

УДК 576.5: 535.2

М.Т. ХАНДЫ^{1,2,*}, Д.В. КОЧКИН^{1,3}, С.В. ТОМИЛОВА⁴, Б.А. ГАЛИШЕВ⁴, Е.С. СУХАНОВА^{1,3}, А.Г. КЛЮШИН³, И.М. ИВАНОВ³, А.М. НОСОВ^{1,3}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234

² Северо-восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Якутск, 677000

³ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, 127276

⁴ Уральский федеральный университет, Екатеринбург, 620002

e-mail: handy_89@mail.ru

Получение и характеристика каллусных и суспензионных культур клеток якорцев стелющихся *Tribulus terrestris* L. — продуцента стероидных гликозидов

Получены каллусная и суспензионная культуры клеток *Tribulus terrestris* L. — ценного лекарственного растения, продуцирующего стероидные гликозиды. Семена *T. terrestris*, растения американской популяции, были использованы в качестве эксплантов. Исследованы закономерности получения культур клеток этого вида растений, а также ростовые и биосинтетические характеристики полученных линий. Показано, что оптимальной средой для получения каллусной культуры клеток и ее выращивания является среда MS, содержащая 2,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л БАП. Суспензионная культура клеток, полученная на жидкой среде того же состава, характеризуется высокими ростовыми характеристиками (максимальное накопление сухой биомассы — до 13 г/л, удельная скорость роста в экспоненциальной фазе — 0,24 сут⁻¹, экономический коэффициент — 0,39), которые сохраняются в процессе длительного субкультивирования (более двух лет). Осуществлено выращивание полученной культуры клеток в биореакторе лабораторного объема в полупроточном режиме. Проведен скрининг полученных культур клеток на содержание стероидных гликозидов. В каллусных культурах стероидные гликозиды обнаружены не были. В суспензионной культуре клеток методами ТСХ и UPLC ESI MS показано наличие фураностаноловых гликозидов, количество которых увеличивается по мере выращивания культуры. Полученные результаты согласуются с гипотезой об автоселекции клеток, содержащих соединения, способствующие пролиферации клеток *in vitro*.

Ключевые слова: каллусогенез, стероидные гликозиды, суспензионная культура клеток, якорцы стелющиеся, *Tribulus terrestris* L.

doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-4-21-30

Культура клеток высших растений традиционно рассматривается как уникальная экспериментально созданная биологическая система, представляющая собой гетерогенную популяцию де-

дифференцированных клеток [1]. В биотехнологии использование культуры клеток растений *in vitro* представляет собой эффективный способ получения экологически чистого возобновляемого

Ханды Мария Терентьевна, Кочкин Дмитрий Владимирович, Томилова Светлана Вячеславовна, Галишев Борис Александрович, Суханова Елена Сергеевна, Ключин Андрей Геннадьевич, Иванов Игорь Михайлович, Носов Александр Михайлович.

Список сокращений: БАП — 6-бензиламинопурин; 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота; НУК — α -нафтилуксусная кислота; ТСХ — тонкослойная хроматография; UPLC ESI MS — ультраэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением.

* Автор для переписки.

растительного сырья с высоким содержанием целевых биологически-активных веществ независимо от климатических и погодных условий. При наличии высокоэффективного штамма-продуцента эта технология обеспечивает создание оригинальных препаратов, получение которых на основе традиционного сырья нерентабельно или неосуществимо. В этом аспекте перспективной может быть культура клеток лекарственного растения якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L.).

Известно, что экстракты из этих растений являются безопасным и эффективным средством при лечении женской сексуальной дисфункции, а также используются в качестве афродизиака для мужчин [2, 3]. Водный экстракт *T. terrestris* при наружном применении проявляет ранозаживляющие свойства [4]. Во многих работах показано противоопухолевое действие биологически активных соединений якорцев; в частности, водный экстракт *Tribulus* ssp. блокирует пролиферацию и индуцирует апоптоз раковых клеток печени человека за счет ингибирования сигнального пути NF- κ B [5—7]. На основе интактного растения *T. terrestris* создан ряд лекарств и более двадцати нутрицевтиков. В частности, лекарственные препараты Tribestane и Vitanone используют для лечения импотенции, а Tribusaponins и Xin-CAK Shutong — для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [8, 9]. В настоящее время выпуск препаратов Tribestane и Tribusaponins практически прекращен из-за отсутствия сырья.

Установлено, что в большинстве случаев биологическая активность экстракта якорцев обусловлена наличием обширного набора стероидных гликозидов [6, 10, 11], основными агликонами которых являются тигогенин, неотигогенин, гитогенин, неогитогенин, гекогенин, неогекогенин, диосгенин, хлорогенин, рускогенин и сарсасапогенин [8]. Состав стероидных гликозидов интактного растения зависит от ареала произрастания [12].

Есть сведения о получении каллусных культур якорцев [13—16]. В одной из работ показано наличие спиростаноловых гликозидов в каллусах *Tribulus terrestris* L. [14]. Согласно анализу доступной литературы, суспензионная культура *T. terrestris* ранее получена не была. Систематические исследования культур клеток якорцев стелющихся до настоящего времени также не проводились.

Таким образом, целью настоящей работы было получение каллусных и суспензионных культур клеток *T. terrestris*, выяснение закономерностей каллусогенеза, а также исследование ростовых и биосинтетических характеристик полученных культур клеток.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве эксплантов были использованы семена растения *Tribulus terrestris* L. американской популяции (Forever Seeds Company, США). Семена промывали детергентом твин-80 (Sigma, Германия) и стерилизовали 0,1%-ным раствором сулемы (Sigma) в течение 5 мин. После стерилизации материал ополаскивали, а затем трехкратно отмывали в течение 20 мин в стерильной дистиллированной воде. После этого семена использовали в качестве эксплантов, помещая их на агаризованную питательную среду.

Для экспериментов использовали среду MS, приготовленную по стандартной прописи [17] с добавлением гидролизата казеина (0,5 г/л) (Merck, Германия), инозита (0,1 г/л) (Merck), 3% сахарозы (Merck) и агара (0,5%) (Merck). Использовали 9 вариантов сред, различающихся по составу регуляторов роста, в качестве которых применяли α -нафтилуксусную кислоту (НУК) (Merck) в концентрации 0,2—2,0 мг/л, 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) (Merck) в концентрации 1,0—2,0 мг/л, кинетин (Merck) в концентрации 0,15—1,0 мг/л и 6-бензиламинопурин (БАП) (Merck) в концентрации 0,15—2,0 мг/л.

Культивирование проводили в темноте при 26°. Цикл субкультивирования для каллусных культур клеток составлял 4 нед, для суспензионных — 2 нед. Для выращивания каллусных культур использовали чашки Петри (d=60 мм), каллус при пересеве делили на 4—6 частей. Суспензионные культуры клеток выращивали в колбах объемом 250 мл (30—40 мл суспензии в колбе) на качалке (100 об/мин). Для пересева применяли соотношение инокулюм—свежая среда, равное 1:10.

Аппаратурное выращивание осуществляли в 7-литровом лабораторном биореакторе фирмы New Brunswick Scientific (рабочий объем 5 л), с механическим перемешивающим устройством типа «морской винт» (скорость перемешивания 200 об/мин). Для барботажа использовали оригинальное точечное аэрирующее устройство на основе силиконового шланга с микроотверстиями; интенсивность аэрации составляла 1,0 л/мин (0,2 объем воздуха/объем среды/мин), температура культивирования 26°.

Для характеристики суспензионных культур определяли такие параметры, как содержание сухой и сырой биомассы в 1 л среды, концентрацию клеток в среде и жизнеспособность культуры.

Для определения содержания сырой и сухой биомассы фиксированный объем суспензии (не менее 15 мл в трех повторностях) фильтровали

под вакуумом через бумажный фильтр с помощью воронки Бюхнера. Биомассу высушивали до постоянной массы в токе теплого воздуха при температуре 30° [18].

Для подсчета концентрации клеток (X) 0,5 мл суспензии инкубировали с 2,0—2,5 мл 20%-ного раствора хромовой кислоты (Merck) при 60° в течение 15—20 мин в зависимости от возраста суспензии [19].

Жизнеспособность культур клеток определяли, используя прижизненный краситель фено-сафранин (Merck) (0,1%-ный раствор), путем подсчета живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) культивируемых единиц под микроскопом [20].

По полученным результатам рассчитывали параметры эффективности роста культуры: индекс роста (I), удельную скорость роста в экспоненциальной фазе (μ), экономический коэффициент по сахарозе (Y), время удвоения (τ), продуктивность по сухой биомассе (P).

Для расчетов использовали следующие формулы [21]:

$$I = (X_{max} - X_0) / X_0,$$

где X_{max} и X_0 — максимальное и начальное значения содержания сырой или сухой биомассы в 1 л среды, соответственно;

$$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1),$$

где X_2 и X_1 — содержание сухой биомассы в 1 л среды в моменты времени t_2 и t_1 , соответственно (рассчитывали для экспоненциальной фазы роста);

$$\tau = \ln 2 / \mu;$$

$$Y = (X_{max} - X_0) / S,$$

где X_{max} и X_0 — см. выше, а S — начальная концентрация субстрата (сахарозы) в среде;

P — максимальное значение,

$$P_i = (X_i - X_0) / (t_i - t_0),$$

где X_0 и X_i — содержание сухой биомассы в начале культивирования и в момент времени t_i , соответственно.

Анализ наличия в исследуемой культуре клеток стероидных гликозидов проводили с помощью хроматографии в тонком слое силикагеля (ТСХ) (см. ниже) и ультраэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением (UPLC ESI MS).

Для приготовления проб брали по 100 мг лиофильно высушенной биомассы культур кле-

ток, экстрагировали 70%-ным (по объему) этиловым спиртом (соотношение биомасса—растворитель = 1:40 (масса/объем) 3 раза по 30 мин при комнатной температуре при действии ультразвука (УЗВ «Сапфир», Россия). Объединенные спиртовые экстракты упаривали досуха под вакуумом (55°) 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 этиловым спиртом. Спиртовую фракцию упаривали досуха и подвергали анализу.

Для анализа методом ТСХ очищенную фракцию гликозидов растворяли в этаноле (70%) и 50 мкл полученного раствора наносили на хроматографическую пластинку Kieselgel 60 (Merck). Фуростаноловые гликозиды элюировали в системе растворителей хлороформ—метанол—вода (65:35:10 по объему). Хроматограммы проявляли реактивом Эрлиха (1%-ный раствор парадиметил-аминобензальдегида (Merck) в смеси концентрированной соляной кислоты (Merck)—метанол (Merck) = 34:66 об/об) с последующим прогреванием пластинки при 100° в течение 3—5 мин. При этом фуростаноловые гликозиды обнаруживаются в виде пятен красного цвета.

Для разделения спириостаноловых гликозидов использовали систему этилацетат—ледяная уксусная кислота—вода (32:9:9 по объему). Хроматограммы проявляли 1%-ным раствором ванилина (Merck) в смеси этанол—концентрированная серная кислота (Merck) (2:1 по объему).

Для проведения UPLC ESI MS пробу растворяли в смеси ацетонитрил (Merck)—вода (50:50 по объему) и фильтровали через нейлоновой фильтр с порами 0,2 мкм (Acrodisc, Германия).

UPLC ESI MS проводили на хроматографе Waters Aquity UPLC (Waters, США). Пробу в объеме 0,5 мкл наносили на колонку ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50×2,1 мм, 1,7 мкм; Waters, Ирландия). Температура колонки составляла 40°, объемная скорость потока подвижной фазы — 0,4 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0,1%-ный (по объему) раствор муравьиной кислоты (Merck) в воде и 0,1%-ный (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле. Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентной элюции. В процессе анализа состав подвижной фазы изменяли следующим образом (концентрация ацетонитрила, об. %): 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 — 19%.

Анализ осуществляли в режиме детекции положительных ионов (диапазон m/z 100—1200) при следующих параметрах процесса: температура источника ионизации — 120°, температура десольвации — 250°, напряжение на капилляре — 3,0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы — 30 В и скорость подачи азота (десольвационный газ) — 600 л/ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов по влиянию различных регуляторов роста на каллусогенез было установлено, что каллусные культуры исследуемых видов якорцев формируются только на среде, содержащей 2,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л БАП. Эффективность синтетического ауксина 2,4-Д для индукции каллусогенеза из якорцев была описана и ранее [14—16].

Первичный каллусогенез начинался непосредственно из семян на 10-е сутки культивирования без образования корней и побегов. Интенсивность каллусогенеза составила 20%. Полученные каллусные культуры характеризовались светло-желтым цветом, рыхлой структурой и высокой степенью оводнения (рис. 1).

На среде, содержащей НУК и БАП, в первые недели культивирования наблюдали образование на семенах соматических эмбриоидов, которые погибали ко 2-му—3-му пассажу. Однако при переводе эмбриогенных культур на среду, содержащую в качестве ауксина 2,4-Д, из них также формировался каллус, близкий по морфологическим характеристикам к каллусам, полученным исходно на среде с 2,4-Д и БАП. На остальных вариантах используемых сред какие-либо ростовые процессы не выявлены.

В результате проведенных работ была получена каллусная культура клеток якорцев стелющихся *T. terrestris*, которая сохраняла высокий ростовой потенциал в течение более чем 30 циклов субкультивирования (более двух лет выращивания).

Для получения суспензионных культур клеток в качестве экспланта использовали 4-недельную каллусную культуру после 3-го цикла выращивания. Около 30 г каллусных клеток (по сырой биомассе) помещали в жидкую среду, используемую для выращивания каллусов (MS, содержащая 2,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л БАП), но без добавления агара. Через 14 или 21 сут культивирования полученную первичную суспензионную культуру клеток пересаживали с разной плотностью (степень разведения от 1:5 до 1:10) на свежую среду. К 5-му



Рис. 1. Каллусная культура клеток *T. terrestris*

Fig. 1. Callus culture of *T. terrestris* cells

циклу выращивания был определен оптимальный режим субкультивирования: использование 14-дневной культуры и степень ее разведения в 10 раз (3 мл инокулюма на 30 мл свежей среды); начальная плотность культуры при этом составляла около 1,5 г сухой биомассы на 1 л среды. Полученная суспензионная культура клеток имела желтый цвет, содержала небольшие агрегаты клеток меристемоподобного типа, одиночные паренхимоподобные и удлиненные клетки, а также грушевидные клетки с большим количеством крахмальных зерен (рис. 2).

В течение 8-го цикла выращивания был проведен анализ ростовых характеристик полученной суспензионной культуры клеток *T. terrestris*.

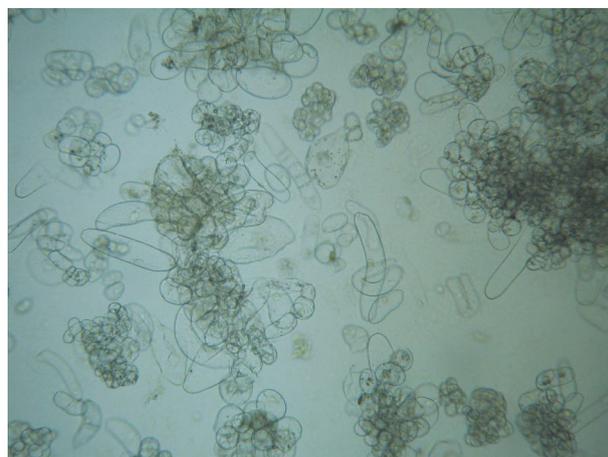


Рис. 2. Суспензионная культура клеток *T. terrestris*

Fig. 2. Suspension culture of *T. terrestris* cells

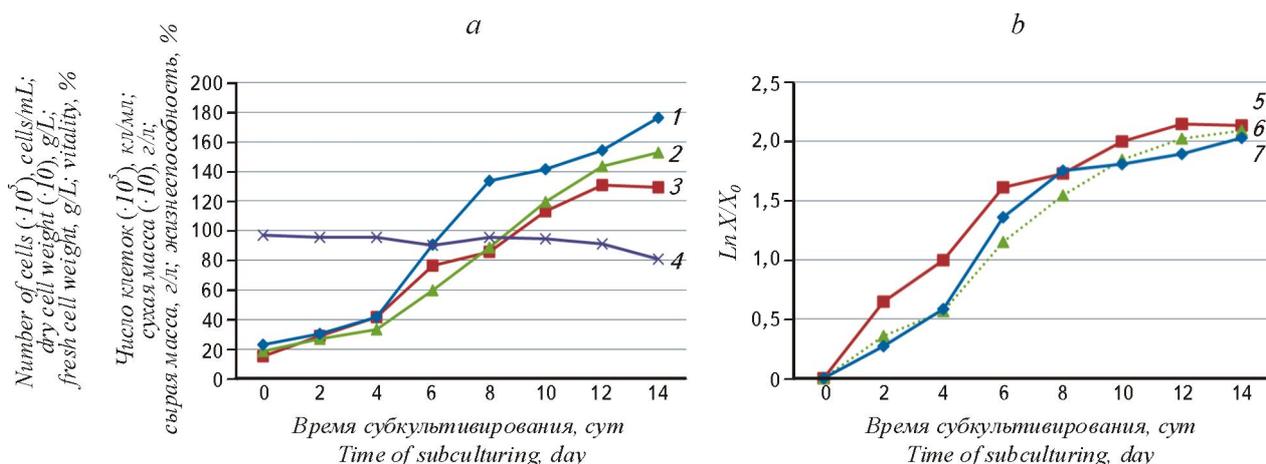


Рис. 3. Динамика роста суспензионной культуры клеток *T. terrestris* при выращивании в колбах объемом 250 мл в нормальной (а) и полулогарифмической (b) системе координат: 1 — число клеток, $\cdot 10^5$, кл/мл; 2 — сырая масса, г/л; 3 — сухая масса $\cdot 10$, г/л; 4 — жизнеспособность, %; 5 — сухая масса, $\ln X/X_0$; 6 — сырая масса, $\ln X/X_0$; 7 — число клеток, $\ln X/X_0$ (X — текущие значения параметра в цикле культивирования, X_0 — начальные значения параметра в цикле культивирования; начальная плотность культуры 1,5 г/л)

Fig. 3. Dynamics of *T. terrestris* suspension culture growth in flasks (250 mL) in a normal (a) and semi-logarithmic (b) coordinate systems: (1), number of cells $\cdot 10^5$, cells/mL; (2), fresh cell weight, g/L; (3), dry cell weight $\cdot 10$, g/L; (4), vitality, %; (5), dry cell weight, $\ln X/X_0$; (6), fresh cell weight, $\ln X/X_0$; (7), number of cells, $\ln X/X_0$ (X is current value of the parameter during culturing cycle, and X_0 is starting value of the parameter; initial culture density is 1.5 g/L)

На рис. 3 приведена динамика роста культуры клеток в нормальной и полулогарифмической системах координат. При анализе представленных кривых роста следует отметить отсутствие лаг-фазы при начальной плотности культуры от 1,5 г/л по сухой массе. Производные ростовые характеристики приведены в табл. 1, из которой следует, что культуру можно отнести к хорошо растущей (максимальное накопление сухой биомассы 13 г/л, индекс роста $I = 8,6$, удельная скорость роста в экспоненциальной фазе по сухой биомассе — $0,24 \text{ сут}^{-1}$, экономический коэффициент $\sim 0,4$, продуктивность по сухой биомассе — 1 г/л/сут). Следует отметить, что культура характеризуется стабильным ростом, не снижающимся в течение более чем двух лет выращивания.

Аппаратурное выращивание суспензионной культуры клеток якорцев стелющихся было проведено в биореакторе (7-литровый лабораторный биореактор New Brunswick Scientific) в полупротоочном режиме с механическим перемешиванием. Было проведено три цикла выращивания; полученные результаты представлены на рис. 4. Из данных экспериментов следует, что аппаратурное выращивание привело к повышению ростовых характеристик культуры. Если при культивировании суспензии клеток в колбах индекс роста и удельная скорость роста по сухой массе составляли 8,6 и $0,24 \text{ сут}^{-1}$, то к третьему циклу выращивания в

биореакторе эти показатели увеличились до 11,3 и $0,38 \text{ сут}^{-1}$, соответственно (табл. 2). Высокие показатели роста культуры клеток в биореакторе по сравнению с таковыми в колбах могут быть связаны с интенсивностью аэрации клеток. Строго доказать подобную закономерность довольно сложно, однако известно, что концентрация растворенного кислорода в процессе культивирования в колбах снижается, а в биореакторе поддерживается на постоянном уровне 10—15% [22].

Скрининг экстрактов клеток каллусных культур методом ТСХ не выявил в них стероидных гликозидов.

При предварительном фитохимическом анализе экстрактов из биомассы первичной суспензионной культуры клеток *T. terrestris* (3-й—6-й циклы культивирования) методом ТСХ ни спиростаноловые, ни фураностаноловые гликозиды также обнаружены не были. Однако повторный анализ через 6 мес выращивания (12-й—15-й циклы выращивания) позволил обнаружить фураностаноловые гликозиды в культуре клеток якорцев стелющихся; на хроматограммах были обнаружены 4 пятна веществ, дающих положительную реакцию с реактивом Эрлиха (рис. 5). При дальнейшем выращивании суспензионной культуры (более двух лет) достаточно стабильное образование как минимум двух фураностаноловых гликозидов сохранялось.

Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris* при выращивании в колбах
Parameters of growth efficiency of *Tribulus terrestris* suspension culture in flasks

Исходные параметры роста Initial parameters of growth efficiency	Производные параметры роста Derived parameters of growth efficiency					
	I	μ , сут ⁻¹ μ , day ⁻¹	τ , сут τ , day	M_{max} , г/л M_{max} , g/L	Y	P , г/л/сут P , g/L/day
Концентрация клеток в суспензии Cell concentration in suspension	7,7	0,29	2,39			
Сырая биомасса Fresh cell weight	8,1	0,24	2,89	13,1	0,39	1,0
Сухая биомасса Dry cell weight	8,6	0,24	2,89			

Примечание: I — индекс роста; μ — удельная скорость роста в экспоненциальной фазе роста; τ — время удвоения; M_{max} — максимальное накопление сухой биомассы; Y — экономический коэффициент; P — продуктивность по сухой биомассе.

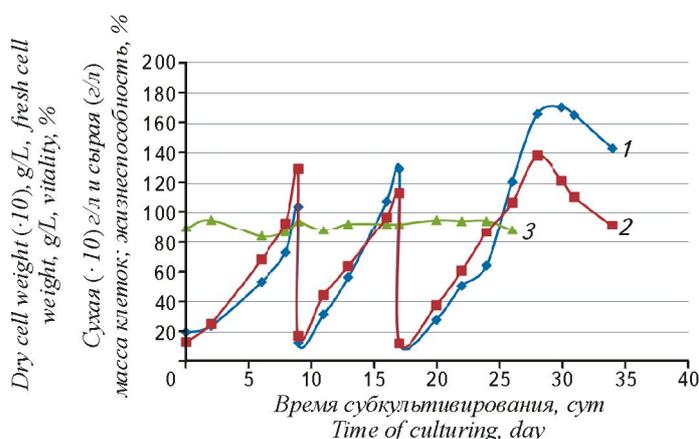
Footnote: I — growth index; μ — specific growth rate in exponential growth phase; τ - doubling time; M_{max} - maximum accumulation of dry cell weight; Y - economical coefficient; P — productivity of dry cell weight.

Для идентификации обнаруженных фураностаноловых гликозидов был проведен UPLC ESI MS-анализ экстракта из биомассы культуры клеток. Показано наличие пиков двух основных соединений со временем удерживания 5,6 и 5,9 мин. Анализ масс-спектров положительных ионов этих соединений (табл. 3) позволил заключить, что оба они имеют в качестве агликона тигогенин (наличие характерного иона с m/z 417) [23]. В пользу того, что обнаруженные два гликозида относятся к фураностаноловому ряду, свидетельствует нали-

чие в их масс-спектрах интенсивного иона с m/z 1065, который соответствует протонированной молекуле гликозида, потерявшей остаток воды ($[M-H_2O+H]^+$). Подобное явление весьма характерно именно для фураностаноловых форм стероидных гликозидов, в молекулах которых присутствует лабильная полуацетальная C22-OH группа [23]. Это предположение подтверждает также присутствие в масс-спектрах обоих гликозидов иона-аддукта $[M+Na]^+$ с m/z 1105. Анализ осколочных ионов (см. табл. 3) показывает, что оба указанные

Рис. 4. Динамика роста суспензионной культуры клеток *T. terrestris* при аппаратном выращивании в нормальной системе координат: 1 — сырая масса, г/л; 2 — сухая масса · 10, г/л; 3 — жизнеспособность, %

Fig. 4. Growth characteristics of plant cell suspension culture of *T. terrestris* in normal coordinate system during bioreactor cultivation (1), fresh biomass, g/L; (2), dry biomass · 10, g/L; and (3), vitality, %



Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *Tribulus terrestris* при выращивании в биореакторе
Growth characteristics of *Tribulus terrestris* suspension culture growing in bioreactor

Номер цикла Cycle number	Исходные параметры роста Initial parameters of growth efficiency	Производные параметры роста Derived parameters of growth efficiency					
		I^*	μ , сут ⁻¹ μ , day ⁻¹	τ , сут τ , day	M_{max} , г/л M_{max} , g/L	Y	P , г/л/сут P , g/L/day
1	Сырая биомасса Fresh cell weight s	5,3	0,21	3,30	13,0	0,39	1,3
	Сухая биомасса Dry cell weight	9,8	0,24	2,89			
2	Сырая биомасса Fresh cell weight	10,3	0,37	1,87	11,4	0,32	1,4
	Сухая биомасса Dry cell weight	6,5	0,46	1,51			
3	Сырая биомасса Fresh cell weight	13,7	0,28	2,48	13,8	0,42	1,2
	Сухая биомасса Dry cell weight	11,3	0,38	1,82			

*Обозначения см. в примечании к табл. 1.

*For designations, see footnote to Table 1.

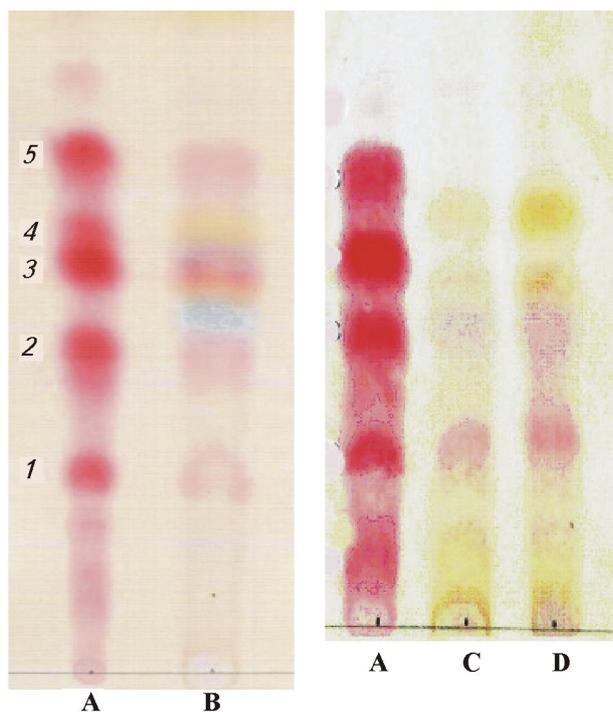


Рис. 5. ТСХ экстрактов из биомассы суспензионной культуры клеток *T. terrestris*: А — стандарт (экстракт фураностаноловых гликозидов из биомассы культуры клеток *Dioscorea deltoidea*); В, С, D — экстракты из биомассы культуры клеток *T. terrestris*: В — 15-й цикл выращивания, С — 45-й цикл выращивания; D — 47-й цикл выращивания; 1—5 — обозначения фураностаноловых гликозидов в порядке уменьшения их полярности

Fig. 5. Thin-layer chromatography of biomass extracts of *T. terrestris* suspension cell culture: A, reference, a sum of steroidal glycosides from *Dioscorea deltoidea* culture biomass; B, C and D, extracts of *T. terrestris* cell culture biomass: B, 15th cycle of growth; C, 45th cycle; D, 47th cycle; 1—5, designations of furostanol glycosides in order of decreasing their polarity

Результаты анализа масс-спектров положительных ионов двух основных соединений, обнаруженных в биомассе суспензионной культуры клеток *T. terrestris* методом UPLC ESI MS
Mass-spectrometry of positive ions of two main compounds detected in biomass of *T. terrestris* suspension cell cultures by UPLC ESI MS

Время удерживания, мин Time of retention, min	Соединение Compound	$[M-H_2O+H]^+$, m/z	$[M+Na]^+$, m/z	Другие ионы, m/z Other ions, m/z
5,6		1065,5695	1105,5447	903,4985 $[M-H_2O-Hex^*+H]^+$ 741,4469 $[M-H_2O-2Hex+H]^+$ 579,3880 $[M-H_2O-3Hex+H]^+$ 417,3363 $[M-H_2O-4Hex+H]^+$
5,9		1065,5592	1105,5492	903,5082 $[M-H_2O-Hex+H]^+$ 741,4478 $[M-H_2O-2Hex+H]^+$ 579,3897 $[M-H_2O-3Hex+H]^+$ 417,3444 $[M-H_2O-4Hex+H]^+$

* Потеря остатка гексозы ($C_6H_{12}O_6$, 162 Да).

* Loss of hexose residue ($C_6H_{12}O_6$, 162 Da).

соединения имеют в своем составе по четыре остатка гексоз (нейтральные потери 162 Да). Идентичность масс-спектров двух гликозидов указывает на то, что они являются изомерами. Для стероидных гликозидов растений известно два типа изомерии [8]: по структуре агликона и/или по строению углеводных цепей. Сопоставление хроматографического поведения гликозидов, обнаруженных в биомассе культуры клеток якорцев, с таковым для изомерных гликозидов диосгенина [24] позволяет предположить, что в данном случае имеет место изомерия по структуре агликона (вероятно, речь идет о 25R/S-изомерах, т.е. производных тигогенина и неотигогенина).

На основании сравнения изложенных результатов с данными литературы [8] можно сделать предварительный вывод, что обнаруженные гликозиды соответствуют 25R/S-изомерам террестризина Н, который ранее был выделен из интактных растений *T. terrestris*. Однако для подтверждения этого заключения требуются дополнительные исследования.

Анализируя закономерности образования стероидных гликозидов при длительном культивировании клеток якорцев стелющихся *in vitro*, можно предположить, что их образование начи-

нается в результате автоселекции клеток, содержащих фураностаноловые гликозиды. Подобное развитие популяции клеток растений *in vitro* можно объяснить антиоксидантной активностью фураностаноловых гликозидов, которая способствует пролиферации клеток. Ранее сходное явление наблюдали в культуре клеток диоскореи дельтовидной [24].

Таким образом, впервые получена суспензионная культура клеток якорцев стелющихся. Охарактеризованы особенности получения культуры клеток *T. terrestris*, описаны ее ростовые характеристики. Проведено аппаратное выращивание в лабораторном биореакторе. Получен стабильный синтез фураностаноловых гликозидов в суспензионной культуре клеток и проведена их предварительная структурная идентификация.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№14-50-00029 «Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем. Направление «Растения»»).

The work was financially supported by the Russian Research Fund (14-50-00029 «Scientific principles for creation of National Depository Bank for Live Systems. Direction «Plants»»).

Получено 4.05.16

ЛИТЕРАТУРА

1. Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology [Eds. K.Y. Paek, H.N. Muyrthy, J.J. Zhong]. — Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2014. — 563 p.
2. Gama, C.R. Clinical Assessment of *Tribulus terrestris* Extract in the Treatment of Female Sexual Dysfunction / C.R. Gama, R. Lasmar., G.F. Gama, C.S. Abreu, C.P. Nunes, M. Geller, L. Oliveira, A. Santos // Clin. Medicine Insights: Women's Health. — 2014. — N. 7. — P. 45—50.
3. Singh, S. Evaluation of the aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in sexually sluggish male albino rats / S. Singh, V. Nair, Y.K. Gupta // J. Pharmacol. Pharmacotherapeutics. — 2013. — V. 3. — P. 43—47.
4. Wesley, J.J. Wound healing activity of the leaves of *Tribulus terrestris* (Linn) aqueous extract in rats / J.J. Wesley, A.J.M. Christina, N. Chidambaranathan, K. Ravikumar // J. Pharm. Res. — 2009. — V.2. — N. 5. — P. 841—843.
5. Wang, J. Five furostanol saponins from fruits of *Tribulus terrestris* and their cytotoxic activities / J. Wang, X. Zu, Y. Jiang // Nat. Prod. Res. — 2009. — V.23. — P. 1436—1444.
6. Ivanova, A. Screening of Some Saponins and Phenolic Components of *Tribulus terrestris* and *Smilax excelsa* as MDR Modulators / A. Ivanova, J. Serly, D. Dinchev, I. Ocsovszki, I. Kostova, J. Molnar // In vivo. — 2009. — V. 23. — N. 4. — P. 545—550.
7. Angelova, S. Antitumor activity of Bulgarian herb *Tribulus terrestris* L. on human breast cancer cells / S. Angelova, Z. Gospodinova, M. Krasteva, G. Antov, V. Lozanov, T. Markov, S. Bozhanov, E. Georgieva, V. Mitev // J. BioSci. Biotechnol. — 2013. — V. 2. — N. 1. — P. 25—32.
8. Kostova, I. Saponins in *Tribulus terrestris* — chemistry and bioactivity / I. Kostova, D. Dinchev // Phytochem. Rev. — 2005. — V. 4. — P. 111—137.
9. Li, J.L. Review of saponins in *Tribulus terrestris* — chemistry and bioactivity / J.L. Li, S.S. Yang // Chin. Arch. Tradit. Chin. Med. — 2006. — V. 24. — P. 1509—1510.
10. Sisto, M. Saponins from *Tribulus terrestris* L. protect human keratinocytes from UVB-induced damage / M. Sisto, S. Lisi, M. D'Amore, R.D. Lucro, D. Carati, D. Castellana, V.L. Pesa, V. Zuccarello, D.D. Lofrumento // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. — 2012. — V. 117. — P. 193—201.
11. Xiao, J. Estrogen receptor mediates the effects of pseudoprotodiosin on adipogenesis in 3T3-L1 cells / J. Xiao, N. Wang, B. Sun, G. Cai // Amer. J. Physiol.: Cell Physiol. — 2010. — V. 299. — N. 1. — P. 128—138.
12. Dinchev, D. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions / D. Dinchev, B. Janda, L. Evstatieva, W. Oleszek, M.R. Aslani, I. Kostova // Phytochem. — 2008. — V. 69. — N. 1. — P. 176—186.
13. Sharifi, S. Enhanced callus induction and high-efficiency plant regeneration in *Tribulus terrestris* L., an important medicinal plant / S. Sharifi, T.N. Sattari, A. Zebajadi, A. Majd, H.R. Ghasempour // J. Med. Plants Res. — 2012. — V. 6. — N. 27. — P. 4401—4408.
14. Zafar, R. Tissue culture studies on *Tribulus terrestris* Linn. / R. Zafar, J. Haque // Indian J. Pharmac. Sci. — 1990. — V. 52. — N. 1. — P. 102—103.
15. Don Palmer, C. Plant regeneration using immature zygotic embryos of *Tribulus terrestris* / C. Don Palmer, W. A. Keller // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). — 2011. — V. 105(1). — P.121—127.
16. Mohan, J.S.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Tribulus terrestris* L. / J.S.S. Mohan, V.V. Kumar, V. Aparna, R.P. Vaidya / Phytomorphology. — 2000. — V. 50. — N. 3/4. — P. 307—311.
17. Murashige, T. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture / T. Murashige, F. Scoog // Physiol. Plantarum. — 1962. — V. 15. — P. 473—497.
18. 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.
Sukhanova, E.S. Obtaining and characteristics of callus and suspension cultures of *Polyscias filicifolia* and *Polyscias fruticosa* / E.S. Sukhanova, N.D. Chernyak, and A.M. Nosov // Biotekhnologiya (Biotechnology). — 2010. — N 4. — P. 44—50.
19. Липский А.Х. Влияние температуры на культуру клеток диоскореи дельтовидной при глубинном выращивании / А.Х. Липский, Н.Д. Черняк // Физиол. раст. — 1983. — Т. 30. — В. 3. — С. 437—447.
Lipskii, A.Kh. Effect of temperature on cell culture of *Dioscorea deltoidea* during submerged culturing / A.Kh. Lipskii, and N.D. Chernyak // Fiziologiya Rasteniy (Plant Physiology). — 1983. — V. 30. — issue 3. — P. 437—447.
20. Самыгин Г.А. Сравнение разных методов для оценки жизнеспособности клеток суспензионных и каллусных культур / Г.А. Самыгин, Л.А. Волкова, А.С. Попов // Физиол. раст. — 1985. — Т. 32. — В. 4. — С. 813—817.
Samygin, G.A. Comparison of various methods for assessment of vitality of cells in suspension callus cultures / G.A. Samygin, L.A. Volkova, and A.S. Popov // Fiziologiya Rasteniy (Plant Physiology). — 1985. — V. 32. — issue 4. — P. 813—817.
21. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений: Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений (ISBN: 978-5-9963-0738-8). — М.: Бином, 2011. — С. 386—403.
Nosov, A.M. Methods for assessment and characteristics of growth of higher plants cell cultures: Molecular genetics and biochemical methods in current plant biology (ISBN: 978-5-9963-0738-8). — M.: Binom, 2011. — P. 386—403.
22. Титова М.В. Особенности дыхания и образования стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Dioscorea deltoidea* при выращивании в колбах и биореакторах / М.В. Титова, Н.А. Шумило, И.Е. Куличенко, И.М. Иванов, Е.С. Суханова, А.М. Носов // Физиол. раст. — 2015. — № 4. — С. 594—601.
Titova, M.V. Features of respiration and formation of steroidal glycosides in suspension cell culture of *Dioscorea deltoidea*

dea during culturing in flasks and bioreactors / M.V. Titova, N.A. Shumilo, I.E. Kulichenko, I.M. Ivanov, E.S. Sukhanova, and A.M. Nosov // *Fiziologiya Rasteniy* (Plant Physiology). — 2015. — N 4. — P. 594—601.

23. Li, R. ESI-QqTOF-MS/MS and APCI-IT-MS/MS analysis of steroid saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica* J. R. Li, Y. Zhou, Z. Wu, L. Ding // *Mass Spectrom.* — 2006. — V.41. — P.1—22.
24. Nosov, A.M., Popova, E.V., Kochkin, D.V. Isoprenoid production via plant cell cultures: Biosynthesis, accumulation and scaling-up to bioreactors: Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology. — Dordrecht: Springer Science+Business Media, 2014. — P. 563—623.

M.T. KHANDY^{1,2,*}, D.V. KOCHKIN^{1,3}, S.V. TOMILOVA⁴,
B.A. GALISHEV⁴, E.S. SUKHANOVA^{1,3}, A.G. KLYUSHIN³,
I.M. IVANOV³, and A.M. NOSOV^{1,3}

¹The Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow Russia

²The Ammosov North-Eastern Federal University, 677000, Yakutsk Russia

³The Timiryazev Institute for Plant Physiology, Russ. Acad. Sci., 127276, Moscow Russia

⁴The Yeltsin Ural Federal University, 620002, Ekaterinburg Russia

e-mail: handy_89@mail.ru

Obtaining and Investigation of Callus and Suspension Plant Cell Cultures of *Tribulus terrestris* L., a Producer of Steroidal Glycosides

Callus and suspension plant cell cultures of *Tribulus terrestris* L., a valuable medicinal plant producing steroidal glycosides, have been obtained. The seeds of *T. terrestris* from an American population were used as explants. The regulation of cell cultures obtaining and growth, as well as the biosynthetic characteristics of the cell lines were studied. The combination of phytohormones of 2,4-D (2.0 mg/L) and BAP (1.0 mg/L) was found to be optimal for the callus induction and cultivation. The suspension cell culture obtained in the liquid medium of the same composition showed such high growth characteristics during the prolonged cultivation (more than 2 years), as maximum accumulation of dry biomass of 13 g/L, specific growth rate at exponential phase of 0.25 day⁻¹, and economical coefficient of 0.39. A semi-continuous mode of cultivation was used to grow the plant cell suspension in a lab-scale bioreactor. The screening of steroidal glycosides in the obtained cell cultures was carried out. In the callus cultures, steroidal glycosides were not found. However, it was established by TLC and UPLC ESI MS that the suspension culture contained furostanol glycosides, and their amount increased during the cultivation process. These results support the hypothesis of the autoselection of cultivated cells that contain compounds promoting their proliferation *in vitro*.

Key words: callusogenesis, steroidal glycosides, suspension plant cell culture, *Tribulus terrestris* L.

Biotekhnologiya (Biotechnology), 2016, V. 32, N 4, P. 21—30.

* Author for correspondence.