



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A01H 4/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2020108276, 26.02.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.02.2020

Дата регистрации:
13.08.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.02.2020

(45) Опубликовано: 13.08.2020 Бюл. № 23

Адрес для переписки:

677000, Рес. Саха (Якутия), г. Якутск, ул.
Белинского, 58, СВФУ, Центр
интеллектуальной собственности

(72) Автор(ы):

Ханды Мария Терентьевна (RU),
Томилова Светлана Вячеславовна (RU),
Кочкин Дмитрий Владимирович (RU),
Носов Александр Михайлович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Северо-Восточный
федеральный университет имени
М.К.Аммосова" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2666920 C1, 13.09.2018, описание,
формула. Gantimur D. et al. Khellactone
derivatives from *Phlojodicarpus sibiricus*,
Chemistry of Natural Compounds, 1986, Vol. 22,
iss. 1, p. 103-104, ISSN 1573-8388 0009-3130, 1573-
8388, DOI:10.1007/BF00574597. Gantimur D. et
al. Coumarins from *Phlojodicarpus sibiricus*,
Chemistry of Natural Compounds, 1981, (см.
прод.)

(54) Штамм суспензионных культур клеток вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) - продуцент кумаринов

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности культивированию клеток растения вздутоплодника сибирского, и может быть использовано для получения биомассы клеток с содержанием кумаринов. Штамм суспензионных культур клеток вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.), полученный в условиях *in vitro*, идентифицированный и депонированный во Всероссийской коллекции культивируемых клеток высших растений (ВККК ВР) при Учреждении РАН Институт физиологии растений РАН,

регистрационный номер 97. Заявленное изобретение позволяет получить суспензионную культуру клеток из листьев асептических проростков через каллусные культуры клеток. При этом получаемая суспензионная культура клеток вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) характеризуется стабильными ростовыми параметрами и синтезирующими кумаринами и их гликозидами. Кроме того, для культивирования клеток отсутствует сезонная зависимость. 2 табл., 2 ил.

(56) (продолжение):

Vol. 17, iss. 1, p. 41-43, ISSN 1573-8388 0009-3130, 1573-8388, DOI:10.1007/BF00566431.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A01H 4/00 (2020.02)

(21)(22) Application: **2020108276, 26.02.2020**

(24) Effective date for property rights:
26.02.2020

Registration date:
13.08.2020

Priority:

(22) Date of filing: **26.02.2020**

(45) Date of publication: **13.08.2020 Bull. № 23**

Mail address:

**677000, Res. Sakha (Yakutiya), g. Yakutsk, ul.
Belinskogo, 58, SVFU, Tsentr intellektualnoj
sobstvennosti**

(72) Inventor(s):

**Khandy Mariia Terentevna (RU),
Tomilova Svetlana Viacheslavovna (RU),
Kochkin Dmitrii Vladimirovich (RU),
Nosov Aleksandr Mikhailovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniia "Severo-Vostochnyi federalnyi
universitet imeni M.K.Ammosova" (RU)**

(54) **STRAIN OF SUSPENSION CELL CULTURES PHLOJODICARPUS SIBIRICUS (STEPH_) K_-POL_ -
PRODUCER OF COUMARINS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, in particular to cultivation of cells of *Phlojodicarpus sibiricus*, and can be used for obtaining biomass of cells with coumarins content. Strain of suspension cultures of cells of *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol., obtained in *in vitro* conditions, identified and deposited in the All-Russian Collection of Cultivated Cells of Higher Plants, Institution of the Russian Academy of Sciences Institute of Plant Physiology, Russian

Academy of Sciences, registration number 97.

EFFECT: invention enables to obtain a suspension cell culture from aseptic sprout leaves through callus cell cultures; wherein the obtained suspension culture of *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph_) K_-Pol_ cells is characterized by stable growth parameters and synthesising coumarins and their glycosides; additionally, for cell cultivation there is no seasonal dependence.

1 cl, 2 tbl, 2 dwg

Изобретение относится к биотехнологии, в частности культивированию клеток растения вздутоплодника сибирского и может быть использовано для получения биомассы клеток с содержанием кумаринов.

Клетки *in vitro* являются экспериментально созданной популяцией дедифференцированных соматических клеток (см. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Москва, Россия: ФБК-Пресс, 1999, 160 с. (Butenko R.G. Biology of plant cell *in vitro* and biotechnology based on them. Moscow, Russia: FBK-Press, 1999, 160 pp.)). При создании определенных условий, система клеток *in vitro* может стать возобновляемым источником целевых биологически-активных веществ, при этом получаемое сырье стандартно, полностью свободно от всех видов поллютантов (см. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент. *Физиология растений*. 1999, 46(6), 837–844. (Nosov A.M. Plant cell culture: Unique system, model and tool. *Russian Journal of Plant Physiology*. 1999, 46 (6), 837–844)). Данная технология оправдывает себя при получении культур клеток ценных, редких и исчезающих растений с уникальными соединениями. С этой точки зрения перспективной может быть культура клеток лекарственного растения вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.).

Известно, что *P. sibiricus* используют при атеросклерозе, болезни Рейно, облитерирующем эндартериите, и хронической коронарной недостаточности (см. Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология. Руководство для врачей. Москва, Россия: Медицинское информационное агентство, 2000, 976 с. (Sokolov S.Ya. Herbal medicine and phytopharmacology. A guide for doctors. Moscow, Russia: Medical News Agency, 2000, 976 pp.); Гуляев С.М., Тараскин В.В., Урбанова Е.З. Адаптогенный эффект экстракта *Phlojodicarpus sibiricus* при ишемии головного мозга. *Оригинальные исследования*. 2019, 17(2), 63–66. <https://doi.org/10.7816/RCF17263-66> (Gulyaev S.M., Taraskin V.V., Urbanova E.Z. Adaptogenic effect of *Phlojodicarpus sibiricus* extract on cerebral ischemia. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019, 17(2), 63–66)), а также при заболеваниях легких, желудка и центральной нервной системы (см. Головкин Б.Н., Руденская Р.Н., Трофимова И.А., Шретер А.И. Биологически активные вещества растительного происхождения [Под редакцией В.Ф. Семихова]. Москва, Россия: Наука, 2001, 350 с. (Golovkin B.N., Rudenskaya R.N., Trofimova I.A., Schreter A.I. Biologically active substances of plant origin [Edited by V.F. Semikhov]. Moscow, Russia: Nauka, 2001, 350 pp); Урбанова Е.З., Гуляев С.М., Николаев С.М., Туртуева Т.А. Нейрофармакологические эффекты *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K.-Pol. *Вестник Бурятского государственного университета*. Выпуск «Медицина, фармация». 2013, 125–127. (Urbanova E.Z., Gulyaev S.M., Nikolaev S.M., Turtueva T.A. Neuropharmacological effects of *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. Ex Spreng.) K.-Pol. *Bulletin of the Buryat State University*. Issue "Medicine, Pharmacy". 2013, 125–127); Гуляев С.М. Защитное действие *Phlojodicarpus sibiricus* при ишемии головного мозга у крыс. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*, 2009, 67(3), 172–174. (Gulyaev S.M. Protective action of *Phlojodicarpus sibiricus* in cerebral ischemia in rats. *Acta Biomedica Scientifica*, 2009, 3, 172–174)).

Биологическая активность *P. sibiricus* обусловлена высоким содержанием пиранокумаринов виснадина и дигидросамидина в корнях и в корневище (не менее 3% согласно ФС 42-2667-89) (см. . Hoult J.R.S., Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1996, 27, 713–722; Яковлев Г.П. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения. 2-е изд., испр. и доп. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2009. 863 с.). На основе суммы кумаринов *P. sibiricus* выпускались

лекарственные средства сосудорасширяющего действия «Дидимин» и «Фловерин» (ВФС 42-1101-81), а также комплексный препарат «Сафинор», применяемый для улучшения работы сердечной мышцы при истощающих заболеваниях и тяжелой нагрузке. В настоящее время производство названных препаратов приостановлено из-за отсутствия сырья. В свою очередь, вздутоплодник сибирский занесен в Красные книги по всему ареалу произрастания – Якутии, Бурятии, Амурской области и Забайкальского края (см. Красная книга республики Саха (Якутия). Т. 1. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов. Москва, 2017; Красная книга Читинской области и Агинского Бурятского автономного округа: Растения. Чита, 2002; Перечень объектов растительного мира, занесенных в Красную книгу Забайкальского края (в редакции постановления Правительства Забайкальского края от 04 февраля 2014 года № 20); Постановление от 16 февраля 2010 года N 52 об утверждении перечня объектов растительного мира, занесенных в Красную книгу Забайкальского края (в редакции Постановлений Правительства Забайкальского края от 04.02.2014 N 20, от 27.05.2014 N 290, от 25.08.2015 N 428, от 24.08.2016 N 362)).

По данным доступной литературы, в корнях *P. sibiricus* обнаружены умбеллиферон, скополетин (см. Antonova O.K., Shemeryankin V.V.. Coumarins of the roots of *Phlojodicarpus sibiricus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 1981, 17(6), 588–588. doi:10.1007/BF00574388), виснадин (см. Nikonov G.K., Vandyshv V.V.. Visnadin – A new component of the plant genus *phlojodicarpus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 1969, 5(2), 101–102. doi:10.1007/BF00633290), дигидросамидин (см. Vabilev F.V., Nikonov G.K.. Coumarins of the roots of *Phlojodicarpus villosus* Turcz. *Chemistry of Natural Compounds*, 1965, 1 (5), 278–279. doi:10.1007/BF00563704), еще 17 соединений были обнаружены недавно: бергаптен, келлактон, 4'-О-ацетил-келлактон, 3',4'-ди-О-ацетил-келлактон, 4'-О-изобутироил-келлактон, d-лазерпитин, хиуганин С, хиуганин D, птериксин, суксдорфин, 3',4'-ди-О-сенециоил-келлактон, прерупторин D, 3',4'-ди-О-изобутироил-келлактон, прерозид II, 6'-О-апиозил-скиммин (адикардин), пеucedанол-7-О-глюкозид, пеucedанол-3'-О-глюкозид (см. 17. Olennikov D.N., Fedorov I.A., Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Vennos C. Khellactone Derivatives and Other Phenolics of *Phlojodicarpus sibiricus* (Apiaceae): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS/MS and HPLC-UV Profile, and Antiobesity Potential of Dihydrosamidin. *Molecules*, 2019, 24(12), 2286. doi:10.3390/molecules24122286).

Трава *P. sibiricus* содержит 6'-О-апиозил-скиммин (см. D. Gantimur, A. I. Syrchina, A. A. Semenov. Isoimperatorin from *Phlojodicarpus sibiricus* (англ.) // *Chemistry of Natural Compounds*. — 1986. — Vol. 22, iss. 1. — P. 104–105. — ISSN 1573-8388 0009-3130, 1573-8388. — DOI:10.1007/BF00574598), изоимператорин, флойодикарпин, изофлойодикарпин (см. D. Gantimur, A. A. Semenov. Coumarins from *Phlojodicarpus sibiricus* (англ.) // *Chemistry of Natural Compounds*. — 1981. — Vol. 17, iss. 1. — P. 41–43. — ISSN 1573-8388 0009-3130, 1573-8388. — DOI:10.1007/BF00566431), 7-гидрокси-8-(2',3'-дигидрокси-3'-метилбутил)-кумарин-7-О-глюкозид (см. D. Gantimur, A. I. Syrchina, A. A. Semenov. New glycosides from plants of the genus *Phlojodicarpus* (англ.) // *Chemistry of Natural Compounds*. — 1986. — Vol. 22, iss. 1. — P. 32–35. — ISSN 1573-8388 0009-3130, 1573-8388. — DOI:10.1007/BF00574575), 4'-О-метил-келлактон, суксдорфин (3'-О-ацетил-4'-О-изовалероил-келлактон), 3'-О-ацетил-4'-О-(2-метилбутироил)-келлактон (см. D. Gantimur, A. I. Syrchina, A. A. Semenov. Khellactone derivatives from *Phlojodicarpus sibiricus* (англ.) // *Chemistry of Natural Compounds*. — 1986. — Vol. 22, iss. 1. — P. 103–104. — ISSN 1573-8388 0009-3130, 1573-8388. — DOI:10.1007/BF00574597), 4'-О-ацетил-келлактон, хиунганин D, дигидросамидин, прерозид II, пеucedанол-3'-О-глюкозид. В траве также выявлены фенолпропаноиды кофеил-глюкозы и кофеилхинные кислоты, флавоноиды диосметин-

7-О-глюкозид и хризозериол-7-О-глюкозид.

Кроме того, известен способ получения адвентивных корней вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) в условиях *in vitro* (см. RU № 2666920, кл. А01Н 4/00, опубл. 13.09.2018).

5 При этом из уровня техники решения в области культивирования клеток *P. sibiricus* и растений рода *Phlojodicarpus* не выявлены.

Задачей настоящего изобретения является получение штамма суспензионных культур клеток вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) с характерными морфологическими, ростовыми, биосинтетическими параметрами и
10 отсутствием сезонной зависимости их получения.

Поставленная задача решена тем, что получен штамм суспензионных культур клеток вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) с содержанием кумаринов в условиях *in vitro*.

Анализ признаков заявленного решения свидетельствует о соответствии заявленного
15 решения критерию «новизна», штамм суспензионной культуры клеток вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) с содержанием кумаринов впервые получен в условиях *in vitro*.

Совокупность существенных признаков обеспечивает решение заявленной
20 технической задачи, а именно, стабилизацию ростовых параметров и морфологических характеристик культур клеток.

Штамм суспензионной культуры клеток вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) идентифицирован и депонирован во Всероссийской коллекции культивируемых клеток высших растений (ВККК ВР) при Учреждении РАН Институт физиологии растений РАН, 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35, регистрационный
25 номер 97.

Заявленное изобретение состоит в том, что за основу взяты 4-недельные каллусные культуры листового происхождения, индуцированные из семядольных листьев асептических проростков *in vitro*, полученных из семян южно-якутской популяции вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.).

30 Заявленное решение иллюстрируется чертежом, где на фигуре 1 представлен снимок суспензионной культуры клеток *P. sibiricus*; на фигуре 2 – графическая схема в нормальной системе координат динамики роста суспензионной культуры клеток *P. sibiricus* при выращивании в колбах объемом 250 мл.

Для получения суспензионных культур клеток в качестве экспланта были
35 использованы каллусные культуры гипокотильного и листового происхождения после 3-го цикла субкультивирования. Каллусные клетки помещали в колбы с жидкой питательной средой (MS с 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП) на круговую качалку (100 об/мин). Через 28 суток культивирования первичные суспензионные культуры пересаживали со степенью разведения инокулюм:свежая среда = 1:3.

40 Состав питательной среды представлен в таблице 1.

Таким образом, были получены суспензионные культуры клеток вздутоплодника сибирского из каллусов листового происхождения (см. фиг. 1). В процессе культивирования определили ростовые и биосинтетические характеристики. Полученные данные позволяют отнести штамм к хорошо растущим (см. кривую роста на фиг. 2,
45 параметры роста – в таблице 2).

Культивирование клеток производили в колбах с объемом 250 мл на качалке в темноте при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$, влажности воздуха $70 \pm 5\%$. Объем питательной среды: 40 мл, скорость перемешивания 100 ± 10 об/мин, кратность посева: инокулюм:свежая

среда = 1:3, продолжительность цикла субкультивирования - 21 сутки.

Штамм суспензионной культуры клеток вздутоплодника сибирского обладает следующими признаками: бело-желтый цвет, содержит агрегаты клеток меристемоподобного и паренхимоподобного типа, также одиночные

5 меристемоподобные, паренхимоподобные и удлиненные клетки.

Анализ наличия в исследуемой культуре клеток кумаринов проводили с помощью хроматографии в тонком слое силикагеля (ТСХ).

Для приготовления проб брали навеску измельченного воздушно-сухого растительного материала (20-80 мг) и экстрагировали в 1 мл 70 % раствора (по объему)

10 водного этилового спирта в течение 30 минут под действием ультразвука (УЗВ-12, Сапфир, Россия; рабочая чистота 35 кГц, температура – комнатная), после чего, центрифугировали при частоте оборотов 10000 об/мин в течение 10 минут (микроцентрифуга МЦФ, Россия).

Для анализа методом ТСХ пробы в объеме 5-10 мкл наносили с помощью

15 микрошприца (Hamilton Bonaduz, Швейцария) на пластинку для тонкослойной хроматографии (Silica gel, Supelco Analytical/Sigma-Aldrich, Германия). Для разделения использовали следующие системы растворителей:

А) для разделения неполярных соединений: этилацетат-гексан (1:1, по объему);

Б) для разделения полярных соединений (в т.ч. гликозидов): этилацетат - уксусная

20 кислота - вода (16:4,5:4,5 по объему).

Для проявления хроматограмм использовали следующие реактивы и подходы:

1. для одновременного обнаружения соединений разных структурных классов (тритерпеновые, стероидные, фенольные производные) пластинку обрабатывали

25 реактивом «анисовый альдегид-серная кислота» (Wagner and Bladt, 1996), при этом смесь включает 20 мл 96 % этилового спирта, 100 мкл анисового альдегида (Sigma-Aldrich, Германия) и 1 мл концентрированной серной кислоты). После чего, пластинку с реактивом прогревали в термостате при температуре 121°C в течение 3-5 минут до

появления интенсивно окрашенных пятен;

2. для обнаружения кумаринов и их производных хроматограмму просматривали в

30 УФ-свете (лампа черного цвета Вуда) без обработки или после обработки 10 % спиртовым раствором гидроксида калия (Wagner and Bladt, 1996);

3. для обнаружения кумаринов и их производных также хроматограмму обрабатывали

диазотированной сульфаниловой кислотой (Wagner and Bladt, 1996).

На первом этапе фитохимического изучения биомассы культур клеток

35 вздутоплодника был произведен поиск в ней агликонов кумаринов, поскольку именно эти соединения являются характерными вторичными метаболитами *P. sibiricus*. При просмотре хроматограммы (система растворителей А) в УФ-свете были обнаружены несколько флуоресцирующих пятен: два – в экстракте вздутоплодника, и одно – в

40 экстракте из биомассы суспензионной культуры клеток этого растения. Предполагается, что пятна соответствуют кумаринам. Данный вывод подтверждается усилением флуоресценции пятен после обработки хроматограммы 10 % спиртовым раствором щелочи. Косвенно, идентификация этих соединений подтверждается тем, что соответствующие им хроматографические зоны не обнаруживаются при обработке

45 хроматографической пластинки реактивом «анисовый альдегид-серная кислота».

Полученные результаты позволяют предположить, что в биомассе суспензионной культур клеток *P. sibiricus* присутствуют гликозиды кумаринов.

Полученный штамм обладает высокой жизнеспособностью – около 75 % сохраняют

стабильные ростовые характеристики (см. таблицу 2). В штамме культуры клеток

вздутоплодника сибирского обнаружены кумарины и их гликозиды.

Таким образом, заявленное решение позволяет получить суспензионную культуру клеток из листьев асептических проростков через каллусные культуры клеток. При этом суспензионная культура клеток вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.) характеризуется стабильными ростовыми параметрами и синтезирующими кумаринами и их гликозидами. Кроме того, для культивирования клеток отсутствует сезонная зависимость.

Таблица 1

Состав питательной среды

	NH ₄ NO ₃	1650 мг/л
	KNO ₃	1900 мг/л
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	370 мг/л
	KH ₂ PO ₄	170 мг/л
15	CaCl ₂ ×2H ₂ O	440 мг/л
	H ₃ BO ₃	6,2 мг/л
	MnSO ₄ ×4H ₂ O	22,3 мг/л
	ZnSO ₄ ×4H ₂ O	8,6 мг/л
	KI	0,83 мг/л
20	Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0,25 мг/л
	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,025 мг/л
	CoCl ₂ ×6H ₂ O	0,025 мг/л
	FeSO ₄ ×7H ₂ O	27,8 мг/л
	Na-ЭДТА	37,3 мг/л
25	Инозитол	100 мг/л
	Тиамин	0,1 мг/л
	Пиридоксин	0,5 мг/л
	Никотиновая кислота	0,5 мг/л
	Сахароза	30 г/л
	2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д)	1,0 мг/л
30	6-бензиламинопурин (БАП)	0,5 мг/л

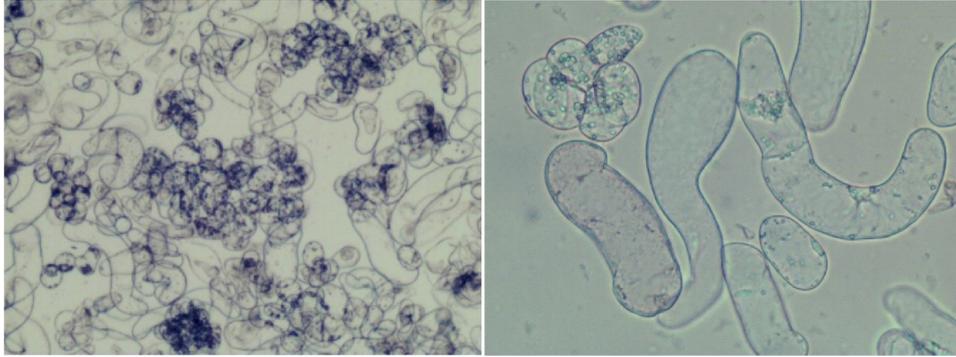
Таблица 2

Ростовые характеристики суспензионной культуры клеток *P. sibiricus*

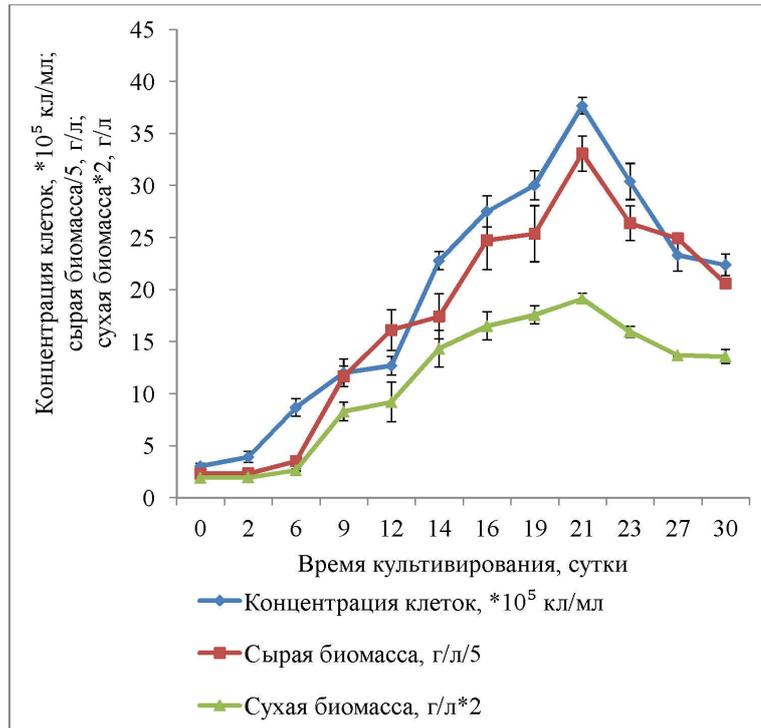
	I	μ, сут ⁻¹	τ, сут	M _{max} , г/л	γ	P, г/(лхсут)
35	Концентрация клеток	12,40	0,30	2,35	9,58	0,29
	Сырая биомасса	14,16	0,40	1,73		
	Сухая биомасса	9,98	0,38	1,82		

(57) Формула изобретения

Суспензионная культура клеток вздутоплодника сибирского (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph.) K.-Pol.), регистрационный номер ВККК ВР 97 - продуцент кумаринов.



Фиг. 1



Фиг. 2