УДК 577.15.086.83

СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

В.М. Юрин, Т.И. Дитченко, О.В. Молчан, С.Н. Ромашко
Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь
e-mail: yurin@bsu.by

Введение

Лекарственные растения являются ценными источниками сырья для фармакологической промышленности, однако содержание вторичных метаболитов в клетках культур, чаще всего, находится на более низком уровне, по сравнению с дикорастущими растительными организмами. Поэтому, особый интерес представляет разработка современных биотехнологических подходов к культивированию растений, их тканей и клеток, позволяющих стимулировать процессы биосинтеза вторичных метаболитов. Одним из таких подходов является использование иммобилизованных растительных клеток, часто способных к увеличению синтеза и экскреции биологически активных соединений. Подбор оптимальных режимов иммобилизации и инкубации, изучение влияния на физиологические и биосинтетические процессы в клетках инкапсулирующих агентов, пермеабилизации, способствующей экскреции конечного продукта, являются сегодня актуальными задачами в области культивирования клеток и тканей [1, 2]. Решение этих проблем позволит существенно повлиять на усовершенствование разработок технологий создания современных экологически безопасных фармакологически активных препаратов.

Нами использовались два лекарственных растения: эхинацея пурпурная *(Echinacea purpurea* L.) и катарантус розовый (*Catharanthus roseus* G. Don).

Растения семейства *Asteraceae,* представителем которого является *Echinacea purpurea* L.*,* содержат комплекс фармакологически активных соединений, среди которых доминирующим классом являются фенилпропаноиды, в частности, свободные гидроксикоричные кислоты и их производные (цикориевая, хлорогеновая кислоты, эхинакозид, цинарин и др.). Данные соединения в сочетании с полисахаридами эхинацеи характеризуются иммуностимулирующим, противовоспалительным, противовирусным действием, а также проявляют выраженные антиоксидантные свойства. Они способны к восстановлению высоко окисленных свободных радикалов и подавлению образования активных форм кислорода, связывая в стабильные комплексы ионы металлов с переменной валентностью, которые играют важную роль в инициировании свободно радикальных реакций. Установлено, что цикориевая и хлорогеновая кислоты ингибируют интегразу, а также экспрессию обратной транскриптазы вируса ВИЧ.

Растения семейства *Apocynaceae* являются незаменимым источником получения терпеновых индольных алкалоидов (ТИА), характеризующихся широким спектром биологической активности и представляют большой интерес для фармацевтической промышленности. Давно изучаемым представителем этого семейства является *Catharanthus roseus*. В основном, такое внимание обусловлено наличием в катарантусе алкалоидов бис-индольной природы, обладающих противоопухолевой активностью, к которым относятся винбластин, используемый, например, для лечения болезни Ходжкина (лимфогранулематоза), и винкристин, применяемый при терапии различных видов лейкемии [3, 4]. Среди алкалоидов мономерной природы особую фармакологическую значимость имеют аймалицин (антиаритмический препарат, функция которого заключается в ингибировании поглощения глюкозы митохондриями в клетках сердца) [5], а также серпентин и резерпин, обладающие гипотензивным, седативным и транквилизирующим эффектами. Кроме того, исследования последних лет показали возможность применения серпентина при лечении болезни Альцгеймера и (или) миостении [6].

Однако, несмотря на широкий спектр фармакологических активностей фенилпропаноидов и алкалоидов, на данный момент культуры клеток и тканей *Echinacea purpurea* и *Catharanthus roseus* не применяются в промышленном производстве указанных соединений благодаря низкому биосинтетическому потенциалу клеток *in vitro*. Целью настоящей работы являлось исследование влияния иммобилизации на некоторые процессы биосинтеза фенилпропаноидов и алкалоидов индольного ряда в суспендированных и иммобилизованных клетках.

Методы исследования

В качестве объектов исследования использовались суспендированные и иммобилизованные клетки *Echinaceae purpurea* L. и *Catharanthus roseus* G. Don.

Получение суспензионной культуры. Суспензионную культуру получали из каллуса рыхло типа, инициированную из листовых эксплантов растений. Исследовались гетеротрофная и фотомиксотрофная культуры. В качестве носителя для иммобилизации использовался кальций-альгинатный гель. Подробно методические приемы получения, культивирования и иммобилизации суспензионных культур указанных растений описаны ранее в наших работах [7, 8].

Количественное определение содержания фенольных соединений. В экстрактах эхинацеи пурпурной содержатся разнообразные фенилпропаноиды, среди которых доминируют гидроксикоричные кислоты и их производные. Для анализа содержания фенольных соединений (ФС) в свободных и иммобилизованных клетках эхинацеи пурпурной в пересчете на феруловую кислоту в работе получали водно-спиртовые экстракты. Для этого точную навеску высушенного сырья (0,2 г) тщательно растирали в ступке с добавлением небольшого количества 70%-ного этанола, затем доводили объем до 20 мл. Полученную массу переносили в коническую колбу объемом 100 мл. Экстрагирование проводилось в течение 1 часа при нагревании на водяной бане с обратным холодильником. Затем полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр, с помощью этанола доводили объем до 20 мл (раствор А). На следующем этапе в пробирку или мерный цилиндр объемом 10 мл вносили 1 мл полученного экстракта, 7 мл дистиллированной воды, 1 мл реактива Фолина-Дениса, через 2 минуты добавляли 1 мл насыщенного раствора углекислого натрия. Полученную смесь (раствор В) оставляли на 1 час до проявления окраски. Контролем служил вариант, в котором в пробирку вносили 1 мл 70%-ого этанола, 7 мл дистиллированной воды, 1 мл реактива Фолина-Дениса, 1 мл насыщенного раствора углекислого натрия. Измерение оптической плотности проводили с помощью спектрофотометра при длине волны 720 нм.

Расчет содержания ФС в пересчете на феруловую кислоту (мг/г сух.в.) производили по формуле:

$$C = (E \cdot V) / (a \cdot m) \qquad (1),$$

где E – оптическая плотность раствора В; a – калибровочный коэффициент, полученный из графика концентрационной зависимости оптической плотности комплекса феруловой кислоты с реактивом Фолина-Дениса при 720 нм (рисунок 1); V – общий объем экстракта (мл); m – навеска биологического материала для анализа (г).

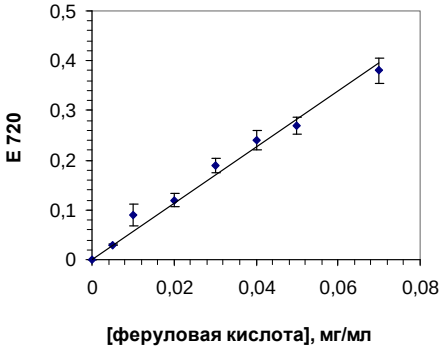


Рисунок 1 – Калибровочная кривая: зависимость оптической плотности раствора (E 720) от концентрации феруловой кислоты

Экстракция и очистка алкалоидов индольного ряда. Выделение алкалоидов индольного ряда из корней, листьев, каллусной и суспензионной культур *Vinca minor* проводили согласно методике, описанной ранее [3]. Для выделения алкалоидов из среды культивирования суспензионных и иммобилизованных клеток 40 мл среды инкубации упаривали на водяной бане при температуре 100°С. Остаток растворяли в 20 мл 50% этилового спирта и использовали для дальнейшей очистки, используя ранее указанную методику [3].

Получение стандарта серпентина. Разделение суммы алкалоидов для получения стандарта серпентина из корней катарантуса розового осуществляли методом ТСХ на пластинках Silica gel 60 F_{254} (Merck, Германия). Серпентин идентифицировали по величине Rf, интенсивной флуоресценции при облучении УФ-светом, реакции с реактивом Драгендорфа и характерным отсутствием окрашивания при обработке ЦАС [9]. Элюцию серпентина с ТСХ пластинки проводили с использованием метанола, который затем отделяли от силикагеля центрифугированием и упаривали при температуре 60°С. Полученный сухой остаток индивидуального соединения взвешивали и растворяли в метаноле до концентрации 2 мМ.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. ВЭЖХ-МС анализ проводили с использованием хроматографа Accela (США) оснащенного диодноматричным и масс-спектрометрическим (LCQ-Fleet) детекторами (Thermo Scientific LCQ-Fleet, США). Анализ проводили на колонке с обращенной фазой Nucleodur C18 Isis (4,6x50 мм; 1,8 мкм). В качестве мобильной фазы использовали смесь – 25 мМ ацетат аммония (pH 6,8) и ацетонитрил. Для количественного определения алкалоидов использовали 2 мМ растворы винкамина, аймалицина, серпентина, винбластина и винкристина в качестве стандартных образцов. Режим ионизации – химическая ионизация при атмосферном давлении.

Определение содержания триптамина. Определение содержания триптамина проводили по методу Сангван с соавт. [10]. Каллусную ткань гомогенизировали в среде, содержащей 100 мМ натрий фосфатный буфер (pH 7,5), 2 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА), 4 мМ β-меркаптоэтанол и 5% (масса/объем) поливинилпирролидон. 100 мкл грубого экстракта добавляли в среду, содержащую 100 мМ натрий фосфатный буфер (pH 8,5) и 2 мМ ЭДТА объемом 1 мл, затем добавляли 2 мл 4 М NaOH и экстрагировали этилацетатом. Все манипуляции проводили при 4 °С. Триптамин детектировали с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse при длине волны возбуждения λ = 280 нм и эмиссии 340 нм. Содержание триптамина определяли по соответствующей калибровочной кривой (рисунок 2).

Определение активности триптофан-декарбоксилазы. Активность триптофан-декарбоксилазы определяли методом, описанным Сангван с соавт. [10]. Каллус гомогенизировали в среде, содержащей 100 мМ натрий фосфатный буфер (pH 7,5), 5 мМ β-меркаптоэтанол, 5 мМ тиомочевину, 100 мг/г поливинилпирролидон. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин, супернатант использовали для определения активности фермента. Все процедуры проводили при 4°С. Концентрацию белка определяли методом Бредфорд [11]. Среда для определения активности фермента содержала 100 мМ натрий фосфатный буфер (pH 8,5), 3,5 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ L-триптофан, и 1 мМ пиридоксаль-5'-фосфат. Реакцию запускали внесением супернатанта. Реакцию останавливали добавлением 4 М NaOH. Триптамин экстрагировали этилацетатом. Содержание триптамина в экстракте измеряли с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse при длине волны испускания λ=280 нм и эмиссии – 350 нм. Содержание триптамина определяли по соответствующей калибровочной кривой (рисунок 2).

Статистическая обработка данных. Обработку данных производили с помощью пакета статистического анализа программы *Microsoft Excel*. Основными статистическими характеристиками служили: сред средняя арифметическая величина (x), среднее квадратическое отклонение (σ), ошибка средней величины (S_x) Для оценки достоверности

различий между вариантами пользовались критерием Стьюдента [12]. Эксперименты выполнены в 3-7 кратной повторности. На диаграммах, графиках и в таблицах представлены средние значения ± ошибка средней величины.

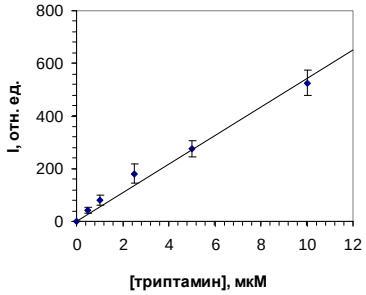
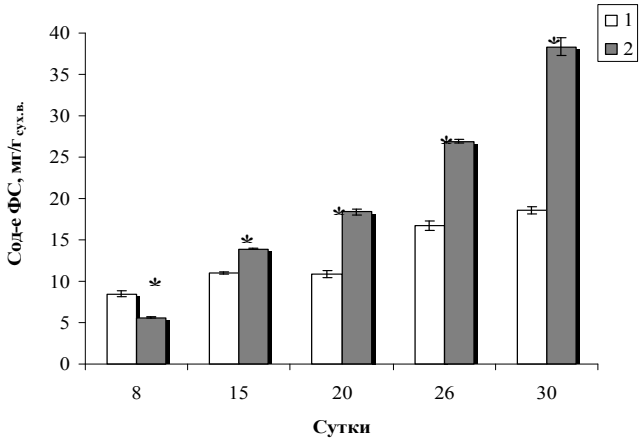


Рисунок 2 – Калибровочная кривая: зависимость интенсивности флуоресценции (I) от концентрации триптамина

Результаты и обсуждение

Подбор оптимальных режимов иммобилизации и инкубации, изучение влияния на физиологические и биосинтетические процессы в клетках инкапсулирующих агентов, пермеабилизации, способствующей экскреции конечного продукта, являются сегодня актуальными задачами в области культивирования клеток и тканей [13]. Решение этих проблем позволит существенно повлиять на усовершенствование технологий по созданию современных экологически безопасных фармакологически активных препаратов.

Влияние света. Одним из физических факторов, эффективно регулирующих процессы синтеза вторичных метаболитов в культурах растительных клеток и тканей, является свет. В связи с этим были изучены особенности продукции ФС свободными и иммобилизованными клетками гетеротрофной и фотомиксотрофной суспензионных культур *Echinacea purpurea.* Повышение накопления ФС в иммобилизованных клетках гетеротрофной культуры по сравнению со свободными происходило, начиная с 15 суток цикла выращивания. При этом увеличение продолжительности культивирования приводило к проявлению более выраженных различий: на 20-е сут содержание анализируемых БАВ в иммобилизованных клетках было выше в 1,7 раза, а на 30-е сут – в 2,1 раза по сравнению со свободными (рисунок 3).



1 –свободные клетки, 2 – иммобилизованные клетки

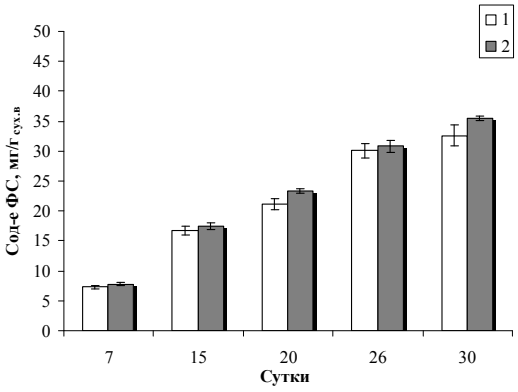
Рисунок 3 – Содержание фенольных соединений в свободных и иммобилизованных клетках гетеротрофной культуры *Echinacea purpurea*

Примечание: * – различия достоверны при $p \leq 0,05$.

Согласно литературным данным иммобилизация может приводить к увеличению продолжительности стационарной фазы, в ходе которой для большинства культивируемых *in vitro* растительных клеток и тканей отмечается максимальный синтез целевого продукта [2]. В наших экспериментах для суспензионной культуры *Echinacea purpurea* содержание ФС в свободных клетках практически не изменялось с 26 по 30-е культивирования, тогда как для иммобилизованных клеток за аналогичный промежуток времени продолжался существенный его рост (в 1,4 раза) (рисунок 3). Это свидетельствует о возможности более длительного и эффективного культивирования иммобилизованных клеток *Echinacea purpurea* в качестве источника БАВ фенольной природы по сравнению со свободными клетками.

Далее было произведено сравнительное изучение содержания ФС в свободных и иммобилизованных клетках культуры *Echinacea purpurea,* культивируемой на свету. Как видно из рисунка 4, свободные и иммобилизованные клетки фотомиксотрофной клеточной культуры достоверно не различались по содержанию ФС ни на одной из стадий ростового цикла. Следовательно, иммобилизация в кальций-альгинатный гель клеток *Echinacea purpurea,* культивируемых на свету, не приводила к повышению их биосинтетического потенциала в отличие от гетеротрофной суспензионной культуры. Возможно, это связано, с тем, что свободные клетки фотомиксотрофной суспензионной культуры изначально характеризовались более высоким уровнем содержания растворимых ФС в стационарную фазу ростового цикла (32,6±1,7 мг/г сух. в.) по сравнению с клетками гетеротрофной культуры (16,7±0,6 мг/г сух. в.). Полученные для неиммобилизованных клеток результаты достаточно хорошо согласуются с литературными данными о стимулирующем действии света на биосинтез ВМ в культурах растительных клеток и тканей.

Иммобилизация в кальций-альгинатный гель клеток гетеротрофной суспензионной культуры *Echinacea purpurea* вызывала существенное повышение количества экскретируемых ФС. Наиболее значительные различия между свободными и иммобилизованными клетками отмечались в стационарную фазу и составляли в среднем 3,5 раза. Следовательно, иммобилизация клеток гетеротрофной культуры *Echinacea purpurea* приводит не только к повышению внутриклеточного содержания ФС, но и их выделения в среду инкубации, что является обязательным условием для практического использования иммобилизованных растительных клеток. В случае фотомиксотрофной культуры стимулирующий эффект был менее выраженным по сравнению с иммобилизованными клетками гетеротрофной культуры и составлял в среднем 1,7 раза.



1 –свободные клетки, 2 – иммобилизованные клетки

Рисунок 4 – Содержание фенольных соединений в свободных и иммобилизованных клетках фотомиксотрофной культуры *Echinacea purpurea*

Определение суммарного содержания ФС в клетках и инкубационной среде для суспензионной и иммобилизованных культур эхинацеи позволило выявить существенное возрастание их продукции при переходе в стационарную фазу цикла выращивания, т.е. при замедлении ростовых процессов. В этих условиях биосинтетический потенциал иммобилизованных клеток гетеротрофной культуры был более чем в 2 раза выше по сравнению клетками суспензионной культуры, а примерно 35% синтезируемых ФС экскретировалось в среду их инкубации (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние иммобилизации на содержание фенольных соединений в свободных и иммобилизованных клетках *Echinacea purpurea* на стационарной фазе ростового цикла (30-е сутки культивирования)

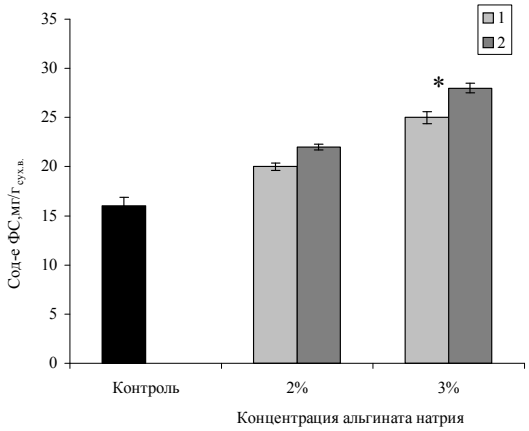
Показатель	Гетеротрофная культура		Фотомиксотрофная культура	
	Свободные клетки	Иммобилизованные клетки	Свободные клетки	Иммобилизованные клетки
Суммарное содержание ФС, мг/г $_{сух.в.}$	26,4±1,9	66,8±2,4	40,9±3,2	49,2±3,9
Количество экскретируемых ФС, мг/г $_{сух.в.}$	7,9±0,4	24,5±1,0	7,4±0,3	13,5±0,4

В случае фотомиксотрофной культуры различия между свободными и иммобилизованными клетками по суммарному образованию ФС не превышали 20–25%.

Таким образом, характер влияния иммобилизации на продукцию ФС клеточными культурами эхинацеи пурпурной в значительной степени зависел от величины их исходного биосинтетического потенциала, который различался для клеточных культур, выращиваемых в темноте и на свету. Проведение данной процедуры целесообразно в случае клеток гетеротрофной культуры, в которой при стандартном варианте культивирования накопление вторичных метаболитов фенольной природы находится на невысоком уровне.

Влияние компонент носителя. Практика применения иммобилизованных клеток основана, главным образом, на эмпирическом подходе. Условия иммобилизации и инкубации, материал носителя, пермеабилизация, способствующая экскреции конечного продукта, а также другие процедуры, как правило, подбираются опытным путем, поскольку клеточные культуры разных видов растений по-разному реагируют на действие определенного вида носителя и его концентрации. В связи с этим оптимизация компонент носителя было проведена на гетеротрофной культуре, характеризующейся более значимыми величинами накопления фенольных соединений иммобилизованными клетками по сравнению с фотомиксотрофной.

Сравнительное изучение величины сухого веса свободных и иммобилизованных клеток *Echinacea purpurea* в стационарную фазу ростового цикла позволило выявить, что испытанные концентрации альгината натрия (2 и 3%) и хлорида кальция (0,25 и 0,5 М) не оказывают заметного влияния на величину ингибирования ростовых процессов исследуемой культуры. На рисунке 5 представлены результаты экспериментов по влиянию иммобилизации на содержания ФС в клетках гетеротрофной культуры *Echinacea purpurea* в стационарную фазу ростового цикла. Из рисунка видно, что иммобилизация в зависимости от ее параметров в разной степени вызывала увеличение содержания ФС в клетках эхинацеи пурпурной.



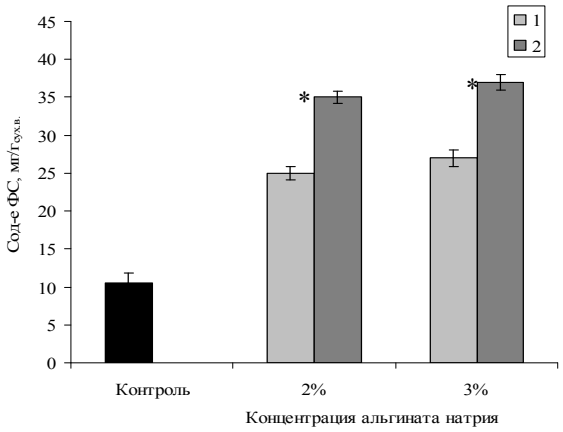
1 – 0,25 М $CaCl_2$; 2 – 0,5 М $CaCl_2$
Рисунок 5 – Влияние параметров иммобилизации на содержание фенольных соединений в клетках гетеротрофной культуры *Echinacea purpurea* в стационарную фазу ростового цикла (26-е сут культивирования)

Примечание: * – различия между вариантами достоверны при $p<0,05$.

Наиболее заметное увеличение содержания анализируемых вторичных метаболитов происходило при иммобилизации клеток в 3%-ом альгинате с использованием 0,5 М $CaCl_2$. При этом содержание ФС было в 1,75 раза выше по сравнению со свободной культурой. В варианте с 0,25 М $CaCl_2$. при такой же концентрации альгината стимулирующий эффект составил 1,5 раза. При использовании 2%-го альгината также наблюдалось увеличение содержания ФС, однако, в меньшей степени, чем при использовании 3%-ой его концентрации.

Далее проводилось исследование влияния иммобилизации на содержание ФС в среде инкубации клеток *Echinacea purpurea.* Из рисунка 6 видно, что значительное увеличение экскреции ФС иммобилизованными в Са-альгинатные гранулы клеток по сравнению со свободными клетками. При этом отмечалось хорошо заметное влияние концентрации хлорида кальция. При использовании как 2%, так и 3% концентраций альгината наибольшего выхода ФС в среду инкубации иммобилизованных клеток удалось добиться при использовании
0,5 М $CaCl_2$. Содержание ФС в обоих случаях было в среднем в 3,5 раза выше по сравнению

с контролем. При использовании 0,25 М $CaCl_2$ для проведения процедуры иммобилизации клеток суспензионной культуры эхинацеи пурпурной количество экскретируемых ФС было заметно ниже – в среднем в 2,4 раза. Таким образом, характер модификации ростовых процессов и биосинтетического потенциала иммобилизованных в Са-альгинатные гранулы клеток эхинацеи пурпурной был различным при варьировании концентрации альгината натрия и хлорида кальция как основных агентов, обеспечивающих формирование полимерной защитной матрицы.



1 – 0,25 М $CaCl_2$; 2 – 0,5 М $CaCl_2$

Рисунок 6 – Влияние иммобилизации на экскрецию фенольных соединений в среду инкубации клеток гетеротрофной культуры *Echinacea purpurea* в стационарную фазу ростового цикла (26-е сут культивирования)

Примечание: * – различия между вариантами достоверны при $p<0,05$

Из анализа литературных данных следует, что при изучении влияния иммобилизации на биосинтез индольных алкалоидов в клетках *Catharanthus roseus* пристальное внимание уделяется только накоплению продуктов биосинтеза ТИА [14, 15, 16, 17]. Однако ферментативную активность компонентов, задействованных в биосинтетической цепочке превращений алкалоидов, авторы этих работ не рассматривали.

Влияние иммобилизации на активность ТДК. В наших предыдущих работах [2, 18] были представлены результаты по влиянию иммобилизации в кальций-альгинатном геле на активность ТДК в клетках культур *Catharanthus roseus*. Было выявлено, что максимальная активность ТДК в свободных суспензионных клетках катарантуса розового наблюдалась в течение лог-фазы ростового цикла и составляла 4,4 пмоль триптамина·мкг белка$^{-1}$·мин$^{-1}$. В иммобилизованных клетках *Catharanthus roseus* максимальная активность фермента наблюдалась также в период наибольшей метаболической активности культур (лог-фаза) и составляла 6,7 пмоль триптамина·мкг белка$^{-1}$·мин$^{-1}$, что на 35% больше, чем в свободных клетках на аналогичном этапе ростового цикла (лог-фазе) [19, 20].

Таким образом, установлено, что иммобилизация в кальций–альгинатном геле стимулирует активность ТДК в культурах *Catharanthus roseus* только в течение лог-фазы ростового цикла, т.е. когда клетки находятся в состоянии максимальной метаболической активности [2, 19, 20]. Можно предположить наличие специфического компетентного состояния клеток к воздействию данного экзогенного фактора, которое индуцируется в период наибольшей метаболической активности.

Накопление и экскреция триптамина. Максимальное накопление триптамина обнаружено в свободных и инкапсулированных клетках катарантуса розового на 14-е сутки культивирования, что соответствует началу стационарной фазы роста свободных клеток и логарифмической фазе роста иммобилизованных клеток. Высокое содержание данного протоалкалоида в свободных и инкапсулированных клетках, вероятно, обусловлено повышенной активностью фермента в начале лог-фазе роста и активным аккумулированием триптамина в клетках для последующего включения в биосинтез ТИА. Содержание триптамина в иммобилизованных клетках катарантуса розового, в целом, коррелирует с активностью ТДК, в то время как для свободных клеток такой закономерности не показано. Так, на 14-е сутки инкубации в иммобилизованных клетках катарантуса розового была установлена как максимальная активность фермента, так и накопление протоалкалоида. При этом в свободных клетках активность ТДК была максимальна на 7-е сутки, а накопление

триптамина – на 14-е сутки (таблица 2). Возможно, это связано с тем, что для свободных клеток (в отличие от иммобилизованных) 14-е сутки все еще являются логарифмической фазой роста, на которой накопленный триптамин еще не израсходован в дальнейших метаболических реакциях.

К стационарной фазе инкубации содержание триптамина как в свободных, так и в иммобилизованных клетках катарантуса розового, существенно снижается (таблица 2), что может свидетельствовать о перестройке метаболизма и незамедлительном включении протоалкалоида в биосинтез ТИА или эндогенного ауксина.

Таблица 2 – Влияние иммобилизации на содержание внутриклеточного протоалкалоида и его экскрецию в среду инкубации клетками *Catharanthus roseus*

Показатель	7 сутки		14 сутки		21 сутки	
	Свобод-ные клетки	Иммоби-лизован-ные клетки	Свобод-ные клетки	Иммоби-лизован-ные клетки	Свобод-ные клетки	Иммоби-лизован-ные клетки
Содержание триптамина в клетках, мкмоль/г сыр. ткани	0,412±0,04	0,197±0,02	1,336±0,05	1,063± ±0,07	0,157± ±0,03	0,075±0,01
Количество экскретируемого триптамина, мкмоль/мл среды	0,005± ±0,0002	0,006± ±0,0003	0,014± ±0,004	0,213± ±0,005	0,036± ±0,004	0,285± ±0,007

Известно, что иммобилизация клеток может вызывать спонтанную экскреция синтезируемых БАВ в среду инкубации, что весьма важно для их получения в промышленных условиях. Действительно выявлено, что при культивировании иммобилизованных клеток катарантуса розового, к началу стационарной фазы роста (21-е сутки) происходит повышение содержания триптамина в среде инкубации в 7 раз (таблица 2) [2, 19, 20].

Содержание алкалоидов в клетках и их экскреция. Стимулирующее влияние иммобилизации в Ca^{2+}-альгинатном геле на биосинтез ТИА в клетках *Catharanthus roseus*, к настоящему времени, описано рядом авторов. Например, было показано, что в иммобилизованных в альгинатном геле клетках катарантуса продукция аймалицина возрастала в 3,5-5 раз [14, 15]. Так, в инкапсулированных клетках катарантуса розового к 25-м суткам культивирования накапливалось около 1000 мкг аймалицина·$г^{-1}$ сухой ткани, в то время как в свободных суспензионных клетках всего – 280 мг·$г^{-1}$ сухой ткани [14]. В свою очередь, накопление другого монотерпенового алкалоида – серпентина в иммобилизованных клетках повышалось в 2,5 раза по сравнению с его содержанием в свободных клетках суспензионной культуры катарантуса розового [15].

Однако в результате наших экспериментов было установлено, что содержание аймалицина и серпентина на стационарной фазе роста в свободных клетках было выше, чем в иммобилизованных (таблица 3). Так, накопление аймалицина в инкапсулированных клетках к 28-м суткам инкубации (стационарная фаза роста) было ниже предела обнаружения, в то время как в свободных – 0,1±0,03 мг/г сухой ткани. Содержание серпентина в иммобилизованных клетках к указанной фазе роста также было меньше в инкапсулированных клетках в 4 раза, по сравнению со свободными и составляло в иммобилизованных клетках – 1,1±0,12, а в свободных – 4,41±0,51 мг/г сухой ткани. Наши результаты, в целом, согласуются с данными некоторых исследователей. Так, ранее было обнаружено, что содержание серпентина на протяжении всего ростового цикла было максимальным в свободных клетках, а к 25-м суткам инкубации – снижалось до нуля и в свободных и в иммобилизованных клетках [14].

Таблица 3 – Влияние иммобилизации на содержание алкалоидов в гетеротрофных свободных и иммобилизованных клетках *Catharanthus roseus* на стационарной фазе ростового цикла (28-е сутки культивирования)

Показатель	Суммарное содержание алкалоида в клетках, мг/г сух. ткани		Количество экскретируемого алкалоида, мкг/л	
	Свободные клетки	Иммобилизованные клетки	Свободные клетки	Иммобилизованные клетки
Аймалицин	0,1±0,03	Ниже предела определения	32,05±5,2	50,0±6,1
Серпентин	4,41±0,51	1,1±0,12	Ниже предела определения	220,4±39,4

Однако, несмотря на пониженный уровень содержания серпентина и аймалицина в иммобилизованных клетках, нами установлено, что инкапсулированные клетки характеризовались значительной экскрецией этих метаболитов. Экскреция аймалицина иммобилизованными клетками была выше на 38% по сравнению со свободными. А содержание серпентина в среде инкубации иммобилизованных клеток составляло 220,4±39,4 мкг/л, в то время как его накопление в среде со свободными – было ниже предела определения.

Низкое содержание аймалицина и серпентина в иммобилизованных клетках на фоне высокого их накопления в среде культивирования, по сравнению со свободными, можно объяснить интенсификацией внутриклеточных метаболических процессов, вызванных сложным комплексом факторов, обусловленных иммобилизацией. В результате этого, в инкапсулированных клетках, возможно, осуществляется превращение аймалицина в серпентин и интенсивная экскреция последнего в среду культивирования.

Другими авторами также было установлено стимулирующее действие иммобилизации на экскрецию аймалицина в среду инкубации в культурах клеток и протопластов *Catharanthus roseus* [16, 17, 21, 22]. Так, в работе Асада с соавт. было показано, что экскреция аймалицина в иммобилизованных клетках *Catharanthus roseus* возрастает до 0,8 мг/л, по сравнению с экскрецией данного алкалоида свободными клетками, где эта величина составляет около 0,2 мг/л [17], что, в принципе, согласуется с нашими результатами. Однако при исследовании влияния иммобилизации на экскрецию серпентина ранее было выявлено, что максимальное накопление данного алкалоида происходит на 20 сутки и составляет 50 мкг/л, к 40-м сутками снижаясь до нуля [23]. В то время как, в результате наших экспериментов установлено, что накопление серпентина к 28-м суткам было гораздо выше и достигало 220,4 мкг/л (таблица 3).

Таким образом, иммобилизация клеток суспезионной культуры в кальций-альгинатном геле в значительной мере влияет на процессы биосинтеза и экскреции биологически активных веществ.

Список литературы

1. Регуляторное действие полисахаридных носителей на синтез вторичных метаболитов в иммобилизованных растительных клетках / В.М. Юрин [и др.] // Труды БГУ. – 2009. – Т. 4, ч. 1. – С. 211–218.

2. Иммобилизация – эффективный прием повышения синтеза биологически активных веществ в суспензионной культуре растительных клеток / В.М. Юрин [и др.] // Труды БГУ. – 2010. – Т. 5, ч. 1. – С. 191–199.

3. Catharanthus biosynthetic enzymes: the road ahead / V.M. Loyola-Vargas [et al.] // Phytochemistry Reviews. – 2007. – Vol. 6. – P. 307–339.

4. Schmeller, T. Utilization of alkaloids in modern medicine / T. Schmeller // Alkaloids. Biochemistry, ecology, and medicinal applications / M.F. Roberts. – New York, 1998. – P. 435–459.

5. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engeneering application / P.J. Facchini [et al.] // Phytochemistry. – 2000. – Vol. 54. – P. 121–138.

6. Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission / D.M. Pereira [et al.] // Phytomedicine. – 2010. – Vol. 8. – P. 646–652.

7. Экзогенная регуляция вторичного метаболизма в культуре клеток и тканей растений / В.М. Юрин [и др.] // Труды БГУ. – 2008. – Т. 3, ч. 2. – С. 118–126.

8. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза / В.М. Юрин [и др.] // Труды БГУ. – 2009. – Т. 4, ч. 2. – С. 168–182.

9. Catharanthus G. Don: The Madagascar periwinkle and related species (Series of revision of Apocynaceae XIII) / M. Bergen [et al.] // Wageningen Agric. Univ. Pap. – 1996. – Vol. 31. – 120 p.

10. *Catharanthus roseus:* micropropagation and in vitro techniques / A. Pietrosiuk [et al.] // Phytochemistry reviews. – 2007. – Vol. 6. – P. 459–473.

11. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: it is applications and production / A. Junaid [et al.] // Pharmacie Globale (IJCP). – 2010. – Vol. 1 (4). – P. 1–16.

12. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation / M. El-Sayed [et al.] // Phytochemistry Reviews. – 2007. – Vol. 6. – P. 277–305.

13. Manipulating indole alkaloid production by Catharanthus roseus cell cultures in bioreactors: from biochemical processing to metabolic engineering / J. Zhao [et al.] // Phytochemistry Reviews. – 2007. – Vol. 6. – P. 435–457.

14. Alkaloid accumulation in Ca-alginate entrapped cells of *Catharanthus roseus*: Using a limiting growth medium / F. Majerus [et al.] // Plant Cell Reports. – 1986. – Vol. 5. – P. 302–305.

15. Plant cell immobilization in alginate and polyurethane foam / M.T. Ziyad-Mohammed [et al.] // Method in molecular biology. – 1990. – Vol. 6. – P. 513–536.

16. Indole alkaloids production by *Catharanthus roseus* protoplasts with artificial cell wall containing of guluronic acids rich alginate gel / H. Aoyagi [et al.] // J. Ferment Bioeng. – 1998. – Vol. 85. – P. 306–311.

17. Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus:* effect of adsorption in situ, elicitors and alginate immobilization / M. Asada [et al.] // Applied Microbiology Biotechnology. – 1989. – Vol. 30. – P. 475–481.

18. Юрин, В.М. Физиолого-биохимические закономерности функционирования иммобилизованных растительных клеток/ В.М. Юрин // Труды БГУ. – 2012. – Т. 7, ч. 1. – С. 84–98.

19. Ромашко, С.Н. Влияние иммобилизации на активность триптофан-декарбоксилазы и содержание триптамина в суспензионных клетках *Catharanthus roseus* / С.Н. Ромашко, О.В. Молчан, В.М. Юрин // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: материалы Междунар. науч. конф., Минск, 23–25 июня 2010 г. / НАН Беларуси, инст-т биофизики и клетчной инженерии; редкол.: И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск, 2010. – С. 245–247.

20. Ромашко, С.Н. Активность триптофан-декарбоксилазы в клетках суспензионной культуры *Catharanthus roseus* при иммобилизации в альгинате натрия различной вязкости / С.Н. Ромашко, О.В. Молчан, В.М. Юрин // Клеточная сигнализация у растений: тезисы докладов Междунар. науч. конф., Казань, 28 июня–1 июля 2011 г. / РАН, отделение биол. наук РАН, Казанский институт биохимии и биофизики КАЗНЦ РАН; редкол.: А.Н. Гречкин [и др.]. – Казань, 2011. – С. 156–157.

21. Endogenous elicitor-like effects of alginate on physiological activities of plant cells / C. Akimoto [et al.] // Appl. Microbial. Biotechnol. – 1999. – Vol. 52. – P. 429–436.

22. Immobilized plant cells / Brodelius P. [et al.] // Adv. Appl. Microbiol. – 1982. – Vol. 28. – P. 1–18.

23. Production of indole alkaloids by gel-entrapped cells of *Catharanthus roseus* in a continuous flow reactor / F. Majerus [et al.] // Biotech. letters. – 1986. – Vol. 8. – P. 863–866.