

ИММОБИЛИЗАЦИЯ – ЭФФЕКТИВНЫЙ ПРИЕМ ПОВЫШЕНИЯ СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

В.М. Юрин, С.Н. Ромашко, О.В. Молчан, Т.И. Дитченко

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

В настоящее время многие из промышленно важных соединений, используемых в фармацевтической, пищевой, парфюмерной и др. отраслях, выделяют из тканей растений. Эти вещества имеют сложное химическое строение, и поэтому их трудно получить другими способами [1].

Растительные клетки тотипотентны, т. е. в них экспрессируется вся генетическая информация, и, следовательно, любое вещество, находящееся в интактном растении, можно получить, культивируя клетки данного растения. За последнее десятилетие в этой области достигнуты значительные успехи.

Создание надежной сырьевой базы, используемой для получения физиологически активных веществ, а также радикальное решение проблем, связанных с импортозамещением, экономией площадей и затрат на тепличное оборудование, стандартизацией сырья и контроля его качества, возможно на основе разработки биотехнологического способа получения биомассы культур клеток.

Однако для промышленного использования растительных клеток с целью получения биологически активных веществ необходимо решить ряд проблем, одной из которых является низкое их внутриклеточное содержание.

В этой связи особое место в качестве отдельной отрасли биотехнологии при создании и использовании биологических объектов с повышенным содержанием физиологически активных веществ может иметь иммобилизация.

Иммобилизованный объект представляет собой систему, действие которой в целом определяется правильным подбором самого объекта, носителя и способа связывания объекта с носителем.

Основными преимуществами использования иммобилизованных биологических объектов являются:

- высокая активность;
- возможность контроля за микроокружением агента;
- полное и быстрое отделение целевых продуктов;
- организация непрерывных процессов с многократным использованием объекта.

Среди приемов иммобилизации в основном используются следующие:

- включение в гели и микрокапсулы;
- адсорбция на нерастворимых носителях;
- ковалентное связывание с носителем;
- сшивка бифункциональными реагентами.

Рассмотрим отдельные примеры изменения биосинтетического потенциала культивируемых *in vitro* клеток лекарственных растений, в частности, представителей семейств *Asteraceae* и *Aprocynaceae*, в результате включения в кальций-альгинатный полисахаридный гель.

Одной из острейших проблем населения большинства индустриальных городов является рост числа заболеваний, которые сопровождаются развитием иммунодефицитных состояний. Растения рода эхинацея (сем. *Asteraceae*) становятся чрезвычайно популярными в последнее время благодаря получаемым из них лекарственным препаратам, обладающим иммуностимулирующим действием. Поэтому фитохимики, фармакологи и врачи различного профиля проявляют повышенный интерес к изучению и использованию данного растения.

Среди веществ, обнаруженных в эхинацее и имеющих значение для медицины, – полисахариды, производные кофейной (3,4-дигидроксикоричной) кислоты, флавоноиды, эфирные масла, алкиламины ненасыщенных кислот, макро- и микроэлементы. Из всех видов эхинацеи – *Echinacea purpurea* (L.) является лидером по содержанию ценных веществ и представляет наибольший интерес в качестве лекарственного сырья [2].

Растения семейства *Asteraceae* являются незаменимым источником получения многих биологически активных вторичных метаболитов. Самым известным представителем семейства является катарантус розовый (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don f.) – тропический вечнозеленый кустарник. Особая фармакологическая ценность этих растений обусловлена содержанием алкалоидов индольного ряда, таких, как винбластин и винкристин, обладающих противоопухолевой активностью [3]. Поэтому сырье катарантуса используют для получения препаратов, применяемых при лимфогранулематозе, гематосаркомах и других онкологических заболеваниях. Фармакологически значимыми являются также аймалицин и резерпин – алкалоиды, характеризующиеся гипотоническим действием. Данный вид растений на территории Республики Беларусь может произрастать только в условиях оранжерейной культуры, а также с использованием методов культуры клеток и тканей. Однако биосинтез вторичных метаболитов в растениях, произрастающих в искусственных условиях, а также в клетках культуры находится на более низком уровне по сравнению с дикорастущим растительным организмом [4]. В связи с этим при культивировании растительных клеток чрезвычайно актуальным является использование методов иммобилизации, приводящих к сверхсинтезу и экскреции биологически активных соединений [5].

Методы исследования подробно описаны в наших ранее опубликованных работах [6, 7].

Результаты и обсуждение

Влияние иммобилизации на содержание гидроксикоричных кислот и их производных в клетках суспензионной культуры эхинацеи пурпурной и среде инкубации

Среди растительных фенольных соединений гидроксикоричные кислоты (ГК) занимают особое положение. Они широко распространены в растениях и являются биогенетическими предшественниками большинства других фенольных соединений, которые синтезируются из фенилаланина вследствие дезаминирования с образованием транс-коричной кислоты [8].

Гидроксикоричные кислоты (п-кумаровая, кофейная, феруловая и синаповая) в различных комбинациях, в свободном виде или в составе гликозидов и сложных эфиров содержатся во многих высших растениях. Наиболее распространены в природе кофейная кислота и ее производные – хлорогеновая, цикориевая и др. Эхинацея пурпурная является одним из наиболее известных и богатых природных источников ГК [2].

В настоящей работе было проведено количественное определение содержания суммы ГК в пересчете на цикориевую кислоту в свободных и иммобилизованных клетках суспензионной культуры эхинацеи пурпурной, а также в среде их инкубации на отдельных стадиях ростового цикла.

Согласно полученным данным содержание ГК на начальном этапе ростового цикла (лаг-фаза) и в ходе лог-фазы было выше в свободных клетках суспензионной культуры *Echinacea purpurea*, а к 14-м суткам (стационарная фаза) в иммобилизованных (рисунок 1).

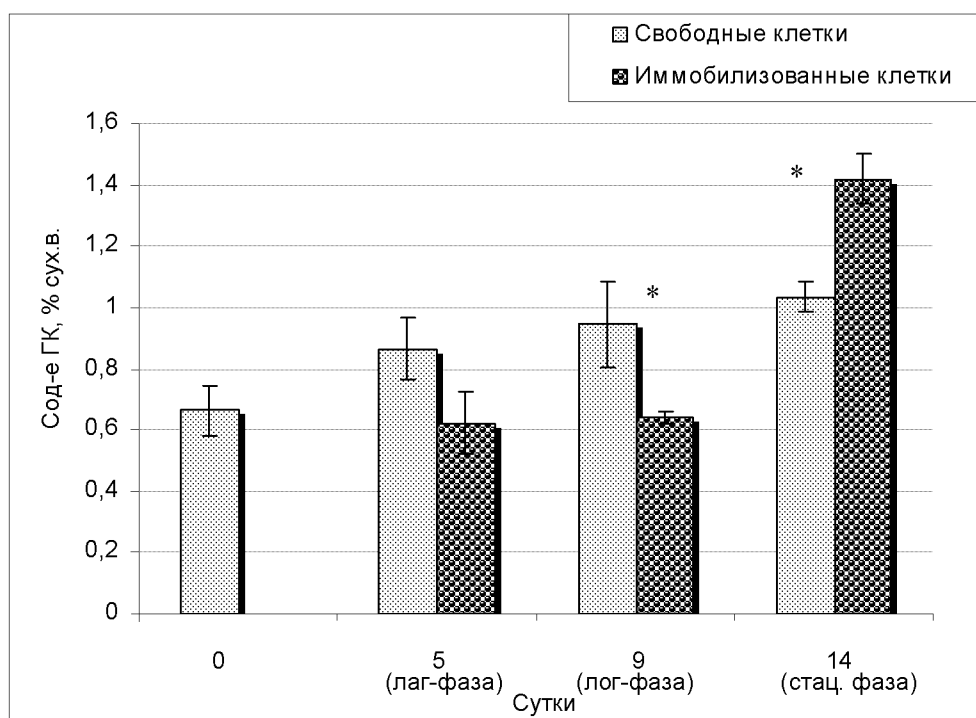


Рисунок 1 – Динамика изменения содержания гидроксикоричных кислот в свободных и иммобилизованных клетках суспензионной культуры

Echinacea purpurea в ходе ростового цикла

* – различия между вариантами достоверны при $P \leq 0,05$.

Количество ГК в иммобилизованных клетках на 5-е и 9-е сутки практически не отличалось между собой и соответствовало таковому в свободных клетках перед проведением процедуры иммобилизации. Отсутствие изменений в содержании ГК у иммобилизованных клеток на протяжении 9 суток культивирования, вероятно, связано с их адаптацией к функционированию в условиях включения в носитель. При переходе к стационарной фазе отмечалось резкое возрастание уровня ГК в иммобилизованных клетках – в 1,4 раза по сравнению со свободными клетками и в 2,3 раза по сравнению с иммобилизованными клетками на 9-е сутки культивирования. Таким образом, иммобилизация приводила к стимуляции накопления ГК в клетках эхинацеи пурпурной к концу ростового цикла.

Положительный эффект иммобилизации на накопление ГК в клетках суспензионной культуры эхинацеи пурпурной может быть связан с повышением активности ключевого фермента метаболизма фенольных соединений – фенилаланинаммониолиазы. Действительно, в работе [9] было обнаружено существенное возрастание активности данного фермента в иммобилизованных клетках суспензионной культуры *Vitis vinifera*. С другой стороны, иммобилизации может снижать интенсивность синтеза материалов клеточной стенки, которая содержит значительное количество фенольных соединений [10]. В результате этого процесса происходит их перераспределение и преимущественное накопление внутриклеточных растворимых предшественников растительных фенолов, в частности гидроксикоричных кислот.

В результате иммобилизации растительных клеток наблюдается увеличение экскреции вторичных метаболитов [11], поэтому в нашей работе также производилось определение содержания ГК в среде культивирования свободных и иммобилизованных клеток. На рисунке 2 представлено влияние иммобилизации на содержание ГК в среде инкубации клеток *Echinacea purpurea* на разных стадиях ростового цикла. Из рисунка видно, что на 5-е сутки – лаг-фаза – более высокое содержание ГК и их производных обнаружено в питательной среде иммобилизованных клеток по сравнению со свободными. Можно

предположить, что увеличение выхода ГК (почти в 3 раза) из клеток вызвано их реакцией на иммобилизацию.

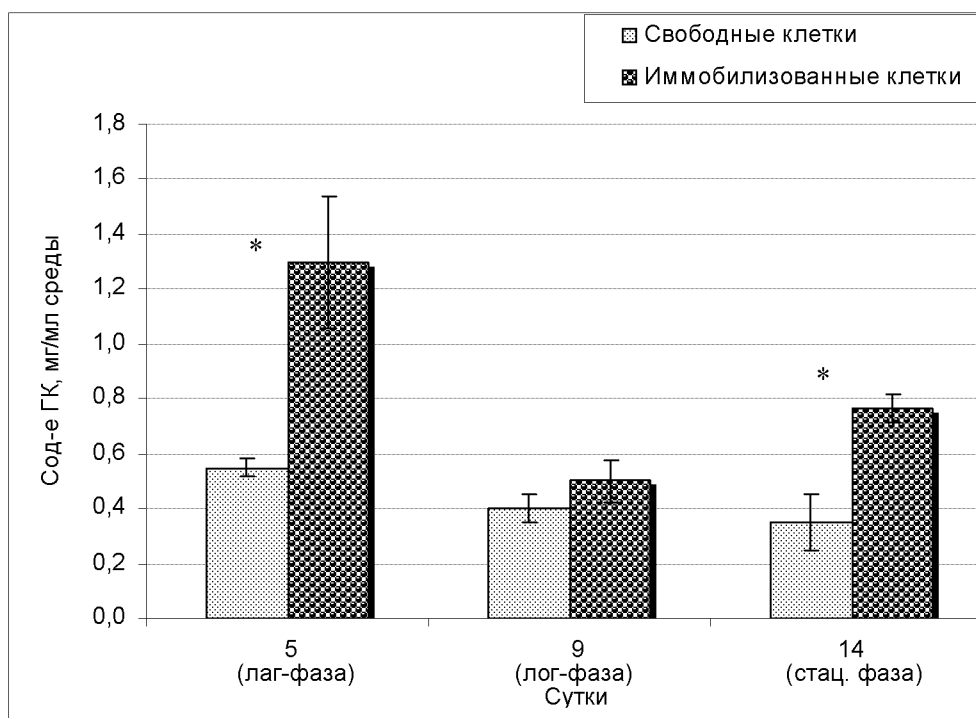


Рисунок 2 – Влияние иммобилизации на содержание гидроксикоричных кислот в среде культивирования свободных и иммобилизованных клеток *Echinacea purpurea*

* – различия между вариантами достоверны при $P \leq 0,05$.

На 9 сутки – лог-фаза ростового цикла – наблюдается снижение экскреции ГК в питательную среду иммобилизованными клетками (в 1,7 раза по сравнению с лаг-фазой). Для свободных клеток их содержание в среде культивирования остается практически на прежнем уровне. На 14-е сутки ростового цикла (стационарная фаза) отмечается повышение экскреции данных вторичных метаболитов в питательную среду иммобилизованными клетками не только по сравнению со свободными клетками, но и иммобилизованными клетками на 9-е сутки культивирования.

Таким образом, количество экскретируемых ГК практически на всех стадиях ростового цикла было выше у иммобилизованных в Са-альгинатном геле клеток суспензионной культуры *Echinacea purpurea*. При этом если в лаг-фазу отмечалось выделение в питательную среду 17% от суммарного содержания ГК в иммобилизованных клетках и среде культивирования, то при переходе к лог-фазе и стационарной фазе – 10 и 5%, соответственно. Данный эффект, вероятно, обусловлен рассмотренным ранее резким увеличением содержания суммы ГК в клетках *Echinacea purpurea* в результате их иммобилизации при переходе к стационарной фазе ростового цикла. Следовательно, в стационарной фазе активно происходит наработка продукта, а для инициации его выхода из клеток требуется разработка дополнительных приемов.

Следует отметить, что содержание ГК в надземных частях растений *Echinacea purpurea* L. составляет от 2,2 до 4,9% сух.в. в зависимости от фазы развития растения [12]. Содержание суммы ГК в первичном каллусе составляло всего лишь 0,29% сух.в. [6]. В результате последующей оптимизации состава питательных сред и условий культивирования содержание ГК в клетках суспензионной культуры эхинацеи пурпурной, используемых в работе, достигало в среднем 0,9–1,0% сух.в. [6], а в результате иммобилизации возрастало до 1,4–1,5% сух.в.

Влияние иммобилизации на начальный этап биосинтеза алкалоидов индольного ряда в клетках суспензионной культуры катарантуса розового

Биосинтез терпеноидных индольных алкалоидов в растении *Catharanthus roseus* начинается реакцией декарбоксилирования триптофана и превращения его в триптамин. Реакцию катализирует фермент триптофан-декарбоксилаза (ТДК). Для изучения влияния иммобилизации на процессы биосинтеза алкалоидов проводилась оценка активности этого ключевого фермента начального этапа биосинтетического пути алкалоидов и анализировалось содержание первичного продукта биосинтеза алкалоидов индольного ряда – триптамина как в свободных и инкапсулированных в носитель клетках, так и в среде их инкубации.

Влияние иммобилизации на активность ТДК

Максимальная активность ТДК в суспензионной культуре катарантуса розового наблюдалась в период наибольшей метаболической активности клеток (на 7 сутки инкубации) и составляла 4,3 пмоль триптамина/(мкг белка*мин). Затем в ходе дальнейшего культивирования активность фермента падала.

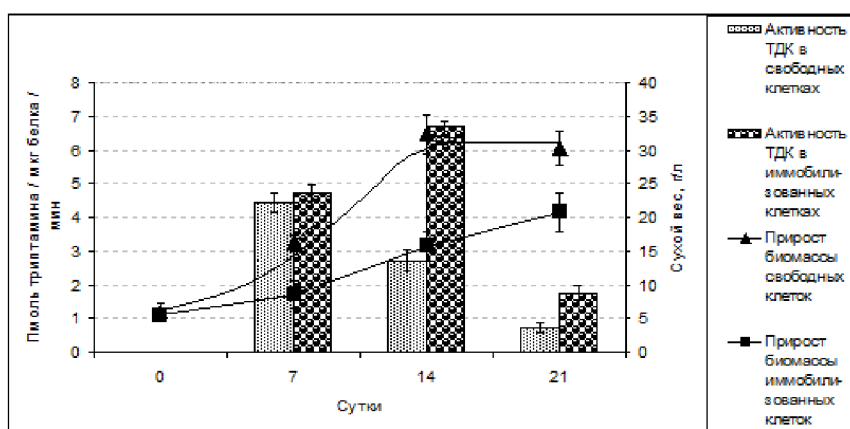


Рисунок 3 – Активность ТДК в клетках суспензионной культуры *Catharanthus roseus* в течение ростового цикла

Активность ТДК в иммобилизованных клетках суспензионной культуры являлась максимальной на 14 сутки культивирования и составляла величину около 6,7 пмоль триптамина/(мкг белка*мин) (рисунок 3). Кроме того, как видно на рисунке 3 прирост сухой массы иммобилизованных клеток является менее интенсивным по сравнению со свободными. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при иммобилизации клеток суспензионных культур происходит замедление ростовых процессов и, соответственно, происходит смещение временных параметров этапов ростового цикла по сравнению со свободными клетками [13]. При этом иммобилизация приводит к значительной стимуляции активности ТДК и на 14 и 21 сутки культивирования по сравнению со свободными.

Влияние иммобилизации на содержание триптамина

Было установлено, что содержание триптамина в иммобилизованных клетках суспензионной культуры катарантуса розового значительно ниже содержания этого протоалкалоида в клетках в суспензии в течение всего периода инкубации (рисунок 4). Такое снижение, с одной стороны, может быть обусловлено перестройкой метаболизма клеток, связанное с активацией процессов биосинтеза при иммобилизации и включением синтезируемого триптамина в дальнейшие пути биосинтеза алкалоидов индольного ряда. Кроме того, нельзя исключить стимуляции экскреции триптамина в среду инкубации клеток при иммобилизации.

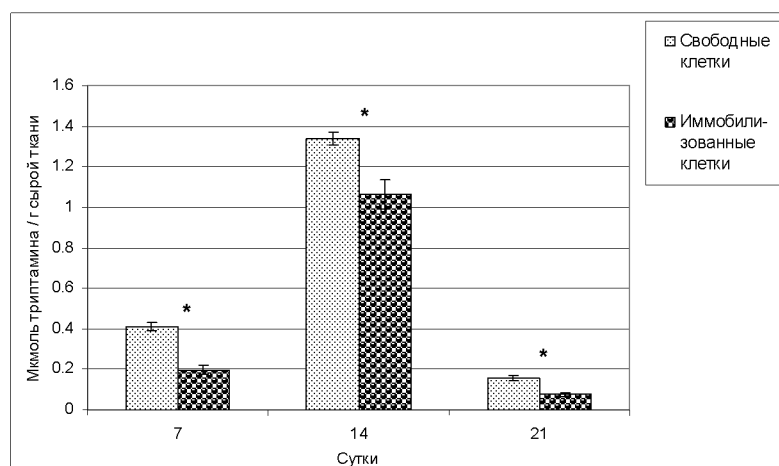


Рисунок 4 – Содержание триптамина в клетках суспензионной культуры *Catharanthus roseus*

* – различия между вариантами достоверны при $P \leq 0,05$.

Влияние иммобилизации на экскрецию триптамина в среду инкубации

Известно, что характерной особенностью иммобилизованных клеток является спонтанная экскреция синтезируемых БАВ в среду инкубации. Проведенные исследования позволили установить, что на 21 сутки инкубации иммобилизованных клеток суспензионной культуры подавляющее количество триптамина экскретировалось (рисунок 5). Содержание триптамина в среде инкубации свободных клеток суспензионной культуры составило 0,04 мкмоль триптамина/мл, в то время как при иммобилизации – 0,28 мкмоль триптамина/мл, т.е. наблюдалась 7-ми кратная стимуляция экскреции триптамина в среду инкубации.

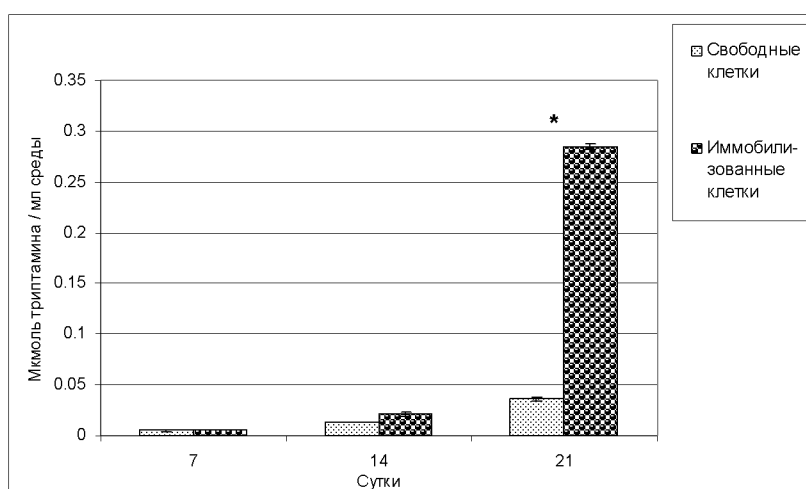


Рисунок 5 – Содержание триптамина в среде инкубации клеток суспензионной культуры *Catharanthus roseus*

* – различия между вариантами достоверны при $P \leq 0,05$.

Влияние физико-химических свойств альгината натрия на процессы биосинтеза алкалоидов в иммобилизованных клетках

Хорошо известно, что существенным этапом включения клеток в носитель является подбор соответствующего метода иммобилизации и условий культивирования, при которых биосинтез целевого продукта был бы оптимальным. Особенно важными являются характеристики носителя, используемого для иммобилизации. Было установлено, что при использовании для иммобилизации клеток суспензионной культуры катарантуса розового 3% альгината натрия и 100 мМ хлорида кальция, гранулы сохраняли механическую прочность, а клетки оставались жизнеспособными в течение всего периода культивирования. Однако известно, что физико-химические свойства коммерческих альгинатов натрия могут

значительно варьировать. Это может быть связано с видом используемого сырья и технологией получения альгината. К таким физико-химическим свойствам относят молекулярную массу полимеров, соотношение мономеров – маннурановой и гулурановой кислот, содержание свободных карбоксильных групп и их взаимное расположение в полимерной цепи. Вследствие указанных причин коммерческие альгинаты отличаются относительной вязкостью, которая может влиять на биосинтетические процессы в клетках. Поэтому нами были протестированы 2 альгината натрия с относительной вязкостью 30 000 сПз и 250 сПз. Было установлено, что наибольшим стимулирующим эффектом, как на активность ТДК, так и на экскрецию триптамина в среду инкубации характеризовался альгинат вязкостью 250 сПз (рисунок 6, 7).

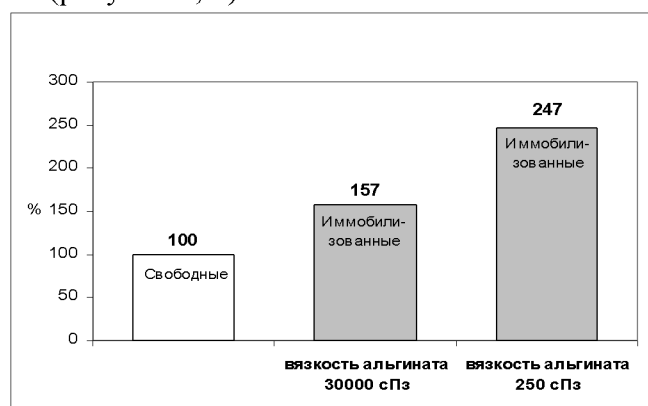


Рисунок 6 – Стимулирующее влияние альгината натрия различной вязкости на активность ТДК в клетках суспензионной культуры *Catharanthus roseus*

При использовании альгината натрия вязкостью 30 000 сПз активность ТДК составила 157% от контроля (свободные клетки суспензионной культуры), в то время как при альгинате натрия вязкостью 250 сПз – 247% (рисунок 6). Уровень экскреции триптамина в среду инкубации составил при использовании альгината натрия с относительной вязкостью 30 000 сПз и 250 сПз – 311 и 791% (рисунок 7), соответственно, по отношению к свободным клеткам суспензионной культуры.

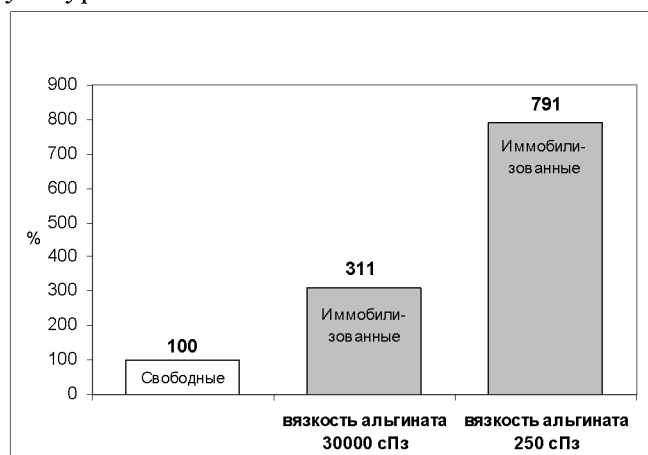


Рисунок 7 – Стимулирующее влияние альгината натрия различной вязкости на содержание триптамина в среде инкубации суспензионной культуры *Catharanthus roseus*

Низкая вязкость раствора альгината натрия предполагает присутствие молекул с небольшими молекулярными массами. Данный факт установлен в исследованиях по изучению влияния термодеполимеризации (расщеплении полимера на мономеры) на вязкость альгината натрия [14]. Обнаруженные нами эффекты подтверждают предположения ряда авторов о том, что именно небольшие фрагменты альгината натрия в растворе оказывают существенное «элиситорное» влияние на физиологическое состояние клеток

культуры *Catharanthus roseus*, вызывая рост концентрации активных форм кислорода и приводя к активации синтеза индольных алкалоидов [15].

Наряду с характеристиками носителя существенную роль в физиолого-биохимических процессах, происходящих в свободных и иммобилизованных клетках, играет также агрегированность и степень клеточных контактов. Более высокая агрегированность в случае иммобилизованных клеток приводит к гетерогенности внутри гранул геля. Это проявляется в значительном варьировании физического и химического микроокружения от центра гранул к периферии, в частности – разнице в освещении, градиентах питательных веществ, кислорода, углекислого газа и других факторов. Считают, что вследствие этого происходит экспрессия в иммобилизованных клетках путей синтеза вторичных метаболитов [16]. Кроме того, специфическое клеточное окружение способствует более эффективному использованию кофакторов, играющих существенную роль в клеточном метаболизме. В частности, в работе [17] было показано, что более высокая способность клеточной культуры *Catharanthus roseus* трансформировать триптамин в алкалоиды аймалицинового типа является результатом эффективного оборота эндогенной НАДФН₂ в клетках при их иммобилизации.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существенном изменении биосинтетического потенциала растительных клеток, происходящем в результате заключения их в носитель.

В целом увеличение биосинтеза физиологически активных соединений иммобилизованными растительными клетками может быть объяснено изменением баланса первичного и вторичного метаболизма в сторону последнего.

На основании анализа физиолого-биохимических характеристик иммобилизованных клеток и идентификации механизмов внутриклеточной регуляции метаболических процессов наблюдаемая при иммобилизации стимуляция синтеза вторичных метаболитов обусловлена комплексом различных факторов, из которых наиболее важными являются:

- удлинение ростового цикла и/или стационарной фазы роста, снижение скорости клеточных делений и замедление роста, вследствие чего продукты первичного метаболизма накапливаются и становятся более доступными для вторичного метаболизма;
- модификация внутриклеточных физиологических процессов (фотосинтеза, дыхания) из-за диффузионных ограничений и специфических условий микросреды внутри полимерного матрикса;
- гетерогенность физических и химических факторов от центра гранул к периферии (разница в освещении, градиенты питательных веществ, кислорода, углекислого газа и других факторов);
- увеличение числа межклеточных контактов, что обеспечивает более эффективное использование кофакторов, играющих существенную роль в клеточном метаболизме;
- возникновение стрессовых для растительной клетки условий, обусловленное включением в носитель;
- высвобождение из кальций-альгинатного матрикса вторичного посредника кальция с последующим увеличением его цитоплазматической концентрации, приводящее к активации ферментных систем;
- свойства носителя, формирующего экстраклеточный матрикс.

Список литературы

1. Иммобилизованные клетки и ферменты. – Пер. с англ./ Под ред. Дж. Вудворта. – М.: Мир, 1988.
2. Фитохимический состав представителей рода Эхинацея (*Echinacea* Moench.) и его фармакологические свойства / В.Н. Самородов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1996. – № 4. – С. 32–37.
3. El-Sayed, M. *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation / M. El-Sayed, R. Verpoorte // *Phytochem. Rev.* – 2007. – Vol. 6. – P. 277–305.
4. Verpoorte, R. *Biotechnology for the production of plant secondary metabolites* / R. Verpoorte, A. Contin, J. Memelink // *Phytochem. Rev.* – 2002. – Vol. 1. – P. 13–25.

5. Knorr, D. Immobilization and permeabilization of cultured plant cells / D. Knorr, S.M. Miazga, R.A. Teutonico // Food Technol. – 1985. – Vol. 39, №10. – P. 135–140.
6. Экзогенная регуляция вторичного метаболизма в культуре клеток и тканей растений / В.М. Юрин [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2008. – Т. 3, ч. 2. – С. 118–126.
7. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза / В.М. Юрин [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Инновационные биотехнологии в XXI». – 2009. – Т. 4, ч. 2. – С. 168–182.
8. Медведев, С.С. Физиология растений / С.С. Медведев / С.-Петербург. Ун-та, 2004. – 336 с.
9. Dörnenburg, H. Evaluation of immobilization effects on metabolic activities and productivity in plant cell processes / H. Dörnenburg // Process Biochemistry. – 2004. – Vol. 39. – P. 1369–1375.
10. Capsaicin biosynthesis in cell culture of Capsica / M. Holden [et al.] // J. Inst. Chem. Eng. – 1987. – P. 46–63.
11. Gillet, F. Immobilization of Nicotiana tabacum plant cell suspensions within calcium alginate gel beads for production of enhanced amounts of scopolin / F. Gillet // Enzyme and Microbial Technology. – 2002. – Vol. 26. – P. 229–234.
12. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea* / В.А. Куркин [и др.] // Растительные ресурсы. – 1998. – Т.34, вып. 2. – С. 81–85.
13. Ziyad-Mohammed, M.T. Plant cell immobilization in alginate and polyurethane foam / M.T. Ziyad-Mohammed, A.H. Scragg // Method in molecular biology – 1990. – Vol. 6. – P. 513–536.
14. Влияние физико-химических свойств альгината натрия на синтез наночастиц серебра / И.Н. Юркова [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2007. – Т. 20 (59), №3. – С. 142–147.
15. Production of 5'-phosphodiesterase by *Catharanthus roseus* cells promoted by heat-degraded products generated from uranic acid / Chiharu, A.T. [et al.] // Journal of bioscience and bioengineering. – 2002. – Vol. 94, №. 2. – P. 154–159.
16. Lindsey, K. The synthetic potential of immobilised cells of *Capsicum frutescens* Mill. cv. annum / K. Lindsey, M.M. Yeoman // Planta. – 1984. – Vol. 162. – P. 495–501.
17. Brodelius, B. Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products / B. Brodelius, K. D. Mosbach, M.H. Zenk // FEBS Letter. – 1979. – Vol. 103. – P. 93–97.

IMMOBILIZATION – EFFECTIVE WAY OF INCREASE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES SYNTHESIS BY SUSPENSION PLANT CELL CULTURE

V.M. Yurin, S.N. Romashko, O.V. Molchan, T.I. Ditchenko

Belarusian State University, Minsk, Belarus

Examples of plant cells biosynthetic potential change as a result of immobilization received for suspension cultures of herbs *Echinacea purpurea* (L.) and *Catharanthus roseus* (L.) G. Don f. are considered in article. It has been shown that cell entrapment in Ca-alginate granules leads to the growth of biologically active substances content, stimulation of key enzymes activity of secondary metabolites biosynthesis, and also to more effective synthesized products excretion in the cultural medium. The increase in physiologically active compounds biosynthesis of immobilized plant cell is associated with change of balance of a primary and secondary metabolism towards the last and is determined by influence of factors resulted in article.