

УДК 581.1

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И СИНТЕЗА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ В КУЛЬТУРАХ *in vitro Digitalis lanata* EHRH.

© 2022 г. С. В. Томилова^b, Д. В. Кочкин^{a, b, *}, Т. М. Тюрина^a, Е. С. Плаголева^a,
Е. А. Лабунская^a, Б. А. Галишев^c, А. М. Носов^{a, b, **}

^aФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
“Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

^bФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

^cФедеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
“Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина”, Екатеринбург, Россия

*e-mail: dmitry-kochkin@mail.ru

**e-mail: al_nosov@mail.ru

Поступила в редакцию 11.09.2021 г.

После доработки 28.09.2021 г.

Принята к публикации 30.09.2021 г.

Получены ризогенная, каллусная и суспензионная культуры *in vitro* наперстянки шерстистой *Digitalis lanata* и исследованы их ростовые, цитофизиологические и биохимические особенности. Полученные культуры характеризовались удовлетворительными ростовыми характеристиками (индексы роста I в пределах 5–13). Суспензионная культура клеток имела удельную скорость роста μ в пределах 0.2–0.3 сут⁻¹ и для нее была характерна двухфазная ростовая кривая (задержка роста во время экспоненциальной фазы). В полученных культурах методами UPLC-ESI-MS и HPLC-ESI-MS проведено исследование качественного и количественного состава вторичных метаболитов, которое показало отсутствие в них сердечных гликозидов. В то же время во всех исследованных культурах были обнаружены гликозиды фенолэтаноидов и стероидные гликозиды фураностанолового ряда. Общее содержание фенолэтаноидов в каллусной и суспензионной культурах составляло около 0.5% к сухой биомассе клеток. На основании результатов масс-спектрометрии идентифицировано 10 структур фенолэтаноидов, в том числе дигицилизид А, дигицилизид В, максозид, пурпуреазид Е и их метильные производные и изомеры, а также 7 фураностаноловых гликозидов с агликонами тигогенин и гитогенин. Показано, что состав вторичных метаболитов зависит от степени дифференцировки клеток: в ризогенной культуре, состоящей преимущественно из дифференцированных клеток, преобладают фураностаноловые гликозиды, тогда как в каллусной и суспензионной культурах клеток, состоящих из недифференцированных клеток, существенно расширяется разнообразие фенолэтаноидов. Полученные результаты подтверждают выдвинутую в наших предыдущих работах гипотезу о специфичности вторичного метаболизма и его высокой интенсивности в культурах клеток высших растений.

Ключевые слова: *Digitalis lanata*, ризогенез, каллусогенез, суспензионная культура клеток, вторичные метаболиты, сердечные гликозиды, стероидные гликозиды, фенолэтаноиды

DOI: 10.31857/S0015330322020208

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, несмотря на достижения в синтетической химии, по-прежнему для создания многих фармацевтических препаратов и биологически активных добавок используются растения.

Сокращения: HPLC-ESI-MS – высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией при ионизации электрораспылением; SIM – selected-ion monitoring; UPLC-ESI-MS – ультраэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением.

Как минимум 25% всех лекарств в промышленно развитых странах содержат растительные химические соединения, тогда как в развивающихся странах около 75% населения полагается исключительно на средства растительного происхождения [1]. В связи с тем, что популяции лекарственных дикорастущих растений крайне часто сокращаются из-за нерегулируемых заготовок сырья и многие виды относятся к редким и исчезающим, идет поиск альтернативных источников растительных биологически активных соединений. Перспек-

тивным способом получения растительного сырья с целевыми веществами можно считать культуры клеток, органов и тканей высших растений [2].

Digitalis lanata Ehrh., широко известная как наперстянка шерстистая, принадлежит к семейству *Plantaginaceae* и встречается в диком виде в Италии, Венгрии и на Балканах. Род *Digitalis* хорошо известен в медицине, начиная с XVIII века, благодаря наличию в этих растениях сердечных гликозидов (карденолидов), которые применяли для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [1, 3]. Дигоксин (наиболее используемый в медицине сердечный гликозид) получают из высушенных листьев *D. lanata*, поскольку его химический синтез экономически невыгоден. На данный момент карденолиды наперстянки не играют большой роли в терапии сердечно-сосудистых патологий, но их активно рассматривают как перспективные агенты при лечении ряда онкологических заболеваний и вирусных инфекций [1, 4].

Изучение культуры клеток *Digitalis* spp. как источника сердечных гликозидов началось более 50 лет назад. Во множестве экспериментальных работ было отмечено, что даже если на начальных этапах культивирования карденолиды присутствуют в небольших концентрациях в каллусных и суспензионных культурах, то в процессе длительного выращивания их синтез полностью исчезает [3, 5, 6]. В свою очередь для культур листьев и корней *in vitro D. lanata* отмечена продукция сердечных гликозидов, что указывает на связь биосинтеза этих соединений с процессами морфологической дифференцировки [5, 7, 8]. Кроме того, имеются сведения о том, что эмбрионные культуры также могут накапливать значительное количество этих соединений [9]. Из анализа доступных источников следует, что дедифференцированные клетки *in vitro* наперстянки не способны к синтезу карденолидов, несмотря на то, что необходимые ферментативные системы в них функционируют, что подтверждается их способностью к биотрансформации целевых соединений при внесении в среды различных субстратов [5, 10].

Практически во всех работах по изучению вторичного метаболизма в культурах клеток *D. lanata* основное внимание уделено присутствию в них только сердечных гликозидов [3, 5]. В то же время известно, что интактные растения этого вида содержат широкий набор вторичных метаболитов разных групп – стероидные гликозиды, дигитанола, фенолэтаноиды, антрахиноны, флавоноиды, многие из которых обладают биологической активностью [4].

Целью настоящей работы стало получение культур *in vitro Digitalis lanata* с разной степенью дифференцирования (ризогенной, каллусной и суспензионной) и исследование особенностей их

роста и синтеза вторичных метаболитов различных структурных групп.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения культур *in vitro D. lanata* использовали асептические проростки, выращенные из семян *D. lanata*, взятых от растений из Ботанического сада биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Семена стерилизовали смесью детергента Tween-20 (Sigma, Германия) и 50% раствора гипохлорита натрия (“Белизна”, Россия), промывали стерильной дистиллированной водой и высевали на чашки Петри с агаризованной средой Мурасиге и Скуга (MS) [11] без добавления регуляторов роста. Чашки Петри помещали на стеллажи под люминесцентные лампы дневного света и проращивали при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ и 16-часовом световом дне.

Ризогенез индуцировали на агаризованной среде MS с регуляторами роста – α -нафтилуксусная кислота (α -НУК) и кинетин (Merck, Германия) (диапазон концентраций от 1.0 до 2.0 мг/л), используя в качестве эксплантов семядольные листья или гипокотили асептических проростков.

Каллусную культуру получали на ризогенной культуре с применением регуляторов роста – α -НУК, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП) (Merck, Германия) (диапазон концентраций от 0.1 до 2.5 мг/л).

Выращивание каллусной и ризогенной культур осуществляли на чашках Петри с диаметром – 60 или 90 мм, в темноте при $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Для получения суспензионной культуры клеток в качестве эксплантов использовали каллусную культуру. Каллусы помещали в 250 мл колбы с 33–40 мл жидкой среды, которые размещали на ротационном шейкере (100 об./мин) и культивировали в темноте при $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Для выращивания полученных культур *in vitro* использовали среду MS с добавлением гидролизата казеина (0.5 г/л), инозитола (0.1 г/л), 3% сахарозы и регуляторов роста (α -НУК, 2,4-Д, кинетин, БАП). При выращивании каллусной и суспензионной культур клеток гидролизат казеина не применяли.

Микрофотографии суспензионной культуры клеток сделаны с помощью цифровой камеры TourCam SCMOS 0.3 Мпикс (Китай).

Для характеристики роста и физиологического состояния культур *D. lanata* использовали уровень накопления сырой и сухой биомассы, концентрацию (количество клеток в 1 мл суспензии) и жизнеспособность клеток.

Жизнеспособность суспензионной культуры определяли, используя прижизненный краситель

феносафранин (0.1% раствор) (Merck, Германия), путем подсчета живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) культивируемых единиц под микроскопом [12].

Для определения концентрации клеток (числа клеток в 1 мл суспензии) в суспензионной культуре использовали подсчет клеток в гемоцитометре Фукса-Розенталя после мацерации суспензии в 20% растворе хромовой кислоты при 60°C в течение 20–30 мин [12].

Для определения сырой и сухой биомассы каллусной и ризогенной культур использовали каллус или корни, отделенные от питательной среды. Для построения кривой роста использовали вес одного каллуса или участка корневой культуры при массе транспланта 150 мг ± 30% сырой биомассы. Для каждой точки использовали минимум три каллуса или участка корневой культуры.

Для суспензионной культуры клеток фиксированный объем суспензии (не менее 10 мл в двух биологических повторностях) фильтровали под вакуумом через бумажный фильтр с помощью воронки Бюхнера [12].

Биомассу всех полученных культур *in vitro* высушивали в сушильном шкафу при 50°C в течение 24 часов.

На основании полученных результатов вычисляли параметры роста суспензионной культуры, такие как индекс роста (I), удельная скорость роста (μ), время удвоения биомассы (τ), экономический коэффициент (Y), продуктивность по биомассе (P). Для расчетов использовали следующие формулы [12]:

$I = X_{\max}/X_0$, где X_{\max} и X_0 – максимальное и начальное значения критерия роста соответственно (сухая масса клеток, сырая масса клеток, концентрация клеток).

$\mu = (\ln X_2 - \ln X_1)/(t_2 - t_1)$, где X_2 и X_1 – значения критерия роста (сухая масса клеток, сырая масса клеток, концентрация клеток) в момент времени t_2 и t_1 соответственно (рассчитывали для экспоненциальной фазы роста).

$$\tau = \ln 2/\mu$$

$Y = (X_{\max} - X_0)/S_0$, где X_{\max} и X_0 – максимальная и начальная концентрации сухой биомассы (г/л), соответственно; S_0 – начальная концентрация субстрата (сахарозы) в среде (г/л среды).

$P = (X_i - X_0)/(t_i - t_0)$, где X_0 и X_i – количество сухой биомассы в начале культивирования и в момент времени t_i соответственно.

Для качественного и количественного анализа состава вторичных метаболитов в исследуемых культурах использовали ультраэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием при ионизации электрораспылением (UPLC-ESI-MS) и высокоэффективную

жидкостную хроматографию с масс-спектрометрией при ионизации электрораспылением (HPLC-ESI-MS) соответственно.

Для приготовления проб 100–300 мг высушенного растительного материала (биомасса клеток или корней) экстрагировали 3 раза 70% (по объему) этиловым спиртом в течение 30 минут под действием ультразвука (УЗ-ванна “Сапфир”, Россия) при комнатной температуре, после чего центрифугировали (центрифуга “MiniSpin plus”, Eppendorf, Германия) при 9660 g в течение 5 минут и отбирали супернатант в грушевидную колбу. Объединенные спиртовые экстракты упаривали под вакуумом при 40°C, суспендировали в 3 мл 5% (по объему) раствора уксусной кислоты и наносили на патрон для твердофазной экстракции Supelclean ENVI-18 (“Supelco”, США). Патрон промывали 3 мл 5% раствора уксусной кислоты, аналиты смывали в грушевидную колбу 3 мл 70% этанола. Полученный экстракт упаривали досуха под вакуумом при 40°C и использовали для химического анализа.

Для проведения UPLC-ESI-MS пробы растворяли в смеси ацетонитрил : вода (1 : 1, по объему) и фильтровали с помощью нейлонового фильтра с порами 0.2 мкм (Acrodisc, Pall Corporation, США). UPLC-ESI-MS-анализ выполняли на хроматографе Waters Acquity UPLC (Waters, США), оснащенном гибридным квадрупольным времяпролетным масс-спектрометром XEVOQTOF (Waters, США). Пробу в объеме 1 мкл наносили на колонку ACQUITY UPLC BEH Phenyl (50 × 2.1 мм, 1.7 мкм; Waters, США). Температура колонки составляла 40°C, объемная скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в воде (растворитель А) и 0.1% (по объему) раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле (растворитель Б). Хроматографическое разделение проводили в режиме градиентного элюирования. В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (Б, % по объему): 0–1 мин – 15%, 1–5 мин – 15 → 30%, 5–15 мин – 30 → 38%, 15–15.5 мин – 38 → 45%, 15.5–23 мин – 45%, 23–23.5 мин – 45 → 95%. Анализ осуществляли в режиме детектирования положительных и отрицательных ионов (диапазон m/z 100–1200). Параметры источника ионизации: температура источника ионизации – 120°C, температура десольвации – 250°C, напряжение на капилляре – 3.0 кВ, напряжение на конусе ввода пробы – 30 В, скорость подачи азота (десольвационный газ) – 600 л/час. Обработку полученных результатов производили с помощью программы MassLynx (Waters, США). Идентификацию соединений осуществляли на основании расшифровки масс-спектров и сопоставления хроматографического и масс-спектрометрического поведения обнаруженных соединений с данными литературы [1, 13–18].

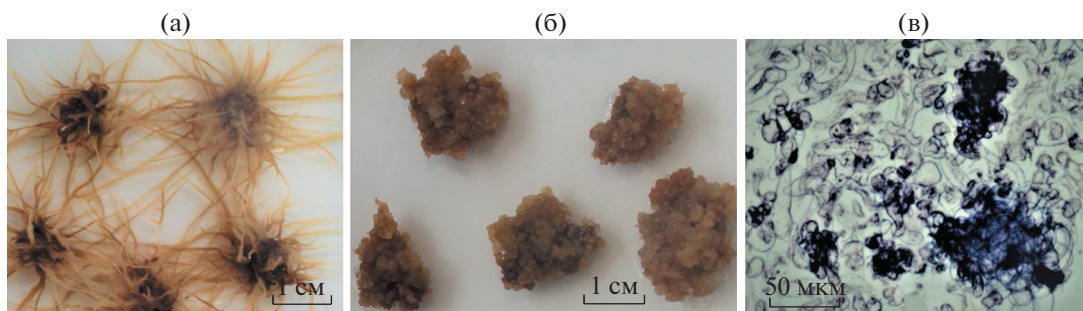


Рис. 1. Ризогенная (а), каллусная (б) и суспензионная (в) культуры *D. lanata*.

Перед HPLC-ESI-MS анализом все пробы растворяли в смеси ацетонитрил : вода (1 : 1, по объему) и фильтровали в стеклянные вials с помощью тefлоновых фильтров с порами 0.45 мкм CAMEO 17F (GVSS.p.A., Италия). Анализ осуществляли на приборе Agilent 1260 Infinity (“Agilent Technologies”, США), оснащенный масс-селективным детектором (6100, “Agilent Technologies”, США). Колонка: Poroshell 120 EC-C18 (100 мм × 3 мм, 2.7 мкм, “Agilent”, США). Температура колонки – 43°C, скорость потока подвижной фазы – 0.4 мл/мин. Объем инъекции – 0.5 мкл. В качестве подвижной фазы использовали 0.05% (по объему) раствор муравьиной кислоты (Fluka, США) в воде (растворитель А) и ацетонитрил (растворитель Б). В процессе анализа состав подвижной фазы менялся следующим образом (Б, % по объему): 0–7.5 мин – 5 → 13%, 7.5–9 мин – 13 → 21%, 9–19 мин – 21 → 31%, 19–19.5 мин – 31 → 95%, 19.5–21.5 мин – 95%. Анализ осуществляли при детектировании отрицательных ионов (диапазон m/z 100–1300, фрагментор – 90) в режиме записи сигналов для определенных ионов (режим SIM – “selected-ion monitoring”). Параметры источника ионизации: температура квадрупольной – 100°C, температура газа-носителя (азот) – 150°C, скорость подачи азота (распыляющий газ) – 12.5 л/мин, давление азота – 2484 торр, напряжение на капилляре – 4 кВ.

Количественное определение содержания индивидуальных гликозидов фенолэтаноидов проводили на основе HPLC-ESI-MS анализа методом внешней калибровки против стандартного образца эхинакозида (Sigma, США).

Для определения чувствительности метода HPLC-ESI-MS при скрининге сердечных гликозидов в пробах использовали стандартные образцы ланатозида С (Sigma, США), конваллятоксина, дигитоксина и дигоксина (ChromaDex, США). Минимальная определяемая концентрация для растворов стандартных образцов сердечных гликозидов находилась в пределах 0.4–0.8 мкг/мл.

Определение сырой и сухой биомассы и жизнеспособности клеток проводили в 2–3 биологи-

ческих повторностях. Подсчет числа клеток производили в 2–3 биологических и 2 аналитических повторностях. Качественное и количественное определение вторичных метаболитов осуществляли в индивидуальном экстракте без учета биологических и аналитических повторностей. При количественном определении содержания индивидуальных гликозидов фенолэтаноидов методом HPLC-ESI-MS относительное стандартное отклонение для времен удерживания соединений не превышало 5%, для площадей пика эхинакозида – 10%. Анализ данных проводили с помощью программы Excel, входящей в состав офисного пакета приложений Microsoft Office 2010. На графиках представлены средние значения и их стандартные ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первым этапом работ явилось получение ризогенной культуры *D. lanata*. В качестве эксплантов использовали семядольные листья и гипокотили асептических проростков, полученных из стерильных семян. От проростков отделяли семядольные листья или гипокотили и помещали их на чашки Петри с агаризованной средой MS, дополненной 2 мг/л α -НУК и 2 мг/л кинетина. Формирование ризогенной культуры обычно наблюдали через 10–14 дней. У *D. lanata* в присутствии 2 мг/л α -НУК и 2 мг/л кинетина формировалась устойчивая и хорошо растущая ризогенная ткань (рис. 1). Стоит отметить, что интенсивный ризогенез был характерен преимущественно для листовых эксплантов, тогда как для гипокотильных наблюдался некроз образующейся культуры.

Каллусные культуры клеток инициировали из полученной ризогенной культуры *D. lanata*. Для индукции каллусогенеза использовали среды MS с различными комбинациями регуляторов роста: 1 мг/л α -НУК – 2.5 мг/л БАП, 1 мг/л 2,4-Д – 0.1 мг/л кинетина, 2 мг/л 2,4-Д – 1 мг/л кинетина, 1 мг/л 2,4-Д – 0.5 мг/л БАП. Оптимальной для формирования каллусной культуры клеток оказалась среда MS с 1 мг/л 2,4-Д и 0.5 мг/л БАП. По-

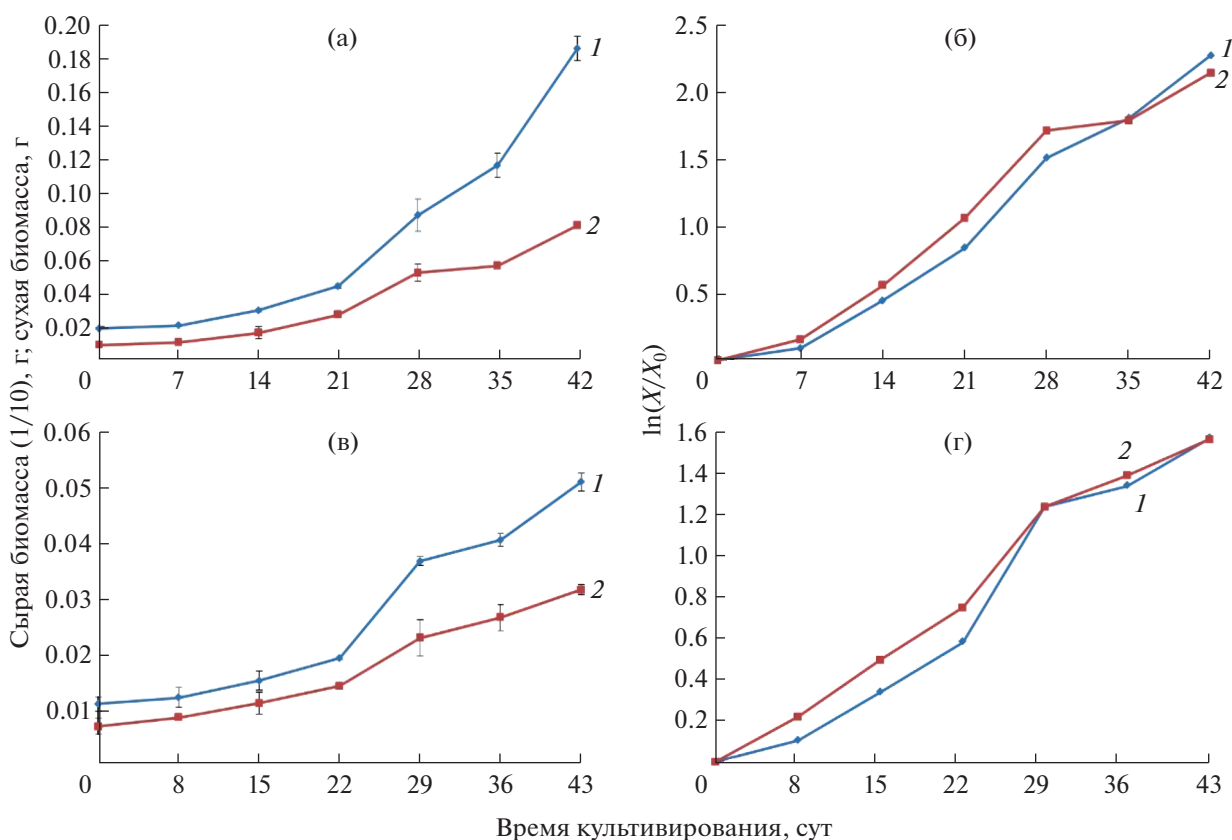


Рис. 2. Кривые роста в стандартной и полулогарифмической системе координат ризогенной (а, б) и каллусной (в, г) культур *D. lanata*: 1 – сырая биомасса; 2 – сухая биомасса. Числовые данные указаны в расчете на один каллус или участок ризогенной ткани.

лученная каллусная культура имела коричневый цвет и рыхлую структуру (рис. 1). На других комбинациях регуляторов роста индуцировать каллусогенез не удалось, в большинстве случаев наблюдали некроз культуры корней.

Суспензионная культура клеток *D. lanata* была получена из каллусной культуры, возраст которой был более 1 года (11 циклов культивирования). Каллусные клетки (2–4 г сырой биомассы) помещали в колбы с жидкой питательной средой MS, дополненной 1 мг/л 2,4-Д и 0.5 мг/л БАП. Колбы помещали на ротационный шейкер и через 18–22 суток выращивания была получена первичная суспензионная культура клеток. В результате работ по оптимизации режима выращивания полученной суспензии было установлено, что оптимальным является цикл культивирования – 21 сутки и соотношение инокулюм:свежая среда при пересадке – 1 : 8. Полученная суспензия имела желто-коричневый цвет, и содержала крупные агрегаты из меристемоподобных и паренхимоподобных клеток, а также множество одиночных меристемоподобных, паренхимоподобных и удлиненных аномальных клеток. Большинство оди-

ночных клеток в суспензии были нежизнеспособными (рис. 1).

После 1.5–2.5 лет культивирования (15–25 циклов выращивания) полученных каллусной и ризогенной культур было проведено исследование их ростовых характеристик. Установлено, что к 42–43 суткам культивирования кривые роста каллусной и ризогенной культур *D. lanata* еще не достигли стационарной фазы. При этом для культуры корней была характерна лаг-фаза в течение 7 суток, для каллусной культуры клеток отмечено замедление роста после 29 суток выращивания. В случае с ризогенной культурой *D. lanata* на 42 сутки культивирования отмечен прирост в 9 раз по сырой биомассе и в 8 раз – по сухой биомассе. Для каллусной культуры клеток на 43 сутки выращивания наблюдали прирост в 5 раз как для сухой, так и сырой биомассы (рис. 2).

Ростовые характеристики суспензионной культуры *D. lanata* были определены после 7 циклов выращивания (5 месяцев культивирования после получения) (рис. 3). При анализе ростовых кривых было отмечено отсутствие лаг-фазы для показателя концентрации клеток и ее наличие в течение 6–8 суток для накопления сырой и сухой

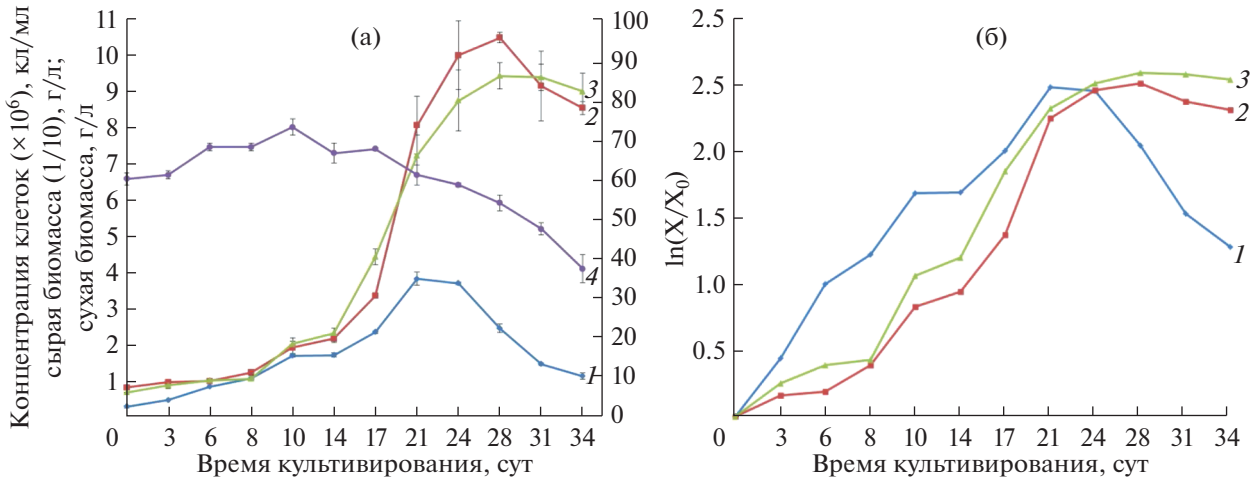


Рис. 3. Кривые роста в стандартной (а) и полулогарифмической (б) системе координат и жизнеспособность клеток суспензионной культуры *D. lanata*: 1 – концентрация клеток; 2 – сырая биомасса; 3 – сухая биомасса; 4 – жизнеспособность клеток.

биомассы. Стоит также отметить, что в цикле культивирования наблюдали период задержки роста в течение экспоненциальной фазы длительностью 4 суток, что разбивает цикл выращивания на 2 фазы. После 21 суток культивирования наступает замедление роста и переход культуры в стационарную фазу роста, которая длится около 4 суток. Кроме того, для суспензии *D. lanata* был зафиксирован относительно невысокий показатель жизнеспособности клеток – в течение всего цикла выращивания он находился на уровне 60–70% и приближался к 50% на 28 сутки. Подобная динамика может быть связана с большим количеством одиночных мертвых клеток и нахождением основной массы живых клеток преимущественно в составе крупных агрегатов.

В таблице 1 представлены производные параметры роста суспензионной культуры – индекс роста (I), удельная скорость роста (μ), время удвоения биомассы (τ), максимальное накопление сухой биомассы (M_{\max}), экономический коэффициент (Y) и максимальная продуктивность (P).

Из представленных ростовых параметров следует (табл. 1), что суспензионная культура *D. lanata* при сравнительно невысокой жизнеспособности клеток являлась хорошо растущей культурой. Индексы роста по концентрации клеток, сырой и су-

хой биомассе составляли 12–13, удельная скорость роста была в пределах $0.2\text{--}0.3\text{ сут}^{-1}$, максимальное накопление сухой биомассы – 9.4 г/л . Кроме того, отмечен достаточно хороший экономический коэффициент при выращивании культуры, который равен 0.29 , из чего следует, что почти 30% сахарозы питательной среды расходуется на построение биомассы клеток.

Для исследования качественного состава вторичных метаболитов в ризогенной культуре *D. lanata* использовали метод UPLC-ESI-MS. Хроматограмма спиртового экстракта из биомассы культуры корней, записанная в режиме полного ионного тока (при регистрации положительно заряженных ионов), и масс-спектры (положительные ионы) некоторых пиков идентифицированных соединений представлены на рис. 4.

В ризогенной культуре было обнаружено как минимум 10 пиков соединений со временем удерживания на колонке в пределах 1–5 мин. Фитохимический анализ показал отсутствие в экстракте из биомассы ризогенной ткани сердечных гликозидов – основных вторичных метаболитов наперстянок, но там были найдены фенолэтаноиды и стероидные гликозиды фураностанолового ряда, структуры которых представлены на рис. 5 и в таблице 2.

Таблица 1. Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *D. lanata*

Показатель роста	Производные параметры роста					
	I	$\mu, \text{сут}^{-1}$	$\tau, \text{сут}$	$M_{\max}, \text{г/л}$	Y	$P, \text{г/(л сут)}$
Концентрация клеток	12.0 ± 0.6	0.23 ± 0.01	3.0 ± 0.2			
Сырая биомасса	12.4 ± 0.6	0.22 ± 0.01	3.2 ± 0.2	9.4 ± 0.5	0.29 ± 0.01	0.34 ± 0.02
Сухая биомасса	13.3 ± 0.7	0.32 ± 0.02	2.2 ± 0.1			

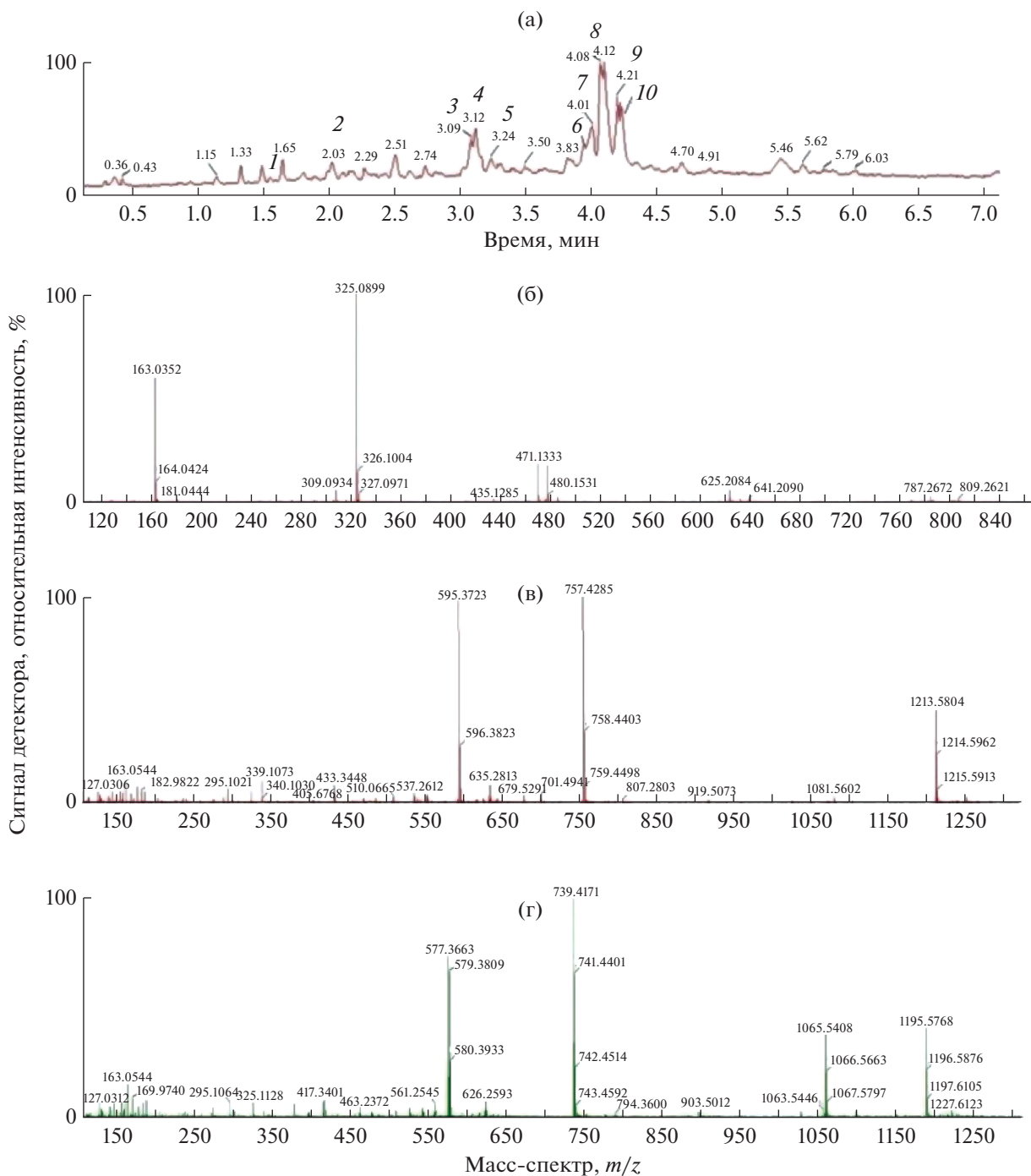


Рис. 4. UPLC-ESI-MS-хроматограмма (а, записана в режиме полного ионного тока при регистрации положительных ионов) спиртового экстракта из биомассы ризогенной культуры *D. lanata* и масс-спектры (положительные ионы) пиков со временем удерживания 2.03 (б, предположительная идентификация – фенолэтаноид деметил-пурпуразид Е), 3.12 (в, предположительная идентификация – фураностаноловый гликозид с агликоном гитогенин), 4.01 (г, предположительная идентификация – фураностаноловый гликозид с агликоном тигогенин): 1–10 – пики идентифицированных соединений (табл. 2).

Результаты масс-спектрометрии свидетельствуют о том, что обнаруженные гликозиды фенолэтаноидов соответствуют дигицилизиду А, максозиду и деметил-пурпуразиду Е, фураноста-

ноловые гликозиды являются производными двух агликонов – гитогенина и тигогенина. В ризогенной культуре присутствует не менее 7 фураностаноловых гликозидов и 3 фенолэтаноида.

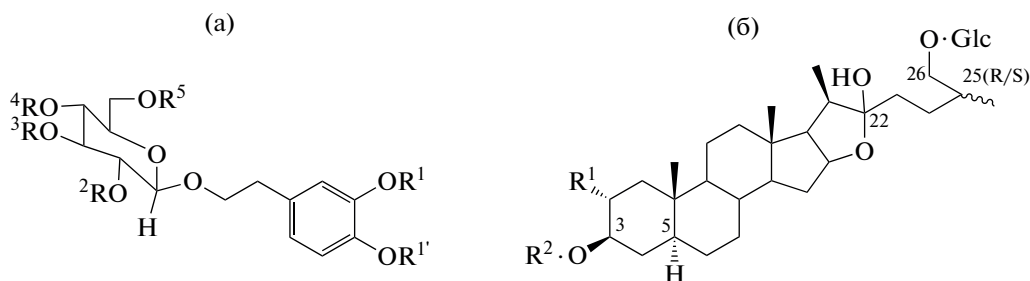


Рис. 5. Химические структуры фенолэтанойдных (а) и фураностероидных (б) гликозидов [4, 19]: R¹, R^{1'}, R², R³, R⁴, R⁵ – расшифровка радикалов, представлена в табл. 2.

Полученные методом UPLC-ESI-MS данные были использованы для таргетированного (выполнен с помощью HPLC-ESI-MS) качественного и количественного анализа фенолэтанойдов, а также качественного анализа стероидных гликозидов в биомассе каллусной и суспензионной культур *D. lanata*. Для увеличения чувствительности HPLC-ESI-MS анализ проводили при детектировании отрицательно заряженных ионов [20] и регистрации определенных выбранных ионов (режим SIM – “selected-ion monitoring”) [21]. Обзорные HPLC-ESI-MS (режим SIM) хроматограммы спиртовых экстрактов из биомассы куль-

тур клеток представлены на рис. 6. Список ионов фенолэтанойдов (в предложенных условиях HPLC-ESI-MS детектировались как депротонированные ионы [M-H]⁻) и стероидных гликозидов (декорировались как ионы-аддукты с компонентом подвижной фазы – муравьиной кислотой, [M-H + HCOOH]⁻) представлен в таблице 3.

В суспензионной культуре клеток *D. lanata* было обнаружено как минимум 10 фенолэтанойдов и 4 фураностероидных гликозида, в каллусной культуре – 9 фенолэтанойдных и 4 фураностероидных гликозида. HPLC-ESI-MS анализ показал увели-

Таблица 2. Предполагаемые (на основании результатов масс-спектрометрии) структуры фенолэтанойдных и фураностероидных гликозидов, обнаруженных в биомассе ризогенной культуры *D. lanata* методом UPLC-ESI-MS (номера хроматографических пиков соответствуют таковым на рис. 4)

Гликозиды фенолэтанойдов							
№ пика	Время удерживания, мин	R ¹ и R ^{1'}	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Предположительная идентификация
1	1.55	ОН	Н	Hex (Glc)	Caff	Hex (Glc)	Максозид
2	2.03	ОН	Н	Hex (Glc)	Caff	Rha	Деметил-пурпуреазид Е
3	3.09	Н и CH ₃	Н	Hex (Glc)	Ferul	Rha	Дигицилизид А
Фураностероидные гликозиды							
№ пика	Время удерживания, мин	R ¹	R ²			Агликон	
4	3.12	ОН	Pent-Hex-Hex-Hex			Гитогенин	
5	3.25	ОН	Hex-Hex				
6	3.96	Н	Hex-Hex-Hex-Hex			Тигогенин	
7	4.01	Н	Hex-Hex-Hex				
8	4.08/4.12	Н	Pent-Hex-Hex-Hex				
9	4.21	Н	Pent-Hex-Hex				
10	4.24	Н	Hex-Hex				

Примечание: R – радикалы, Pent – остаток пентозы, Hex – остаток гексозы, Glc – остаток глюкозы, Rha – остаток рамнозы, Ferul – феруловая кислота, Caff – кофейная кислота.

чение спектра гликозидов фенолэтанойдов и уменьшение разнообразия стероидных гликозидов в дедифференцированных культурах клеток *D. lanata*. Стоит отметить, что в ризогенной культуре присутствовали фураностаноловые гликозиды, имеющие в качестве агликонов тигогенин и гитогенин, а в каллусной и суспензионной культурах обнаружены только производные тигогенина.

Количественный анализ методом HPLC-ESI-MS (режим SIM) гликозидов фенолэтанойдов в каллусной и суспензионной культурах клеток *D. lanata* показал, что в представленных образцах содержание этих соединений достигало 0.5% к сухой массе клеток (табл. 4).

Отмечено, что в культурах *D. lanata*, состоящих преимущественно из дедифференцированных клеток (калусных и суспензионных) основными соединениями являются максозид и деметилпурпуреазид Е (в культуре корней эти соединения также обнаружены, но в незначительных количествах). В то же время пурпуреазид Е, дигицилизид А, изомер дигицилизид А и диметилдигицилизид В в каллусных и суспензионных культурах клеток присутствуют преимущественно в следовых количествах, тогда как в ризогенной культуре интенсивность хроматографическо-

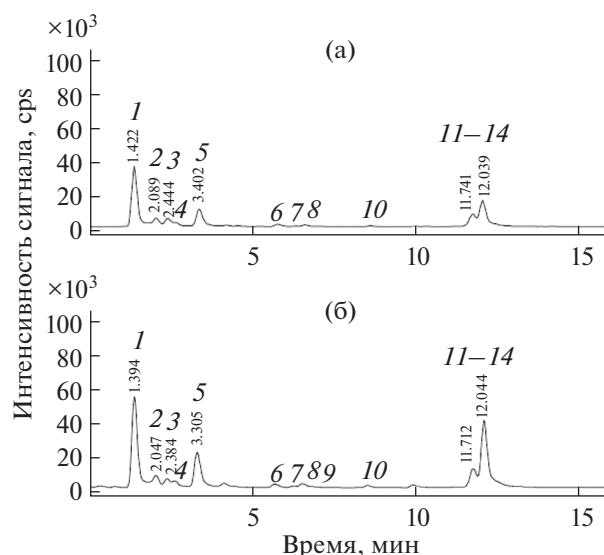


Рис. 6. HPLC-ESI-MS-хроматограммы (записаны при детектировании отрицательных ионов в режиме SIM; список ионов, для которых проводился анализ, и их идентификация представлен в табл. 3) спиртовых экстрактов из биомассы культур клеток *D. lanata*: (а) – каллусная культура клеток; (б) – суспензионная культура клеток; 1–14 – пики идентифицированных соединений (табл. 3).

Таблица 3. Список фенолэтанойдных и фураностаноловых гликозидов, для которых проводили HPLC-ESI-MS анализ (режим SIM, отрицательные ионы) в образцах биомассы культур клеток *D. lanata* (номера хроматографических пиков соответствуют таковым на рис. 6)

Гликозиды фенолэтанойдов			
№ пика	Время удерживания, мин	$[M-H]^{-}$, m/z	Идентифицированное соединение
1	1.42	801.50	Максозид
2	2.07	815.50	Метил-максозид
3	2.42	917.50	Деметил-дигицилизид В
4	2.61	815.50	Изомер метил-максозида
5	3.37	785.50	Деметил-пурпуреазид Е
6	5.75	799.50	Пурпуреазид Е
7	6.30	813.50	Изомер дигицилизид А
8	6.60	799.50	Изомер пурпуреазид А
9	7.01	945.50	Диметил-дигицилизид В
10	8.59	813.50	Дигицилизид А
Фураностаноловые гликозиды			
№ пика	Время удерживания, мин	$[M-H + HCOOH]^{-}$, m/z	Идентифицированное соединение
11	11.60	1289.50	Тигогенин-Нex-Нex-Нex-Нex-Нex
12	11.70	1127.50	Дезсилозил-парвиспинозид В
13	11.77	1259.50	Тигогенин-Pent-Нex-Нex-Нex
14	12.04	965.50	Тигогенин-Нex-Нex-Нex

Примечание: Нex – остаток гексозы; Pent – остаток пентозы.

Таблица 4. Результаты количественного HPLC-ESI-MS (режим SIM) анализа гликозидов фенилэтаноидов в биомассе культур клеток *D. lanata*

Название соединения	Содержание гликозидов фенилэтаноидов, мг/г сухой биомассы	
	каллусная культура клеток	суспензионная культура клеток
Максозид	2.68 ± 0.27	2.81 ± 0.28
Метил-максозид	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.04
Деметил-дигицилизид В	0.37 ± 0.04	0.27 ± 0.03
Изомер метил-максозида	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Деметил-пурпуреазид Е	0.89 ± 0.09	1.16 ± 0.12
Пурпуреазид Е	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Изомер дигицилизид А	0.05 ± 0.005	0.06 ± 0.01
Изомер пурпуреазид А	0.10 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Диметил-дигицилизид В	—	0.03 ± 0.003
Дигицилизид А	0.04 ± 0.004	0.07 ± 0.01
Сумма гликозидов фенилэтаноидов, мг/г сухой биомассы	4.70 ± 0.47	5.15 ± 0.52

го пика дигицилизид А (судя по UPLC-ESI-MS-анализу) была довольно высокая.

ОБСУЖДЕНИЕ

Digitalis lanata считается одним из наиболее изученных видов наперстянки в плане вторичного метаболизма, как в интактном растении, так и в культуре клеток, органов и тканей *in vitro* [5]. Большинство данных указывают на то, что в каллусных и суспензионных культурах клеток наперстянок сердечные гликозиды обычно либо отсутствуют, либо присутствуют в крайне низких концентрациях на начальных этапах получения и выращивания, но при длительном культивировании, как правило, исчезают полностью. Связь биосинтеза карденолидов *Digitalis* spp. с морфологической дифференцировкой подчеркнута результатами целого ряда исследований с различными видами культур *in vitro* [3, 5]. Известно, что культуры органов (листья и корни), а также каллусная ткань с эмбриогенными структурами *D. lanata* сохраняли способность образовывать сердечные гликозиды [5, 7–9, 22].

Результаты данной работы подтверждают отсутствие синтеза карденолидов в дедифференцированных культурах клеток *D. lanata*. Несмотря на имеющиеся данные о том, что в культурах побегов и корней *in vitro* наперстянок эти соединения встречаются [5, 7, 8], в пределах представленного исследования в ризогенной культуре *D. lanata* их обнаружить не удалось. Стоит сказать, что, судя

по доступным литературным источникам, ризогенные культуры наперстянки не во всех случаях способны продуцировать сердечные гликозиды [5]. Известно, что в интактных растениях *Digitalis* spp. карденолиды образуются и накапливаются преимущественно в листьях, основная их масса сосредоточена в мезофилле, поэтому вероятно морфогенетические процессы, связанные с формированием побеговых и листовых культур являются наиболее предпочтительными для их синтеза [23].

Формирование фенилэтаноидов и стероидных гликозидов фураностанолового ряда в культурах *in vitro* *D. lanata* указывает на специфичность их вторичного метаболизма и изменение групп и спектра соединений в зависимости от степени дифференцирования клеток в культурах *in vitro*. В ризогенной культуре, состоящей преимущественно из дифференцированных клеток, преобладают фураностаноловые гликозиды, тогда как в каллусной и суспензионной культурах клеток, состоящих из дедифференцированных клеток, существенно расширяется разнообразие фенилэтаноидов. Стоит отметить, что в литературе имеются сведения о формировании в дедифференцированных растительных клетках *D. lanata* антрахинонов [24, 25], в свою очередь наличие фенилэтаноидов и стероидных гликозидов в клетках *in vitro* наперстянки было ранее отмечено для каллусных культур *D. purpurea* [5, 26].

Результаты исследования подтверждают выдвинутую в наших предыдущих работах гипотезу

о специфичности вторичного метаболизма и его высокой интенсивности в культурах клеток высших растений. Однако, механизмы, которые лежат в основе закономерностей синтеза конкретных групп вторичных метаболитов в культурах клеток, органов и тканей *in vitro* растений рода *Digitalis* требуют дальнейшего изучения.

Работа выполнена на базе “Научно-производственного биотехнологического комплекса для проведения работ по изучению, сохранению и практическому применению культивируемых клеток и органов высших растений и микроводорослей” при финансовой поддержке Мегагранта Правительства Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1882).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kreis W. The foxgloves (*Digitalis*) revisited // *Planta Med.* 2017. V. 83. P. 962. <https://doi.org/10.1055/s-0043-111240>
2. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2012. V. 48. P. 609. <https://doi.org/10.1134/S000368381107009X>
3. Verma S.K., Das A.K., Cingoz G.S., Gurel E. *In vitro* culture of *Digitalis* L. (foxglove) and the production of cardenolides: An up-to-date review // *Industrial Crops and Products.* 2016. V. 94. P. 20. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.031>
4. Clemente E.S., Muller-Uri F., Nebauer S.G., Segura J., Kreis W., Arrillaga I. *Digitalis* // *Wild crop relatives: genomic and breeding resources, plantation and ornamental crops* / Ed. C. Kole. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 2011. P. 73. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21201-7_5
5. Rucker W. *Digitalis* spp.: *In vitro* culture, regeneration, and the production of cardenolides and other secondary products // *Medicinal and aromatic plants I. Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 4* / Ed. Y.P.S. Bajaj. Heidelberg, Berlin: Springer, 1988. P. 388. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73026-9_21
6. Hagimori M., Matsumoto T., Kisaki T. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture I. Determination of digitoxin and digoxin contents in first and second passage calli and organ redifferentiating calli of several *Digitalis* species by radioimmunoassay // *Plant Cell Physiol.* 1980. V. 21. P. 1391. <https://doi.org/10.1093/pcp/21.8.1391>
7. Lui J.H., Staba E.J. Effects of precursors on serially propagated *Digitalis lanata* leaf and root cultures // *Phytochemistry.* 1979. V. 18. P. 1913. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82701-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82701-6)
8. Lui J., Staba E. Effects of age and growth regulators on serially propagated *Digitalis lanata* leaf and root cultures // *Planta Med.* 1981. V. 41. P. 90. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971682>
9. Kuberski Ch., Scheibner H., Steup C., Diettrich B., Luckner M. Embryogenesis and cardenolide formation in tissue cultures of *Digitalis lanata* // *Phytochemistry.* 1984. V. 23. P. 1407. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80475-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80475-6)
10. Spieler H., Alfermann A.W., Reinhard E. Biotransformation of β -methyl digitoxin by cell cultures of *Digitalis lanata* in airlift and stirred tank reactors // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1985. V. 23. P. 1. <https://doi.org/10.1007/BF02660109>
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
12. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Под ред. Вл.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. С. 386.
13. Skhirtladze A., Kemertelidze E., Nebieridze V., Ganzera M. Phenylethanoid glycosides from the roots of *Digitalis ciliata* Trautv. // *Helv. Chim. Acta.* 2016. V. 99. P. 241. <https://doi.org/10.1002/hlca.201500288>
14. Perrone A., Plaza A., Bloise E., Nigro P., Hamed A.I., Belisario M.A., Pizza C., Piacente S. Cytotoxic furostanol saponins and a megastigmane glucoside from *Tribulus parvispinus* // *J. Nat. Prod.* 2005. V. 68. P. 1549. <https://doi.org/10.1021/np0502138>
15. Skhirtladze A.V., Kopaliani T.A., Nebieridze V.G., Kemertelidze E.P., Ganzera M. New steroidal glycosides from pericarp of *Digitalis ferruginea* // *Chem. Nat. Compd.* 2017. V. 53. P. 1083. <https://doi.org/10.1007/s10600-017-2206-x>
16. Calis I., Akbay P., Kuruuzum A., Yalcin F.N., Sahin P., Pauli G.F. Phenylethanoid and cardioactive glycosides from *Digitalis ferruginea* // *Pharmazie.* 1999. V. 54. P. 926. <https://doi.org/10.1002/chin.200010190>
17. Zhou B.N., Bahler B.D., Hofmann G.A., Mattern M.R., Johnson R.K., Kingston D.G. Phenylethanoid glycosides from *Digitalis purpurea* and *Penstemon linarioides* with PKC α -inhibitory activity // *J. Nat. Prod.* 1998. V. 61. P. 1410. <https://doi.org/10.1021/np980147s>
18. Jin Q., Jin H.G., Shin J.E., Hong J., Woo E.R. Phenylethanoid glycosides from *Digitalis purpurea* L. // *Bull. Korean Chem. Soc.* 2011. V. 32. P. 1721. <https://doi.org/10.5012/BKCS.2011.32.5.1721>
19. Kirmizibekmez H., Kusz N., Karaca N., Demirci F., Hohmann J. Secondary metabolites from the leaves of *Digitalis viridiflora* // *Nat. Prod. Commun.* 2017. V. 12. P. 59.
20. Liigand P., Kaupmees K., Haav K., Liigand J., Leito I., Girod M., Antoine R., Kruve A. Think negative: finding the best electrospray ionization/MS mode for your analyte // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 5665. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00096>
21. Muller M., Volkel W. The use of liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) in biological moni-

- toring // The MAK-Collection Part IV: Biomonitoring Methods. 2007. V. 11. P. 3.
<https://doi.org/10.1002/3527600418.bilcsmonte0011>
22. Luckner M., Dietrich B. Formation of cardenolides in cell and organ cultures of *Digitalis lanata* // Primary and secondary metabolism of plant cell cultures / Eds. K.H. Neumann, W. Barz, E. Reinhard. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 1985. P. 154.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-70717-9_15
23. 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. V. 69. P. 653.
<https://doi.org/10.1104/pp.69.3.653>
24. Furuya T., Kojima H. 4-Hydroxydigitolitein, a new anthraquinone from callus tissue of *Digitalis lanata* // Phytochemistry. 1971. V. 10. P. 1607.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(71\)85033-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(71)85033-1)
25. Furuya T., Kojima H., Katsuta T. 3-methylpurpurin and other anthraquinones from callus tissue of *Digitalis lanata* // Phytochemistry. 1972. V. 11. P. 1073.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)88455-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)88455-1)
26. Matsumoto M., Koga S., Shoyama Y., Nishioka I. Phenolic glycoside composition of leaves and callus cultures of *Digitalis purpurea* // Phytochemistry. 1987. V. 26. P. 3225.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82474-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82474-7)