

СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР НА ПРИМЕРЕ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО, АРАЛИИ СЕРДЦЕВИДНОЙ И ГАРДЕНИИ ЖАСМИНОВИДНОЙ

Данилова Александра Артёмовна, магистр 2-го года обучения, ассистент кафедры промышленной технологии лекарственных препаратов, инженер лаборатории аддитивных технологий, E-mail: shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

Некрасова Дарья Алексеевна, аспирант 2-го года обучения, м.н.с. лаборатории культуры растительных клеток, E-mail: nekrasova.darya@pharminnotech.com

Бугаев Артём Сергеевич, магистр 1-го года обучения, E-mail: artem.bugaev@spcpi.ru

*ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет
Министерства здравоохранения РФ*

***Аннотация.** Изучены особенности введения в культуру *in vitro* растительных клеток шлемника байкальского, аралии сердцевидной и гардении жасминовидной, исследованы особенности культивирования указанных объектов на питательных средах различного состава.*

***Ключевые слова:** культуры растительных клеток, шлемник байкальский, аралия сердцевидная, гардения жасминовидная, каллусные культуры, суспензионная культура, вторичные метаболиты, иридоиды, флавоноиды, тритерпеноиды.*

Введение. Лекарственные растения играют большое значение для фармацевтической промышленности в виду продуцирования широкого спектра биологически активных веществ (БАВ) - соединений вторичного метаболизма, которые могут быть использованы в технологии создания фитопрепаратов, лечебно-косметических средств и биологически активных добавок (БАД) [1]. Рассматриваемые в рамках данной работы виды (шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi), аралия сердцевидная (*Aralia cordata* Thunb.) и гардения жасминовидная (*Gardenia jasminoides* Ellis)) отличаются высоким содержанием вторичных метаболитов. Например, в составе подземных органов шлемника байкальского обнаружены полифенольные соединения (байкалеин и байкалин), ингибирующие репликацию коронавируса [2]. Наличие в составе гардении жасминовидной таких соединений, как иридоидные гликозиды (генипин, генипозид, гарденозид), опосредует противовоспалительное, гепатопротекторное и антидепрессивное действие [3]. Вторичные метаболиты аралии сердцевидной обладают адаптогенным, противодиабетическим, гепатопротекторным, противоопухолевым и кардиотоническим эффектом [4]. Однако, одной из существенных проблем, ограничивающих использование шлемника байкальского, гардении жасминовидной и аралии сердцевидной,

становится тенденция деградации фитобиоценозов, связанная с влиянием антропогенного фактора, изменением климатических и экологических условий. Стоит отметить, что *S.baicalensis*, *A. cordata* и *G. jasminoides* имеют ограниченный естественный ареал, а культивирование данных растений традиционными способами является трудоемким процессом. С целью удовлетворения интересов государственной политики в области природосбережения и научно-исследовательских изысканий предлагается создание банка клеточных культур *in vitro*, в частности, шлемника байкальского, аралии сердцевидной и гардении жасминовидной.

Материалы и методы. Материалом для исследований служили экспланты, полученные из органов интактных растений *S.baicalensis*, *A. cordata*, *G. jasminoides*. Стерилизацию эксплантов проводили путем обработки 5% раствором гипохлорита натрия для уничтожения эпифитной микробиоты, а затем 70% спиртом этиловым для удаления липидного слоя [5]. Остатки стерилизующих агентов удаляли трехкратной промывкой водой очищенной. Для индукции каллусогенеза на пластинки наносили раневые линии. После экспланты помещались на агаризированные питательные среды различного состава (табл.1). Культивирование проводили в темноте и на свету при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$. По прошествии 15 суток (для гардении и шлемника) и 30 суток (для аралии) светлые участки первичного каллуса в субкультивировали на свежую питательную среду.

Введение клеток шлемника байкальского в суспензионную культуру предполагало перенос рыхлого каллуса в конические колбы, заполненные жидкой питательной средой. Выращивание биомассы проводилось в условиях непрерывного перемешивания на качающейся платформе (скорость 100 ± 5 об/мин.).

Для определения оптимального срока культивирования полученной культуры в течение всего ростового цикла отбирались пробы. На основании полученных данных рассчитывали показатели индекса роста и удельной скорости роста для *S.baicalensis*, *G. jasminoides*. Подбор оптимальных условий для культивирования каллуса *A.cordata* подбирали эмпирически, визуально оценивая прирост биомассы.

Анализ БАВ осуществляли методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с использованием системы CAMAG HPTLC PRO SYSTEM (Швеция). Образцы извлечений (2 мкл) наносили на пластины HPTLC Silica Gel 60 F254 (Merck KGaA, Германия) с помощью аппликатора полуавтоматического *Linomat 5* (CAMAG AG, Швейцария). Опыты проводились в трехкратной повторности.

Результаты и их обсуждение. В результате исследований получены каллусные культуры *A. cordata*, *G. jasminoides*, а также каллусная и суспензионная культуры клеток *S.baicalensis*.

Для культуры аралии сердцевидной наибольший прирост биомассы наблюдался при использовании питательной среды Линсмайера-Скуга с добавлением 1,5 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л кинетина и среды ВТ с использованием 2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л кинетина. При этом, цикл роста каллуса составил 30 дней.

Ростовые показатели культур *S. baicalensis*, выращенных на плотной питательной среде и на жидком субстрате примерно сопоставимы

Таблица 1 - Условия получения и культивирования каллусных культур *S.baicalensis*, *A. cordata* и *G. jasminoides*

Растение	Экспланты	Тип культуры in vitro	Место произрастания	Питательная среда
<i>S. baicalensis</i>	микрочеренки из семян интактного растения	каллусная, суспензионная	пос. Лемболово (Ленинградская обл.)	MS (стандартная пропись); MS с добавлением 0,5 мг/мл гидролизата казеина и 1 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), среда Шенка-Хильдебрандта (SH).
<i>A. cordata</i>	части листьев интактного растения	каллусная	Ботанический институт имени В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН)	MS с добавлением 0,5 мг/мл 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 0,5 мг/мл кинетина; MS с добавлением различных фитогормонов: 1,0 мг/л 2,4-Д, 1,0 мг/л кинетина и 0,5 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК); WPM с добавлением 0,5 мг/л кинетина, 0,5 мг/л 6-БАП; BT с внесением 2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л кинетина; Среда Линсмайера-Скуга с добавлением 1,5 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л кинетина
<i>G. jasminoides</i>	листовые пластинки	каллусная	пос. Лемболово (Ленинградская обл.)	MS с добавками 6 мг/л НУК, 2 мг/л кинетина, 0,5 мг/л гидролизата казеина.

В течении 30 суток суспензионного культивирования в колбе выход по сухой биомассе составляет $7,9 \pm 0,5$ г/л. При выращивании клеток в виде каллусной ткани сухая биомасса ($7,2 \pm 0,4$ г/л) нарабатывается лишь к 35 дню культивирования. По рассчитанным данным установлено, что оптимальным является модифицированный состав MS с добавлением 0,5 мг/мл гидролизата казеина и 1 мг/л 6-БАП. Срок культивирования большинства каллусов гардении жасминовидной составляет 3-4 недели со стационарной фазой на 20 сутки. Установлено, что каллусная культура *G. jasminoides* относится к долгорастущим из-за позднего наступления фазы стационара. Выявлено, что свет оказывает ингибирующее действие на ростовые свойства биомассы. Качественный анализ БАВ позволил выявить в составе клеточных культур присутствие ряда ценных вторичных метаболитов: флавоноидов, тритерпеноидов и иридоидных гликозидов (табл.2).

Таблица 2 -Результаты качественного анализа сухой биомассы культур шлемника байкальского, гардении жасминовидной и сырой биомассы аралии сердцевидной

Культура	Система растворителей	Идентифицируемые соединения
<i>S.baicalensis</i>	этилацетат : муравьиная кислота : уксусная кислота : вода (10:1,1:1,1:2,5)	лютеолин (Rf = 0.72), рутин (Rf = 0.56)
<i>A. cordata</i>	хлороформ : этилацетат : метанол : вода (15:40:22:9)	гингенозиды Rb ₂ (Rf = 0,25), Rd (Rf = 0,43)
<i>G. jasminoides</i>	этилацетат : метанол : вода (77:15:8)	генипин (Rf =0,704)

Заключение. В рамках проведенных исследований в культуру *in vitro* удалось ввести клетки шлемника байкальского, гардении жасминовидной и аралии сердцевидной. Установлены условия, обеспечивающие рост клеточной биомассы как на плотных питательных средах для *S.baicalensis*, *A. cordata*, *G. jasminoides*, так и в объеме жидкой среды для *S.baicalensis*. В настоящее время наблюдается прирост каллусной ткани без участков некротизации и гипергидрации, что может свидетельствовать об оптимальном составе подобранных питательных сред. Клетки в суспензионной форме также обнаруживают склонность к увеличению количества биомассы. Однако, при суспензионном культивировании сокращаются сроки наработки клеточной массы. Предварительный фитохимический анализ полученных биомасс позволил установить присутствие таких соединений, как флавоноиды (рутин, лютеолин) в культуре *S.baicalensis*, гингенозиды (Rb₂ и Rd) в культуре *A. cordata* и иридоидные гликозиды (генипин) в культуре *G. jasminoides*. В связи с этим, открываются перспективы дальнейших исследований качественного и количественного содержания вторичных метаболитов в культурах растительных клеток с целью получения эффективных лекарственных препаратов с ценными фармакологическими свойствами.

Библиографический список

1. Demeke C. A., Woldeyohanins, A. E., & Kifle, Z. D. (2021). Herbal medicine use for the management of COVID-19: A review article / C. A. Demeke, A. E. Woldeyohanins & Z. D. Kifle // *Metabolism Open*. 2021 - No 12. P. 100141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.metop.2021.100141>
2. Zhao T. et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi. (*Lamiaceae*): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology / T. Zhao, H. Tang, L. Xie, Y. Zheng, Z. Ma, Q. Sun, X. Li // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. - 2019. - V. 71, Iss. 9. P. 1353–1369. DOI: <https://doi.org/10.1111/jphp.13129>.
3. Chen L. et al. *Gardenia jasminoides* Ellis: Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological and industrial applications of an important traditional Chinese medicine / L. Chen, M. Li, Z. Yang [и др.] // *Journal of Ethnopharmacology*. 2020. – V. 257. – P. 112829. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112829>
4. Племенков В. В., Тевс О. А. Медико-биологические свойства и перспективы терпеноидов (изопреноидов) / В.В. Племенков, О.А. Тевс // *Химия растительного сырья*. - 2014. - №4. – с. 5-20. DOI: 10.14258/jcprm.201404225.
5. Костюк М. А. Стерилизация эксплантов в технологии производства оздоровленного посадочного материала сливы домашней / М. А. Костюк, Л. Л. Бунцевич // *Плодоводство и виноградарство Юга России*. – 2017. – Т. 286, № 44. – С. 186-194.