

УДК 582.675.1.086.83

## КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ ПЛЮЩА ОБЫКНОВЕННОГО (*Hedera HELIX L.*) КАК ИСТОЧНИК ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Фазылов А. Р., Бугара А. М., Юркова И. Н., Горденко С. Л.

Растения являются ценным источником вторичных метаболитов, которые привлекают большое внимание химиков, энзимологов, биотехнологов, фармакологов. Промышленность заинтересована в синтезе и производстве широкого круга экономически важных продуктов, таких как алколоиды, стиролы, гликозиды, красители, эфирные масла [1].

Представители рода плющ широко применяются в народной медицине как слабительное, глистогонное, противохордачное средства. Плющ в своем составе содержит различные группы веществ: тритерпеновые гликозиды - хедерасапонин С и В, альфа-хедерин, стигмастерол, ситостерин, альфа-спинастирол, скополин, хлорогеновую и кофейную кислоты, бета-элемен, эликсин, лалкаринол, лалкаринон, флавоноиды, фолькаринол, фолькаринон, 11-дигидрофолькаринол [2, 3]. Исследования биохимической активности тритерпеновых гликозидов плюща показали, что они обладают противогрибковыми и моллюскоцидными свойствами [4, 5]. Наряду с этим сапонины плюща проявляют выраженное антипротозойное действие [6]. Показано, что гликозиды плюща обладают цитотоксическим действием по отношению к культивируемым клеткам меланомы В-16 [7].

В настоящее время одним из перспективных сырьевых источников является культура клеток высших растений. Клеточные культуры сохраняют ряд свойств, характерных для исходного организма, и одним из таких свойств является способность к синтезу вторичных метаболитов [8]. Литературные данные о получении клеточных культур плюща, содержащих тритерпеновые гликозиды нам не известны.

Целью настоящей работы являлось изучение возможности получения каллусных культур плюща обыкновенного, содержащих тритерпеновые гликозиды.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили каллусные культуры плюща обыкновенного *Hedera helix L.*, индуцированные из зародышей. При выполнении работы использовали методы, общепринятые в исследованиях по культуре изолированных тканей растений [9]. Для получения асептических культур плоды обрабатывали в течение 15 минут 50 %-ным раствором препарата «Брадофен», а затем трижды промывали автоклавированной дистиллированной водой. В стерильных условиях ламинарного бокса экспланты помещали на поверхность

различных вариантов агаризованной питательной среды Мурасиге-Скуга (МС), дополненной 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксисукусная кислота) и БАП (6-бензиламинопурин).

В качестве культуральных сосудов использовали пробирки 2 x 20 см, содержащие 10 мл питательной среды. На каждый вариант питательной среды было высажено по 20 эксплантов в трёхкратной повторности. Культивирование проводили в темноте в условиях термостатированного помещения при температуре 22-24° С и относительной влажности воздуха 60-70 %.

Пассирование каллуса осуществляли каждые 45-50 дней, масса транспланта составляла около 100 мг. Прирост сырой биомассы определяли в % от объёма исходной биомассы в конце цикла выращивания.

Химический анализ содержания тритерпеновых гликозидов проводили на каллусных культурах третьего пассажа, индуцированных из зародышей семян. Культуры, находящиеся в стационарной фазе роста, высушивали при комнатной температуре, а затем измельчали в ступке с изопропанолом. Смесь нагревали на водяной бане до температуры кипения изопропанола. Для определения наличия тритерпеновых гликозидов на хроматографические пластинки «Sorbfil» наносили по 0,2 мл смеси в потоке тёплого воздуха. Разделение гликозидов на фракции проводили в системе растворителей хлороформ : метанол : 25% аммиак = 100 : 40 : 5. Пластины высушивали, проявляли в растворе фосфорновольфрамовой кислоты в 100% этаноле, а затем повторно высушивали при 100-105°С в течение 3-5 минут. В качестве контроля использовали водно-спиртовой экстракт из семян плюща крымского.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что прирост биомассы каллусных культур зависел от концентрации фитогормонов в питательной среде (табл.).

Таблица.

Влияние фитогормонов в питательной среде на прирост биомассы пассируемого каллуса плюща обыкновенного

Концентрации фитогормонов в питательной среде, мг/л		Прирост биомассы, %
БАП	2,4 -Д	
-	-	300±20
0,2	0,1	400±22
0,15	1,5	50±5
0,5	4,0	20±3

Результаты одномерного хроматографирования экстракта семян хорошо согласуются с литературными данными, анализ которых показывает, что в семенах

## КАЛЛУСНЫЕ КУЛЬТУРЫ ПЛЮЩА ОБЫКНОВЕННОГО (*HEDERA HELIX L.*)

плюща содержатся следующие тритерпеновые гликозиды: 3-о-β-Д-глюкопиранозил-(1→2)-о-β-Д-глюкопиранозид хедерагенина, 3-о-β-Д-глюкопиранозил-28-о-β-Д-глюкопиранозил-(1→6)-о-β-Д-глюкопиранозидовый эфир хедерагенина, 3-о-β-Д-глюкопиранозил-(1→2)-о-β-Д-глюкопиранозил-28-о-β-Д-глюкопиранозил-(1→6)-о-β-Д-глюкопиранозидовый эфир хедерагенина, 3-о-β-Д-глюкопиранозид хедерагенина.

Для выявления положения гликозидов на тонкослойной хроматографической пластине проводили сравнение определяемых подвижностей с подвижностями заведомо известных образцов гликозидов. Установлено, что тритерпеновые гликозиды из семян плюща располагались на тонкослойной хроматографической пластине в определенном порядке (рис.).

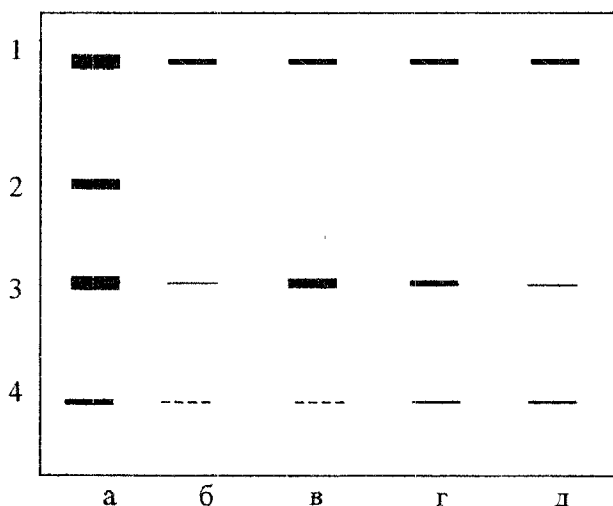


Рис. Тонкослойная хроматография гликозидов интактных семян (а) и каллусных культур *Hedera helix*, полученных на различных модификациях питательной среды МС (б-д): б - 4,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП; в - 1,5 мг/л 2,4-Д и 0,15 мг/л БАП; г - 0,1 мг/л 2,4-Д и 0,2 мг/л БАП; д - безгормональная питательная среда. 1 - 3-о-β-Д-глюкопиранозид хедерагенина; 2 - 3-о-β-Д-глюкопиранозил-(1→2)-о-β-Д-глюкопиранозид хедерагенина; 3 - 3-о-β-Д-глюкопиранозил-28-о-β-Д-глюкопиранозил-(1→6)-о-β-Д-глюкопиранозидовый эфир хедерагенина; 4 - 3-о-β-Д-глюкопиранозил-(1→2)-о-β-Д-глюкопиранозил-28-о-β-Д-глюкопиранозил-(1→6)-о-β-Д-глюкопиранозидовый эфир хедерагенина.

Каллус, выращенный на безгормональной среде, содержал следовые концентрации гликозидов фракции 3 и 4. При увеличении концентрации фитогормонов в каллусных культурах наблюдалось увеличение содержания гликозида фракции 3, кроме питательной среды с максимальным содержанием гормонов. При концентрации фитогормонов 4 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л 6-БАП соотношение гликозидов фракции 1 и 3 становилось одинаковым и по концентрации приближалось к той, что наблюдалась в каллусных культурах, выращиваемых без фитогормонов. При увеличении концентрации фитогормонов в питательной среде концентрация гликозида фракции 4 уменьшалась.

Таким образом, полученные результаты подтверждают известные литературные данные о возможности получения каллусных культур, содержащих тритерпеновые гликозиды, характерные для интактных растений [10, 11]. Наши исследования показали, что в каллусных культурах плюща обыкновенного содержатся фракции гликозидов, характерных для интактных семян. Однако концентрация выявленных в каллусных культурах фракций гликозидов зависела от уровня экзогенных фитогормонов в питательной среде. Установленный факт позволяет сделать предположение, что направленность биосинтеза тритерпеновых гликозидов в сторону тех или иных фракций детерминирована составом питательной среды.

### ВЫВОДЫ

1. Экспериментально показана возможность получения каллусных культур плюща обыкновенного, содержащих фракции тритерпеновых гликозидов.
2. Показана идентичность основных фракции тритерпеновых гликозидов интактных семян и каллусных культур.

### Список литературы

1. Dicosmo F. Plant cell culture secondary metabolism. – CRC Press, 1996. – 232 p.
2. Wichtl M., Bisset N. G. Herbal Drugs and Phutopharmaceuticals. – Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1994. – 622 p.
3. Bruneton J. Pharmacognocy, Phytochemistry. Medical plants. – Paris: Lavoisier Publishing, 1995. – 153 p.
4. Wren R. C. Potter's New Cyclopedia of Botanical Drugs and Preparations. – Essex: The C.W. Daniel Company Ltd, 1994. – 478 p.
5. Гришковец В. И. Тритерпеновые гликозиды аралиевых: выделение, установление строения, биологическая активность и хемотаксономическое значение: Автореф. дис... д-ра.х.н.: 02.00.10/ НАНУ Физико-химический ин-т им. О. В. Югатского. – Одесса, 2004 – 36 с.
6. Majoster- Savonin B. Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their leishmanicidic activity // *Planta med.* – 1992. – V.57, № 3. – P. 260-262.
7. Danloy S. Effects of alpha-hederin A saponin extracted from *Hedera helix*, on cells cultured in vitro // *Planta med.* – 1994. – V.60, № 1. – P. 45-49.
8. Филишова В.Н. Биосинтез эждистероидов в культурах клеток сердухи венценосной и живучки ползучей // *Вестник Ин-та биол.* – 2001. – № 9. – С. 8-11.
9. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полицук. – Киев: Наук. думка, 1980. – 488 с.
10. Kawamura M. Production of secondary metabolites by organ or cell culture // 15 th Int. Bot. Congr., Yokogama., Aug.28- Sept. 03. – 1993. – P. 194.
11. Shulman Alan H. Plant cell sell plants // *Trends Biotechnology.* – 1998. – №16. – С. 1-2.

*Поступила в редакцию 04.04.2006 г.*