

В.Ю. Дорофеев, Р.А. Карначук, И.В. Шилова

**ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОК КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ
КНЯЖИКА СИБИРСКОГО (*Atragene speciosa* Weinm.) *in vitro***

Аннотация. Впервые показано содержание элементов в клетках каллусной культуры княжика сибирского, длительно пассируемого на питательной среде Мурасиге – Скуга в темноте. При исследовании качественного и полуколичественного состава микроэлементов составлен ряд предпочтительного накопления элементов каллусными клетками. Проведено сравнение содержания элементов, обнаруженных в клетках каллуса и в дикорастущем растении соответственно.

Ключевые слова: каллусная культура, субкультивирование клеток *in vitro*, *Atragene speciosa* Weinm., ноотропное действие, озоление, эмиссионная спектрометрия.

Княжик сибирский – *Atragene speciosa* Weinm. сем. *Ranunculaceae* – многолетнее растение, произрастающее в таежных лесах Сибири. Надземная биомасса его используется в народной медицине для лечения сердечно-сосудистых, гинекологических и опухолевых заболеваний, как кардиотоническое, противоревматическое, диуретическое, ранозаживляющее, болеутоляющее и общеукрепляющее средства. Исследователями НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН и СибГМУ в княжике сибирском обнаружены фенолоспирты, флавоноиды, антрахиноны, кумарины, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества, алкалоиды, тритерпеновые гликозиды, полисахариды, каротиноиды и органические кислоты. Установлено, что экстракт этого растения оказывает ноотропное и противоязвенное действия, обладает противосудорожным, транквилизирующим, стресс-протективным свойствами [1], а также выраженным антистрессорным и противоневротическим действием, не уступая по своей активности диазепаму, но при этом лишен его побочных эффектов. Фракции, полученные из экстракта, проявляют выраженный ноотропный и противоишемический эффекты [2].

Поскольку это вид с разреженным ареалом произрастания, имеются трудности в сборе лекарственного сырья. Жизненная форма княжика сибирского – лиана, поэтому интродукция этого растения невозможна. Интерес к введению его в асептическую культуру *in vitro* вызван возможностью получения вышеперечисленных соединений для создания на их основе ноотропного и адаптогенного фитопрепарата.

Метод культуры тканей и клеток лекарственных растений *in vitro* позволяет получать экологически чистое сырье круглый год, увеличивать выход биологически активных веществ, регулируя их накопление в культуре. Так, в качестве источника алкалоидов успешно культивируются клеточные культуры *Atropa belladonna* L., *Symphytum officinale*, *Aconitum* sp.; алкалоидов и сапонинов – *Nigella* sp.; витамина Е – *Carthamus tinctorius* L.; эфирных масел – *Lavandu-*

la sp., и многие другие растения [3, 4]. Данный метод имеет ряд преимуществ перед использованием интактного растения. Он позволяет получать сырьё независимо от климатических условий, поддерживать рост растений круглый год, что важно для видов, имеющих в цикле своего развития периоды покоя.

На основе изучения биосинтетических процессов можно получить наиболее богатые тканевые клоны биологически действующих веществ, а также заменить интактные растения, природный ареал которых недостаточен для использования в практических целях.

В Томском государственном университете на кафедре физиологии растений и биотехнологии была впервые получена каллусная культура растительных клеток княжика сибирского *in vitro* в качестве продуцента физиологически активных веществ [5]. Крупномасштабное промышленное оборудование (ферментеры) для культивирования в дальнейшем позволит быстро получать биомассу растительных клеток *in vitro*.

Получены предварительные данные фитохимического анализа накопления биологически активных веществ каллусной культуры княжика сибирского. Спектрофотометрическим методом определена сумма флавоноидов. Методом тонкослойной хроматографии обнаружены фракции высокополярных три-терпеновых гликозидов (сапонинов), в том числе длительно пассируемых штаммов (32 и 44 субкультивирований) каллусной культуры княжика сибирского. Результаты позволяют говорить о способности клеточной культуры сохранять синтез соединений, характерных для интактных растений.

В настоящее время потребность в препаратах, содержащих микроэлементы, значительно возросла. Микроэлементы в растениях могут стимулировать действие их биологически активных соединений [6]. Известно содержание микроэлементов в дикорастущем княжике сибирском.

Нашей задачей явилось исследование элементного состава каллусной культуры клеток *in vitro* и сравнение с таковым дикорастущего княжика сибирского (*Atragene speciosa* Weinm.).

Объекты и методики исследования

Объектом исследования явилась каллусная культура клеток княжика сибирского, полученная при использовании в качестве экспланта сегментов черешков молодых листьев интактных растений из республики Хакасия (Ширинский район) [7].

Данная культура на протяжении 44 субкультивирований в темноте выращивалась на питательной среде Мурасиге – Скуга [8] с модифицированным гормональным составом. Ауксин 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота и цитокинин 6-бензиламинопурина в концентрациях 0,6 и 0,3 мг/л соответственно, оказывающие наиболее эффективное действие на пролиферацию каллусной культуры княжика сибирского, добавлялись в питательную среду.

Исследовали качественный и полуколичественный состав микроэлементов в каллусной культуре *Atragene speciosa* Weinm. В ходе атомно-эмиссионного анализа биологических образцов одним из основных этапов является озоление.

Озоление. Использовали традиционный способ озоления биологических проб, время озоления 2–3 сут [9]. Для приготовления зольного остатка брали навеску 1 г измельченной воздушно-сухой массы растительного сырья (клеток каллусной культуры), помещали ее в предварительно прокаленный до постоянной массы фарфоровый тигель и равномерно распределяли по дну. Навеску сырья в тигле осторожно обугливали над слабым пламенем горелки.

После полного обугливания сырья тигли переносили в муфельную печь для полного прокаливания остатка при температуре 550–650°C, избегая сплавления золы и спекания ее со стенками тигля. Дальнейшее высушивание проводили до постоянной массы при температуре 400–450°C в течение 3 сут до образования серой золы постоянной массы. Для этого массу зольного остатка периодически взвешивали, предварительно охладив в эксикаторе. Определение общей золы в каллусе проводили в соответствии с методикой ГФ XI (1990).

Процентное содержание общей золы (X) в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле

$$X = (m_1 100 \times 100) \div (m_2 (100 - w)),$$

где m_1 – масса золы, г; m_2 – масса навески, г; w – потеря в массе сырья при высушивании, %.

Зольный остаток использовали для обнаружения минеральных элементов.

Эмиссионная спектрометрия. Определение микроэлементов проводилось спектрографически на спектрографе из золы исследуемых образцов методом эмиссионной спектрометрии [9]. Этот метод применяется для исследования элементного (качественного и количественного) состава вещества по спектру излучения его атомов.

Результаты и обсуждение

Количество золы в растительном сырье колеблется в определенных пределах и зависит от специфики самого сырья и условий его сушки. В зольном остатке растений чаще всего содержатся следующие элементы: K, Na, Mg, Ca, Fe, C, Si, P; реже и в меньшем количестве – Cu, Mn, Al и др. Эти элементы обнаруживаются в виде оксидов или солей угольной, фосфорной, серной и других кислот.

Полученный нами зольный остаток клеток каллусной культуры составил 0,15 г от навески 1 г воздушно-сухой массы. Процентное содержание общей золы в абсолютно сухой массе клеток *in vitro* составило 17,38. Процент общей золы каллусной культуры клеток *Atragene speciosa* Weinm. 16,20, что в 2 раза превышает аналогичный показатель дикорастущего растения. Методом эмиссионной спектрометрии установлено наличие 18 элементов. Из них макроэлемент – марганец, 6 микроэлементов и 11 ультрамикроэлементов.

Исследования показали, что качественный состав элементов, обнаруженных в каллусе и дикорастущем растении, идентичен, тогда как количественное содержание существенно отличалось. В дикорастущем княжике сибирском обнаружены следующие элементы: Mn; Ni; Cr; Mo; V; Pb; Zn; Ag; Cu; Si; Bi; Co; Na; Mg; Sn; Al; Ca; Fe [6, 10–12].

На основании данных спектрографического анализа составлен ряд предпочтительного накопления элементов клетками каллусной культуры *Atragene speciosa* Weinm.: $Mg > Zn > Fe > Ag > Mn > Cu > Cr > W = Cd > Ta > Ti > Al > V > Mo > Ni > Sn > Pb > Bi$. Отличительным свойством каллусной культуры является ее способность накапливать следующие микроэлементы: серебро, цинк, медь, хром, свинец, марганец, магний, железо, молибден, никель. В клетках *in vitro* наблюдали содержание Mg и Fe в концентрациях на порядок ниже, чем в надземной биомассе дикорастущих особей в период плодоношения. Высокие концентрации этих элементов в дикорастущем растении, возможно, связаны со способностью накапливать их при переходе в очередную фазу онтогенеза либо являются ответом на геохимическую ситуацию данного района.

Необходимо отметить, что содержание серебра (0,24 мг % на 100 г воздушно-сухой массы клеток каллусной культуры) и цинка (0,51 мг %) значительно превышает таковое дикорастущего *Atragene speciosa* Weinm. – 0,045 и 0,256 мг % соответственно. Однако дикорастущий княжик сибирский в значительном количестве содержит магний, железо, марганец, никель, молибден, ванадий, свинец, алюминий и висмут. Возможно, наличие высоких концентраций некоторых элементов в клетках каллусной культуры объясняется способностью аккумулировать их в процессе 44 субкультивирований на питательной среде Мурасиге – Скуга с содержанием микроэлементов по прописи, приведенной в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

Содержание некоторых источников элементов в питательной среде Мурасиге – Скуга, обнаруженных в клетках каллусной культуры княжика сибирского

Состав	Концентрация в питательной среде, М	Концентрация исходного раствора, мг/л	Объем исходного раствора на 1 л питательной среды, мл
Источник магния			
$Mg SO_4 \times 7H_2O$	$1,50 \times 10^{-3}$	7 400	50
Источник железа			
$FeSO_4 \times 7H_2O$	$1,00 \times 10^{-4}$	5 560	5
Источники микроэлементов			
$MnSO_4 \times 4H_2O$	$9,99 \times 10^{-5}$	4 460	5
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	$2,99 \times 10^{-5}$	1 720	
$Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	$1,00 \times 10^{-6}$	50	
$CuSO_4 \times 5H_2O$	$1,00 \times 10^{-7}$	5	

Наблюдающаяся динамика накопления микроэлементов в дикорастущем растении зависит от биогеохимической специфики ареала произрастания данного вида.

Различия в элементном составе надземной части растения и клеточной культуры *in vitro* связаны с избирательностью поглощения этих элементов в разные фазы развития в зависимости от биохимических процессов, протекающих в органах растения и клетках каллуса *in vitro*. Данные сравнительного анализа приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Содержание элементов в дикорастущем растении* и каллусной культуре клеток
Atrgene speciosa Weinm. (мг % на 100 г воздушно-сухой массы)

Элемент	Содержание элементов		
	в листьях дикорастущего растения в период*:		в каллусной культуре
	цветения	плодоношения	
Макроэлемент			
Mg	–	25,180	2,400
Железо			
Fe	6,420	3,487	0,260
Микроэлементы			
Cu	0,183	0,021	0,150
Zn	0,256	0,241	0,510
Mn	0,256	1,283	0,230
Mo	0,019	0,236	0,004
Ni	0,562	0,221	0,003
Ультрамикроэлементы			
Cr	0,064	0,018	0,026
V	0,014	–	0,005
W	–	–	0,024
Sn	–	–	0,003
Pb	0,015	0,017	0,003
Cd	–	–	0,024
Al	2,740	2,034	0,006
Ti	–	–	0,020
Ta	–	–	0,021
Ag	0,045	0,023	0,240
Bi	0,023	–	–

* Приведены данные из [6, 10].

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о возможности использования клеточной культуры *in vitro*, как и надземной биомассы дикорастущего княжика сибирского, в качестве источника разнообразных микроэлементов, в том числе незаменимых, при различных гипомикроэлементных состояниях. Наряду с этим необходимо учитывать специфику в накоплении исследуемых элементов в процессе культивирования княжика сибирского *in vitro*.

Заключение

Впервые методом эмиссионной спектрометрии определено содержание 8 элементов в клетках каллусной культуры княжика сибирского, из которых макроэлемент – марганец, 6 микроэлементов и 11 ультрамикроэлементов.

Литература

1. Краснов Е.А., Шилова И.В., Суслов Н.И. Исследования по разработке оригинального ноотропного фитопрепарата // Химия природных соединений. 1981. № 6. С. 806.

2. Шилова И.В., Краснов Е.А., Андреева Т.И. и др. Исследование химического состава надземных частей *Atragene sibirica* L. и ее культуры ткани // Материалы Всерос. совещания «Физиология и биотехнология растений». Томск: Изд-во Том. ун-та, 1998. С. 79–81.
3. Shoyama Y., Nishioka I., Hatano K. IV. Aconitum spp. (Monkshood) // Biotechnology in Agriculture and Forestry 15. Medicinal and Aromatic Plants III / Ed. by Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Printed in Germany, 1991. P. 68–73.
4. Schmauder H.-P., Doebl P. XIX Nigella spp.: in vitro culture, regeneration, and the formation of secondary metabolites // Biotechnology in Agriculture and Forestry 15. Medicinal and Aromatic Plants III / Ed. by Y.P.S. Bajaj. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Printed in Germany, 1991. P. 311–336.
5. Карначук Р.А., Клетикова Т.В., Шилова И.В. и др. Культура ткани *Atragene sibirica* L. – продуцент биологически активных сапонинов // Материалы Междунар. совещания «Физиолого-биохимические аспекты изучения лекарственных растений». Новосибирск, 1998. С. 29.
6. Сдобникова Л.А., Ковалевич Н.В. Содержание микроэлементов в княжике сибирском, произрастающем в Казахстане // Некоторые проблемы фармацевтической науки и практики. Алма-Ата, 1975. С. 118–119.
7. Карначук Р.А., Дорофеев В.Ю. Княжик сибирский (*Atragene speciosa* Weinm.) in vitro – источник физиологически активных веществ // Материалы VIII Междунар. конф. «Биология клеток растений in vitro и биотехнология». Саратов, 2003. С. 134–135.
8. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Culture // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, № 13. P. 473–497.
9. Каишкан Г.В., Кулешов В.И. и др. Анатомо-эмиссионное определение микроэлементов в биологических жидкостях и тканях // Тезисы докл. I Областной науч.-технич. конф. «Основные разработки медицинской техники учреждениями и предприятиями г. Томска». Томск, 1988. С. 8–9.
10. Шилова И.В., Краснов Е.А., Барановская Н.Б. и др. Элементный состав надземной части *Atragene sibirica* L. // Растительные ресурсы. 2002. Т. 38, вып. 4. С. 69–74.
11. Шилова И.В., Краснов Е.А., Барановская Н.В. и др. Аминокислотный и минеральный состав надземной части *Atragene speciosa* Weinm. // Химико-фармацевтический журнал. 2002. Т. 36, № 11. С. 26–28.
12. Шилова И.В., Барановская Н.В., Сырчина А.И. и др. Аминокислотный и элементный состав активной фракции княжика сибирского // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2008. № 3. С. 30–33.