

УДК 577.13+576.535.2

ЗАКОНОМЕРНОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ В ЦИКЛЕ ВЫРАЩИВАНИЯ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *POLYSCIAS FRUTICOSA*

Д. В. Кочкин¹, Е. С. Суханова¹, А. М. Носов^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Российская Федерация, 119991, Ленинские горы, 1, стр. 12
E-mail: mushilda@mail.ru

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Российская Федерация, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35
E-mail: amn@ippras.ru

Изучены закономерности накопления индивидуальных полисциозидов в цикле выращивания суспензионной культуры клеток Polyscias fruticosa при культивировании в колбах. Показано, что на протяжении цикла выращивания в биомассе культуры были представлены полисциазид А, Pol 3, полисциазид Е и ладигинозид А. При этом мажорными компонентами были полисциазид Е и ладигинозид А.

Ключевые слова: культура клеток *in vitro*; ВЭЖХ; ЯМР; олеаноловая кислота; полисциозиды; *Polyscias*; *Araliaceae*.

Введение. Исследование культур клеток и тканей представителей рода *Polyscias* было начато в нашей стране в начале 1970-х годов. В 1971–1975 гг. в Ленинградском химико-фармацевтическом институте были получены первые каллусные культуры *Polyscias filicifolia* и *P. balfouriana* [1]. Исходным материалом для получения культур ткани служили взрослые растения, выращенные в оранжерее Ботанического института АН СССР. В качестве эксплантов использовали зоны флоэмы корня и листья.

Фитохимический анализ каллусной культуры клеток *P. filicifolia* показал наличие в биомассе этой культуры большого количества водо- и спирторастворимых веществ, крахмала, свободных аминокислот, редуцирующих сахаров, тритерпеновых сапонинов и β -ситостерина [2]. Максимальное содержание «сапониновой фракции» (5,8 %) отмечалось на 5-е и 25-е сутки роста – дни максимальной митотической активности клеток [1, 2]. Следует подчеркнуть, что в этих работах исследователи изучали только так называ-

емую «суммарную гликозидную фракцию» («сапониновая фракция»). Точная структура обнаруженных гликозидов установлена не была.

В конце прошлого века ЗАО НПФ «Биофармтокс» был получен новый штамм *Polyscias filicifolia* БФТ-001-95, а в ИФР РАН была получена суспензионная культура клеток этого штамма. Были выяснены закономерности изменения физиологических характеристик данной культуры при выращивании в различных экспериментальных системах и режимах (в колбах в периодическом режиме, в лабораторных биореакторах в полупроточном и проточном режимах). Кроме того, было осуществлено масштабирование выращивания культуры клеток *P. filicifolia* до биореакторов промышленного объема (0,63 м³) [3].

Совместно с ЗАО НПФ «Биофармтокс» была проведена оценка биологической активности биомассы культуры клеток *P. filicifolia*, полученной при различных способах культивирования. Полученные при этом результаты свидетельство-

вали, что биомасса суспензионной культуры клеток *P. filicifolia* обладала большей биологической активностью по сравнению с биомассой каллусной культуры *P. filicifolia*. В настоящее время культура клеток *P. filicifolia* используется для производства пищевой биологически активной добавки «Витагмал» [4, 5]. Авторы этих работ связывали биологическую активность культур клеток *P. filicifolia* с присутствием в их биомассе тритерпеновых гликозидов. При этом, однако, детальное химическое исследование полученных культур клеток не проводилось.

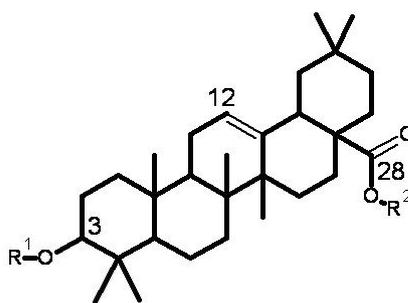
Близкий к *P. filicifolia* вид, *Polyscias fruticosa* (полисциас кустарниковый), используется в народной медицине стран Юго-Восточной Азии как тонизирующее, повышающее работоспособность и сопротивляемость к инфекционным заболеваниям средство, а также как средство против головокружений [4, 6]. В то же время, *P. fruticosa* изучен гораздо меньше, чем *P. filicifolia*. В 2005 году в ИФР РАН была впервые получена каллусная и суспензионная культура клеток *P. fruticosa* [7].

Цель настоящей работы заключалась в изучении закономерностей образования тритерпеновых гликозидов олеананового ряда, характерных для видов рода *Polyscias*, в суспензионной культуре клеток

полисциаса кустарникового – *P. fruticosa*.

Условия эксперимента. Объектом исследования служила суспензионная культура клеток *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. на 154 цикле выращивания, полученная из листовых эксплантов в 2005 году [7]. Условия выращивания культуры описаны ранее [7, 8]. Для хроматографического анализа использовали воздушно-сухую биомассу культуры.

Содержание индивидуальных тритерпеновых гликозидов в биомассе культуры клеток определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием (ВЭЖХ-УФ) методом внешней калибровки. Условия ВЭЖХ-УФ опубликованы ранее [8]. В качестве стандартов использовали образцы полисциозидов с рабочими названиями Pol 1, Pol 3, Pol 5 и Pol 7, выделенных ранее из листьев *Polyscias filicifolia*. Структура выделенных гликозидов была установлена с помощью спектроскопии ЯМР и масс-спектрологии высокого разрешения [9]. Гликозид Pol 1 оказался идентичным полисциозиду E, Pol 5 – полисциозиду A, Pol 7 – ладигинозиду A, структура Pol 3 была определена как 28-*O*- β -D-глюкопиранозиловый эфир 3-*O*- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-глюкуронопиранозида олеаноловой кислоты (рис. 1).



Название	R ¹	R ²
Pol 1 = полисциозид E	Glc(1-4)(Glc(1-2))GluA	Glc
Pol 3	Glc(1-4)GluA	Glc
Pol 5 = полисциозид A	Glc(1-4)(Glc(1-2))GluA	H
Pol 7 = ладигинозид A	Glc(1-4)GluA	H

Рис. 1. Химическая структура гликозидов Pol 1, Pol 3, Pol 5 и Pol 7, выделенных из листьев *P. filicifolia*
Glc - β -D-глюкопираноза, GluA - β -D-глюкуронопираноза

Идентификацию тритерпеновых гликозидов в биомассе культуры клеток *P. fruticosa* осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и ВЭЖХ-УФ путём совместного хроматографирования со стандартными образцами полисциозидов [9].

Подготовка проб для анализа. 30 мг воздушно-сухой биомассы культуры клеток экстрагировали смесью метанол : вода (95:5 по объёму) в течение 30 мин под действием ультразвука (УЗВ УХ 3560, GXET LTD, КНР) при комнатной температуре. Затем полученный экстракт центрифугировали 6 мин при 3900 g (Микроцентрифуга МЦФ, Россия). Супернатант фильтровали через нейлоновый фильтр с порами 0,2 мкм (Acrodisc, Германия). Полученную пробу использовали для ВЭЖХ-анализа.

Результаты и обсуждение. В результате предварительного фитохимического исследования биомассы суспензионной культуры клеток *P. fruticosa* было установлено наличие в ней тритерпеновых гликозидов олеаноловой кислоты [8]. Однако точная структура этих гликозидов оставалась неизвестной.

С помощью ТСХ и ВЭЖХ было показано, что основные тритерпеновые гликозиды, обнаруженные в суспензии клеток *P. fruticosa*, идентичны гликозидам, выделенным из листьев *P. filicifolia* [8, 9]. При этом мажорными компонентами в культуре клеток *P. fruticosa* были полисциозид Е (Pol 1), 28-*O*- β -D-глюкопиранозиловоый эфир 3-*O*- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-глюкуронопиранозида олеаноловой кислоты (Pol 3) и ладигинозид А (Pol 7) [9].

Для выяснения закономерностей образования индивидуальных тритерпеновых гликозидов в культуре клеток *P. fruticosa* было проведено изучение изменения их содержания в цикле выращивания данной культуры в колбах.

Полученные результаты представлены на рис. 2. Установлено, что содержа-

ние суммы гликозидов увеличивалось в течение цикла выращивания и максимальное значение этого показателя (0,5 % от веса сухой биомассы) отмечалось в конце экспоненциальной фазы роста культуры (14 сутки). Это вполне согласуется с данными литературы, из которых следует, что наибольшее накопление тритерпеновых кислот (олеаноловой, урсоловой) в суспензионной культуре клеток *Cyclocarya paliurus* отмечалось в конце экспоненциальной – начале стационарной фаз роста культуры [10].

На протяжении цикла выращивания в биомассе культуры клеток *P. fruticosa* были представлены все обнаруженные гликозиды – полисциозид А, Pol 3, полисциозид Е и ладигинозид А. При этом мажорными компонентами были полисциозид Е и ладигинозид А – на их долю в разные периоды выращивания приходилось 10–40 и 40–70 % от содержания суммы гликозидов, соответственно. Особый интерес вызывает тот факт, что в биомассе культуры клеток данного вида полисциаса в значительных количествах присутствовал самый неполярный из обнаруженных гликозидов – монодесмозид ладигинозид А. Накопление этого гликозида было достаточно стабильным на протяжении всего цикла выращивания культуры (рис. 2, Б). Между тем, хорошо известно, что для листьев и корней интактных растений семейства аралиевых, синтезирующих сапонины олеананового ряда, образование заметных количеств монодесмозидов не характерно [2]. Можно предположить, что данный результат является проявлением видовых особенностей *P. fruticosa* и/или связан с перестройкой метаболизма тритерпеновых гликозидов в условиях культуры клеток *in vitro* – популяции соматических клеток [11]. Однако для доказательства или опровержения этого предположения требуются дополнительные исследования.

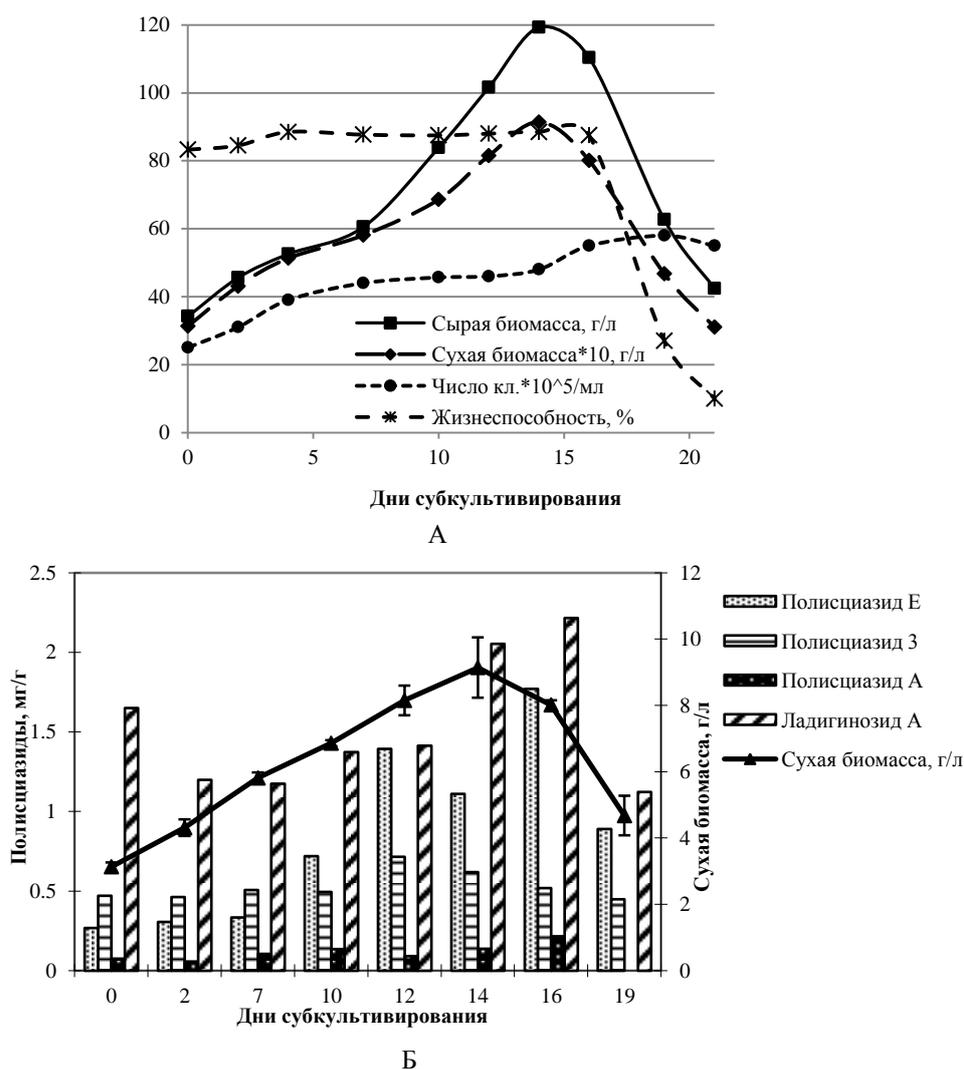


Рис. 2. Изменение ростовых характеристик (А) и содержания тритерпеновых гликозидов (Б) в цикле выращивания культуры клеток *Polyscias fruticosa* в колбах (154 цикла)

Следует заметить, что закономерно-сти накопления индивидуальных тритерпеновых гликозидов в культуре клеток одного из видов полискиаса в настоящей работе описаны впервые.

Вывод. Можно заключить, что исследованный вид полискиаса сохраняет спо-

собность к образованию определённого набора гликозидов олеаноловой кислоты в условиях культуры клеток. Однако механизмы формирования конкретного качественного состава гликозидов в данной культуре клеток требуют дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» (государственный контракт № 16.552.11.7089 от 12 июля 2012 г.) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «ПГТУ» и Межгосударственной целевой программы ЕвразЭС «Инновационные биотехнологии» (государственный контракт № 16.M04.12.0003).

Список литературы

1. Слепян, Л. И. Культура тканей некоторых видов рода *Polyscias* J.R. et G. Forst. (Araliaceae) / Л.И. Слепян, Н.Н. Арнаутов, И.В. Грушвицкий // Растительные ресурсы. – 1975. – Т. 11, Вып. 2. – С. 198-204.
2. Слепян, Л. И. Химическое и фармакологическое изучение биомассы культуры тканей *Polyscias filicifolia* Bailey / Л.И. Слепян, Л.А. Джабава, И.А. Лоцилина // Растительные ресурсы. – 1975. – Т. 11, Вып. 4. – С. 523-528.
3. Ключин, А. Г. Характеристика роста суспензионной культуры клеток *Polyscias filicifolia* Bailey при различных способах культивирования: автореф. дисс. канд. биол. наук / Ключин Андрей Геннадьевич. – М., 2000. – 24 с.
4. Котин, А. М. В поисках средства от всех заболеваний / Котин Аркадий Михайлович. – СПб: ЗАО НПФ «Биофармтокс», 2001. – 28 с.
5. Furmanowa, M. Antimicrobial activity of *Polyscias filicifolia* cell biomass extracts / M. Furmanowa, A.M. Nosov, A.V. Oreshnikov, A.G. Klushin, B. Starościk, A. Śliwińska, J. Guzewska, R. Bloch // Pharmazie. – 2002. – Vol. 57(6). – Pp. 424-426.
6. Гришковец, В. И. Тритерпеновые гликозиды аралиевых: выделение, установление строения, биологическая активность и хемотаксономическое значение: дис. докт. хим. наук / Гришковец Владимир Иванович. – Симферополь, 2004. – 460 с.
7. Суханова, Е. С. Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток *Polyscias filicifolia* и *Polyscias fruticosa* / Е.С. Суханова, Н.Д. Черняк, А.М. Носов // Биотехнология. – 2010. – № 4. – С. 44-50.
8. Суханова, Е. С. Влияние предшественника синтеза изопrenoидов на ростовые и биосинтетические характеристики культуры клеток *Polyscias fruticosa* (L.) Harms. / Е.С. Суханова, Д.В. Кочкин, Э.И. Гафиятова, А.М. Носов // Вестник СВФУ им. А.К. Амосова. – 2011. – Т. 8. – С. 40-44.
9. Кочкин, Д. В. Качественный и количественный состав тритерпеновых гликозидов культур клеток *in vitro* представителей семейства Araliaceae (на примере *Panax* spp. и *Polyscias* spp.) : автореф. дисс. канд. биол. наук // Кочкин Дмитрий Владимирович. – М., 2012. – 28 с.
10. Yin, Z. Growth and triterpenic acid accumulation of *Cyclocarya paliurus* cell suspension cultures / Z. Yin., X. Shangguan, J. Chen, Q. Zhao, D. Li // Biotechnology and Bioprocess Engineering. – 2013. – Vol. 18. – Pp. 606-614.
11. Verpoorte, R. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites / R. Verpoorte, A. Contin, J. Memelink // Phytochem. Rev. – 2002. – Vol. 1. – Pp. 13-25.

Статья поступила в редакцию 04.06.14.

Ссылка на статью: Кочкин Д.В., Суханова Е.С., Носов А.М. Закономерности накопления тритерпеновых гликозидов в цикле выращивания суспензионной культуры клеток *Polyscias fruticosa* // Вестник Поволжского государственного технологического университета. Сер.: Лес. Экология. Природопользование. – 2014. – № 4 (24). – С. 67-73.

Информация об авторах

КОЧКИН Дмитрий Владимирович – кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры физиологии растений биологического факультета, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова. Область научных интересов – физиология растений. Автор 11 публикаций.

E-mail: info@mail.bio.msu.ru

СУХАНОВА Елена Сергеевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник кафедры физиологии растений биологического факультета, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова. Область научных интересов – культура клеток, вторичный метаболизм высших растений. Автор 18 публикаций.

E-mail: mushilda@mail.ru

НОСОВ Александр Михайлович – доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии растений, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова; зав. отделом биологии клетки и биотехнологии, Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – биотехнология. Автор 114 публикаций. E-mail: amn@ippras.ru

THEIR ACCUMULATION OF TRITERPENE GLYCOSIDES IN THE GROWING CYCLE CELL SUSPENSION CULTURES POLYSCIAS FRUTICOSA

D. V. Kochkin¹, E. S. Sukhanova¹, A. M. Nosov^{1,2}

¹Moscow State University named after M. V. Lomonosov,
1, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russian Federation
E-mail: mushilda@mail.ru

²Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev,
35, Botanicheskaya st., Moscow, 127276, Russian Federation
E-mail: amn@ippras.ru

Key words: *plant cell culture in vitro; HPLC; NMR; oleanolic acid; polysciosides; Polyscias; Araliaceae.*

ABSTRACT

Variation in the amounts and compositions of the individual polysciosides formed during a 21-day growth cycle of the cell-suspension culture of Polyscias fruticosa in flasks were determined by RP-HPLC-UV analysis. The plant cell culture was obtained from leaves of an adult plant and the present research has been led on the 154th subcultivation cycle of the suspension cell culture growth. Four polysciosides (oleanolic acid glycosides) were identified: ladiginoside A, polyscioside A, polyscioside E and glucopyranosyl-(1-2)-glucuronopyranosyl-3-oleanolic acid-28-glucopyranosyl ester. These glycosides were the same as in Polyscias filicifolia leaves, which had been isolated, determined by NMR method and used as standarts for the present research. The occurrence of all of them was shown during the whole subcultivation cycle. The major components were ladiginoside A and polyscioside E, their percentage during the subcultivation period amounted correspondingly up to 70% and 40%. An investigation of these glycosides dynamics during the cultivation cycle has been processed. The maximum content of the sum of glycosides (0,5% of the dry weight) was observed on the 14th day of subcultivation, at the end of the exponent stage of the cell culture growth. It is important to note that ladiginoside A is the most nonpolar glycoside among the determined ones, and while being a major glycoside with a rather stable occurrence during the cell culture cultivation is not common to be a major one for plants of Araliaceae family. It should be noted that the research of isolated glycosides accumulation has been led for the first time.

The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation within the Federal Targeted Programme “Researches and Elaborations in Priority in the Lines of Development of Science and Technology Sector of Russia in 2007–2013 Years” (state contract № 16.552.11.7089 of July, 12 2012) using the equipment of CUC “EBEE” of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education “Volga State University of Technology” and Interstate Special-Purpose Programme EvrAzES “Innovative Biotechnologies” (state contract № 16.M04.12.0003).

REFERENCES

1. Slepyan L. I., Arnautov N. N., Grushvitskiy I. V. Kultura tkaney nekotorykh vidov roda Polyscias J.R. et G. Forst. (Araliaceae) [Tissue Culture of Some Kinds of *Polyscias* J.R. et G. Forst. (Araliaceae)]. *Rastitelnye resursy* [Plant Resources]. 1975. Vol. 11, Iss. 2. Pp. 198-204.
2. Slepyan L. I., Dzhabava L. ., Loshchilina I. A. Khimicheskoe i farmakologicheskoe izuchenie biomassy kultury tkaney Polyscias filicifolia Bailey [Study of Tissue Culture Biomass of *Polyscias filicifolia* Bailey (Chemical and Pharmacological Point of View)]. *Rastitelnye resursy* [Plant Resources]. 1975. Vol. 11, Iss. 4. Pp. 523-528.
3. Klushin A. G. Kharakteristika rosta suspenzionnoy kultury kletok Polyscias filicifolia Bailey pri razlichnykh sposobakh kultivirovaniya: avtoref. diss. kand. biol. nauk. [Peculiarities of Growth of Suspension Culture of Cells of *Polyscias filicifolia* Bailey in Case of Different Ways of Cultivation: autoref. for a Candidate degree (Biology)]. Moscow, 2000. 24 p.
4. Kotin A. M. V poiskakh sredstva ot vsekh zabolevaniy [In Search of Means of All the Deceases]. Saint-Petersburg: CJSC SPC «Biopharmtoks», 2001. 28 p.
5. Furmanova A. M., Nosov A.V., Oreshnikov A.G., Klushin A.G., Starościk B., Śliwińska A., Guzewska J., Bloch R. Antimicrobial Activity of *Polyscias Filicifolia* Cell Biomass Extracts. *Pharmazie*. 2002. Vol. 57(6). P. 424-426.

6. Grishkovets V. I. Triterpenovye glikozidy araliykh: vydelenie, ustanovlenie stroeniya, biologicheskaya aktivnost i khemotaksonomicheskoe znachenie: dis. dokt. khim. nauk [Triterpenoid Glycosides of Araliaceae: Extraction, Structure Definition, Biological Activity and Chemotaxonomic Significance: thesis for a Doctor of Chemical Sciences]. Simferopol, 2004. 460 p.

7. Sukhanova E. S., Chernyak N. D., Nosov A. M. Poluchenie i kharakteristika kallusnykh i suspenzionnykh kultur kletok *Polyscias filicifolia* i *Polyscias fruticosa* [Obtainment and Characteristics of Callus and Suspension Culture of *Polyscias filicifolia* and *Polyscias fruticosa* Cells]. *Biotehnologiya* [Biotechnology]. 2010. № 4. Pp. 44-50.

8. Sukhanova E. S., Kochkin D. V., Gafiyatova E. I., Nosov A. M. Vliyaniye predshhestvennika sinteza izoprenoidov na rostovye i biosinteticheskie kharakteristiki kultury kletok *Polyscias fruticosa* (L.) Harms [Impact of Predecessor of Synthesis of Isoprenoids on Growth and Biosynthetic Characteristics of

Cell Culture of *Polyscias fruticosa* (L.) Harms]. *Vestnik SVFU im. A.K. Amosova* [Vestnik of North-Eastern Federal University]. 2011. Vol. 8. Pp. 40-44.

9. Kochkin D.V. Kachestvennyy i kolichestvennyy sostav triterpenovykh glikozidov kultur kletok in vitro predstaviteley semeystva Araliaceae (na primere *Panax* spp. i *Polyscias* spp.) : avtoref. diss. kand. biol. nauk. [Qualitative and Quantitative Composition of Triterpenoid Glycosides of *in vitro* Cells of Araliaceae Family (based on the example of *Panax* spp. and *Polyscias* spp.): autoref. for a Candidate degree (Biology)]. Moscow, 2012. 28 p.

10. Yin Z., Shangguan X., Chen J., Zhao Q., Li D. Growth and Triterpenic Acid Accumulation of *Cyclocarya paliurus* Cell Suspension Cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2013. Vol. 18. Pp. 606-614.

11. Verpoorte R., Contin A., Memelink J. Biotechnology for the Production of Plant Secondary Metabolites. *Phytochem. Rev.* 2002. Vol. 1. Pp. 13-25.

The article was received 04.06.14.

Citation for an article: Kochkin D. V., Sukhanova E. S., Nosov A. M. Their accumulation of triterpene glycosides in the growing cycle cell suspension cultures *Polyscias fruticosa*. *Vestnik of Volga State University of Technology. Ser.: Forest. Ecology. Nature Management*. 2014. No 4 (24). Pp. 67-73.

Information about the authors

KOCHKIN Dmitry Vladimirovich – Candidate of Biological Sciences, Researcher at the Chair of Plant Physiology, Biological Faculty, Moscow State University named after M. V. Lomonosov. Research interests – plant physiology. The author of 11 publications.

E-mail: info@mail.bio.msu.ru

SUKHANOVA Elena Sergeevna – Candidate of Biological Sciences, Research officer at the Chair of Plant Physiology, Biological Faculty, Moscow State University named after M. V. Lomonosov. Research interests – cell culture, secondary metabolism of higher plants. The author of 18 publications. E-mail: mushilda@mail.ru

NOSOV Alexander Mikhailovich – Doctor of Biological Sciences, Professor at the Chair of Plant Physiology, Moscow State University named after M. V. Lomonosov, Head at the Department of Cytobiology and Biotechnology, Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev, RAS. Research interests – biotechnology. The author of more than 114 publications. E-mail: amn@ippras.ru