

Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2008. – 291 с. – С. 89–91.

4. Корожан, Н.В. Фармакогностическое обоснование применения нового источника череды травы и комбинированного средства на ее основе: дис. на соис. уч. ст. канд. фарм. наук: 14.04.01 / Н.В. Корожан; УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». – Витебск, 2016. – 174 с.

5. Молчан, О.В. Распространение череды олиственной (*Bidens frondosus* L., Asteraceae) в Беларуси и содержание биологически активных соединений в сырье растений / О.В. Молчан [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. – 2016. – Т.11, Ч. 2. – С. 123–131.

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОПРОДУКТИВНЫХ ЛИНИЙ КУЛЬТУР *IN VITRO* ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ – ОДНО ИЗ НАПРАВЛЕНИЙ РАЗВИТИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ БИОЭКОНОМИКИ

Молчан О.В.¹, Шабуня П.С.², Фатыхова С.А.², Юрин В.М.³,

¹ ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф.Купревича НАН Беларуси» Минск, Республика Беларусь,

² Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь;

³ Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь.

Получены несколько высокопродуктивных каллусных линий: F4 – устойчивая к p-флуорофенилаланину, характеризующаяся повышенными уровнями накопления фенольных соединений и флавоноидов; метилтриптофан-устойчивые каллусные линии V4, 7, 11, 17 с повышенными уровнями активности ключевого фермента биосинтеза ТИА – триптофандекарбоксилазы, содержанием триптамина и основного алкалоида барвинка малого – винкамина. Отобранные линии характеризовались также достаточно высокими скоростями роста, сравнимыми с показателями первичной каллусной линии, а также стабильностью ростовых и биосинтетических процессов в течение 3-х пассажей.

Независимо от определения сути биоэкономики, ее неотъемлемой частью являются биотехнологии, которые подразумевают модификацию и изменение живых организмов для создания способов их практического применения в различных областях производства, т.е. биоэкономика основана на системном использовании биотехнологии.

Одной из составляющих биоэкономики является разработка, освоение и использование клеточных технологий и интеграция знаний и приложений в различных секторах экономики и бизнеса [1].

Развитие фармацевтической промышленности тесно связано с получением природных препаратов из растительного сырья. С позиций

биоэкономики в данной отрасли биотехнология должна решить экологические и социальные проблемы, связанные с повышением эффективности производства, качеством и количеством получаемых препаратов из растительной биомассы, сохранением редких и исчезающих видов и т.д. С целью импортзамещения фармацевтических субстанций не последнюю роль должно сыграть введение в культуру не произрастающих в умеренной зоне лекарственных растений.

Поэтому необходимо разработать биотехнологические приемы получения линий культур растительных клеток *in vitro* с высоким содержанием ценных физиологически активных соединений.

Постановка такой задачи диктуется тем, что во многих случаях выход целевого продукта из культуры растительных клеток, выращенных *in vitro*, ниже, чем из травы нативного растения [2, 3].

Эта задача, в известной степени, ранее решалась нами путем подбора условий выращивания, воздействия различных физико-химических факторов и т.д. [4, 5] Особые надежды в этом направлении связывают с химическим мутагенезом [6].

Продемонстрируем эффективность используемых нами приемов химического мутагенеза на каллусной культуре *Vinca minor* L.

Для культивирования каллусных культур использовали агаризованную среду Мурасиге и Скуга (МС) [7], содержащую 30 г/л сахарозы, 1 мг/л НУК и 1 мг/л кинетин, 8 г/л агара. Культивирование проводили при 25 °С в темноте. Пересадку осуществляли каждые 25-30 суток. В качестве мутагена использовали этил-метансульфонат (EMS). Обработку клеток EMS проводили согласно [8]. Каллусные ткани обрабатывали стерильным раствором мутагена в течение 1 часа, затем трижды промывали неагаризованной средой культивирования. В ходе предварительных экспериментов было установлено, что для каллусной ткани барвинка малого эффективная концентрация EMS составляла 1% [8, 9].

Отбор линий проводили, культивируя клетки на селективных средах, содержащих р-флуорофенилаланин (PFP - аналог фенилаланина) и 4-метилтриптофан (4MT – аналог триптофана) согласно [8, 9], и определяя индекс роста, активность триптофан декарбоксилазы (ТДК), содержание фенольных соединений (ФС), флавоноидов, триптамина и винкамина, а также по морфологическим признакам.

Отбор клеточных линий на селективной среде, содержащей PFP

Прежде всего, для отобранных каллусных линий оценивали интенсивность ростовых процессов. Индекс роста исходной каллусной линии составлял в среднем 5,6 отн.ед. Для линий F1 и F3 данный показатель был равен 4,5-4,7 отн.ед. Некоторые каллусные линии отличались значительным замедлением ростовых процессов по сравнению с контрольной. Так, индекс роста линии F2 составлял 2,1-3,1 отн.ед. Была также выделена каллусная линия (F4) с более высоким индексом роста – $7,0 \pm 0,6$ отн.ед. Кроме того, в

линии F4 было отмечено появление клеток, характеризующихся специфическим окрашиванием. Эти клетки отбирали и субкультивировали в течение нескольких пассажей. При этом достоверных изменений скорости роста данной каллусной линии в течение длительного субкультивирования отмечено не было. Клетки линии F4 сохраняли высокую интенсивность ростовых процессов и после 90 сут. субкультивирования. В то же время, для линий F1-3, отмечено некоторое снижение (в среднем на 10%) скорости роста клеток каллуса при последующих пассажах.

Исследование накопления ФС показало, что в одной из выделенных линий (F1) содержание данных вторичных метаболитов несколько снизилось по сравнению с контролем. Следует отметить, что эта же линия характеризовалась уменьшением интенсивности накопления биомассы (табл. 1). В то же время, отмечено увеличение накопления ФС клетками линий F2 и F3 и, в особенности, линии F4. Как было установлено, в тканях данной каллусной линии сумма ФС возрастала в среднем в 4 раза и сохранялась стабильной в течение 3-х пассажей. В то время как линии F2 и F3 постепенно теряли способность накапливать повышенное количество.

В выделенных каллусных линиях определяли также содержание флавоноидов. В результате было обнаружено, что в линиях F1 и F3 содержание суммы флавоноидов было ниже предела определения, как и в исходной каллусной линии, даже несмотря на увеличение суммы ФС, как в клетках линии F3. В то же время, возможно, существенное снижение скорости ростовых процессов линии F2 приводило к стимуляции накопления флавоноидов. Так, сумма флавоноидов в каллусе линии F2, характеризующейся минимальным индексом роста, составляла $1,43 \pm 0,11$ мг/г сухой массы. Самым высоким, как и следовало ожидать, оказалось содержание флавоноидов в клетках каллусной линии F4, достигая в среднем величин $5,56 \pm 0,19$ и $7,25 \pm 0,12$, через 30 и 90 сут. субкультивирования после отбора на селективной среде, соответственно. Важно, что в течение 3-х пассажей (90 сут.) клетки каллусной линии F4 не только сохраняли способность к синтезу и накоплению флавоноидов, но и характеризовались повышением уровня содержания этих вторичных метаболитов.

Отбор клеточных линий на селективной среде, содержащей 4MT

Основной целью данной работы было получение клеточных линий с повышенным содержанием винкамина, основного алкалоида, определяющего фармакологическую ценность растений *Vinca minor* L. В результате для субкультивирования были отобраны несколько МТ-устойчивых мутантных каллусных штаммов. В отобранных каллусных штаммах в течение 3-х пассажей (90 сут) оценивали индекс роста и содержание винкамина. Результаты представлены в таблице 1.

Большинство отобранных каллусных линий характеризовались либо отсутствием изменений индекса роста, либо незначительным снижением интенсивности ростовых процессов по сравнению с первичной каллусной

линией. Только в вариантах V2 и V10 индекс роста был снижен существенно - в среднем до 2,5 отн. ед., а в варианте V12 – увеличился до 7,3±0,6. Содержание винкамина в контрольной, необработанной мутагеном каллусной ткани составляло в среднем 7 мкг/г сухой массы. Значительное увеличение содержания винкамина было отмечено только для 4-х из отобранных линий - V4, V7, V11 V17 (таблица 1). При этом в варианте V17 содержание винкамина в каллусе снижалось в течение 3-х пассажей, в линии V11 – оставалось неизменным, в линиях V4 и V7 – увеличивалось.

Таблица 1 – Индекс роста и содержание винкамина в каллусных линиях *Vinca minor* L. (отбор на устойчивость к 4МТ)

Линия каллусной культуры	Индекс роста, отн. ед.	Содержание винкамина, мкг/г	
		30 сут	90 сут
первичная	5,6±0,3	7,25±0,11	
V1	4,8±0,2	2,45±0,15	1,87±0,49
V2	2,4±0,3	8,25±0,08	9,45±0,24
V3	4,5±0,1	0,44±0,09	0,37±0,07
V4	4,3±0,1	17,57±0,84	21,45±1,02
V5	3,7±0,2	5,41±0,18	5,16±0,28
V6	3,6±0,5	–	–
V7	5,0±0,6	14,57±0,38	17,45±1,33
V8	4,0±0,6	–	–
V9	3,7±0,2	3,28±0,11	2,99±0,34
V10	2,6±0,5	1,45±0,23	1,56±0,35
V11	5,3±0,4	11,75±0,91	12,17±1,08
V12	7,3±0,6	–	–
V13	4,8±0,2	2,39±0,51	2,63±0,43
V14	4,7±0,6	0,45±0,09	0,65±0,07
V15	4,6±0,5	–	–
V16	4,5±0,1	–	–
V17	4,7±0,9	18,23±0,62	12,11±1,58

“–” – ниже предела определения

Таким образом, мы предположили, что перспективными для дальнейшего субкультивирования являются каллусные линии V4, 7, 11, 17, характеризующиеся достаточно высокими индексом роста и уровнями содержания винкамина.

Одной из причин устойчивости культур к аналогам триптофана может быть сверхпродукция свободного триптофана, повышенный уровень активности ферментов его трансформации в клетках и, таким образом, лучшая детоксификация по сравнению с неустойчивыми клетками [10, 11]. Повышенное содержание винкамина, основного алкалоида барвинка малого, свидетельствует о высоком уровне процессов биосинтеза ТИА в исследуемых каллусных тканях. Одним из ключевых ферментов биосинтеза ТИА является L-триптофан декарбоксилаза (ТДК, ЕС 4.1.1.28) – катализирующая превращение триптофана в триптамин [12]. Триптамин

является протоалкалоидом – основным предшественником ТИА. Во многих работах предполагается, что активность триптофан декарбоксилазы является показателем биосинтетического потенциала клеточных культур. Однако следует отметить, что к настоящему времени очень мало данных по исследованию участия триптофан декарбоксилазы в биосинтезе алкалоидов барвинка малого [13]. Также отсутствуют публикации об использовании химического мутагенеза для повышения биосинтетического потенциала каллусных клеток барвинка малого, активности ТДК и накопления триптамина. В связи с вышесказанным были проведены исследования активности ТДК и содержания эндогенного триптамина в 4МТ-устойчивых мутантных линиях, с повышенным содержанием винкамина. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Активность ТДК и содержание триптамина в каллусных линиях *Vinca minor* L. (отбор на устойчивость к 4МТ)

Клеточная культура	Активность ТДК, нмоль триптамина/мг белка/мин		Содержание триптамина, мкмоль/г	
	30 сут	90 сут	30 сут	90 сут
первичная	0,83±0,08		0,65±0,05	
Линия V4	1,75±0,91	2,17±1,08	1,88±0,11	1,95±0,17
Линия V7	1,25±0,08	1,45±0,24	0,43±0,11	0,65±0,17
Линия V11	4,57±0,84	4,45±1,02	1,56±0,19	1,25±0,12
Линия V17	2,57±0,38	2,45±1,33	1,55±0,22	1,05±0,13

Было установлено, что каллусные линии V4, 7, 11, 17 характеризовались также высокими значениями активности триптофан декарбоксилазы и эндогенного содержания триптамина, основного предшественника ТИА барвинка малого, а также стабильностью ростовых и биосинтетических процессов в течение 3-х пассажей. Индексы роста отобранных линий были сравнимы с показателями каллуса первичной линии. Для линии V7 было характерно 1,5-кратное увеличение активности ТДК и отсутствие увеличения содержания триптамина (табл. 1). В тканях линий V4, 11, 17 отмечено 2-5-кратное увеличение активности ТДК и 2-3 кратное - триптамина по сравнению с каллусной тканью первичной линии (табл. 2).

В результате проведенных исследований были отобраны МТ-устойчивые каллусные линии *Vinca minor* L., характеризующиеся достаточно высокими скоростью роста, уровнями активности ключевого фермента биосинтеза ТИА – триптофандекарбоксилазы и содержанием эндогенного протоалкалоида триптамина, а также накопления винкамина.

Проведенное нами сравнение с первичным каллусом линий-сверхпродуцентов (обработанные мутагеном) на 30-е и 90-е сутки показало увеличение содержания винкамина в 2-3 раза. Стоимость винкамина на мировом рынке составляет около 80 000 дол. США за 1 кг [3]. Таким образом, очевидно, что обработка каллусных культур мутагеном значительно повышает рентабельность препарата.

Приведенные результаты указывают на экологическую целесообразность, социальную направленность и экономическую эффективность развития биофармацевтики.

Работа выполнена при поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант №Б15-087).

Список литературы

1. Жарашуева Л. М., Бисчекова Ф. Р. Биоэкономика как новое и перспективное направление в экономике // Биоэкономика и экобиополитика. – 2015. – №1. – С. 8-10.
2. Verpoorte, R. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites / R. Verpoorte, A. Contin, J. Memelink // Phytochem. Rev. – 2002. – V. 1. – P. 13–25.
3. Rao, R.S. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites / R.S. Rao, G.A. Ravishankar // Biotechnology Advances. – 2002. – V. 20. – P. 101-153.
4. Юрин, В.М. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза / В.М. Юрин, Т.И. Дитченко, О.В. Молчан, М.П. Шапчиц, С.Н. Ромашко, Булатова А.А., Логвина А.О. // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2009. – Т. 4, ч. 2. – С.168–182.
5. Молчан О.В., Фатыхова С.А., Шабуня П.С., Юрин В.М. Содержание феруловой кислоты в интродуцированных растениях и каллусных культурах *Vinca minor* L. Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем» – 2015. – Т. 10, часть 1. – С 203-208.
6. Penna S., Vitthal S.B., Yadal P.V. In vitro mutagenesis and selection in plant tissue Cultures and their prospects for crop improvement // Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability (Special Issue I)– 2012.- V6.- P. 6-14.
7. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1968. – Vol. 15, №13. – P. 473-497.
8. Pollard J.W., Walker J.M. Methods in molecular biology. V. 6. Plant cell and tissue culture. – New Jersey: Humana Press/ - 1990. – 597 p
9. Молчан О.В. Получение мутантных каллусных линий *Vinca minor* L. с повышенными уровнями активности триптофандекарбоксилазы и содержания триптамина / О.В. Молчан, В.М. Юрин // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2016. – Т. 11, ч. 2. – С.148–155.

10. Maliga, P. (1980) Isolation, characterization and utilization of mutant cell lines in higher plants. *Infernfl. Rev. Cytol. supp.* 11 A, 225-250.)
11. Berlin J., Mollenschott C., Sasse F., Witte L., Piehl G., Buntemeyer H. Restoration of serotonin biosynthesis in cell suspension cultures of *Peganum harmala* by selection for 4-methyltryptophan-tolerant cell lines. – 1987. – *J. Plant Physiol.* – V. 131.- P. 225-236.
15. Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering application / P.J. Facchini [et al.] // *Phytochemistry.* – 2000. – Vol. 54. – P. 121–138.
16. Molchan, O. L-tryptophan decarboxylase activity and tryptamine accumulation in callus cultures of *Vinca minor* L. / O. Molchan, S. Romashko, V. Yurin // *Plant Cell and Tissue Organ Cultures.* – 2012. – Vol. 108. – P. 535–539.

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ ОВЕЧЬИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ α - И γ -ИНТЕРФЕРОНОВ

Острикова К.В., Потапович М.И.

Белорусский Государственный Университет, г. Минск, kristiost@mail.ru

Целью данного исследования является получение субстанций овечьих α - и γ -интерферонов. В результате выполнения работы получены высокоэффективные штаммы-продуценты соответствующих белков, а также очищенные белки, которые обладают высокой удельной активностью.

Введение. Мелкий рогатый скот (МРС) подсемейство ко́зьи (лат. *Caprinae*), – отрасль мирового продуктивного скотоводства, которая дает в больших объемах сырьё для легкой промышленности. По численности сельскохозяйственных животных мелкий рогатый скот занимает одно из ведущих мест. Однако на необходимое расширение отрасли влияют многие отрицательные факторы и, в первую очередь, разнообразные причинные стрессовые состояния, приводящие к иммунодефицитам, а также постоянно растущий и развивающийся инфекционный фон, обусловленный вирусными факторами [1].

Несмотря на регулярно проводимые противозооотические мероприятия, количество новых инфекционных болезней животных в мире постоянно растет. Во всех странах они являются серьезной социально-экономической проблемой. Экономический ущерб от инфекционных заболеваний МРС складывается из падежа, снижения продуктивности животных вследствие их заболевания; недополучения приплода из-за переболевания и бесплодия животных, а также затрат на проведение специальных ветеринарных мероприятий [1,2]. К числу наиболее опасных заболеваний относится чума мелкого рогатого скота, анаплазмоз, ящур, блютанг и др. [2].