

УДК 641.002

Ж. Т. ЛЕСОВА¹, С. А. НАДИРОВА¹, Н. Г. ГЕМЕДЖИЕВА²

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМПОНЕНТОВ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ПОВЫШЕНИЕ ВЫХОДА КЛЕТОЧНОЙ БИОМАССЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

¹АО «Алматинский технологический университет»,

²РГП «Институт ботаники и фитоинтродукции» КН МОН РК, г. Алматы

(Представлена академиком НАН РК А. И. Изтаевым)

В статье отражены результаты проведенных экспериментов по получению клеточной культуры лекарственных растений каланхое перистого (*Kalanchoe Pinnata*) и кодонопсиса ломоносового (*Codonopsis clematidea*) с использованием стандартных питательных сред и сочетанием различных фитогормонов.

В настоящее время клеточные культуры лекарственных растений являются перспективным источником биологически активных веществ (БАВ). Традиционно биологически активные вещества растений получают на основе использования природного сырья. Широкое использование растений для получения БАВ привело к стремительному сокращению их в природе. Некоторые из них относятся к редким и исчезающим видам, многие растения долго восстанавливают свои площади произрастания. При этом следует подчеркнуть, что промышленное получение некоторых соединений, например, сердечных гликозидов, флавоноидов, кумаринов, эфирных масел достигается только путем выделения их из растительного сырья. Однако получение продуктов вторичного метаболизма в достаточном количестве зачастую ограничено, что связано с сокращением ресурсов некоторых ценных дикорастущих растений, принадлежностью многих лекарственных растений к группам эндемиков, редким и исчезающим видам. В связи с этим для получения и сохранения растений – источников БАВ, кроме традиционных методов, используются биотехнологические методы [1, 2].

Целью наших исследований явилось введение в культуру клеток лекарственных растений каланхое перистого (*Kalanchoe Pinnata*) и кодонопсиса ломоносового (*Codonopsis clematidea*).

Материалы и методы. Каланхое перистое (*Kalanchoe pinnata*) – вечнозеленое растение семейства толстянковых (Crassulaceae). В ряде работ исследователей показано, что в каланхое содержатся биогенные стимуляторы, которые усиливают обмен веществ в различных тканях и повышают сопротивление организма вредным болезнестворным факторам. Его применяют также при различных видах анемии, бронхиальной астме, хронических гастритах, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и ряде других заболеваний. Химический состав каланхое пока еще изучен недостаточно хорошо. Установлено, что в соке листьев и стеблей содержится до 40% полисахаридов, есть катехины, незначительное количество дубильных веществ, ферменты (дегидраза яблочной кислоты, карбоксилаза щавелевой и уксусной кислот), органические кислоты (яблочная, уксусная, лимонная, щавелевая, изолимонная и др.), аскорбиновая кислота, микроэлементы, минеральные соли и флавоноиды. Сок каланхое успешно применяется для лечения тропических язв, экземы, фурункулов, пролежней, кожной сыпи, гнойных процессов, ожогов, эрозий и т.д. [3].

Кодонопсис ломоносовый (*Codonopsis clematidea*) – ценное лекарственное сырье в народной и восточной медицине. Его препараты способствуют нормализации практических всех жизненно важных функций организма: обладают выраженным иммуномодулирующим эффектом и, в частности, стимулируют синтез иммуноглобулинов и иммунных медиаторов (интерлейкинов), нормализации кроветворения и повышения энергетического обмена эритроцитов. Кодонопсис является очень мощным кардиотоническим средством и увеличивает силу сердечных сокращений. Кроме того, экстракты кодонопсиса обладают сосудорасширяющим действием и препятствуют процессу тромбообразования. Немаловажно и то, что кодонопсис является универсальным регулятором большинства пищеварительных процессов. Наконец, кодонопсис стимулирует синтез

белка и процессы клеточного роста. В настоящее время в Китае, России разработаны и широко применяются препараты, в состав которых входит кодонопсис (*Codonopsis clematidea*), растение из семейства колокольчиковых (*Campanulaceae*). Ценным является корневая часть растения [4, 5].

В связи с вышеизложенным нами ставилась задача разработки технологии получения биомассы данных лекарственных растений *in vitro* для получения экстрактов БАВ и БАД.

Нами проведены работы по подбору условий культивирования клеток листовой поверхности каланхоэ и корневища кодонопсиса на стандартной питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) с различным сочетанием регуляторов роста.

Для получения клеточной культуры отбирались листья и сегменты листьев каланхоэ, которые после стерилизации переносили на питательную среду для культивирования. Предварительно листья обрабатывали 70%-ным этиловым спиртом в течение 30 секунд и 0,1%-ным раствором гипохлорита натрия – в течение 15 мин, а затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой по 15 минут. Простерилизованные листья разделяли на сегменты размером 0,5-1 см и помещали верхней стороной на питательную среду в чашки Петри. Подбор условий культивирования проводили, комбинируя разные концентрации фитогормонов: ауксинов и цитокининов. Для получения каллусов использовали питательную среду МС, содержащую 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты (ИУК), 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 30 г/л сахарозы, вариант с добавлением 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) в концентрации 0,5-1 мг/л, а также модифицированную питательную среду Гамборга В5 (ГВ-5).

Каждые 3 дня проводили визуальное наблюдение за приростом каллусов лекарственного растения каланхоэ перистого, измеряя диаметр каллусов. Отмечено, что на среде ГВ-5 лучше идет прирост каллусов.

Корневища кодонопсиса предварительно мыли щёткой в мыльной воде, затем промывали обычной водой. После замачивали в слабом растворе KMnO_4 на 15 мин., затем дистиллированной водой. После этого на 5 мин. помещали в 3-5% раствор хлорамина, трехкратно промывали дистиллированной водой, после чего помещали в 70% этиловый спирт и промывали водой. Последние две процедуры проводили в стерильных условиях в ламинарном боксе. Стерилизация эксплантов корневища кодонопсиса таким способом обеспечивала освобождение от инфекции на 80-85%.

Экспланты тканей свежего корня кодонопсиса, собранного в сентябре месяце, размерами в 0,3-0,5 мм разрезали на диски толщиной 0,2-0,5 мм и помещали в чашки Петри с питательной средой МС и ГВ-5. В качестве фитогормонов использовали 2,4-Д, кинетин и индолилуксусную кислоту (ИУК).

Культивировали на среде МС в следующих модификациях – для каллусогенеза: 2 мг/л 2,4-Д, для морфогенеза и регенерации – с кинетином и ИУК, затем на безгормональной среде. При этом чашки Петри с каллусами содержались в термостате при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Часть полученных морфогенных каллусов культивировали на среде МС с 1 мг/л 2,4-Д в термостате при температуре $+25^\circ\text{C}$, часть – на безгормональной среде МС при температуре $+25^\circ\text{C}$ и освещенности.

Образование каллусов на МС среде наблюдали на 5-7 сутки культивирования, на ГВ-5 – на 11-15 сутки. Каллусы культивировали при температуре 24-26°C в термостате при постоянной влажности в течение 2-х месяцев. Отмечено, что на среде МС лучше идет прирост и образование каллусов морфогенного типа (ярко-желтые, грозньевидной структуры), которые отбирались для дальнейшего субкультивирования.

Показано, что высокая частота каллусообразования у каланхоэ перистого отмечена на модифицированной среде Гамборга В-5, тогда как у эксплантов кодонопсиса – на среде МС с добавлением 2,4-Д в концентрации 5 мг/л и на среде МС+кинетин+ИУК.

Питательная среда для культивирования *in vitro* корневищ кодонопсиса подобрана экспериментально на основе среды МС с введением в ее состав смеси фитогормонов кинетина и ауксина ИУК. На этой среде отмечено активное каллусообразование и корнеобразование, что объясняется свойством кинетина стимулировать митотическую активность клеток и свойством ауксина ИУК стимулировать регенерацию растений *in vitro*. Одним из факторов, осложняющих культивирование эксплантов лекарственных растений *in vitro*, является чрезмерное выделение ими в питательную среду окисленных продуктов метаболизма, что связано с интенсивной деятельностью полифенолоксидазы и накоплением продуктов окисления фенолов. Подбираются реагенты для добавления в питательную среду для снижения их образования.

Клетки растений можно выращивать в искусственных условиях на питательных средах неограниченно долго, при этом часть биомассы можно использовать для экстракции целевого продукта, а часть пересаживать на свежую питательную среду для возобновления культуры. Независимость от влияния различных факторов окружающей среды (климат, сезон, погода, почвенные условия, вредители), более высокий выход и качество продукта делают привлекательной эту технологию для производителей. Производство при умелой организации является экологически чистым, а продукт – свободным от гербицидов и тяжелых металлов. На основное место в настоящее время выходит фактор лекарственной безопасности нашей страны. В условиях, когда постоянно падает доля лекарственных субстанций отечественного производства, представляется важным развивать технологии, создающие надежную сырьевую базу для выработки отечественных препаратов.

В ходе наших экспериментов выявлено, что в культуре клеток каланхоз выделяются флавоноиды и что, варьируя компонентами питательной среды, можно увеличить содержание флавоноидов. Нами изучена возможность повышения их содержания путем изменения концентраций соли нитрата аммония в культивируемой питательной среде.

Получена суспензионная культура каланхоз. Выявлено, что модифицированная питательная среда ГВ-5, обогащенная аминокислотами и витаминами, наиболее благоприятна для роста клеток каланхоз. Изучение роста суспензионных клеток каланхоз показало, что выход живых клеток составил 75-85%. Суспензионную культуру выращивали в течение 16-20 суток на качалке при 120 об/мин. Выявлено, что наибольший прирост клеток отмечен на модифицированной среде ГВ-5 на 5-7 сутки, затем идет стабилизация роста на 8-9-сутки. Поэтому на 9-11 сутки проводится субкультивирование (перенос клеток на свежую питательную среду), что позволяет наращивать биомассу клеточной культуры.

В процессе исследования содержания общего количества флавоноидов в суспензионной культуре клеток *Kalanchoe pinnatum* нами было обнаружено, что в первичной культуре клеток уровень содержания флавоноидов был ниже стандартного (сок каланхоз). Для количественного определения содержания флавоноидов использовали стандартный метод.

Известно, что в соке нативного растения каланхоз содержится значительное количество флавоноидов (8,05% от сухой зеленой массы), однако в активно растущей суспензионной культуре количество флавоноидов значительно ниже – 0,79 % от зеленой массы.

В наших экспериментах было проведено изучение влияния такого важного компонента метаболизма как азот, который может существенно влиять как на первый, так и на второй метаболизм.

При культивировании клеток каланхоз в питательную среду добавляли различные концентрации азота в составе соли нитрата аммония. Проводились исследования ростовых и биосинтетических характеристик суспензионной культуры. Были использованы различные концентрации соли NH_4NO_3 , которые отличались по количеству от содержания в модифицированной питательной среде ГВ-5.

Показано, что снижение количества азота на 20, 40, 60, 80 и 100% значительно снижает ростовые характеристики суспензии клеток. Наличие минимального роста суспензионной культуры при полном отсутствии соли NH_4NO_3 обусловлено наличием в составе МС другого источника азота, а именно нитрата калия.

С другой стороны азотное голодание клетками принимается, скорее всего, в качестве шокового сигнала, который включает защитные ответные механизмы. Показано, что со снижением концентрации азота до 50% идет рост количества флавоноидов до 2,5% от сухой массы, что в три раза больше, чем при нормальных условиях. Однако дальнейшее снижение концентрации азота не приводило к линейному росту содержания флавоноидов, что говорит о том, что общее ухудшение роста клеток негативно сказывается и на биосинтезе вторичных метаболитов [6].

Таким образом, результаты эксперимента позволяют предположить, что, манипулируя компонентным составом питательных веществ среды, можно существенно улучшить ростовые и биосинтетические характеристики клеточной культуры, что позволит использовать их в дальнейшем для выделения БАВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Першина Л.А. Методы культивирования *in vitro* в биотехнологии растений. Новосибирск: Изд. НГУ, 2000. 68 с.
2. Шаушеков З.К., Куандыкова А.Ж., Асанова Г.К., Абдыкалыков М.А.. Адекенов С.М. Введение в культуру клеток эндемичных видов растений // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ботанического ресурсоведения». Алматы, 2010. С. 359-361.
3. Багинская А. И., Лескова Т. Е., Соколов С. Я. Сравнительное изучение активности сока каланхое, консервированного спиртом и хлороформом // Химическая и медико-биологическая оценка новых фитопрепаратов. М., 1989. С. 90-95.
4. Kovaleva N.G. Лечение растениями. М.: Медицина, 1971. 352 с.
5. Ладыгина Е.Я., Сафонов Л.Н. Химический анализ лекарственных растений. М.: Высшая школа, 1983. 176 с.
6. Адихотдаев К.Б. Определение флавоноидов в растительном сырье // Фармация. 1977. № 3. С. 3-27.

REFERENCES

1. Pershina L.A. *Novosibirsk, izdanie NGU*, **2000**, 68 p. (in Russ.).
2. Shaushkov Z.K., Kuandykova A.Zh., Asanova G.K., Abdykalykov M.A.. Adekenov S.M. *Materialy Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii «Aktual'nye problemy botanicheskogo resursovedeniya»*, Almaty, **2010**, 359-361 (in Russ.).
3. Baginskaia A. I., Leskova T. E., Sokolov S. Ia. *Khimicheskaiia i mediko-biologicheskaiia otsenka novykh fitopreparatov*. M., **1989**, 90–95 (in Russ.).
4. Kovaleva N.G. *Meditisina*. **1971**, 352 p. (in Russ.).
5. Ladygina E.Ia., Safronov L.N. **1983**, *Moskva, Vysshiaia shkola*, 176 p. (in Russ.).
6. Adikhotdaev K.B. *Farmatsiia*. **1977**, 3, 3-27 (in Russ.).

Ж. Т. Лесова, С. А. Надирова, Н. Г. Гемеджиеева

**ДӘРІ-ДӘРМЕК ӨСІМДІКТЕРДІҢ КЛЕТКАЛЫҚ БИОМАССАСЫН ҚӨБЕЙТУ МАҚСАТЫНДА
ҚОРЕКТИК ОРТАНЫҢ ҚҰРАМЫНДАҒЫ ЗАТТАРДЫҢ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ**

Каланхое (*Kalanchoe Pinnata*) және кодонопсис (*Codonopsis clematidea*) өсімдіктерінің стандарттық қоректік орталарда әртүрлі фитогормондарды колданып клеткалық күлтуралды алу нәтижелері көрсетілген. Кодонопсис және каланхое халық медицинасындағы өте бағалы дәрі-дәрмекті шикізат көзі болып табылады. Олардың препараттары ағзада барлық маңызды нормаландырыу (жақсарту) қызметін атқарады. Кодонопсис және каланхое құрамына биогенді ынталандырушылар жатады, олар ағзадағы корғаушы күшін күшетумен және ұлпалардағы репорация (қайта қалпына келтіру) үдерістерін ынталандыруда ерекшеленеді.

Z. T. Lesova, S. A. Nadirova, N. F. Gemedzhieva

**STUDYING THE INFLUENCE OF NUTRIENT MEDIUM COMPONENTS
ON INCREASE OF CELLULAR BIOMASS OF HERBS EXIT**

Almaty Technological University

In these article results of the experiments on reception of cell culture of herbs of a kalanchoe plumose (*Kalanchoe Pinnata*) and codonopsis (*Codonopsis clematidea*) with the use of standard nutrient mediums and a combination of various phytohormones are reflected. Codonopsis and kalanchoe are very valuable medicinal raw materials in national medicine. Their preparation promote normalization of almost all important functions of the organism since it contains biogene stimulators possessing an ability to strengthen protective forces of the organism and to stimulate reparation processes in fabrics.