

Согласно литературным данным, многие исследователи считают НМГ такими же сильными, как и НФГ. При этом лекарственные средства НМГ имеют ряд преимуществ, так как доставляют гораздо меньше проблем и осложнений.

#### **Список использованной литературы**

1. Савельев В.С. Флебология: Руководство для врачей / В.С. Савельев, В.А. Гологорский, А.И. Кириенко и др.: Под ред. В.С. Савельева. – М.: Медицина, 2001. – 664с.
2. Макацария А.Д. Системный венозный и артериальный тромбоз эмболизм в акушерско-гинекологической практике / А.Д. Макацария, Б. Бреннер, В.О.Бицадзе, С.В. Акинъшина – М., 2016. – 995 с.
3. Козлов А.А., Методы определения активности гепарина: учебно-методическое пособие / А.Л. Берковский, Е.В.Сергеева, А.В.Суворов, А.Л. Мелкумян, А.А Козлов, Е.А. Нешкова, Г.А. – М.: 2015. – 64 с
4. Краснопольский Ю.М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ: учеб. пособие: в 2ч. – Ч.1 / Ю.М. Краснопольский, Н.Ф. Клещев – Харьков: НТУ «ХПИ», 2013. – 304 с.

*Кобец Ю.Е., Дитченко Т.И.*

#### **СТИМУЛЯЦИЯ ПРОДУКЦИИ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КУЛЬТУРОЙ КЛЕТОК АЛТЕЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПОД ДЕЙСТВИЕМ БИОТИЧЕСКИХ ЭЛИСИТОРОВ**

Биотехнология лекарственных растений базируется на использовании в качестве продуцентов биологически активных веществ культивируемых *in vitro* клеток, тканей и органов, в т.ч. генетически модифицированных. По сравнению с традиционным лекарственным сырьем культуры клеток имеют такие преимущества, как гарантированное круглогодичное получение экологически чистых целевых продуктов независимо от климатических, сезонных, погодных условий, возможность стандартизации и автоматизации процессов культивирования, создание линий-сверхпродуцентов на основе управления составом питательной среды и физическими параметрами.

Одним из способов увеличения уровней накопления фармакологически важных соединений в культурах растительных клеток и тканей является обработка элиситорами, действие которых направ-

лено на активацию защитной реакции растительной клетки путём синтеза фитоалексинов, в частности фенольных соединений. Элиситоры разного происхождения широко используются в работах с культурами клеток, тканей и органов растений [1-3]. Некоторые из них продуцируются микроорганизмами, другие образуются при ферментативном расщеплении высокополимерных соединений кутикулы и полисахаридов клеточных стенок растений и микроорганизмов, третьи представляют собой стрессовые фитогормоны, синтез которых в растениях индуцируется патогенами и абиогенными стрессорами. В качестве широко применяемых биотических элиситоров выступают дрожжевой экстракт (ДЭ) и метилжасмонат (МеЖ).

Поскольку результаты элиситации разных клеточных культур могут существенно варьировать, то подбор оптимальных режимов использования элиситоров является актуальной задачей при создании клеточных линий-продуцентов экономически важных биологически активных соединений. Целью настоящей работы явилось исследование особенностей однокомпонентного и сочетанного воздействия разных концентраций ДЭ и МеЖ на уровни накопления вторичных метаболитов фенольной природы в клетках суспензионной культуры *Althaea officinalis* L.

Надземные и подземные части алтея лекарственного содержат достаточно высокий уровень хлорогеновой кислоты и других фенолоксилов, биофлавоноидов и дубильных веществ, что позволяет рассматривать данное лекарственное растение в качестве перспективного источника природного сырья для получения препаратов антиоксидантного, противовоспалительного, Р-витаминного действия.

Способность к синтезу вторичных метаболитов фенольной природы сохраняют и культуры клеток алтея лекарственного [4]. Объектом исследования в настоящей работе служила суспензионная культура *Althaea officinalis* L., которую выращивали на питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга, дополненной 30 г/л сахаразы, 0,2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л ИУК, 0,5 мг/л кинетина.

Использовалась технология двухстадийного культивирования: первый этап – обеспечение активного прироста биомассы культуры, второй – создание условий для продукции целевых вторичных метаболитов. В связи с этим добавление элиситоров в питательные среды осуществляли на 13-е сут культивирования, т.е. в конце фазы логарифмического роста, анализ данных по содержанию в клетках фенолоксилов и флавоноидов производили на 15-е сут.

В первой серии экспериментов клетки суспензионной культуры инкубировали в течение 2 суток в присутствии 100-1000 мг/л ДЭ. Во второй серии осуществлялась совместная обработка культуры обоими элиситорами. Для этого на 13-е сутки цикла выращивания в питательные среды вносили указанные выше концентрации ДЭ и добавляли МеЖ в концентрации  $10^{-5}$  моль/л,  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л либо  $10^{-4}$  моль/л. Количественное определение содержания фенолокислот в пересчете на галловую кислоту, флавоноидов в пересчете на кверцетин производили с помощью спектрофотометрического метода.

В результате однокомпонентного воздействия ДЭ на клетки суспензионной культуры *Althaea officinalis* L. наиболее высокие уровни накопления фенолокислот и флавоноидов отмечались в присутствии 1000 мг/л исследуемого элиситора. Стимуляция биосинтеза фенолокислот достигала в среднем 1,8 раза относительно контрольного варианта. Содержание флавоноидов возрастало более чем в 3 раза. Одновременная обработка клеток суспензионной культуры ДЭ и  $10^{-5}$  моль/л МеЖ приводила к тому, что выраженный стимулирующий эффект наблюдался при действии более низких концентраций ДЭ (100-500 мг/л).

В частности, практически равные уровни накопления фенолокислот отмечались при сочетанном влиянии 250 мг/л ДЭ и  $10^{-5}$  моль/л МеЖ, а также в результате однокомпонентного воздействия 1000 мг/л ДЭ. Максимальная продукция исследуемых вторичных метаболитов суспензионной культурой *Althaea officinalis* L. обнаружена при совместном использовании 500 мг/л ДЭ и  $10^{-5}$  моль/л МеЖ – в 2,33 раза по сравнению с необработанными клетками. Повышение концентрации МеЖ до  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л на фоне 250-500 мг/л ДЭ сопровождалось снижением величины стимулирующего эффекта. Только в одном варианте (100 мг/л ДЭ) отмечен статистически достоверный рост содержания фенолокислот в результате воздействия  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л МеЖ по сравнению с действием более низкой его концентрации. В случае обработки клеток суспензионной культуры алтея лекарственного  $10^{-5}$  либо  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л МеЖ на фоне 1000 мг/л ДЭ стимулирующий эффект проявлялся в равной степени. Использование  $10^{-4}$  моль/л МеЖ в сочетании с ДЭ приводило к ингибированию положительного эффекта 250-500 мг/л ДЭ.

В результате уровни накопления фенолокислот не отличались от контрольного варианта. В присутствии 100 и 1000 мг/л ДЭ дополнительное внесение в среду инкубации клеток суспензионной культуры  $10^{-4}$  моль/л МеЖ не вызывало усиления биосинтеза фенолокислот. Аналогичный характер обнаружен и в результате со-

четанного воздействия 100-500 мг/л ДЭ и МеЖ в концентрации  $10^{-5}$  либо  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л на уровни накопления флавоноидов. Во всех указанных вариантах использование МеЖ на фоне ДЭ не приводило к усилению стимулирующего эффекта.

При использовании самой высокой из испытанных концентраций ДЭ (1000 мг/л) дополнительное внесение в питательную среду МеЖ сопровождалось подавлением положительного влияния. Среди испытанных комбинаций исследуемых биотических элиситоров синергетический эффект обнаружен только в присутствии 250 мг/л ДЭ и  $10^{-4}$  моль/л МеЖ. Рост содержания флавоноидов составил 2,77 раза относительно необработанных клеток.

Таким образом, сочетанное воздействие ДЭ и МеЖ целесообразно для повышения уровней накопления фенолокислот в клетках суспензионной культуры алтея лекарственного. Показано, что использование МеЖ обеспечивает усиление стимулирующего влияния 100-500 мг/л ДЭ. При этом наиболее эффективной комбинацией является 500 мг/л ДЭ и  $10^{-5}$  моль/л МеЖ. Можно предположить, что установленный эффект является результатом запуска альтернативных путей сигнальной трансдукции в ответ на элиситацию клеток исследуемой суспензионной культуры компонентами ДЭ и молекулами МеЖ, который приводит к повышению биосинтеза таких фитоалексинов как фенолокислоты.

#### **Список использованной литературы**

1. Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories / K. Ramirez-Estrada [et al.] // *Molecules*, 2016. – Vol. 21. – P. 182-206.
2. Patel, H. Elicitors in Plant Tissue Culture / H. Patel, R. Krishnamurthy // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2013. – Vol. 2 (2). – P. 60-65.
3. Naik, P.M. Abiotic and biotic elicitors – role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants / P.M. Naik, J.M. Al-Khayri; ed.: A.K. Shanker, C. Shanker. *Abiotic and Biotic Stress in Plants Recent Advances and Future Perspectives*. IntechOpen, 2016. – P. 247–277.
4. Характеристика суспензионной культуры как объекта для промышленного производства фармакологически активных веществ / В.М. Юрин [и др.] // *Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем»*, 2016. № 11. – С. 9–31.