УДК 573.6.086.835

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, А.А. Булатова, А.О. Логвина

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

В настоящее время многие из промышленно важных соединений, используемых в фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности, выделяют из тканей возделываемых или дикорастущих растений, часто принадлежащих к редким видам. В связи с этим идет активный поиск новых альтернативных источников получения биологически активных веществ растительного происхождения. Одним из таких источников являются культуры клеток растений, преимущества использования которых для получения биологически активных веществ (БАВ) широко признаны в настоящее время. Культуры клеток и тканей, полученные *in vitro*, как и клетки интактного растения, могут синтезировать вторичные метаболиты (ВМ), имеющие большое практическое значение.

Широкий спектр биологической активности и «мягкость» действия являются основными преимуществами фармакологических препаратов из природного растительного сырья. На сегодняшний день из растений получают более трети всех лекарственных субстанций, используемых в медицинской практике. Структура многих из них настолько сложна, что растения еще долго будут их единственным источником [1]. Целебное действие лекарственных растений обусловлено присутствием в них биологически активных веществ, относящихся обычно к продуктам специализированного (вторичного) обмена [2]. В настоящее время известно более 100 000 ВМ, продуцируемых растениями. Многие из них являются практически важными продуктами. Однако в настоящее время в биосфере насчитывается 6 млн. индивидуальных химических соединений, которые тем или иным путем могут попадать и накапливаться в растениях [3]. Поэтому альтернативным источником получения экологически безопасных лекарственных субстанций является культура растительных клеток и тканей [4-5].

На кафедре физиологии и биохимии растений биологического факультета Белгосуниверситета к настоящему времени получены каллусные и суспензионные культуры лекарственных растений: эхинацеи пурпурной, шалфея лекарственного, расторопши пятнистой, сирени обыкновенной, каллизии душистой, пажитника греческого, катарантуса розового, барвинка малого и др.

Эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea)* хорошо известна как прекрасный иммуностимулятор. К основным классам БАВ данного растения относятся водорастворимые полисахариды, гидроксикоричные кислоты и их производные, флавоноиды и др. [6].

Среди фенольных соединений шалфея лекарственного (*Salvia officinalis*) доминируют фенолкарбоновые кислоты и их производные (хлорогеновая, розмариновая и др.), обладающие антиоксидантным, нейропротеторным, противирусным, гепатопротекторным действиями [7].

Расторопша пятнистая *(Sylibum marianum)* обладает выраженными гепатопротекторными свойствами благодаря высокому содержанию флаволигнанов (силибина, силикристина, силидианина) – уникальных соединений группы фенилпропаноидов [8].

Сирень обыкновенная *(Syringa vulgaris)* также содержит разнообразные соединения, обладающие адаптогенными, иммуномодулирующими и противораковыми свойствами, которые уже многие годы привлекают внимание различных исследователей [9].

Лечебные свойства каллизии душистой *(Callisia fragrans)* объясняются наличием в химическом составе этого растения биологически активных веществ из группы флавоноидов (кверцетин и кемпферол) и растительных стероидов. В соке найдены витамины С, РР, B_{12} и микроэлементы Fe, Cr, Ni, Cu. Каллизию используют для лечения ожогов, туберкулеза, артрита, бронхиальной астмы, бесплодия, кожных онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний. Препараты, приготовленные из листьев и побегов каллизии душистой, подавляют патогенную микрофлору в кишечнике, облегчают боль, восстанавливают функцию поджелудочной железы, селезенки, устраняют воспаление [10].

Пажитник греческий *(Trigonella foenum-graecum)* как лекарственное растение включено в ряд европейских и других фармакопей. Официально признано, что экстракты семян обладают антиоксидантным, противовоспалительным, антихолестериновым, антианемическим, антидиабетическим и другими терапевтическими эффектами. Фитохимические исследования семян свидетельствуют о присутствии в них алкалоида тригонеллина, стероидных сапогенинов, таких как диосгенин, ямогенин, гитогенин и др. [11], флавоноидов (витексина, ориентина, изоветиксина, лютеолина, кемпферола, кверцетина) [12].

Из различных частей растения катарантуса розового (или барвинка розового) *(Catharanthus roseus)* выделяют более 100 алкалоидов, производных индола. Особый интерес представляют алкалоиды винбластин, винкристин, катарантин, аймалицин, виндолин, которые широко используются для комплексной терапии некоторых форм онкологических заболеваний и лечении диабета. Некоторые алкалоиды, содержащиеся в данном растении (например, резерпин, серпентин), являются транквилизаторами. Кроме алкалоидов в различных тканях катарантуса присутствуют стероиды, фенольные соединения, антоцианы, жирные кислоты и другие метаболиты, обеспечивающие антиоксидантные и противовоспалительные эффекты [13].

Барвинок малый *(Vinca minor)* является менее изученным по сравнению с катарантусом розовым. Однако в его составе также обнаружены алкалоиды индольного ряда, флавоноиды, стероиды, органические кислоты и др. соединения. Препараты барвинка малого понижают артериальное давление, расширяют венечные сосуды сердца и сосуды головного мозга. Основной алкалоид растения – винкамин – улучшает мозговое кровообращение и утилизацию кислорода тканями мозга. Лекарственные препараты, содержащие сумму алкалоидов барвинка, применяют при спазмах сосудов мозга, гипертонической болезни, неврогенной тахикардии, головных болях различного происхождения, а также при депрессивных состояниях [14].

Таким образом, представленные виды лекарственных растений характеризуются разнообразием фармакологических эффектов и содержат различающиеся по химической структуре и физико-химическим свойствам группы вторичных метаболитов. Поскольку большинство из них не имеют естественных ареалов произрастания на территории Беларуси, то большой практический интерес представляет возможность их культивирования в искусственных условиях *in vitro*.

Методика получения каллусных и суспензионных культур

В наших экспериментах при культивировании растительных объектов *in vitro* в качестве основы использовалась среда Мурасиге и Скуга [15], которая дает хорошие результаты при каллусообразовании и эффективно поддерживает рост клеточных культур большинства двудольных растений. Вариации касались содержания представителей двух групп регуляторов роста – ауксинов и цитокининов, присутствие которых абсолютно необходимо для индукции дедифференциаиции и каллусогенеза. В качестве ауксинов для получения и поддержания культур тканей использовалась β-индолил-3-уксусная кислота (ИУК), α-нафтилуксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). В

качестве источников цитокининов в питательных средах использовали кинетин и 6-бензиламинопурин (БАП).

Технология получения каллусной и суспензионной культур сводится к следующему. На первом этапе производится выбор эксплантов. Наиболее пригодный материал для получения каллусов дает проращивание простерилизованных семян в асептических условиях. Поэтому источником эксплантов при введении в культуру *in vitro* таких лекарственных растений как эхинацея пурпурная, шалфей лекарственный, расторопша пятнистая, катарантус розовый служили асептически выращенные 3-4 недельные их проростки. Для стандартизации полученных результатов по всем исследуемым культурам в данной работе приводятся материалы, относящиеся к каллусу листового происхождения.

Ввиду отсутствия семян при получении каллусных культур каллизии душистой и барвинка малого использовали процедуру стерилизации листовых эксплантов дезинфицирующим средством *Domestos* с последующим трех-четырехкратным их промыванием стерильной водой.

Несмотря на то, что каллусные клетки представляют собой основной объект при длительном культивировании *in vitro,* биотехнологическое получение экономически важных фармакологически активных веществ в настоящее время основано на суспензионной культуре. Это связано с тем, что она характеризуется более высокой скоростью роста, более широкими возможностями для изучения влияния экзогенных факторов на метаболизм и рост клеток, а также простотой процедуры субкультивирования, что позволяет осуществлять технологический процесс на основе использования биореакторов [16].

Для получения первичной суспензии эхинацеи пурпурной, шалфея лекарственного, сирени обыкновенной, каллизии душистой, катарантуса розового использовали стандартную методику: 7-10 г свежей массы каллусной ткани переносили в жидкие питательные среды объемом 150-200 мл. Колбы помещали на круговые качалки, скорость вращения которых составляла 110–120 об/мин. Для избавления от крупных остатков каллуса первичную суспензию фильтровали через металлические сита. Культивирование каллусных и суспензионных культур осуществлялось либо в темноте в условиях микробиологического термостата при температуре (24±1)°С, либо на свету при искусственном освещении люминесцентными лампами ЛБ-20 (освещенность 3000 лк) с чередованием 14-часового светового и 10-часового темнового периодов при температуре (22±2)°С

Данные культуры использованы для получения экстрактов и идентификации физиологически активных соединений спектрофотометрическим, флуориметрическим и ВЭЖХ методами (табл. 1).

Таблица 1 – Исследуемые фармакологически активные соединения в клеточных культурах

Объект	Тип культуры	Анализируемые ВМ	Метод анализа
Эхинацея пурпурная	Каллусная Суспензионная	Гидроксикоричные кислоты	Спектрофотометрический
Шалфей лекарственный	Каллусная Суспензионная	Фенолкарбоновые кислоты	Спектрофотометрический
Сирень обыкновенная	Каллусная Суспензионная	Фенольные соединения	Спектрофотометрический ВЭЖХ
Катарантус розовый	Каллусная Суспензионная	Алкалоиды	ВЭЖХ Флуориметрический
Барвинок малый	Каллусная	Алкалоиды	ВЭЖХ Флуориметрический
Расторопша пятнистая	Каллусная	Флаволигнаны	Спектрофотометрический

С целью изучения биосинтеза алкалоидов индольного ряда в клеточных культурах катарантуса розового производили определение активности триптофан декарбоксилазы (ТДК). Для этого свежий каллус гомогенизировали в среде, содержащей 100 мМ фосфата натрия (pH 7,5), 5мМ β-меркаптоэтанола, 5мМ тиомочевины, 100 мг/г поливинилпирролидона. Гомогенат центрифугировали при 10 000 g в течение 30 мин, супернатант использовали для определения активности фермента. Все процедуры проводили при 4°С. Активность ТДК определяли методом, описанным в работе [17]. Реакцию запускали внесением 100 мкл супернатанта, содержащего 100 мкг белка, а останавливали добавлением 2,0 мл 4 М NaOH. Триптамин экстрагировали 3,5 мл этилацетата. Содержание триптамина в экстракте определяли флуориметрически.

Результаты и обсуждение

Для эхинацеи пурпурной наиболее интенсивное формирование каллусов наблюдалось в присутствии 0,5 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л кинетина, для шалфея лекарственного – 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина. Самые высокие значения эффективности каллусогенеза у листовых эксплантов пажитника греческого отмечались под влиянием 1,0 мг/л 2,4-Д и 1,0 мг/л кинетина. Увеличение содержания 2,4-Д в среде до 2,0 мг/л существенно ингибировало процессы дедифференциации и каллусогенеза у данного растения. Сходные результаты были получены при изучении индукции каллусогенеза у листовых эксплантов расторопши пятнистой.

При получении каллусных клеток катарантуса розового ткани листа помещали на искусственную среду, также содержащую ауксины и цитокинины в различных соотношениях. В качестве ауксинов использовали 1 мг/л 2,4-Д и 0,5-1 мг/л НУК. Цитокининами служили кинетин в концентрациях 0,1-1,5 мг/л и 1 мг/л БАП. В ходе экспериментов было установлено, что наиболее оптимальной является среда, включающая 1 мг/л НУК и 0,1-0,5 мг/л кинетина. Данная комбинация регуляторов роста позволяет получить в течение нескольких месяцев довольно рыхлый, оводненный каллус, что немаловажно для последующей инициации суспензионной культуры. Замена НУК на 2,4-Д приводило к ингибированию каллусогенеза, а включение в качестве цитокинина БАП – к формированию очень плотных каллусных структур.

При инициации каллусогенеза у листовых эксплантов барвинка малого был установлено, что при уменьшении в среде культивирования содержания НУК или замене НУК на 2,4-Д снижается как интенсивность каллусогенеза, так и накопление биомассы каллусной культурой**.**

Наиболее важной характеристикой популяции является ее рост. В процессе культивирования каллусов каллизии душистой на четырех вариантах питательных сред, различающихся по содержания 2,4-Д и кинетина, были обнаружены значительные различия в интенсивности ростовых процессов. Установлено, что наиболее оптимальным среди протестированных питательных сред является вариант с содержанием 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л кинетина. Низкие значения индекса роста и удельной скорости роста характерны для каллусной культуры каллизии душистой, культивируемой на варианте 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л кинетина. Анализ полученных результатов позволяет заключить, что оптимальным для роста каллусной культуры является вариант среды, в котором соотношение гормонов 2,4-Д и кинетина равно 10:1. Уменьшение соотношения данных фитогормонов в среде приводило к снижению ростовых показателей.

Обычно растительные клетки *in vitro* проходят фазы ростового цикла, аналогичные для роста клеток высших растений *in vivo*. При этом на каждой стадии они имеют характерные морфологические и физиолого-биохимические особенности, в частности, различаются по способности к синтезу вторичных метаболитов. В связи с этим были получены кривые роста всех исследуемых каллусных культур; примеры приведены на рис. 1.

Полученные закономерности протекания ростовых процессов были использованы в дальнейшем при анализе характера взаимосвязи между ростовой активностью и

накоплением конкретных фармакологически активных соединений в каллусных культурах.

Анализ динамики прироста биомассы суспензионных культур эхинацеи пурпурной, шалфея лекарственного, сирени обыкновенной и др. показал, что в отличие от каллусных культур продолжительность их ростовых циклов составляет не более 10-14 сут (рис. 2). Это обеспечивает гораздо более эффективное накопление клеточной биомассы по сравнению с каллусами.

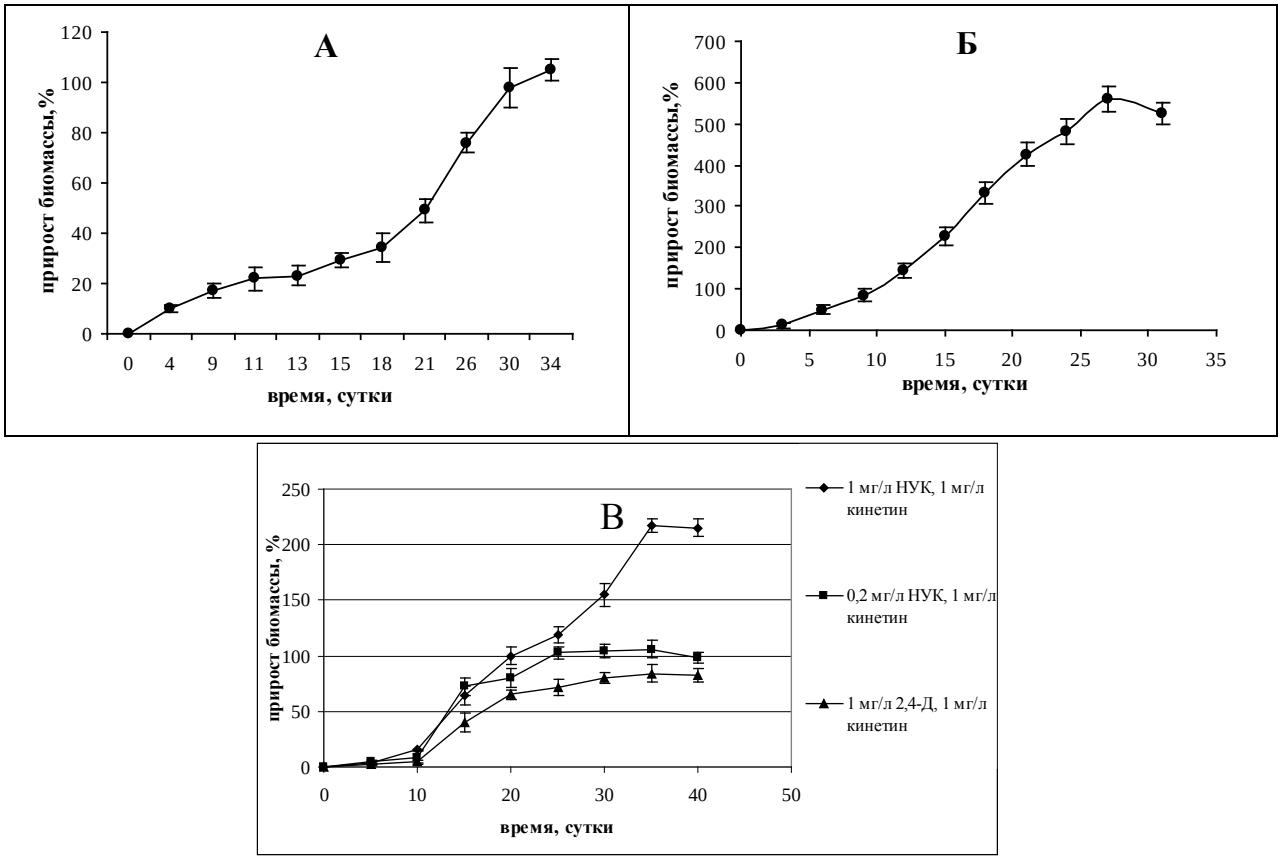


Рисунок 1 - Кривые роста каллусных культур пажитника греческого (А), шалфея лекарственного (Б) и барвинка малого (В)

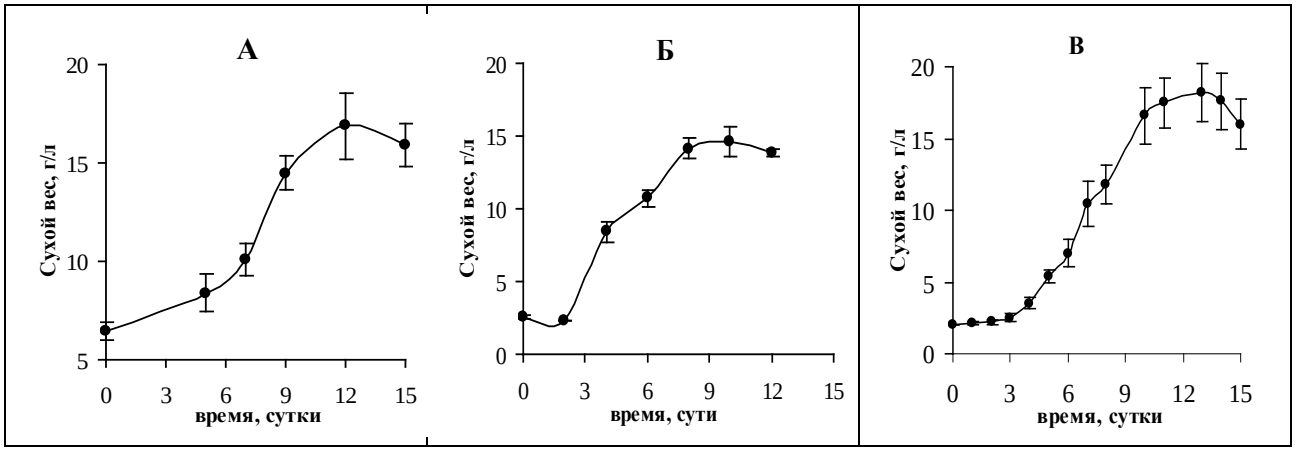


Рисунок 2 - Кривые роста суспензионной культуры эхинацеи пурпурной (А), шалфея лекарственного (Б), сирени обыкновенной (В)

Таким образом, получены стабильно растущие каллусные ткани и клеточные суспензии лекарственных растений, являющихся ценными источниками различных фармакологически активных веществ.

Анализ литературных данных [18-19], а также результаты определения содержания ВМ в исследуемых культурах клеток и тканей лекарственных растений показал необходимость разработки дополнительных приемов, позволяющих целенаправленно повысить уровни их накопления.

Наиболее простым и часто применяемым подходом для повышения синтеза фармакологически активных субстанций в клеточных культурах является изменение ***состава питательных сред***. Среди компонентов культуральных сред, эффективно регулирующих образование ВМ в культурах растительных клеток, следует отметить фитогормоны, углеводы и макроэлементы (такие, как азот и фосфор) и др.

Применение *гормональных эффекторов* в большинстве случаев позволяет значительно увеличить образование вторичных соединений в культуре клеток, однако в каждом случае необходим поиск оптимальных условий. Показано, что действие фитогормонов специфично (зависит от вида растения, природы вторичного соединения, клеточного штамма и т.д.) Поэтому результаты экспериментов по влиянию фитогормонов на синтез ВМ крайне противоречивы [18].

Широко применяемым ауксином является 2,4-Д, способный стимулировать как деление, так и растяжение клеток. Однако он может вызывать резкое подавление синтеза продуктов вторичного метаболизма. Действительно, на примере каллусной культуры шалфея лекарственного было установлено, что повышение концентрации 2,4-Д в питательной среде сопровождается более активным приростом клеточной биомассы и снижением уровня фенолкарбоновых кислот (рис. 3).

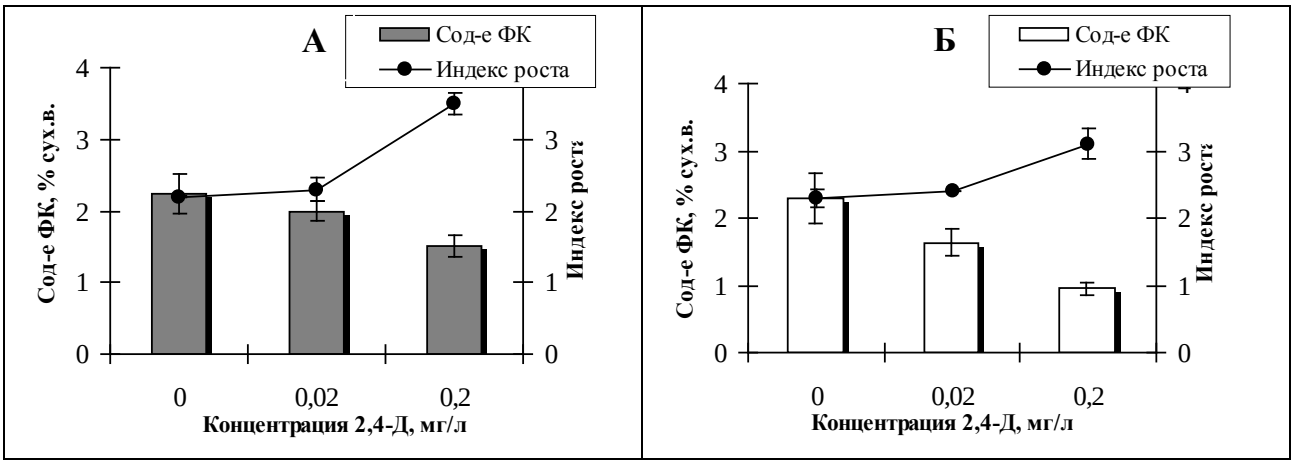


Рисунок 3 - Влияние концентрации 2,4-Д в питательной среде на прирост биомассы и содержание фенолкарбоновых кислот в каллусах шалфея лекарственного, культивируемых в темноте (А) и на свету (Б)

Напротив, включение в состав питательной среды НУК в качестве ауксина в концентрациях от 0,2 до 1,0 мг/л способствовало значительному возрастанию содержания фенолкарбоновых кислот в исследуемой каллусной культуре.

Установленные особенности в характере влияния 2,4-Д и НУК, вероятно, обусловлены различиями не только в степени активности данных соединений, но и связаны со способностью индуцировать процессы клеточной дифференцировки. Еще в опытах Гамбурга [1] было показано, что НУК практически на порядок менее активна, чем 2,4-Д в поддержании роста изолированных культур тканей табака и сои. В отличие от НУК именно 2,4-Д в большинстве случаев используется для получения клеточных культур и поддержания их активного роста, поскольку способствует переходу клеток экспланта в дедифференцированное состояние. Присутствие данного регулятора в питательной среде обеспечивает стабильный рост клеточных культур, но вместе с тем вызывает подавление активности многих ферментов, участвующих в синтезе ВМ. Можно

предположить, что положительный эффект НУК на продукцию фенолкарбоновых кислот каллусной культурой шалфея лекарственного связан не только с замедлением скорости ростовых процессов, но и с индукцией процессов цитодифференцировки. Таким образом, во многих случаях 2,4-Д лишь поддерживает пролиферацию клеток *in vitro,* а для начала синтеза ВМ требуется присутствие в питательной среде других ауксинов – НУК либо ИУК, которые способны запускать процессы клеточной дифференцировки [20].

Поскольку содержание практически важных соединений в высших растениях часто определяется активностью синтеза и уровнем накопления их предшественников, в экстрактах исследуемых каллусных линий растений семейства *Apocynaceae* на стационарной фазе ростового цикла было определено содержание L-триптофана. L-триптофан является первичным предшественником всех индольных алкалоидов, в том числе и основных алкалоидов барвинка малого и катарантуса розового. Как видно на рис. 4, наибольшее содержание L-триптофана отмечается в экстрактах каллуса, культивируемого на среде, содержащей 1 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК. В экстрактах каллуса, культивируемого на среде с пониженным содержанием НУК, L-триптофана было меньше на 15%, а на среде, содержащей 2,4-Д – на 20% (рис. 4). Таким образом, уменьшение содержания НУК в среде культивирования, и замена НУК на 2,4-Д приводит и к уменьшению накопления биомассы, и к снижению содержания L-триптофана.

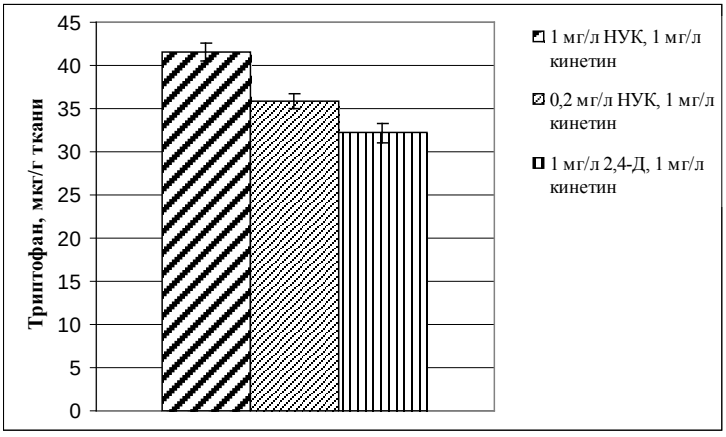


Рисунок 4 - Содержание триптофана в экстрактах каллусной ткани барвинка малого

При снижении накопления биомассы почти в 2 раза (см. рис 1В), происходит уменьшение содержания L-триптофана только на 15-20%. Возможно, это связано с тем, что аминокислота L-триптофан не является незаменимой для растений и снижение концентрации ауксина в среде не затрагивает шикиматный путь биосинтеза ароматических аминокислот. С другой стороны, из L-триптофана синтезируется эндогенный ауксин – индолилуксусная кислота, и при снижении содержания в среде экзогенного ауксина включаются дополнительные механизмы регуляции биосинтеза ИУК.

На первой стадии биосинтеза всех алкалоидов индольного ряда происходит превращение L-триптофана в триптамин, катализируемое пиридоксальзависимым ферментом – триптофан декарбоксилазой. Было определено содержание триптамина в каллусной ткани барвинка малого (рис. 5). Оказалось, что содержание триптамина гораздо выше (в 3-5 раз) в клетках каллуса, культивируемого на среде, содержащей 1 мг/л НУК. При культивировании каллуса на среде, включающей 0,2 мг/л НУК, содержание

триптамина было наименьшим (рис. 5). Таким образом, уменьшение содержания НУК в среде культивирования и замена НУК на 2,4-Д в большей степени снижают накопление триптамина, чем содержание триптофана. Последнее может свидетельствовать об ингибировании активности ТДК. И возможно, что таким образом L-триптофан не включается в дальнейшие пути биосинтеза вторичных метаболитов и накапливается в тканях каллуса.

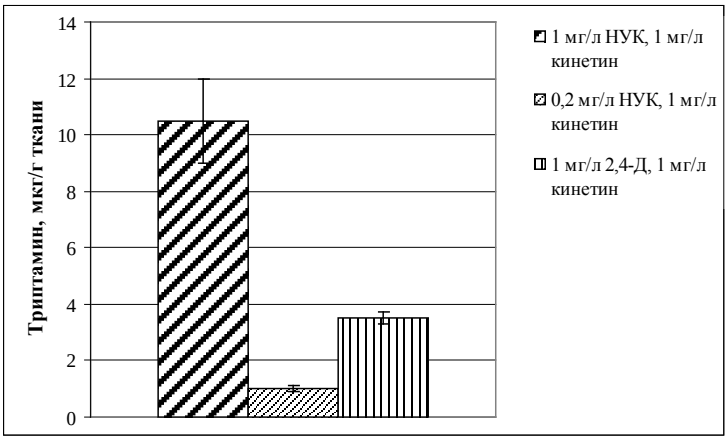


Рисунок 5 - Содержание триптамина в экстрактах каллусной ткани барвинка малого

Следующий этап биосинтеза терпеноидных алкалоидов заключается в конденсации триптамина с циклическим альдегидом секологанином с последующим образованием стриктозидина. Оказалось, что только в каллусной ткани, культивируемой на среде, содержащей 1 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК возможна идентификация секологанина. Во всех исследованных каллусных линиях барвинка малого содержание конечного продукта биосинтеза алкалоидов индольного ряда – винкамина – было ниже предела определения (табл. 2).

Таблица 2 – Содержание секологанина, винкамина и аналога винкамина в каллусной культуре барвинка малого в зависимости от типа и содержания ауксинов в среде

Среда	Секологанин, 0,8 мин, отн.ед	Винкамин	Аналог винкамина, 3,4 мин, отн. ед
1 мг/л НУК, 1 мг/л кинетин	450	ниже предела определения	1357
0,2 мг/л НУК, 1 мг/л кинетин	ниже предела определения	ниже предела определения	ниже предела определения
1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л кинетин	ниже предела определения	ниже предела определения	ниже предела определения

Однако в клетках каллуса, культивируемого на среде, содержащей 1 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК, был обнаружен аналог, либо предшественник винкамина (см. табл. 2). Данное вещество характеризовалось спектром поглощения, идентичным спектру поглощения винкамина, но отличалось по времени удержания. Обнаружение аналога винкамина может свидетельствовать о более высоком уровне биосинтеза индольных алкалоидов в клетках данной каллусной линии. В каллусных тканях двух других исследуемых линий данное вещество не обнаружено.

В связи с предполагаемым ингибированием активности ТДК на примере катарантуса розового было изучено влияние кинетина и ауксинов (НУК и 2,4-Д) на ее активность. По результатам исследований было установлено, что увеличение концентрации кинетина в

присутствии 1 мг/л НУК в среде инкубации приводит к существенному снижению активности ТДК (рис. 6).

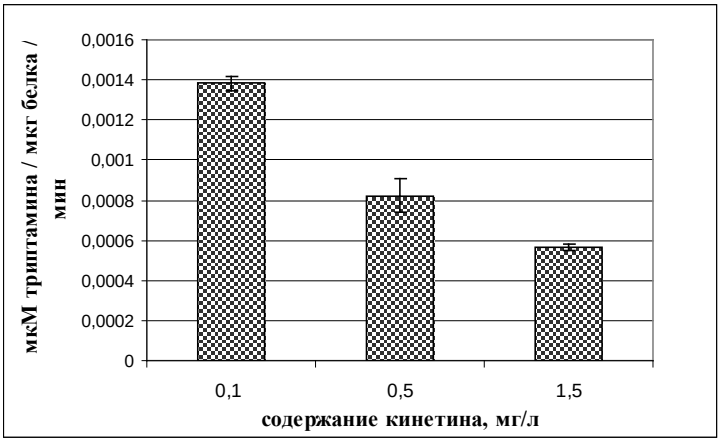


Рисунок 6 - Влияние содержания кинетина в среде культивирования на активность ТДК в каллусной ткани катарантуса розового

Замена же в среде инкубации НУК на 2,4-Д не приводила к существенным различиям в активности ТДК (рис. 7).

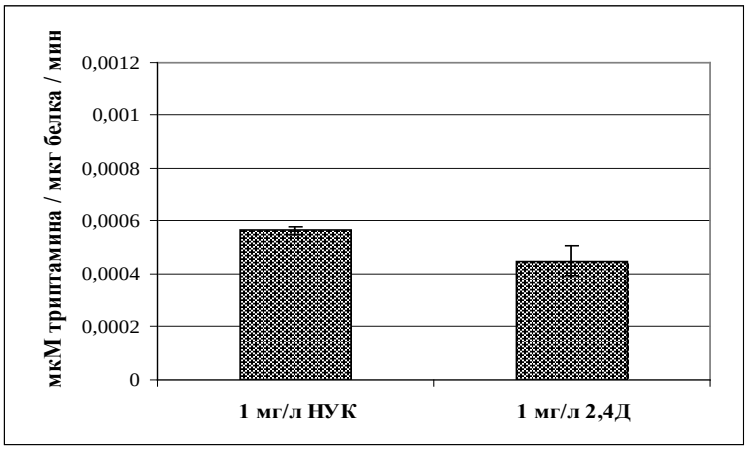


Рисунок 7 - Активность ТДК в в каллусной ткани катарантуса розового в присутствие в среде инкубации синтетических ауксинов

На синтез ВМ оказывают влияние и другие компоненты питательной среды. Увеличение выхода ВМ во многих случаях наблюдается при повышении концентрации *углеводов*, в частности, сахарозы. Так, увеличение содержания сахарозы в питательной среде до 8% приводило как к увеличению сухого веса суспензионной культуры катарануса розового, так и к существенному возрастанию содержания серпентина [21]. Стимулирующий эффект сахарозы может быть связан с увеличением продолжительности стационарной фазы ростового цикла, ингибированием синтеза эндогенных ауксинов, увеличением активности ферментов пентозофосфатного пути [18]. Конкурировать с сахарозой может и глюкоза, которая для некоторых культур обеспечивает более высокие скорости прироста биомассы и накопление продуктов вторичного метаболизма.

Для каллусной культуры шалфея лекарственного не было выявлено стимулирующего эффекта глюкозы в концентрациях 2-5% на продукцию фенолкарбоновых кислот, однако обнаружено возрастание как скорости ростовых процессов, так и уровня анализируемых ВМ при совместном использовании 2% сахарозы и 2% глюкозы (рис. 8), что может быть использовано в качестве одного из приемов при создании продукционных сред для данного объекта.

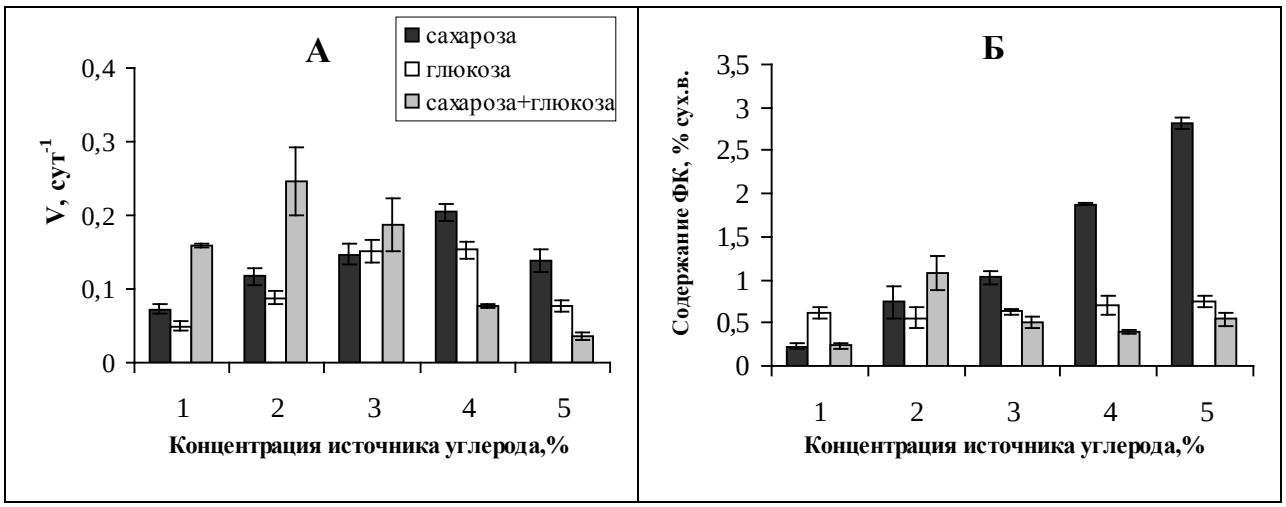


Рисунок 8 - Влияние концентрации углеводов в питательной среде на удельную скорость роста (А) каллусной культуры шалфея лекарственного и содержание в ней фенолкарбоновых кислот (Б)

Среди других компонентов питательных сред воздействие на накопление ВМ могут оказывать *источники азота и фосфора*. Характер их влияния значительно различается в зависимости от вида растения и синтезируемого соединения. Высокое содержание нитратов, ионов аммония, фосфатов способствует быстрому росту клеток, тогда как истощение среды по этим макроэлементам значительно активизирует процессы вторичного метаболизма. Действительно, уменьшение в 2 раза содержания фосфора, и азота и фосфора в среде вызывало увеличение содержания фенольных веществ в каллусной культуре сирени в экспоненциальную фазу роста (рис. 9). На стационарной фазе роста количество фенольных соединений было выше, чем в контроле только в варианте с вдвое уменьшенным содержанием фосфора в среде. Отсутствие азота практически не влияло на накопление фенольных соединений.

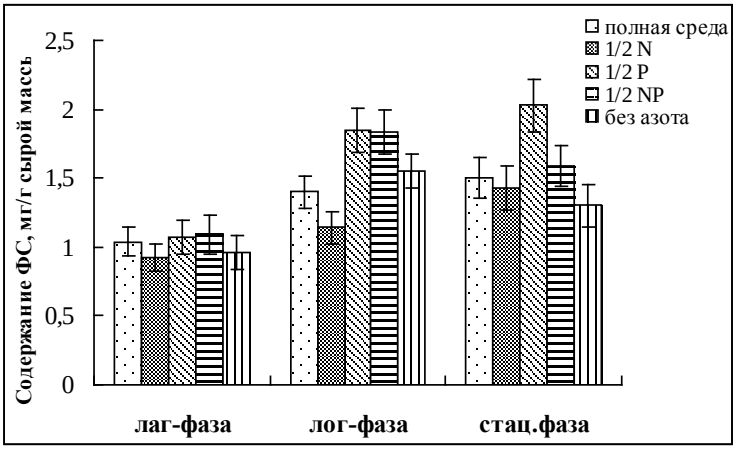


Рисунок 9 - Влияние содержания азота и фосфора в среде на концентрацию фенольных соединений (ФС) в каллусной культуре сирени

Уменьшение концентрации азота и фосфора в среде вызывало торможение роста (рис. 10). Индексы роста для каллусной культуры сирени, выращиваемой на вариантах сред с различным содержанием минерального азота и фосфора, в стационарную фазу в среднем составили: контроль – 3,7; 1/2 азота – 2,9; 1/2 фосфора – 1,5; 1/2 азота и фосфора – 1,6 и среда без азота – 0,7. Как видно из полученных данных максимальное подавление роста культуры сирени происходило на среде без азота и минимальное на среде с пониженным содержанием данного минерального элемента.

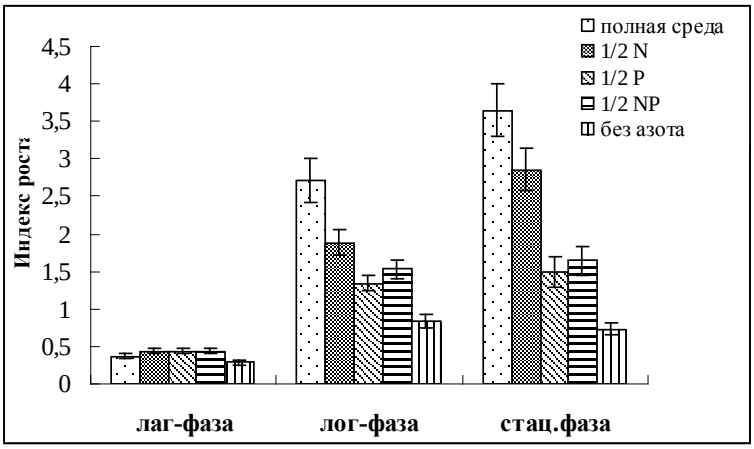
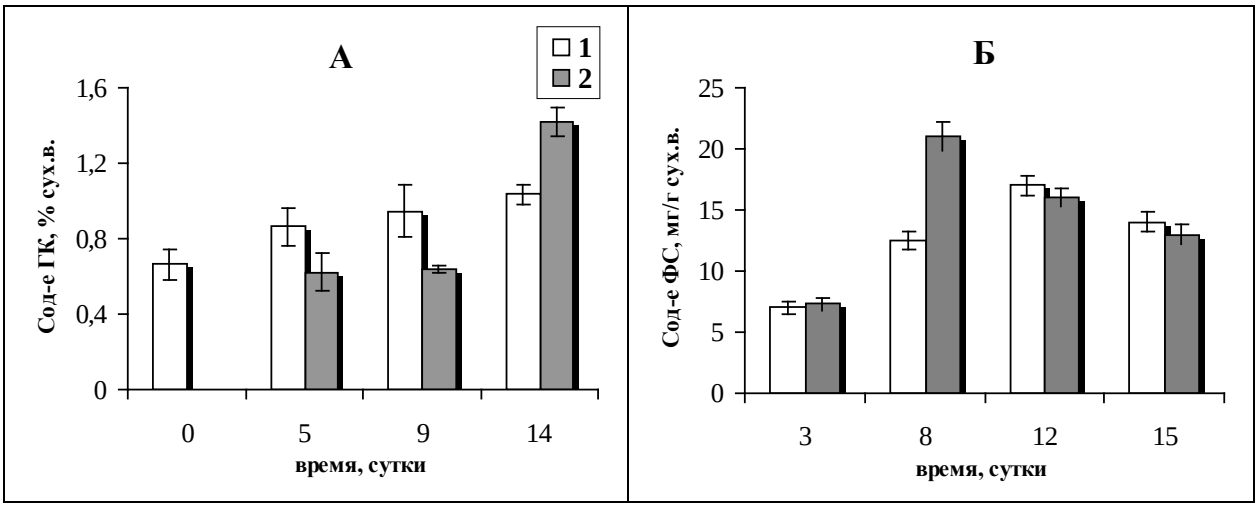


Рисунок 10 - Влияние содержания азота и фосфора в среде на индекс роста каллусной культуры сирени

Таким образом, установленные закономерности накопления фенольных соединений и прироста биомассы каллусной культуры сирени обыкновенной могут быть использованы при оптимизации питательных сред для получения лекарственных субстанций.

В регуляции синтеза ВМ важную роль играют *элиситоры* [22]. В наших исследованиях в качестве элиситоров использовались полисахаридные носители. Согласно полученным данным содержание гидроксикоричных кислот в инкапсулированных в альгинатном геле клетках суспензионной культуры эхинацеи пурпурной было в 1,4 раза выше по сравнению со свободными клетками на 14-е сут культивирования. Для суспензионной культуры сирени обыкновенной аналогичная стимуляция накопления фенольных соединений отмечалась на 8-е сутки (рис. 11).



1 – свободные клетки, 2 – инкапсулированные в альгинатном геле.

Рисунок 11 - Влияние полисахаридного носителя на содержание в клетках суспензионной культуры эхинацеи пурпурной гидроксикоричных кислот (А) и фенольных соединений (Б) в сирени обыкновенной.

В качестве приема для увеличения уровней накопления искомых метаболитов можно использовать ***физические факторы***, к которым относятся свет, температура, аэрация и др. Стимулирующее действие света на образование ВМ в культурах клеток показано на примере каротиноидов, эфирных масел, флавоноидов, пластохинонов, антоцианов, катехинов, алкалоидов, витаминов. Свет активировал

ферменты фенольного метаболизма, не влияя при этом на ферменты углеводного и липидного обмена [19].

Нами было проанализировано влияние *света* на активность ТДК и выявлено повышение активности данного фермента в каллусной ткани катарантуса розового, культивируемой при освещении по сравнению с каллусами, выращиваемыми в темноте (рис. 12).

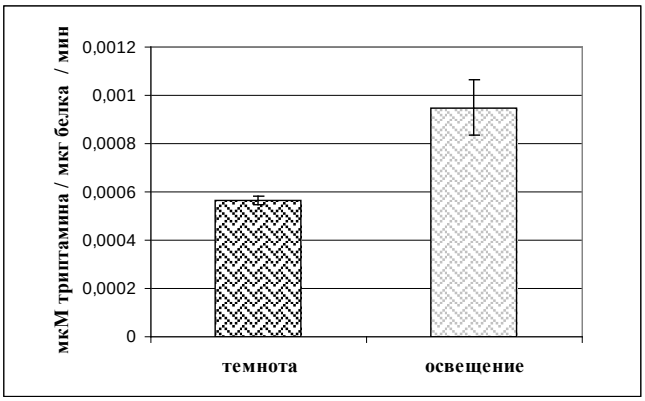


Рисунок 12 - Влияние света на активность ТДК в каллусной ткани катарантуса розового

Данных о влиянии *температуры* на рост и биосинтез ВМ в клеточных культурах очень мало. Работы в этом направлении весьма желательны, поскольку температурные оптимумы для роста культуры клеток и образования продуктов вторичного метаболизма не всегда совпадают. Исследования ростовой и биосинтетической активности клеток каллусной культуры эхинацеи пурпурной при варьировании температуры от 18ºС до 33ºС показали, что оптимальными для роста каллусов являются температуры 24-27ºС, тогда как для накопления гидроксикоричных кислот – 21°С (рис. 13).

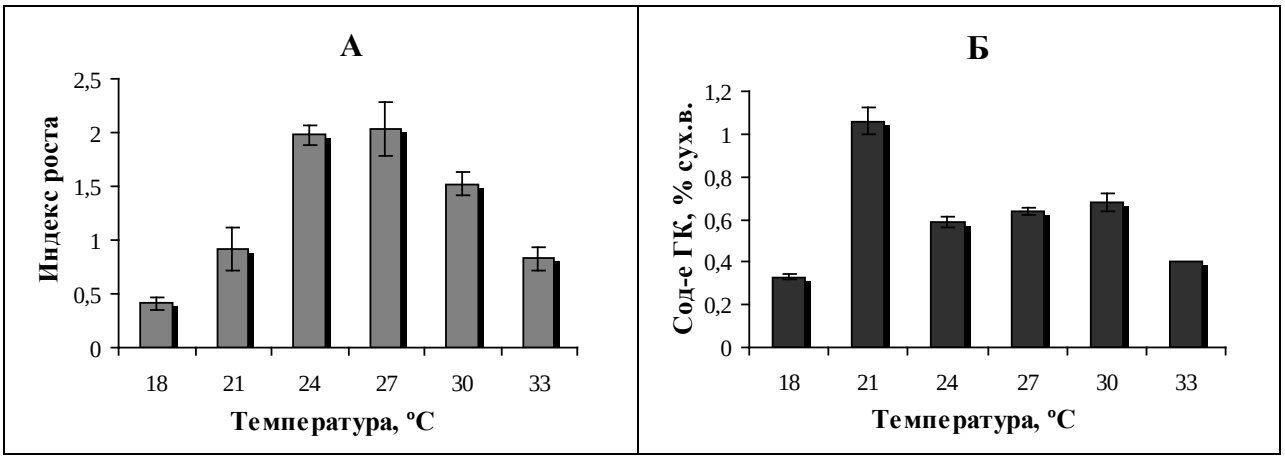


Рисунок. 13 - Зависимость прироста биомассы (А) и содержания гидроксикоричных кислот (Б) в каллусах эхинацеи пурпурной от температурных условий культивирования

Выявленные особенности могут быть использованы при разработке режимов выращивания клеточных культур эхинацеи пурпурной. Для одностадийных процессов целесообразно поддержание температуры 27°С. Использование пониженной температуры (21°С) для стимуляции накопления гидроксикоричных кислот может быть оправданным только при двустадийном культивировании, т.е. после того, как достигнуты достаточно высокие уровни накопления биомассы.

В случае каллусной культуры шалфея лекарственного на всех стадиях ростового цикла оптимальной для роста каллусов являлась температура 24°С. Как повышение, так и понижение температуры приводило к заметному замедлению ростовых процессов.

Стимуляция накопления фенолкарбоновых кислот в каллусах шалфея в наибольшей степени проявлялась при снижении температуры до 18°С. Данный эффект был особенно выражен в логарифмическую фазу, в ходе которой клетки характеризуются максимальной активностью метаболических процессов, необходимых для поддержания процессов деления и роста клеток (рис. 14).

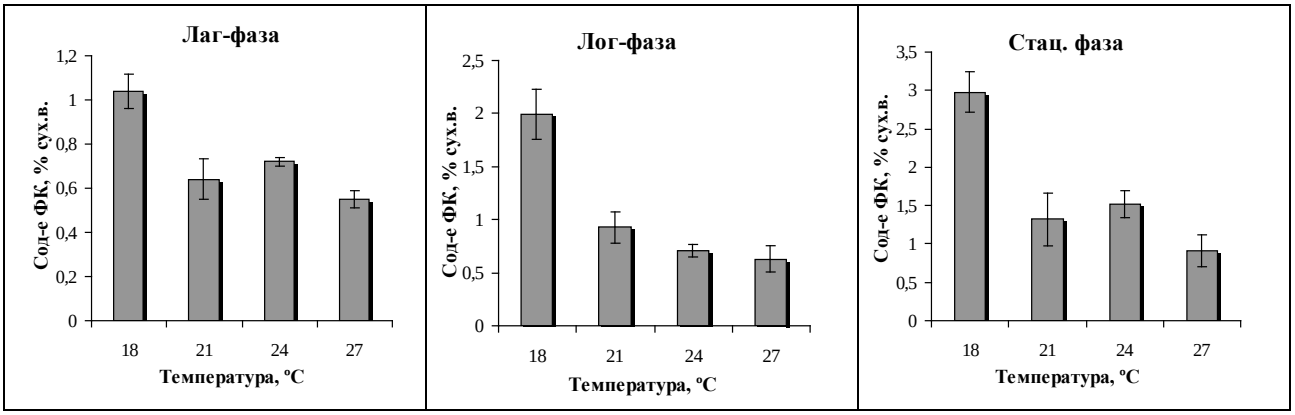


Рисунок 14 - Влияние температуры на содержание фенолкарбоновых кислот в каллусах
шалфея лекарственного на отдельных стадиях ростового цикла

Оригинальным приемом экзогенного физического воздействия явилось воздействие слабыми дозами *электрического тока* на каллусную культуру катарантуса розового. Учитывая роль кальция как вторичного мессенджера, эксперименты проводились как в присутствии, так и отсутствии кальция в среде. Было установлено, что содержание триптамина в ткани каллуса под влиянием электрического тока возрастает почти в 1,5 раза (рис. 15А), что, вероятно, связано со стимуляцией активности фермента, катализирующего превращение триптофана в триптамин в период влияния электрического тока. Спустя сутки после воздействия, активность ТДК не имела различий с контролем (см. рис. 15Б).

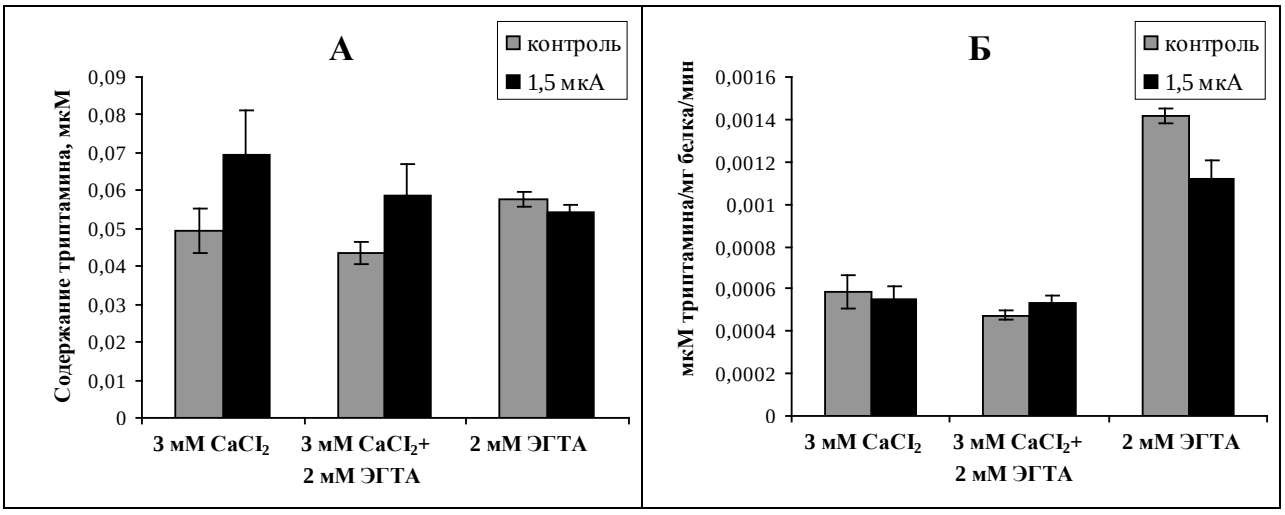


Рисунок 15 - Влияние электрического тока и ионов кальция в среде на содержание триптамина в каллусной ткани катарантуса розового (А) и активность ТДК (Б)

Добавление в среду культивирования кальциевого хелатора ЭГТА не приводило к существенным изменениям в уровне триптамина. Только полное исключение кальция из среды инкубации вызывало подавление влияния электрического тока на уровень триптамина и, с другой стороны, значительное повышение активности фермента. Данные результаты позволяют заключить, что под влиянием электрического тока происходит

стимуляция биосинтеза триптамина – первичного интермедиата биосинтетического пути образования алкалоидов.

В целом следует отметить, что накопление клетками продуктов вторичного метаболизма является результатом динамического равновесия между биосинтетическим, биотрансформационным и биодеградационным процессами. Влияние внешних и внутренних факторов на каждый из этих процессов имеет сложный характер. Тем не менее, использование эмпирического подхода позволило нам выявить регуляторные факторы, способствующие повышению биосинтетической активности каллусных и суспензионных культур.

Список литературы

1. Валиханова, Г.Ж. Биотехнология растений / Г.Ж. Валиханова // Алматы: «Конжык», 1996. – 272 с.
2. Barz W, Ellis B. Potential of plant cell cultures for pharmaceutical production / W. Barz, B. Ellis // In: Beal J.L., Reinhard E. (eds.) Natural Products as Medicinal Agents. Stuttgart, Hippokrates. – 1981. – P. 471–507.
3. Бабикова, А.В. Растение как объект биотехнологии / А.В. Бабикова, Т.Ю. Горпеченко, Ю.Н. Журавлев // Комаровские чтения. – 2007. – Вып. LV. – С. 184-211.
4. Mulabagal, V. Plant Cell Cultures – An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites / V. Mulabal, H-S Tsay // International Journal of Applied Science and Engineering. – 2004. – Vol. 2. – P. 29–48.
5. Юрин, В.М. Основы ксенобиологии. Учебное пособие / В.М. Юрин // Минск: ООО “Новое знание”, 2002. – 267 с.
6. Самородов, В.Н. Фитохимический состав представителей рода *Echinacea* Moench. и его фармакологические свойства / В.Н. Самородов, С.В. Поспелов, Г.Ф. Моисеева, А.В. Середа // Химико-фармацевтический журнал. – 1996. – № 4. – С. 32–37.
7. Then, M. Polyphenol-, mineral element content and total antioxidant power of sage (*Salvia officinalis* L.) extracts / M. Then, R. Szollosy, K. Vasarhelyi-Peredi, K. Szentmihalyi // Acta Horticulturae: XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants. – 2004. – P. 123-129.
8. Куркин, В.А. Расторопша пятнистая – источник лекарственных средств / В.А. Куркин // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Том 37. – №4.
9. Куркин, В.А. Фенилпропаноиды из лекарственных растений: распространение, классификация, структурный анализ и биологическая активность / В.А. Куркин // Химия природных соединений. – 2003. – №2. – С. 123-153.
10. Полевая, М.А. Золотой ус или Домашний женьшень / М.А. Полевая // Москва: Весь, 2008. – 128 с.
11. Dawidar, A.M. Steroid sapogenin constituents of fenugreek seeds / A.M. Dawidar, A.A. Saleh, S.L. El-Motei // Planta Medica. – 1973. – Vol. 24. – P. 367-370.
12. Chatterjee, A. The Treatise on Indian Medicinal Plants / A. Chatterjee, S.C. Pakrashi // Publications and Information Directorate, CSIR, New Delhi. – 1999. – P. 125-126.
13. Verma, A. Simplified Procedure for Indole Alkaloid Extraction from *Catharanthus roseus* combined with a Semi-synthetic Production Process for Vinblastine / A. Verma, I. Laakso // Molecules. – 2007. – Vol. 12. – P. 1307-1315.
14. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование / Л. 1984–1996. Т. 5.
15. 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.
16. Heistein, P.F. Plant cell suspension cultures as a source of drugs / P.F. Heistein // Pharmacy International. – 1986. – Vol. 7. – P. 38-40.
17. Hughes, E.H. Metabolic engineering of the indole pathway in *Catharanthus roseus* hairy roots and increased accumulation of tryptamine and serpentine / E.H. Hughes, S.B. Hong, S.I. Gibson // Metabolic Engineering. 2004. – Vol.6, Issue 4. – P. 268-276.

18. Endreb R. Plant Cell Biotechnology / R. Endreb // Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1994. – 353 p.
19. Мэнтелл, С.Г. Факторы культивирования, влияющие на накопление вторичных метаболитов в культурах клеток и тканей растений / С.Г. Мэнтелл, Г. Смит // Биотехнология сельскохозяйственных растений. пер. с англ. В.И. Негрука; М.: Агропромиздат, 1989. – С. 75-102.
20. Смоленская, И.Н. Противоположное влияние синтетических ауксинов – 2,4-дихлорфеноксиуксусной и 1-нафтилуксусной кислот на рост культуры клеток женьшеня настоящего и синтез гинзенозидов / И.Н. Смоленская, О.В. Решетняк, Ю.Н. Смирнова, Н.Д. Черняк, Е.Б. Глоба, А.М. Носов, А.В. Носов // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – С. 243-252.
21. Zenk, M.H. Formation of indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus* / Zenk M.H., H. El-Shagi, H. Arens, J. Stockigt, E.W. Weiler, B. Deus // In: Barz W., Reinhard E., Zenk M.H. (eds) Plant tissue culture and its biotechnological applications. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1977. – P. 27-43.
22. Dörnenburg, H. Effectiveness of plant-derived and microbial polysaccharides as elicitors for anthraquinone synthesis in *Morinda citrifolia* cultures / H. Dörnenburg, D. Knorr // J. Agric. Food. Chem. – 1994. – Vol. 42. – P. 1048–1052.