

УДК 582.71:57.085.33:615.32

## ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК КРОВОХЛЕБКИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ *SANQUISORBA OFFICINALIS* (L)

© А.Н. Акулов

Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра  
Российской академии наук, ул. Лобачевского, 2, Казань, 420111 (Россия)  
Казанский федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008  
(Россия), e-mail: akulov\_anton@mail.ru

Из тканей семян кровохлебки лекарственной были получены каллусные культуры. Длительнопассируемые суспензионные культуры получили переносом каллусных культур в жидкую питательную среду. Прирост биомассы суспензионной культуры кровохлебки за пассаж составил 501%, выход сухой биомассы составил 120 мг/г сырого веса. Содержание извлекаемых спиртом фенольных соединений в суспензионной культуре кровохлебки увеличивалось в ходе пассажа и достигало максимума (34.6 мг/г сухого веса) на 22-е сутки культивирования. Был проведен ВЭЖХ-анализ фенольных соединений суспензионной культуры и корневищ растений кровохлебки. Доля некоторых фенольных соединений в полученной культуре существенно выше, по сравнению с их долей в корневищах растений. Такими соединениями являлись галловая, феруловая и кофейная кислоты, а также конденсированные танины. Кроме того, полученная культура может быть объектом для проведения экспериментов по усилению синтеза фенольных соединений под действием различных индукторов. Все это позволяет рассматривать полученную культуру как потенциальный источник биологически активных соединений фенольной природы.

*Ключевые слова:* кровохлебка лекарственная, *Sanquisorba officinalis* (L.), культура клеток, высокоэффективная жидкостная хроматография, фенольные соединения.

### Введение

Кровохлебка лекарственная *Sanquisorba officinalis* (L.) – многолетнее травянистое растение семейства *Rosaceae*. Занесена в Красные книги Латвии, Харьковской области Украины, в России в Красные книги Вологодской, Ивановской и Костромской областей. Кровохлебка лекарственная включена в фармакопею СССР с 1952 г. [1] и в настоящее время – в государственный реестр лекарственных средств Российской Федерации [2]. Экстракты и отвары применяют при амёбной дизентерии, различных желудочно-кишечных заболеваниях, при геморроидальных и маточных кровотечениях и при тромбозе кровеносных сосудов конечностей. Наружно ее применяют для лечения трофических язв, ожогов, в виде вяжущих полосканий при стоматитах, а также при некоторых гинекологических заболеваниях. Установлено антисептическое действие экстракта кровохлебки в отношении кишечной палочки и менее выраженное – в отношении брюшнотифозной, паратифозной и дизентерийной палочек. Основными биологически активными соединениями кровохлебки являются фенолкарбоновые кислоты (галловая и эллаговая) [3], дубильные вещества пирогалловой группы [4], танины [5], эфирное масло, сапонины [6], в небольшом количестве флавоноиды (рутин, кверцетин) [7]. В лечебных целях применяются корни и корневища кровохлебки, заготавливаемые в период плодоношения, когда соцветия приобретают темно-красный цвет. Заготовку растительного сырья можно производить начиная со второго года жизни растения [8]. В настоящее время наряду с традиционными способами получения биологически активных соединений из растительного сырья внедряются также и биотехнологические методы, связанные с получением культуры клеток [9–11]. В литературе существуют работы по получению суспензионных культур и культуры корней кровохлебки лекарственной [12]. Однако в таких работах не проводился сравнительный анализ фенольных соединений растений и полученных из них культур клеток. В связи с этим целью работы являлось получение

Акулов Антон Николаевич – старший научный сотрудник, ассистент кафедры,  
e-mail: akulov\_anton@mail.ru

культуры клеток и сравнительный анализ качественного состава фенольных соединений культуры клеток и корней растений кровохлебки лекарственной.

### Экспериментальная часть

В качестве исходного материала были использованы семена кровохлебки лекарственной *Sanquisorba officinalis* (L.), предоставленные ботаническим садом Казанского государственного медицинского университета. Для получения биомассы корней растения выращивали в течение одного вегетационного сезона в смеси верхового сфагнового торфа, дерновой земли и песка в ящиках на экспериментальной площадке. Сбор, сушку и хранение корневищ кровохлебки лекарственной проводили по методике, описанной в государственной фармакопее [1]. Растения выкапывали целиком, надземную часть отрезали, корневища тщательно очищали и промывали. Затем разрезали на небольшие кусочки длиной 10–15 см и сушили в проветриваемом помещении, избегая попадания прямых солнечных лучей. Сухие корневища хранили в плотно закрытых емкостях. Для получения культур клеток кровохлебки лекарственной использовали семена.

Были использованы питательные среды MS б/г и MS 2/0.5, приготовленные на основе солевой основы по Мурасиге–Скугу [13] и среда RX [14]. Среда для получения и поддержания суспензионной культуры не содержала агара. pH всех питательных сред доводили до 5.5–5.6 и автоклавировали 40 мин при давлении 0.8 атм.

Для получения культур клеток кровохлебки лекарственной семена были промыты водопроводной водой и затем помещены в марлевые мешочки по 15–20 семян и плотно завязаны. В ламинарном боксе мешочки с семенами помещали в стерильные банки и заливали стерилизующим раствором, представляющим собой 5% раствор гипохлорита натрия в 10% этиловом спирте. Мешочки с семенами оставляли на 10 мин, следя за тем, чтобы они были полностью погружены в раствор и не имели воздушных карманов. Затем стерильным пинцетом мешочки переносили в банку со стерильной дистиллированной водой и оставляли на 15 мин. Для полного удаления стерилизующего раствора смену воды осуществляли трижды. После этого мешочки переносили в стерильную чашку Петри и раскрывали. Стерильным пинцетом каждое семя переносили на чашку Петри с питательной средой MS и помещали в термостат, в темноту при температуре 25 °С. Появившиеся 3–4-дневные проростки в стерильных условиях переносили в колбы со средой MS (табл. 1) и выставляли на свет для выращивания растений. Полученные 10–12-дневные растения в стерильных условиях скальпелем разделяли на листовые и корневые экспланты размером 2–3 мм, которые помещали на среду RX и среду MS 2/0.5 (табл. 1). Через 4 недели ни в одном из помещенных на питательную среду эксплантов не образовался каллус. Вторым подходом для получения каллуса была выбрана прямая индукция из тканей зародыша. Для этого простерилизованные описанным выше способом семена кровохлебки помещали непосредственно на питательные среды с добавлением фитогормонов. Через неделю семенная кожура семян разрывалась, и зародыш оказывался на питательной среде. Через три недели от момента начала эксперимента на поверхности свободных от семенной кожуры зародышей появлялся первичный каллус, причем основная часть первичного каллуса находилась в области корешка. Первичный каллус представлял собой глобулярные структуры коричневатого-серого цвета с ослизненной поверхностью (рис. 1а). Необходимо отметить, что каллус образовывался только на среде RX, на среде MS 2/0.5, образование каллуса отмечено не было. Такое различие могло быть обусловлено наличием в составе среды RX гидролизата казеина, являющегося источником органического азота.

Через 4 недели культивирования первичный каллус вместе с эксплантом переносили на свежую среду RX. В процессе культивирования из части клеток первичного каллуса образовался вторичный. Вторичный каллус представлял собой плотные глобулярные структуры серовато-желтого цвета (рис. 1б). Вторичный каллус отделяли и культивировали в темноте на среде RX, перенося на свежую среду через каждые 28 дней. Поскольку полноценное использование каллусных культур для биотехнологических целей является невозможным, то необходимо получить суспензионную культуру, которая по сравнению с каллусной тканью, выращиваемой на агаризованной поверхности, дает больше возможность быстрого набора биомассы для получения БАВ и использования в технических циклах. Для получения суспензионных культур чаще всего используют каллусную ткань рыхлого типа, которая легко фрагментируется на отдельные клетки и небольшие агрегаты при помещении ее в перемешиваемую жидкую среду. Для получения суспензионной культуры кусочки каллуса переносили в колбы с жидкой питательной средой RX и помещали в темноту на орбитальный шейкер-инкубатор с частотой вращения 130 об/мин при температуре 25 °С. Через 2 недели культивирования с помощью сита с размером ячеек 3–4 мм крупные агрегаты были отделены и перенесены в чистую колбу со средой RX для дальнейшего субкультивирования. Пошедшие сито мелкие агрегаты и клеточная взвесь были собраны, сконцентрированы и также помещены в колбу со средой RX. Дальнейшее субкультивирование суспензии проводили тем же образом, отделяя появляющиеся

крупные агрегаты от мелких агрегатов и клеточной взвеси, и перенося клеточную массу в свежую среду раз в три недели. Полученная таким образом суспензионная культура имела коричневато-серый цвет, клеточные агрегаты разного размера и клеточную взвесь. По сравнению с другими компонентами питательной среды RX гидролизат казеина является достаточно дорогим, и возникает необходимость его замены или исключения. Нами была предпринята попытка перевести суспензионную культуру со среды RX на среду MS 2/0.5. Для этого часть фракции, состоящей из крупных агрегатов, была помещена в колбу со средой MS 2/0.5 и оставлена на три недели. Через три недели мелкоклеточная и крупная фракции были разделены с помощью сита и снова помещены в среду MS 2/0.5. При дальнейшем культивировании было отмечено, что клеточная часть суспензии становилась светлее по сравнению с исходной и приобретала желтоватую окраску (рис. 1в). В дальнейшем для определения физиологических и биохимических характеристик использовали суспензионную культуру на среде MS 2/0.5.

Таблица 1. Состав питательных сред

Компоненты	Содержание компонента в питательной среде, мг/л		
	MS	MS 2/0.5	RX
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.0	1650.0	–
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	–	134.0
KNO <sub>3</sub>	1900.0	1900.0	2500.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370.0	370	250.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	–	–	150.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.0	170.0	–
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440.0	440.0	150.0
KI	0.83	0.83	0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.3	6.3	3.0
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	22.3	13.2
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	2.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.02
Na <sub>2</sub> -ЭДТА	37.3	37.3	37.3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	27.8
Мезоинозит	100.0	100.0	100.0
Тиамин (B <sub>1</sub> )	2.0	2.0	2.0
Пиридоксин (B <sub>6</sub> )	1.0	1.0	1.0
Никотиновая кислота (B <sub>5</sub> )	1.0	1.0	1.0
Гидролизат казеина	–	–	2000.0
2,4-Д	–	2.0	2.0
ИУК	–	–	0.5
НУК	–	0.5	0.5
кинетин	–	–	0.2
Сахароза	25000.0	7500.0	25000.0
Агар-агар	7500.0	7500.0	7500.0

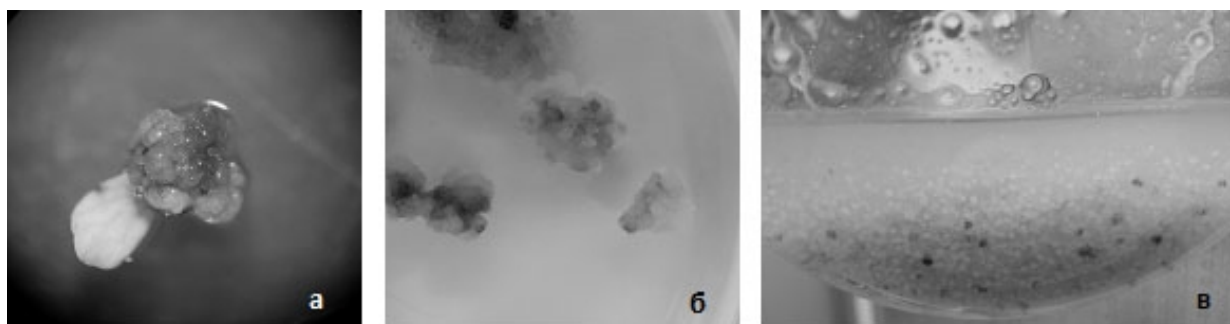


Рис. 1. Культивируемые клетки кровохлебки лекарственной: а – первичный каллус, б – длительно пассируемый каллус, в – суспензионная культура

Для определения прироста сырой и сухой биомассы навески клеточной массы суспензионной культуры помещали в колбы с жидкой питательной средой и через определенные интервалы времени отбирали жидкость, а клеточную массу взвешивали. Взвешенные навески помещали на чистые чашки Петри и лиофильно высушивали при использовании лиофильной сушки «Martin Christ» и затем снова взвешивали. Прирост сырой биомассы рассчитывали по формуле:

$$M=(m_{\text{кон}}-m_{\text{нач}})/m_{\text{нач}}\times 100,$$

где  $m_{\text{нач}}$  – масса навески в начале культивирования,  $m_{\text{кон}}$  – масса навески в конце культивирования. Выход сухой биомассы рассчитывали как отношение сухой биомассы навески к сырой и выражали в мг на грамм сырого веса.

Для определения суммы растворимых фенольных соединений высушенные корневища растирали в порошок, а клеточную массу суспензионной культуры отделяли от среды культивирования, лиофильно высушивали и затем растирали в порошок. К навеске 25 мг добавляли 300 мкл 80%-го этанола и инкубировали на водяной бане при температуре 80 °С в течение 30 мин. Полученный экстракт центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин. Определение содержания растворимых фенольных соединений проводили по методу Фолина-Чокальтеу в модификации Синглтона-Росси [15]. К 0.1 мл спиртового экстракта фенольных соединений добавляли 0.5 мл реактива Фолина-Чокальтеу, через 3 мин приливали 0.4 мл водного раствора соды  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75 г/л). В контрольные пробирки вместо экстракта вносили 0.1 мл 80% метанола. Пробирки с реакционной смесью хорошо встряхивали и оставляли на 2 ч в темноте. Измерение оптической плотности проводили в микрокуветах на спектрофотометре при длине волны 765 нм. Содержание фенольных соединений в экстракте определяли с помощью калибровочной кривой, построенной по галловой кислоте. Содержание ФС выражали в мг-экв галловой кислоты на 1 г сухого веса. Для расчета содержания внутриклеточных фенольных соединений в образце использовали формулу

$$\Phi=(C\times V_{\text{экстракта}})/(m\times 1000),$$

где  $\Phi$  – общее содержание фенольных соединений, мг-экв галловой кислоты/г сухого веса,  $C$  – концентрация ФС, полученная по калибровочной кривой, исходя из оптической плотности образцов, мг-экв галловой кислоты/л,  $V_{\text{экстракта}}$  – общий объем экстракта, мл,  $m$  – масса навески, г, 1000 – коэффициент перевода л в мл (объема экстракта).

Для разделения фенольных соединений методом ВЭЖХ образцы готовили следующим образом: клеточную биомассу отделяли от среды, лиофильно высушивали и вычисляли сухой вес. Сухую ткань растирали, к навеске (25 мг) добавляли 80% метанола (300 мкл) и инкубировали на водяной бане при температуре 80 °С в течение 30 мин. Полученный экстракт осаждали при 12000 g в течение 10 мин. Разделение фенольных соединений проводили на хроматографической системе высокого давления Breeze (Waters, США). Использовали оригинальную колонку Symmetry® C18, 100Å, 5 µm, 3,9 mm×150 mm (Waters, США). Детекцию пиков осуществляли посредством двуволнового УФ ВЭЖХ детектора Waters 2489 (Waters, США) при длине волны 280 и 360 нм. Для разделения использовали следующие растворы: Раствор А: 2.5% уксусная кислота, метанол, ацетонитрил (40:0:1) Раствор Б: 2.5% уксусная кислота, метанол, ацетонитрил (40:40:1). Скорость потока – 0.25 мл/мин. Градиент раствора Б был сделан по следующей схеме: 0–2 мин раствор А : раствор Б = 95 : 5; 2–30 мин раствор А : раствор Б = 95 : 5 → 5 : 95; 30–40 мин раствор А : раствор Б = 5 : 95; 40–43 мин раствор А : раствор Б = 5 : 95 → 95 : 5, 43–45 мин раствор А : раствор Б = 95:5. На колонку вносили по 20 мкл спиртового экстракта фенольных соединений, содержащего 1–5 мкг фенольных соединений. Идентификацию пиков проводили, используя набор стандартных фенольных соединений (галловая, феруловая, кофейная, бензойная, кумаровая кислоты, катехин, эпикатехин, рутин, кверцетин). Для расчета доли каждого из идентифицированных соединений строили калибровочные кривые с соответствующими стандартами.

Каждый опыт проводили в трех биологических повторностях. Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета статистического анализа программы Microsoft Office Excel 2007. Данные представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего значения при доверительной вероятности 95%.

### **Обсуждение результатов**

Прирост биомассы суспензионной культуры кровохлебки за пассаж составил 501%., при этом кривая роста имела типичный вид. Выход сухой биомассы в конце пассажа составил 120 мг/г сырого веса (рис. 2).

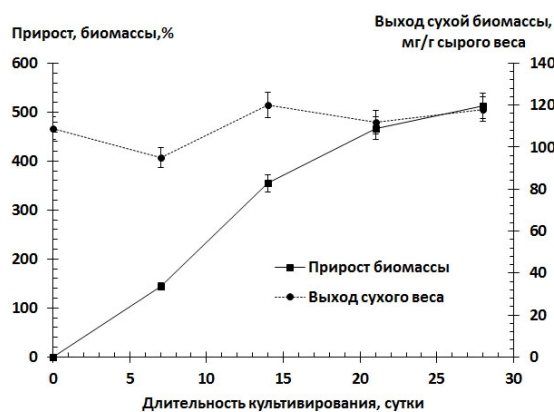


Рис. 2. Прирост сырой биомассы и выход сухой биомассы суспензионной культуры кровохлебки

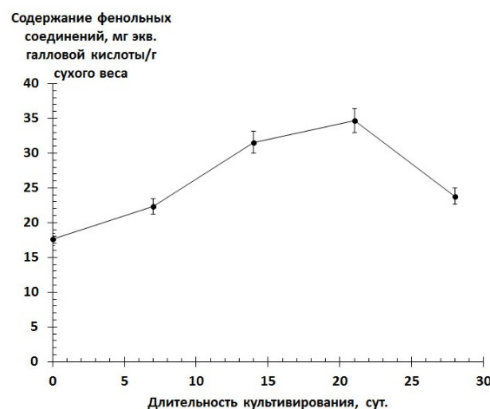


Рис. 3. Содержание фенольных соединений в суспензионной культуре кровохлебки

Содержание извлекаемых спиртом фенольных соединений в суспензионной культуре кровохлебки увеличивалось в ходе пассажа и достигало максимума (34.6 мг/г сухого веса) на 22-е сутки культивирования (рис. 3). В конце пассажа содержание фенольных соединений уменьшалось, что могло быть связано с их экскрецией в среду культивирования, о чем свидетельствует заметное изменение цвета питательной среды после 25 суток пассажа, что вероятно связано с накоплением в среде культивирования танинов. Показано, что в культуре корней кровохлебки накапливаются танины [16], которые могут секретироваться в среду культивирования или подпадать туда в результате гибели клеток в конце пассажа. В этом случае выделение танинов в среду культивирования будет приводить к их связыванию с компонентами питательной среды, например катионами двух и трехвалентных металлов. В связи с этим оптимальным периодом для отбора биомассы для определения качественного состава фенольных соединений были выбраны 22-е сутки культивирования.

ВЭЖХ-анализ извлекаемых спиртом фенольных соединений позволил выявить наличие фенольных соединений, характерных для кровохлебки, как в корнях, так и в биомассе суспензионной культуры, среди них фенольные кислоты и флавонолы (рис. 4).

В корневище кровохлебки было отмечено присутствие флавоноидов рутина и кверцетина, доля которых в суспензии была незначительной (табл. 2).

Это согласуется с данными литературы о том, что флавоноиды накапливаются в надземной части растений [17]. Кроме того, в экстрактах корневищ было отмечено наличие двух неидентифицированных пиков, доля которых была выше по сравнению с остальными пиками и которые отсутствовали в экстракте суспензионной культуры. Можно предположить, что данными соединениями могли являться производные эпикатехина и галловой кислоты, в том числе эпикатехин галлат и эпикатехин галлат, доля которых, по данным литературы, в корнях наибольшая [17]. Отсутствие этих пиков в суспензионной культуре может быть следствием меньшей дифференцированности ее клеток, по сравнению с корневищем, а также перестройкой метаболических путей при культивировании *in vitro*. При этом важно отметить, что несмотря на культивирование в искусственных условиях, клетки кровохлебки сохраняют способность синтезировать некоторые фенольные соединения характерные для целых растений.

Было отмечено, что в клетках суспензии доля галловой и кофейной и феруловой кислот была значительно выше по сравнению с корневищами (табл. 2). Вероятно, увеличение синтеза этих фенольных кислот связано с их участием в защитных и адаптивных реакциях к условиям *in vitro*. Известно, что галловая, феруловая и кофейная кислоты обладают широким спектром биологической активности, в том числе противовоспалительными [18], антибактериальными [19] и антиоксидантными свойствами [20, 21]. Отмечено, что доля катехина и эпикатехина, которые являются характерными соединениями кровохлебки [17], была выше в экстрактах корневищ. Основными фенольными соединениями корней у кровохлебки являются кумарин и такие полифенолы, как эпикатехингаллат и эпигаллокатехин [17, 22]. Относительно невысокая доля свободных катехина и эпикатехина в суспензионной культуре, по сравнению с корневищем, вероятно, обусловлена более интенсивным их включением в состав танинов, о чем свидетельствует потемнение в конце пассажа как самих клеток суспензионной культуры, так и культуральной жидкости.

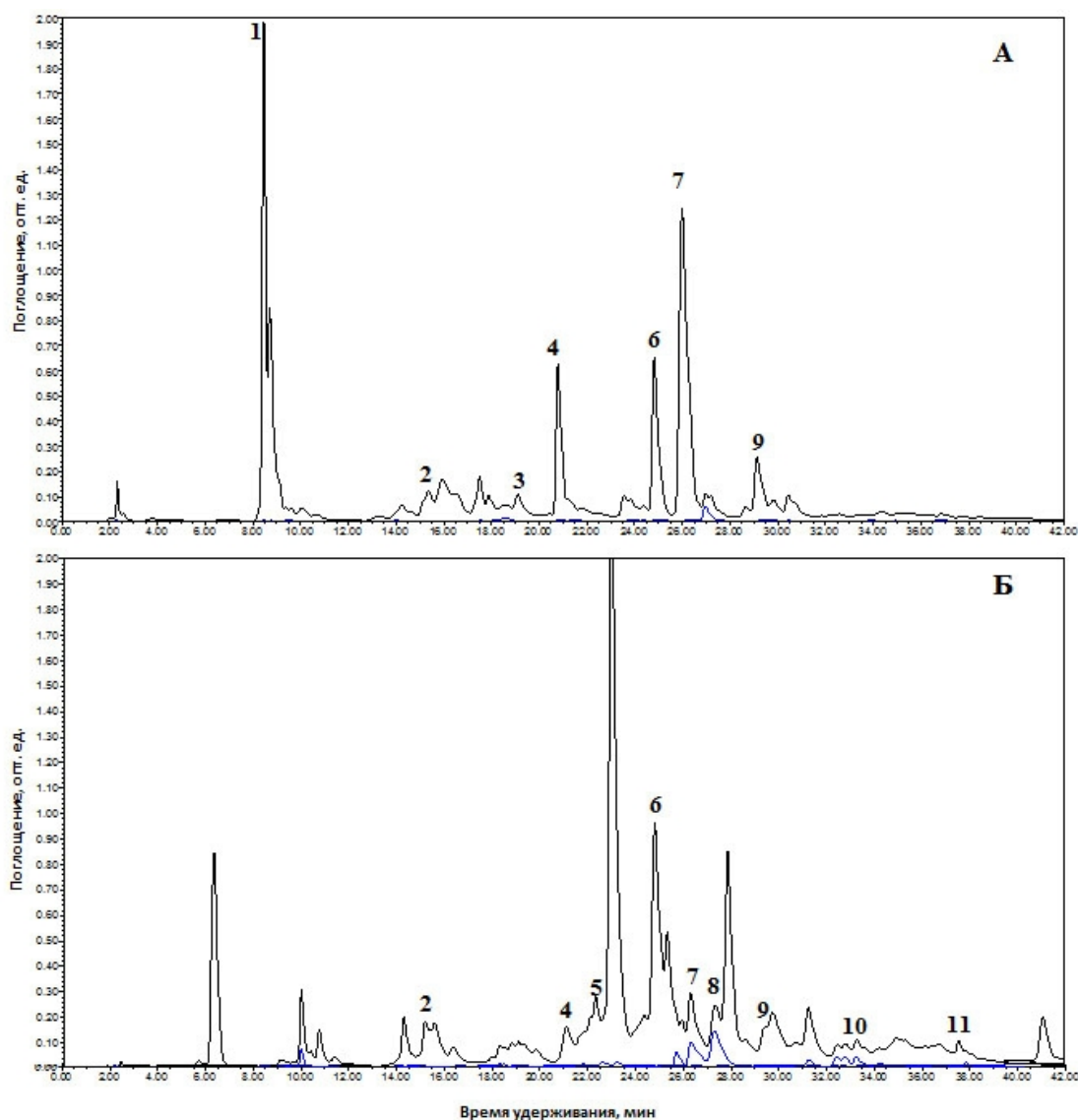


Рис. 4. ВЭЖХ спиртового экстракта фенольных соединений суспензионной культуры (А) и корней (Б) кровохлебки лекарственной. Черным – поглощение при 280 нм, синим – при 360 нм.

Идентифицированные пики: 1 – галловая кислота, 2 – катехин, 3 – хлорогеновая кислота, 4 – кофейная кислота, 5 – эпикатехин, 6 – кумаровая кислота, 7 – феруловая кислота, 8 – рутин, 9 – бензойная кислота, 10 – анисовая кислота, 11 – кверцетин

Таблица 2. Доля идентифицированных фенольных соединений в экстрактах кровохлебки, % от сухого веса

Номер пика	Соединение	Объект	
		Суспензионная культура	Корневища
1	галловая кислота	0.03	–
2	катехин	0.055	0.11
3	хлорогеновая кислота	0.004	–
4	кофейная кислота	0.02	0.01
5	эпикатехин	–	0.13
6	кумаровая кислота	0.012	0.021
7	феруловая кислота	0.06	0.004
8	рутин	–	0.01
9	бензойная кислота	0.012	0.006
10	анисовая кислота	–	0.004
11	кверцетин	–	0.008

Несмотря на то, что в работе не была проведена оценка содержания танинов, наличие темного окрашивания культуры и низкого содержания в клетках свободных катехина и эпикатехина позволяет предположить, культивирование *in vitro* приводит к усилению синтеза различных танинов. Высокая доля свободной галловой кислоты и низкое содержание свободных катехина и эпикатехина позволяют предположить, что в клетках суспензии основную часть танинов составляют конденсированные танины. Используя данные ВЭЖХ и количественного анализа суммы экстрагированных фенольных соединений можно заключить что основную часть (95%) синтезируемых клетками фенольных соединений составляют полифенолы, вероятно являющиеся танинами. Конденсированные танины являются антиоксидантами [23, 24], а также проявляют антимикробный эффект [25]. Вероятно присутствие танинов в культивируемых клетках обусловлено перестройкой путей биосинтеза фенолов, и направленно для адаптации к условиям *in vitro*. Необходимо отметить, что культивирование *in vitro*, несмотря на подобранные условия, может увеличивать генерацию различных активных форм кислорода и усиливать окислительный стресс [26]. Необходимо отметить, что в корневищах интенсивное накопление танинов происходит на второй год жизни растения, в то время как клетки суспензии синтезируют танины в течение пассажа. В связи с этим культивируемые клетки кровохлебки могут удобным объектом для выделения биологически активных танинов, а также для выявления фенольных соединений, ранее не обнаруживаемых в корневищах, поскольку условия *in vitro* позволяют проводить строго контролируемые воздействия. Например, стрессовые воздействия, которые могут вызывать синтез новых фенольных соединений, обладающих биологической активностью. В ряде работ на культурах клеток показано влияние стрессового гормона растений метилжасмоната на биомассу [27, 28] и накопление фенольных соединений [29] в культивируемых клетках растений.

### Заключение

Таким образом, полученная суспензионная культура клеток кровохлебки лекарственной может поддерживаться длительное время и способна активному синтезу и накоплению фенольных соединений, обладающих биологической активностью. Доля некоторых фенольных соединений в полученной культуре существенно выше, по сравнению с их долей в корневищах растений. Такими соединениями являются галловая, феруловая и кофейная кислоты, а также конденсированные танины. Кроме того, полученная культура может быть объектом для проведения экспериментов по усилению синтеза фенольных соединений под действием различных индукторов. Все это позволяет рассматривать полученную культуру как потенциальный источник биологически активных соединений фенольной природы.

### Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. Вып. 1: Общие методы анализа. М.: Медицина, 1987. 336 с.
2. Носов А.М. Лекарственные растения. М., 2004. 350 с.
3. Biernasiuk A., Wozniak M., Bogucka-Kocka A. Determination of free and bounded phenolic acids in the rhizomes and herb of *Sanguisorba officinalis* L // Curr. Issues Pharm. Med. Sci. 2015. Vol. 28(4). Pp. 254–256. DOI: 10.1515/cipms-2015-0083.
4. Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I. 7-O-galloyl-(+)-catechin and 3-O-galloylprocyanidin B-3 from *Sanguisorba officinalis* // Phytochemistry. 1983. Vol. 22(11). Pp. 2575–2578 DOI: 10.1016/0031-9422(83)80168-X.
5. Popov I.V., Andreeva I.N., Gavrilin M.V. HPLC determination of tannins in raw materials and preparations of great burnet // Pharm Chem J. 2003. Vol. 37(7). Pp. 360–363.
6. Sun W., Zhang Z. L., Liu X., Zhang S., He L., Wang Z. et al. Terpene glycosides from the roots of *Sanguisorba officinalis* L. and their hemostatic activities // Molecules. 2012. Vol. 17(7). Pp. 7629–7636. DOI: 10.3390/molecules17077629.
7. Cheng D., Cao X., Zou P., Yang P. Isolation and identification of the flavonoids from garden burnet (*Sanguisorba officinalis*) // Zhongcaoyao. 1995. Vol. 26(11). Pp. 570–571. DOI: 10.3390/molecules17077629.
8. Duke J.A. Handbook of phytochemical constituent grass, herbs and other economic plants // Planta Med. 1992. Vol. 58(6). Pp. 499–504.
9. Nosov A.M. Application of cell technologies for production of plant-derived bioactive substances of plant origin // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. Vol. 48(7). Pp. 609–624. DOI: 10.1134/S000368381107009X.
10. Murthy H.N., Lee E.J., Paek K.Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2014. Vol. 118(1). Pp. 1–16. DOI: 10.1007/s11240-014-0467-7.
11. Ochoa-Villarreal M., Howat S., Hong S.-M., Jang M. O., Jin Y.-W., Lee E.-K., Loake G.J. Plant cell culture strategies for the production of natural products // BMB Rep. 2016. Vol. 49(3). Pp. 149–158. DOI: 10.5483/BMBRep.2016.49.3.264.

12. Ishimaru K., Hirose M., Takahashi K., Koyama K., Shimomura K. *Sanguisorba officinalis* L. (Great Burnet): In Vitro Culture and Production of Sanguin, Tannins, and Other Secondary Metabolites. // *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants VIII*. Heidelberg. 1995. Pp. 427–441. DOI: 10.1007/978-3-662-08612-4\_24.
13. Murashige Y., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15(3). Pp. 473–497.
14. Rumyantseva N.I., Salnikov V.V., Fedoseeva N.V., Lozovaya V.V. Characteristic of morphogenesis in buckwheat calluses cultured for a long time // *Soviet Journal of Plant Physiology*. 1992. Vol. 39(5). Pp. 98–103.
15. Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phoungstic acid reagent // *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965. Vol. 16(3). Pp. 144–158.
16. Ishimaru K., Makoto H., Takahashi K., Koyama K., Shomomura K. Tannin production in root culture of *Sanquisorba officinalis* // *Phytochemistry*. 1990. Vol. 29(12). Pp. 3827–3830. DOI: 10.1016/0031-9422(90)85341-C.
17. Marchyshyn S., Kudrja V., Zarichanska O. The phenolic compounds profile of *Sanguisorba officinalis* roots and herb // *The Pharma Innovation Journal*. 2018. Vol. 6(8). Pp. 274–277.
18. Kroes B.H., van den Berg A.J., Quarles van Ufford H.C., van Dijk H., Labadie R.P. Anti-inflammatory activity of gallic acid // *Planta Med*. 1992. Vol. 58(6). Pp. 499–504. DOI: 10.1055/s-2006-961535.
19. Sarjit A., Wang Y., Dykes G.A. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions // *Food Microbiology*. 2015. Vol. 46(4). Pp. 227–233. DOI: 10.1016/j.fm.2014.08.002.
20. Kikuzaki H., Hisamoto M., Hirose K., Akiyama K., and Taniguchi H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds // *J. Agric. Food Chem*. 2002. Vol. 50(7). Pp. 2161–2168. DOI: 10.1021/jf011348w.
21. Genaro-Mattos T.C., Mauricio A.Q., Rettori D., Alonso A., Hermes-Lima M. Antioxidant activity of caffeic acid against iron-induced free radical generation – a chemical approach // *PLoS One*. 2015. Vol. 10(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0129963.
22. Furlan C.M., Motta L.B., Santos D. Tannins: What do they represent in plant life? // In book: *Tannins: Types, foods containing and nutrition*. Nova Science Publishers. 2011. Pp. 251–263.
23. Zhang Z.L., He L., Wang Z., Wang G.S. Isolation and identification of the phenolic compounds from the roots of *Sanguisorba officinalis* L. and their antioxidant activities // *Molecules*. 2012. Vol. 17(12). Pp. 13917–13922. DOI: 10.3390/molecules171213917.
24. Koleckar V., Kubikova K., Rehakova Z., Kuca K., Jun D., Jahodar L., Opletal L. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health // *Mini Rev Med Chem*. 2008. Vol. 8(5). Pp. 436–447. DOI: 10.2174/138955708784223486.
25. Kiyoshi Tomiyama, Yoshiharu Mukai, Masahiro Saito, et al. Antibacterial Action of a Condensed Tannin Extracted from Astringent Persimmon as a Component of Food Addictive Pancil PS-M on Oral Polymicrobial Biofilms. // *Bio-Med Research International*. 2016. Vol. 2016. Article ID 5730748. 7 pages. DOI: 10.1155/2016/5730748.
26. Ayşe Şen. Oxidative stress studies in plant tissue culture // In book: *Antioxidant Enzyme, InTech – Open Access Publisher*. 2012. Pp. 59–88. DOI: 10.5772/48292.
27. Patil R.A., Lenka S.K., Normanly J., Walker E.L., Roberts S.C. Methyl jasmonate represses growth and affects cell cycle progression in cultured *taxus* cells // *Plant Cell Rep*. 2014. Vol. 33(9). Pp. 1479–1492. DOI: 10.1016/j.btre.2018.e00273.
28. See K.S., Bhatt A., Keng C. L. Effect of sucrose and methyl jasmonate on biomass and anthocyanin production in cell suspension culture of *Melastoma malabathricum* (Melastomaceae) // *Rev. Int. J. Trop. Biol*. 2011. Vol. 59(2). Pp. 597–606.
29. Wang J., Qian J., Yao L., Lu Y. Enhanced production of flavonoids by methyl jasmonate elicitation in cell suspension culture of *Hypericum perforatum* // *Bioresources and Bioprocessing*. 2015. Vol. 2(5). Pp. 1–9. DOI: 10.1186/s40643-014-0033-5.

Поступила в редакцию 8 июня 2018 г.

После переработки 12 октября 2018 г.

Принята к публикации 16 октября 2018 г.

**Для цитирования:** Акулов А.Н. Фенольные соединения культуры клеток кровохлебки лекарственной *Sanguisorba officinalis* (L) // *Химия растительного сырья*. 2019. №1. С. 241–250. DOI: 10.14258/jcrpm.2019014119.



*Akulov A.N. PHENOLIC COMPOUNDS OF GREAT BURNET SANQUISORBA OFFICINALIS (L.) CELL CULTURE*

*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center of RAS, ul. Lobachevskogo, 2, Kazan, 420111 (Russia)*

*Kazan Federal University, ul. Kremlovskaya, 18, Kazan, 420008 (Russia), e-mail: akulov\_anton@mail.ru*

Callus cultures were obtained from the seeds of great burnet plants. Long-passed suspension cultures were obtained by transferring callus cultures to a liquid medium. The increase in the biomass of the suspension culture for the passage was 501%, the yield of dry biomass was 120 mg/g wet weight. The content of methanol-extracted phenolic compounds in the suspension culture increased during the passage and reached a maximum (34.6 mg/g dry weight) on the 22nd day of cultivation. An HPLC analysis of the phenolic compounds of the suspension culture and the rhizomes of the herbaceous plants was carried out. The proportion of some phenolic compounds in the obtained culture is significantly higher compared to their proportion in the rhizomes of plants. Such compounds were gallic, ferulic and caffeic acids, as well as condensed tannins. The obtained culture can be an object for conducting experiments on enhancing the synthesis of phenolic using various inductors. All this allows us to consider the obtained culture as a potential source of biologically active phenolic compounds.

Keywords: great burnet, *Sanquisorba Officinalis* (L.), cell culture, high-performance liquid chromatography, phenolic compounds.

### References

1. *Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR. 11 izdanie.* [State Pharmacopoeia of the USSR. XI edition]. Moscow, 1987, vol. 1, 336 p. (in Russ.).
2. Nosov A.M. *Lekarstvennyye rasteniya.* [Medicinal plants]. Moscow, 2004, 350 p. (in Russ.).
3. Biernasiuk A., Wozniak M., Bogucka-Kocka A. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.*, 2015, vol. 28(4), pp. 254–256. DOI: 10.1515/cipms-2015-0083.
4. Tanaka T., Nonaka G., Nishioka I. *Phytochemistry*, 1983, vol. 22(11), pp. 2575–2578. DOI: 10.1016/0031-9422(83)80168-X.
5. Popov I.V., Andreeva I.N., Gavrilin M.V. *Pharm Chem J.*, 2003, vol. 37(7), pp. 360–363.
6. Sun W., Zhang Z.L., Liu X., Zhang S., He L., Wang Z. et al. *Molecules*, 2012, vol. 17(7), pp. 7629–7636. DOI: 10.3390/molecules17077629.
7. Cheng D., Cao X., Zou P., Yang P. *Zhongcaoyao*, 1995, vol. 26(11), pp. 570–571. DOI: 10.3390/molecules17077629
8. Duke J.A. *Planta Med.*, 1992, vol. 58(6), pp. 499–504.
9. Nosov A.M. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2012, vol. 48(7), pp. 609–624. DOI: 10.1134/S000368381107009X.
10. Murthy H.N., Lee E.J., Paek K.Y. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2014, vol. 118(1), pp. 1–16. DOI: 10.1007/s11240-014-0467-7.
11. Ochoa-Villarreal M., Howat S., Hong S.-M., Jang M.O., Jin Y.-W., Lee E.-K., Loake G.J. *BMB Rep.*, 2016, vol. 49(3), pp. 149–158. DOI:10.5483/BMBRep.2016.49.3.264.
12. Ishimaru K., Hirose M., Takahashi K., Koyama K., Shimomura K. *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plants VIII*, Heidelberg, 1995, pp. 427–441. DOI: 10.1007/978-3-662-08612-4\_24.
13. Murashige Y., Skoog F. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15(3), pp. 473–497.
14. Rumyantseva N.I., Salnikov V.V., Fedoseeva N.V., Lozovaya V.V. *Soviet Journal of Plant Physiology*, 1992, vol. 39(5), pp. 98–103.
15. Singleton V.L., Rossi J.A. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, vol. 16(3), pp. 144–158.
16. Ishimaru K., Makoto H., Takahashi K., Koyama K., Shomomura K. *Phytochemistry*, 1990, vol. 29(12), pp. 3827–3830. DOI: 10.1016/0031-9422(90)85341-C.
17. Marchyshyn S., Kudrja V., Zarichanska O. *The Pharma Innovation Journal*, 2018, vol. 6(8), pp. 274–277.
18. Kroes B.H., van den Berg A.J., Quarles van Ufford H.C., van Dijk H., Labadie R.P. *Planta Med.*, 1992, vol. 58(6), pp. 499–504. DOI: 10.1055/s-2006-961535.
19. Sarjit A., Wang Y., Dykes G.A. *Food Microbiology*, 2015, vol. 46(4), pp. 227–233. DOI: 10.1016/j.fm.2014.08.002.
20. Kikuzaki H., Hisamoto M., Hirose K., Akiyama K., and Taniguchi H. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, vol. 50(7), pp. 2161–2168. DOI: 10.1021/jf011348w.
21. Genaro-Mattos T.C., Mauricio A.Q., Rettori D., Alonso A., Hermes-Lima M. *PLoS One*, 2015, vol. 10(11). DOI: 10.1371/journal.pone.0129963.
22. Furlan C.M., Motta L.B., Santos D. Tannins: What do they represent in plant life? // In book: Tannins: Types, foods containing and nutrition. Nova Science Publishers. 2011. Pp. 251–263.
23. Zhang Z.L., He L., Wang Z., Wang G.S. *Molecules*, 2012, vol. 17(12), pp. 13917–13922. DOI: 10.3390/molecules171213917.
24. Koleckar V., Kubikova K., Rehakova Z., Kuca K., Jun D., Jahodar L., Opletal L. *Mini Rev Med Chem.*, 2008, vol. 8(5), pp. 436–447. DOI: 10.2174/138955708784223486.
25. Kiyoshi Tomiyama, Yoshiharu Mukai, Masahiro Saito, et al. *BioMed Research International*, 2016, vol. 2016, article ID 5730748, 7 p. DOI: 10.1155/2016/5730748.
26. Ayşe Şen. Oxidative stress studies in plant tissue culture // In book: Antioxidant Enzyme, InTech – Open Access Publisher. 2012. Pp. 59–88. DOI: 10.5772/48292.

27. Patil R.A., Lenka S.K., Normanly J., Walker E.L., Roberts S.C. *Plant Cell Rep.*, 2014, vol. 33(9), pp. 1479–1492. DOI: 10.1016/j.btre.2018.e00273.
28. See K.S., Bhatt A., Keng C. L. *Rev. Int. J. Trop. Biol.*, 2011, vol. 59(2), pp. 597–606.
29. Wang J., Qian J., Yao L., Lu Y. *Bioresources and Bioprocessing*, 2015, vol. 2(5), pp. 1–9. DOI: 10.1186/s40643-014-0033-5.

*Received June 8, 2018*

*Revised October 12, 2018*

*Accepted October 16, 2018*

**For citing:** *Akulov A.N., Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 1, pp. 241–250. (in Russ.).  
DOI: 10.14258/jcprm.2019014119.