

IRSTI: 62.33.29

M.K. TYNKULOV^{1*}, A.B. AKHMETOVA², A.B. ABZHALELOV¹, Sh.E. ARYSTANOVA¹,
A.U. UTAUBAYEVA³, Zh.N. UALIAKHMETOVA³, A.U. TUYAKBAYEVA¹,
A.Zh. TEMIRKHANOV⁴

¹L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

²Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

³M. Utemisov West Kazakhstan University, Uralsk, Kazakhstan

⁴Republican collection of microorganisms, Astana, Kazakhstan

*e-mail: tynkulov@list.ru

IN VITRO PLANT CELL CULTURE *AJUGA TURKESTANICA*

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.10

Abstract

The article presents the growth rates of cells of new lines obtained by inoculation-strains of the culture of the endemic plant *Ajuga turkestanica*. Scientific research was conducted in 2022 in the laboratory of biology of cultured cells of the Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev. The purpose of the work: to obtain new tissue and cell culture lines in vitro of the endemic *Ajuga turkestanica* plant, as well as to study the possibility of regulating culture growth and biosynthesis of secondary metabolism products by the influence of various factors. The objects of the study are suspension cultures of *Ajuga turkestanica* cells. Source material: callus strain *Ajuga turkestanica* (Regel) Briq. At21, received in 2016, as well as ready-made frozen collection bases from the cryobank of the Timiryazev IGF of the Russian Academy of Sciences. Research methods: Obtaining a suspension of cells from callus tissue; cultivation of suspension cultures; determination of growth characteristics of the culture: the content of dry and raw biomass in a liter of medium, the concentration of cells in the medium, the viability of the culture. The results of the evaluation of the growth characteristics of suspension crops were obtained. Practical significance: the obtained suspension cultures can be used for various biotechnological studies, such as the production of biologically active substances, the study of secondary metabolism, the development of biotechnological methods for the production of medicines.

Keywords: *Ajuga turkestanica*, endemic, *in vitro*, suspension, cultivation.

The plant kingdom is a rich source for the chemical and pharmaceutical industries. Plants serve as suppliers of a wide range of medicinal substances. Phytoecdysteroids, which possess high physiological activity, are of particular practical interest [1, 2].

Cell and tissue culture of higher plants aimed at obtaining biologically active substances is a promising direction in modern biotechnology. Significant attention is paid to the production and cultivation of cell cultures of endemic plants in vitro. One such plant is ajuga (*Ajuga L.*), or bugleweed - a perennial subshrub plant of the Dicotyledon class, belonging to the *Lamiaceae* family of the *Ajuga* genus [3-5].

Among the representatives of this genus, a significant place is occupied by *Ajuga turkestanica*. The shoots of this plant are widely used in cosmetology and sports medicine [6-10].

Studies by scientists [11-17] on phytochemical analysis have shown that *Ajuga turkestanica* contains a number of ecdysteroids, such as ecdysterone (β -ecdysone), cyasterone, ajugalactone, ajugasterone B, 2,3-monoacetonide ecdysterone, turkesterone, 22-acetylcysterone, 25-hydroxyatrocastosterone A, 11-hydroxycyasterone, turkesterone 22-acetate, 11-hydroxysitosterone, 22-oxoturkesterone, 11-hydroxy- Δ 24-capitasterone, and turkesterone 20,22-acetonide. Additionally, it has been found that *Ajuga turkestanica* contains iridoids such as harpagide and 8-O-acetyl harpagide [18, 19]. Oxosterols, sterols, and triterpenes (betulin and barrigenol) have been identified by GC-MS method. Phenylpropanoids, essential oils, lipid-soluble and water-soluble polysaccharides, and pectin substances have also been isolated from *Ajuga turkestanica* [20, 21].

The novelty of the scientific work lies in the cultivation of *Ajuga turkestanica* cells in vitro within the field of tissue culture, providing opportunities for the introduction of this endemic plant, its further cultivation, and the production of medicinal preparations with adaptogenic, anabolic, and antioxidant properties in the medical and pharmaceutical industries of Kazakhstan. Additionally, it may have potential significance for agricultural development through the breeding of new plant varieties with improved traits. The hypothesis of the research revolves around the possibility of successful cultivation and further investigation of the biosynthesis of bioactive compounds, making *Ajuga turkestanica* an intriguing subject for medical and pharmaceutical research.

The practical significance of the study lies in obtaining stable cell lines and optimizing cultivation conditions, paving the way for the production of medicinal preparations with adaptogenic, anabolic, and antioxidant properties. This can significantly enrich the arsenal of medical treatments for various diseases and improve the quality of life. The research results can also be applied to breeding new varieties of *Ajuga turkestanica* with enhanced traits, such as disease and pest resistance, increased productivity, and crop quality. This contributes to agricultural development in the region, enriching the variety of crops and creating new opportunities for farmers and agricultural producers.

Materials and methods of research

The objects of the study were: suspension cell cultures of *Ajuga turkestanica*, callus strain *Ajuga turkestanica* (Regel) Briq. At21, obtained in 2016, as well as ready frozen collection bases from the cryobank of the Institute of Plant Physiology named after K.A. Timiryazev RAS RF.

The study was conducted in 2022 at the Laboratory of Cultivated Cell Biology of the K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology (Russian Federation, Moscow).

Cell suspension was obtained from callus tissue, initially initiated on solid agarized nutrient medium using the method of subculturing and sieving. Initially, callus tissue formed on the surface of the explant, and then cells and cell aggregates were separated from it, resulting in a cell suspension. Before subculturing, the primary culture was filtered through two layers of cheesecloth to separate large callus tissue aggregates and remnants of the transplant. After that, the culture was placed in a liquid medium with automatic stirring. Suspension cultures were grown on Murashige and Skoog medium [22] supplemented with casein hydrolysate (0.5 g/l), inositol (0.1 g/l), 3% sucrose, vitamins according to Staba, and phytohormones (2 mg/l kinetin and 3 mg/l NAA for the collection strain; 1 mg/l kinetin and 2 mg/l 2,4-D for young strains).

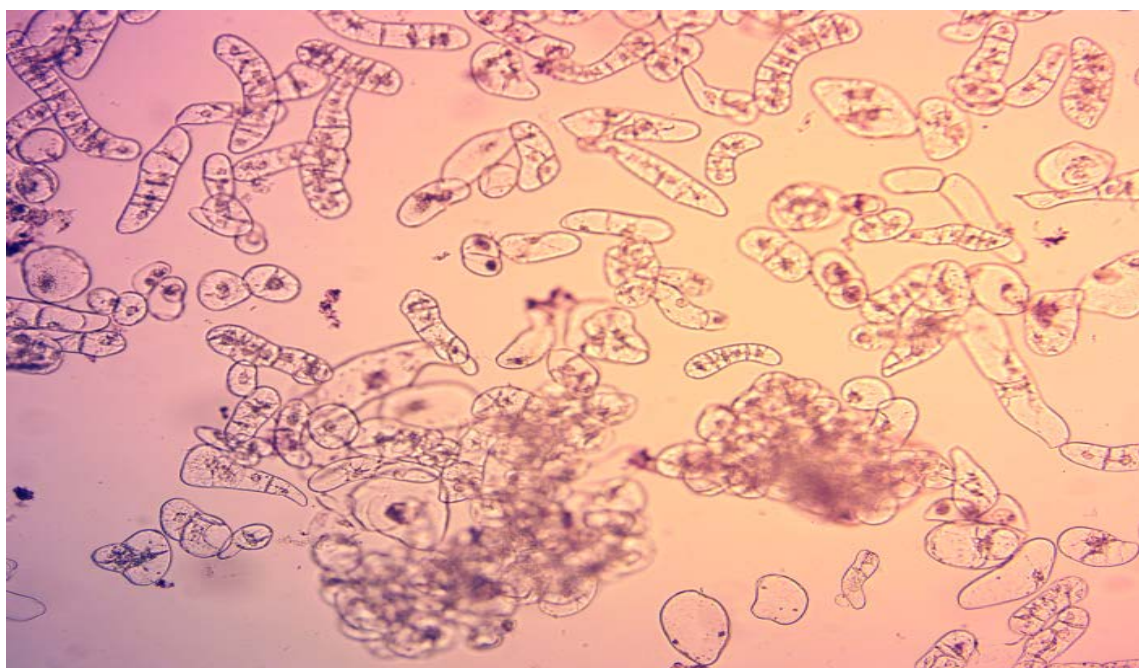
To investigate the growth characteristics of the culture, the content of dry and wet biomass per liter of medium, the cell concentration in the medium, and the culture viability were determined. The biomass was dried to a constant weight at 60°C. To count the cell concentration in the medium, 0.5 ml of suspension was incubated with 2.5 ml of a 20% solution of chromic acid at 60°C for 15 minutes. [23].

The aqueous solutions for nutrient media were prepared by stirring on a laboratory magnetic stirrer.

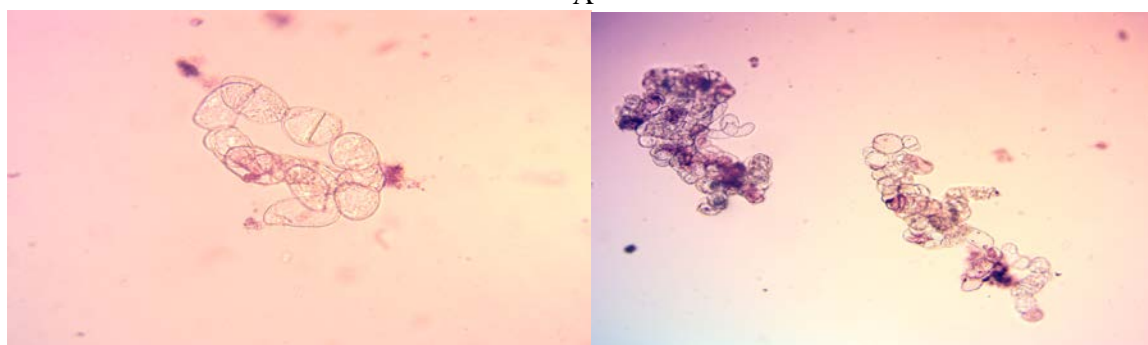
Additionally, the stock solutions were supplemented with casein hydrolysate (0.5 g/L), inositol (0.1 g/L), 3% sucrose, Staba vitamins, and calcium pantothenate. The following cultures were obtained for further extraction – lines: DBN 55-1, DNK 55-1, DNK 14a; as well as collection bases were prepared from the collection strain of *Ajuga turkestanica*.

To determine the content of wet and dry biomass in 1 liter of medium, a fixed volume of suspension (not less than 15 ml, in triplicate) was filtered through a filter paper using a Büchner funnel under vacuum.

To assess the viability of cell cultures, a vital stain, phenosafranin (0.1% solution), was utilized. This involved counting live (unstained) and dead (stained) cultured cells and aggregates under a microscope (Figure 1) [24].



A



B

Figure 1 – a) cell lines of 14a DNA *Ajuga turkestanica* and b) cell lines of 55-1 DBN *Ajuga turkestanica*

According to the obtained results, the following parameters were calculated: growth index (I), specific growth rate in the exponential phase (μ), economic coefficient (Y), doubling time (τ), and productivity (P) of the studied cultures, using the following formulas [25]:

$$I = X_0 X_{MAx} - X_0; \quad (1)$$

where X_{max} and X_0 represent the maximum and initial values of one of the growth criteria (in this study, the content of dry biomass per liter of medium).

$$\mu = \tau_2 - \tau_1 \ln X_2 - \ln X_1; \quad (2)$$

where X_2 and X_1 represent the values of the growth criterion (content of dry biomass per liter of medium) at time points t_2 and t_1 , respectively (calculated for the exponential growth phase).

$$\tau = \ln_2 / \mu Y = (X_{max} - X_0) / S; \quad (3)$$

where X_{max} and X_0 represent the maximum and initial amount of dry biomass in the medium (g/L), respectively, and S is the initial substrate concentration (sucrose) in the medium (g/L of medium) [26].

The data processing was carried out using Microsoft Office Excel software (Microsoft Corporation, USA). The graphs represent the arithmetic mean values and standard deviations from three replicates of subcultivation.

Results and discussion

To determine the increase in dry and wet biomass of cells of the investigated 12 lines in the cell culture growth cycle, growth characteristics of the most prominent 3 lines of *Ajuga turkestanica* were studied: 14a DNA, 55-1 DBN, 55-1 DNA. The obtained results, specifically in the subcultivation cycle of the suspension culture of the *Ajuga turkestanica* strain under standard cultivation in flasks, are presented in the figures. (14a DNA - Figures 2-5; 55-1 DBN - Figures 6-9; 55-1 DNA - Figures 10-13).

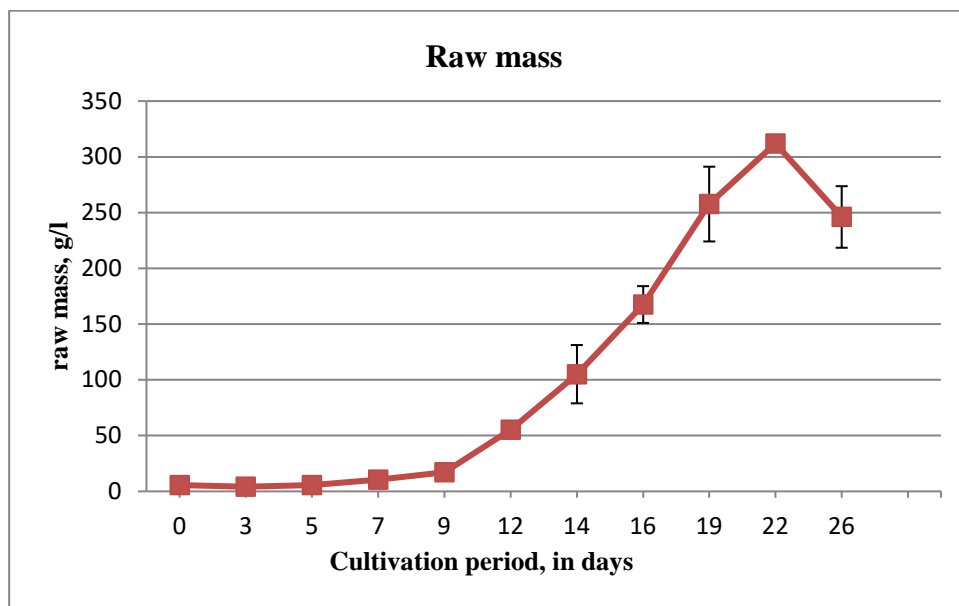


Figure 2 – Raw mass curve of cell lines 14a DNA

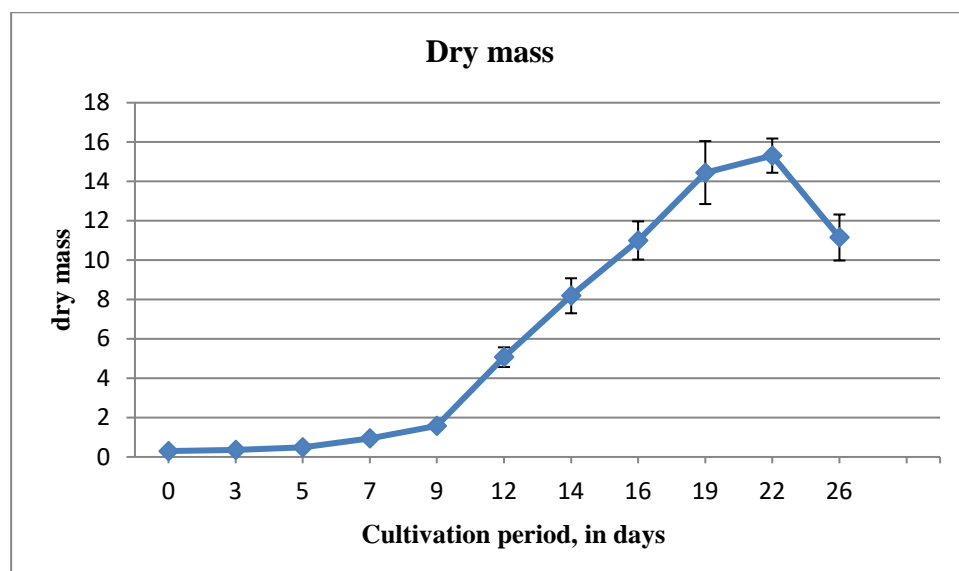


Figure 3 – Dry mass curve of cell lines 14a DNA

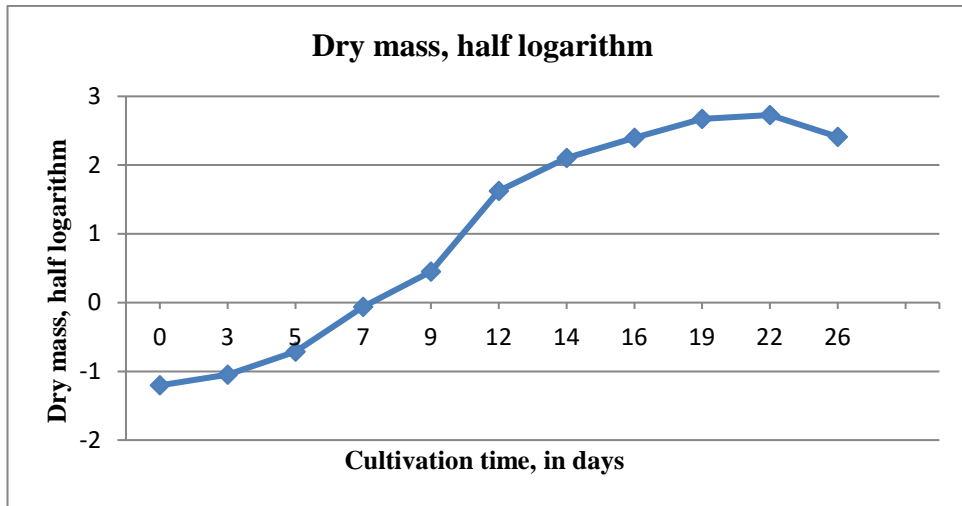


Figure 4 – Half logarithmic graph of growth of dry mass of cell lines 14a DNA

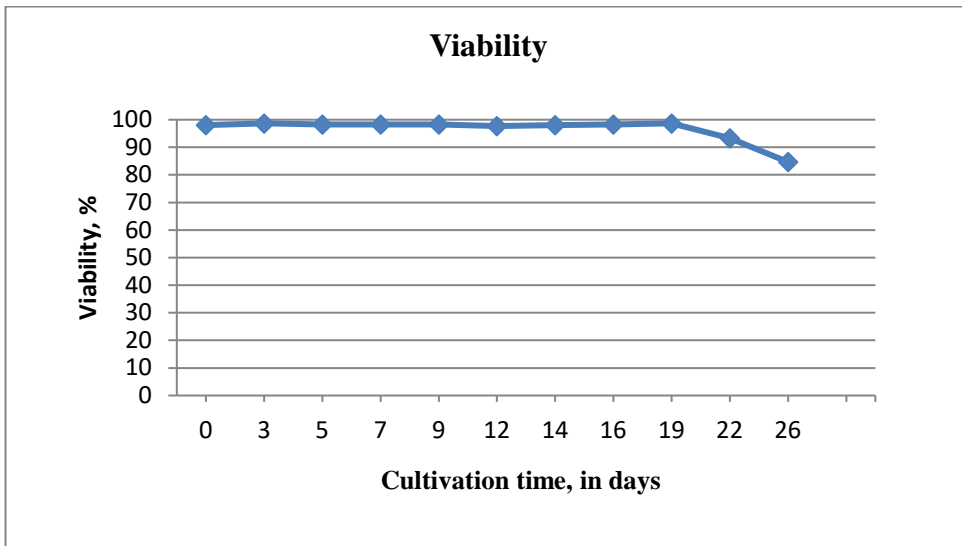


Figure 5 – Viability of cell lines 14a DNA

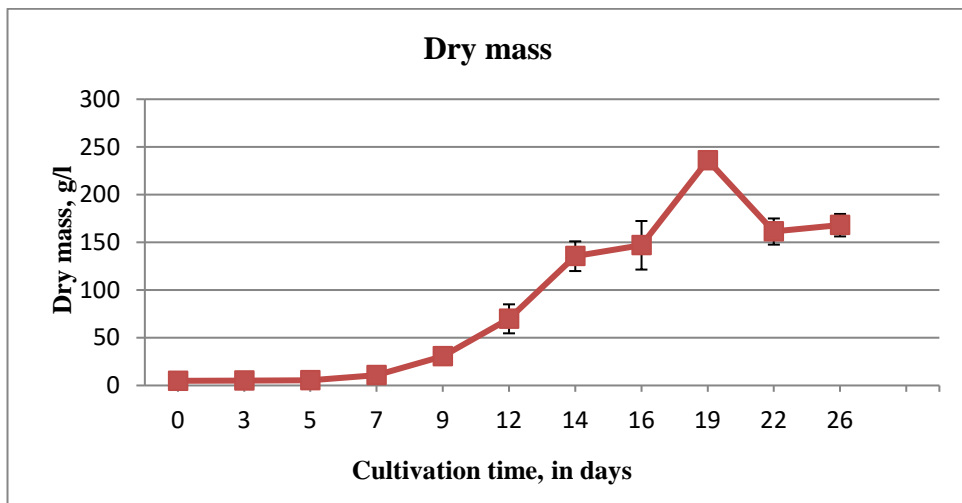


Figure 6 – Dry mass curve of cell lines 55-1 DBN

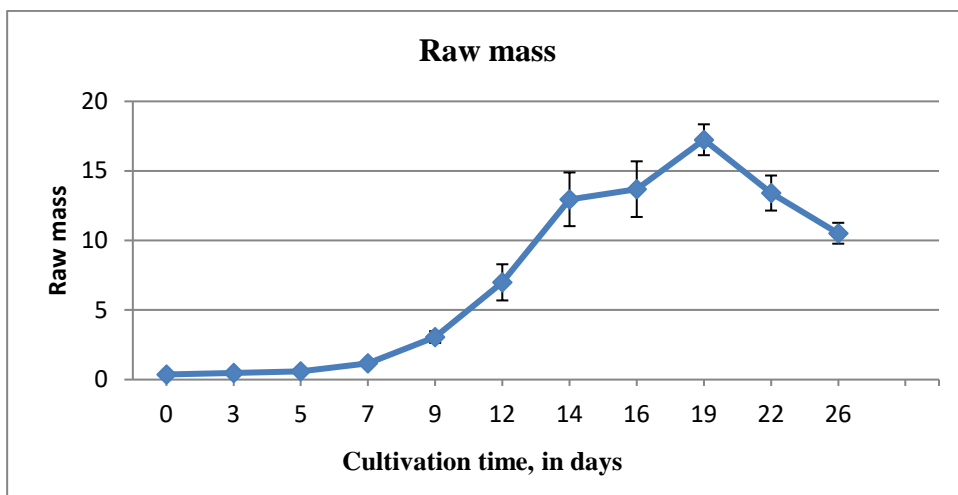


Figure 7 – Raw mass curve of cell lines 55-1 DBN

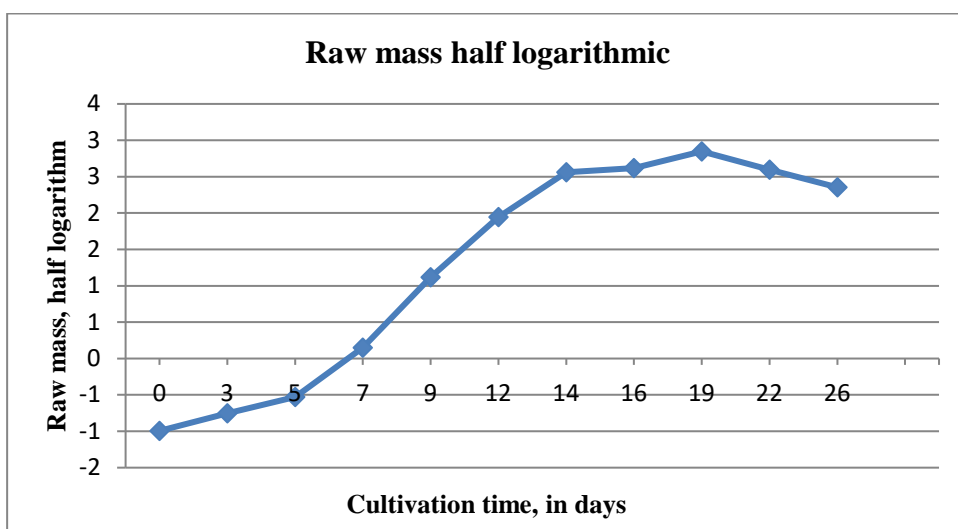


Figure 8 – Half logarithmic graph of growth of dry mass of cell lines 55-1 DBN

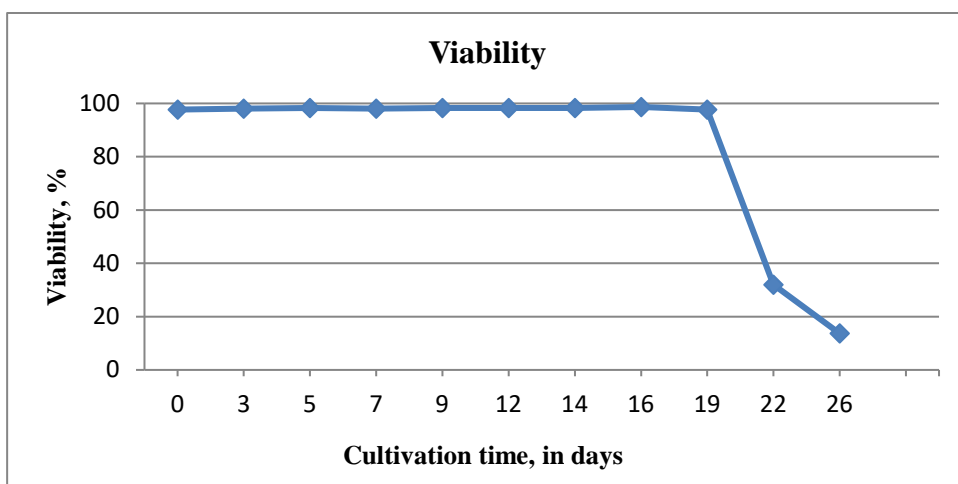


Figure 9 – Viability of cell lines 55-1 DBN

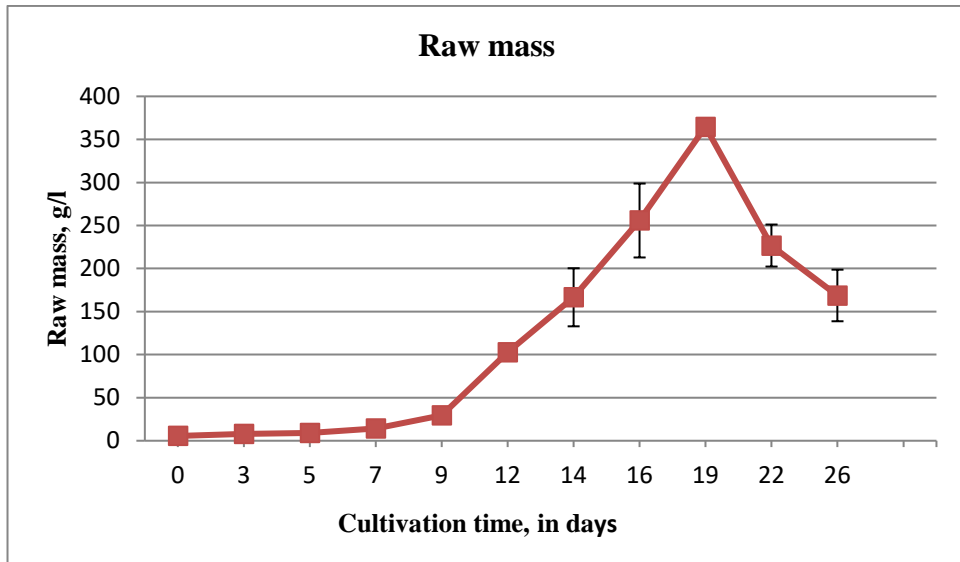


Figure 10 – Raw mass curve if cell lines 55-1 DNA

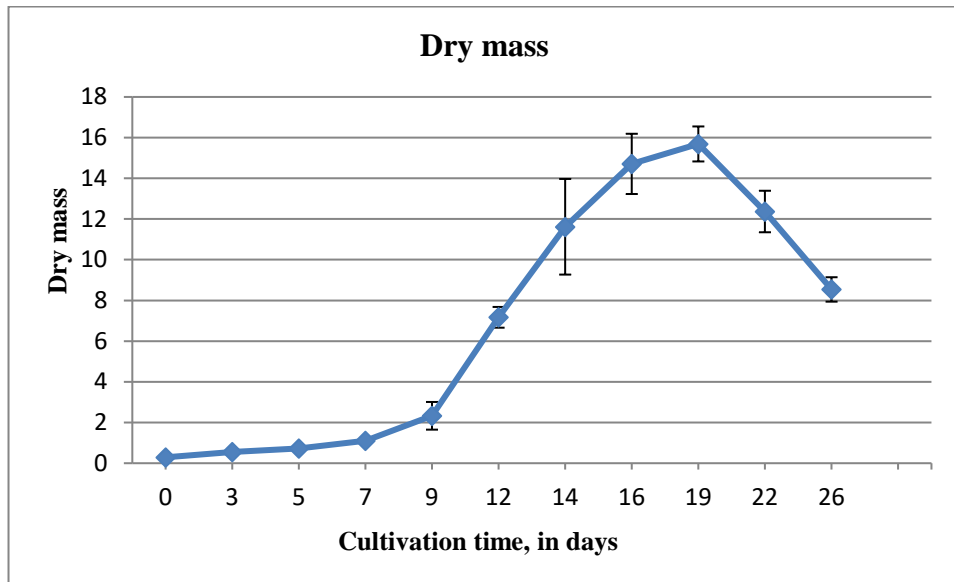


Figure 11 – Dry mass curve of cell lines 55-1 DNA

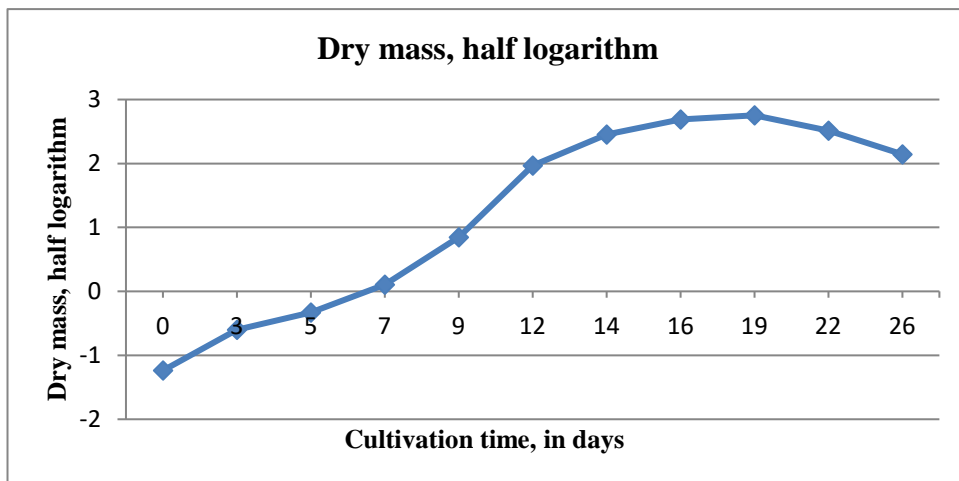


Figure 12 – Half logarithmic graph of growth of dry mass of cell lines 55-1 DNA

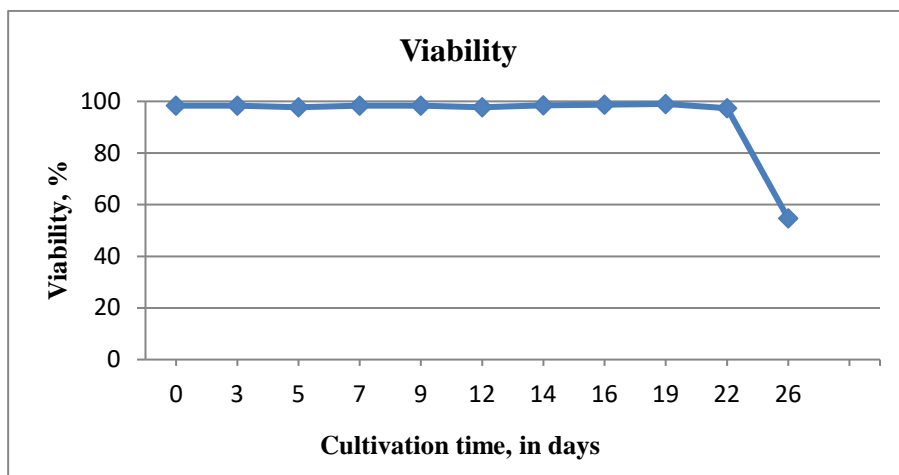


Figure 13 – Viability of cell lines 55-1 DNA

Based on the presented results of growth characteristics analysis, it can be concluded that all studied cell culture lines of *Ajuga turkestanica* demonstrate high growth rates.

For cultures 14a DNA and 55-1 DNA, a typical sigmoid growth curve is observed, unlike the 55-1 DBN line, where cell viability varies from 100% to 10% throughout the culture cycle. The cells of culture 14a DNA decrease to 80% upon reaching the final phase, 55-1 DNA - to 50%, and 55-1 DBN - to 10%.

In the growth curve with an S-shaped form, the 14a DNA cell culture line of *Ajuga turkestanica* exhibits a lag phase of -5 days, which is attributed to the relatively high initial culture density (2 g/L medium). The exponential growth phase based on dry weight lasts for 10 days, followed by a deceleration phase of 2 days. The stationary phase is almost absent, and from day 22, the in vitro cell population undergoes a sharp transition into a degradation stage characterized by increased cell hydration and decreased viability.

The duration of growth phases for the 55-1 DBN line is as follows: a lag phase of 7 days, followed by an exponential phase of 7 days. The prolonged exponential phase is attributed to a "step" observed in the growth curve (days 14-16). The appearance of this "step" is often caused by the presence of two subpopulations of cells with different proliferative activity within the culture. The stationary growth phase is also practically absent, with the degradation phase beginning immediately after the deceleration phase. This is a characteristic feature of the growth curve of *Ajuga turkestanica* cell culture.

For the 55-1 DNA line, the duration of phases and the absence of a stationary phase are quite similar to the 14a DNA line. The appearance of a "step" in the growth curve (days 12-14) also influenced the duration of the exponential growth phase, which lasted for 11 days. A less common reason for such a growth curve shape could be extracellular substrate (sucrose) hydrolysis and variations in the intensity of monosaccharide (glucose and fructose) utilization by the cells.

Based on the growth curves of the studied lines, the main growth characteristics were calculated (Table 1).

Table 1 – Growth results of investigated culture cells by phases

Culture	Growth phase			
	Lag phase	Exponential	Stationary	Degradation
14a DNA	5	5-12	19-22	22 and more
55-1 DBN	7	7-12	19-22	22 and more
55-1 DNA	5	5-12	19-22	22 and more

Comparison of growth parameters of the investigated cell cultures, calculated based on dry biomass, is presented in Table 2.

Table 2 - Growth parameters of the investigated cell cultures

Culture	M in point 0	M _{max} of dry mass	Achievements per day M _{max} of dry mass	Growth index (I)	Specific speed (μ)	Economic coefficient (Y)	Viability
55-1 DBN	0,21	10,97	22,00	51,24	0,50	0,36	0,49
14a DNA	0,12	17,26	16,00	142,83	0,82	0,57	1,07
55-1 DNA	0,10	14,13	14,00	140,30	1,04	0,47	1,00

Note: X_{max} - maximum biomass accumulation (g/L), I - growth index, μ - specific growth rate in the exponential phase (day⁻¹), τ - doubling time (days), Y - economic coefficient

Comparison of the obtained results with data from other authors on cell culture of *Ajuga turkestanica* allows for assessing similarities and differences in the growth characteristics of the investigated lines. The growth index (I) based on dry biomass exceeds 50 for all lines, indicating a high productivity of the cell cultures. The specific growth rate (μ) also falls within the range of 0.50-1.04 day⁻¹, and the doubling time of cell cultures (τ) ranges from 5 to 7 days, indicating rapid cell proliferation and healthy culture growth. The maximum biomass accumulation (M_{max}) surpasses 10 g/l, indicating high productivity of the *Ajuga turkestanica* cell cultures. The economic coefficient (Y) for all investigated cell cultures also falls within satisfactory limits, confirming the efficient utilization of the substrate (sucrose) and the potentially high economic benefit from producing bioactive substances from *Ajuga turkestanica*. Thus, the obtained results suggest that all studied cell cultures can be considered as well-growing, although each line exhibits specific growth curve characteristics (duration of growth phases, presence of a "shoulder" in the exponential growth phase).

Acknowledgment

The authors acknowledge the staff of the Cell Culture Laboratory at the K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia), for their collaboration and assistance in conducting the research.

Conclusion.

Based on the obtained research results, the following conclusions can be drawn:

Growth Curves: All lines (14a DNA, 55-1 DBN) except 55-1 DNA exhibit an S-shaped growth curve. Cell Viability: Cell viability during the cycle varies within the range of 10-80%. Growth Phases: Lag Phase: Lasts for 5-7 days. Exponential Phase: Spans 9-10 days. Deceleration Phase: Lasts 2-3 days. Stationary Phase: Virtually absent. Degradation: Begins from day 22. Growth Characteristics: Growth Index (I) > 50. Specific Growth Rate (μ) = 0.50-1.04 day⁻¹. Doubling Time (τ) = 5-7 days. Maximum Biomass Accumulation (X_{max}) > 10 g/L. Economic Coefficient (Y) = 0.36-0.57.

In conclusion, all *A. turkestanica* lines are well-optimized for growth, each exhibiting specific characteristics in its growth curve. Overall, all studied cell cultures can be considered as good growers.

References:

- 1 Atabekova A.I., Ustinova E.I. *Citologiya rastenij*. - 4-e izd., pererab. i dop. - M.: Agropromizdat, 1987. - 246 s.
- 2 Gladkova V.N. Rod Zhivuchka *Ajuga*. *Flora Evropejskoj chasti SSSR*. - L., 1978. T.2. - 259 s.
- 3 Annenkov N. *Botanicheskij slovar'*. - M.: SPb., 1978. - 646 s.
- 4 Abubakirov N. K. Ecdysteroids of flowering (Angiospermae). *Chem. Nat. Comp.* - 1981. - Vol. 17. - P. 489-503. (<https://doi.org/10.1007/BF00574363>)
- 5 Ahrem A.A., Kovchenko V. *Ekdisteroidy: biohimiya, fiziologiya, farmakologiya*. - Kiev: Naukova dumka, 1989. - 215 s.

- 6 Endress, R. Culturing of Plant Cells. In: Plant Cell Biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg. – 1994. P. 46-62. (https://doi.org/10.1007/978-3-662-02996-1_3)
- 7 Jaime Tomás, Francisco Camps, Josep Coll, Enric Melé, Joaquina Messeguer. Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue cultures. *Phytochemistry*, Volume 32, Issue 2, 1993, P. 317-324, [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94988-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94988-4).
- 8 Lev C.B., Zakirova R.P., Saatov Z., Gorovic M.B., Abubakirov N.K. Ekdisteroidy kul'tury tkanej i kletok kivuchki turkestanokoj. *Referaty dokl. i soobshch. XIV Mendeleevskogo s'ezda po obshchey i prikladnoj himii*. M.: Nauka, 1989.- T.2.- S. 278-283.
- 9 Travyanistye dekorativnye mnogoletniki Glavnogo botanicheskogo sada im. N.V. Cicina RAN. M.: Nauka, 2009. - 396 s.
- 10 Butenko R.G. Biologiya kletok vysshih rastenij in vitro i biotekhnologii na ih osnove. M.: FBK-PRESS, 1999. - 160 s.
- 11 Mashkovskij M.D. Lekarstvennye sredstva.– M., 2008 – S.735–743. ISBN 978-5-7864-0345-0.
- 12 Teplyakov A.T., Bolotskaya L.A., Vdovina T.V. i dr. Klinicheskie i immunomoduliruyushchie vliyaniya polioksidoniy dlya korrekcii vtorichnogo immunodeficita u bol'nyh ishemicheskoy bolezn'yu serdca, associirovannoj s saharnym diabetom tipa 2. *Immunologiya*. – 2008. – T. 29, № 1. – S. 44–50.
- 13 Butenko R.G. Biologiya kletok vysshih rastenij in vitro i biotekhnologii na ih osnove. M.: FBK-PRESS, 1999. - 160 s.
- 14 Rastitel'nye resursy SSSR. T. 6: Cvetkovye rasteniya, ih himicheskij sostav, ispol'zovanie. Semejstva.
- 15 Nosov A.M. Funkcii vtorichnyh metabolitov in vivo i in vitro. – M.: *Fiziologiya rastenij*, 41, 1994. S. 873–878.
- 16 Nosov A.M. Kul'tura kletok vysshih rastenij: ot fundamental'nyh issledovanij k prakticheskomu primeneniyu. *Metody kul'tivirovaniya kletok*; Pod red. Pinaeva G.P., Bogdanovoj V.P. – SPb.: Izd-vo Politekh. un-ta, 2008. – S. 95-118.
- 17 Mamathanov A.U., Hazhibaev T.A., Halilov R.M. Ajuga turkestanica al'ternativnyj istoch-nik dlya proizvodstva ekdistena. *Himiya rastitel'nogo syr'ya*. 2022. №1. S. 309–318. (<http://dx.doi.org/10.14258/jcprm.2022019271>)
- 18 Usmanov V.Z., Gorovits M.B., Abubakirov N.K. Phytoecdysones of *Ajuga turkestanica*. *Chem. Nat. Compd.* 1971. Vol. 7. p. 520. (<http://dx.doi.org/10.14258/jcprm.2022019271>)
- 19 Guibout L., Mamadalieva N., Balducci C., Girault J-P., Lafont R. The minor ecdysteroids from *Ajuga turkestanica*. *Phytochemical Analysis*. 2015. Vol. 26. № 5. p. 293–300. (<https://doi.org/10.1002/pca.2563>)
- 20 Ramazanov N.S. Phytoecdysteroids and Other Biologically Active Compounds from Plants of the Genus *Ajuga*. *Chem. Nat. Compd.* 2005. Vol. 41. p. 361–369. (<http://dx.doi.org/10.1007/s10600-005-0153-4>)
- 21 Kotenko L.D., Yakubova M.R., Mamatkhanov A.U., Saatov Z., Turakhozhaev M.T. Iridoids of *Ajuga turkestanica* and their quantitative determination. *Chem. Nat. Compd.* 1993. Vol. 29. p. 606–607. (<http://dx.doi.org/10.14258/jcprm.2022019271>)
- 22 Murashige T. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog. *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – p.473-495.
- 23 Eshbakova K.A., Zakirova R.P., Khasanova K.I., Bobakulov Kh.M., Aisa H.A., Sagdullaev Sh.Sh., Nosov A.M. Phenylpropanoids from Callus Tissue of *Ajuga turkestanica*. *Chem. Nat. Compd.* 2019. Vol. 55. p. 28–31. (<http://dx.doi.org/10.1007/s10600-019-02608-8>)
- 24 Mamadalieva N.Z., El-Readi M.Z., Ovidi E., Ashour M.L., Hamoud R., Sagdullaev S.S., Azimova S.S., Tiezzi A., Wink M. Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica*. *Phytopharmacology*. 2013. Vol. 4. n1. p. 1–18. (<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2018.1443088>)
- 25 Nosov A.M. Metody ocenki i harakteristiki rosta kul'tur kletok vysshih rastenij. *Sb: Molekulyarnogeneticheskie i biohimicheskie metody v sovremennoj biologii rastenij*, pod red. Kuznecova V.I., Kuznecova V.V., Romanova G.A. - M.: BINOM, 2012. S. 386–403.
- 26 Khidoyatova S.K., Ul'chenko N.T., Gusakova S.D. Chernenko T.V., Sagdullaev Sh.Sh., Nigmatullaev A.M. Com-parative study of lipids and lipophilic constituents from separate organs of *Ajuga turkestanica*. *Chem. Nat. Compd.* 2012. Vol. 48. p. 732–736. (<http://dx.doi.org/10.1007/s10600-012-0370-6>)

М.Қ. ТЫНЫҚҰЛОВ^{1*}, А.Б. АХМЕТОВА³, А.Б. АБЖАЛЕЛОВ¹, Ш.Е. АРЫСТАНОВА¹,
А.У. УТАУБАЕВА⁴, Ж.Н. УАЛИАХМЕТОВА⁴, А.У. ТҰЯҚБАЕВА¹,
А.Ж. ТЕМИРХАНОВ⁴

¹Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана, Қазақстан

²М.В. Ломоносов атындағы Мәскеу мемлекеттік университеті, Мәскеу, Ресей

³әл-Фараби Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

⁴М. Өтемісов атындағы Батыс Қазақстан университеті, Орал, Қазақстан

*e-mail: tynykulov@list.ru

ӨСІМДІК ЖАСУШАЛАРЫНЫҢ DAҚЫЛЫ IN VITRO AJUGA TURKESTANICA

Түйін

Мақалада эндемикалық өсімдік *Ajuga turkestanica* культурасының штамдары-егу арқылы алынған жаңа сызықтардың жасушаларының өсу көрсеткіштері келтірілген. Ғылыми зерттеулер 2022 жылы К.А. Тимирязев атындағы Өсімдіктер физиологиясы институтының мәдени жасушалар биологиясы зертханасында жүргізілді. Жұмыстың мақсаты: *Ajuga turkestanica* эндемикалық өсімдігінің in vitro тіндер мен жасушалар мәдениетінің жаңа желілерін алу, сондай-ақ әртүрлі факторлардың әсерінен мәдениеттің өсуін және қайталама метаболизм өнімдерінің биосинтезін реттеу мүмкіндігін зерттеу. Зерттеу нысандары *ajuga turkestanica* жасушаларының суспензиялық дақылдары болып табылады. Бастапқы материал: 2016 жылы алынған *Ajuga turkestanica* (Regel) Briq At21 каллус штаммы, сондай-ақ Ресей Федерациясының РФА К.А. Тимирязев атындағы Өсімдіктер физиологиясы институтының криобанкінен дайын мұздатылған коллекциялық базалар. Зерттеу әдістері: каллус тінінен жасуша суспензиясын алу; суспензия дақылдарын өсіру; мәдениеттің өсу сипаттамаларын анықтау: бір литр ортадағы құрғақ және шикі биомассаның мөлшері, ортадағы жасуша концентрациясы, мәдениеттің өміршеңдігі. Суспензиялық дақылдардың өсу сипаттамаларын бағалау нәтижелері алынды. Практикалық маңыздылығы: алынған суспензия дақылдарын биологиялық белсенді заттарды алу, қайталама метаболизмді зерттеу, дәрілік препараттарды өндірудің биотехнологиялық әдістерін әзірлеу сияқты әртүрлі биотехнологиялық зерттеулер үшін пайдалануға болады.

Кілтті сөздер: *Ajuga turkestanica*, эндемик, in vitro, суспензия, өсіру.

МРНТИ: 62.33.29

М.К. ТЫНЫҚҰЛОВ^{1*}, А.Б. АБЖАЛЕЛОВ¹, А.Б. АХМЕТОВА³, Ш.Е. АРЫСТАНОВА¹,
А.У. УТАУБАЕВА⁴, Ж.Н. УАЛИАХМЕТОВА⁴, А.У. ТҰЯҚБАЕВА¹,
А.Ж. ТЕМИРХАНОВ⁴

¹Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

⁴Западно-Казахстанский университет им. М. Утемисова, Уральск, Казахстан

*e-mail: tynykulov@list.ru

КУЛЬТУРА РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК IN VITRO AJUGA TURKESTANICA

doi:10.53729/MV-AS.2024.02.10

Аннотация

В статье приведены ростовые показатели клеток новых полученных путем инокуляции линий-штаммов культуры эндемичного растения *Ajuga turkestanica*. Научные исследования проведены в 2022 году в лаборатории биологии культивируемых клеток Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева. Цель работы: получение новых линий культуры тканей и клеток in vitro эндемичного растения *Ajuga turkestanica*, а также изучение возможности регуляции роста культуры и биосинтеза продуктов вторичного метаболизма воздействием различных факторов. Объектами исследования

являются суспензионные культуры клеток *Ajuga turkestanica*. Исходный материал: каллусный штамм *Ajuga turkestanica* (Regel) Briq. Ат21, полученный в 2016 году, а также готовые замороженные коллекционные базы из криобанка ИФР им. К.А. Тимирязева РАН РФ. Методы исследования: получение суспензии клеток из каллусной ткани; культивирование суспензионных культур; определение ростовых характеристик культуры: содержание сухой и сырой биомассы в литре среды, концентрация клеток в среде, жизнеспособность культуры. Получены результаты по оценке ростовых характеристиках суспензионных культур. Практическая значимость: полученные суспензионные культуры могут быть использованы для различных биотехнологических исследований, таких как получение биологически активных веществ, изучение вторичного метаболизма, разработка биотехнологических методов производства лекарственных препаратов.

Ключевые слова: *Ajuga turkestanica*, эндемик, *in vitro*, суспензия, культивирование.

Растительный мир является богатым источником для химико-фармацевтической промышленности. Растения служат поставщиками широкого спектра лекарственных веществ. Большой практический интерес представляют фитоэкдистероиды, обладающие высокой физиологической активностью [1, 2].

Культура клеток и тканей высших растений с целью получения биологически активных веществ - перспективное направление современной биотехнологии. Большая роль отводится работам по получению и выращиванию культур клеток эндемичных растений *in vitro*. Одним из таких растений является аюга (*Ajuga L.*) или живучка - многолетнее полукустарниковое растение класса Двудольные (*Dicotyledoneae*), семейства Губоцветные (*Labiatae*) или Яснотковые (*Lamiaceae*) рода Живучка (*Ajuga L.*) [3-5].

Из представителей этого рода важное место отводится аюге (живучка) туркестанской (*Ajuga turkestanica*). Побеги данного растения широко применяются в косметологии и спортивной медицине [6-10]. Исследования ученых [11-17] по фитохимическому изучению показали, что живучка туркестанская содержит ряд экдистероидов, таких как экдистерон (β -экдизон), циастерон, аюгалактон, аюгастерон В, 2,3-моноацетонид экдистерон, туркестерон, 22-ацетилциастерон, 25-гидроксиатротостерон А, 11-гидроксициастерон, туркестерон 22-ацетат, 11-гидроксицидистерон, 22-оксотуркестерон, 11-гидрокси- Δ 24-капастерон, туркестерон 20,22-ацетонид. Кроме этого выявлено, что живучка туркестанская содержит иридоиды, такие как гарпагид и 8-О-ацетилгарпагид [18, 19]. Методом GC-MS идентифицированы оксостеролы, стеролы и тритерпены (бетулин и барригенол). Из живучки туркестанской также выделены фенилпропаноиды, эфирные масла, спирторастворимые и водорастворимые полисахариды, пектиновые вещества [20, 21]. В аюге туркестанской имеются углеводы, белки, сапонины, флавоноиды, дубильные вещества, горечи, эфирные масла, аскорбиновая кислота, витамин К и другие. Живучка обладает тонизирующими и адаптогенными свойствами, имеет высокий анаболический эффект и антиоксидантную и адаптогенную активность.

Новизна научной работы. Исследования по культивированию клеток *Ajuga turkestanica in vitro* в области тканевой культуры дают возможность интродукции этого эндемичного растения, его дальнейшего культивирования и производства лекарственных препаратов с адаптогенными, анаболическими и антиоксидантными свойствами в медицинской и фармацевтической промышленности Казахстана, также может иметь потенциальное значение для развития сельского хозяйства через выведение новых сортов растений с улучшенными свойствами.

Гипотеза исследования заключается в возможности успешной культивации и дальнейшем исследовании биосинтеза биологически активных веществ, которые делают *Ajuga turkestanica* интересным объектом для медицинских и фармацевтических исследований.

Практическая значимость работы. Получение стабильных линий клеток и оптимизация условий культивирования открывают путь к производству лекарственных препаратов с адаптогенными, анаболическими и антиоксидантными свойствами, что может значительно обогатить арсенал средств медицины для лечения различных заболеваний и

улучшения качества жизни. Результаты исследования могут быть применены для выведения новых сортов растений *Ajuga turkestanica* с улучшенными свойствами, такими как устойчивость к болезням и вредителям, повышенная продуктивность и качество урожая. Это способствует развитию сельского хозяйства в регионе, обогащая ассортимент культур и создавая новые возможности для фермеров и производителей сельскохозяйственной продукции.

Материалы и методы исследований

Объектами исследований были суспензионные культуры клеток аюги туркестанской *Ajuga turkestanica*, каллусный штамм *Ajuga turkestanica* (Regel) Briq. At21, полученный в 2016 году, а также готовые замороженные коллекционные базы из криобанка Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН РФ. Исследование проводили в 2022 году в Лаборатории биологии культивируемых клеток Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева (РФ, г. Москва). Суспензию клеток получали из каллусной ткани, предварительно иницируемой на твердой агаризованной питательной среде, методом пересева и просеивания. Сначала на поверхности экспланта образовывалась каллусная ткань, а затем от нее отделялись клетки и клеточные агрегаты, в результате получалась клеточная суспензия. Перед пересевом первичную культуру фильтровали через два слоя марли для отделения крупных агрегатов каллусной ткани и остатков трансплантата. После этого культуру помещали в жидкую питательную среду с автоматическим перемешиванием. Суспензионные культуры выращивали на среде Мурасиге и Скуга [22] с добавлением гидролизата казеина (0,5 г/л), инозита (0,1 г/л), 3 % сахарозы, витаминов по Стаба и фитогормонов (2 мг/л кинетина и 3 мг/л НУК для коллекционного штамма; 1 мг/л кинетина и 2 мг/л 2,4-Д для молодых штаммов). Культивирование проводили в темноте при 26 °С, на качалке (100 об./мин.), в колбах объемом 250 мл (30–40 мл суспензии в колбе).

Для исследования ростовых характеристик культуры определяли содержание сухой и сырой биомассы в литре среды, концентрацию клеток в среде и жизнеспособность культуры. Биомассу высушивали до постоянного веса при 60 °С. Для подсчета концентрации клеток в среде 0,5 мл суспензии инкубировали с 2,5 мл 20 % раствора хромовой кислоты при 60 °С в течение 15 мин. [23]. Приготавливаемые водные растворы для питательных сред размешивали на лабораторной магнитной мешалке.

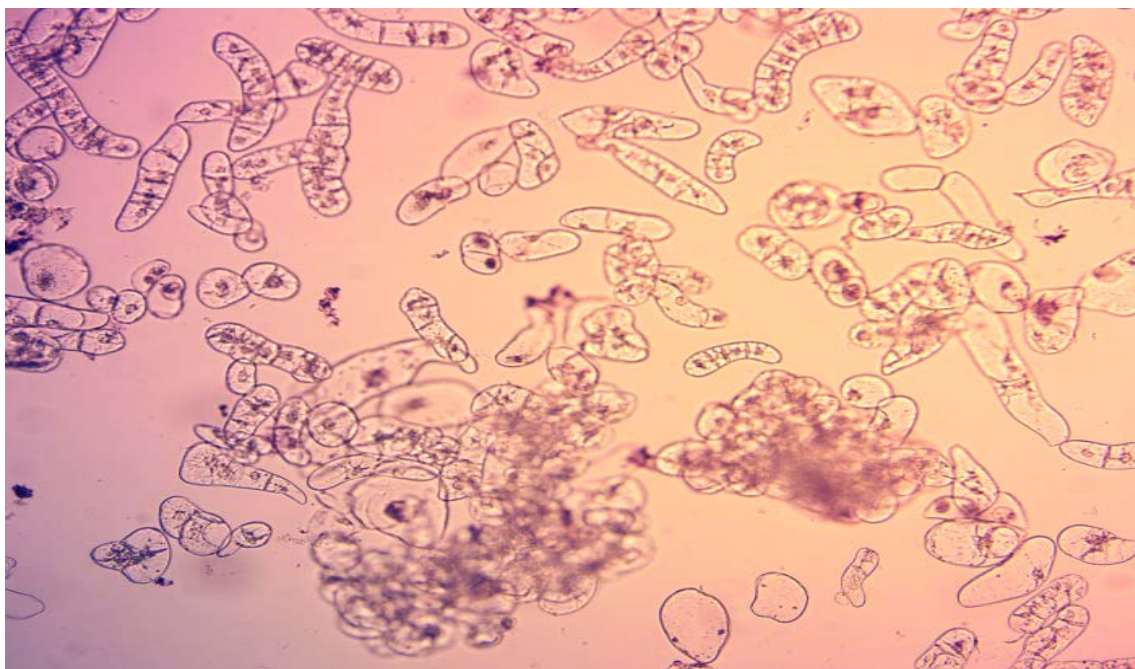
Кроме этого, в стоковые среды добавляли гидролизат казеина (0,5 г/л), инозит (0,1 г/л), 3 % сахарозы, витамины по Стаба, Са-пантотенат.

Взвешивание образцов и веществ проводили на лабораторных электронных весах GP-603S.

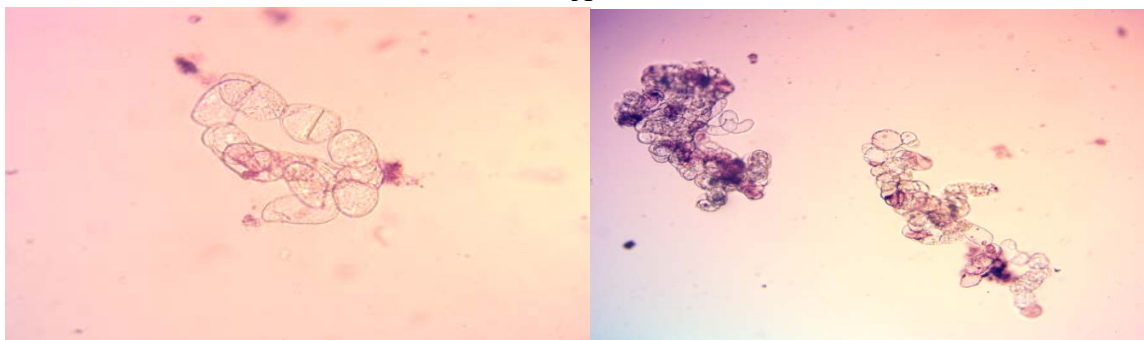
Были получены следующие культуры для дальнейшего экстрагирования – линии: ДБН 55-1, ДНК 55-1, ДНК 14а; а также приготовлены коллекционные базы из коллекционного штамма аюги туркестанской.

Для определения содержания сырой и сухой биомассы в 1 л среды фиксированный объем суспензии (не меньше 15 мл, в трёх повторностях) фильтровали через бумажный фильтр с помощью воронки Бюхнера, под вакуумом.

Для определения жизнеспособности культур клеток использовали прижизненный краситель феносафранин (0,1%-ый раствор), методом подсчета живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) культивируемых клеток и агрегатов под микроскопом (рисунок 1) [24].



А



Б

Рисунок 1 – а) клетки линии 14а ДНК *Ajuga turkestanica* и б) клетки линии 55-1 ДБН *Ajuga turkestanica*

По полученным результатам рассчитывали индекс роста (I), удельную скорость роста в экспоненциальной фазе (μ), экономический коэффициент (Y), время удвоения (τ) и продуктивность (P) исследуемых культур, используя следующие формулы [25]:

$$I = x_0 x_{MAX} - x_0$$

где X_{max} и X_0 – максимальное и начальное значение одного из критериев роста (в данной работе – содержание сухой биомассы в литре среды).

$$\mu = \tau_2 - \tau_1 \ln X_2 - \ln X_1$$

где X_2 и X_1 – значения критерия роста (содержание сухой биомассы в литре среды) в момент времени t_2 и t_1 , соответственно (рассчитывается для экспоненциальной фазы роста).

$$\tau = \ln_2 / \mu Y = (X_{max} - X_0) / S$$

где X_{max} и X_0 – максимальное и начальное количество сухой биомассы в среде (г/л), S – начальная концентрация субстрата (сахарозы) в среде (г/л среды) [26].

Обработку данных проводили при помощи программы Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, США). На графиках представлены средние арифметические значения и стандартные отклонения из трех повторностей субкультивирования.

Результаты и обсуждение

Для определения прироста сухой и сырой биомассы клеток, исследуемых 12-ти линий в цикле выращивания культуры клеток были исследованы ростовые характеристики наиболее выделившихся 3-х линий *Ajuga turkestanica*: 14а ДНК, 55-1 ДБН, 55-1 ДНК. Полученные результаты, а именно в цикле субкультивирования суспензионной культуры *Ajuga turkestanica* штамма при стандартном выращивании в колбах, представлены на рисунках. (14а ДНК - рисунки 2-15; 55-1 ДБН – рисунки 6-19; 55-1 ДНК – рисунки 2-13).

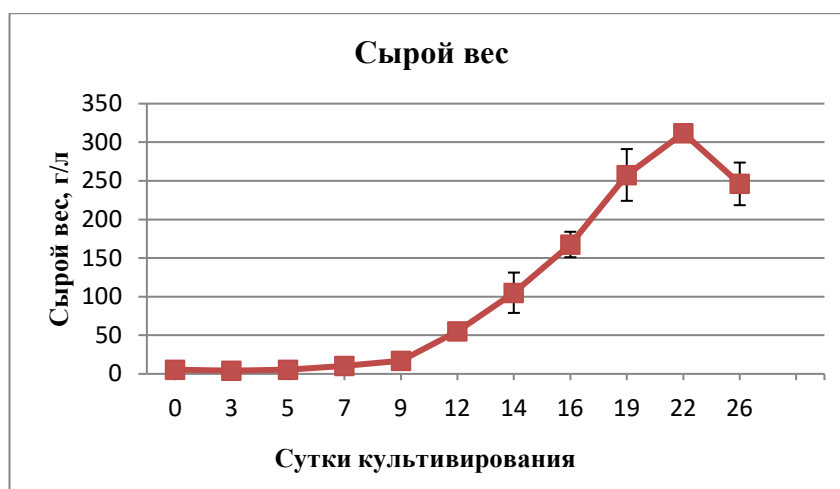


Рисунок 2 – Кривая роста сырой массы клеток линии 14а ДНК

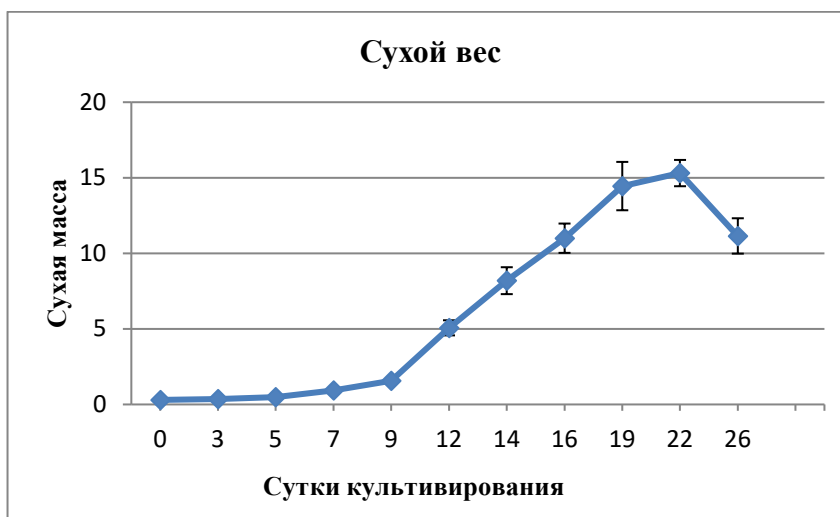


Рисунок 3 – Кривая роста сухой массы клеток линии 14а ДНК

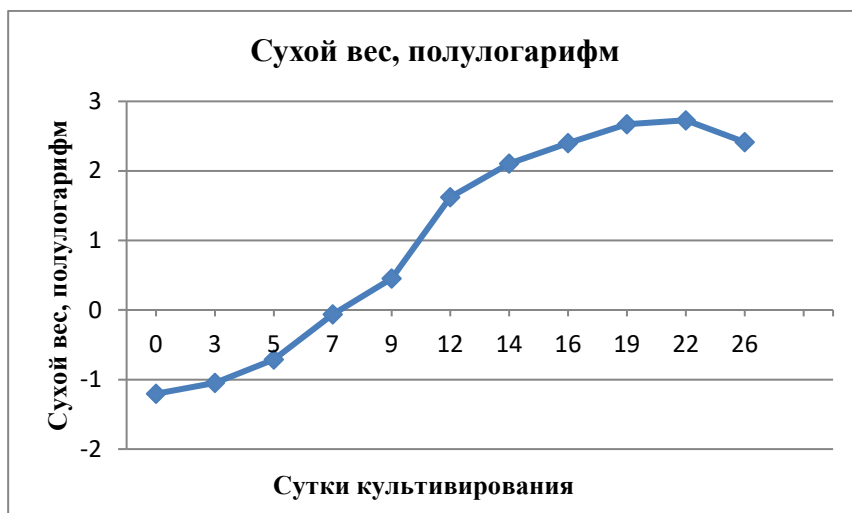


Рисунок 4 – Полулогарифмический график роста клеток линии 14а ДНК



Рисунок 5 – Жизнеспособность клеток линии 14а ДНК

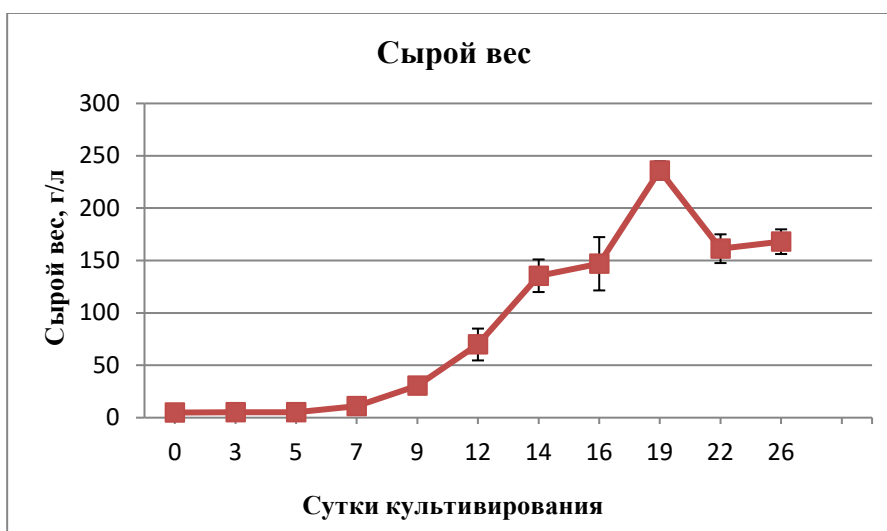


Рисунок 6 – Кривая роста сырой массы клеток линии 55-1 ДБН



Рисунок 7 – Кривая роста сухой массы клеток линии 55-1 ДБН

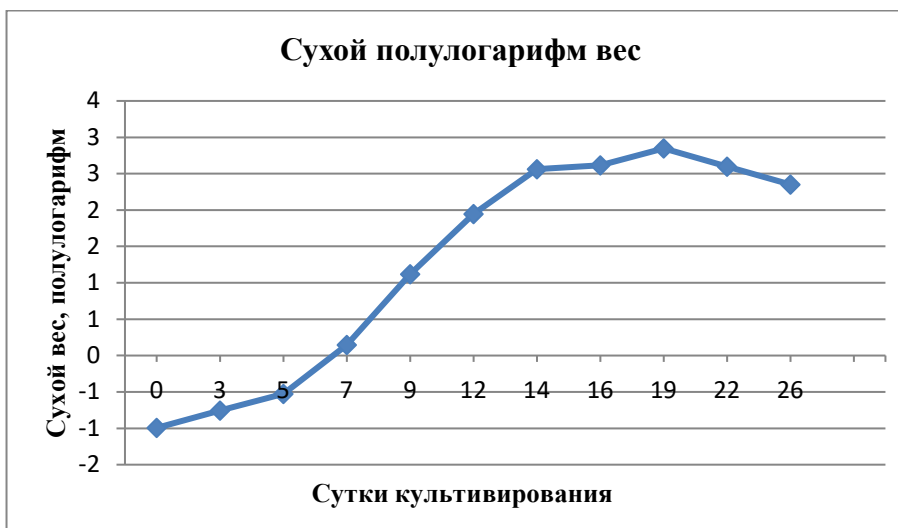


Рисунок 8 – Полулогарифмический график роста сухой массы клеток линии 55-1 ДБН



Рисунок 9 – Жизнеспособность клеток линии 55-1 ДБН

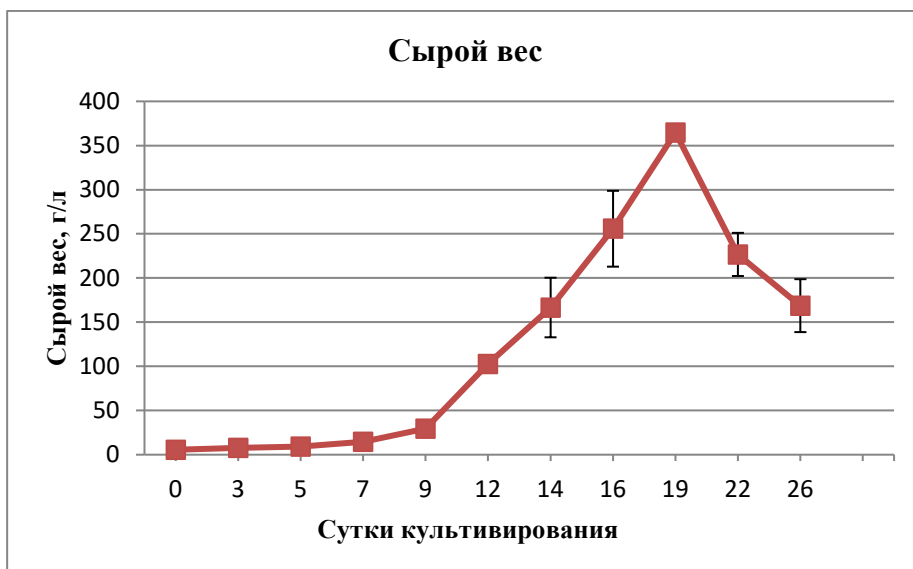


Рисунок 10 – Кривая роста сырой массы клеток линии 55-1 ДНК

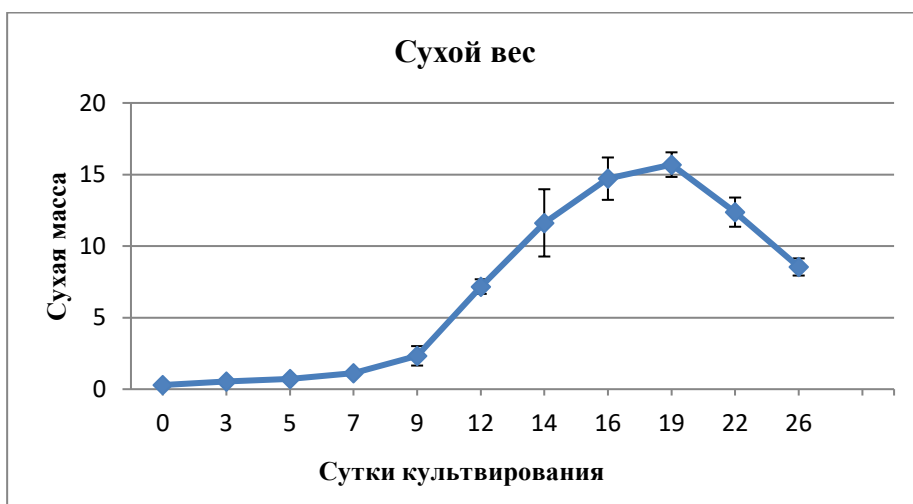


Рисунок 11 – Кривая роста сухой массы клеток линии 55-1 ДНК

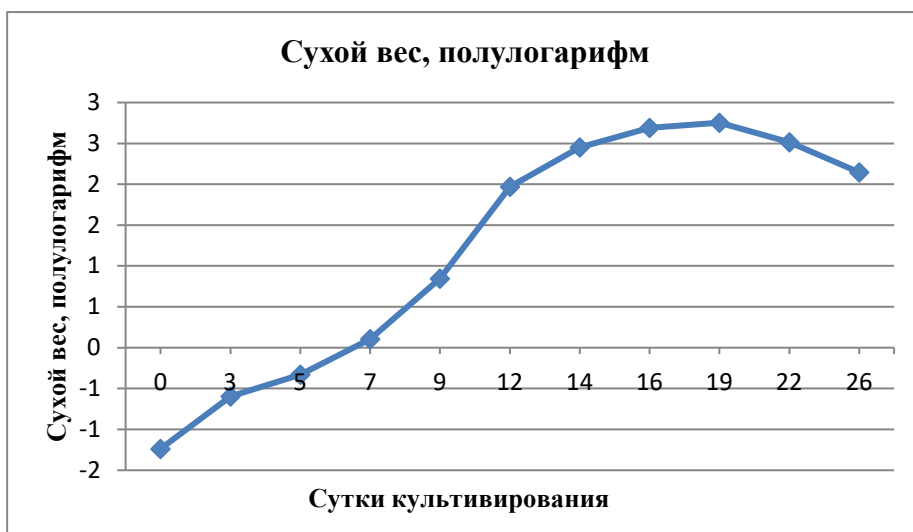


Рисунок 12 – Полулогарифмический график роста сухой массы клеток линии 55-1 ДНК



Рисунок 13 – Жизнеспособность клеток линии 55-1 ДНК

По представленным результатам анализа ростовых характеристик можно заключить, что все исследуемые линии культуры клеток *Ajuga turkestanica* имеют высокие показатели роста. Для культур 14а ДНК и 55-1 ДНК характерна типичная S-образная кривая роста, в отличие от линии 55-1 ДБН, жизнеспособность клеток в течение цикла изменяется от 100 до 10% по культурам. Клетки культуры 14а ДНК уменьшают по достижению конечной фазы до 80%, 55-1 ДНК – до 50%, 55-1 ДБН – до 10%.

В кривой роста с S-образной формой линии 14а ДНК культуры клеток *Ajuga turkestanica* лаг-фаза имеет - 5 суток, что обусловлено достаточно высокой начальной плотностью культуры (2 г/л среды). Экспоненциальная фаза по сухому весу длится 10 дней, фаза замедления роста – 2 сутки, стационарная фаза почти отсутствует, затем с 22-х суток популяция клеток *in vitro* резко переходит в стадию деградации – повышается оводнённость клеток, снижается их жизнеспособность.

Длительность фаз роста линии 55-1 ДБН оказалась следующей: лаг-фаза – 7 суток, экспоненциальная фаза – 7 суток. Причиной продолжительности экспоненты является «ступенька» в экспоненциальной фазе роста (14-16-е сутки). Появление «ступеньки» чаще всего обусловлено наличием в культуре двух субпопуляций клеток с разной пролиферативной активностью. Стационарная фаза роста также практически отсутствует – фаза деградации начиналась непосредственно за фазой замедления роста. Эта особенность ростовой кривой культуры клеток *Ajuga turkestanica*.

У линии 55-1 ДНК длительность фаз и отсутствие фазы стационара довольно схожа с линией 14а ДНК. фазе роста (12-14-е сутки), что повлияло и на длительность фазы экспонентного роста – 11 суток. Более редкая причина подобной формы кривой роста – внеклеточный гидролиз субстрата (сахароза) и различная интенсивность использования клетками полученных моносахаров (глюкозы и фруктозы).

Исходя из кривых роста изучаемых линий были рассчитаны основные ростовые характеристики (таблица 1).

Таблица 1 – Ростовые показатели исследуемых культур клеток по фазам

Культура	Фаза роста			
	Лагфаза	Экспоненциальная	Стационарная	Деградации
14а ДНК	5	5-12	19-22	22 и дальше
55-1 ДБН	7	7-12	19-22	22 и дальше
55-1 ДНК	5	5-12	19-22	22 и дальше

Сравнение ростовых параметров исследуемых культур клеток, рассчитанных по сухой биомассе, представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Параметры роста исследуемых культур клеток

Культура	М в точке 0	М _{max} сухой массы	Суточные достижения М _{max} сухой массы	Индекс роста (I)	Удельная скорость (μ)	Экономический коэффициент (Y)	Продуктивность
55-1 ДБН	0,21	10,97	22,00	51,24	0,50	0,36	0,49
14а ДНК	0,12	17,26	16,00	142,83	0,82	0,57	1,07
55-1 ДНК	0,10	14,13	14,00	140,30	1,04	0,47	1,00

Примечание: X_{max} – максимальное накопление биомассы (г/л), I – индекс роста, μ – удельная скорость роста в экспоненциальной фазе (сут.⁻¹), τ – время удвоения (сут.), Y – экономический коэффициент

Сравнение полученных результатов с данными других авторов по культуре клеток *Ajuga turkestanica* позволяет оценить сходство и различия в ростовых характеристиках исследуемых линий. Индекс роста (I) по сухой биомассе у всех линий превышает 50, что указывает на хорошую продуктивность культур клеток. Удельная скорость роста (μ) также в пределах 0,50-1,04 сут.⁻¹, а время удвоения культуры клеток (τ) составляет 5-7 дней, что свидетельствует о быстром размножении клеток и здоровом росте культур. Максимальное накопление биомассы (M_{max}) выше 10 г/л, что говорит о высокой продуктивности культур клеток *Ajuga turkestanica*. Экономический коэффициент (Y) для всех исследуемых культур клеток также находится в удовлетворительных пределах, что подтверждает эффективное использование субстрата (сахарозы) и потенциально высокую экономическую выгоду от производства биологически активных веществ из *Ajuga turkestanica*. Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что всеизученные культуры клеток можно считать хорошо растущими, однако каждая из линий имеет специфические особенности ростовой кривой (длительность фаз роста, наличие «ступеньки» в экспоненциальной фазе роста).

Заключение

Все линии *A. turkestanica*, за исключением ДНК 55-1, имеют сходную s-образную кривую роста. Это говорит о том, что у них схожий паттерн развития. Жизнеспособность клеток в течение цикла варьируется от 10% до 80%. Это означает, что некоторые клетки могут перестать расти или погибнуть во время развития. Лаг-фаза, представляющая собой период подготовки клеток к активному росту, длится 5-7 дней. Экспоненциальная фаза, при которой происходит активное увеличение количества клеток, длится 9-10 дней. Фаза замедления, когда рост клеток замедляется, длится 2-3 дня. Стационарная фаза, когда количество живых и мертвых клеток выравнивается, практически отсутствует. Деградация клеток начинается примерно через 22 дня. Ростовые характеристики клеток имеют следующие показатели: индекс роста (i) превышает 50, удельная скорость роста (μ) составляет от 0,50 до 1,04 дней⁻¹, время удвоения (τ) составляет 5-7 дней, максимальное накопление биомассы (m_{max}) превышает 10 г/л, экономический коэффициент (y) находится в диапазоне от 0,36 до 0,57. Исследования показывают, что все изученные клеточные культуры *A. turkestanica* проявляют высокие качества способности и оптимизации к росту. Результаты исследования указывают на то, что каждая из клеточных линий *A. turkestanica* имеет свои специфические особенности кривой роста.

Благодарность

Сотрудникам лаборатории культуры клеток ФГБОУ «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева» РАН РФ (г. Москва) за сотрудничество и содействие в проведении исследований.

Литература:

- 1 Атабекова А.И., Устинова Е.И. Цитология растений. - 4-е изд., перераб. и доп. - М.: Агропромиздат, 1987. - 246 с.
- 2 Гладкова В.Н. Род Живучка Аюга. Флора Европейской части СССР. - Л., 1978. Т.2. - 259 с.
- 3 Анненков Н. Ботанический словарь. - М.: СПб., 1978. - 646 с.
- 4 Abubakirov N. K. Ecdysteroids of flowering (Angiospermae). *Chem. Nat. Comp.* – 1981. – Vol. 17. – P. 489-503. (<https://doi.org/10.1007/BF00574363>)
- 5 Ахрем А.А., Ковченко В. Экдистероиды: биохимия, физиология, фармакология. - Киев: Наукова думка, 1989.
- 6 Endress R. Culturing of Plant Cells. *Plant Cell Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg. – 1994. P. 46-62. (https://doi.org/10.1007/978-3-662-02996-1_3)
- 7 Jaime Tomás, Francisco Camps, Josep Coll, Enric Melé, Joaquima Messeguer. Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue cultures. *Phytochemistry*, Volume 32, Issue 2, 1993, P. 317-324. ([https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94988-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94988-4))
- 8 Лев С.В., Закирова Р.П., Саатов З', Горовиц М.Б., Абубакиров Н.К. Экдистероиды культуры тканей и клеток кивучки туркестанской. *Рефераты докл. и сообщ. XIV Менделеевского съезда по общей и прикладной химии*. М.: Наука, 1989. - Т.2. - С.278
- 9 Травянистые декоративные многолетники Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН. М.: Наука, 2009. - 396с.
- 10 Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. - 160 с.
- 11 Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М., 2008 –С. 735–743.
- 12 Тепляков А.Т., Болотская Л.А., Вдовина Т.В. и др. Клинические и иммуномодулирующие влияния полиоксидония для коррекции вторичного иммунодефицита у больных ишемической болезнью сердца, ассоциированной с сахарным диабетом типа 2. *Иммунология*. – 2008. – Т. 29, № 1. – С. 44–50.
- 13 Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. - 160 с.
- 14 Растительные ресурсы СССР. Т. 6: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства.
- 15 Носов А.М. Функции вторичных метаболитов *in vivo* и *in vitro*. – М.: *Физиология растений*, 41, 1994. С. 873–878.
- 16 Носов А.М. Культура клеток высших растений: от фундаментальных исследований к практическому применению. *Методы культивирования клеток*; Под ред. Пинаева Г.П., Богдановой В.П. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. – С. 95-118.
- 17 Маматханов А.У., Хажобаев Т.А., Халилов Р.М. *Ajuga turkestanica* альтернативный источник для производства экдистена. *Химия растительного сырья*. 2022. №1. С. 309–318. DOI: 10.14258/jcprm.2022019271.
- 18 Usmanov V.Z., Gorovits M.B., Abubakirov N.K. Phytoecdysones of *Ajuga turkestanica*. *Chem. Nat. Compd.* 1971. Vol. 7. p. 520. (<http://dx.doi.org/10.14258/jcprm.2022019271>)
- 19 Guibout L., Mamadalieva N., Balducci C., Girault J-P., Lafont R. The minor ecdysteroids from *Ajuga turkestanica*. *Phytochemical Analysis*. 2015. Vol. 26. № 5. p. 293–300. (<https://doi.org/10.1002/pca.2563>)
- 20 Ramazanov N.S. Phytoecdysteroids and Other Biologically Active Compounds from Plants of the Genus *Ajuga*. *Chem. Nat. Compd.* 2005. Vol. 41. p. 361–369. (<http://dx.doi.org/10.1007/s10600-005-0153-4>)
- 21 Kotenko L.D., Yakubova M.R., Mamatkhanov A.U., Saatov Z., Turakhozhaev M.T. Iridoids of *Ajuga turkestanica* and their quantitative determination. *Chem. Nat. Compd.* 1993. Vol. 29. p. 606–607. (<http://dx.doi.org/10.14258/jcprm.2022019271>)
- 22 Murashige T. A. Revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog. *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – p. 473-495.

23 Eshbakova K.A., Zakirova R.P., Khasanova K.I., Bobakulov Kh.M., Aisa H.A., Sagdullaev Sh.Sh., Nosov A.M. Phenylpropanoids from Callus Tissue of *Ajuga turkestanica*. *Chem. Nat. Compd.* 2019. Vol. 55. p. 28–31. (<http://dx.doi.org/10.1007/s10600-019-02608-8>)

24 Mamadalieva N.Z., El-Readi M.Z., Ovidi E., Ashour M.L., Hamoud R., Sagdullaev S.S., Azimova S.S., Tiezzi A., Wink M. Antiproliferative, antimicrobial and antioxidant activities of the chemical constituents of *Ajuga turkestanica*. *Phytopharmacology*. 2013. Vol. 4. n1. p. 1–18. (<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2018.1443088>)

25 Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений. Сб: *Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений*, под ред. Кузнецова Вл.В., Кузнецова В.В., Романова Г.А. - М.: БИНОМ, 2012. С. 386–403.

26 Khidoyatova S.K., Ul'chenko N.T., Gusakova S.D. Chernenko T.V., Sagdullaev Sh.Sh., Nigmatullaev A.M. Com-parative study of lipids and lipophilic constituents from separate organs of *Ajuga turkestanica*. *Chem. Nat. Compd.* 2012. Vol. 48. p. 732–736. (<http://dx.doi.org/10.1007/s10600-012-0370-6>)