

## **IN VITRO КУЛЬТУРЫ *SILYBUM MARIANUM* (L.) КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИСТОЧНИК ЦЕЛЕВЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

### **О.В. Ковзунова**

науч. сотрудник, отдел биохимии и биотехнологии растений, Центральный ботанический сад НАН Беларуси (г. Минск)  
E-mail: olga-kora@mail.ru

### **Н.В. Пушкина**

науч. сотрудник, Институт ядерных проблем, Белорусский государственный университет (г. Минск)

### **С.Г. Азизбекия**

ст. науч. сотрудник, Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси (г. Минск)

Выявлен стимулирующий эффект электромагнитного поля и препарата наночастиц металлов на биосинтез флавонолигнанов в клеточных культурах *Silybum marianum* L. двух рас. Показано, что уровень ответных реакций на модификаторы зависит от степени дедифференциации культуры.

**Ключевые слова:** *in vitro*, суспензионная культура, каллусы, флаволигнаны, биологически активные вещества.

В настоящее время в медицинской практике важное место принадлежит лекарственным средствам растительного происхождения, так как они обладают широким спектром биологического действия, что позволяет использовать их для профилактики и лечения многих заболеваний. Потребность населения в фитопрепаратах удовлетворяется не полностью, главным образом, из-за дефицита сырья. Особое значение приобретают исследования по созданию эффективных, целенаправленных технологий в производстве фитохимических лекарственных средств с целью комплексного использования лекарственного сырья, достижения более высоких выходов, расширения спектра извлекаемых биологически активных веществ (БАВ) и ресурсосбережения [1].

Эти проблемы можно решить, используя новый вид фитосырья – биомассу лекарственных растений, получаемую биотехнологическим способом с направленным биосинтезом целевых веществ, пригодность которого не вызывает сомнений.

Однако сырье, получаемое данным способом, еще достаточно дорогое, поэтому остается актуальным поиск новых эффективных направлений, позволяющих снизить себестоимость сырья за счет повышения продуктивности штаммов, совершенствования методов выращивания биомассы и выделения активных субстанций. Разработка эффективных способов получения дефицитных видов сырья методом культуры тканей и создание

новых технологий фитопрепаратов представляет собой актуальную научно-практическую проблему, решение которой позволит внести важный вклад в развитие фармацевтической технологии [2] и увеличить выпуск необходимых здравоохранению лекарственных средств.

Силимарин (силимариновый комплекс) – это собирательное название флавонолигнанов, основных биологически активных веществ расторопши пятнистой. На основе силимарина разработан ряд фармакологических препаратов с высоким антигепатотоксическим, иммуномодулирующим, гепатопротекторным и антихолестерологическим действием [3, 4].

Существует ряд химических и физических способов воздействия, регулирующих биосинтез БАВ в культурах *in vitro*.

Действие электромагнитного поля сверхвысоких частот (ЭМП СВЧ) низкого уровня мощности на различные биологические объекты изучается давно [5], однако до сих пор клеточные культуры *in vitro* высших растений не были использованы как объекты исследования. А.Х. Тамбиев с коллегами [6, 7] исследовал влияние ЭМП СВЧ на одноклеточные водоросли. Облучение водорослей приводило к увеличению выхода биомассы как минимум в два раза и усилению интенсивности фотосинтеза до 350%. По мнению А.Х. Тамбиева и его коллег [6–8], под действием ЭМП СВЧ в клетках водорослей происходит образование и накопление актив-

ных радикалов кислорода и перекисей, что приводит к развитию автокаталитических (типа цепных) реакций, которые в итоге через ускорение мембранного транспорта и интенсификацию фотосинтетических процессов оказывают стимулирующий эффект на физиологические параметры фотосинтезирующих организмов [7, 8]. Наночастицы представляют собой нерастворимые соединения настолько малых размеров, что способны проникать через клеточную стенку и мембраны растений вместе с жидкой фазой. Они характеризуются высокой реакционной способностью и каталитической активностью; являясь кофакторами ферментов, принимают активное участие в регуляции различных жизненных процессов. Наночастицы обладают пролонгированным действием, что отличает их от других соединений (солей, хелатов). Следует отметить, что расторопша пятнистая обладает высокой металлофитностью к ряду микроэлементов.

Следовательно, в роли физического стимулятора биосинтеза БАВ может быть использована обработка культур *in vitro* электромагнитным полем сверхвысоких частот (ЭМП СВЧ), а в роли химического модификатора метаболизма – комплексный препарат наночастиц металлов «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe».

Цель исследования – изучение изменения метаболизма в *in vitro* культурах *Silybum marianum* L., полученных из растений двух рас – красноцветкового сорта Золушка белорусской селекции и белоцветкового сортообразца *Sibilla* венгерской селекции, при воздействии модификаторов различной природы, на основе анализа содержания целевых БАВ (флавонолигнанов).

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Каллусы расторопши пятнистой красно- и белоцветковой расы инициировали из стеблевых и корневых эксплантов-сегментов размерами 4 мм, взятых с 17-дневных асептических растений, на среде Мурасиге–Скуга (МС), содержащей гормоны 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 0,4 мг/л кинетина. Пассирование каллусов каждые 14–17 дней проводили на свежую МС среду с добавлением гормонов: 2 мг/л бензиламинопурина (БАП) и 1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК). Дальнейшее культивирование каллусов осуществляли в темноте при температуре 25 °С. Суспензионную культуру *S. marianum* выращивали из каллусной культуры на жидкой среде МС с добавле-

нием 2 мг/л БАП и 1 мг/л НУК в круглодонных колбах в люминостате при 24–25 °С на круговой качалке (100–120 об/мин) в темноте. Субкультивирование суспензионной культуры проводили с интервалом в 16 дней. Для анализов использовали гетерогенные каллусные и суспензионные культуры разной степени дедифференциации: 4-го и 27-го пассажей. Для каллусов 4-го пассажа характерно присутствие небольшого количества мелких меристематических клеток с утолщенными стенками, крупным ядром, мелкими вакуолями и наличием очагов проводящей ткани, не встречающихся в каллусах 27-го пассажа. Каллус 27-го пассажа характеризуется крупными вакуолизированными клетками с тонкой клеточной оболочкой, что позволяет считать данный каллус высокодедифференцированным.

Образцы обрабатывали ЭМП СВЧ в миллиметровом диапазоне волн мощностью 10 мВт и временем обработки 20 мин. Препарат наночастиц металлов «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» вносили в культуральную среду в концентрации 0,01 мг/л. Биологические эффекты на метаболизм *in vitro* культур *S. marianum* оценивали в сравнении с культурами, не подвергнутыми обработке (контроль).

Экстракцию флавонолигнанов проводили по методике [9, 10]. Оптическую плотность измеряли через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 380 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание суммы флаволигнанов в процентах ( $X$ ) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times 50}{67,5 \times m \times (100 - W)},$$

где  $D$  – оптическая плотность испытуемого раствора; 67,5 – молярный коэффициент экстинкции (удельный показатель поглощения силидианина-стандарта) силидианина;  $m$  – масса сырья в граммах;  $W$  – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Все анализы проводили в шестикратной повторности, полученные результаты обрабатывали, используя Microsoft Office Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ суммарного содержания флавонолигнанов (ФЛВ) в каллусах и суспензионной культуре *S. marianum* (рис. 1, 2) показал, что ЭМП СВЧ и комплексный препарат наночастиц металлов ока-

зывает положительный стимулирующий эффект на биосинтез целевых БАВ. Контрольные вариан-

ты характеризовались практически одинаковым уровнем содержания ФЛВ в 4-м и 27-м пассажах.

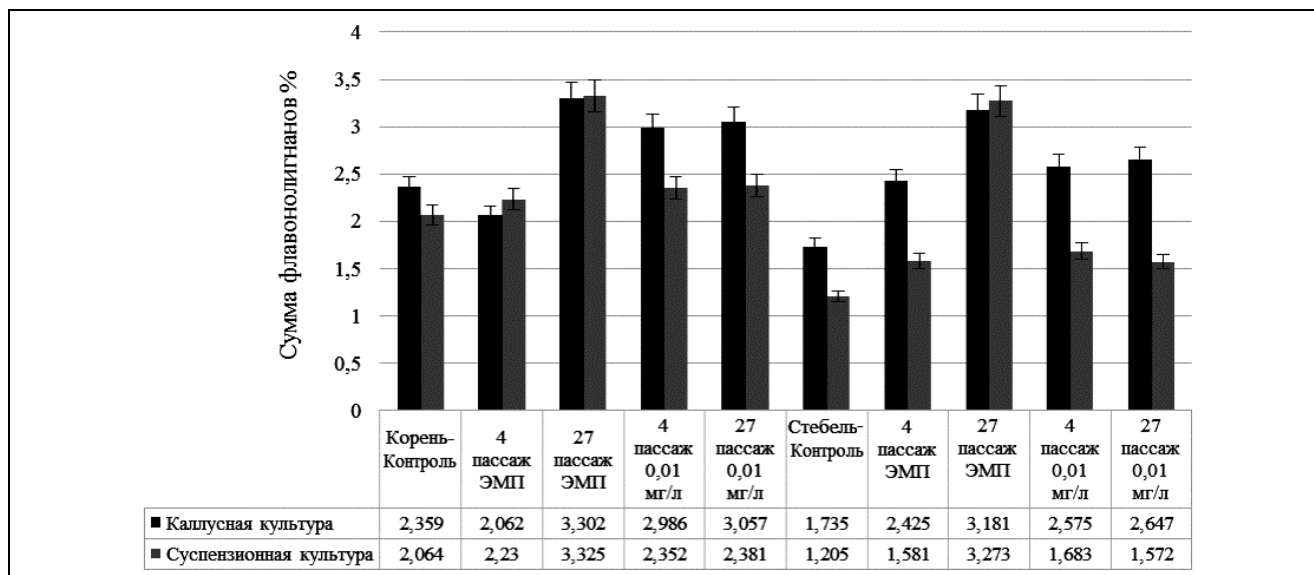


Рис. 1. Суммарное содержание флавонолигнанов в *in vitro* культуре *S. marianum* сортообразца *Sibilla* венгерской селекции при воздействии модификаторов метаболизма различной природы

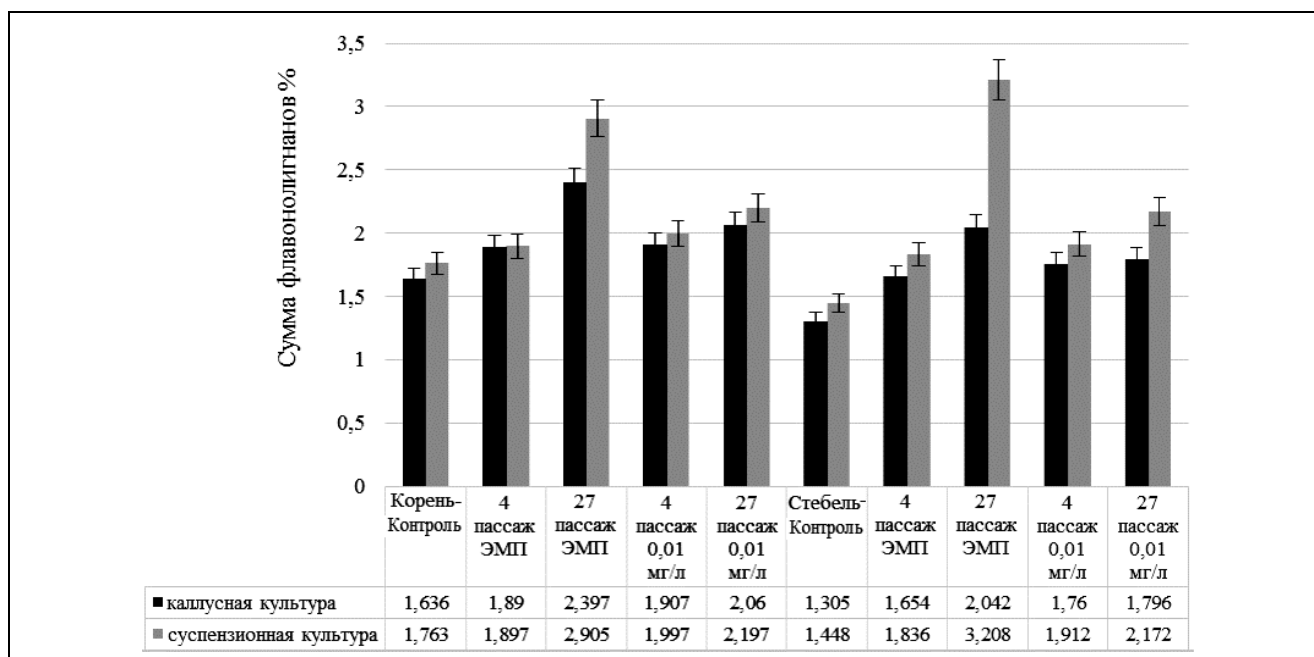


Рис. 2. Суммарное содержание флавонолигнанов в *in vitro* культуре *S. marianum* сорта *Золушка* белорусской селекции при воздействии модификаторов метаболизма различной природы

В калусной культуре сортообразца *Sibilla* венгерской селекции корневого происхождения внесение препарата наночастиц металлов увеличивало содержание целевых БАВ на 26 и 30% в 4-м и 27-м пассажах, в то время как в суспензионной культуре данные показатели составили 14 и 15% соответственно.

Стеблевая культура расторопши пятнистой венгерской селекции оказалась более отзывчивой на внесение в культуральную среду препарата «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» — количество ФЛВ увеличилось на 50% в калусной культуре и на 40% в суспензионной.

У сорта Золушка наблюдалась схожая ситуация: в корневом и стеблевом каллусах содержание флавонолигнанов увеличилось на 20 и 35% по сравнению с контролем, а в корневой и стеблевой суспензионной культуре – на 19 и 40% соответственно.

Следовательно, внесение препарата наночастиц металлов «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» в каллусную культуру корневого и стеблевого происхождения сортообразца венгерской селекции в концентрации 0,01 мг/л приводило к наибольшему увеличению содержания ФЛВ по сравнению с суспензионной, причем максимальное увеличение наблюдалось на стеблевой культуре, в то время как внесение данного препарата в суспензионную культуру расторопши пятнистой сорта Золушка максимально увеличивало содержание флавонолигнанов по сравнению с каллусной культурой.

Тенденция к повышению содержания исследуемых веществ наблюдалась и при обработке электромагнитным облучением низкого уровня мощности (см. рис. 1, 2). Содержание ФЛВ в корневой культуре 27-го пассажа сортообразца венгерской селекции (калусная культура и суспензионная культура) возросло на 40 и 61%, в стеблевой культуре – на 83 и 172%, а в 4-м пассаже стеблевой культуры – на 40 и 31% соответственно. Обработка ЭМП СВЧ каллусной и суспензионной корневой культуры 4-го пассажа незначительно увеличило содержание исследуемой группы БАВ – на 11 и 8% по отношению к контролю.

При анализе содержания ФЛВ в *in vitro* культуре сорта Золушка наблюдалась та же тенденция: в стеблевом каллусе 27-го пассажа содержание увеличивалось на 57%, в корневом – на 47%, в стеблевой суспензионной культуре – на 121,5 %, а в корневой – на 65 %. Обработка 4-го пассажа увеличила содержание ФЛВ на 15% в корневой каллусной культуре и на 25% – в стеблевой по отношению к контролю.

## Выводы

1. Электромагнитное поле сверхвысоких частот низкого уровня мощности сильнее стимулировало биосинтез флавонолигнанов в высокодифференцированных культурах, при том что исходные уровни содержания ФЛВ у данных культур были одинаковыми. Возможно, *in vitro* культуры в состоянии полной дедифференциации лучше воспринимают внешние электромагнитные сигналы, на более высоких

уровнях генерируют ответное образование различных радикалов и, как следствие, активируют биосинтез БАВ.

2. Действие исследуемых модификаторов метаболизма (комплексного препарата наночастиц металлов «Наноплант – Co, Mn, Cu, Fe» и ЭМП СВЧ низкого уровня мощности) на клеточные культуры *S. marianum* оказывает положительный стимулирующий эффект на биосинтез целевых метаболитов в клетках. При этом длительно пассируемые суспензионные культуры являются более отзывчивыми к электромагнитной обработке, а каллусные культуры – к внесению препарата наночастиц металлов. Подобранные режимы обработки и концентрации наночастиц металлов могут быть использованы с целью увеличения биосинтеза целевых веществ в *in vitro* культурах *Silybum marianum* L. красно- и белоцветковых рас.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Rao R.S. Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites // *Biotechnol. Adv.* 2002. № 20. P. 101–153.
2. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures // *Journal of Medicinal Plants Research.* 2009. V. 3. № 13. P. 1222–1239.
3. Wellington K. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders // *BioDrugs.* 2001. V. 15. № 7. P. 465–489.
4. Крепкова Л.В., Шкаренков А.А., Сокольская Т.А. Экспериментальное и клиническое изучение фитопрепаратов из расторопши пятнистой // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2008. №4. С. 3–6.
5. Baner N., Leljak-Levanic D., Jelaska S. // *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschun.* 2004. № 59. P. 554–560.
6. Tambiev A.H., Kirikova N.N. The prospects of use of EHF radiation in photobiotechnology // *Biological aspects of low intensity millimeter waves.* By N.D. Deviatkov and O.V. Betskii (Eds). M.: Sevenplus. 1994. P. 125–163.
7. Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н. Васильев В.Г. Действие КВЧ-облучения на аксеничные эксплантаты и фототрофные клеточные суспензии морских макрофитных водорослей // *Материалы Междунар. конф. «Автотрофные микроорганизмы».* М.: МАКС пресс. 2000. С. 180–181.
8. Тамбиев А.Х. Влияние электромагнитных волн миллиметрового диапазона низкой интенсивности на фотосинтезирующие организмы: развитие направления (обзор) // *Биомедицинская радиоэлектроника.* 2014. № 6. С. 4–18.
9. Федосеева Г.М., Минович В.М., Горячкина Е.Г., Переломова М.В. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды. Иркутск. 2009. 67 с.
10. Ширяков А.А., Марченко С.И. Государственная фармакопея Республики Беларусь. М. 2007. № 3. С. 712–713.

Поступила после доработки 30 марта 2017 г.

## IN VITRO CULTURE *SILYBUM MARIANUM* (L.) AS A POTENTIAL SOURCE OF TARGET BAS

© Authors, 2017

**O.V. Kovzunova**

Research Scientist, Central Botanical Gardens NAS of Belarus (Minsk)

E-mail: olga-kopa@mail.ru

**N.V. Pushkina**

Research Scientist, Research Institute for Nuclear Problems of Belarusian State University (Minsk)

**S.G. Azizbekian**

Senior Research Scientist, Institute of Physical Organic Chemistry NAS of Belarus (Minsk)

The development of effective ways to obtain the most raw materials by the method of culture of cells and tissues and the creation of new technologies plant-based preparation is a topical scientific and practical problem whose solution will make an important contribution to the development of pharmaceutical technology and increase the output of essential health medicines was revealed. In this regard, the purpose of our study was to investigate changes of metabolism in *in vitro* cultures of *S. marianum* obtained from plants of the two races, the effects of modifiers of different nature, based on a content analysis of target biologically active substances on the basis of which a number of pharmacological preparation was developed.

It was used for the analysis of callus and suspension culture 4<sup>th</sup> and 27<sup>th</sup> passage, cultured on MS (2 mg/l 6-Benzylaminopurine and 1 mg/l 1-naphthylacetic acid). Processing pre-sowing microwave treatment (a physical modifier PSMT) was carried out in the millimeter wavelength range with a capacity of 10 mW and treatment time of 20 minutes. The preparation of nanoparticles of metals «Nanoplant – Co, Mn, Cu, Fe» (chemical modifier) — a concentration of 0.01 mg/L. Extraction of flavonolignans was carried out by the standard method.

The analysis of the total content of flavonolignans in callus and suspension culture of *S. marianum* showed that PSMT and complex preparation of nanoparticles of metals has a positive stimulating effect on the biosynthesis of target biologically active substances and flavolignans content increases from 19 to 172%, relative to control. Long cultivated suspension cultures are more responsive to PSMT, and callus culture are more responsive to preparation of nanoparticles of metals. Selected treatment mode and the concentration of metal nanoparticles (0.01 mg/l) can be used to increase the biosynthesis of target compounds in *in vitro* cultures of *S. marianum*.

**Key words:** *in vitro*, suspension culture, callus cultures, flavolignany, biologically active substances.

### REFERENCES

1. Rao R.S. Plant tissue cultures; chemical factories of secondary metabolites // *Biotechnol. Adv.* 2002. № 20. P. 101–153.
2. Karuppusamy S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures // *Journal of Medicinal Plants Research.* 2009. V. 3. № 13. P. 1222–1239.
3. Wellington K. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders // *BioDrugs.* 2001. V. 15. № 7. P. 465–489.
4. Krepkova L.V., Shkarenkov A.A., Sokol'skaja T.A. Jeksperimental'noe i klinicheskoe izuchenie fitopreparatov iz rastropshi pjatnistoj // *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii.* 2008. №4. S. 3–6.
5. Baner N., Lejjak-Levanic D., Jelaska S. // *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschun.* 2004. № 59. P. 554–560.
6. Tambiev A.H., Kirikova N.N. The prospects of use of EHF radiation in photobiotechnology // *Biological aspects of low intensity millimeter waves.* By N.D. Deviatkov and O.V. Betskii (Eds). M.: Sevenplus. 1994. P. 125–163.
7. Tambiev A.H., Kirikova N.N. Vasil'ev V.G. Dejstvie KVCh-obluchenija na aksenichnye jeksplantaty i fototrofnye kletochnye suspenzii morskij makrofitnyh vodoroslej // *Materialy Mezhdunar. konf. «Avtotrofnye mikroorganizmy».* M.: MAKs press. 2000. S. 180–181.
8. Tambiev A.H. Vlijanie jelektromagnitnyh voln millimetrovogo diapazona nizkoj intensivnosti na fotosintezirujushhie organizmy: razvitie napravlenija (obzor) // *Biomedicinskaja radiojelektronika.* 2014. № 6. S. 4–18.
9. Fedoseeva G.M., Mirovich V.M, Gorjachkina E.G., Perelomova M.V. Fitohimicheskij analiz rastitel'nogo syr'ja, sodержashhego flavonoidy. Irkutsk. 2009. 67 s.
10. Shirjakov A.A., Marchenko S.I. Gosudarstvennaja farmakopeja Respubliki Belarus'. M. 2007. № 3. S. 712–713.