали световую микроскопию, предварительно прибегая к условиям мацерации (Фурет Г.Г., 1979). Для достижения точности измеряли с помощью окуляр-микрометра. Объём клеток вычисляли по формуле Ю.А. Цельникер и А.Т. Мокроносова с учётом $K = L / D$, где L – длина клетки, D – ширина клетки (Мокроносов А.Т. и др., 1978). Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась на персональном компьютере, с помощью электронных таблиц Excel. В таблицах и на рисунках приведены данные в виде средних арифметических с доверительными интервалами.

РОСТОВАЯ АКТИВНОСТЬ КАЛЛУСНОЙ И СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУР *ATRAGENE SPECIOSA* WEINM.

После анализа роста были отобраны компоненты питательной среды Мурасиге – Скуга, которые оказывали наиболее эффективное действие на пролиферацию клеток каллуса княжика сибирского: мезоинозит - 100 мг/л; 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота - 0,5 мг/л; 6-бензиламинопурин - 0,3 мг/л; сахароза - 30 г/л; агар - 9 г/л. Наши наблюдения показали, что наибольший прирост сырой биомассы каллуса (100%) наблюдался в темноте при культивировании на средах Мурасиге – Скуга, Шенка – Хильдебрандта (рис. 1).

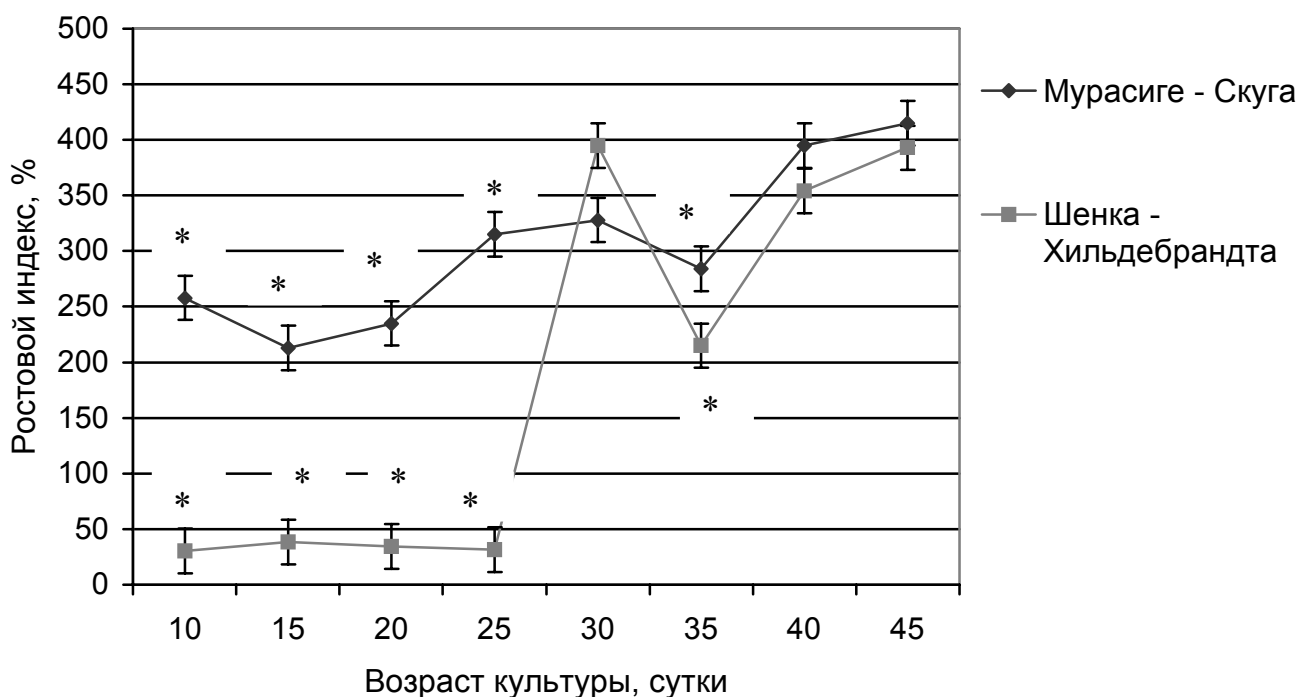


Рисунок 1. Динамика роста каллусной культуры *A. speciosa* Weinm. (штамм 1ПК) 10-15-го субкультивирований на питательных средах Мурасиге – Скуга и Шенка – Хильдебрандта

Примечание: * - различия достоверны при $p < 0,05$

Замечено, что культивирование на среде Гамборга (B5) вело к некрозу ткани уже на 6 – 7 сутки после пересадки культуры. Максимальный прирост биомассы каллуса получен на среде, содержащей 3 % сахарозы.

Белый свет вызывал активное зеленение культуры княжика сибирского. В клетках каллуса княжика сибирского 18 – 19-го субкультивирований (штамм 1ПК) в темноте, обнаружены следовые количества каротиноидов. Белый и красный свет вызывали синтез хлорофиллов а и b. При этом происходило увеличение содержания пигментов по сравнению с предыдущим пассажем.

На 10, 20 и 30 сутки 13-го субкультивирования наблюдались достоверные различия в средних объемах мелких клеток на среде Мурасиге - Скуга с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой и 6-бензиламинопурином. К концу субкультивирования на среде Мурасиге - Скуга с α -нафтилуксусной кислотой и 6-бензиламинопурином объем мелких клеток уменьшался, а на среде с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой и 6-бензиламинопурином - увеличивался (рис. 2).

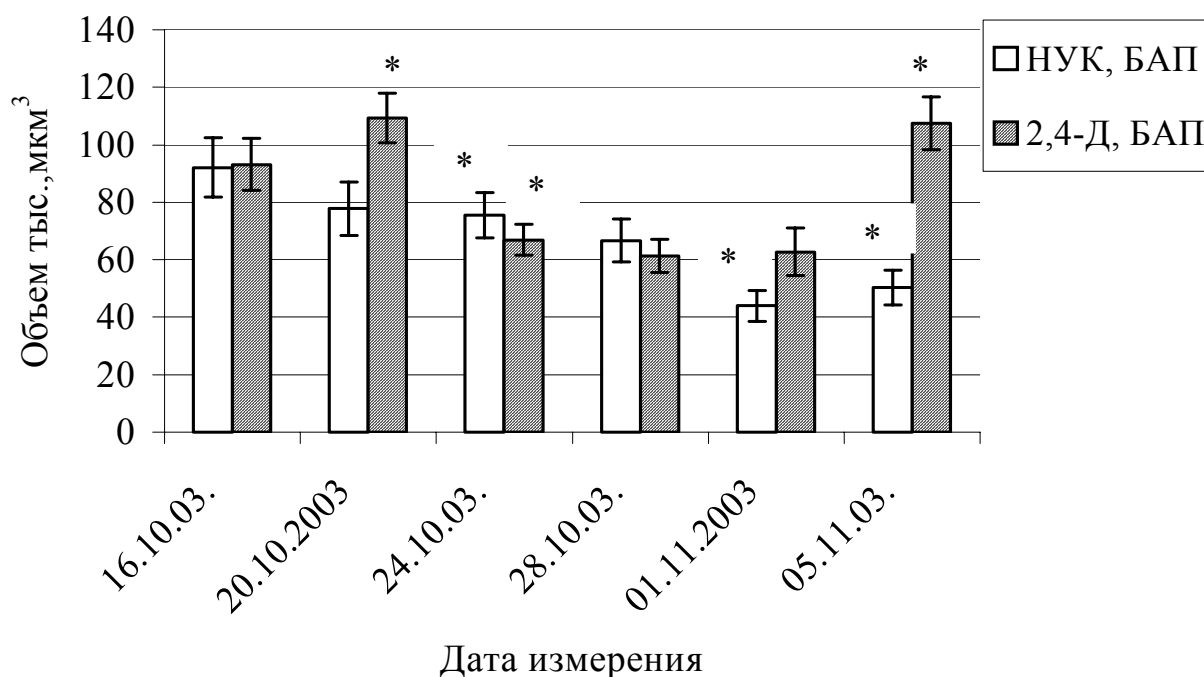


Рисунок 2. Объем мелких клеток каллусной культуры *A. speciosa* Weinm 13-го субкультивирования на питательной среде Мурасиге – Скуга

Примечания: здесь и в табл. 1 НУК - α -нафтилуксусная кислота; БАП - 6-бензиламинопурин; * - различия достоверны с «16.10.03» при $p < 0,05$

Переход к периодическому культивированию (суспензионным культурам) в первую очередь был вызван тем, что при таком режиме культивирования, как правило, происходит интенсификация ростовых процессов, а в ряде случаев увеличивается биосинтетический потенциал культур. Суспензионные культуры сохраняют ряд свойств, характерных для исходного организма. И одним из таких свойств является способность к синтезу вторичных метаболитов (Simmonds D. et al., 1983; Seo W.T. et al., 1993). Быстрое получение биомассы растительных клеток суспензионных культур позволяет использовать для культивирования крупномасштабное промышленное оборудование (ферментеры) (Svatos A., Masek T., 1994). Поскольку суспензионная культура клеток этого вида получена впервые, начальным этапом работы было оптимизация условий выращивания, изучение её цитологических и физиологических характеристик, в частности, размера клеток,

агрегированности, скорости роста суспензии, оптимального времени субкультивирования.

Время, необходимое для роста клеточной суспензии после 5-го субкультивирования, составило 20 суток. При отборе быстрорастущей фракции это время может быть сокращено до 16 суток (табл. 1).

Таблица 1

Основные ростовые характеристики суспензионной культуры *Atragene speciosa* Weinm. ($X \pm m$)

Характеристики	Среда с 2,4-Д и БАП		Среда с НУК и БАП	
	3-й пассаж	5-й пассаж	3-й пассаж	5-й пассаж
1) Жизнеспособность клеток, %	63±3	76±2*	58±2	61±4*
2) Плотность клеток, кл./мл	3,5·10 ⁴	4,8·10 ⁶ *	2,3·10 ⁴	2,7·10 ⁵ *
3) Содержание сухой массы в клетках, %	4,5±0,3	5,2±0,2*	3,8±0,2	4,5±0,2
4) Время максимального накопления массы, сутки	20±3	16±3*	30±2	27±3*

Примечание: * - различия достоверны с «3-ий пассаж» при $p < 0,05$

ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА РОСТ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР *ATRAGENE SPECIOSA* WEINM.

Основным недостатком биотехнологических методов синтеза фитопродуктов является низкая продуктивность культур клеток-продуцентов. В последнее время в некоторых работах показана возможность существенного увеличения выхода производных шиконина и алканнина в культурах клеток растений сем. Boraginaceae с помощью жасмоновой кислоты. Эффект жасмонатов проявляется специфически в каждой конкретной культуре клеток в зависимости от вида растения, линии или штамма клеток, питательной среды и других условий культивирования (Parthier В., 1991).

Анализировали данные 2, 6, 8, 12-го субкультивирований (штамм 2 Д) и 70, 73-го субкультивирований (штамм 1 ПК) культуры *A. speciosa* Weinm. Показан эффект стимуляции роста каллуса (штамм 2Д) с жасмоновой кислотой в низкой концентрации (10^{-9} - 10^{-8} М). Начиная с 14-17 суток 70 и 73-го субкультивирования, происходила активация роста штамма 1ПК, но уже к концу субкультивирования (30 сутки) наблюдалось ингибирование роста клеточной культуры (рис. 3).

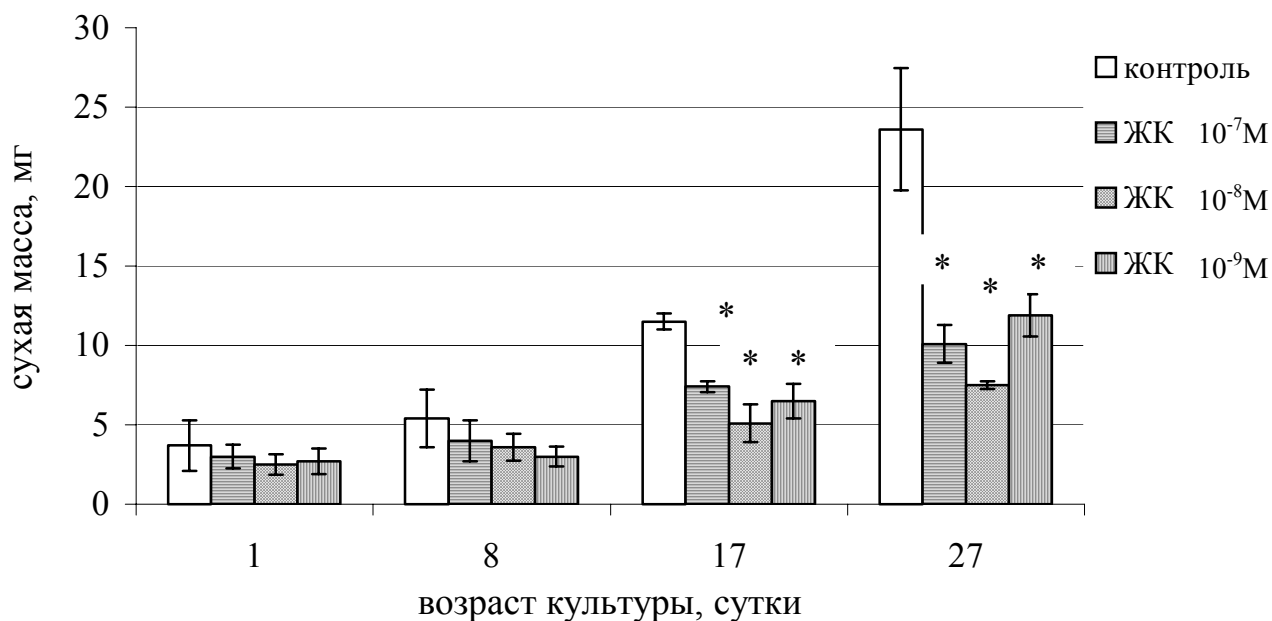


Рисунок 3. Динамика роста клеточной культуры *Atragene speciosa* Weinm. (штамм 1ПК) 70-го субкультивирования с жасмоновой кислотой

Примечания: ЖК – жасмоновая кислота; * - различия достоверны с контролем при $p < 0,05$

Жасмоновая кислота влияла на прирост биомассы суспензионной культуры 2-го и 6-го субкультивирований спустя 7 суток от начала культивирования (табл. 2).

Таблица 2
Ростовые характеристики суспензионной культуры *Atragene speciosa* Weinm. на среде с жасмоновой кислотой ($X \pm m$)

Параметры роста и номер пассажа		контроль	Концентрация жасмоновой кислоты, М	
			10 ⁻⁶	10 ⁻⁹
Индекс роста	5	1,58±0,07	0,86±0,03*	1,34±0,04*
	6	2,04±0,03	0,95±0,07*	1,27±0,07*
Сухая масса, мг	5	5,22±0,05	1,53±0,12*	2,63±0,13*
	6	5,71±0,02	1,58±0,07*	2,74±0,07*

Примечание: * - здесь и в табл. 3, 4 различия достоверны с контролем при $p < 0,05$

Также было исследовано влияние экзогенного 24-эпибрассинолида в концентрациях 10^{-12} – 10^{-7} М на рост клеток княжика сибирского. Стимуляция роста происходила при добавлении в среду 24-эпибрассинолида в низких концентрациях (10^{-9} – 10^{-12} М). На 25-30 сутки 8-го субкультивирования каллусной культуры (штамм 2Д) прирост биомассы достигал 130% (табл 3).

Таблица 3

Индекс роста каллусной культуры *Atragene speciosa* Weinm. (штамм 2Д) 8-го субкультивирования ($X \pm m$)

Концентрации ЭБ, М	Сутки, индекс роста, %					
	5	10	15	20	25	30
Контроль	54,32±8,27	21,12±4,38	122,50±12,50	150,83±22,50	155,55±47,58	526,48±86,76
10^{-7}	34,31±4,96*	—	42,04±12,95*	—	—	—
10^{-8}	24,88±4,69*	—	23,90±5,18*	41,89±3,71*	26,69±4,88*	63,77±21,67*
10^{-9}	3,07±1,07*	—	—	12,30±2,33*	—	56,92±5,69*
10^{-10}	41,30±2,28*	7,03±1,01*	87,17±5,24*	114,82±7,10*	163,13±24,67	794,37±25,14*
10^{-11}	24,85±30,56*	49,80±5,19*	166,66±12,67*	212,88±10,02*	350,44±6,69*	1016,93±77,35*
10^{-12}	61,52±4,38	16,40±0,03*	216,00±81,72*	228,73±14,44*	358,05±23,76*	1131,00±83,27*

Примечания: ЭБ – 24-эпибрассинолид; * - различия достоверны с контролем при $p < 0,05$

Более высокие концентрации 24-эпибрассинолида (10^{-7} – 10^{-8} М) ингибировали рост культуры 6-го субкультивирования.

В практике растениеводства сравнительно недавно начали использовать гуминовые кислоты и препарат «Силк». Исследовали динамику роста и морфометрические характеристики клеток каллусной культуры *Atragene speciosa* Weinm. (штамм 2Д), культивируемой на модифицированных питательных средах Мурасиге - Скуга с добавлением гуминовых кислот и препарата «Силк». Наши наблюдения показали, что наибольший прирост сырой биомассы каллуса был на среде с добавкой гуминовых кислот в концентрациях 10^{-3} и 10^{-4} % (табл. 4).

Ростовой индекс *Atragene speciosa* Weinm. (штамм 2Д)
15-го субкультивирования на среде с гуминовыми кислотами и препаратом «Силк»
($X \pm m$)

Вариант выращивания:	Компонент питательной среды, ростовой индекс, %					
	контроль	ГК ($10^{-3}\%$)	ГК ($10^{-4}\%$)	ГК ($10^{-5}\%$)	"Силк" (0,04 мл/л)	"Силк" (0,08 мл/л)
в пробирках	145±0,4	333±0,2*	332±0,5*	161±0,3*	278±0,4*	247±0,2*
в чашках Петри	23±0,1	3±0,1*	35±0,1*	20±0,1*	2±0,2*	31±0,1*
в пробирках на среде без БАП	251±0,5	63±0,3*	158±0,3*	—	—	—

Примечания: ГК – гуминовые кислоты; БАП – 6-бензиламинопурин;
* - различия достоверны с контролем при $p < 0,05$

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА КАЛЛУСНОЙ И СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУР *ATRAGENE SPECIOSA* WEINM.

Для обнаружения тритерпеновых гликозидов (сапонинов) были использованы каллусная и суспензионная культуры княжика сибирского разного возраста и условий выращивания. В клетках 32-го субкультивирования, выращенных на белом свете обнаружено десять фракций высокополярных тритерпеновых гликозидов с rf 0,02; 0,04; 0,07; 0,09; 0,11; 0,14; 0,16; 0,18; 0,22; 0,24, а в темноте - восемь тритерпеновых гликозидов. Выход из 1 г сухого сырья 25–26-го (белый свет), 32-го (темнота и белый свет) субкультивирований при экстрагировании 10 мл метанола составил 10, 25 и 15%, соответственно. Во всех вариантах культивирования каллусной, суспензионной культур преобладает накопление высокополярных тритерпеновых гликозидов, состав которых соответствует таковому интактного растения.

В каллусных клетках 2-го и 6-го субкультивирований, выращенных на питательной среде без добавления гормонов и с добавкой жасмоновой кислоты 10^{-8} М, обнаружено девять фракций тритерпеновых гликозидов. В каллусе, выращенном на среде с добавлением жасмоновой кислоты 10^{-7} М обнаружено шесть тритерпеновых гликозидов, а с добавкой жасмоновой кислоты в концентрации 10^{-9} М - пять фракций тритерпеновых гликозидов с rf 0,03; 0,08; 0,19; 0,58; 0,91.

В каллусе 2-го и 6-го субкультивирований, выращенном с добавлением 24-эпибрассинолида в концентрациях 10^{-8} и 10^{-9} М обнаружено восемь фракций тритерпеновых гликозидов с rf 0,06; 0,16; 0,27; 0,35; 0,52; 0,88, а с добавкой 24-эпибрассинолида в концентрации 10^{-7} М – одна фракция тритерпеновых гликозидов с rf 0,95.

Выход из 1 г сухой культуры клеток 2-го и 6-го субкультивирований составил 14%, а с добавлением жасмоновой кислоты в концентрации 10^{-9} М - 24%.

В каллусе 15-го субкультивирования на среде с добавлением гуминовых кислот 10^{-3} %, выявлено одиннадцать тритерпеновых гликозидов, а в клетках, на среде с добавлением гуминовых кислот 10^{-4} %, обнаружили двенадцать тритерпеновых гликозидов.

Следует отметить, что добавление в среду жасмоновой кислоты и 24-эпибрассинолида в концентрации 10^{-8} М стимулирует образование высокополярных тритерпеновых гликозидов, а препарата «Силк» - накопление малополярных сапонинов.

В результате исследования было показано, что в стимуляции биосинтеза флавоноидов (5,15%) в каллусной культуре 2 – 6-го субкультивирований наиболее эффективен 24-эпибрассинолид в концентрации 10^{-6} М. Известно, что в листьях княжика сибирского содержание флавоноидов составляет около 6%, в стеблях – около 1,5% и в корнях – около 1%.

Полученные нами данные показывают, что синтез тритерпеновых гликозидов и флавоноидов в каллусной и суспензионной культурах клеток на единицу сухой массы сопоставим с содержанием этих веществ в интактном растении.

Таким образом, интерес к введению княжика сибирского в асептическую культуру *in vitro* вызван возможностью получения физиологически активных веществ (тритерпеновых гликозидов (сапонинов), феноло-спиртов и их гликозидов, О-гликозидов органических кислот, флавоноидов, кумаринов, аминокислот) для создания ноотропного и адаптогенного фитопрепарата.

Впервые нами получена суспензионная культура, обладающая высокой и стабильной скоростью роста, для которой была подобрана среда и оптимизирован режим культивирования. Время максимального накопления биомассы суспензионной культуры составляло 16-20 суток, а плотность суспензии - $4,8 \cdot 10^6$ клеток/мл.

Нами также получен новый штамм (2Д) каллусной культуры княжика сибирского *in vitro*, для активного роста которой подобран и оптимизирован состав питательной среды. Динамика роста этого штамма была оптимальной при добавлении гормонов 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (0,5 мг/л), α -нафтилуксусной кислоты (0,6 мг/л) и 6-бензиламинопурина (0,3 мг/л). Продолжительность одного субкультивирования для каллусной культуры составляла 30-35 суток.

Максимальный прирост биомассы наблюдался при выращивании клеточной культуры в темноте. При культивировании на свету было показано, что белая часть спектра снижала ростовую активность, а красная – вызывала полное ингибирование роста каллуса. Подобная тенденция наблюдалась другими авторами в работе с культурами *Ficus elastica* и *Scozonera* sp. (Гусев М.В. и др., 1992).

Показана способность клеточной культуры княжика сибирского как в каллусе, так и суспензии, синтезировать тритерпеновые гликозиды и флавоноиды в условиях *in vitro*.

Важным моментом при культивировании клеточных культур является оптимизация продукционного процесса добавлением физиологически активных соединений, в том числе, гормонов. Так, прирост биомассы каллусной (штамм 2Д) и суспензионной культур второго и шестого субкультивирований под действием жасмоновой кислоты замечен только на 7 сутки субкультивирования, при этом обнаружено не менее девяти фракций тритерпеновых гликозидов.

Стимуляция роста происходила при добавлении 24-эпибрассинолида в концентрациях 10^{-9} - 10^{-12} М. При этом прирост биомассы каллусной культуры через 25 суток составил 130%. Для суспензионной культуры пятого и шестого субкультивирований стимулирующий эффект наблюдался при добавлении 24-эпибрассинолида в концентрации 10^{-9} М. При этом изменялась динамика накопления тритерпеновых гликозидов и суммы флавоноидов. Выявлено восемь высокополярных сапонинов в культуре княжика сибирского десятого субкультивирования.

Таким образом, нами получены суспензионная и каллусная (штамм 2Д) клеточные культуры княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) *in vitro*. Оптимизированы параметры их выращивания, изучены ростовые характеристики и накопление вторичных веществ. Полученные результаты позволяют говорить о получении перспективного продуцента физиологически активных веществ для создания фитопрепарата ноотропного действия.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы условия получения и выращивания суспензионной культуры княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.). Получен новый штамм (2Д) каллусной культуры княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) в качестве экспланта для суспензионной культуры. Оптимизированы условия индукции каллусогенеза этого штамма.

2. Исследована динамика роста суспензионной культуры княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.). Свет (красный и белый) ингибировал рост каллусной культуры княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.).

3. Стимуляция роста каллусной и суспензионной культур княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) происходила при добавлении 24-эпибрассинолида в низких концентрациях 10^{-9} - 10^{-12} М. Жасмоновая кислота в концентрациях 10^{-7} - 10^{-8} М ингибировала рост клеточных культур княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.).

4. Суспензионная и каллусная культуры княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) *in vitro* синтезируют высокополярные тритерпеновые гликозиды, ассортимент которых увеличивается при дальнейшем культивировании. Соединения соответствуют интактному растению.

5. Показано стимулирующее влияние экзогенных физиологически активных жасмоновой кислоты и 24-эпибрассинолида в концентрации 10^{-8} М на накопление тритерпеновых гликозидов (сапонинов) клеточных культур княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.). Биосинтез флавоноидов

суспензионной и каллусной культурами княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) стимулировал 24-эпибрассинолид в высокой концентрации 10^{-6} М.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оптимизация среды и режима культивирования для каллусной культуры *Atragene sibirica* L. Материалы Всеросс. совещ., посвящ. 120 - летию ТГУ «Физиология и биотехнология растений». - Томск: Изд-во ТГУ. - 1998. - С. 72-74 / Соавт.: Ю.В. Медведева.
2. Синтез сапонинов в культуре ткани *Atragene sibirica* L. Тезисы докладов IV съезда Общества физиологов растений России. Международная конференция «Физиология растений - наука III тысячелетия» (Москва, 4-9 октября 1999 г.). – М. - 1999. – Т. II. - С. 593 / Соавт.: Р.А. Карначук, И.В. Шилова, Е.А. Краснов.
3. Роль света в образовании сапонинов клеточной культурой ткани княжика сибирского. Материалы городской конференции молодых учёных и специалистов «Региональные проблемы экологии и природопользования» (Томск, 25-26 ноября, 1999 г.). - Томск: Изд-во Томского государственного университета систем управления и радиовещания. - 2000. - С. 72-73.
4. Вторичные метаболиты культуры ткани княжика сибирского (*Atragene sibirica* L.). Материалы Междунар. научн. конф. «Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности» (Томск, 27-29 июня 2000 г.). - Томск: СГМУ. – 2000. - С. 33-34 / Соавт.: Р.А. Карначук, И.В. Шилова, Е.А. Краснов.
5. Физиологически активные вещества каллусной культуры княжика сибирского. Труды IV Междунар. симпоз. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». - М.: Изд-во РУДН. - 2001. - С.117-119 / Соавт.: Р.А. Карначук, И.В. Шилова, Е.А. Краснов.
6. Клеточная культура княжика сибирского – перспективный источник лекарственных средств. Материалы Междунар. научн. конф. «Биотехнология на рубеже двух тысячелетий» (Саранск, 12-15 сентября 2001 г.). - Саранск: Изд-во Мордов. ун-та. - 2001. - С.182-183 / Соавт.: Р.А. Карначук, Е.А. Краснов, И.В. Шилова.
7. Княжик сибирский (*Atragene speciosa* Weinm.) – клеточная культура *in vitro* как источник биологически активных веществ. Материалы LX Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Биология. - Новосибирск: Изд-во Новосибирского государственного университета. - 2002. - С. 75-76.
8. Клеточная культура почечного чая (*Orhtosiphon stamineus* Benth.) – источник биологически активных веществ. Материалы LX Международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс»: Биология. - Новосибирск: Изд-во Новосибирского государственного университета. - 2002. - С. 104 / Соавт.: Д.М. Старцева.
9. *Atragene speciosa* Weinm.: культура *in vitro* как источник тритерпеновых гликозидов. Материалы I Междунар. конгресса «Биотехнология

– состояние и перспективы развития» (Москва, 14-18 октября 2002 г.). - М.: ЗАО «ПИК Максима», РХТУ им. Менделеева. - 2002. - С. 90 / Соавт.: Р.А. Карначук.

10. Влияние условий выращивания на гормональный статус и урожайность высокорослой и карликовой линий пшеницы. Физиология растений. - 2003. - Т. 50. - № 2. - С. 1-6 / Соавт.: Р.А. Карначук, О.Б. Вайшля С.А. Ушакова, А.А.Тихомиров, Х. Лассер, Дж.-Б. Гро.

11. Княжик сибирский (*Atragene speciosa* Weinm.) *in vitro* – источник физиологически активных веществ. Материалы VIII Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Саратов, 9-13 сентября 2003 г.). – Саратов. - 2003. - С. 134-135 / Соавт.: Р.А. Карначук.

12. Введение в клеточную культуру *Saussurea frolovii* Ledeb. в качестве источника лекарственных веществ. Материалы II Московского международного Конгресса «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 10-14 ноября 2003 г.). - М.: Изд-во ЗАО «ПИК Максима», РХТУ им. Менделеева. – 2003. - Ч. 1. - С. 280 / Соавт.: Р.А. Карначук, Д.В. Анциферов, Р.И. Лещук.

13. Культура клеток княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) *in vitro* как источник биологически активных сапонинов. Материалы VI Общероссийской межвузовской конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Наука и образование» (Томск, 15-20 апреля 2002 г.). - Томск: Изд-во Томского государственного педагогического университета. - 2003. - С. 44-45 / И.В. Шилова.

14. Почечный чай (*Orthosiphon stamineus* Benth.) – источник лекарственных средств. Материалы VI Общероссийской межвузовской конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Наука и образование» (Томск, 15-20 апреля 2002 г.). - Томск: Изд-во Томского государственного педагогического университета. - 2003. - С. 75-76 / Соавт.: Д.М. Старцева.

15. Влияние жасмоновой кислоты на рост миниклубней оздоровленного *in vitro* картофеля в условиях гидропоники. Тезисы докладов. V съезд общества физиологов растений России и Международной конф. «Физиология растений – основа фитобиотехнологии» (Пенза, 15-21 сентября 2003 г.). – Пенза. - 2003. - С. 397-398 / Р.А. Карначук, Ю.Е. Якимов, М.В. Ефимова, В. Именов, И. Махачкова.

16. Клеточная культура княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) в контролируемых условиях *in vitro*. Материалы II Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы экологии» (Караганда, 4-5 декабря 2003 г.). - Караганда: Изд-во Карагандинского государственного университета. – 2003. – Ч. 1. - С. 261-263 / Соавт.: Р.А. Карначук.

17. Регуляция роста клеточной культуры княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) *in vitro*. Вестник Томского государственного университета. Серия «Биологические науки» (биология, почвоведение, лесоведение). Приложение. (ноябрь 2003 г.). - Томск: Изд-во Томского государственного университета. – 2003. - № 8. - С. 68-70 / Соавт.: Р.А. Карначук.

18. Клеточная культура княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.) *in vitro* – продуцент сапонинов. Сборник статей «Ноосферные знания и технологии». – Томск: Изд-во Том. Ун-та. - 2004. – Вып. 1. – С. 71-76.

19. Суспензионная культура *Atragene speciosa* Weinm. как источник физиологически активных веществ. Материалы III Московского Международного Конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 14-18 марта 2005). - М.: Изд-во ЗАО «ПИК Максима», РХТУ им. Менделеева. – 2005. - Ч. 1. – С. 73-74 / Соавт.: Р.А. Карначук, О.В. Стронин, Е.А. Краснов, И.В. Шилова.

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедрой фармацевтической химии Сибирского государственного медицинского университета, доктору фармацевтических наук, профессору Е.А. Краснову, старшему преподавателю кафедры фармацевтической химии Сибирского государственного медицинского университета, кандидату фармацевтических наук И.В. Шиловой, начальнику отделения медикобиологических проблем Филиала ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ в г. Томске «НПО Вирион», кандидату медицинских наук О.В. Стронину, заведующему кафедрой физиологии растений и биотехнологии Томского государственного университета, доктору биологических наук, профессору Р.А. Карначук.