

<https://doi.org/10.47370/2072-0920-2021-17-6-35-47>



УДК 633.685:577.19

© 2021

Поступила 28.09.2021

Received 28.09.2021

Принята в печать 25.10.2021

Accepted 25.10.2021

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interests

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ / ORIGINAL ARTICLE

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА
КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР *DIOSCOREA CAUCASICA*
В СВЯЗИ С ПОЛУЧЕНИЕМ ИСТОЧНИКА БАВ С
КАРДИОПРОТЕКТОРНЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ

Анна И. Лосева*, Варвара И. Минина, Анна В. Позднякова,
Елена В. Остапова

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»;
ул. Красная, д. 6, г. Кемерово, 650000, Российская Федерация

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение № 075-02-2018-223 от 26.11.2018, № 075-15-2019-1362 от 14.06.2019 (идентификатор проекта RFMEFI57718X0285).

Аннотация. Диоскорея кавказская является источником биологически активных веществ (БАВ): сапонинов и полифенолов, проявляющих противоатеросклеротическое действие. Но так как данный вид растения во многих регионах России занесен в Красную книгу, то изъятие растительного сырья из естественной среды обитания невозможно. Решением данной проблемы является применение биотехнологических методов *in vitro* – получение каллусных, суспензионных и корневых культур. Цель данной работы состояла в подборе рабочих параметров экстрагирования из клеточных культур максимального количества БАВ. Для ее реализации использовались выращенные по общепринятым методикам клеточные культуры *in vitro*, экстракты на основе данных культур, полученные с помощью различных органических растворителей, и при варьировании параметрами экстракции (температурой, соотношением сырье:экстрагент, временем). Максимальный выход экстракта, следовательно, БАВ из каллусов наблюдался при использовании метанола в соотношении 1:10 при 40°C в течение 60 мин. Из суспензионных культур максимальный выход БАВ – при использовании изопропанола в соотношении 1:10 при 40°C в течение 30 мин. Из корневых культур – при использовании изопропанола в соотношении 1:10 при 40°C в течение 60 мин. Из анализируемых экстрактов наибольшее содержание БАВ (кофейной кислоты, рутина,

мангиферина, кверцетина, апигенина) содержалось в экстракте из корневой культуры *in vitro*. Например, содержание рутина выше в 13 и 22 раза, чем у каллусной и суспензионной культур. Методами ТСХ, ВЭЖХ и ЯМР установлено, что изопропанольный экстракт корневой культуры *in vitro* Диоскореи кавказской содержал сапонины: глюкопиранозид и рамнопиранозид, дельтозид, протодиосцин, спиростенол А и спиростенол Б – вещества, проявляющие противоатеросклеротическое действие. В перспективе клеточные культуры *in vitro* Диоскореи кавказской использовать как сырье в фармацевтических целях (для приготовления лекарственных препаратов) и в пищевой промышленности (как компонент функциональных продуктов питания и биологически активных добавок).

Ключевые слова: Диоскорея кавказская, биотехнология *in vitro*, кардиопротекторные свойства, атеросклероз, вторичные метаболиты, фенолы, сапонины, экстракция

Для цитирования: Исследование химического состава клеточных культур *DIOSCOREA CAUCASICA* в связи с получением источника БАВ с кардиопротекторным потенциалом / Лосева А.И. [и др.] // Новые технологии. 2021. Т. 17, № 6. С. 35-47. <https://doi.org/10.47370/2072-0920-2021-17-6-35-47>

CHEMICAL COMPOSITION OF THE *DIOSCOREA CAUCASICA* CELL CULTURE AS A SOURCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES WITH CARDIOPROTECTIVE POTENTIAL

Anna I. Loseva*, Varvara I. Minina,
Anna V. Pozdnyakova, Elena V. Ostapova

FSBEI HE «Kemerovo State University»; 6 Krasnaya str., Kemerovo, 650000, Russian Federation

ACKNOWLEDGEMENT

The work was carried out with the support of the Ministry of Science and Education of the Russian Federation within the framework of the Federal Target Program «Research and Development in priority areas of development of the scientific and technological complex of Russia for 2014-2020», Agreement No. 075-02-2018-223 dated 26.11.2018, No. 075-15-2019-1362 dated 14.06.2019 (project ID RFMEFI57718X0285).

Abstract. *Dioscorea Caucasica* is a source of various biologically active substances (BAS), e.g. saponins and polyphenols, which are known for their anti-atherosclerotic action. However, this species is in the Red List of many Russian regions. Biotechnological methods of production of callus, suspension, and root cultures *in vitro* can solve this problem. The research objective was to select the optimal BAS extraction parameters. The study featured *in vitro* cell cultures, grown according to standard methods, and extracts, obtained from these cultures using various organic solvents and extraction parameters, i.e. temperature, the ratio of raw material vs. extractant, time, etc. The best yield of the extract from callus cultures was observed when methanol was applied in a ratio of 1:10 at 40°C for 60 min. As for suspension cultures, the greatest yield was provided by isopropanol in a ratio of 1:10 at 40°C for 30 min. In case of root cultures, the most effective combination was that of isopropanol in a ratio of 1:10 at 40°C for 60 min. The root culture proved the source of the highest BAS content, namely caffeic acid, rutin, mangiferin, quercetin, and apigenin. The content of rutin was 13 and 22 times higher than that of callus and suspension cultures. TLC, HPLC, and NMR procedures demonstrated that the isopropanol extract contained such saponins as glucopyranoside,

rhamnopyranoside, deltoside, protodioscin, spirosthenol A, and spirosthenol B. These substances are known for their antiatherosclerotic properties. Therefore, *in vitro* cell cultures of *Dioscorea Caucasica* can be used as raw materials for various pharmaceutical purposes, as well as in functional foods.

Keywords: *Dioscorea Caucasica*, biotechnology *in vitro*, cardioprotective properties, atherosclerosis, secondary metabolites, phenols, saponins, extraction

For citation: Loseva A.I. [et al.] Investigation of the chemical composition of cell cultures of *DIOSCOREA CAUCASICA* in connection with the production of BAS sources with cardioprotective

potential. *New Technologies*. 2021;17(6):35-47.
<https://doi.org/10.47370/2072-0920-2021-17-6-35-47> (In Russ.)

Сегодня в современной медицине актуально использовать растения в качестве источника биологически активных веществ (БАВ), оказывающих оздоровительный и профилактический эффект на организм человека [1]. Среди хронических заболеваний сердечно-сосудистые (ССЗ) занимают лидирующие позиции среди основных причин смертности населения [2]. В профилактике ССЗ важен здоровый образ жизни, в частности правильное питание [3]. Но в связи с денежными, климатическими и экологическими ограничениями систематический прием обогащенных витаминами, минералами и прочими БАВ продуктов затруднителен для многих потребителей [4]. В связи с чем актуальна разработка функциональных продуктов питания (ФПП) и биологически активных добавок (БАД) к пище [5].

Перспективным источником БАВ, проявляющих кардиопротекторную активность через противоатеросклеротическое действие, является Диоскорея кавказская (*Dioscorea caucasica*) [5; 6; 7]. Это реликтовая многолетняя травянистая лиана, настойки, отвары из корневища (подземных органов) которой традиционно использовались в качестве средства, снижающего уровень липидов в крови, проявляющего противомикробные и противовоспалительные свойства [8], антиоксидантное действие и способность к повышению иммунитета [9]. Растение

обладает данной физиологической активностью благодаря содержанию ряда БАВ. В состав корневища растения входит крахмал [10], белки, витамины, липиды, минералы, сапонины, гликаны и танины [8]. Кардиопротекторной активностью обладают сапонины и полифенолы Диоскореи, влияющие на сорбцию, биосинтез холестерина и на нормализацию сосудисто-тканевой проницаемости [5].

Из-за ряда лимитирующих факторов (низкой конкурентной способности, сокращения ареала обитания, изъятия для фармацевтических целей и т.п.) Диоскорея кавказская находится под угрозой исчезновения – вид занесен в Красную книгу ряда регионов России [11; 12]. Для использования данного растения в целях оздоровления населения с сохранением биологического разнообразия перспективны биотехнологические методы *in vitro* [1]. Например, выращивание каллусных, суспензионных культур и бородачатых корней *in vitro* [13], содержащих большее количество БАВ, в сравнении с растительными предшественниками [14].

Цель данной работы заключается в подборе рабочих параметров экстракции для выделения максимального количества БАВ из клеточных культур *in vitro* Диоскореи кавказской.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования стали клеточные культуры *in vitro*, полученные из семян Диоскореи кавказской. Семена приобретены в коллекции Е.К. Сироткина (Россия). Стерилизация семян осуществлялась по методике, описанной в работе Е.А. Калашниковой и ее коллег

[15]. Полученные 28-суточные стерильные проростки (листья) использовали для индукции каллусных культур и бородатых корней.

Выращивание каллусной культуры осуществлялось по методике, описанной в работе М.А. Sonibare [16]. Для выращивания каллусов использовалась питательная среда Мурасиге-Скуга [17], в состав которой добавляли 6-бензиламинопурин (6-БАП) в количестве 1,0 мг/л, α -нафталинуксусная кислота (НУК) – 0,2 мг/л, цистеин – 20 мг/л. Параметры культивирования: температура $27\pm 1^\circ\text{C}$, фотопериод 16 ч, влажность 60–70%. Цикл субкультивирования составлял 28 суток.

Часть выращенных каллусов использовалась для получения суспензионной культуры. Рыхлые каллусы переносились с агаризованной питательной среды на жидкие среды (аналогичного состава, но без агара). Параметры культивирования аналогичны параметрам получения каллусных клеток. Цикл субкультивирования составлял 21 день.

Для получения бородатых корней стерильные проростки (листья) трансформировали с помощью агробактерий по методике Т. Novikova и ее коллег [18]. Для трансформации использовались *Agrobacterium rhizogenes* 15834 Swiss (Уфа, Россия). Бородатые корни выращивали на жидкой среде Гамборга (без гормонов) [19] в течение 35 суток. Параметры культивирования: температура $23\pm 1^\circ\text{C}$, в темноте, на качалке с частотой 90 об/мин.

Все реактивы приобретены в ООО «Диаэм» (Россия). Все работы осуществлялись в стерильных условиях ламинар-боксов БМБ-II-«Ламинар-С»-1,2 NEOTERIC (ЗАО «Ламинарные системы», Россия).

В работе анализировались экстракты, полученные из клеточных культур *in vitro*. Для подбора рабочих параметров по получению максимального выхода экстракта (и БАВ) из клеточных культур варьировали экстрагентом – в работе использовался метанол, этилацетат, ацетон, изопропанол, диэтиловый эфир,

70-процентный этанол, с соотношением сырье:экстрагент 1:1, 1:2, 1:5, 1:10 и 1:20, при температурах 25°C , 40°C , 60°C , температура кипения и временем 10, 30, 60, 120, 180, 360 мин. экстракции.

Для экстрагирования навеску клеточной культуры ($3,0\pm 0,1$ г) помещали в пробирку (на 50 мл) и заливали 40 мл растворителя. Затем пробирку помещали на шейкер-инкубатор (ES-20/60, Biosan, Латвия) и перемешивали в течение 60 мин. С помощью фильтрования отделяли сухую массу от экстрагента (использовали фильтр «Красная лента»). Фильтрат центрифугировали (использовали центрифугу 5810/5810R, Eppendorf, Германия) при 5000 об/мин. в течение 10 мин. для удаления взвешенных частиц. Растворитель из экстракта упаривали (использовали ротационный испаритель «Constructional Vapor», ИКА®-Werke GmbH & Co. KG, Германия) при пониженном давлении из предварительно взвешенной колбы объемом 100 мл. Колбу взвешивали и определяли выход экстракта.

Для изучения химического состава полученных экстрактов клеточных культур *in vitro* использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). ВЭЖХ осуществлялась на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence (Shimadzu Corp., Япония) с диодноматричным детектором Shimadzu SPD-20-MA (Shimadzu Corp., Япония) и рефрактометрическим детектором RID-10A (Shimadzu Corp., Япония). Для экстрактов, содержащих наибольшее количество БАВ, была произведена оценка индивидуальных веществ с помощью метода ЯМР-спектроскопии (ЯМР-спектрометр Bruker Avidence, Германия, с рабочей частотой 400 МГц) и тонкослойной хроматографии (ТСХ). ТСХ выполняли на пластинах Sorbfil ПТСХ-АФ-А с последующей денситометрией ТСХ пластины Sorbsil. Использовали денситометр с системой фотофиксации Soni (ООО «ИМИД», Россия).

Обработка полученных данных осуществлялась в программе Microsoft Excel. Результаты и обсуждения
 На рис. 1 представлены объекты исследования – каллусные, суспензионные

и корневые культуры *in vitro*, полученные на начальных этапах данного исследования. Результаты по подбору оптимального экстрагента представлены в табл. 1.

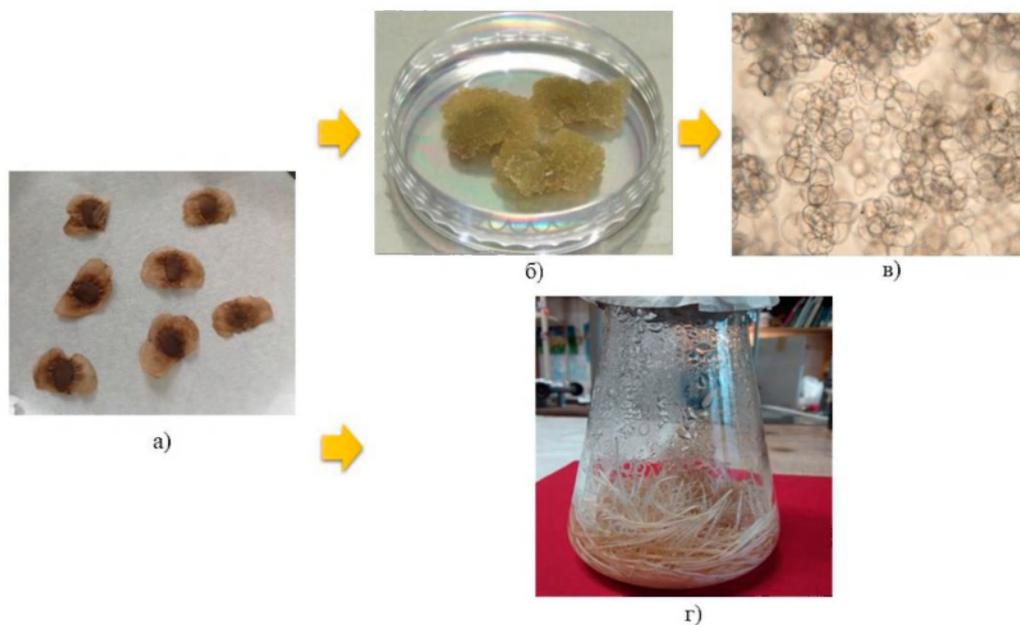


Рис. 1. Схема получения каллусной, суспензионной и корневой культуры *in vitro* из стерильных семян Диоскореи кавказской

Fig. 1. Scheme of obtaining callus, suspension and root culture *in vitro* from sterile seeds of Caucasian dioscorea

Таблица 1

Эффективность экстракции (выход экстракта) из биомассы клеточных культур *in vitro* различными растворителями

Table 1

The efficiency of extraction (extract yield) from the biomass of cell cultures *in vitro* by various solvents

Биомасса	Выход тотального экстракта %					
	метанол	этилацетат	ацетон	изопропанол	диэтиловый эфир	70%-этанол
каллус	6,76±0,68	0,74±0,07	0,51±0,05	0,93±0,09	0,37±0,04	4,77±0,48
суспензия	6,76±0,68	0,74±0,07	0,51±0,05	9,39±0,94	0,37±0,04	4,77±0,48
корни	6,76±0,68	0,74±0,07	0,51±0,05	15,39±1,54	0,37±0,04	4,77±0,48

Для получения большего количества экстракта из высушенной биомассы каллусных клеток Диоскореи кавказской целесообразно применять в качестве органического растворителя метанол; из

суспензионной культуры и бородатых корней – изопропанол.

Результаты подбора параметров экстракции (соотношения сырье:экстрагент, время и температура) метанолом

Таблица 2

Выход (%) сухого экстракта из высушенной биомассы каллусных культур Диоскореи кавказской в зависимости от соотношения сырье: экстрагент и продолжительности экстракции

Table 2

Yield (%) of dry extract from dried biomass of callus cultures of Caucasian dioscorea, depending on the ratio of raw materials: extractant and duration of extraction

№	Сырье: экстрагент	Выход экстракта, %, при разной продолжительности процесса, мин.					
		10	30	60	120	180	360
1	1:1	0,50±0,05	0,81±0,08	1,22±0,12	1,29±0,13	1,38±0,14	1,38±0,14
2	1:2	0,80±0,08	0,94±0,09	1,35±0,14	1,58±0,16	1,67±0,17	1,71±0,17
3	1:5	1,20±0,12	1,80±0,18	2,78±0,28	4,12±0,41	4,45±0,45	4,81±0,48
4	1:10	1,40±0,14	3,98±0,40	6,46±0,65	6,44±0,75	6,12±0,71	6,37±0,74
5	1:20	1,40±0,14	2,01±0,20	6,37±0,66	6,35±0,64	6,41±0,46	6,43±0,65

Таблица 3

Выход (%) сухого экстракта в зависимости от температурного режима экстракции из высушенной биомассы каллусных культур Диоскореи кавказской

Table 3

Yield (%) of dry extract depending on the temperature regime of extraction from dried biomass of callus cultures of Caucasian dioscorea

№	Температура, °С	Выход экстракта, %, при разной продолжительности процесса, мин.					
		10	30	60	120	180	360
1	25	1,20±0,12	1,80±0,18	2,78±0,28	5,88±0,59	5,95±0,60	5,81±0,58
2	40	1,55±0,16	1,98±0,20	6,92±0,69	6,21±0,62	6,18±0,62	6,24±0,62
3	60	1,79±0,18	2,35±0,24	6,68±0,67	7,74±0,77	7,01±0,70	7,12±0,71
5	Кипение	1,62±0,16	2,14±0,21	6,04±0,60	7,12±0,71	7,14±0,71	7,17±0,72

Таблица 4

Выход (%) сухого экстракта из высушенной биомассы суспензионных культур Диоскореи кавказской от соотношения сырье:экстрагент и продолжительности экстракции

Table 4

The yield (%) of dry extract from dried biomass of suspension cultures of Caucasian dioscorea depends on the ratio of raw materials: extractant and the duration of extraction

№	Сырье: экстрагент	Выход экстракта, %, при разной продолжительности процесса, мин.					
		10	30	60	120	180	360
1	1:1	0,50±0,05	0,81±0,08	1,22±0,12	1,29±0,13	1,38±0,14	1,38±0,14
2	1:2	0,80±0,08	0,94±0,09	1,35±0,14	1,58±0,16	1,67±0,17	1,71±0,17
3	1:5	1,20±0,12	9,18±0,92	9,28±0,93	9,52±0,95	9,45±0,95	9,81±0,98
4	1:10	1,40±0,14	8,98±0,90	8,46±0,85	8,45±0,85	8,12±0,81	8,37±0,84
5	1:20	1,40±0,14	7,01±0,70	7,57±0,76	7,35±0,74	8,41±0,84	8,53±0,85

клеточных культур *in vitro* Диоскореи кавказской представлены в табл. 2–7.

Результаты показывают, что максимальный выход экстракта (при использовании метанола) из высушенной биомассы каллусных клеток достигается при температуре 40°C, при соотношении

сырье:экстрагент – 1:10 и продолжительности 60 мин.

Максимальный выход экстракта из высушенной биомассы суспензионных культур Диоскореи кавказской наблюдается при использовании изопропанола при следующих параметрах: температура

Таблица 5

Выход (%) сухого экстракта в зависимости от температурного режима экстракции из высушенной биомассы суспензионных культур Диоскореи кавказской

Table 5

Yield (%) of dry extract depending on the temperature regime of extraction from dried biomass of suspension cultures of Caucasian dioscorea

№	Температура, °С	Выход экстракта, %, при разной продолжительности процесса, мин.					
		10	30	60	120	180	360
1	25	1,20±0,12	1,80±0,18	2,78±0,28	5,88±0,59	5,95±0,60	5,81±0,58
2	40	1,55±0,16	8,98±0,90	7,92±0,79	8,21±0,82	8,18±0,82	8,24±0,82
3	60	1,79±0,18	7,35±0,74	7,68±0,77	7,74±0,77	7,01±0,70	7,12±0,71
4	Кипение	1,62±0,16	2,14±0,21	6,04±0,60	7,12±0,71	7,14±0,71	7,17±0,72

Таблица 6

Выход (%) сухого экстракта комплекса БАВ из высушенной биомассы корневых культур *in vitro* Диоскореи кавказской от соотношения сырья:экстрагент и продолжительности экстракции

Table 6

The yield (%) of the dry extract of the BAS complex from the dried biomass of root cultures *in vitro* of the Caucasian dioscorea depends on the ratio of raw materials: extractant and the duration of extraction

№	Сырье: экстрагент	Выход экстракта, %, при разной продолжительности процесса, мин.					
		10	30	60	120	180	360
1	1:1	0,50±0,05	0,81±0,08	1,22±0,12	1,29±0,13	1,38±0,14	1,38±0,14
2	1:2	0,80±0,08	0,94±0,09	1,35±0,14	1,58±0,16	1,67±0,17	1,71±0,17
3	1:5	1,20±0,12	1,80±0,18	2,78±0,28	4,12±0,41	4,45±0,45	4,81±0,48
4	1:10	1,40±0,14	3,98±0,40	16,46±1,05	16,44±1,75	17,12±1,71	17,37±1,74
5	1:20	1,40±0,14	2,01±0,20	16,37±1,66	16,35±1,64	16,41±1,64	16,43±1,65

40°C, продолжительность 30 мин., соотношение сырья:экстрагент 1:5.

Оптимальными параметрами экстракции (при использовании изопропанола) БАВ корневой культуры *in vitro* Диоскореи кавказской являются: температура процесса 40°C,

продолжительность 60 мин., соотношение сырья:экстрагент 1:10.

Результаты ВЭЖХ образцов экстрактов из клеточных культур *in vitro* Диоскореи кавказской представлены в табл. 8.

Установлено, что наибольшее количество БАВ содержится в изопропанольном

Таблица 7

Выход (%) сухого экстракта в зависимости от температурного режима экстракции из высушенной биомассы корневой культуры *in vitro* Диоскореи кавказской

Table 7

The yield (%) of the dry extract depending on the temperature regime of extraction from the dried biomass of the root culture *in vitro* of the Caucasian dioscorea

№	Температура °С	Выход экстракта, %, при разной продолжительности процесса, мин.					
		10	30	60	120	180	360
1	25	1,20±0,12	1,80±0,18	2,78±0,28	5,88±0,59	5,95±0,60	5,81±0,58
2	40	1,55±0,16	1,98±0,20	16,92±1,69	16,21±1,62	16,18±1,62	16,24±1,62
3	60	1,79±0,18	2,35±0,24	16,68±1,67	17,74±1,77	17,01±1,70	17,12±1,71
4	Кипение	1,62±0,16	2,14±0,21	16,04±1,60	17,12±1,71	17,14±1,71	17,17±1,72

Таблица 8

Содержание БАВ в исследуемых экстрактах клеточных культур *in vitro* Диоскореи кавказской

Table 8

The content of BAS in the studied extracts of cell cultures *in vitro* of Caucasian dioscorea

Экстракт	Содержание БАВ, мг/кг									
	кофейная кислота	рутин	сумма экистероидов	мангиферин	кверцетин	сумма флавоно-гликозидов	апигенин	кодонопсин	кардиофоллин	колеофолд
кallусной культуры	1,60±0,08	0,77±0,04	0,04±0,002	0,51±0,03	0,13±0,01	0,93±0,05	4,15±0,21	0,97±0,05	0,74±0,04	4,77±0,24
суспензионной культуры	1,64±0,08	0,65±0,03	0,24±0,01	0,31±0,02	0,63±0,03	0,31±0,02	1,15±0,06	1,97±0,10	0,44±0,02	4,77±0,24
корневой культуры	9,60±0,48	10,77±0,54	7,04±0,35	5,51±0,28	14,13±0,71	7,93±0,40	24,15±1,21	0,37±0,02	10,74±0,54	14,77±0,74

экстракте корневой культуры *in vitro* Диоскореи кавказской. Результаты исследования индивидуального состава БАВ изопропанольного экстракта корневой культуры *in vitro* представлены на рис. 2–5.

Результаты анализа ТСХ экстрактов позволяют идентифицировать характерные спиростенолы: спиростен-5-3-ол, в виде глюкопиранозида и рамнопиранозида.

На полученной хроматограмме присутствуют пики четырех основных

гликозидов (со временами удерживания в пределах 15–19 мин.). На основании сопоставления времен удерживания со стандартными образцами пики идентифицированы как (25S)-дельтозид, дельтозид, (25S)-протодиосцин и протодиосцин.

Методом ЯМР-спектроскопии была установлена структура индивидуальных соединений: спиростенол А (выделен в количестве 2 мг), спиростенол Б (выделен в количестве 1,5 мг).



Рис. 2. Результаты анализа методом ТСХ фракций экстрактов комплекса БАВ из корневых культур *in vitro* Диоскореи кавказской

Fig. 2. Results of TLC analysis of fractions of extracts of the BAS complex from *in vitro* root cultures of Caucasian *dioscorea*

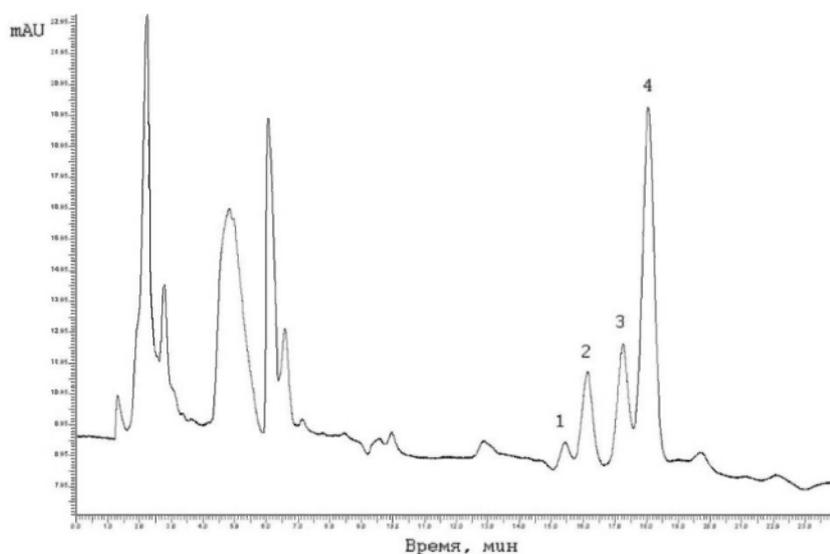


Рис. 3. ВЭЖХ профиль экстракта из корневых культур *in vitro* Диоскореи кавказской
1 – (25S)-дельтозид, 2 – дельтозид, 3 – (25S)-протодиосцин, 4 – протодиосцин

Fig. 3. HPLC extract profile from *in vitro* root cultures of Caucasian *dioscorea*
1 – (25S)-deltoside, 2 – deltoside, 3 – (25S)-protodioscine, 4 – protodioscine

В ходе проведенного исследования установлено, что максимальный выход тотального экстракта наблюдался при экстрагировании каллусной культуры с помощью метанола (6,76%), суспензионной и корневой культуры *in vitro* – изопропанолом (9,39 и 15,39% соответственно) Диоскореи кавказской. Были подобраны рабочие параметры экстракции, позволяющие получить максимальное содержание экстракта (следовательно и БАВ) клеточных культур *in vitro*

Диоскореи кавказской. Для каллусной культуры оптимальными параметрами экстракции метанолом стали: соотношение сырье:экстрагент – 1:10, температура 40°C, в течение 60 мин. Для суспензионной культуры оптимальными параметрами экстракции изопропанолом стали: соотношение сырье:экстрагент – 1:5, температура 40°C, в течение 30 мин. Для корневой культуры оптимальными параметрами экстракции изопропанолом стали: соотношение сырье:экстрагент – 1:10,

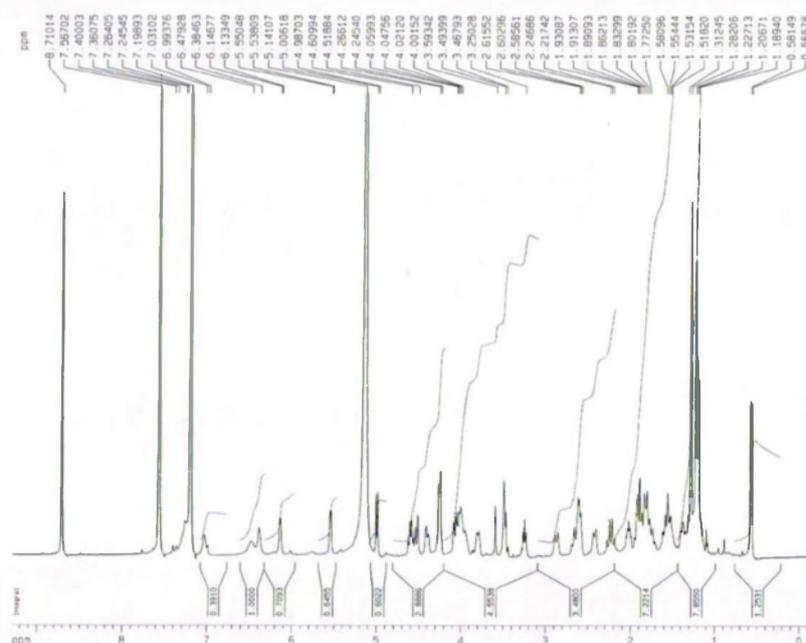


Рис. 4. ^1H ЯМР-спектр спиростенаола А, выделенного из экстрактов Диоскореи кавказской

Fig. 4. ^1H NMR spectrum of spirostenol A isolated from extracts of Caucasian dioscorea

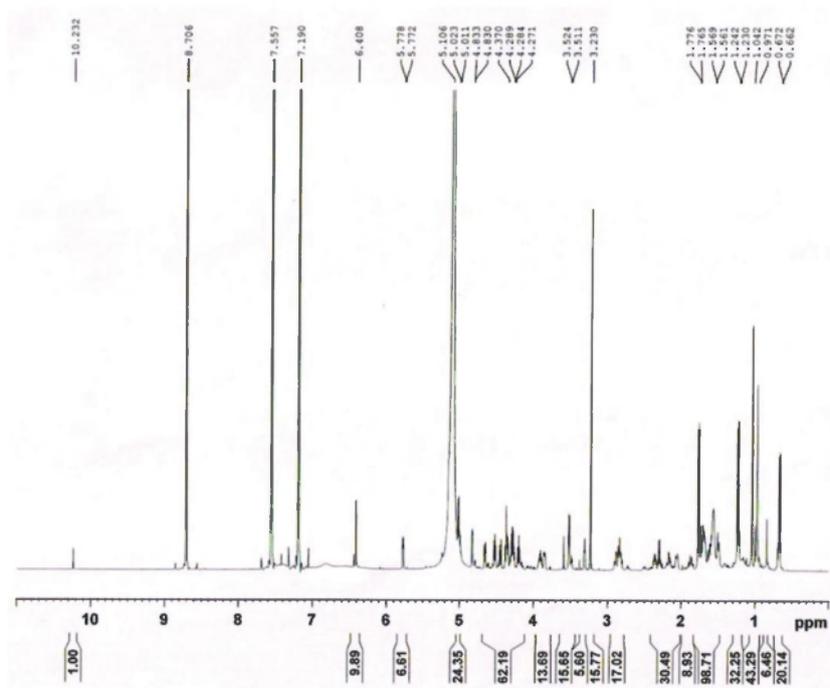


Рис. 5. ^1H ЯМР-спектр спиростенаола В, выделенного из экстрактов Диоскореи кавказской

Fig. 5. ^1H NMR spectrum of spirostenol B isolated from extracts of Caucasian dioscorea

температура 40°C, в течение 60 мин. При этом максимальное содержание БАВ (кофейной кислоты, рутина, экидистеронов, мангиферина, кверцетина, флавоногликозидов, апигенина, кардиофолина и колеофолида) наблюдалось в экстракте корневой культуры *in vitro* растения. В экстракте были идентифицированы: глюкопиранозид и рамнопиранозид, дельтозид, дельтозид (25S), протодиосцин (25S) и протодиосцин, спиростенол А и спиростенол Б.

Вывод

Диоскорея кавказская – перспективное лекарственное сырье, традиционно используемое в качестве кардиопротекторного средства. Сегодня данный вид растения во многих регионах России находится на грани исчезновения. Для того чтобы продолжать использовать данное растение (не нанося вреда

окружающей среде) и извлекаемые из него БАВ в целях здравоохранения (в рамках фармацевтического производства – лекарственные препараты и пищевого производства – ФПП и БАД), необходимо использовать биотехнологические методы культивирования клеток растений *in vitro*. В данной работе подобраны рабочие параметры экстрагирования наибольшего количества БАВ из клеточных культур *in vitro* Диоскореи кавказской. В ходе исследования было установлено, что для массового производства препаратов, пищевых добавок целесообразно использовать корневые культуры растения. Так как они, в сравнении с суспензионными и каллусными культурами, накапливают наибольшее количество БАВ, например, полифенолов (рутина, кверцетина), сапонинов – веществ, проявляющих противоиатеросклеротические свойства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Растительная биотехнология – способ рационального использования биосинтетического потенциал / Решетников В. [и др.] // Наука и инновации. 2014. № 5 (135). С. 21–25.
2. ВОЗ публикует статистику о ведущих причинах смертности и инвалидности [во всем мире за период 2000–2019 гг.] [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019> (дата обращения: 07.09.2021).
3. Lordan R. [et al.] Dairy Fats and Cardiovascular Disease: Do We Really Need to be Concerned? *Foods (Basel, Switzerland)*. 2018; (3): 9. <https://doi.org/10.3390/foods7030029>.
4. Роль оптимального питания в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний / Сметнева Н.С. [и др.] // Вопросы питания. 2020. Т. 89, № 3. С. 114–124.
5. Инновационная технология таблеток «Диосклефит» на основе Диоскореи кавказской (*Dioscorea caucasica* Lypsky) / Корочинский А.В. [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4 (13). С. 74–81.
6. Влияние регуляторов роста на морфогенетическую активность экпланотов *Dioscorea piperonica* Makino и образование полифенолов / Калашникова Е.А. [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. 2020. № 6–2 (96). С. 6–11.
7. Тания И.В., Шевчук О.М., Лейба Л.О. Редкие виды лекарственных растений Ризинского реликтового национального парка (Республика Абхазия) // Биология растений и садоводство: теория, инновации. 2021. № 1 (158). С. 38–51.
8. Lazim A.M. [et al.] Structure, physicochemical and toxicity properties of underused malaysian native Tuber's starch (*Dioscorea Pentaphylla*). *Journal of King Saud University Science*. 2021; 33(6): 101501. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101501>.
9. Li Q. [et al.] Physicochemical properties and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from *Dioscorea opposita* polysaccharides. *LWT* 2021; 149: 111833. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111833>.

10. Jiang Q. [et al.] Characterizations of starches isolated from five different *Dioscorea* L. species. *Food Hydrocolloids*. 2012;29(1):35-41. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.011>.
11. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / П.С. Чиков. М.: Картография, 1983. 340 с.
12. Кравцова Л.П. Оценка перспективности редких лекарственных растений при интродукции в Хакасии // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2019. № 5. С. 35–39.
13. Доан Т.Т., Калашникова Е.А., Молканова О.И. Клональное микроразмножение редких и исчезающих видов растений // *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 2012. № 5. С. 48–52.
14. Цитотоксичность и биологическая активность экстрактов редких лекарственных растений (*Dioscorea caucasica* Lypsky, *Astragalus dasyanthus* Pall, *Withania somnifera* L.) в условиях *in vitro* / Калашникова Е.А. [и др.] // *Norwegian Journal of Development of the International Science*. 2020. № 42-2. С. 8–12.
15. Особенности микрклонального размножения лекарственных растений рода *Dioscorea* с высоким содержанием биофлавоноидов в условиях *in vitro* / Калашникова Е.А. [и др.] // *Norwegian Journal of Development of the International Science*. 2019. № 11–2 (36). С. 3–8.
16. Sonibare M.A., Adeniran A.A. Comparative micromorphological study of wild and micropropagated *Dioscorea bulbifera* Linn. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2014;4(3):176-183. URL:[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60228-8](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60228-8).
17. Murashige T., Scoog F.A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture. *Physiology Plantarum*, 1962;15:473-49.
18. Novikova T. [et al.] *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Astragalus membranaceus* (Fisch. Ex Link) Bunge as a source of valuable secondary metabolites. *BIO Web of Conferences*. 2020;24:6.
19. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima O. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*. 1968;50(1):151–158.

REFERENCES:

1. Reshetnikov V., Spiridovich E., Fomenko T., Nosov A. Plant biotechnology – a way of rational use of biosynthetic potential. *Science and innovation*. 2014;5 (135):21–25. (In Russ.)
2. WHO publishes statistics on the leading causes of death and disability worldwide for the period 2000–2019 [Electronic resource]. Access mode: <https://www.who.int/ru/news/item/09-12-2020-who-reveals-leading-causes-of-death-and-disability-worldwide-2000-2019> (access date: 09/07/2021).
3. Lordan R. [et al.] Dairy Fats and Cardiovascular Disease: Do We Really Need to be Concerned? *Foods* (Basel, Switzerland). 2018;7(3):29. <https://doi.org/10.3390/foods7030029>.
4. Smetneva N.S. [et al.] The role of optimal nutrition in the prevention of cardiovascular disease. *Nutrition issues*. 2020;89(3):114-124. (In Russ.)
5. Korochinskiy A.V. [et al.] Innovative technology of Diosclefit tablets based on Caucasian *dioscorea* (*Dioscorea caucasica* lypsky). *Development and registration of medicines*. 2015;4(13):74–81. (In Russ.)
6. Kalashnikova E.A. [et al.] Influence of growth regulators on morphogenetic activity of *Dioscorea nipponica* Makino explants and formation of polyphenols. *International research journal*. 2020;6-2 (96):6–11. (In Russ.)
7. Tania I.V., Shevchuk O.M., Leiba L.O. Rare species of medicinal plants of the Ritsa relict national park (Republic of Abkhazia). *Plant biology and horticulture: theory, innovation*. 2021;1(158):38–51. (In Russ.)
8. Lazim A.M. [et al.] Structure, physicochemical and toxicity properties of underused malaysian native Tuber's starch (*Dioscorea Pentaphylla*). *Journal of King Saud University Science*. 2021;33(6):101501. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101501>.

9. Li Q. [et al.] Physicochemical properties and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from *Dioscorea opposita* polysaccharides. *LWT*. 2021;149:111833. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111833>.
10. Jiang Q. [et al.] Characterizations of starches isolated from five different *Dioscorea* L. species [Electronic resource]. *Food Hydrocolloids*. 2012;29(1):35-41. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.011>.
11. Atlas of areas and resources of medicinal plants in the USSR / P.S Chikov. Moscow: Cartography; 1983. (In Russ.)
12. Kravtsova L.P. Assessment of the prospects of rare medicinal plants for introduction in Khakassia. *International Journal of Applied and Basic Research*. 2019;5:35-39. (In Russ.)
13. Doan T.T., Kalashnikova E.A., Molkanova O.I. Clonal micropropagation of rare and endangered plant species. *News of the Timiryazev Agricultural Academy*. 2012;5:48-52. (In Russ.)
14. Kalashnikova E.A. [et al.] Cytotoxicity and biological activity of extracts of rare medicinal plants (*Dioscorea Caucasica* Lypsky, *Astragalus dasyanthus* Pall, *Withania somnifera* L.) in vitro. *Norwegian Journal of Development of the International Science*. 2020;42-2:8-12. (In Russ.)
15. Kalashnikova E.A. [et al.] Features of micropropagation of medicinal plants of the genus *Dioscorea* with a high content of bioflavonoids in vitro. *Norwegian Journal of Development of the International Science*. 2019;11-2(36):3-8. (In Russ.)
16. Sonibare M.A., Adeniran A.A. Comparative micromorphological study of wild and micropropagated *Dioscorea bulbifera* Linn. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2014;4(3):176-183. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60228-8](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60228-8).
17. Murashige T., Scoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture. *Physiology Plantarum*. 1962;15:473-497.
18. Novikova T. [et al.] *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Astragalus membranaceus* (Fisch. Ex Link) Bunge as a source of valuable secondary metabolites. *BIO Web of Conferences*. 2020; 24:6. (In Russ.)
19. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima O. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*. 1968;50(1):151-158.

Информация об авторах / Information about the authors

Анна Ивановна Лосева, начальник Управления научно-издательской деятельности ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»; кандидат технических наук

losevaa@mail.ru

Варвара Ивановна Минина, заведующая кафедрой генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», доктор биологических наук, доцент

Анна Владимировна Позднякова, доцент кафедры бионанотехнологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», кандидат технических наук

Елена Владимировна Остапова, профессор кафедры фундаментальной и прикладной химии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», доктор химических наук

Anna I. Loseva, Head of the Department of Scientific and Publishing Activities of FSBEI HE «Kemerovo State University»; Candidate of Technical Sciences

losevaa@mail.ru

Varvara I. Minina, Head of the Department of Genetics and Fundamental Medicine of FSBEI HE «Kemerovo State University», Doctor of Biological Sciences, Associate Professor

Anna V. Pozdnyakova, Associate Professor of the Department of Bionanotechnology of FSBEI HE «Kemerovo State University», Candidate of Technical Sciences

Elena V. Ostapova, Professor of the Department of Fundamental and Applied Chemistry of FSBEI HE «Kemerovo State University», Doctor of Chemical Sciences