



УДК 581.143.6:604.4

КУЛЬТУРА КЛЕТОК *ACONITUM BAICALENSE* TURSZ. EX RAPAIGS 1907 – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

А.Г. Еникеев¹**А.А. Семенов²****А.Г. Горшков³, Л.А. Максимова¹****Т.В. Копытина¹****Л.В. Гаманец¹****С.Г. Швецов¹****А.В. Пермьяков¹****Т.Н. Шафrikова¹**

¹⁾ Учреждение Российской академии наук Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033 Иркутск, Лермонтова, 132

e-mail: enikeev@sifibr.irk.ru

²⁾ Научно-производственное объединение ООО «Байкал-Биосинтез», 664074 Иркутск, Лермонтова, 89

³⁾ Учреждение Российской академии наук Лимнологический институт СО РАН, 664033 Иркутск, Улан-Баторская, 3

Первичный анализ экстрактивных веществ из культуры клеток *A. baicalense* показал наличие алкалоида зонгарин обладающего противометастатическим действием, а также сложной смеси дитерпеновых алкалоидов, не присутствующих в целом растении. Кроме этого, обнаружен биосинтез фитосфинголипидов, значительно отличающихся по химическому строению от описанных ранее. Предполагается, что указанные вещества обладают высокой биологической активностью.

Ключевые слова: *Aconitum baicalense*, культура клеток, алкалоиды, сфинголипиды.

Введение

Общая тенденция развития современной фарминдустрии состоит в преимущественном внедрении в лечебную практику новых лекарственных средств, получаемых из природного сырья. При этом природные биологически активные вещества служат не только как непосредственно лекарственные субстанции, но и в качестве «лидирующих соединений» – образцов для синтетических модификаций, улучшающих и изменяющих их свойства [1, 2]. Борец байкальский (*Aconitum baicalense* Turz. ex Rapaics 1907, сем. *Ranunculaceae*) – лекарственное растение флоры Сибири. Экстракты надземной части растений обладают выраженными фармакологическими свойствами. Так, установлена их эффективность в качестве антиметастатического средства [3, 4], в регуляции гормонального баланса организма [5]. Алкалоиды борца байкальского проявляют стресс-модулирующий эффект [6, 7].

Несмотря на широкий ареал [8], ресурсы вида ограничены, что исключает возможность промышленной заготовки сырья в естественных условиях. Попытки организовать выращивание растений в искусственных посадках оказались малоэффективными. Отсутствие надежной сырьевой базы исключает возможность завершения процедуры регистрации в качестве лекарственного препарата ранее разработанной на основе этого растения настойки «Баякон» [5]. Тем не менее, проблема сырья может быть успешно решена с помощью методов культур тканей и изолированных органов. Этому способствуют определенные преимущества этого способа, включая независимость от сезонных условий, болезней и их переносчиков, возможность получить необходимое количество требуемого продукта, обладающего стандартными качественными характеристиками [9].

Цель настоящей работы – получить культуру клеток борца байкальского и оценить способность культивируемых клеток к синтезу вторичных метаболитов, представляющих практический интерес.



Объекты и методы исследования

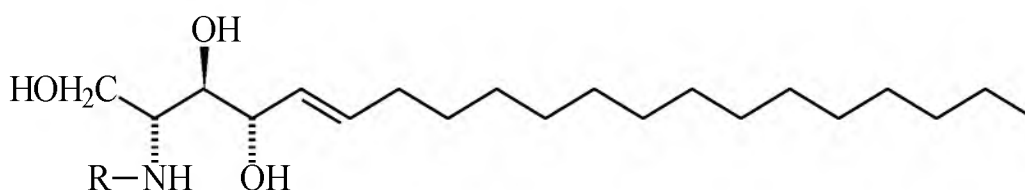
Культура клеток. Исходные семена растений борца байкальского собраны в августе 2006 г на заболоченном лугу в окрестностях г. Иркутска. Семена стерилизовали в 3% р-ре перекиси водорода, после чего переносили их в пенициллиновые флаконы с агаризованной средой (соли 1/2MS, без сахарозы). Флаконы помещали в холодильник (4°C) на 2.5 месяца. По истечении указанного срока флаконы с семенами переносили в темновой термостат на 26°C. Каллусная культура получена из этиолированных проростков на солевой среде В5 с добавлением тиамина 1мг/л, пиридоксина 0.5 мг/л, никотиновой кислоты 0.5 мг/л, инозита 100 мг/л, 2,4Д 1 мг/л, 2% сахарозы, агар-агар 0.8%, pH среды 5.8. Полученную из каллуса суспензионную культуру выращивали в среде того же состава, с пересевом в свежую среду каждые 14 дней.

Анализ химического состава биомассы. Клеточную массу отделяли от среды, высушивали на лиофильной сушилке Иней 3.2 (СССР) и последовательно экстрагировали органическими растворителями различной полярности (петролейный эфир→хлороформ→ этилацетат→ацетон→ этанол→вода). Полученные экстракты упаривали на ротаторном испарителе и использовали в анализе. Качественный анализ метаболитов проводили на хроматомасс-спектрометре LCMS-2010EV методом ионизации ESI (Shimadzu, Япония) и хроматографе Милихром А02 (Эко-Нова, Россия).

Результаты и их обсуждение

Культуры клеток и тканей растений в качестве продуцентов биологически активных веществ имеют ряд существенных отличий от целого растения. При переводе в изолированную культуру в растительных клетках часто отмечается как снижение содержания, так и изменение качественного состава вторичных метаболитов [10]. Существующие биотехнологические приемы, включая методы генетической инженерии, позволяют успешно преодолевать указанные обстоятельства и проводить отбор высокопродуктивных штаммов с определенным составом вторичных соединений [11]. С другой стороны, изменения в спектре синтезируемых веществ нередко приводят к открытию новых, ранее неизвестных соединений, обладающих биологической активностью. К числу основных действующих начал препарата «Баякон», созданного на основе травы борца байкальского, относятся алкалоиды напеллин и зонгрин. Кроме того, в растении обнаружены алкалоиды мезаконитин, гипоконитин, 12-эпинапеллин и его N-окись [12, 13]. Из перечисленных выше соединений в культивируемых клетках обнаружены только напеллин, зонгорин и мезаконитин. Вместе с тем, обнаружен ряд новых алкалоидов, предварительно идентифицированных как дегидромезаконитин, дезацетилмезаконитин и дезоксинапеллин. Принимая во внимание растущий интерес к алкалоидам как средствам для лечения ряда трудноизлечимых заболеваний [14, 15], обнаружение новых соединений имеет большое практическое и теоретическое значение.

В липофильных экстрактах из культивируемых клеток обнаружен набор фитосфингозинов – веществ, обладающих разнообразными биологическими свойствами, и изученными преимущественно в объектах животного происхождения. В настоящее время установлена значительная роль сфинголипидов в регуляции многих биологических процессов, включая пролиферацию, дифференциацию и апоптоз клеток. Установлено, что сфинголипиды могут подавлять рост злокачественных опухолей, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных субстанций для создания новых противоопухолевых препаратов [16]. В исследуемом комплексе присутствуют фитосфингенин С-20 (R=H; M+1=342.27) и его ацильные производные (рисунок). Химическая структура фитосфинголипидов из культивируемых клеток значительно отличается от ранее описанных в литературе. Это позволяет рассматривать клеточную культуру как перспективный источник новых биологически активных соединений.



R₁ = H; M+1=342.27

R₂ = CO-C₄H₉; M+1=414.19

R₃ = CO-C₉H₁₇; M+1=496.35 (одна двойная связь)

R₄ = CO-C₁₁H₁₅; M+1=520.35 (три двойных связи)

R₅ = CO-C₂₈H₅₁; M+1=758.58 (три двойных связи)

R₆ = CO-C₃₀H₅₁; M+1=782.59 (пять двойных связей)

Рис. Сфинголипиды из культуры клеток *Aconitum baicalense*

Заключение

В результате проведенных исследований впервые получена культура клеток борца байкальского. Показано, что культивируемые клетки сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов, но их качественный состав отличается от целого растения. Наряду с известными веществами, в культивируемых клетках обнаружены 9 ранее не описанных в литературе химических соединений (алкалоиды и сфинголипиды). Первичный анализ их химической структуры позволяет предполагать наличие высокой биологической активности. Таким образом, культуру клеток борца байкальского можно рассматривать как перспективный источник альтернативного биотехнологического сырья для получения как уже известных биологически активных веществ, так и новых, ранее не известных субстанций с высокой биологической активностью.

Выводы

1. Результаты исследований химического состава культуры клеток борца байкальского свидетельствуют о возможности ее использования в качестве альтернативного источника биологически активных веществ, в частности алкалоидов напеллин и зонгорин, входящих в число действующих начал препарата «Баякон».

2. В культивируемых клетках обнаружены новые ранее неизвестные соединения из классов алкалоидов и фитосфинголипидов, представляющие большой теоретический и практический интерес.

Список литературы

1. Малыгина Н.В., Осадчий С.А., Шакиров М.М., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. Новые превращения дитерпеновых алкалоидов антранилового типа // Доклады Академии наук. – 2004. – Т.394. – № 3. – С.343-346.
2. Шульц Э.Э., Ралдугин В.А., Волчо К.П., Салахутдинов Н.Ф., Толстиков Г.А. Растительные метаболиты флоры Сибири. Химические превращения и возможности практического использования // Успехи химии. – 2007. – Т.76. – № 7. – С.707-723.
3. Поветьева Т.Н., Пашинский В.Г., Семенов А.А. и др. Исследование противоопухолевых и антиметастатических свойств растительных средств из аконита байкальского // Сибирский онкологический журнал. – 2002. – №.3/4. – С.138-141.
4. Поветьева Т.Н., Пашинский В.Г., Нестерова Ю.В., Пушкарский С.В., Гайдамович Н.Н., Семенов, А.А., Жапова Ц., Погодаева, Н.Н. Противометастатические свойства алкалоидов аконита байкальского // Сибирский онкологический журнал. – 2005. – № 4. – С. 43 – 46.
5. Васильева Л.С., Изатуллин В.Г., Манюк Е.С., Семенов А.А. Корректирующее действие настойки баякон на функцию щитовидной железы // Химико-фармацевтический журнал. – 2005. – Т.39. – №5. – С.23-25.
6. Пашинский В.Г., Пушкарский С.В., Поветьева Т.Н., Нестерова Ю.В., Гайдамович Н.Н., Семенов А. А., Жапова Ц., Погодаева, Н. Н., Жданов В. Н. Влияние алкалоидов аконита



байкальского на состояние слизистой желудка экспериментальных животных при стрессе // Сибирский журнал гастроэнтерологии и гепатологии. – 2004. – № 18. – С.112-113.

7. Пушкарский С.В., Пашинский В.Г., Поветьева Т.Н., Нестерова Ю.В., Гайдамович Н.Н., Семенов А. А., Жапова Ц., Погодаева Н. Н. Стресс-модулирующий эффект алкалоидов *Aconitum baicalense* (Ranunculaceae) при воспалении и иммобилизации // Растительные ресурсы. – 2006. – Т. 42. – № 2. – С. 115-119.

8. Флора Сибири .Portulacaceae – Ranunculaceae / Сост. С.А.Тимохина, Н.В.Фризен, Н.В.Власова, В.В.Зуев, Н.К. Контонюк, К.С. Байков. Т 6. Новосибирск: ВО «Наука». Сибирская издательская фирма, 1993. – 310 с.

9. Bhojwani S.S., Razdan M.K. Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition / Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Tokyo: Elsevier, 1996. – 767 p.

10. Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений / Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С.5-20.

11. Булгаков В.П., Журавлев Ю.Н. Культуры трансформированных клеток растений как новый источник продуктов вторичного метаболизма // Успехи современной биологии. – 1992. – Т.112. – Вып. 3. – С. 342-349.

12. Жапова Ц., Модонова Л.Д., Семенов А.А. Алкалоидоносность *Aconitum czekanowskyi* // Химия природных соединений. – 1986. – № 3. – С.382.

13. Жапова Ц., Семенов А.А. 12-эпинапеллин и его оксиды из *Aconitum baicalense* // Химия природных соединений. – 1993. – № 6. – С.888- 892.

14. Kiahore N., Mishra B.B., Tripathi V., Tiwari V.K. Alkaloids as potential anti-tubercular agents // Fitoterapia. – 2009. – V.80, № 3. – P.149-163.

15. Mishra B.B., Kale R.R., Singh R.K., Tiwari V.K. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis // Fitoterapia. – 2009. – V.80. – № 2. – P.81-90.

16. Дятловицкая Э.В., Кандыба А.Г. Роль биологически активных сфинголипидов в опухолевом росте // Биохимия. – 2006. – Т.71 – №1. – С.17-25.

CELL CULTURE OF *ACONITUM BAICALENSE* TURSZ. EX RAPAICS1907 IS A PERSPECTIVE SOURCE OF THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS.

A.G. Enikeev¹,

A.A. Semenov²

A.G. Gorshkov³

L.A. Maximova¹

T.V. Kopytina¹

L.V. Gamanets¹

S.G. Shvetsov¹

A.V. Permyakov¹

T.N. Shafikova¹

¹ Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
664033, Irkutsk, Lermontov St. 132,
post box 317, Russia

e-mail: enikeev@sifibr.irk.ru

² "Baykal-Biosynthesis" company
664074, Irkutsk, Lermontov St.89,
of. 333, Russia

³ Limnological Institute SB RAS
664033, Irkutsk, Ulan-Batorskaya
St., 3, post box 278, Russia

Preliminary analysis of extractive compounds from cell culture of *A. baicalense* showed up the presence of the alkaloid zongarin having antimethastatic action and also of complex mixture of the diterpene alkaloids which are not founded in a native plant. Besides, the biosynthesis of phytosphyngolipids is opened chemical constructions of which are remarkably different from ones described earlier. All these specified compounds are supposed to be of high biological activity.

Key words: *Aconitum baicalense*, cell culture, alkaloids, sphingolipids.