

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ МЕДИ НА РОСТ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК
ВАСИЛИСТНИКА МАЛОГО (*Thalictrum minus* L.)

© 2023 г. Е. А. Осипова*

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

*e-mail: eleang@mail.ru

Поступила в редакцию 21.01.2023 г.

После доработки 15.02.2023 г.

Принята к публикации 15.02.2023 г.

Берберин соединение с широким спектром биологической активности, синтезируется в культуре клеток лекарственного растения *Thalictrum minus*. Исследовали влияние абиотического элиситора (Cu^{2+}) на рост культуры клеток *Thalictrum minus* и биосинтез в ней протобербербиновых алкалоидов на разных стадиях ростового цикла. Оценивали быструю реакцию (через 2 ч) и продолжительную (в конце ростового цикла). Наибольший эффект по увеличению протобербербиновых алкалоидов наблюдали после воздействия (Cu^{2+}) 20, 25 мг/л в 0 день через 2 ч, на 49 и 114% выше контроля, соответственно, при сохранении роста на уровне контроля. К концу ростового цикла масса клеток и содержание протобербербиновых алкалоидов снижались на 67–70 и 27–53%, соответственно (токсичный эффект). При 5 мг/л (Cu^{2+}), реакция была противоположная. Через 2 ч наблюдали стимуляцию роста на 48% и снижение содержания протобербербиновых алкалоидов на 48% по отношению к контролю. К концу ростового цикла сохранялось превышение роста на 50%, а содержание протобербербиновых алкалоидов повышалось на 60% по отношению к контролю. Если воздействие Cu^{2+} проводили в середине ростового цикла, при концентрации 20, 25 мг/л, как при быстрой реакции (через 2 ч), так и к концу ростового цикла, происходило снижение роста на 65–71% и содержания протобербербиновых алкалоидов на 52–70%. При 5 мг/л ионов меди сохранялось превышение роста на 50–54%, содержание алкалоидов оставалось на уровне контроля. Реакция при 10 мг/л ионов Cu^{2+} была промежуточной. Проведенные исследования показали перспективность применения низких концентраций ионов меди для культуры клеток *Thalictrum minus*. Содержание протобербербиновых алкалоидов повышалось на фоне стимуляции роста культуры клеток в конце ростового цикла.

Ключевые слова: *Thalictrum minus*, ионы меди, суспензионная культура клеток, протобербербиновые алкалоиды, элиситор

DOI: 10.31857/S0015330323600055, **EDN:** PZWUYA

ВВЕДЕНИЕ

Берберин – протобербербиновый алкалоид изохинолиновой группы [1] обладает широким спектром биологической активности. Среди свойств отмечены антимикробные [2] (ингибирование токсинов и бактерий, в том числе *Helicobacter pylori* [3]), противоопухолевые [4–7], желчегонные [1], выявлена его антиоксидантная активность [5]. Исследуется применение берберина в качестве антидепрессанта [8], также для снижения уровня холестерина в крови [9, 10], при болезни Альцгеймера [11–13]. Берберин регулирует гликометаболизм и липидный обмен [3]. Берберин синтезируется в растениях разных семейств *Berberidaceae*, *Ranunculaceae*, *Menispermaceae*, *Rutaceae*, *Papavera-*

ceae [2]. *Василистник малый* (*Thalictrum minus* L.) – лекарственное растение семейства лютиковых (*Ranunculaceae*), широко распространено на территории России и в других странах средней полосы. Листья и корни растения применяются в тибетской медицине при отеках, водянке, женских болезнях. Трава василистника малого входит в состав сбора Здренко [14]. В культуре клеток растения василистника малого берберин может достигать 0.67% от сухой массы клеток [15, 16]. Это ниже, чем в интактном растении. Однако это свойство неорганизованных пролиферирующих клеток растения, в которых содержание искомым веществ может быть на порядок ниже, чем в органах целого растения [17]. Поэтому встает проблема повышения содержания вторичных метаболитов в культуре клеток растения. Для суспензионной культуры клеток *Thalictrum minus* это достигалось за счет воздействия регуляторов роста. Было по-

Сокращения: 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, НУК – 1-нафтилуксусная кислота, ИРТ – изопентениладенинтрансфераза, ООК – объем осажденных клеток.

казано, что цитокинины в сочетании с НУК (1-нафтилуксусная кислота) или 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) повышали содержание берберина [18, 19]. Но именно цитокинины стимулировали превращение предшественника L-тирозина в берберин [19], активировали (S)-тетрагидропротобербериноксидазу — фермент биосинтеза берберина [20]. На основании этих данных была разработана схема агробактериальной трансформации каллусной культуры клеток василистника малого с *ipt* геном, участвующем в биосинтезе цитокининов, и показана возможность получения клеточных линий с более высоким содержанием протобербериновых алкалоидов [21]. Основываясь на гетерогенности культур клеток растения, проводили клонирование и отбор перспективных по уровню содержания протобербериновых алкалоидов клеточных линий [22]. Еще одно из направлений, проводимых с целью повышения содержания вторичных соединений в культуре клеток растений — элиситация. К элиситорам относят несвойственные для растений молекулы, связанные с патогенами, вредителями [23], физическими факторами и химическими веществами, включая тяжелые металлы [24]. Среди тяжелых металлов отмечена медь [24]. Исследований по влиянию ионов меди на суспензионные культуры лекарственных растений немного. Однако в этих работах было показано, что под влиянием ионов меди можно повышать содержание вторичных метаболитов в суспензионных культурах *Beta vulgaris* (беталаинов) [24], *Angelica archangelica* (скополетина) [25], *Agave amanuensis* (рекогенина) [26], *Portulaca* (бетацианинов) [27], *Tribulus terrestris* L. (стероидных гликозидов) [28]. Исследований по влиянию ионов меди на содержание протобербериновых алкалоидов в суспензионной культуре *Thalictrum minus* в литературных источниках не найдено. В то же время было показано, что содержание протобербериновых алкалоидов повышалось в суспензионной культуре *Thalictrum minus* после воздействия другим элиситором, в результате инфицирования мицелиальными грибами [29]. Это могло указывать на то, что культура клеток *Thalictrum minus* чувствительна к элиситации. Необходимо отметить, что в низких концентрациях медь выступает эссенциальным элементом, необходимым для метаболизма клеток. В концентрации 0.1 мкМ медь включена в состав микроэлементов питательной среды по прописи Мурасиге и Скуга [30]. В биосинтезе протобербериновых алкалоидов медьсодержащий фермент — фенолаза, участвует в реакциях гидроксигликозирования тирамина в дофамин и (S) и (R) — формы N-метилкоккаурина с последующим метилированием (S) форм в (S)-ретикулин [31, 32]. Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния ионов меди на суспензионную культуру клеток *Thalictrum minus* L.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила суспензионная культура клеток *Thalictrum minus* L., штамм 233, полученный после клонирования исходной суспензионной культуры и отбора клеточной линии с более высоким уровнем содержания протобербериновых алкалоидов [22]. Штамм культивируется более 20 лет. Суспензионную культуру выращивали на модифицированной МС-среде [30] с добавлением витаминов по прописи Стаба [33] 10 мл/л, что соответствовало содержанию цианокаламида NaCl 0.0015 мг/л (“Борисовский завод медицинских препаратов”, Беларусь), фолиевой кислоты 0.5 мг/л (“Applichem”, Германия), рибофлавина 0.5 мг/л (“Applichem”, Германия), Са-пантотената 1.0 мг/л (“Sigma-Aldrich”, США), пиридоксина гидрохлорида (“Acros organics”, Бельгия), тиамин гидрохлорида 1.0 мг/л (“Applichem”, Германия), никотиновой кислоты 2.0 мг/л (“Sigma-Aldrich”, США). Исключали из состава витаминов по прописи Стаба биотин и холинхлорид. Среда включала 2,4-Д (2,4 дихлорфеноксиуксусная кислота) 0.01 мг/л (“Sigma-Aldrich”, США), сахарозу 5%. Суспензионную культуру выращивали в темноте, на качалке при 100 об/мин в колбах объемом 250 мл с заполнением средой 60 мл. Соотношение инокулюма : среды было 1 : 6. Цикл субкультивирования 17 дней. Рост суспензионной культуры определяли двумя способами: (1) по сухой массе клеток после отделения от культуральной жидкости через бумажный фильтр под вакуумом, далее клетки снимали с фильтра и сушили в термостате (“ТС-80”, Россия) при температуре 60°C в течение трех суток, взвешивали на аналитических весах (“Scout Pro”, США); (2) по объему осажденных клеток (ОК) — суспензионную культуру переносили в мерные пробирки и оставляли на 2 ч. Для оценки роста клеток на агаровой среде клетки суспензионной культуры на 17 день ростового цикла стерильно в ламинар-боксе (“КПГ-1М”, СССР) фильтровали через лабораторную воронку с фильтром из тканевого волокна “бязь”. Отфильтрованные клетки массой 80 мг, переносили на среду такого же состава, что и для культивирования суспензионной культуры, с добавлением 0.7% агара в чашки Петри диаметром 9 см по 10 кусочков в каждую чашку, по 4 чашки в каждом варианте. Выживаемость клеточных конгломератов определяли по числу живых, имеющих характерную светло-желто-зеленоватую окраску, от числа исходно посаженных. Раствор меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (“Реакхим”, Россия) в среду (жидкую и агаровую) добавляли стерильно в пересчете на ионы меди в диапазоне от 5 до 30 мг/л (5, 10, 20, 25, 30 мг/л), что соответствовало Cu^{2+} 78, 156, 312, 390, 468 мкМ. Раствор ионов меди вносили в жидкую и агаровую среду перед посадкой культуры клеток (0 день) и на 10 день ростового цикла суспензионной культуры.

Таблица 1. Выживаемость и рост клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) при поверхностном стационарном выращивании после добавления в среду с агаром разной концентрации ионов меди через 8 недель культивирования

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25	30
Выживаемость от числа исходно посаженных конгломератов клеток, %	25 ± 7	$75 \pm 7^*$	$68 \pm 7^*$	25 ± 7	0	0
Масса живых клеток, % к контролю	100	$207 \pm 9^*$	93 ± 4	93 ± 4		
Масса живых клеток, мг	80 ± 0	$166 \pm 7^*$	74 ± 3	74 ± 3		

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, t -значения Стьюдента. * – разница достоверна при $P < 0.05$.

Таблица 2. Рост суспензионной культуры клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) к 17 дню культивирования (конец ростового цикла) на разных концентрациях ионов меди

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25
ООК, мл	2.80 ± 0.16	2.90 ± 0.20	$0.60 \pm 0.11^*$	$0.50 \pm 0^*$	$0.40 \pm 0^*$
% к контролю	100	104 ± 7	$21 \pm 0^*$	$19 \pm 0^*$	$14 \pm 0^*$

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, t -значения Стьюдента. * – разница достоверна при $P < 0.05$.

Для определения содержания протобербериновых алкалоидов в суспензионной культуре клеток применяли спектрофотометрический метод. Содержание протобербериновых алкалоидов определяли в этанольных экстрактах сырой массы клеток и в культуральной среде. К 500 мг сырой массы клеток добавляли 5 мл этанола дважды с интервалом 1 сут. до полного обесцвечивания клеток. Культуральную жидкость предварительно замораживали при -20°C , оттаивали, центрифугировали при 8000 об/мин, 15 мин на центрифуге (“Опн”, Россия). Проводили спектрофотометрическое определение культуральной жидкости и этанольных экстрактов из клеток на спектрофотометре (“UNICO”, США) при длине волны 427 нм [34]. Для каждого варианта проводили три аналитические и три биологических повторности. Статистическую обработку, вычисление средних значений, стандартную ошибку и t -значения Стьюдента проводили по стандартным методам с использованием MS-Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы определяли чувствительность клеток к разным концентрациям ионов меди при разных условиях выращивания. Оценивали рост суспензионной культуры (глубинное выращивание), выживаемость и рост конгломератов клеток, полученных из культуры клеток, при поверхностном стационарном выращивании на среде с агаром (табл. 1, 2). После переноса клеток из суспензии на агаровую среду выживаемость на

контрольной среде была невысокой – 25%. Добавление в среду 5 и 10 мг/л ионов меди повышали выживаемость клеток до 75 и 68%, соответственно. При 20 мг/л ионов меди рост и выживаемость клеток соответствовали контрольному уровню, тогда как при 25 и 30 мг/л ионов меди происходила гибель клеток. Увеличение массы клеток в 2 раза отмечено при концентрации ионов меди – 5 мг/л среды, тогда как при 10 и 20 мг/л масса клеток соответствовала контрольному уровню. В суспензионной культуре (глубинное выращивание) отмечено сохранение роста на уровне контроля при концентрации ионов меди – 5 мг/л, тогда как 10, 20 и 25 мг/л – сублетальные. Несмотря на разные критерии оценки роста при поверхностном выращивании (сухая масса клеток) и в суспензионной культуре (ООК), можно отметить, что 5 мг/л ионов меди не оказывали негативного воздействия. Снижение роста при поверхностном выращивании было на более высоких концентрациях ионов меди, чем в суспензионной культуре.

Определяли влияние разных концентраций ионов меди на биосинтез протобербериновых алкалоидов в суспензионной культуре василистника малого (*Thalictrum minus* L.) после внесения в среду на разных фазах ростового цикла, в начале (0 день), в середине (10 день), через 2 ч (быстрая реакция) и на 17 день культивирования (продолжительное воздействие). Через 2 ч культивирования после внесения в среду ионов меди в 0 день ростового цикла, наблюдали стимуляцию роста только при 5 мг/л на 48%, по отношению к контролю. Содержание протобербериновых алкало-

Таблица 3. Влияние на рост и содержание протобербербиновых алкалоидов в суспензионной культуре клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) разных концентраций ионов меди через 2 ч культивирования после пересадки (0 день ростового цикла)

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25
Сухая масса клеток, г/л	0.29 ± 0.01	$0.43 \pm 0^*$	0.30 ± 0	0.34 ± 0.04	0.28 ± 0.01
Сухая масса клеток, % к контролю	100	$148 \pm 0^*$	104 ± 0	117 ± 14	97 ± 4
Протобербербиновые алкалоиды (среда + клетки), % от сухой массы клеток	0.68 ± 0.04	$0.35 \pm 0.01^*$	0.71 ± 0.11	1.02 ± 0.23	$1.45 \pm 0.01^*$
Протобербербиновые алкалоиды (среда + клетки), % к контролю	100	$52 \pm 2^*$	104 ± 17	149 ± 34	$214 \pm 15^*$

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, *t*-значения Стьюдента. * — разница достоверна при $P < 0.1 - 0.05$.

Таблица 4. Влияние на рост и содержание протобербербиновых алкалоидов в суспензионной культуре клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) разных концентраций ионов меди через 17 дней культивирования (конец ростового цикла)

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25
Сухая масса клеток, г/л	3.30 ± 0.70	$4.96 \pm 0.14^*$	3.47 ± 0.12	$1.07 \pm 0.15^*$	$0.97 \pm 0.10^*$
Сухая масса клеток, % к контролю	100	$150 \pm 4^*$	105 ± 4	$33 \pm 5^*$	$30 \pm 3^*$
Протобербербиновые алкалоиды (среда + клетки), % от сухой массы клеток	0.16 ± 0.04	$0.26 \pm 0.02^*$	$0.09 \pm 0.01^*$	0.12 ± 0.01	$0.07 \pm 0.01^*$
Протобербербиновые алкалоиды (среда + клетки), % к контролю	100	$160 \pm 13^*$	$59 \pm 5^*$	73 ± 9	$47 \pm 9^*$

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, *t*-значения Стьюдента. * — разница достоверна при $P < 0.1 - 0.05$.

идов, при этой концентрации, наоборот, было ниже на 48%. Значительное повышение содержания протобербербиновых алкалоидов наблюдали при высокой концентрации ионов меди (25 мг/л) на 114% и сохранение роста на уровне контроля (табл. 3). При продолжении культивирования до конца ростового цикла (до 17 дня) с теми же концентрациями ионов меди, можно было отметить, что только при 5 мг/л сохранялась стимуляция роста, а содержание протобербербиновых алкалоидов превышало контрольный уровень на 60%. Повышение концентрации ионов меди приводило к динамичному снижению, как роста, так и содержания протобербербиновых алкалоидов, максимально при 25 мг/л на 70 и 53%, соответственно (табл. 4). Если ионы меди вносили в середине ростового цикла на 10 день, то при высоких концентрациях 20 и 25 мг/л происходило снижение роста и содержания протобербербиновых алкалоидов, как через короткое время (через 2 ч), так и после выдерживания до конца ростового цикла (до 17 дня). При более низких концентрациях ионов меди, 5 мг/л, отмечена только стимуляция роста и только через 2 ч после внесения ионов меди (табл. 5, 6). Таким образом, можно отметить, что ионы меди токсичны при высоких концентрациях, но приводят к быстрому повышению содержания про-

тобербербиновых алкалоидов в начале ростового цикла. Низкая концентрация приводит к стимуляции роста, а при продолжительном воздействии содержание протобербербиновых алкалоидов превышало контрольный уровень. Из этого следует, что чувствительность клеток к ионам меди различается в зависимости от стадии ростового цикла. Более чувствительны к ионам меди были клетки, когда ионы меди вносили в начале ростового цикла, что приводило к повышению протобербербиновых алкалоидов.

ОБСУЖДЕНИЕ

На основании наших исследований и других авторов следует, что для эффекта элиситации (ионов меди) имеет значение концентрация элиситора, длительность его действия, возраст культуры клеток. Анализ наших данных показывает, что быстрая и долговременная реакции на ионы меди различаются. При быстрой реакции высокие (20 и 25 мг/л) и низкая (5 мг/л) концентрации имели противоположный эффект после внесения в начале ростового цикла (0 день). Низкая концентрация стимулировала рост, тогда как высокие — повышали содержание алкалоидов. После продолжительного культивирования, до конца

Таблица 5. Влияние на рост и содержание протобербербиновых алкалоидов в суспензионной культуре клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) разных концентраций ионов меди через 2 ч после внесения в среду на 10 день ростового цикла

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25
Сухая масса клеток, г/л	2.60 ± 0.42	$3.91 \pm 0.32^*$	2.86 ± 0.15	$1.08 \pm 0.14^*$	$0.74 \pm 0.22^*$
Сухая масса клеток, % к контролю	100	$150 \pm 12^*$	110 ± 6	$42 \pm 6^*$	$29 \pm 9^*$
Протобербербиновые алкалоиды (среда + клетки), % от сухой массы клеток	0.23 ± 0.09	0.26 ± 0.04	0.14 ± 0.04	$0.11 \pm 0.03^*$	$0.07 \pm 0.02^*$
Протобербербиновые алкалоиды (среда + клетки), % к контролю	100	113 ± 17	61 ± 17	$48 \pm 13^*$	$30 \pm 9^*$

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, *t*-значения Стьюдента. * — разница достоверна при $P < 0.1-0.05$.

Таблица 6. Влияние на рост и содержание протобербербиновых алкалоидов в суспензионной культуре клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) разных концентраций ионов меди в конце ростового цикла (на 17 день культивирования, после внесения в среду на 10 день ростового цикла)

Концентрация меди (Cu^{2+}), мг/л среды	0	5	10	20	25
Сухая масса клеток, г/л	3.30 ± 0.70	5.08 ± 0.17	4.28 ± 0.25	$1.28 \pm 0.19^*$	$1.47 \pm 0.25^*$
Сухая масса клеток, % к контролю	100	154 ± 36	130 ± 8	$39 \pm 6^*$	$45 \pm 9^*$
Протобербербиновые алкалоиды (среда + клетки), % от сухой массы клеток	0.16 ± 0.04	0.16 ± 0	0.23 ± 0.05	$0.04 \pm 0.01^*$	$0.08 \pm 0^*$
Протобербербиновые алкалоиды (среда + клетки), % к контролю	100	93 ± 15	138 ± 31	$24 \pm 7^*$	$48 \pm 0^*$

Примечание. Приведены средние значения трех биологических повторностей и их стандартная ошибка, *t*-значения Стьюдента. * — разница достоверна при $P < 0.1-0.05$.

ростового цикла, при высоких концентрациях рост и содержание алкалоидов значительно снижались. То есть, наблюдали токсичный эффект высоких концентраций. При низкой концентрации стимуляция роста сохранялась, а содержание алкалоидов было выше контроля. Клетки суспензионной культуры середины ростового цикла были менее чувствительны к ионам меди. Однако стимуляция роста при низкой концентрации сохранялась. Для эффективного применения элиситоров в культуре клеток растения важно сочетание роста и биосинтеза вторичных соединений. Анализируя исследования других авторов по влиянию ионов меди на рост и содержание вторичных метаболитов, было показано, что для разных суспензионных культур клеток эффективная концентрация ионов меди различалась. Для суспензионной культуры клеток *Angelica archangelica* определяли влияние ионов меди в диапазоне 0.1–200 мкМ в темноте в конце ростового цикла. Концентрация до 100 мкМ ионов меди не влияли на рост. Снижение роста наблюдали при 200 мкМ на 30%, а концентрация 500 мкМ оказалась летальной. Концентрации 10, 50, 100 мкМ повышали содержание скополетина, максимально при 50 мкМ в 2 раза [25]. В суспензионной культуре клеток *Agave amanuensis* изучали влияние концентраций

ионов меди в диапазоне от 10 до 240 мкМ. Рост снижался только при 240 мкМ на 61.5%. Содержание гекогенина повышалось на 59.7% при 20 мкМ [26]. В суспензионной культуре *Vaccinium pahalae* определяли влияние 10, 20, 40, 80 мкМ ионов меди. Рост сохранялся при всех концентрациях, но максимально повышался при 20 мкМ. При этой же концентрации максимально повышалось содержание антоцианов [35]. В культуре клеток *Tribulus terrestris* рост сохранялся до 10 мкМ ионов меди. Определение содержания фурастанолевых гликозидов определяли при 2 мкМ, при этой концентрации содержание фурастанолевых гликозидов повышалось в 1.5–3 раза [28]. Таким образом, можно отметить, что полученные нами данные не противоречат данным, полученным другими авторами для разных культур клеток. Во всех случаях при невысоких концентрациях ионов меди повышение вторичных метаболитов происходило на фоне роста культуры клеток в конце ростового цикла. Несмотря на то, что тяжелые металлы, в частности, медь, считаются токсичными, полученные результаты исследований говорят о том, что этот вопрос недостаточно изучен, в частности диапазон эффективных концентраций. На это указывает незначительное количество исследовательских работ в этом направлении и, как результат,

недооцененность эффективности воздействия невысоких концентраций на культуру клеток растений с целью повышения содержания вторичных метаболитов. Эффективными были концентрации ионов меди, показанные в исследованиях, значительно превышающие (на 2–2.5 порядка), традиционно применяемые в культуре клеток растений [30] и ниже на порядок токсичных концентраций [25, 26]. Известно, что воздействие элиситорами приводит к окислительному стрессу и активации защитных механизмов клеток [23, 24]. Различают дистресс (плохой стресс), который приводит к повреждению и гибели растений и эустресс (хороший стресс), который приводит к активации защитной реакции и активации вторичного метаболизма в соответствии с кривой гормезиса [36]. Интересен факт сохранения или стимуляции роста при повышении содержания вторичных соединений после воздействия невысоких концентраций ионов меди. Возможно, это связано со второй фазой реакции на стресс, фазой адаптации. В случае гетерогенности клеточных культур в разных клетках эти два процесса, защитный и адаптивный, проходят, возможно, независимо. Поэтому наблюдали накопление вторичных соединений на фоне роста культуры клеток в конце ростового цикла, то, чего не происходило после разрушающего действия высоких концентраций ионов меди. Полученные результаты могут указывать на перспективность применения низких концентраций элиситора (ионов меди) в культуре клеток лекарственных растений, так как происходит повышение содержания вторичных метаболитов при сохранении роста культуры клеток.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042600086-7).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Максютина Н.П., Комиссаренко Н.Ф., Прокопенко А.П., Погодина Л.И., Липкан Г.Н. Растительные лекарственные средства. Киев.: Здоровья. 1985. С. 280.
- Холина А.Б., Журавлев Ю.Н. Культура клеток растений, как источник протобербериноидов // Растительные ресурсы. 1996. Вып. 1. С. 134.
- Song D., Hao J., Fan D. Biological properties and clinical applications of berberine // *Front Med.* 2020. V. 14. P. 564.
<https://doi.org/10.1007/s11684-019-0724-6>
- Потопальский А.И., Петличная Л.И., Ивасивка С.В. Барбарис и его препараты в биологии и медицине. Киев.: Изд-во Наук. думка. 1989. С. 287.
- Thirupurasundari C.J., Padmini R., Devaraj S.N. Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane-induced colon cancer in rat // *Chemico-Biological Interactions.* 2009. V. 177. P. 190.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.027>
- Rauf A., Abu-Izneid T., Khalil A.A., Imran M., Shah Z.A., Mitra S., Khan Z., Alhumaydhi F.A., Aljohani A.S.M., Rahman Md.M., Jeandet P., Gonda T.A. Berberine as a potential anticancer agent: a comprehensive review // *Molec.* 2021. V. 26. P. 7368.
<https://doi.org/10.3390/molecules26237368>
- Xiong R.G., Huang S.Y., Wu S.X., Zhou D.D., Yang Z.J., Saimaiti A., Zhao C.N., Shang A., Zhang Y.J., Gan R.Y., Li H.B. Anticancer effect and mechanism of berberine from medicinal herbs: an update review // *Molec.* 2022. V. 15. P. 4523.
<https://doi.org/10.3390/molecules27144523>
- Kulkarni S.K., Dhir A. On the mechanism of antidepressant-like action of berberine chloride // *Europ. Pharmacol.* 2008. V. 589. P. 163.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.05.043>
- Kong W., Wei J., Abidi P., Lin M., Inaba S., Li C., Wang Y., Wang Z., Si S., Pan H., Wang S., Wu J., Wang Y., Li J., Jiang J.D. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins // *Nat. Med.* 2004. V. 10. P. 1344.
<https://doi.org/10.1038/nm1135>
- Jia X., Chen Y., Zidichouski J., Zhang J., Sun C., Wang Y. Co-administration of berberine and plant stanols synergistically reduces plasma cholesterol in rat // *Atherosclerosis.* 2008. V. 201. P. 101.
- Jiang W.X., Li S.H., Li X.J. Therapeutic potential of berberine against neurodegenerative diseases // *Sci. Chin.* 2015. V. 58. P. 564.
<https://doi.org/10.1007/s11427-015-4829-0>
- De Oliveria J.S., Abdalla F.H., Dornelles G.L., Adefegha S.A., Palma T.V., Signor C., Bernardi J. da S., Baldissarelli J., Lenz L.S., Magni L.P., Rubin M.A., Pillat M.M., Andrade C.M. Berberine protects against memory impairment and anxiogenic-like behavior in rats submitted to sporadic Alzheimer's-like dementia: Involvement of acetylcholinesterase and cell death // *Neurotoxicology.* 2016. V. 57. P. 241.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.10.008>
- Yuan N.-N., Cai C.-Z., Wu M.-Y., Su H.-X., Lu J.-H. Neuroprotective effects of berberine in animal models of Alzheimer's disease: a systematic review of pre-clinical studies // *BMC Complement Altern Med.* 2019. V. 23. P. 109.
<https://doi.org/10.1186/s12906-019-2510-z>
- Гаммерман А.Ф., Кадаев Г.Н., Яценко-Хмелевский А.А. Лекарственные растения. М.: Изд-во Высшая школа. 1990. С. 544.
- Ikuta A., Itokawa H. Berberine and other protoberberine alkaloids in callus tissue of *Thalictrum minus* // *Phytochem.* 1982. V. 21. P. 1419.
- Сараев И.В., Величко Н.А., Ренях С.М. Химический состав василистника малого *Thalictrum minus* L. // *Химия растительного сырья.* 2000. № 1. С. 37.
- Бутенко Р.Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного

- происхождения // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Изд-во Наука. 1986. С. 3.
18. Nakagawa K., Fukui H., Tabata M. Hormonal regulation of berberine production in cell suspension cultures of *Thalictrum minus* // Plant Cell Rep. 1986. V. 5. P. 69. <https://doi.org/10.1007/BF00269722>
 19. Hara M., Kitamura T., Fukui H., Tabata M. Induction of berberine biosynthesis by cytokinins in *Thalictrum minus* cell suspension cultures // Plant Cell Rep. 1993. V. 12. P. 70. <https://doi.org/10.1007/BF00241937>
 20. Hara M., Morio K., Yazaki K., Tanaka S., Tabata M. Separation and characterization of cytokinin-inducible (S)-tetrahydroberberine oxidases controlling berberine biosynthesis in *Thalictrum minus* cell cultures // Phytochem. 1995. V. 38. P. 89. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00623](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00623)
 21. Осипова Е.А. Агробактериальная трансформация культуры клеток василистника малого (*Thalictrum minus* L.) // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2018. Т. 20. С. 447.
 22. Осипова Е.А., Цыбулько Н.С., Шамина З.Б. Вариабельность клеточных клонов *Thalictrum minus* in vitro // Физиология растений. 1999. Т. 46. С. 908.
 23. Карпун Н.Н., Янушевская Э.Б., Михайлова Е.В. Механизмы формирования неспецифического индуцированного иммунитета у растений при биогенном стрессе // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. С. 540. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.5.540rus>
 24. Ramakrishna A., Ravishankar G.A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants // Plant Signal Behav. 2011. V. 6. P. 1720. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
 25. Siatkaa T., Chlebek J., Hošťálková A. Copper (II) sulfate stimulates scopoletin production in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* // Nat. Product Commun. 2017. V. 12. P. 1779.
 26. Kartosentono S., Indrayanto G., Zaini N.C. The uptake of copper ions by cell suspension cultures of *Agave amaniensis*, and its effect on the growth, amino acids and hecogenin content // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2002. V. 68. P. 287.
 27. Bhuiyan N.H., Adachi T.J. Stimulation of betacyanin synthesis through exogenous methyl jasmonate and other elicitors in suspension-cultured cells of *Portulaca* // Plant Physiol. 2003. V. 160. P. 1117. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01044>
 28. Томилова С.В., Кочкин Д.В., Галишев Б.А., Носов А.М. Влияние повышенных Концентраций ионов меди на ростовые характеристики и синтез стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Tribulus terrestris* L. // Биотехнология. 2019. V. 35. P. 42.
 29. Осипова Е.А. Влияние биотического стресса на содержание протобербериновых алкалоидов в суспензионной культуре клеток *Thalictrum minus* L. Ученые записки Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского // Биология. Химия. 2020. Т. 6. С. 125.
 30. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures Murashige T. and Skoog F // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052>
 31. Loeffler S., Zenk M.N. Hydroxylation step in the biosynthetic pathway leading from norcoclaurine to reticuline // Phytochem. 1990. V. 29. P. 3499.
 32. Frenzel T., Zenk M.N. S-adenosyl-L-methionine: 3'-hydroxy-N-methyl (S)-coclaurine-4-O-Methyltransferase, a region- and stereoselective enzyme of the (S)-reticuline pathway // Phytochem. 1990. V. 29. P. 3505.
 33. Staba J.E. Plant tissue culture as a technique for the phytochemistry Staba J.E. // Resent Adv. In Phytochem. 1969. V. 2. P. 80.
 34. Цыбулько Н.С., Осипова Е.А. Метод определения протобербериновых алкалоидов в культуре ткани василистника // Химико-фармацевтический журнал. 1999. Т. 33. С. 34.
 35. Fang Y., Smith M.A.L., Pépin M.F. Effects of exogenous methyl jasmonate in elicited anthocyanin-producing cell cultures of ohelo (*Vaccinium pahalae*) // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 1999. V. 35. P. 106.
 36. Humberto A.-B.H., Vazques-hemandes M.C., Saenz de la O.D., Alvaroradio-Mariana A., Guevara-Gonzales R.G., Garcia-Trejo J.F., Feregrino-perez A.A. Role of stress and defense in plant secondary metabolites production // Bioactive Natural Products for Pharmaceutical Applications. 2020. P. 15.