

УДК 576.535+57.085.23

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ IN VITRO, РОСТОВЫЕ ПАРАМЕТРЫ И ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ К БИОСИНТЕЗУ ГЛИКОЗИДОВ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК *DIGITALIS PURPUREA* L.

Л.Г. ЛЕШИНА, О.В. БУЛКО

*Институт биоорганической химии и нефтехимии Национальной академии наук Украины*

*02094 Киев, ул. Мурманская, 1*

*e-mail: llioshina@bpci.kiev.ua*

Получены и охарактеризованы по ростовым параметрам каллюсная и суспензионная культуры наперстянки пурпурной *Digitalis purpurea* L. — источника сердечных гликозидов. Установлено, что оптимальными условиями для каллюсогенеза является инкубация листовых эксплантатов на среде МС с добавлением 3 мг/л 2,4-Д, в темноте, при  $26 \pm 2$  °С. Для субкультивирования подобрана комбинация гормонов ИУК — 0,1 мг/л и БАП — 0,1 мг/л. Суспензионная культура получена на среде с теми же гормонами без ионов кальция. Определены ее ростовые показатели: индекс роста, жизнеспособность, время удвоения, скорость роста клеток, которые показали, что культура хорошо адаптировалась к условиям in vitro и представляет собой активно растущую клеточную популяцию. Методом ВЭЖХ доказана способность культуры клеток синтезировать тот же спектр гликозидов, что и интактное растение.

*Ключевые слова:* *Digitalis purpurea* L., каллюсная культура, суспензионная культура, сердечные гликозиды.

Наперстянка пурпурная (*Digitalis purpurea* L.) — травянистое двулетнее растение, принадлежащее по системе классификации APG II к семейству Подорожниковые (Plantaginaceae), по системе классификации Кронквиста — к семейству Норичниковые (Scrophulariaceae). Из надземной части растения выделено более 60 гликозидов. Среди них первичные гликозиды — пурпуреагликозиды А, В и глюкогиталоксин, которые под действием фермента дигипурпидазы трансформируются во вторичные гликозиды — дигитоксин, ацетилдигитоксин, дигитонин, гитоксин и другие, большинство из которых используется в качестве лекарственных средств [10, 11]. Под воздействием наперстянки и ее препаратов усиливаются и ускоряются сокращения сердечной мышцы, повышается диурез, исчезают отеки, улучшается общее состояние организма [2, 3]. Есть сообщения об антиопухоловой активности компонентов наперстянки [12].

Целью нашей работы было получение каллюсной и суспензионной культур клеток *D. purpurea* с высокой пролиферативной активностью, оптимизация условий культивирования in vitro этих культур для получения эффективного прироста массы, оценка способности к биосинтезу гликозидов дедифференцированных клеток эксплантатов исследуемого растения.

## Методика

Поверхностное культивирование проводили на среде Мурасиге—Скуга (МС) [13] с добавлением 0,1 мг/л ИУК и 0,1 мг/л БАП, при  $26 \pm 1$  °С, влажности 80 % и 16-часовом фотопериоде.

Условия суспензионного культивирования: шейкер «Epan» (Польша), колбы на 250 мл, 100 об/мин,  $27 \pm 1$  °С, 100 мл МС без ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с добавлением 0,1 мг/л ИУК и 0,1 мг/л БАП.

Подсчет количества клеток проводили в камере Фукса—Розенталя после мацерации суспензии в 10 %-м растворе хромовой кислоты при 60 °С в течение 15 мин. Прирост культуры клеток определяли по массе сырого и сухого вещества [6]. Степень агрегации устанавливали подсчетом клеток в нескольких полях зрения на временных препаратах при малом увеличении микроскопа.

Жизнеспособность клеток определяли по соотношению к общему их количеству. Жизнеспособные клетки характеризовались наличием ядер и движением цитоплазмы при окрашивании препаратов 0,1 %-м водным раствором метиленового синего в течение 2 мин.

Гликозиды определяли методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы «Agilent» (США) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования. Разделительная колонка Rapid Resolution HT Cartige 4,6 × 30 мм, 1,8-Micron, Zorbx SB-C18, подвижная фаза — смесь ацетонитрил : метанол : вода (4 : 4 : 5), скорость движения — 3 мл/мин. Детектирование проводили при длине волны 215 нм. Подготовка пробы: по 2 г листовой или каллюсной ткани суспендировали в воде и инкубировали при 40 °С в течение 3 ч для ферментативного превращения первичных гликозидов во вторичные. Затем образцы готовили, как описано Фуджи в работе [8]. Оценивали хроматограмму по времени удерживания и площади пика в автоматическом режиме.

Результаты обработаны статистически по Лакину [4], компьютерная обработка данных проведена с помощью программы Excel стандартного пакета программ Microsoft Office XP («Microsoft», США). В таблице и на рисунках представлены среднеарифметические значения показателей и их стандартные отклонения.

## Результаты и обсуждение

Для введения в культуру *in vitro* мы использовали семена и молодые побеги *D. purpurea*, которые после стерилизации высаживали на безгормональную среду МС. Всхожесть семян составляла 80 %. Побеги имели приживаемость 100 %.

Полученные растения использовали для выделения стерильных эксплантатов и дальнейшего каллюсообразования. Каллюсообразование инициировалось из листовых эксплантатов в темноте на среде МС с добавлением 3 мг/л 2,4-Д. Попытка получить каллюс на среде с добавлением 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИУК или НУК, как предположили авторы работы [14], приводила только к ризогенезу. Первичный каллюс образовывался на 25—30-е сутки, имел бледно-желтый цвет, неорганизованную структуру и рыхлую консистенцию.

При изучении влияния физических факторов на каллюсообразование и рост культуры клеток мы установили, что при температуре инкубации ниже 21 °С и выше 29 °С рост культуры существенно замедляется. Наиболее благоприятным для роста и пролиферации является

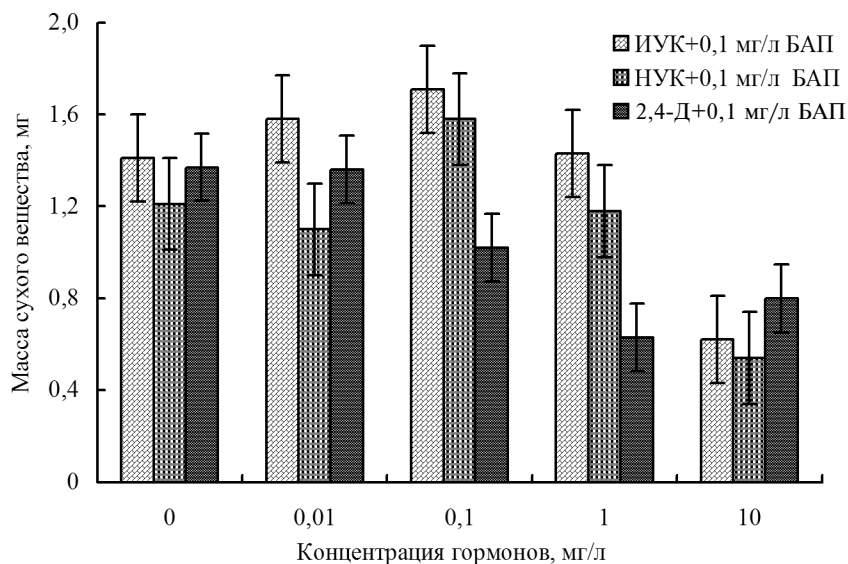


Рис. 1. Влияние фитогормонов на рост культуры клеток *D. purpurea*

температурный режим  $26 \pm 2$  °С. Освещение принципиально не изменяло скорость и интенсивность роста культур, однако известно, что под влиянием света синтез гликозидов усиливается [9], поэтому каллус инкубировали в световом блоке при 16-часовом фотопериоде.

Для эффективного субкультивирования мы исследовали влияние разных фитогормонов и их комбинаций на рост каллюсной культуры. Концентрация БАП во всех случаях составляла 0,1 мг/л (рис. 1). Оптимальным соотношением экзогенных фитогормонов оказалась комбинация ИУК 0,1 мг/л и БАП 0,1 мг/л.

Цитоморфологические характеристики каллюса изучали со 2 по 5 пассаж. Цитологическими исследованиями установлено, что ткань состояла из меристемных и паренхимных клеток, причем часть клеток каждого типа закономерно изменялась по мере субкультивирования. Меристемные клетки имели небольшие размеры (<100 мкм), округлую форму, хорошо заметное ядро. Характерным признаком клеток паренхимного типа была их существенная удлиненность.

Каллюсную культуру переносили в жидкую среду для глубинного культивирования и получения суспензионной культуры. Для этого отдельные фрагменты каллюса рыхлого типа разделяли и небольшие агрегаты помещали в жидкую среду МС с добавлением гормонов, как для субкультивирования каллюса. Модификация состава среды заключалась в отсутствии ионов кальция. Ростовую активность культуры клеток определяли, анализируя динамику накопления массы сырого и сухого вещества, изменение количества клеток в цикле выращивания и их жизнеспособность. Число клеток и прирост массы практически не отличались при субкультивировании в стандартных условиях в трех параллельных экспериментах (рис. 2).

Кривая роста по числу клеток имела лаг-период длительностью 1—2 сут, экспоненциальную фазу — 3—4 сут, потом рост замедлялся и с 15-х суток начиналась стационарная фаза, которая длилась до 19—20-х суток, после чего наступала фаза деградации. Рост культуры был достаточно сбалансированным, что выражалось в подобии графиков накопле-

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ IN VITRO

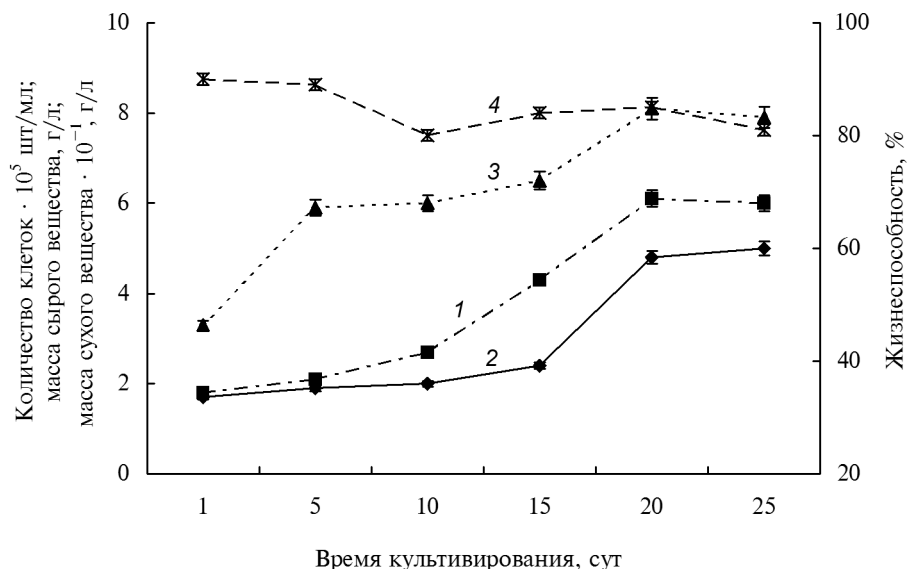


Рис. 2. Ростовые характеристики суспензионной культуры *D. purpurea*:

1 — масса сырого вещества; 2 — масса сухого вещества · 10<sup>-1</sup>; 3 — количество клеток; 4 — жизнеспособность

ния массы и числа клеток. S-образный вид кривой роста характерный для большинства суспензионных культур клеток растений и описан для ряда растений, среди которых серпуха венценосная, живучка ползучая [7], женьшень [5], гидрастис канадский [1].

Расчетом ростовых параметров суспензионной культуры наперстянки пурпурной установлено, что жизнеспособность клеток в течение всего периода культивирования в среднем держалась на уровне  $85 \pm 0,5 \%$ . Индекс роста (I) суспензионной культуры равнялся: по количеству клеток  $3,4 \pm 0,8$ ; по массе сырого вещества  $4,4 \pm 0,9$ ; по массе сухого вещества  $3,8 \pm 1,1$ . Несущественные расхождения по индексу роста между этими показателями свидетельствуют о стабильности роста полученной культуры. Наименьшее значение индекс роста имел по количеству клеток (3,4), наибольшее — по массе сырого вещества (4,4).

Еще одной количественной характеристикой роста культуры клеток была удельная скорость роста ( $\mu$ , сут<sup>-1</sup>), которая в нашем случае равнялась  $0,11$  сут<sup>-1</sup> по числу клеток,  $0,10$  — по массе сырого вещества и  $0,12$  сут<sup>-1</sup> — по массе сухого вещества. Время удвоения числа клеток в среднем составляло 3—4 сут.

Характерным показателем интенсивности деления является число клеток в агрегатах. В начале культивирования количество мелких агрегатов от 2 до 10 клеток составляло 21 %, больших (более 50 в агрегате) — 32,5 %. До конца цикла выращивания количество мелких агрегатов снижалось в 2,1 раза, число крупных — росло и представляло почти половину всех клеток (таблица).

Состав популяции по типам клеток был достаточно разнообразен. Согласно цитологическим исследованиям, в первой половине пассажа основную массу представляли клетки меристемного типа размером до 100 мкм и паренхимного типа размером 100—200 мкм. До конца субкультивирования число паренхимных клеток возросло, появилось много удлинённых клеток размером больше 200 мкм. Количество живых кле-

## Динамика изменения количества клеток в агрегатах

Время роста, сут	Количество клеток в агрегате, шт.			
	2—10	10—20	20—50	>50
	Доля агрегатов в популяции клеток, %			
1	21,0 ± 1,3	22,3 ± 0,5	22,7 ± 0,6	32,5 ± 1,5
5	15,1 ± 0,2	21,0 ± 0,3	28,7 ± 0,5	37,2 ± 0,6
10	15,0 ± 0,2	19,8 ± 0,1	25,1 ± 0,2	42,7 ± 0,3
15	12,4 ± 0,3	19,7 ± 0,1	24,0 ± 0,4	43,9 ± 0,6
20	10,1 ± 0,7	17,1 ± 0,0	27,4 ± 0,2	44,2 ± 0,4
25	9,9 ± 0,7	16,5 ± 0,5	28,5 ± 0,4	44,1 ± 0,6

ток в течение всего периода культивирования находилось на высоком уровне.

Суммарный состав сердечных гликозидов наперстянки исследовали методом ВЭЖХ. Обнаружено некоторое различие спектров вторичных метаболитов ткани интактного растения и культуры недифференцированных клеток (рис. 3). Пики, идентифицированные нами как соответствующие гитоксину, гиталоксину, дигацетинину, дигитоксину, в культуре клеток имели меньшую интенсивность, сигнал соответствующий дигинину — практически не детектировался. В то же время сигнал, соответствующий дезацетилдигацетигенину, в каллюсной культуре обнаруживался в большем количестве, чем в интактном растении.

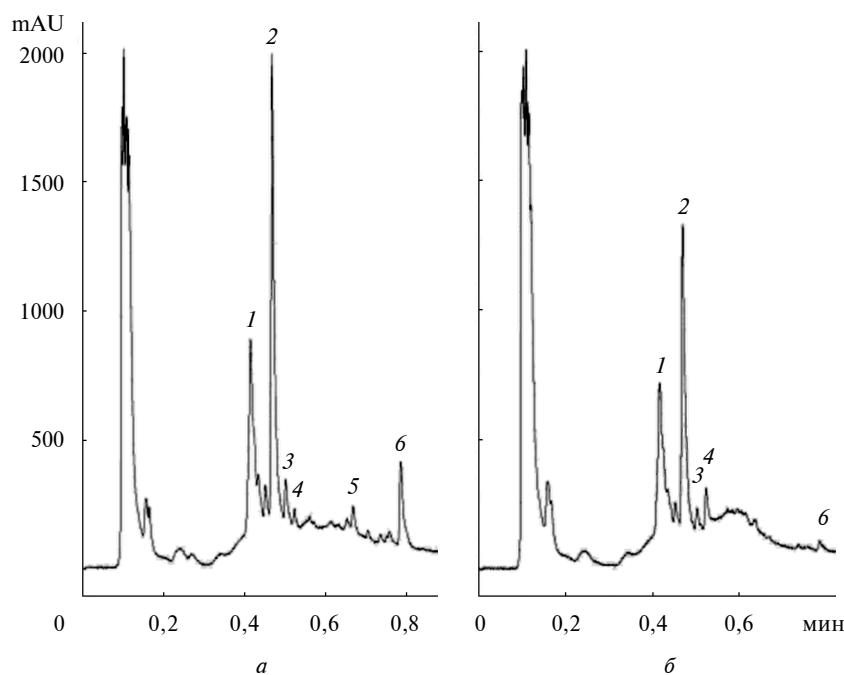


Рис. 3. Разделение гликозидов *D. purpurea* методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (по оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — единицы оптической плотности, mAU (milli-absorbance unit)):

*а* — экстракт из листьев; *б* — экстракт из культуры клеток; 1 — гитоксин; 2 — гиталоксин; 3 — дигацетинин; 4 — дезацетилдигацетигенин; 5 — дигинин; 6 — дигитоксин

Анализом данных, полученных в трех независимых субкультивированиях суспензии клеток *D. purpurea*, доказана достаточная стабильность ростовых и цитоморфологических показателей культуры клеток. Средние ростовые характеристики подтвердили, что культура клеток в суспензии хорошо адаптировалась к условиям *in vitro* и представляет собой клеточную популяцию, которая активно растет.

В результате выполненной работы установлен температурный режим для стабильной пролиферации культуры клеток наперстянки —  $26 \pm 2$  °С. Оптимальный состав среды для каллюсообразования — МС + 3 мг/л 2,4-Д, для роста каллюсной культуры — МС с добавлением 0,1 мг/л НУК и 0,1 мг/л БАП, для суспензионной культуры — та же среда с теми же гормонами, но без ионов кальция.

Согласно результатам хроматографического исследования, спектры экстрактов интактного растения и каллюсной культуры имеют разные ВЭЖХ-профили, однако подтверждена способность культуры клеток синтезировать те же вторичные метаболиты, что и интактное растение.

Таким образом, полученная нами культура клеток *D. purpurea* характеризуется стабильными показателями, которые делают ее удобной модельной системой для изучения физиологических, биохимических и цитогенетических особенностей клеточных популяций этого растения в условиях *in vitro*, а также с целью дальнейшего исследования биосинтеза гликозидов в культуре клеток биотехнологического использования.

1. Александрова И.В., Аверьянова В.А., Чернышев Р.В., Быков В.А. Каллюсная и суспензионная культура *Hidrastris canadensis* L.: ростовые, цитогенетические особенности и первичная оценка биосинтетического потенциала // Биотехнология. — 2004. — № 1. — С. 39—46.
2. Гаммерман А.Ф., Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А. Лекарственные растения. — М.: Высш. шк., 1983. — 400 с.
3. Коваленко В.Н. О биологической активности некоторых видов наперстянки // Фармакология и токсикология. — 1954. — 3. — С. 18—22.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
5. Смоленская Н.И., Зориянц С.Э., Смирнова Ю.Н. и др. Суспензионная культура клеток *Rapax japonicus* var. *repens*. I. Параметры роста и цитогенетические характеристики // Биотехнология. — 2005. — № 5. — С. 21—28.
6. Титова М.В., Шумило Н.А., Куличенко И.Е. и др. Длительное аппаратное выращивание суспензионной культуры *Dioscorea deltoidea* Wall в полупроточном режиме // Там же. — 2006. — № 2. — С. 28—31.
7. Филиппова В.Н., Володина С.О., Смоленская И.Н. и др. Экдистероиды в культурах клеток *Serratula coronata* и *Ajuga reptans* // Химия растительного сырья. — 2002. — № 1. — С. 57—62.
8. Fujii Y., Ikeda Y., Yamazaki M. High-performance liquid chromatographic determination of secondary cardiac glycosides in *Digitalis purpurea* leaves // J. Chromatogr. A. — 1989. — 479. — P. 319—325.
9. Hagimori M., Matsumoto T., Obi Y. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture: II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media // Plant Physiol. — 1982. — 69. — P. 653—656.
10. Ikeda Y., Fujii Y., Nakaya I., Yamazaki M. Quantitative HPLC analysis of cardiac glycosides in *Digitalis purpurea* leaves // J. Nat. Prod. — 1995. — 58, N 6. — P. 897—901.
11. Kreis W., Hensel A., Stuhlemmer U. Cardenolide biosynthesis in foxglove // Planta Med. — 1998. — 64. — P. 491—499.
12. Lopez-Lazaro M., Pastor N., Azrak S.S. et al. Digitoxin inhibits the growth of cancer cell lines at concentrations commonly found in cardiac patients // J. Nat. Prod. — 2005. — 68, N 11. — P. 1642—1645.
13. Murashige I., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. plant. — 1962. — 15, N 3. — P. 473—497.

14. Palazyn J.M., Bonfill R., Cusidy M. et al. Effects of auxin and phenobarbital on morphogenesis and production of digitoxin in *Digitalis callus* // Plant Cell Physiol. — 1995. — 36, N 2. — P. 247–252.

Получено 30.08.2010

КУЛЬТИВУВАННЯ IN VITRO, РОСТОВІ ПАРАМЕТРИ ТА ОЦІНЮВАННЯ  
ЗДАТНОСТІ ДО БІОСИНТЕЗУ ГЛІКОЗИДІВ КУЛЬТУРИ КЛІТИН  
*DIGITALIS PURPUREA* L.

Л.Г. Льошина, О.В. Булко

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії Національної академії наук України, Київ

Отримано і схарактеризовано за ростовими параметрами калюсну й суспензійну культури наперстянки пурпурової *Digitalis purpurea* L. — джерела серцевих глікозидів. Установлено, що оптимальними умовами для калюсогенезу є інкубація листкових експлантатів на середовищі МС із додаванням 3 мг/л 2,4-Д, у темряві, за  $26 \pm 2$  °С. Для субкультивування підбрано комбінацію гормонів ІОК — 0,1 мг/л і БАП — 0,1 мг/л. Суспензійну культуру отримано на середовищі з тими ж гормонами без іонів кальцію. Визначено її ростові показники: індекс росту, життєздатність, час подвоєння, швидкість росту клітин, які показали, що культура добре адаптувалась до умов in vitro і є клітинною популяцією, що активно росте. Методом ВЕРХ доведено здатність культури клітин синтезувати той самий спектр глікозидів, що й інтактна рослина.

*DIGITALIS PURPUREA* L. CELLS CULTURE: CULTIVATION IN VITRO, GROWTH  
PARAMETERS AND DETERMINATION OF GLYCOSIDES BIOSYNTHETIC ABILITY

L.G. Liozhina, O.V. Bulko

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine  
1 Murmanska St., Kyiv, 02094, Ukraine

The *Digitalis purpurea* L. callus and suspension culture, a source of cardiac glycosides, have been received and characterized by the growth parameters. An optimal conditions for callus induction are the incubation of leaf explants on MS medium with 3 mg/l 2,4 D, in the dark at  $26 \pm 2$  °C. For subculturing combination of hormones IAA 0.1 mg/l and BAP 0.1 mg/l was selected. Suspension culture was obtained in the same medium with calcium ions free. The indices of growing cultures — growth index, viability, cells doubling time and growth rate showed that the cell culture well adapted to conditions in vitro and actively grown. The ability of culture cells to cardiac glycosides synthesis, as well as intact plant, showed by HPLC.

*Key words:* *Digitalis purpurea* L., callus culture, suspension culture, cardiac glycosides.