

**МЕТАБОЛИТНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ И СИГНАЛЬНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ
В КЛЕТКАХ КУЛЬТУР *IN VITRO* *VINCA MINOR* L.****О.В. Молчан, С.Н. Ромашко, В.М. Юрин***Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь
e-mail: olga_molchan@mail.ru***Введение**

Барвинок малый (лат. *Vinca minor* L.), относящийся к роду *Vinca* семейства Аросупасеае, является ценным лекарственным растением [1]. Его вертикальные побеги заготавливают в период цветения - начала плодоношения в местах естественного обитания вида и используют в фармацевтической промышленности в качестве сырья для производства сосудорасширяющих и гипотензивных препаратов, средств, стимулирующих церебральный метаболизм. Терапевтическое действие оказывают синтезируемые в растении терпеновые индольные алкалоиды (ТИА), основным из которых является винкамин [2]. Производимые препараты, содержащие либо сумму индольных алкалоидов барвинка, либо выделенный винкамин, либо его производные, эффективны для лечения таких заболеваний, как артериальная гипертензия, цереброваскулярная недостаточность, неврогенная тахикардия, менингоэнцефалит и т.д. [3]. Кроме того, среди ТИА барвинка малого был обнаружен бисиндольный алкалоид винкарубин, предположительно имеющий антинеопластическую активность [4].

Для *V. minor* характерен европейско-средиземноморский тип ареала [5, 6]. Данный вид широко распространен в странах Атлантической, Центральной и Южной Европы (от Португалии и Франции – на западе, до Германии и Польши – на севере, Румынии и Болгарии – на востоке), а также на Кавказе (Западное Закавказье) и в Западной Азии (Турция). На территории Беларуси *V. minor* является интродуцентом и в качестве растительного сырья не заготавливается.

Как следует из данных, полученных нами ранее, за последние десятилетия распространение вида в Беларуси значительно расширилось [6]. В нашей стране учтено более 120 местонахождений барвинка малого практически во всех административных областях, однако наибольшее его распространение характерно для западной и центральной частей республики. В этих регионах он встречается как в антропогенных местах обитания, так и активно дичает и натурализуется в естественных, преимущественно лесных фитоценозах [6]. В Беларуси *V. minor* цветет с конца апреля до конца июня в течение 25–30 дней. Также было показано присутствие ТИА в интродуцированных на территории Беларуси растениях. Были определены сумма алкалоидов и содержание винкамина [7, 8]. Так, в пересчете на сухую массу, сумма алкалоидов составляла около 24 мг/г, содержание винкамина – 0,32–1,83 мг/г. Полученные величины оказались сравнимы с аналогичными показателями, характерными для растений барвинка, произрастающих в местах естественного обитания вида. Таким образом, *V. minor* является перспективным источником индольных алкалоидов для фармацевтической промышленности Беларуси. Альтернативным вариантом получения ТИА растительного происхождения могут быть также культуры клеток и тканей. К основным преимуществам использования культур *in vitro* относят экологическую чистоту продуктов, независимость от климатических и сезонных флуктуаций, возможности оптимизации и стандартизации условий выращивания для создания клеточных линий-сверхпродуцентов, а также автоматизации процессов получения целевых продуктов [9]. Состав и содержание индольных алкалоидов как в интродуцированных растениях, так и в культурах *in vitro* данного вида также остается не изученным.

Методы исследования

Объектами исследования являлись растения и каллусные культуры *Vinca minor* L. Растения выращивали в открытом грунте на территории ботанического сада биологического

факультета Белорусского государственного университета. Культивирование каллуса и клеточной суспензии производили при 25°C в темноте на среде Мурасиге и Скуга (агаризованной для каллуса), содержащей НУК и кинетин. Пересадку осуществляли каждые 25–30 суток.

Выделение ТИА проводили согласно методике, описанной ранее [8, 10]. 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 (рН 6,8) и ацетонитрил. Для количественного определения алкалоидов использовали 2 мМ растворы винкамина, аймалицина, серпентина в качестве стандартных образцов. Режим ионизации – химическая ионизация при атмосферном давлении со следующими параметрами источника ионизации: напряжение на конусе – 22 В, скорость потока осушающего газа (азот) – 30 А.У.; скорость потока вспомогательного газа (азот) – 5 А.У.; сила тока и напряжение при разряде – 5 нА и 4,2 В; температура капилляра – 272°C; напряжение на капилляре – 22 В; температура десольвации – 350°C; диапазон сканирования, 50–1500 Да.

Активность триптофан-декарбоксилазы и содержание эндогенного триптамина определяли методом Сангван с соавт. [11] с модификациями, описанными в работе [12].

Выделение мембранных везикул из каллусной ткани *Vinca minor* L. проводили методом дифференциального центрифугирования, как было описано ранее [13]. Все операции проводили при температуре 0–4°C. Изменение содержания Ca^{2+} исследовали с помощью Ca^{2+} -чувствительного зонда хлортетрациклин гидрохлорид (ХТЦ) [14]. Измерение флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse при длинах волн возбуждения и эмиссии 390 и 530 нм, соответственно.

Содержания белка определяли методом Бредфорд [15] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. Жизнеспособность каллусных клеток определяли с помощью метода оценки митохондриальной активности с помощью 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида [16]. Для определения параметров роста культур использовали стандартные методики и формулы [17].

Для обработки полученных результатов использовали методы вариационной статистики. Основными статистическими характеристиками служили: среднее арифметическое, ошибка средней величины и достоверность отличий между средними величинами (t). Различия между средними показателями оценивали при уровне значимости (p) не более 0,05.

Результаты и обсуждение

Следует отметить, что перевод клеток растения в культуру *in vitro* может приводить к снижению уровня биосинтеза вторичных метаболитов и даже к синтезу совершенно новых соединений с принципиально другим механизмом фармакологического действия [9, 17]. Поэтому, прежде всего, нами были проведены исследования по идентификации и сравнению качественного состава и количественного содержания ТИА в каллусной ткани, в листьях и корнях нативного растения. В результате проведенного ВЭЖХ-МС анализа были идентифицированы ионы, которые могут соответствовать более чем 100 терпеновым индольным алкалоидам, среди которых, вероятно присутствуют как моно-, так и бисиндольные соединения. Среди идентифицированных – 53 из 55 известных ранее для *V. minor*. Около 50 ионов имели массовые числа, соответствующие соединениям, которые можно определить, как алкалоиды, ранее идентифицированные в других растениях, либо к настоящему времени не установленные. В таблице 1 приведены масс-спектрометрические характеристики некоторых компонентов экстрактов алкалоидов *Vinca minor*, полученных из листа, корня и каллуса. Как видно, в таблице 1 среди компонентов экстрактов алкалоидов были обнаружены соединения, накапливающиеся только в листьях (резерпин, винкарубин),

либо только в корнях (серпентин, альстонин), либо только в каллусе (дегидровинкамаин). Присутствие некоторых соединений показано во всех исследованных объектах (винкадифформин).

Особый интерес представляют алкалоиды, имеющие коммерческую ценность. Среди них – винкамин – основной алкалоид барвинка малого. Обнаружение ионов с массовыми числами 355,1, 355,2 355,3 m/z позволило предположить присутствие винкамина в листьях, корнях и каллусе барвинка. Кроме того, присутствие винкамина было показано в нативном растении, интродуцированном на территории нашей страны методом ВЭЖХ с использованием стандарта [7, 8]. Таким образом, синтез винкамина может происходить в растении и при интродукции, и при введении в культуру *in vitro*. Важным было также обнаружение ионов с массовыми числами, предположительно соответствующими серпентину и аймалицину. Эти фармакологически ценные алкалоиды синтезируются в растениях *Rauvolfia serpentina* L. и *Catharanthus roseus* G. Don и ранее из барвинка малого не выделялись [8]. Особую значимость, на наш взгляд, имеет обнаружение иона, предположительно соответствующего бис-индольному алкалоиду винкарубину, обладающего противоопухолевой активностью (таблица 1).

Сравнительный анализ содержания алкалоидов в клетках нативных растений и каллусных культур позволил предположить, что основным алкалоидом корня интродуцированных растений является 1,2-дегидроаспидоспермидин, листа – винкамин, а каллуса – дегидровинцин и дегидровинкамаин. Серпентин- и аймалицин-подобные соединения накапливаются, в основном, в корне. А для каллуса – характерным оказывается значительное содержание стриктозида. В целом, следует отметить гораздо более низкое содержание алкалоидов в каллусной ткани по сравнению с листом и корнем.

Таблица 1 – Масс-спектрометрическая характеристика некоторых компонентов экстрактов алкалоидов *Vinca minor* L.

	Предполагаемое соединение	Мол. масса, а.е.м.	Массовое число иона, m/z		
			Лист	Корень	Каллус
1	эбурнамин	278,4	–	279,3	279,0
2	1,2-дегидроаспидоспермидин	280,4	281,3	281,3	–
3	эбурнамин	296,4	–	297,3	–
4	аповинкамин, таберсонин*, виндолинин*	336,4	337,3	337,3	–
5	винкадифформин, пикрицин	338,4	339,3	339,2	339,2
6	серпентин*, альстонин*	349,4	–	350,2	–
7	эрвин, миовин, аймалицин*, лохнерицин	352,4	353,2	353,3	–
8	винкамин, изовинкамин, эпивинкамин, йохимбин*, стеммаденин*	354,4	355,3	355,2	355,1
9	дегидровинкамаин*	364,4	–	–	365,3
10	винцин	384,5	385,9	385,1	385,3
11	стриктозидин	530,2	–	531,7	531,2
12	резерпин	608,7	609,9	–	–
13	винкарубин	718,9	720,0	–	–

Примечание: * – ранее не идентифицированы в барвинке малом, _____ – представляющие коммерческую ценность.

Для повышения синтеза вторичных метаболитов клетками культур растений традиционно используются следующие методы:

- ✓ выбор продуктивных генотипа донорного растения, а также его ткани или органа;
- ✓ подбор состава питательной среды и физических условий культивирования;
- ✓ отбор высокопродуктивных клеточных линий;
- ✓ введение в систему «предшественников» целевых продуктов [9, 17].

Использование некоторых из этих подходов оказалось эффективным и для каллусной культуры барвинка малого. Так, ранее нами были установлены оптимальные концентрации фитогормонов в среде культивирования [9, 12]. Показано, что свет стимулирует процессы синтеза индольных алкалоидов [12]. Постоянно ведется отбор высокопродуктивных

клеточных линий. В то же время, введение в среду культивирования L-триптофана – предшественника синтеза ТИА – не привело к стимуляции биосинтетических процессов (данные не опубликованы). Вероятно потому, что ферментативные реакции, в которые данный предшественник включается в качестве субстрата, не являются лимитирующими. В связи с этим нам представляется более перспективным не эмпирический подбор условий культивирования, а целенаправленное управление синтезом ТИА и, таким образом, продуктивностью культуры.

Основными направлениями метаболической инженерии растений сегодня являются работы по сверхэкспрессии генов, кодирующих ферменты, лимитирующие скорость синтеза, либо блокирующие механизм ингибирования синтеза по принципу обратной связи, либо блокирующие конкурентные пути снижения катаболизма вторичных метаболитов [18]. Главная причина отсутствия значительных успехов в этом направлении – недостаток базовых знаний о процессах синтеза, транспорта, особенностях накопления и механизмах регуляции, вовлекаемых в биосинтез вторичных метаболитов в растительной клетке [18]. В полной мере это справедливо и для культур барвинка малого, поскольку и метаболические пути, и механизмы регуляции ТИА в клетках этого растения остаются совершенно не изученными. В связи с этим на основании знаний о составе ТИА нами была составлена предполагаемая схема биосинтеза алкалоидов в растениях *Vinca minor* (данные не опубликованы).

В растениях и культурах *in vitro* барвинка малого были также определены эндогенное содержание триптамина и активность одного из ключевых ферментов биосинтеза ТИА – L-триптофан декарбоксилазы (ТДК, ЕС 4.1.1.28) – катализирующего превращение триптофана в триптамин [19]. Впервые ген, кодирующий ТДК, был обнаружен в *Catharanthus roseus* [20], затем было показано, что в растениях *Camptotheca acuminata* и *Ophiorhiza pumila* функционируют белки, аминокислотные последовательности которых на 67 и 71% схожи с ТДК катарантуса [19]. Впоследствии было установлено, что ТДК может вовлекаться в биосинтез серотонина (5-гидрокситриптамина), простых β -карболиновых алкалоидов, а также ТИА в ряде других растений [19, 21]. Триптамин и его производные представляют собой в соответствии с общепринятым определением протоалкалоиды.

На первом этапе работы были определены активность ТДК и содержание эндогенного триптамина в листьях и стеблях вертикальных побегов барвинка малого (рисунок 1).

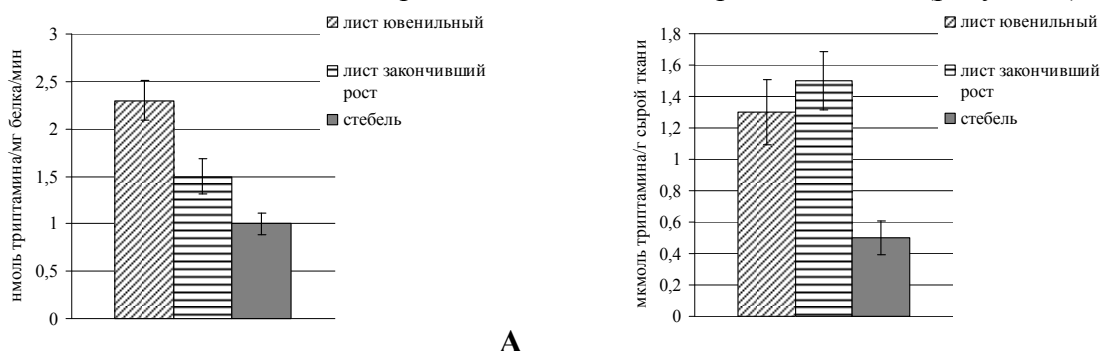


Рисунок 1 – Активность ТДК (А) и содержание триптамина (Б) в различных органах барвинка малого

В результате было установлено, что активность ТДК достигает максимального значения ($2,3 \pm 0,2$ нмоль триптамина \times мг⁻¹ белка \times мин⁻¹) в активно растущих ювенильных листьях. В листьях, закончивших рост, активность фермента была значительно меньше. В стеблях и активность ТДК, и содержание эндогенного триптамина были минимальными. Содержание триптамина в листьях разного возраста было примерно одинаковым и варьировало в пределах 1,1–1,7 мкмоль/г сырой ткани. Возможно, отсутствие корреляции между активностью ТДК и накоплением триптамина в листьях объясняется тем, что стимуляция фермента связана с активацией ростовых процессов, в то время как содержание триптамина,

скорее всего, определяется как интенсивностью его синтеза, так и скоростью включения в процессы биосинтеза алкалоидов. Культуры клеток и тканей, характеризующиеся по сравнению с нативным растением менее длительным ростовым циклом, являются удобной моделью для исследования взаимосвязи между активностью ТДК, накоплением триптамина и ростовыми процессами. Определение активности ТДК было проведено на различных стадиях ростового цикла каллусной культуры (рисунок 2). Продолжительность ростового цикла каллуса составляла 30 суток. На ростовой кривой можно было выделить характерные фазы: лаг- (0–10 суток), лог- (11–20 суток), замедленного роста (21–25) суток и стационарную (26–30 суток). Как видно на рисунке 2А, максимальная активность ТДК в каллусе (в среднем $0,7$ нмоль триптамина \times мг⁻¹ белка \times мин⁻¹) наблюдалась на 25 сутки культивирования, т.е в фазе замедленного роста. На стационарной фазе роста (30 сут) активность ТДК уменьшалась, вероятно вследствие снижения метаболической активности клеток.

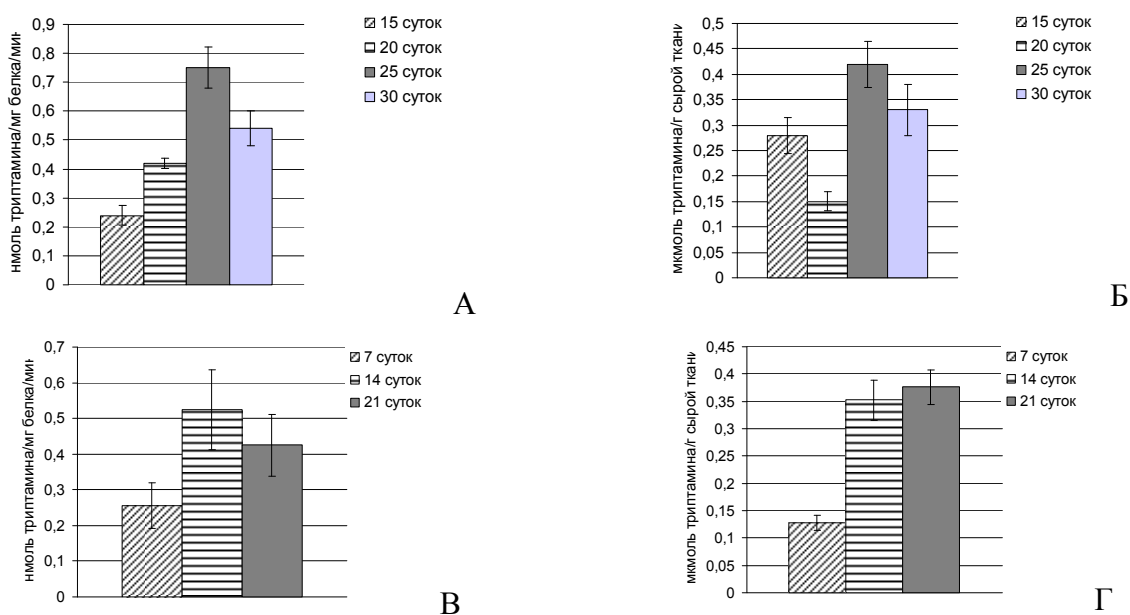


Рисунок 2 – Активность ТДК (А, В) и содержание триптамина (Б, Г) на различных стадиях ростового цикла каллусной (А, Б) и суспензионной (В, Г) культур

Определение содержания триптамина в каллусной ткани на различных этапах ростового цикла показало, что уровень накопления протоалкалоида в принципе согласуется с активностью ТДК. Как видно на рисунке 2Б, содержание эндогенного триптамина в каллусе варьирует в диапазоне значений от 0,15 до 0,45 мкмоль/г сырой массы ткани. Максимальный уровень накопления триптамина (25 сут) отмечается в период повышенной активности ТДК. К 30-м суткам культивирования каллусной ткани и активность ТДК, и содержание эндогенного триптамина снижаются на 30–40% по сравнению с 25-ми сутками. Минимальный уровень содержания триптамина был зарегистрирован на 20-е сутки ростового цикла – в период наибольшей ростовой и метаболической активности клеток. Таким образом, возможно, в исследуемой каллусной ткани уровень накопления триптамина на 10, 25 и 30-е сутки культивирования определяется в основном активностью его синтеза. В то время как, на 20 сутки культивирования, вероятно, активируются также системы, способствующие включению триптамина в биосинтез алкалоидов.

Суспензионная культура клеток растений является наиболее востребованным объектом при изучении синтеза продуктов вторичного метаболизма [9]. В результате проведенных исследований было показано, что максимальная активность ТДК в клетках суспензионной культуры барвинка малого наблюдалась в течение лог-фазы ростового цикла, на 14 сутки

инкубации составляла ($0,53 \pm 0,11$ нмоль триптамина \times мг^{-1} белка \times мин^{-1}) и до 21-х суток сохранялась на прежнем уровне (рисунок 2 В).

Таким образом, активность ТДК составляла 1,8–2,5 и 0,3–0,7 нмоль триптамина \times мг^{-1} белка \times мин^{-1} в листьях нативных растений и культурах *in vitro*, соответственно. Данный диапазон значений согласуется с некоторыми уже известными данными по изучению этого фермента в высших растениях [19–25]. Так, активность ТДК (нмоль триптамина \times мг^{-1} белка \times мин^{-1}) была равна: 0,8 – в суспензионной культуре катарантуса розового, 0,3 – в суспензионной культуре кампототеки остроконечной, 0,6 – в листьях тополя [19–25]. В то же время, в ряде других объектов активность ТДК отличалась от полученного нами значения в 10–100 раз. Например, в листьях риса и в суспензионной культуре цинхоны аптечной она составляла 0,0015 и 0,018–0,024 нмоль триптамина \times мг^{-1} белка \times мин^{-1} , соответственно [19–25]. Содержание эндогенного триптамина, определенное нами в листьях и культурах *in vitro* барвинка малого, также совпадало по порядку величины с данными, полученными ранее в некоторых работах. Так, содержание триптамина в листьях тополя и листьях риса составляло 1 и 0,5 мкмоль / г сырой массы, соответственно [19–25].

Обнаруженное нами некоторое снижение активности ТДК и накопления триптамина в тканях культур *in vitro* по сравнению с листьями барвинка малого, в принципе, не удивительно, поскольку в культурах уровень биосинтеза вторичных метаболитов часто находится на более низком уровне. Это, например, характерно и для биосинтеза ТИА в клетках культур *in vitro* *Catharanthus roseus* [26]. Стимуляция активности ТДК, наблюдаемая в фазе интенсивного роста листьев и культур *in vitro* также согласуется с известными результатами, согласно которым в некоторых растениях и культурах ТДК регулируется на уровне транскрипции факторами развития, а максимальная активность фермента проявляется в интенсивно растущих тканях и клетках [19–25]. Таким образом, обнаруженные нами изменения активности ТДК и содержания эндогенного триптамина, позволяют предположить активное участие этого фермента в реакциях как вторичного, так и первичного метаболизма в клетках барвинка малого.

В результате конденсации триптамина с секологанином в растениях *Rauvolfia serpentina* и *Catharanthus roseus* образуется первичный продукт синтеза всех индольных алкалоидов стриктозидин [26]. Поскольку нами была определена активность ТДК, идентифицированы триптамин и стриктозидин в растениях барвинка малого, мы предполагаем, что начальные этапы синтеза ТИА барвинка малого осуществляются согласно схеме, показанной на рисунке 3.

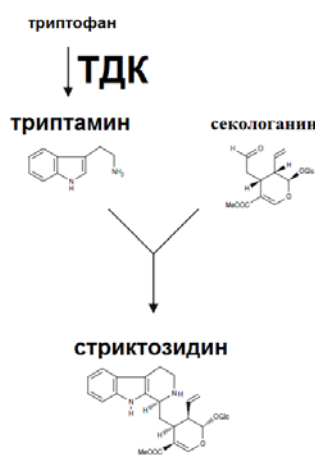


Рисунок 3 – Предполагаемая схема начальных этапов биосинтеза терпеновых индольных алкалоидов в *Vinca minor* L. в клетках растений и культур *in vitro*

Следующим этапом нашей работы стало исследование сигнальных механизмов, в результате которых могут активироваться процессы биосинтеза и накопления ТИА. Хорошо известно, что вторичные метаболиты, и, в частности, индольные алкалоиды – защитные молекулы, благодаря которым растение противостоит атаке многих биотических и абиотических стрессоров. После воздействия стрессового фактора в клетках растений активируются сигнальные пути, приводящие к различным внутриклеточным регуляторным процессам – каскадам фосфорилирования/дефосфорилирования, активации ионных каналов, накоплению жасмоновой, салициловой кислот, увеличению содержания абсцизовой кислоты,

этилена, генерации активных форм кислорода [27]. Одним из важнейших элементов трансдукции внешних сигналов является также активация в клетке систем вторичных медиаторов – низкомолекулярных биологически активных соединений, таких как Ca^{2+} , цАМФ, цГМФ, ИФ₃ и др. Каким может быть специфический почерк процессов сигнальной трансдукции, приводящих в результате воздействия стрессора к стимуляции синтеза ТИА в клетках культуры *in vitro*?

Как уже было упомянуто, в результате действия многих стрессовых факторов на растительный организм, в клетках может отмечаться рост содержания абсцизовой кислоты [28]. Участие АБК и в регуляции синтеза ТИА, и вообще в процессах сигнальной трансдукции в клетках алкалоид-синтезирующих растений и культур *in vitro* остается плохо изученным. Поэтому нами было исследовано влияние экзогенной абсцизовой кислоты на активность триптофан декарбоксилазы и содержание триптамина в каллусных тканях *Vinca minor* L. АБК была добавлена в начале лог-фазы ростового цикла, в период максимальной метаболической активности клеток, анализ параметров производили через 48 ч. Как видно на рисунке 4 (А, Б), из всех протестированных концентраций АБК в диапазоне 1–20 мкМ, только 10 мкМ оказалась эффективна для стимуляции активности ТДК и накопления эндогенного триптамина. Было установлено также, что при 10 мкМ АБК также достаточно низкой является пероксидазная активность, часто являющаяся признаком стрессовой реакции (рисунок 4В). Кроме того, было выявлено, что абсцизовая кислота в концентрации 10 мкМ не влияла на основные ростовые параметры культуры – индекс роста и время удвоения биомассы, в то время как при более высоких концентрациях наблюдали ингибирование ростовых процессов (данные не показаны).

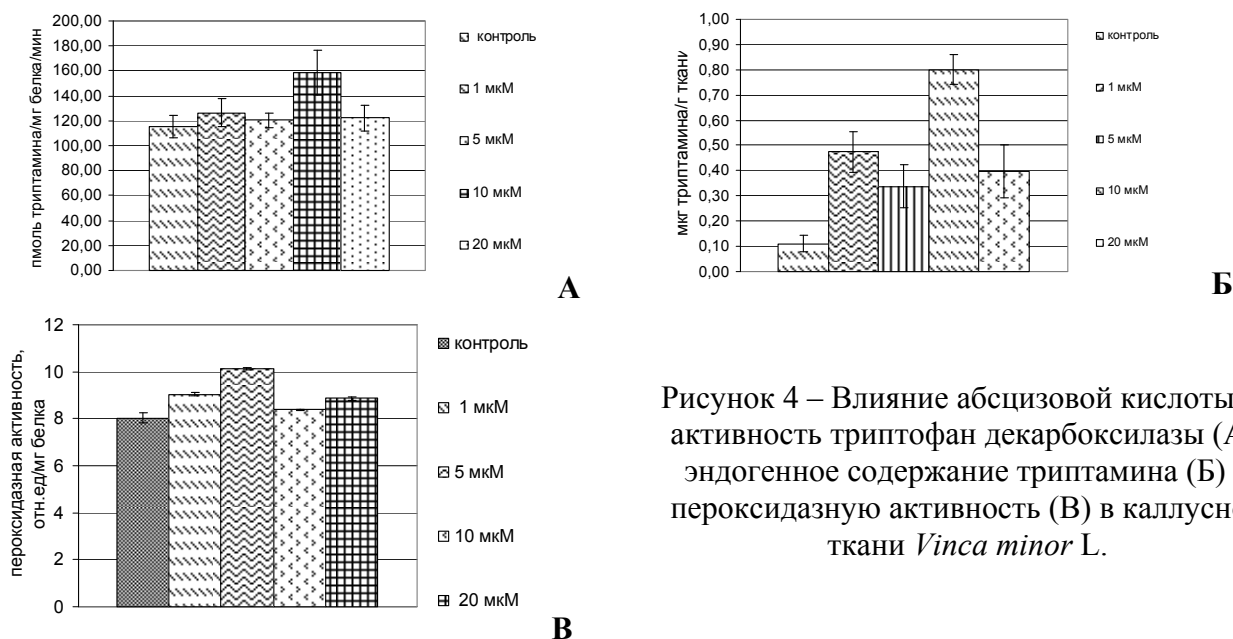


Рисунок 4 – Влияние абсцизовой кислоты на активность триптофан декарбоксилазы (А), эндогенное содержание триптамина (Б) и пероксидазную активность (В) в каллусной ткани *Vinca minor* L.

Для выявления регуляторных механизмов, активация которых под влиянием абсцизовой кислоты может приводить к росту содержания индольных алкалоидов, в клетках культур растений, остаются не установленными. В связи с этим возможное участие Ca^{2+} , как вторичного медиатора и в восприятии внешних сигналов, и в процессах регуляции метаболической активности клеток культур растений привлекает особое внимание. Изменение цитоплазматической концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{цит}}$ является ключевым событием в трансдукции большинства внешних для клетки стимулов [29]. Однако для каждой культуры важно определить специфический « Ca^{2+} -почерк»: идентифицировать задействованные в Ca^{2+} -ответе депо и транспортные системы, амплитуду и кинетику Ca^{2+} -ответа, взаимосвязи с другими сигнальными системами. Тем более, что перевод клеток в условия *in vitro* может не только приводить к синтезу совершенно новых соединений с принципиально другим механизмом действия, но и полностью изменять весь клеточный метаболизм.

Поэтому в данной работе было исследовано влияние АБК на транспорт ионов кальция через мембраны везикул, выделенных из клеток каллусной культуры (рисунок 5). Обнаружено, что экзогенно добавляемая АБК вызывает уменьшение интенсивности флуоресценции окрашенных ХТЦ мембранных везикул, обусловленное выходом Ca^{2+} . При сравнительном анализе влияния различных концентраций АБК на флуоресценцию комплекса кальций-ХТЦ в мембранных везикулах было установлено, что при воздействии 10 мкМ АБК изменение проницаемости мембран для Ca^{2+} и активация выброса иона из предварительно нагруженных Ca^{2+} везикул происходит наиболее эффективно (рисунок 5А).

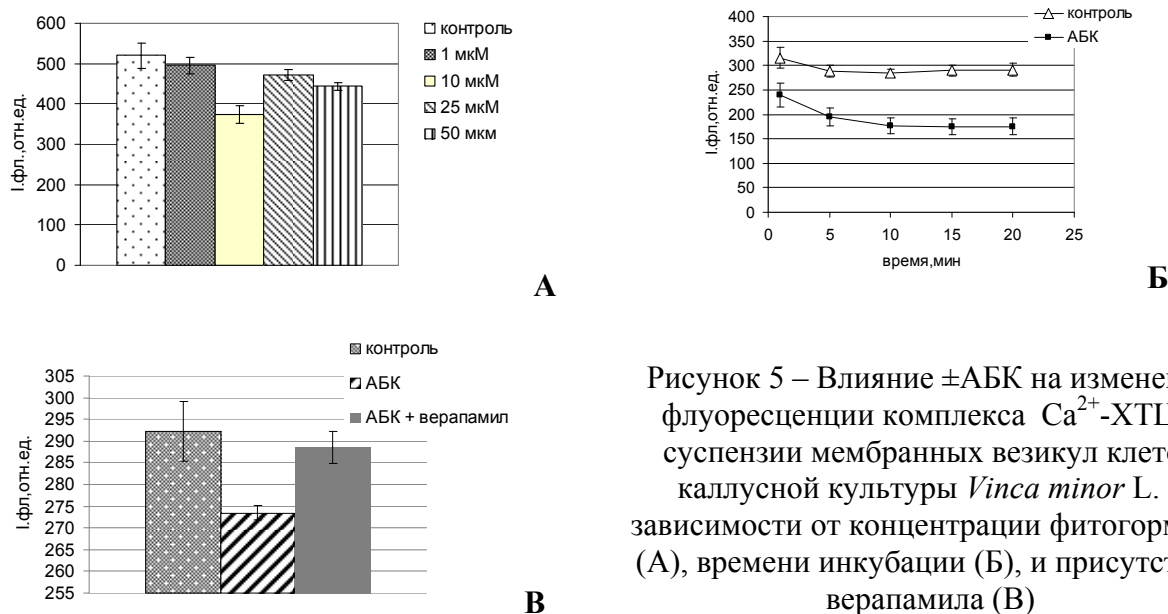


Рисунок 5 – Влияние \pm АБК на изменение флуоресценции комплекса Ca^{2+} -ХТЦ в суспензии мембранных везикул клеток каллусной культуры *Vinca minor* L. в зависимости от концентрации фитогормона (А), времени инкубации (Б), и присутствия верапамила (В)

Исследование временных параметров показало, что наиболее интенсивные изменения флуоресценции комплекса Ca^{2+} -ХТЦ под действием 10 мкМ АБК отмечены через 5 минут инкубации (рисунок 5Б). Стимуляция выхода ионов кальция под влиянием АБК подавляется добавлением верапамила – ингибитора каналов, через которые может осуществляться транспорт Ca^{2+} (рисунок 5В). Таким образом, регуляция абсцизовой кислотой транспорта ионов кальция может осуществляться посредством участия верапамил-чувствительных каналов. Возможное вовлечение других транспортных структур в исследуемые процессы станет предметом наших будущих исследований.

Хорошо известно, что процессы Ca^{2+} -сигналикации в клетках связаны с системами других вторичных медиаторов. Так например, во многих растениях обнаружены нуклеотид-чувствительные Ca^{2+} -каналы (CNGCs) [29]. Поэтому при проведении экспериментов интерес вызвало обнаружение влияния ДБ-цГМФ на кальций-транспортные процессы в мембранных везикулах (рисунок 6). Как видно на рисунке 6, ДБ-цГМФ в концентрации 50 мкМ в первые 5 минут инкубации снижал интенсивность флуоресценции комплекса Ca^{2+} -ХТЦ в мембранных везикулах, вероятно связанное с выходом Ca^{2+} .

Таким образом, можно предположить, что для клеток каллусной культуры барвинка малого характерно наличие таких структур, как нуклеотид-управляемые катионные каналы, через которые может осуществляться транспорт Ca^{2+} . Кроме того, вероятно, что в клетках культур *in vitro* *V. minor* могут функционировать системы циклических мононуклеотидов, участвуя также в регуляции процессов вторичного метаболизма.

Результаты исследования возможного участия циклических мононуклеотидов в качестве вторичных медиаторов, регулирующих биосинтез ТИА представлены на рисунке 7. Как было установлено, ДБ-цГМФ, но не ДБ-цАМФ, стимулирует активность ТДК (рисунок 7). Эффект ДБ-цГМФ ингибировался добавлением ловушки NO – карбоxy-PTIO, позволяя предположить участие NO в цГМФ-опосредованной регуляции процессов биосинтеза ТИА и наличие «cross-talk» между сигнальными путями.

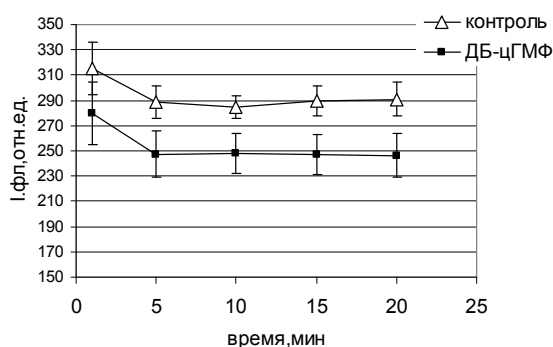


Рисунок 6 – Влияние ДБ-цГМФ на изменение флуоресценции комплекса Ca^{2+} -ХТЦ в суспензии мембранных везикул клеток каллусной культуры *Vinca minor* L.

Выводы

В результате проведенных исследований было установлено, что в культурах *in vitro* *V. minor* могут синтезироваться фармакологически ценные ТИА. Один из ключевых ферментов биосинтеза ТИА, ТДК, активируется в периоды интенсивного роста листьев и культур *in vitro*. Наблюдаемая активация ТДК под действием АБК и ДБ-цГМФ позволяет предположить участие этих эффекторов в регуляции биосинтеза ТИА. Ca^{2+} и цГМФ, возможно, являются вторичными медиаторами, участвующими в процессах сигнальной трансдукции, связанных с регуляцией биосинтеза индольных алкалоидов.

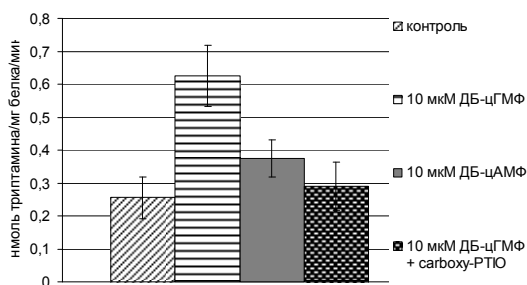


Рисунок 7 – Влияние аналогов циклических мононуклеотидов на активность триптофан декарбоксилазы

Авторы выражают благодарность сотруднику ИБОХ НАН Беларуси А.В. Янцевичу за помощь в проведении ВЭЖХ и масс-спектрометрического анализа.

Данная работа проводилась в рамках ГПНИ «Фундаментальные основы биотехнологий» подпрограммы «Молекула и клетка» 2011–2013 гг. «Анализ содержания алкалоидов индольного ряда в растениях семейства *Arosynaceae* и разработка методов получения на их основе противоопухолевых лекарственных препаратов», а также при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований – грант БРФФИ 2013-2015 гг. «Антирадикальная и ДНК-протекторная активность индольных алкалоидов интродуцированных растений и культур *in vitro* *Vinca minor* L.»

Список литературы

1. Победимова, Е.Г. Сем. *Arosynaceae* / Е.Г. Победимова // Флора СССР / Е.Г. Победимова [и др.]; под ред. Б.К. Шишкина, Е.Г. Бобров. – М.–Л., 1952. – С. 646–652.
2. Alkaloids from *Vinca minor* / W. Opke [et al.] // Tetrahedron Letters. – 1968. – Vol. 58. – P. 6065–6066.
3. Регистрация лекарственных средств России / Г.А. Вышковский [и др.]; под общ. ред. Г.А. Вышковского. – 11-е изд. – М., 2004. – 195 с.
4. High performance liquid chromatographic determination of alkaloids from *Vinca minor* / B. Proksa [et al.] // Phytochemical Analysis. – 1991. – Vol. 2. – P. 74–76.
5. Кухарева, Л.В. Полезные травянистые растения природной флоры: Справочник по итогам интродукции в Белоруссии / Л.В. Кухарева, Г.В. Пашина. – Минск: Наука и техника, 1986. – 215 с.
6. Род *Vinca* L. (*Arosynaceae*) во флоре Беларуси. / Джус М.А. [и др.] // Украинский ботанический журнал. – 2009. – Т. 66, № 6. – С. 783–793.
7. Идентификация фармакологически активных веществ в экстрактах листьев барвинка малого (*Vinca minor* L.) / Молчан О.В. [и др.] // Труды БГУ. – 2008. – Т. 3, ч. 1. – С. 221–227.
8. Содержание винкамина и идентификация серпентин- и аймалицин-подобных соединений в интродуцированном в Беларуси Барвинке малом / С.Н. Ромашко [и др.] // Труды БГУ. – 2011. – Т. 6. – С. 62–69.
9. 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.

10. Symmetry C₁₈ column: a better choice for the analysis of indole alkaloids of *Catharanthus roseus* / G.C. Uniyal [et al.] // *Phytochemical Analysis*. – 2001. – Vol. 12. – P. 206–210.
11. Direct fluorometry of phase-extracted tryptamine-based fast quantitative assay of L-tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* leaf / R.S. Sangwan [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1998. – Vol. 255. – P. 39–46.
12. 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.
13. Шатило, Е.В. Влияние фитогормонов на транспорт Ca²⁺ через мембраны клеток суспензионной культуры *Catharanthus roseus* / Е.В. Шатило, О.В. Молчан // Сборник работ 69-ой научной конференции студентов и аспирантов БГУ 14–17 мая 2012 г. Минск. – Ч. I. – С. 54–57.
14. Muchling, K.H. Apoplastic and membrane-associated Ca²⁺ in leaves and roots as affected by boron deficiency. / K.H. Muchling, M. Wimmer, H.E. Goldbach // *Physiologia plantarum*. – 1998. – Vol. 102. – P. 179–184.
15. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
16. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures / L.E. Towill [et al.] // *Can. J. Bot.* – 1974. – Vol. 53. – P. 1097–1102.
17. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений; учеб.-метод. пособие / В.Ж. Цыренов [и др.]; под ред. С.Н. Балдаева. – Улан-Удэ, 2003. – 58 с.
18. Zhao, J. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. / J. Zhao, L.C. Davis, R. Verpoorte // *Biootechnology Advances*. – 2005. – Vol. 23. – P. 283–333.
19. 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.
20. Tryptophan decarboxylase from *Catharanthus roseus* is a pyridoxoquinoprotein / E.J.M. Pennings [et al.] // *FEBS Letters*. – 1989. – Vol. 255. – P. 97–100.
21. The beta-carboline hallucinogens of South America / R.E. Schultes [et al.] // *Journal of Psychoactive drug*. – 1982. – Vol. 14. – P. 205–219.
22. Effects of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line / A. Silvestrini [et al.] // *Plant Physiol. Biochem.* – 2002. – Vol. 40. – P. 749–753.
23. Gill, R. Over-expression of tryptophan decarboxylase gene in poplar and its possible role in resistance against *Malacosoma disstria* / R. Gill, B. Ellis // *New Forests*. – 2006. – Vol. 3. – P. 195–209.
24. Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice / S. Kang [et al.] // *Planta*. – 2007. – Vol. 227. – P. 263–272.
25. Skinner, N.J. Tryptophan decarboxylase, strictosidine synthase and alkaloid production by *Cinchona ledgeriana* cell suspension cultures / N.J. Skinner, R.J. Robins, M.J.C. Rhodes // *Phytochemistry*. – 1987. – Vol. 26. – P. 721–725.
26. El-Sayed, M. *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. *Phytochem* / M. El-Sayed, R. Verpoorte. // *Rev.* – 2007. – Vol. 6. – P. 277–305.
27. Sudha, G. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects / G. Sudha, G.A. Ravishankar // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2002. – Vol. 71. – P. 181–212.
28. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells / Z.M. Pei [et al.] // *Nature*. – 2000. – Vol. 406. – P. 731–734.
29. Swarbreck, S.M. Plant Calcium-Permeable Channels / S.M. Swarbreck, R. Colaco, J.M. Davies // *Plant Physiology*. – 2013. – Vol. 163. – P. 514–522