

На правах рукописи



**Некрасова
Дарья Алексеевна**

**«ПОЛУЧЕНИЕ И ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАЛЛУСНЫХ
КУЛЬТУР АРАЛИИ СЕРДЦЕВИДНОЙ (*ARALIA CORDATA THUNB.*) КАК
ПЕРСПЕКТИВНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ»**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Санкт-Петербург

2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Повыдыш Мария Николаевна доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Моисеев Дмитрий Владимирович доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры фармации и клинической фармакологии

Гудкова Алевтина Алексеевна доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, доцент кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «19» декабря 2024 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, вн.тер.г. муниципальный округ Аптекарский остров, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте организации (<http://dissovet.spcpu.ru>).

Автореферат разослан «____» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 21.2.063.01,
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Растительные организмы обладают уникальной способностью к биосинтезу вторичных метаболитов – различных по природе органических соединений, обеспечивающих взаимодействие растений с окружающей средой и обладающих разнообразной биологической активностью (Ravi, Nitish, 2023).

Среди всех вторичных метаболитов лекарственных растений, наиболее высокое разнообразие фармакологических эффектов проявляют терпеноиды. Данная группа также не имеет аналогов по разнообразию структурных типов молекул. Она насчитывает более 23 тысяч веществ с установленным химическим строением, превосходит по числу представителей все другие классы природных соединений. Терпеноиды образуются во всех частях растений (Li et al., 2023).

Одной из причин интереса к терпеноидам, как к биологически активным веществам, являются адаптогенные (Ratan et al., 2021, Panossian, 2017), цитотоксические (Liu et al., 2020), противодиабетические (Bnouham, 2006), противовоспалительные (Merecz-Sadowska, 2020) и др. (Гришковец, 2007; Sierocinski et al., 2021, Sulborska, 2021) свойства препаратов на основе растений семейства *Araliaceae* - женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* С. А. Mey), элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus* (Maxim. & Rupr.) Maxim.), заманихи высокой (*Oplopanax elatus* Nakai), аралии маньчжурской (*Aralia mandshurica* Rupr. & Maxim.) и плюща обыкновенного (*Hedera helix* L.), действующим началом которых являются тритерпеноиды (Davydov, Krikorian, 2000; Seema, Abdur, 2017).

На территории России произрастает 10 дикорастущих видов аралиевых (6 родов), одним из наиболее известных видов является аралия сердцевидная (*Aralia cordata* Thunb.). *Aralia cordata* - многолетнее травянистое растение, имеющее восточно-азиатский островной тип ареала. В настоящее время растение внесено в Красную книгу России (Shustov et al., 2021).

Особый охранный статус аралии сердцевидной объясняется сложностью возобновления естественных популяций, связанных с наличием периода морфофизиологического покоя и природной недоразвитостью зародыша.

Трудоемкость культивирования, ограниченность природного ареала и большое практическое значение вторичных метаболитов аралии сердцевидной ставит вопрос о целесообразности введения данного вида в культуру *in vitro* (Некрасова, Повыдыш, 2022).

Грамотный подход к культурам растительных клеток и тканей может позволить вести работы по получению биологически активных веществ (БАВ) в течение всего года и вне зависимости от условий среды, а контроль над условиями культивирования позволит увеличить их выход (Носов, 1994).

Перечисленные преимущества клеточных технологий открывают большие перспективы для фармацевтической промышленности. Использование культур клеток и тканей растений может решить проблемы ограниченности запасов лекарственного сырья, невозможности выращивания многих видов растений традиционными методами (Erst et al., 2015).

Степень разработанности темы исследования

Клеточные технологии делают возможным выращивание изолированных органов, тканей и клеток растений в условиях *in vitro*. В настоящее время указанные технологии широко используются в декоративном растениеводстве и овощеводстве, что позволяет облегчить селекционный процесс и получить растения с заданными характеристиками в короткие сроки (Роговая, Гвоздев, 2005; Носов, 2010). Применимость описанных технологий в области лекарственного растениеводства остается открытым вопросом и требует отдельного изучения, связанного с особенностями накопления целевых групп вторичных метаболитов в культуре (Решетников и др., 2014).

Ранее предполагалось, что накопление фармацевтически ценных вторичных метаболитов в культурах изолированных клеток и тканей растений носит исключительный характер, что было связано с сосредоточенностью исследователей на поисках конкретных фармакологически активных соединений, синтез которых в данных биологических системах может быть затруднен (Носов, 2008, Nosov et al., 2014).

Расширение спектра детальных фитохимических исследований позволило определить, что синтез вторичных метаболитов культурами клеток осуществляется, однако имеет свои характерные особенности, связанные с непрерывной пролиферативной активностью, а также дедифференцированным состоянием клеток (Томилова и др., 2022).

Ранние опыты по введению аралии сердцевидной в культуру *in vitro* были связаны с изучением ее биосинтетической активности в отношении антоцианов (Kobayashi et al., 1993). Были разработаны стратегии получения суспензий-продуцентов, изучены факторы, влияющие на процесс накопления данной группы биологически активных веществ (Murthy et al., 2023), тогда как наличие тритерпеновых гликозидов в культурах описано не было.

Цели и задачи работы

Целью работы является изучение каллусной культуры аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.) как потенциального источника растительного сырья.

Задачи исследования:

1. Введение аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb) в культуру, подбор и оптимизация условий для длительного поддержания полученных культур;
2. Анализ ростовых и биосинтетических (накопление терпеноидов) характеристик культур *Aralia cordata* в динамике культивирования на средах с различными добавками;
3. Оценка качественного и количественного состава биологически активных веществ, накапливаемых культурами клеток *Aralia cordata*, в сравнении с интактными растениями;
4. Изучение экспрессии гена β -амиринсинтазы в культурах аралии сердцевидной в сравнении с интактным растением;
5. Установление биологической активности экстрактов из культур клеток на моделях *in vivo*.

Научная новизна работы

Впервые получена стабильная каллусная культура из листьев интактного растения *Aralia cordata* на среде Мурасиге-Скуга с добавлением 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина, подобраны условия для ее стабильного роста.

Изучено влияние липофильных добавок и кокосовой воды на микроскопические, макроскопические признаки, ростовые характеристики и жизнеспособность культуры.

С использованием современных физико-химических методов анализа установлено, что полученные культуры являются продуцентами тритерпеновых гликозидов. Методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии и ВЭЖХ впервые подтверждено наличие аралозидов А во всех полученных культурах.

Определено количественное содержание тритерпеновых гликозидов в культурах в сравнении с листьями интактного растения аралии сердцевидной и корнями аралии маньчжурской. Показано, что культуры накапливают количество тритерпеновых гликозидов, сравнимое с корнями аралии маньчжурской и листьями аралии сердцевидной.

Впервые проведена оценка количественного содержания аралозидов А в культурах методом ВЭЖХ-УФ. Показано, что в процессе культивирования количество аралозидов А

постепенно снижается по отношению к нарастающей биомассе. Наиболее чувствительными к колебаниям количества аралозида А оказались культуры на средах с липофильными добавками, что объясняется постепенным образованием на поверхности клеток тонкой пленки масла, которая ведет к уменьшению количества субстрата для синтеза тритерпеновых гликозидов и оказывает негативное влияние на жизнедеятельность клеток.

Качественный анализ методом ВЭЖХ-МС показал наличие в культурах тритерпеновых гликозидов и подтвердил схожесть химического состава каллусных культур с листьями аралии сердцевидной.

Анализ экспрессии гена β -амиринсинтазы в каллусных культурах методом ПЦР в реальном времени показал, что уровень экспрессии гена прямо пропорционален накоплению аралозида А, однако низкий уровень экспрессии данного гена в культурах по сравнению с листьями позволяет предположить наличие иных молекулярных механизмов биосинтеза тритерпеновых гликозидов в культурах растительных тканей.

Определение биологической активности экстракта из каллусной культуры аралии сердцевидной показало, что биологически активные вещества, входящие в состав культуры, обладают низким уровнем токсичности и увеличивают работоспособность животных при интенсивных физических нагрузках.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты проделанной работы позволяют рассматривать полученную культуру аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.) в качестве потенциальной пищевой и фармацевтически ценной субстанции.

В ходе работы установлено, что культуры являются продуцентами тритерпеновых гликозидов, а изменение условий культивирования позволяет влиять на морфологические признаки культуры, а также модифицировать скорость накопления вторичных метаболитов, их качественный и количественный состав, что подкреплено результатами фитохимического анализа с использованием современных физико-химических методов. В частности установлено, что в начале цикла культивирования наибольшую продуктивность в отношении вторичных метаболитов показывают культуры на средах с липофильными добавками. Все используемые в ходе анализа подходы демонстрируют, что качественный и количественный состав культур приближен к составу листьев интактного растения аралии сердцевидной и накапливают большее количество биологически активных веществ, чем корень аралии маньчжурской.

С использованием методов ВЭТСХ и ВЭЖХ-УФ подтверждено наличие в культурах аралозидов А – мажорного соединения фармакопейного сырья - аралии маньчжурской. Таким образом, аралозид А может использоваться для стандартизации и являться маркером доброкачественности культур как лекарственного растительного сырья.

Результаты, полученные в ходе работы, использованы для составления паспорта каллусной культуры *Aralia cordata* Thunb., в котором отражены все основные морфологические, ростовые и биосинтетические характеристики.

Выявленная актопротекторная активность позволяет рассматривать полученные культуры в качестве сырья для получения фитопрепаратов для повышения физической работоспособности.

Результаты диссертационного исследования использованы в научно-исследовательской деятельности кафедры фармакогнозии и лаборатории культур растительных клеток федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (акт внедрения от 22.05.2024 г.).

Методология и методы исследования

Исследование проводили в период с 2021 по 2024 год с использованием актуальных биотехнологических, фитохимических и молекулярно-генетических методов и современного научного оборудования. Фитохимический анализ проводили с использованием ряда хроматографических методов: ВЭЖХ-МС высокого разрешения, ВЭЖХ-УФ и ВЭТСХ. Теоретическую основу исследования составили труды отечественных и зарубежных исследователей по получению культур растительных клеток и фитохимическому анализу вторичных метаболитов *A. cordata* и *A. mandshurica*.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты получения и оптимизации условий культивирования каллусной культуры аралии сердцевидной;
2. Результаты изучения морфологических особенностей и ростовых характеристик полученных каллусных культур в зависимости от состава питательной среды;
3. Результаты фитохимического анализа каллусных культур методами ВЭЖХ-МС, ВЭЖХ-УФ и ВЭТСХ;
4. Результаты сравнительного исследования активности гена β -амиринсинтазы в листьях аралии сердцевидной и каллусных культурах;

5. Результаты определения биологической активности экстракта из каллусных культур на моделях *in vivo*.

Степень достоверности и апробации результатов исследования

Основные результаты, полученные в рамках исследования, были представлены на V (XIII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2022 год), научно-практической конференции «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье XXV Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей» (Санкт-Петербург, 2022), международной конференции PLAMIC 2022 (Санкт-Петербург, 2022), XXVI Международном Конгрессе PHYTOPHARM 2023 (Санкт-Петербург, 2023), Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2021, 2022, 2023), Научно-методической конференции с международным участием «Сандеровские чтения» (2022, 2023).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций, среди которых 1 статья в издании, включенном в международную наукометрическую базу данных Scopus.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в рамках инициативной тематики НИР «Создание промышленно-значимых штаммов культур клеток лекарственных растений и оценка их биосинтетического потенциала», (регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР- 122120700021-2 от 07.12.2022)

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 5 - Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье и пункту 6 - Изучение химического состава лекарственного растительного

сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов

Автор лично участвовал в формулировке цели исследования и постановке задач, сборе и анализе литературных данных, планировании экспериментальной работы, постановке экспериментов, обработке и интерпретации полученных результатов. Автор лично осуществлял написание тезисов и статей по тематике исследования. Личный вклад автора составил не менее 90%.

Объем и структура работы. Работа изложена на 135 страницах компьютерного набора, включает введение, список сокращений, обзор литературных данных, главу «Материалы и методы» и «Результаты и обсуждение», заключение, список литературы, состоящий из 138 источников (из них 113 на иностранных языках). Материалы исследования проиллюстрированы 15 рисунками и 43 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы изложена информация о ботанической характеристике объекта исследования – аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.), данные о его химическом составе, биологической активности вторичных метаболитов и особом охранном статусе вида. Описаны эксперименты с введением представителей рода *Aralia* в культуру *in vitro*. На основании результатов изучения и критической оценки литературных данных был сделан вывод об актуальности получения культуры ткани аралии сердцевидной, изучении состава и особенностей биосинтеза тритерпеновых гликозидов, накапливаемых культурами, а также оценка биологической активности активных компонентов из полученных культур на моделях *in vivo*.

Глава 2. Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали:

1. Части листа интактного растения аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.), культивируемого на территории Ботанического института имени В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН) для изучения процесса каллусообразования и

подбора условий для увеличения биомассы каллуса. Сбор листьев осуществляли в июне 2022 года;

2. Каллусную культуру аралии сердцевидной, полученную из листьев интактного растения, для последующего изучения ростовых характеристик и особенностей накопления вторичных метаболитов. Культура была получена в июле 2022 года в Лаборатории культур растительных клеток Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета;

Для получения каллусной культуры аралии сердцевидной в качестве первичного экспланта использовали листья *Aralia cordata*. Эксплант стерилизовали, помещали на питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением 0,5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 0,5 мг/л кинетина. Для долговременного поддержания культуры была выбрана среда Линсмайера-Скуга (Linsmaier, Skoog, 1965), которая в дальнейшем была модифицирована с использованием липофильных компонентов-рекордсменов по содержанию сквалена, предшественника β -амирина (табл. 1) и регулятора роста - кокосовой воды, влияние которой на химический состав каллусов ранее не изучалось (Al-Khayri, 1992).

Таблица 1. Модификация питательных сред.

Питательная среда	Используемая добавка	Концентрация
ЛС + 0,25 мг/л кинетин + 1 мг/л 2,4-Д	Сквалан	1 г/л
	Амарантовое масло	1 г/л
	Оливковое масло	1 г/л
	Кокосовая вода	60 мл/л

Микроскопические особенности культур изучали с использованием микроскопа Bresser LCD 50x-2000x (Германия), ростовые характеристики исследовали по приросту сырой биомассы, используя язык программирования R (R Core Team, 2021) и пакет Growthcurver (Sprouffske, Wagner, 2016).

Для изучения фитохимического состава полученных культур в сравнении с интактными растениями использовали физико-химические методы анализа – ВЭТСХ (САМАГ НТРС System, Швеция), фотоэлектроколориметрию (СФ-2000, Россия), ВЭЖХ-УФ (Shimadzu Prominence, Япония) и ВЭЖХ-МС (Waters® ACQUITY UPLC® I-Class System, Германия). Для анализа использовали суммарные этанольные и метанольные экстракты из каллусов, листьев аралии сердцевидной и корней аралии маньчжурской.

Изучение экспрессии гена β -амиринсинтазы проводили по схеме, указанной на рисунке 1.



Рисунок 1. Схема выделения и анализа нуклеиновых кислот

Для исследования биологической активности компонентов сырья на моделях *in vivo*, из культур получали сухой экстракт, который затем растворяли в изотоническом натрия хлориде и вводили мышам внутривентрально.

Эксперимент состоял из двух этапов: определения ЛД₅₀ и исследования работоспособности мышей по методике «Вынужденное плавание с грузом».

Экстракт вводили в течение двух недель с соблюдением условий тренировочного режима и затем определяли его влияние на физическую активность животных, используя в качестве растительного препарата сравнения сухой экстракт левзеи сафлоровидной.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Была получена стабильная каллусная культура аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.), для которой оптимальной средой для культивирования является среда Линсмайера-Скуга с концентрацией сахарозы 20 г/л и добавлением 1 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л кинетина.

Результаты демонстрируют, что липофильные компоненты оказывают влияние на структуру каллусной культуры, макроскопические, микроскопические признаки, жизнеспособность и ростовые характеристики. Данные показывают, что наибольший прирост биомассы обеспечивает культура на среде с добавлением кокосовой воды.

Предварительный фитохимический анализ показал, что культуры накапливают тритерпеновые гликозиды, углеводы, флавоноиды и дубильные вещества.

Качественный анализ методом ВЭТСХ позволил обнаружить порядка 27 соединений, 13 из которых имели красную, розовую или коричневую окраску после проявления 10% серной кислотой и предварительно были отнесены нами к тритерпеновым гликозидам (рис. 2)

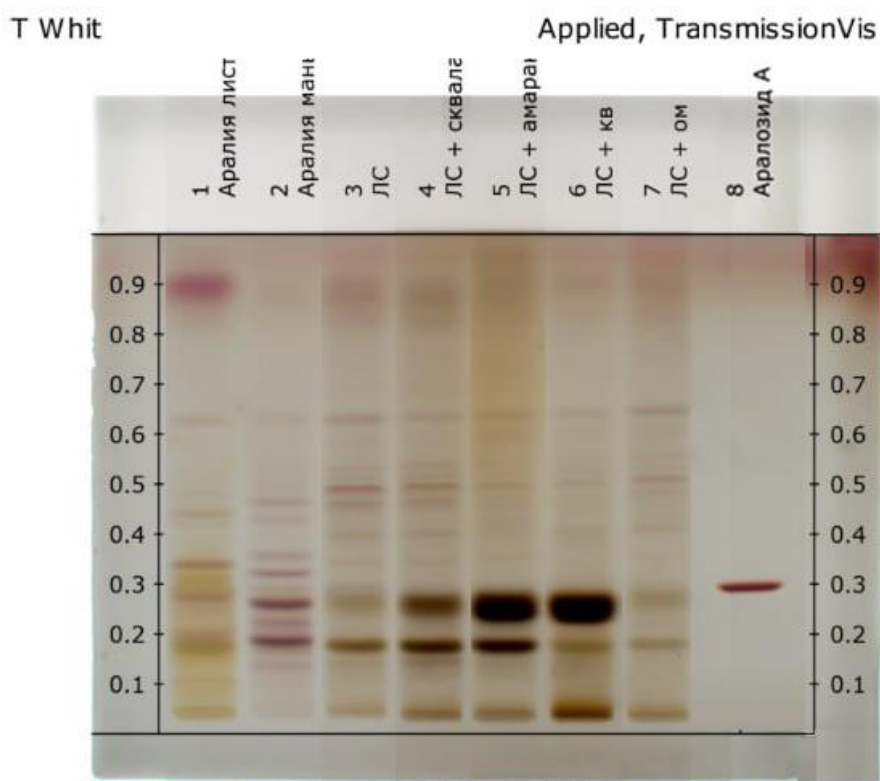


Рисунок 2. Хроматограмма извлечений из каллусных культур аралии сердцевидной и интактных растений

Примечание:

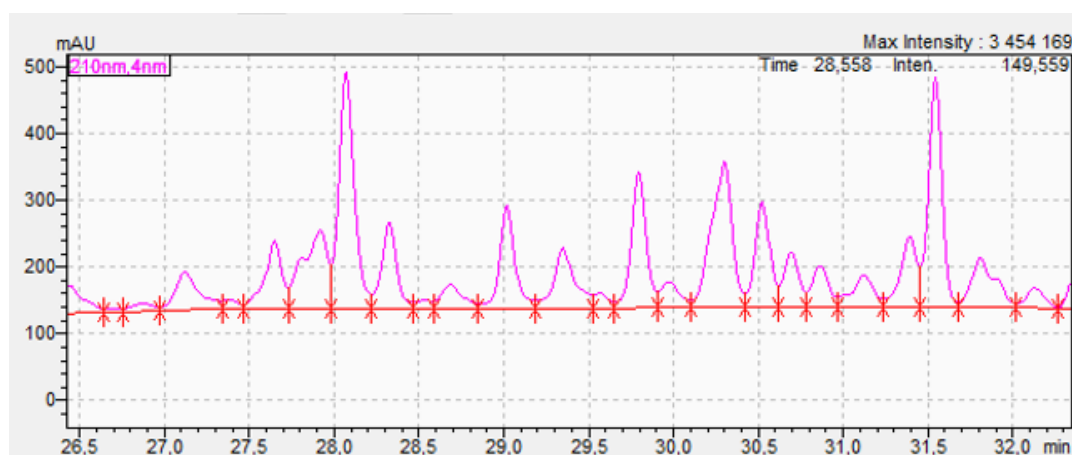
1. Лист аралии сердцевидной;
2. Корни аралии маньчжурской;
3. Каллусы на среде Линсмайера-Скуга;
4. Каллусы на среде Линсмайера-Скуга с добавлением сквалана;
5. Каллусы на среде Линсмайера-Скуга с добавлением амарантового масла;
6. Каллусы на среде Линсмайера-Скуга с добавлением кокосовой воды;
7. Каллусы на среде Линсмайера-Скуга с добавлением оливкового масла;
8. Аралозид А

Во всех культурах, за исключением каллусов на среде с кокосовой водой, был идентифицирован аралозид А. Денситометрический анализ показал, что количество

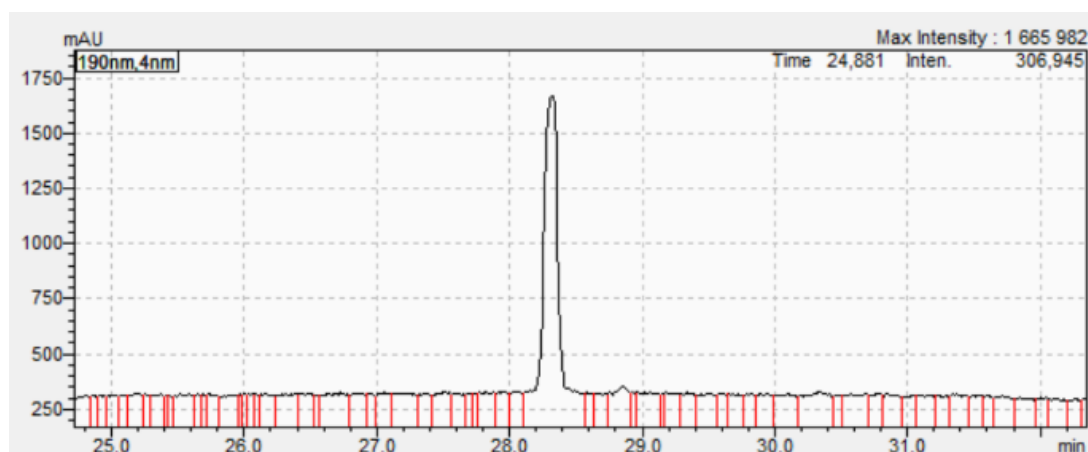
аралозида А сопоставимо с таковым в корнях аралии маньчжурской, а химический состав каллусов в целом приближен к листу аралии сердцевидной.

Количественное определение суммы тритерпеновых гликозидов методом фотоэлектроколориметрии в пересчете на «Сапарал» показало, что все культуры накапливают большее количество тритерпеноидов, чем корни аралии маньчжурской, но меньшее, чем лист интактного растения, а анализ полученных данных с использованием однофакторного дисперсионного анализа методом ANOVA показал наличие статистически значимых различий между группами ($p\text{-value} = 1,02 \cdot 10^{-6}$).

Количественное содержание суммы тритерпеновых гликозидов методом ВЭЖХ-УФ оценивали, измеряя площадь пиков с диапазоном времени удерживания от 27,5-32 минут с учетом, что стандарт аралозид А имеет время удерживания 28,315 минут (рис. 3) (табл.2).



А



Б

Рисунок 3. Хроматограммы, полученные в ходе анализа методом ВЭЖХ-УФ.

А – диапазон определение площадей пиков;

Б – Хроматограмма стандартного образца аралозид А

Таблица 2. Результаты количественного определения суммы тритерпеновых гликозидов методом ВЭЖХ-УФ.

День, сут	ЛС, $\log_{10}S^*$	ЛС + ом, $\log_{10}S^*$	ЛС + амарант, $\log_{10}S^*$	ЛС + кв, $\log_{10}S^*$	ЛС + сквалан, $\log_{10}S^*$	Корни аралии маньчжурской, $\log_{10}S^*$	Лист аралии сердцевидной, $\log_{10}S^*$
7	6,95 ± 0,37	7,3 ± 0,23	6,72 ± 0,2	6,3 ± 0,11	6,4 ± 0,09	5,8 ± 0,2	6,2 ± 0,21
14	6,94 ± 0,28	6,2 ± 0,17	6,41 ± 0,27	5,9 ± 0,15	6,7 ± 0,11		
21	6,72 ± 0,33	6,16 ± 0,2	6,2 ± 0,11	6,3 ± 0,13	7,2 ± 0,14		

* $\log_{10}S$ – десятичный логарифм площади суммы пиков;

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что наибольшее количество тритерпеновых гликозидов культуры накапливают в начале цикла культивирования, когда биомасса культур наименьшая. По мере увеличения биомассы количество тритерпеновых гликозидов постепенно снижается. Исключением являются культуры на среде с добавлением сквалана и кокосовой воды.

Количественное содержание аралозидов А в образцах определяли по методу внешнего стандарта, при этом погрешность определения данного вещества по времени удерживания не превышала 0,007 мин (табл. 3).

Таблица 3. Количественное определение аралозидов А в исследуемых объектах.

День, сут	ЛС, мг	ЛС + ом, мг	ЛС + амарант, мг	ЛС + кв, мг	ЛС + сквалан, мг	Корни аралии маньчжурской, мг	Лист аралии сердцевидной, мг
7	0,22 ± 0,01	0,35 ± 0,12	0,16 ± 0,1	0,003 ± 0,0002	0,29 ± 0,02	0,07 ± 0,005	0,23 ± 0,01
14	0,78 ± 0,07	0,007 ± 0,0002	0,016 ± 0,001	0,099 ± 0,002	0,22 ± 0,03		
21	0,2 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,003 ± 0,0005	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02		

На примере аралозида А можно заключить, что его количество в культурах постепенно снижается, что соотносится с общей тенденцией. Пик накопления соединения к концу периода культивирования приходится на каллусы на среде с добавлением кокосовой воды.

Качественный анализ вторичных метаболитов методом ВЭЖХ-МС показал, что каллусные культуры накапливают множество соединений, относящихся к тритерпеновым гликозидам (табл.4.)

Полученные демонстрируют, что наименьшая площадь суммы пиков наблюдается для корней аралии маньчжурской, что соотносится с результатами анализа методом фотоэлектроколориметрии и ВЭЖХ-УФ. В целом, результаты исследования подтверждают, что каллусные культуры показывают высокий уровень продуктивности и накапливают большое количество вторичных метаболитов, а разные подходы к фитохимическому исследованию показывают схожие результаты с учетом погрешности методов.

Таблица 4. Результаты изучения состава тритерпеноидов каллусных культур и интактных растений методом ВЭЖХ-МС.

m/z [M-H] ⁻	Брутто- формула	Предполагаемые соединения	Лист аралии сердцевидной	Корни аралии маньчжурской	ЛС	ЛС + амарант	ЛС + ом	ЛС + кокосовая вода	ЛС + сквалан
925,4802	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₈	Аралиясапонин XVII, аралозид А, аралозид Н, аралозид J, арматозид А, элатозид А, псевдогинзенозид RT, стипулеанозид R ₁	9	4	3	4	5	4	5
763,4244	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	Календулозид G, чикусетсусапонин Ib, момордин Ic, тарасапонин VI	4	2	1	2	2	2	3
1087,5330	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₃	Аралозид С, конгмунозид IX, калопанакс-сапонин F или стипулеанозид R ₂	5	1	1	1	1	1	1
955,4908	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	Календулогликозид С, чикусетсапонин V, конгмуаенозид Е, элатозид В и гинзенозид R ₆	5	2	1	4	3	3	2
631,3851	C ₃₆ H ₅₆ O ₉	Календулозид Е	1	1	1	1	1	1	1
927,2749	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	Аралиясапонин I, дурупкозид и хиноасапонин В	3	-	1	1	-	3	2
809,4329	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₅	Акантопанаксозид Е, элатозид Н или трагопонозид Б	5	-	2	4	2	2	1

957,5064	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	Конгмуенозид В, эклалбасапонин III, эклиптасапонин В, хиноасапонин 2 и конгмуенозид I	2	-	1	1	1	2	2
849,5005	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₄	Тайбайенозид IV	1	-	1	1	1	1	1
941,4667	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₉	Арматозид В	1	-	1	1	1	1	1
881,4904	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₆	Аралозид D или Тарасапонин IV	1	-	1	1	1	1	1
943,4908	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₉	Аралиясапонина II	1	-	-	1	1	1	1
749,4481	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	α-хедерин, эклалбасапонин I, конгмуанозид D и луцинозид E	3	-	-	-	-	-	-
765,4430	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	Колинсонидин	-	1	-	-	-	-	-

Таблица 5. Количественное определение суммы тритерпеновых гликозидов методом ВЭЖХ-МС.

Образец	Лист аралии сердцевидной	Корни аралии маньчжурской	ЛС	ЛС + ом	ЛС + амарант	ЛС + сквалан	ЛС + кв
log ₁₀ S*	9,14 ± 0,25	8,81 ± 0,17	9,24 ± 0,2	9,07 ± 0,18	9,58 ± 0,26	9,15 ± 0,14	9,12 ± 0,4

*S – площадь суммы пиков

Анализ экспрессии гена β -амиринсинтазы в культурах и листьях интактного растения показал наличие прямой зависимости между уровнем экспрессии и количеством аралозида А (рис. 4).

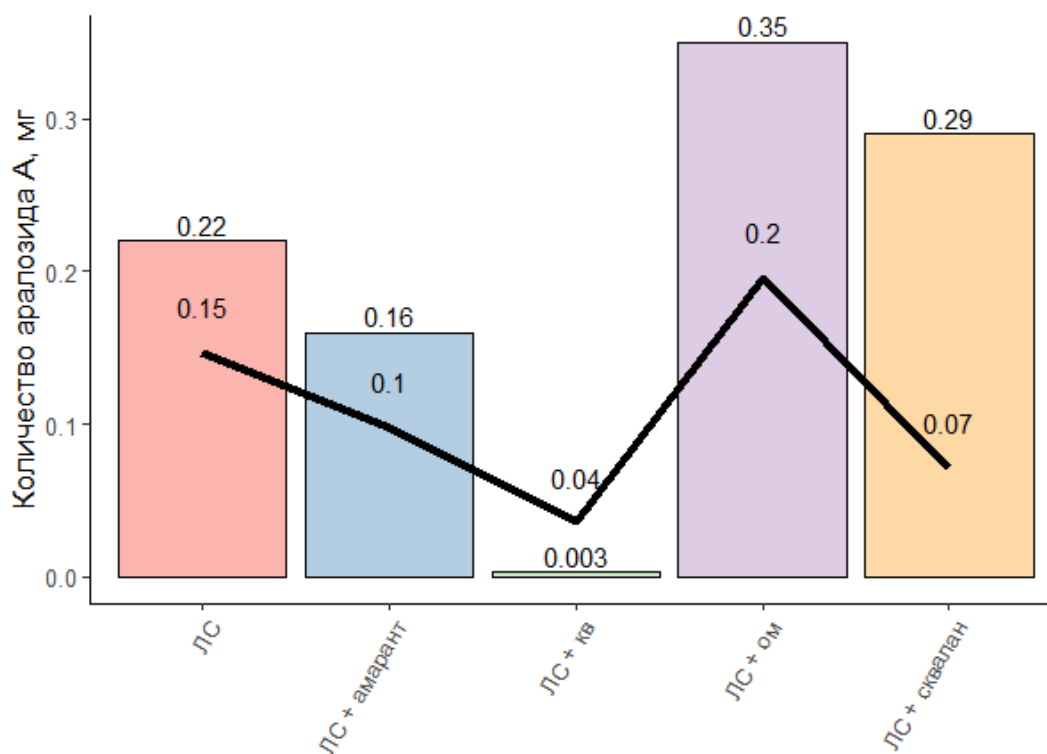


Рисунок 4. Сопоставление уровня экспрессии гена β -амиринсинтазы с содержанием аралозида А.

*Для удобства визуализации уровня экспрессии, ее первоначальное значение умножали на 20 и обозначили на диаграмме в виде кривой.

Результаты демонстрируют, что экспрессия гена в культурах в целом ниже, чем в листьях интактного растения, что может быть связано с дедифференцированным состоянием клеток и отсутствием хлоропластов (Roberts, 2007). Высокий уровень количественного содержания тритерпеновых гликозидов в культурах и низкий уровень экспрессии позволяют предположить наличие иных молекулярных механизмов в биосинтезе тритерпеноидов с участием других типов сквален-эпоксидаз и β -амиринсинтаз. Данные также подтверждают высокую степень гомологии гена β -амиринсинтазы у аралии маньчжурской и аралии сердцевидной, что является важным открытием, поскольку последовательность гена для исследуемого вида на сегодняшний день не описана.

Оценка LD_{50} экстракта из каллусной культуры показала, что летальная доза исследуемого экстракта выше, чем 5000 мг/кг, что говорит о его низкой токсичности и высокой безопасности по шкале Hodge and Sterner. (Ahmed, 2015).

Исследование работоспособности мышей по методике "Трехнагрузочная плавательная проба" показала наличие статистически значимых различий между группами в третьем плавании (рис. 5).

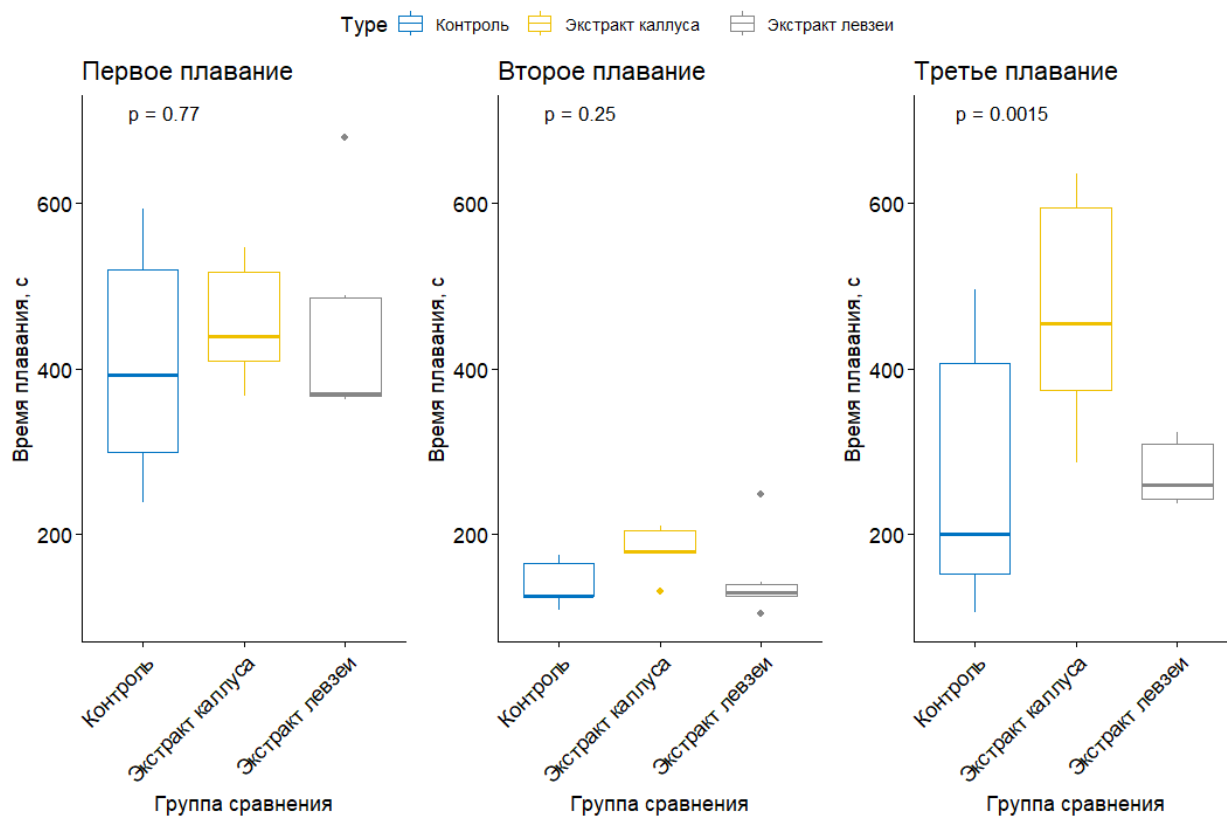


Рисунок 5. Результаты изучения актопротекторного действия культур в тесте трехнагрузочного плавания.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что экстракт из каллусной культуры аралии сердцевидной обладает актопротекторной активностью при интенсивных нагрузках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- 1) Получена стабильная каллусная культура аралии сердцевидной, изучены макроскопические и микроскопические признаки первичного и вторичного каллусов;
- 2) Изучено влияние модификаторов питательных сред на микроскопические и макроскопические признаки культур, их ростовые и биосинтетические характеристики – установлено, что добавки влияют на морфологические признаки культур, а наилучшие ростовые характеристики показывает культура на среде с кокосовой водой;
- 3) Изучен фитохимический состав полученных каллусных культур в сравнении с интактными растениями – листьями аралии сердцевидной и корнями аралии

маньчжурской. Показано, что химический состав полученных каллус схож с листом аралии сердцевидной как качественно, так и количественно и обладает большим разнообразием, чем корень аралии сердцевидной;

4) Исследована экспрессия гена β -амиринсинтазы в каллусных культурах и листьях интактного растения. Результаты демонстрируют, что экспрессия гена в каллусных культурах снижена, однако полученные данные по химическому составу позволяют предположить наличие других молекулярных механизмов биосинтеза тритерпеновых гликозидов в дедифференцированных клетках;

5) Исследована биологическая активность экстракта из каллусных культур на среде с кокосовой водой на модели *in vivo*. Показано, что входящие в состав экстракта биологически активные вещества увеличивают работоспособность при интенсивных физических нагрузках.

Результаты исследования демонстрируют, что каллусы аралии сердцевидной являются активными биосинтетическими единицами, накапливающими большое количество тритерпеновых гликозидов.

Наличие выраженного актопротекторного эффекта экстракта каллусной культуры на моделях *in vivo* наглядно показывает, что культуры являются перспективным источником растительного сырья для производства фитобиопрепаратов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Статьи в журналах Перечня ВАК:**

1. **Некрасова, Д. А.** Каллусная культура аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.): получение, подбор условий культивирования, индукция соматического эмбриогенеза / **Д. А. Некрасова**, М. Н. Пovyдыш, Н. С. Пивоварова, К. О. Сидоров // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2023. – Т. 12, № 4. – С. 40-45. – DOI 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1581. – EDN HJCJKF.

2. **Некрасова, Д. А.** Перспективы получения и исследования клеточных культур видов рода аралия (*Aralia* ssp.) / **Д. А. Некрасова**, М. Н. Пovyдыш, Н. С. Пивоварова, М. Ю Гончаров // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2022. – Т.38, № 4. – С.55-63.

Прочие статьи:

3. **Некрасова, Д. А.** Изучение перспективности введения терпеноидсодержащих растений в культуру *in vitro* на примере аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.) / **Д. А. Некрасова**, М. Н. Пovyдыш, Н. С. Пивоварова // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2022. – С. 221-223.

4. **Некрасова, Д. А.** Перспективы введения аралии сердцевидной в культуру *in vitro* / **Д. А. Некрасова**, М. Н. Пovyдыш, Н. С. Пивоварова // Сборник материалов V (XIII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге. – Санкт-Петербург: БИН РАН, 2022. – С.117.

5. **Некрасова, Д. А.** Введение аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.) в культуру *in vitro* и ее фитохимический анализ / **Д. А. Некрасова** // Сборник материалов XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье». – Санкт-Петербург: СПбГУ, 2022. – С. 428-429.

6. **Некрасова, Д. А.** Перспективы использования клеточных технологий для введения аралии сердцевидной в культуру *in vitro* (*Aralia cordata* Thunb.) / **Д. А. Некрасова**, М. Н. Пovyдыш, Н. С. Пивоварова // Сборник тезисов докладов LXXVI Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные проблемы современной медицины и фармации». – Минск: БГМУ, 2022. – С.219-220.

7. **Некрасова, Д. А.** Использование клеточных технологий для введения в культуру аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.) / **Д. А. Некрасова**, М. Н. Повыдыш // Сборник материалов 3-й Международной научной конференции PLAMIC2022 «Растения и Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». – Санкт-Петербург, 2022. – С.168.

8. Пивоварова, Н. С. Новые объекты в коллекции культур клеток высших растений Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета / Н. С. Пивоварова, М. Н. Повыдыш, Т. С. Шебитченко, **Д. А. Некрасова**, А. А. Данилова, А. С. Бугаев, Е. Д. Бронских // Сборник материалов конференции «Сандеровские чтения». – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2023. – С.198-201.

9. **Некрасова, Д. А.** Тритерпеновые гликозиды каллусных культур аралии сердцевидной (*Aralia cordata* Thunb.) / **Д. А. Некрасова**, М. Н. Повыдыш, Н. С. Пивоварова // Сборник материалов конференции «Сандеровские чтения». – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 268-276.