

УДК 581.143

Влияние повышенных концентраций ионов меди на ростовые характеристики и синтез стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Tribulus terrestris* L.

© 2019 С.В. ТОМИЛОВА^{1,2}, Д.В. КОЧКИН^{1,2}, Б.А. ГАЛИШЕВ³, А.М. НОСОВ^{1,2,*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Россия

²Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, Москва, 127276, Россия

³Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург, 620002, Россия

*e-mail: al_nosov@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2018 г.

После доработки 18.03.2019 г.

Принята к публикации 07.05.2019 г.

Изучено влияние повышенных концентраций ионов меди на ростовые характеристики суспензионной культуры якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. и на образование фармакологически ценных соединений (стероидных гликозидов) в клеточной биомассе *T. terrestris*. Показано, что увеличение содержания ионов меди в питательной среде в 5–100 раз (до 10 мкМ) практически не влияло на ростовые характеристики культуры клеток, однако, высокие концентрации (5 и 10 мкМ) вызывали значительное (ниже 50%) падение уровня жизнеспособности клеток. Методом УЭЖХ ЭР МС доказано присутствие в клеточной биомассе *T. terrestris* фураностанолового гликозида террестринина В и его 25(*R*)-стереоизомера. Повышение концентрации ионов меди в среде вызывало существенное (до трехкратного) увеличение их содержания в первом цикле культивирования, которое сохранялось, но в меньшей степени (в 1,5–2 раза) в последующих циклах выращивания. Напротив, изменение гормонального состава среды (удаление α -НУК) может приводить к изменениям в составе фураностаноловых гликозидов (исчезновение либо кардинальное снижение содержания производных террестрозина Н, наличие которого для этой культуры было показано ранее). Можно заключить, что тяжелые металлы (ионы меди) могут интенсифицировать образование стероидных гликозидов в культуре клеток *T. terrestris*, тогда как регуляторы роста, в частности ауксины, – изменять их качественный состав.

Ключевые слова: ионы меди, стероидные гликозиды, суспензионная культура клеток, якорцы стелющиеся, *Tribulus terrestris*

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-42-49

В настоящее время в качестве перспективных фармпрепаратов и биологически активных добавок широко используют вещества растительного происхождения, что связано с их лучшей переносимостью, редкими и/или слабо выраженными побочными эффектами. В связи с этим серьезной проблемой является поиск возобновляемых источников растительного сырья. Культура клеток высших растений может служить перспективным

источником подобного сырья с высоким содержанием целевых соединений, которые в большинстве случаев относятся к веществам специализированного обмена – вторичным метаболитам [1]. В то же время в литературе встречается много сведений о том, что закономерности образования вторичных метаболитов в клетках растений *in vitro* могут существенно отличаться от таковых в интактных растениях. В культуре клеток вторичный

Список сокращений: 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; БАП – 6-бензиламинопурин; α -НУК – α -нафтилуксусная кислота; ТСХ – тонкослойная хроматография; УЭЖХ ЭР МС – ультраэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением.

метаболизм во многом определяется спецификой этой биологической системы, а именно: дедифференцированным состоянием клеток, их постоянной пролиферацией и популяционными механизмами развития. Для инициации синтеза и повышения уровня содержания вторичных метаболитов в клетках *in vitro* могут быть эффективны целенаправленные воздействия на культуру. Одним из таких способов является применение различных стрессовых факторов, которые служат сигналами, запускающими вторичный метаболизм в интактном растении [2]. В качестве стрессоров могут выступать тяжелые металлы, относящиеся к особой группе загрязнителей, неподверженных биодеструкции и способных аккумулироваться в клетках до токсических концентраций. Среди тяжелых металлов медь занимает особое положение. Ее концентрации уже в пределах 10^{-7} – 10^{-5} моль/л способны подавлять рост большинства высших растений [3–4]. Одновременно данный элемент является эссенциальным, т.е. используется при выращивании культур клеток в составе сред как микроэлемент. Имеются сообщения, в которых отмечена стимуляция синтеза вторичных метаболитов в культурах клеток высших растений при увеличении содержания ионов меди в питательных средах [5–6]. Классическим примером является радикальное повышение концентрации шиконина в культуре клеток воробейника краснокорневого *Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zucc. при тридцатикратном увеличении содержания сульфата меди в среде выращивания [6]. В то же время, работ по изучению влияния повышенных концентраций ионов меди на образование различных вторичных метаболитов в современной литературе исчезающе мало.

Якорцы стелющиеся *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae R. Br.) являются источником большого набора стероидных гликозидов, таких как протодиосцин, прототрибестин, псевдопротодиосцин, диосцин, трибестин, трибулозин, тигогенин, неотигогенин, гитогенин, диосгенин и др. [7–8]. Препараты и экстракты на основе *T. terrestris* обладают высокой биологической активностью, в частности сердечно-сосудистой, цитотоксической и противомикробной, оказывают положительное влияние на репродуктивную систему животных и человека и используются при лечении различных заболеваний [7, 9–10]. Культура клеток *T. terrestris* может служить потенциальным источником стероидных гликозидов, однако их содержание в клетках *in vitro*, в большинстве случаев, слишком низкое для крупномасштабного производства [11–12].

Ранее нами были получены каллусная и суспензионная культуры клеток якорцев стелющихся, определены их ростовые параметры и показано наличие в клетках как минимум двух фурарановых гликозидов [13].

Цель настоящей работы – изучение влияния повышенных концентраций ионов меди на ростовые и биосинтетические характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris*.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использована суспензионная культура клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L., (штамм Tter 8 коллекционный № 81 во Всероссийской коллекции культур клеток высших растений (ВККК ВР)), которая была получена М.Т. Ханды с коллегами в Институте физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН в 2014 г. из каллусной культуры клеток, индуцированной из семян растения *T. terrestris* американской популяции (Forever Seeds Company, США) [13].

Для экспериментов использовали среду Мурашиге–Скуга (MS) следующего состава [14], г/л: гидролизат казеина – 0,5 (Merck, Германия), инозитол – 0,1 (Merck); сахароза – 3% (Merck); мг/л: 2,4-Д – 2,0 (Merck) и БАП – 1,0 (Merck). Для увеличения концентрации ионов меди в среде применяли раствор сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (ЛенРеактив, Россия).

Культивирование суспензионной культуры

Культивирование проводили в колбах объемом 250 мл (33–35 мл суспензии в колбе) на качалке (100 об./мин) в темноте при температуре 26 °С. Цикл субкультивирования суспензионной культуры клеток *T. terrestris* составлял 14 дней. Для пересева применяли соотношение инокулюма и свежей среды равное 1:10.

Показатели суспензионных культур

Для характеристики суспензионных культур клеток использовали жизнеспособность клеток и содержание сырой и сухой биомассы в 1 л среды. Жизнеспособность культур клеток определяли, используя прижизненный краситель (0,1%-ный раствор феносафранина, Merck), путем подсчета живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) культивируемых единиц под микроскопом. Для определения сырой и сухой биомассы фиксированный объем суспензии (не менее 30 мл в двух

повторностях) фильтровали под вакуумом через бумажный фильтр с помощью воронки Бюхнера. Биомассу высушивали методом сублимационного обезвоживания [15].

Качественный анализ стероидных гликозидов

Для качественного анализа стероидных гликозидов в исследуемых вариантах культуры клеток использовали хроматографию в тонком слое силикагеля (ТСХ) и ультраэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением (УЭЖХ ЭРМС).

Общую экстракцию стероидной фракции проводили из лиофилизированной биомассы 70%-ным этанолом (соотношение биомасса–растворитель – 1:40 (масса : объем)) на ультразвуке 3 раза по 30 мин при комнатной температуре (УЗ-ванна «Сапфир», Россия). Объединенный экстракт упаривали досуха под вакуумом при 55 °С и растворяли в воде. Полученный раствор наносили на патрон для твердофазной экстракции Supelclean ENVI-18 (Supelco, США). Затем патрон последовательно промывали водой и 70%-ным этанолом. Спиртовой экстракт упаривали досуха под вакуумом при 55 °С и использовали для химического анализа.

Метод ТСХ. Очищенную фракцию стероидных гликозидов растворяли в 70%-ном этаноле (0,5–1 мл) и 30 мкл экстракта наносили на хроматографическую пластинку Kieselgel 60 (Merck). Для сопоставления в качестве известной модели использовали 1%-ный раствор препарата «Дельтостим» (ИБХ им. А.Н. Баха и ИФР им. К.А. Тимирязева РАН), который представляет собой экстракт из биомассы суспензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall. и включает в себя четыре фураностаноловых гликозида (протодиосцин и его 25(R)-изомер, дельтозид и его 25(R)-изомер). Раствор дельтостима наносили на хроматографическую пластинку в объеме 10 мкл. Для разделения фураностаноловых гликозидов использовали систему растворителей хлороформ–метанол–вода (65:35:10, по объему). Проявление хроматограммы проводили 1%-ным раствором реактива Эрлиха (*n*-диметиламинобензальдегид (Merck)) в смеси концентрированная соляная кислота и этанол (34:66, по объему) с последующим прогреванием пластинки при 100 °С в течение 5 мин. Фураностаноловые гликозиды обнаруживаются в виде розово-красных пятен.

Метод УЭЖХ ЭРМС. Пробу растворяли в смеси ацетонитрил–вода (50:50, по объему) и фильтровали через нейлоновый фильтр с порами

0,2 мкм (Acrodisc, Германия). УЭЖХ ЭРМС проводили на хроматографе Waters Aquity UPLC (Waters, США). Пробу в объеме 0,5–1,0 мкл наносили на колонку ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50 × 2,1 мм; размер зерна 1,7 мкм; Waters, США). Температура колонки составляла 40 °С, объемная скорость потока подвижной фазы – 0,4 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0,1%-ный (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде и 0,1%-ный (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (ацетонитрил, % по объему): 0–7 мин – 19%, 7–17 мин – 19→35%, 17–23 мин – 35→45%, 23–27 мин – 45→55%, 27–33 мин – 55→65%, 33–33,5 мин – 65→95%, 33,5–35 мин – 95%, 35–35,5 мин – 95→19%, 35,5–37 мин – 19%. Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных ионов (*m/z* 100–1500). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации 120 °С, температура десольвации 250 °С, напряжение на капилляре 3,0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) 600 л/час.

Количественный анализ стероидных гликозидов

Для анализа применяли спектрофотометрический метод. В пробирки Эппендорфа отбирали 0,4 мл спиртового экстракта. К экстракту добавляли 1,0 мл реактива Эрлиха – 1%-ный раствор *n*-диметиламинобензальдегида в смеси концентрированной соляной кислоты и этанола (34:66, по объему). Пробирки закрывали и помещали в термостат при 50 ± 1 °С на 2 ч. После охлаждения пробирок проводили измерение оптической плотности на спектрофотометре «Униплан» (ЗАО «Пикон», Россия) при 520 нм. Концентрацию фураностаноловых гликозидов вычисляли по калибровочному графику, построенному по препарату «Дельтостим».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Суспензионную культуру клеток *T. terrestris* выращивали на питательных средах с повышенными концентрациями ионов меди (0,5, 1, 2, 3, 5, 10 мкМ ионов меди); контроль – 0,1 мкМ в среде MS. Исследование показало, что увеличение содержания ионов меди в питательной среде существенно не влияло на накопление биомассы суспензионной культуры клеток *T. terrestris* (рис. 1, рис. 2). Повышение

ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ МЕДИ

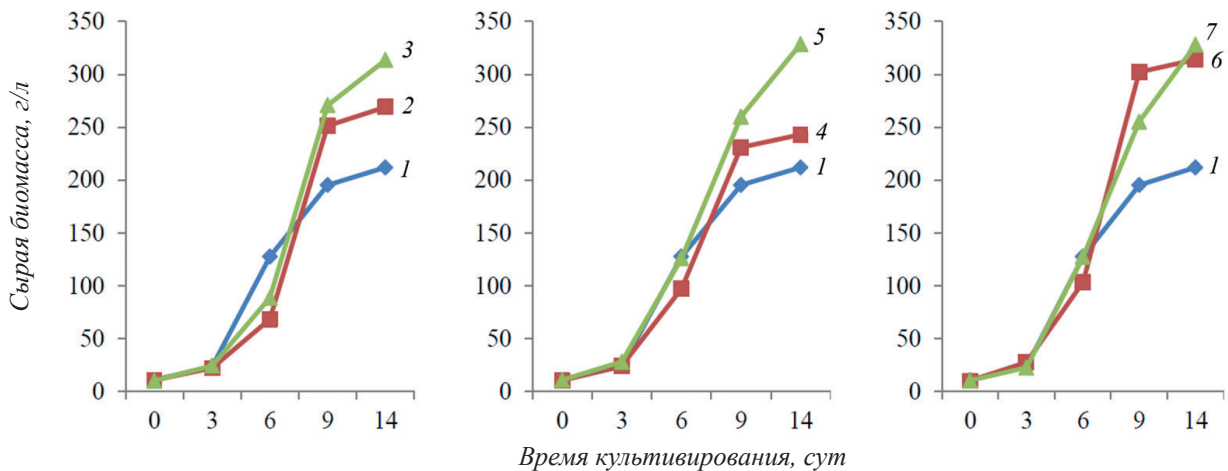


Рис. 1. Кривые роста по накоплению сырой биомассы суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращиваемой на средах с повышенной концентрацией ионов меди: 1 – 0,1 мкМ ионов меди (контроль); 2 – 0,5 мкМ; 3 – 1 мкМ; 4 – 2 мкМ; 5 – 3 мкМ; 6 – 5 мкМ; 7 – 10 мкМ

Fig. 1. Growth curves for the accumulation of fresh biomass of *T. terrestris* suspension cell culture grown on media with high concentration of copper ions: 1 – 0,1 μM copper ions (control); 2 – 0,5 μM; 3 – 1 μM; 4 – 2 μM; 5 – 3 μM; 6 – 5 μM; 7 – 10 μM

концентрации ионов меди в среде в 5, 10, 20 и 30 раз также не приводило к заметному падению жизнеспособности клеток – к концу срока культивирования для данных вариантов показатель составлял 70–80% (рис. 3). Значительное снижение жизнеспособности клеток (ниже 50%) наблюдали лишь при повышении содержания ионов меди в питательной среде в 50 и 100 раз по сравнению с контролем.

Результаты анализа могут объясняться тем, что медь является не только фактором стресса, но и необходимым элементом для жизнедеятель-

ности растительного организма. Кроме того, восприимчивость к стрессу, вызываемому различными поллютантами, зависит не только от природы загрязняющего вещества, но и от видовых (морфологических, физиологических, биохимических и генетических) особенностей организма [2–4].

Исходя из полученных результатов, концентрацию 2 мкМ ионов меди в питательной среде, т.е. превышение ее в 20 раз по сравнению с контролем, можно считать оптимальной для проведения экспериментов.

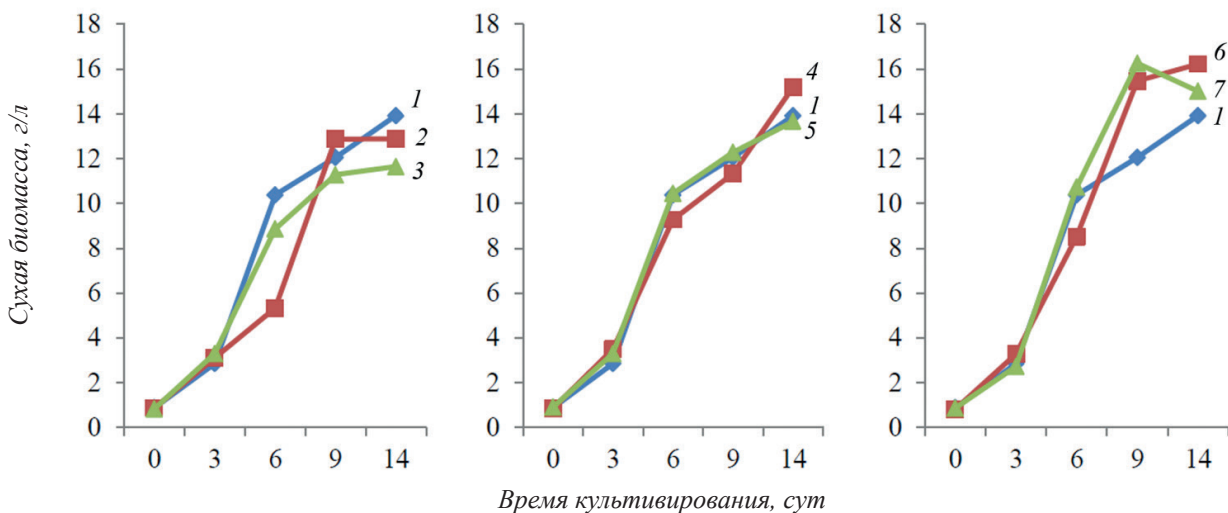


Рис. 2. Кривые роста по накоплению сухой биомассы суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращиваемой на средах с повышенной концентрацией ионов меди: 1 – 0,1 мкМ ионов меди (контроль); 2 – 0,5 мкМ; 3 – 1 мкМ; 4 – 2 мкМ; 5 – 3 мкМ; 6 – 5 мкМ; 7 – 10 мкМ

Fig. 2. Growth curves for the accumulation of dry biomass of *T. terrestris* suspension cell culture grown on media with high concentration of copper ions: 1 – 0,1 μM copper ions (control); 2 – 0,5 μM; 3 – 1 μM; 4 – 2 μM; 5 – 3 μM; 6 – 5 μM; 7 – 10 μM

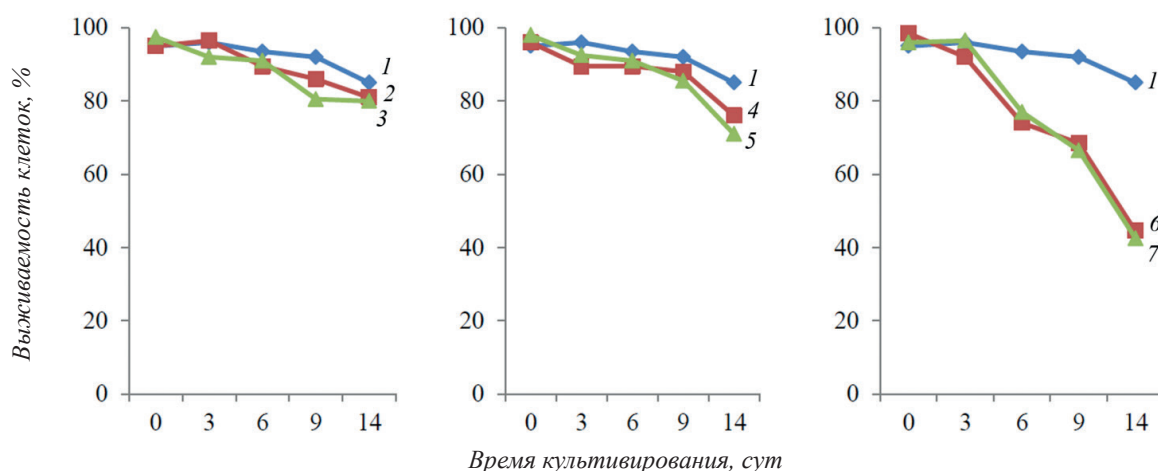


Рис. 3. Жизнеспособность суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращиваемой на средах с повышенной концентрацией ионов меди: 1 – 0,1 мкМ ионов меди (контроль); 2 – 0,5 мкМ; 3 – 1 мкМ; 4 – 2 мкМ; 5 – 3 мкМ; 6 – 5 мкМ; 7 – 10 мкМ

Fig. 3. Viability of *T. terrestris* suspension cell culture grown on media with high concentration of copper ions: 1 – 0,1 μM copper ions (control); 2 – 0,5 μM; 3 – 1 μM; 4 – 2 μM; 5 – 3 μM; 6 – 5 μM; 7 – 10 μM

В процессе фитохимического анализа стероидных гликозидов методом ТСХ на хроматографических пластинках зафиксировано наличие двух отчетливых розово-красных пятен, предположительно соответствующих стероидным гликозидам фураностанолового ряда (рис. 4). Интенсивность окраски пятен была существенно выше в вариантах с повышенной концентрацией ионов меди в среде. При этом можно заключить, что активация синтеза этих соединений происходила уже при пятикратном повышении концентрации ионов меди в среде по сравнению с его контрольным содержанием.

Для структурной идентификации стероидных гликозидов, обнаруженных при анализе методом ТСХ, был проведен УЭЖХ ЭР МС-анализ экстрактов из биомассы суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращенной как на контрольной среде, так и на средах с повышенными концентрациями ионов меди. На хроматограммах всех исследуемых проб было отмечено наличие пиков только двух соединений (рис. 5), со временем удерживания на колонке около 11 мин.

Масс-спектры двух обнаруженных соединений были практически одинаковыми и содержали сигналы молекулярного иона $[M-H_2O+H]^+$, иона-аддукта $[M+Na]^+$ и серии осколочных ионов, образовавшихся в результате отщепления двух остатков пентоз (нейтральные потери 132 Да), трех остатков гексоз (162 Да) и одного остатка дезоксигексозы (146 Да) (табл. 1).

На основании приведенных результатов можно заключить, что соединения 1 и 2 имеют структуру фураностаноловых гликозидов тигогенина и

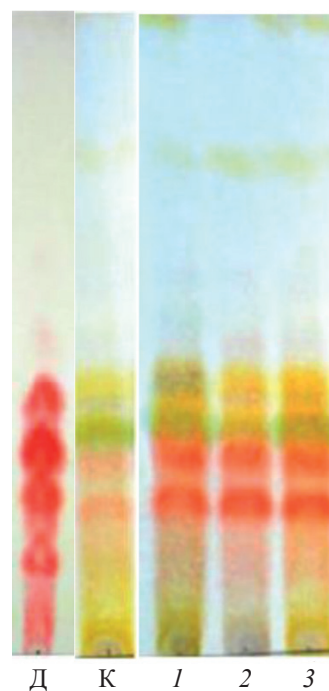


Рис. 4. ТСХ-хроматограмма экстрактов из биомассы суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращенной на средах с различным содержанием ионов меди (розово-красные пятна соответствуют фураностаноловым гликозидам). Д – 1%-ный раствор дельтостима; К – культура клеток, выращиваемая на среде с 0,1 мкМ ионов меди (контроль); 1 – 0,5 мкМ ионов меди; 2 – 2 мкМ; 3 – 10 мкМ

Fig. 4. TLC chromatograms of extracts from biomass of *T. terrestris* suspension cell culture grown on media with different content of copper ions (pink-red spots correspond to furostanol glycosides): Д – 1% solution of deltostim; К – cell culture grown on medium with 0,1 μM copper ions (control); 1 – 0,5 μM copper ions; 2 – 2 μM; 3 – 10 μM

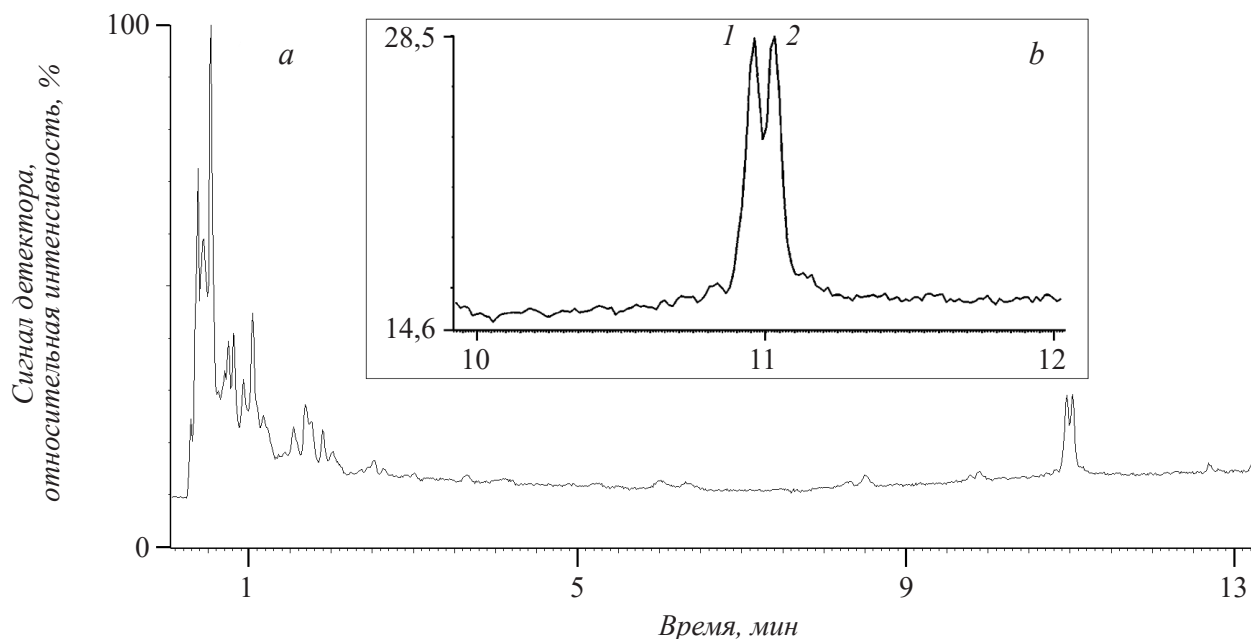


Рис. 5. Результаты УЭЖХ ЭР МС-анализа экстракта из биомассы суспензионной культуры клеток *T. terrestris*, выращенной на среде с 10 мкМ ионов меди (1-й пассаж, 14-е сут): *a* – обзорная хроматограмма, (записана в режиме полного ионного тока при регистрации положительных ионов); *b* – увеличенный фрагмент хроматограммы (с 10 по 12 мин). 1 и 2 – пики идентифицированных фураностаноловых гликозидов (табл. 1)

Fig. 5. UPLC ESI MS analysis of extract from biomass of *T. terrestris* suspension cell culture (grown on medium with 10 μM copper ions, 1st passage, 14th day): *a* – overview chromatogram (recorded in the full ion current mode during registration of positive ions); *b* – enlarged fragment of the chromatogram (from 10 to 12 min). 1 and 2 – peaks of identified furostanol glycosides (Table 1)

неотигогенина, содержащих по три остатка гексоз (один остаток у С26-ОН-группы и два – в углеводной цепи у С3-ОН-группы), два остатка пентоз и по одному остатку дезоксигексозы. Сопоставление характера фрагментации гликозидов 1 и 2 с данными литературы позволяет предположить, что они соответствуют террестринину В и его 25(*R*)-изомеру, соответственно [7].

Следует отметить, что при анализе содержания стероидных гликозидов в этой же культуре клеток *T. terrestris*, проведенном ранее [13], были обнаружены несколько фураностаноловых гликозидов, из них два соединения со временем удерживания около 6 мин были идентифицированы как террестрозин Н и его 25(*R*)-изомер. Важно, что в этом случае культуру выращивали на средах

Таблица 1

Результаты анализа масс-спектров положительных ионов фураностаноловых гликозидов, обнаруженных в биомассе суспензионной культуры клеток *T. terrestris*

Mass-spectrometry of positive ions of furostanol glycosides detected in biomass of *T. terrestris* suspension cell cultures

Соединение	Масс-спектры*, m/z			T, мин	Агликон	Результаты идентификации
	[M-H ₂ O+H] ⁺	[M+Na] ⁺	Осколочные ионы			
1	1313,6	1353,6	1181,6; 1167,6; 1049,6; 1035,5; 1019,6; 903,5; 887,5; 873,5; 741,4; 579,4; 417,1	10,96	Тигогенин	Террестринин В
2	1313,6	1353,6	1181,6; 1167,6; 1049,6; 1035,5; 1019,5; 903,5; 887,5; 873,5; 741,4; 579,4; 417,3	11,03	Неотигогенин	25(<i>R</i>)-террестринин В

Примечание: T – время удерживания на колонке.

*Данные масс-спектров (указаны значения m/z для обнаруженных ионов).

Note: T – retention time on the column.

*Data of mass-spectra (m/z values for detected ions).

с другим составом регуляторов роста – в качестве ауксина в среду, наряду с 2,4-Д, был дополнительно добавлен α -НУК. Полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют, что в культуре клеток *T. terrestris*, выращенной на среде без добавления α -НУК, производные террестрозина Н либо отсутствуют, либо их содержание находится на уровне следовых количеств. Можно предположить, что состав регуляторов роста в среде выращивания, в частности композиция ауксинов (только 2,4-Д или 2,4-Д + α -НУК) может изменять качественный состав образуемых вторичных метаболитов (стероидных гликозидов). Однако для строгого доказательства этого предположения необходимы дополнительные исследования.

Влияние ионов меди на содержание фураностаноловых гликозидов

Определение количественного содержания стероидных гликозидов в клетках якорцев *in vitro* было проведено спектрофотометрическим методом для варианта с двадцатикратным превышением содержания ионов меди в питательной среде (2 мкМ). Анализ осуществляли в течение семи циклов выращивания суспензионной культуры клеток *T. terrestris*. Пробы для проведения исследований отбирали в начале стационарной фазы роста (14-е сут выращивания). Уже в первом цикле выращивания с повышенным содержанием ионов меди отмечено почти трехкратное увеличение содержания фураностаноловых гликозидов по сравнению с контрольной культурой (2,26 и 0,86 мг/г сухой массы соответственно). В последующих циклах выращивания наблюдали снижение накопления фураностаноловых гликозидов (1,35–1,48 мг/г), однако их содержание в течение всего эксперимента превышало в 1,5–2,0 раза уровень контрольного варианта. Вероятно, это связано с адаптацией клеток к стрессовому воздействию.

На основе полученных результатов, можно сделать заключение, что влияние тяжелых металлов, а именно повышение концентрации ионов меди, может вызывать существенное (до трехкратного) увеличение содержания фураностаноловых гликозидов в дедифференцированных клетках высших растений *in vitro*. Наибольший эффект наблюдается в первом цикле культивирования с сохранением, но в меньшей степени, в последующих циклах. Подобная динамика процесса может указывать на сигнальный механизм действия ионов меди в качестве стрессового фактора. Напротив, изменение гормонального состава среды, в частности, удаление α -НУК, может

приводить к качественному изменению состава фураностаноловых гликозидов, например резкому снижению содержания отдельных гликозидов (террестрозин Н и его 25(R)-изомер), вплоть до исчезающего малых количеств. Установленные закономерности могут быть использованы для целенаправленного регулирования образования ценных вторичных метаболитов в культурах клеток высших растений. Однако влияние таких факторов, как повышенные концентрации тяжелых металлов, влияние элиситоров, регуляторов роста фитогормонов на качественный состав стероидных гликозидов в культуре клеток *T. terrestris* требует дальнейшего изучения.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 16-14-00126).

ЛИТЕРАТУРА

1. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения. *Биотехнология*, 2010, (5), 8–28.
2. Nosov A.M., Popova E.V., Kochkin D.V. Isoprenoid production via plant cell cultures: biosynthesis, accumulation and scaling-up to bioreactors. In: Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology [Eds. K.Y. Paek., H.N. Murthy, J.J. Zhong]. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2014, 563–623. doi: 10.1007/978-94-017-9223-3_23
3. Fernandes J.C., Henriques F.S. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review*, 1991, 57(3), 246–273. doi: 10.1007/BF02858564
4. Yruela I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct. Plant Biol.*, 2009, 36(5), 409–430. doi: 10.1071/FP08288
5. Gandi S., Rao K., Chodiseti B., Giri A. Elicitation of andrographolide in the suspension cultures of *Andrographis paniculata*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2012, 168, 1729–1738. doi: 10.1007/s12010-012-9892-4
6. Fujita Y., Hara Y., Suga C., Morimoto T. Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. II. A new medium for the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Reports*, 1981, 1(2), 61–63. doi: 10.1007/BF00269273
7. Kostova I., Dinchev D. Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity. *Phytochemistry Reviews*, 2005, 4(2), 111–137. doi: 10.1007/s11101-005-2833-x

8. Dinchev D., Janda B., Evstatieva L., et al. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. *Phytochemistry*, 2008, 69(1), 176–186. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.07.003
9. Gama C.R., Lasmar R., Gama G.F., et al. Clinical assessment of *Tribulus terrestris* extract in the treatment of female sexual dysfunction. *Clin. Medicine Insights: Women's Health*, 2014, 7, 45–50. doi: 10.4137/CMWH.S17853
10. Angelova S., Gospodinova Z., Krasteva M., et al. Antitumor activity of bulgarian herb *Tribulus terrestris* L. on human breast cancer cells. *J. BioSci. Biotechnol.*, 2013, 2(1), 25–32.
11. Erhun W.O., Sofowora A. Callus induction and detection of metabolites in *Tribulus terrestris* L. *J. Plant Physiol.*, 1986., 123, 181–186.
12. Nikam T.D., Ebrahimi M.A., Patil V.A. Embryogenic callus culture of *Tribulus terrestris* L. a potential source of harmaline, harmine and diosgenin. *Plant Biotechnol. Rep.*, 2009, 3(3), 243–250. doi: 10.1007/s11816-009-0096-5
13. Khandy M.T., Kochkin D.V., Tomilova S.V., et al. Obtaining and study of callus and suspension plant cell cultures of *Tribulus terrestris* L., a producer of steroidal glycosides. *Biotekhnologiya*. 2016, 32(4), 21–30. doi: 10.21519/0234-2758-2016-4-21-30.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3), 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
15. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений. В кн.: Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений [Ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова]. Москва, Россия: БИНОМ, 2012, 386–403.

Effect of Elevated Concentrations of Copper Ions on Growth Characteristics and Synthesis of Steroidal Glycosides in Suspension Plant Cell Culture of *Tribulus terrestris* L.

S.V. TOMILOVA^{1,2}, D.V. KOCHKIN^{1,2}, B.A. GALISHEV³, A.M. NOSOV^{1,2*}

¹M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia

²K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276, Russia

³Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Ekaterinburg, 620002, Russia

*e-mail: al_nosov@mail.ru

Received November 30, 2018

Revised March 18, 2019

Accepted May 07, 2019

Abstract—In order to optimize the productivity of plant cell cultures for pharmacologically valuable compounds(steroidal glycosides), the effect of the elevated concentrations copper ions on growth and biosynthetic characteristics of the suspension culture of *Tribulus terrestris* L. has been studied. It was shown that the increase in the content of copper ions in nutrient medium by 5–100 times (up to 10 μM) did not practically affect growth characteristics of the cell culture; however, high concentrations (5 and 10 μM) caused a significant (below 50%) decrease in the cell viability. It was proved by UPLC ESI MS that the *T. terrestris* biomass contains a furostanol glycoside, terrestrinin B, and its 25(R)-stereoisomer. An increase in the concentration of copper ions in the medium provided a significant (up to 3 times) increase in the content of furostanol glycosides in the first cultivation cycle, and this compound was maintained in the next 5–7 cultivation cycles, although its content was 1.5–2 times lower. On the contrary, changes in the hormonal status of the medium (removal of α-NAA) could result in changes in the composition of furostanol glycosides (disappearance or a drastic decrease in the content of terrestrozin N derivatives, the presence of which in this plant cell culture was shown previously). It may be concluded that heavy metals (copper ions) can intensify the formation of steroidal glycosides in *T. terrestris* cell culture, whereas growth regulators (for example, auxins) can change their qualitative composition.

Key words: copper ions, steroidal glycosides, plant suspension cell culture, *Tribulus terrestris*

Funding—The work was financially supported by the Russian Science Foundation (№ 16-14-00126).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-3-42-49