

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь



Юрин Владимир Михайлович, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры физиологии и биохимии растений биологического факультета Белгосуниверситета

e-mail: Yurin@bsu.by

Область научных интересов – ксенобиология, биофизика, биотехнология растений.

Ввиду ограниченных возможностей получения возделываемых или дикорастущих растений идет активный поиск новых альтернативных источников для создания надежной сырьевой базы, используемой для получения физиологически активных веществ (ФАВ). Проблемы, связанные с импортозамещением, экономией площадей и затратами на тепличное оборудование, стандартизацией сырья и контролем его качества, возможно решить на основе выращивания растительных клеток в культуре. По мнению большинства специалистов, этот подход представляется весьма перспективным для получения специфических веществ, используемых в фармацевтической, косметической и пищевой промышленности.

Растительные клетки тотипотентны, т. е. в них экспрессируется вся генетическая информация, и, следовательно, любое вещество, находящееся в интактном растении, можно получить *in vivo*.

Однако уровень синтеза вторичных метаболитов в культивируемых каллусных и суспензионных культурах во многих случаях ниже, чем в нативном растении [1–3]. Особую роль в повышении внутриклеточного содержания физиологически активных веществ наряду с другими факторами может играть иммобилизация клеток.

Проблема использования иммобилизованных растительных клеток в биотехнологии в настоящее время является чрезвычайно актуальной, что находит отражение в возрастающем числе публикаций, посвященных этой теме.

Иммобилизация – это фиксация биокатализаторов (ферментов или клеток) в некоторой фазе, чаще всего нерастворимой, отделенной от другой фазы (раствора), в которой находятся молекулы субстрата и (или) продукта, причем возможен перенос этих молекул.

Преимущества использования культуры клеток, а не целых растений при получении продуктов растительного происхождения известны давно. Однако в промышленных масштабах для получения широкого спектра ФАВ эффективное применение иммобилизованных клеток растений объясняется следующим причинам [4]:

- возможностью многократного использования биомассы;
- отсутствием затрат на выделение и очистку продуктов реакции;
- более высокой активностью и способностью к сверхсинтезу продуктов вторичного метаболизма;
- стабильностью и наличием защиты от микробного заражения и механического повреждения;
- возможностью длительного культивирования и автоматизации процессов.

Перечисленные преимущества определяют значительный технологический потенциал иммобилизованных растительных клеток.

Получение иммобилизованных систем клеток растений включает следующие этапы:

- получение культуры клеток с определенными заданными свойствами, например линии клеток с высоким выходом продукта и низкой скоростью роста;

– подбор соответствующего метода иммобилизации и условий культивирования, при котором жизнеспособность клеток и биосинтез целевого продукта поддерживались бы максимально длительное время;

– создание условий экскреции продукта из клеток в среду культивирования при сохранении жизнеспособности культуры.

К настоящему времени использование иммобилизации оказалось эффективным для ряда культур растительных клеток; отдельные примеры приведены в таблице 1.

Процесс иммобилизации может оказывать значительное влияние на образование продуктов вторичного метаболизма посредством модификации внутриклеточных физиологических процессов.

Таблица 1 – Синтез вторичных метаболитов иммобилизованными клетками растений [5,6]

| Метод иммобилизации | Иммобилизованные культуры | Наименование продукта |
|---|----------------------------|-----------------------|
| Гранулы, 2-5% охлажденная агароза (40–20°C) | <i>Catharanthus roseus</i> | Аймалицин |
| Гранулы, 2–4% альгинат натрия, ионное поперечное связывание | <i>Catharanthus roseus</i> | Алкалоиды |
| | <i>Daucus carota</i> | Стероиды |
| | <i>Morinda citrifolia</i> | Антрахиноны |
| | <i>Digitalis lanata</i> | Дигитоксин |
| | <i>Nicotiana tabacum</i> | Никотин |
| | <i>Papaver somniferum</i> | Морфиновые алкалоиды |
| Листы, 5% бисакриамид + ксантановая смола, окислительно-восстановительная полимеризация | <i>Catharanthus roseus</i> | Серпентин |
| | <i>Nicotiana tabacum</i> | Алкалоиды |
| Выращивание клеток внутри нейлонового сита | <i>Beta vulgaris</i> | Бетацианин |
| Выращивание клеток внутри пенополиуретанового матрикса | <i>Capsicum frutescens</i> | Капсаицин |
| Полые волокна | <i>Daucus carota</i> | Фенольные соединения |
| В частицах, оксид полифенилена, поперечные сшивки | <i>Solanum aviculare</i> | Гликоалкалоиды |

В связи отмеченными выше преимуществами представлялось целесообразным установить физиолого-биохимические закономерности функционирования культивируемых клеток в условиях иммобилизации.

Остановимся на рассмотрении полученных нами результатов на примере гетеротрофной культуры таких растений, как *Syringa vulgaris*, *Echinacea purpurea*, *Catharanthus roseus* и *Vinca minor*, представителях семейств Oleaceae, Аросупасеae и Asteraceae.

Для осуществления процесса иммобилизации первоначально получали каллусную культуру из листовых эксплантов, а затем клеточную суспензию, помещая каллусную ткань в колбу с жидкой питательной средой. Суспензия перемешивалась в колбе на качалке при скорости перемешивания 100–120 об/мин. При первом переносе на свежую среду удаляли крупные агрегаты, фильтруя через нейлоновые сита. Культивирование каллусных и

суспензионных культур осуществляли на среде Мурасиге и Скуга (МС) [7], содержащей оптимальные концентрации фитогормонов, при 25°C в термостате в темноте.

Иммобилизованные клетки получали включением в Са-альгинатный гель. С этой целью смешивали 10 мл суспензионной культуры с 10 мл 3% альгината натрия и полученную смесь по каплям вносили в 0,25 моль/л раствора хлорида кальция для формирования гранул с включенными внутрь клетками. Иммобилизованные клетки находились в термостате (24,5°C) в течение периода выращивания [8, 9]. Схематически процедура получения иммобилизованных клеток представлена на рисунке 1.

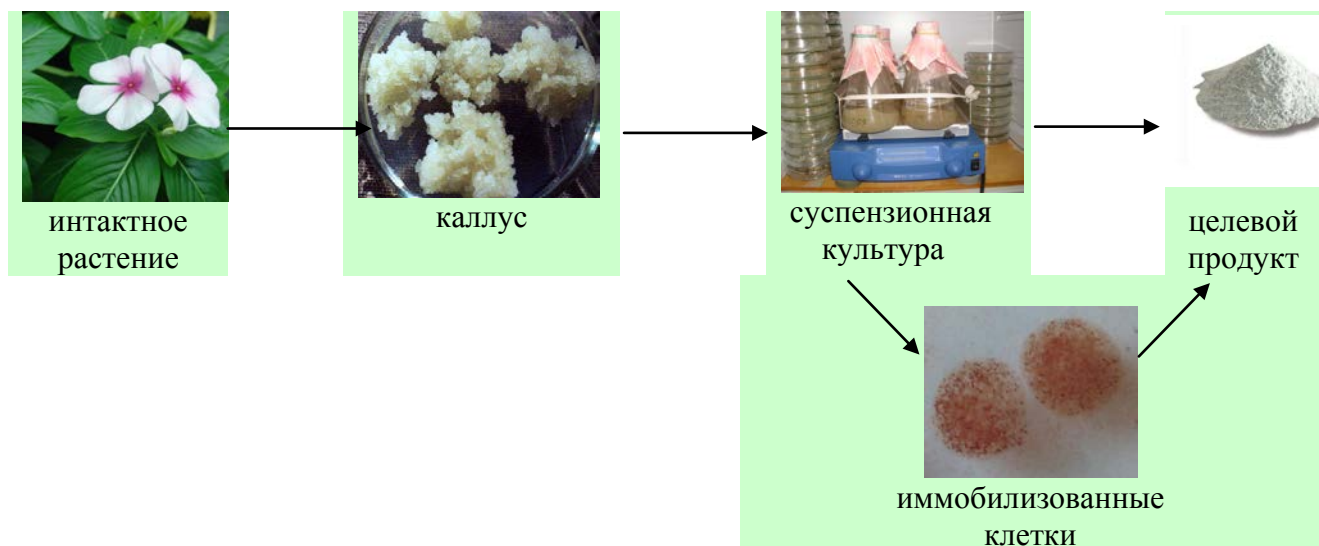


Рисунок 1 – Схема получения иммобилизованных клеток

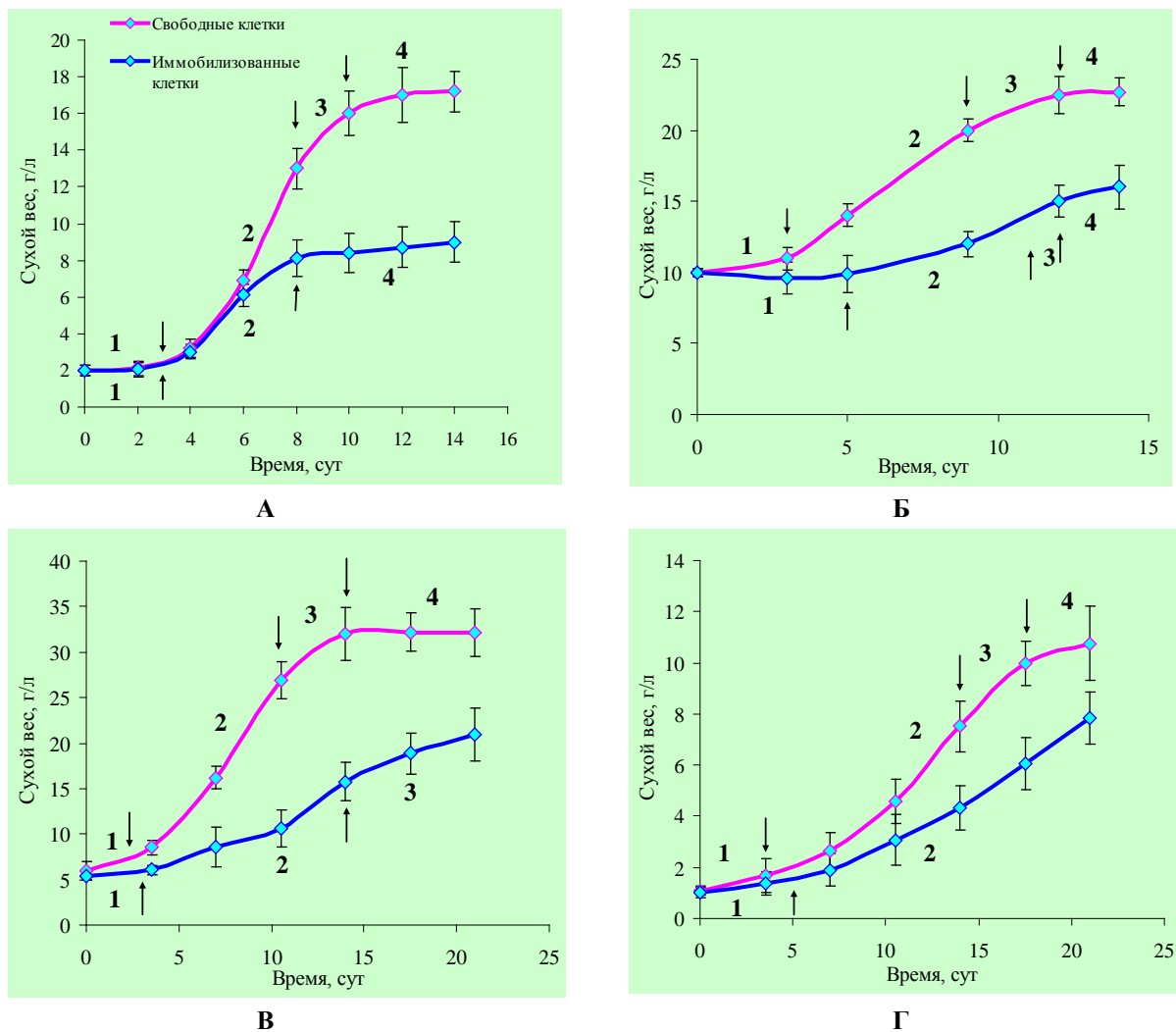
При изучении особенностей физиологии иммобилизованных растительных клеток были установлены изменения в процессах фотосинтеза и дыхания, возникающие вследствие иммобилизации [10–14]. Иммобилизация клеток *Chlorella* в Са-альгинатном геле способствует их более длительному хранению в темноте при низких температурах и поддерживает более высокий уровень метаболизма при хранении на свету при комнатной температуре по сравнению со свободными. Были обнаружены также сдвиги барьерно-транспортных свойств плазматической мембраны, в частности – параметров транспорта K^+ , H^+ и NO_3^- . Причем, именно заряженные полисахариды оказывают непосредственное влияние на транспортные характеристики плазматической мембраны [15–17]. В этой связи можно предполагать и изменения во внутриклеточных метаболических процессах, определяющих рост и развитие клеток и организма в целом.

Особенно важно для метаболизма клеток сохранение жизнеспособности. Суспендированные и иммобилизованные клетки в нашем случае характеризовались достаточно высокой жизнеспособностью, причем для *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* иммобилизация способствовала увеличению данного показателя. Жизнеспособность иммобилизованных клеток для последних двух видов растений составляла более 90% (таблица 2).

Таблица 2 – Жизнеспособность культивируемых клеток на стационарной фазе роста

| Объект | Жизнеспособность, % | |
|----------------------------|---------------------|-------------------------|
| | Свободные клетки | Иммобилизованные клетки |
| <i>Syringa vulgaris</i> | 85±6 | 85±7 |
| <i>Echinacea purpurea</i> | 87±1 | 84±1 |
| <i>Catharanthus roseus</i> | 68±2 | 94±6 |
| <i>Vinca minor</i> | 76±2 | 93±7 |

Исследование характера роста свободных и иммобилизованных клеток суспензионной культуры сирени обыкновенной [18–20] показало, что с начала культивирования и до 5 суток сухая их масса изменялась одинаково. Небольшие различия в сухой массе свободных и иммобилизованных клеток начинали наблюдаться к 8 суткам культивирования. К 14 суткам культивирования сухая масса свободных клеток сирени увеличивалась почти в 7 раз, а иммобилизованных в 3 раза. Полученные результаты позволяют заключить, что иммобилизация в Са-альгинатный гель вызывала торможение роста клеток сирени по сравнению со свободными клетками (рисунки 2).



стрелками указаны фазы роста (1 – лаг-, 2 – лог-, 3 – замедления, 4 – стационарная)

Рисунок 2 – Кривые роста иммобилизованных и свободных клеток гетеротрофной суспензионной культуры *Syringa vulgaris* (А), *Echinacea purpurea* (Б), *Catharanthus roseus* (В) и *Vinca minor* (Г)

Параметры, характеризующие интенсивность ростовых процессов клеток суспензионной культуры (свободные клетки) и иммобилизованных в Са-альгинатном геле указывают на более медленный рост последних (таблица 3). Но здесь важно подчеркнуть, что замедление и последующее прекращение роста является важным фактором, запускающим синтез вторичных метаболитов.

Таблица 3 – Показатели роста клеток

| Растение Параметр | Клетки | Индекс роста | Удельная скорость роста, сут ⁻¹ | Время удвоения биомассы, сут |
|----------------------------|------------------|--------------|---|---------------------------------------|
| <i>Syringa vulgaris</i> | свободные | 7,48±0,25 | 0,36±0,02 | 1,9±0,1 |
| | иммобилизованные | 3,50±0,56* | 0,16±0,03 | 4,1±0,3 |
| <i>Echinacea purpurea</i> | свободные | 1,28±0,09 | 0,11±0,01 | 6,3±0,4 |
| | иммобилизованные | 0,54±0,04 | 0,50±0,01 | 14,9±1,0 |
| <i>Catharanthus roseus</i> | свободные | 4,09±0,44 | 0,19±0,04 | 3,5±0,1 |
| | иммобилизованные | 2,89±0,32 | 0,13±0,02 | 4,9±0,2 |
| <i>Vinca minor</i> | свободные | 9,04±0,62 | 0,43±0,03 | 1,6±0,1 |
| | иммобилизованные | 6,55±0,56 | 0,31±0,03 | 2,2±0,1 |

Доминирующая группа ФАВ в растении сирени обыкновенной представлена фенолпропаноидами. Фенолпропаноидный гликозид сирингин, содержащийся в коре сирени, обладает нейротропным, противовоспалительным и противоаллергическим действием. Данное соединение обуславливает адаптогенные и иммуномодулирующие свойства препаратов. Для другого фенолпропаноидного гликозида вербаскозида характерны антиоксидантные (ингибирует ПОЛ), антибактериальные, иммуносупрессорные, анальгетические, гипотензивные свойства. Для вербаскозида также выявлено положительное кардиоактивное и антимагастазное действие.

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.

Растения семейства Аросупасеае являются незаменимым источником получения многих биологически активных вторичных метаболитов. Самым известным представителем семейства является катарантус розовый (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don f.) – тропическое вечнозеленое растение. Особая фармакологическая ценность этих растений обусловлена содержанием алкалоидов индольного ряда, таких, как винбластин и винкрестин, обладающих противоопухолевой активностью. Фармакологически значимыми являются также аймалицин и резерпин – алкалоиды, характеризующиеся гипотоническим действием.

Как уже отмечалось выше, процесс иммобилизации может оказывать значительное влияние на образование продуктов вторичного метаболизма посредством модификации внутриклеточных физиологических процессов.

Это подтверждается характером изменения содержания фенольных соединений в иммобилизованных клетках по сравнению со свободными (рисунок 3).

Анализ содержания ФС в ростовом цикле показал, что на 3 сутки культивирования (лаг-фаза) в свободных и иммобилизованных клетках не имело достоверных отличий (рисунок 4). Количество ФС в свободных клетках постепенно увеличивалось со временем культивирования и достигало максимума к стационарной фазе – 10 и 14 сутки культивирования – и составляло 118–126 мг/г сухой массы клеток. В иммобилизованных

клетках содержание исследуемых соединений также увеличивалось и достигало максимальных значений в стационарную фазу роста (8–14 сутки культивирования) и составило в среднем 157 мг/г сухой массы.

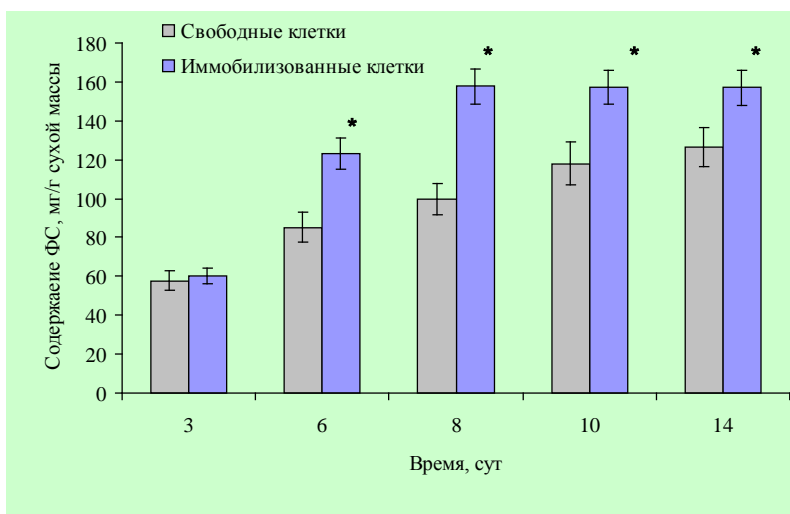


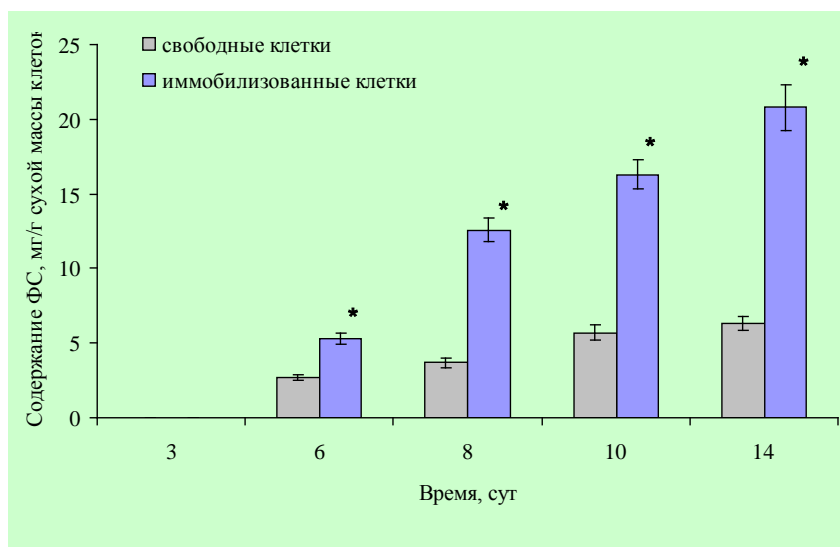
Рисунок 3 – Содержание фенольных соединений в свободных и иммобилизованных клетках суспензионной культуры *S. vulgaris* в ростовом цикле

* – различия достоверны по сравнению с контролем (свободные клетки гетеротрофной культуры) при $P \leq 0,05$

Одним из преимуществ использования иммобилизованных клеток для получения биологически активных веществ является способность клеток к экскреции этих веществ, индуцированной носителем. В среде культивирования как свободных, так и иммобилизованных клеток гетеротрофной суспензионной культуры на 3 сутки культивирования, ФС не идентифицировались (рисунок 4). Начиная с 6 суток содержание фенольных веществ в среде культивирования свободных и иммобилизованных клеток увеличивалось, причем в варианте с иммобилизованными клетками содержание этих соединений было достоверно выше по сравнению со свободными клетками. На 14 сутки культивирования – в стационарной фазе роста для обоих вариантов клеток – содержание ФС в среде культивирования иммобилизованных клеток было выше примерно в 3 раза по сравнению со свободными и составляло в среднем 20,8 мг/г сухой массы клеток. Таким образом, иммобилизованные клетки экскретировали в среду культивирования примерно 60% от общей продукции фенольных соединений, тогда как свободные клетки только около 30%. Вероятно, альгинат оказывал элиситорное действие на продукцию фенольных веществ, которое выражалось в значительной активации специфических метаболических путей.

Полученные закономерности согласуются с литературными данными, которые свидетельствуют о стимуляции экскреции различных вторичных метаболитов в результате иммобилизации растительных клеток в геле альгината кальция [105].

Анализ суммарного содержания ФС в свободных и иммобилизованных клетках и среде их культивирования (суммарной продукции фенольных соединений) показал (рисунок 5), что характер изменения суммарной продукции ФС на протяжении ростового цикла был следующим: на 3 сутки (лаг-фаза) суммарная продукция фенольных веществ была минимальной и составляла $57,6 \pm 6,0$ мг/г сухой массы. Далее происходил рост суммарной продукции фенольных соединений; максимальная продукция наблюдалась в стационарную фазу роста клеток (14 сутки культивирования), которая для иммобилизованных клеток составляла 178 ± 10 мг/г сухой массы.



Риснок 4 – Содержание фенольных соединений в среде культивирования свободных и иммобилизованных клеток суспензионной культуры *S. vulgaris* в ростовом цикле

* – различия достоверны по сравнению с контролем (свободные клетки гетеротрофной культуры) при $P \leq 0,05$

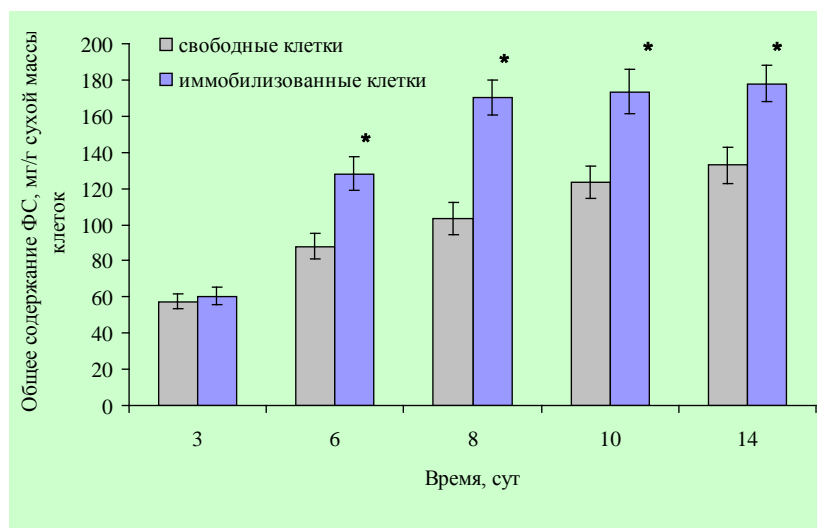


Рисунок 5 – Суммарная содержание ФС свободными и иммобилизованными клетками суспензионной культуры *S. vulgaris* в ростовом цикле

* – различия достоверны по сравнению с контролем (свободные клетки гетеротрофной культуры) при $P \leq 0,05$

В результате проведенного нами хроматографического анализа стандартных образцов и экстрактов свободных и иммобилизованных клеток суспензионной культуры сирени установлено присутствие сирингина и вербаскозида. Содержание вербаскозида в иммобилизованных и свободных клетках составляло в среднем 148 ± 12 мг/г сухой массы и 91 ± 8 мг/г сухой массы соответственно (примерно 15% и 9% сухой массы), причем иммобилизованные клетки синтезировали в 1,6 раза больше вербаскозида по сравнению со свободными. Вербаскозид был преобладающим фенольным соединением, (примерно 80% от всех веществ, выявляемых на хроматограмме [23, 24]. Содержание вербаскозида, отмеченное во многих растениях, составляет около 2% [25, 26], что значительно ниже по сравнению со свободными и иммобилизованными клетками суспензионной культуры *S. vulgaris*.

Гидроксикоричные кислоты (кумаровая, кофейная, феруловая и синаповая) в различных комбинациях, в свободном виде или в составе гликозидов и сложных эфиров содержатся во многих высших растениях. Эхинацея пурпурная является одним из наиболее

известных и богатых природных источников гидроксикоричных кислот и их производных [27], которые выступают в качестве доминирующей группы ФС данного лекарственного растения.

Нами было проведено количественное определение содержания ФС в пересчете на феруловую кислоту в свободных и иммобилизованных клетках суспензионной культуры эхинацеи пурпурной, а также в среде их инкубации на отдельных стадиях ростового цикла.

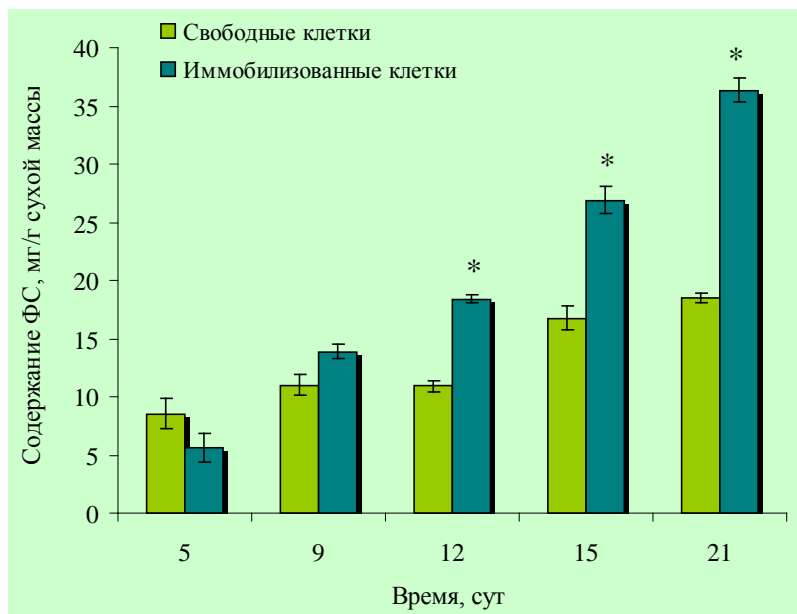


Рисунок 6 – Динамика изменения содержания фенольных соединений в свободных и иммобилизованных клетках суспензионной культуры *Echinacea purpurea* в ходе ростового цикла

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

Согласно полученным данным на начальных этапах культивирования (лаг-фаза) и в ходе лог-фазы иммобилизация клеток суспензионной культуры *Echinacea purpurea* не вызывала достоверных изменений в содержании анализируемых вторичных метаболитов, и только при переходе в стационарную фазу (12 сутки) отмечалось возрастание уровней их накопления в иммобилизованных клетках по сравнению со свободными (рисунок 6).

Содержание ФС в иммобилизованных клетках на 12 и 15 сутки было в среднем в 1,7 раза выше относительно контроля. Дальнейшее увеличение продолжительности культивирования приводило к тому, что в позднюю стационарную фазу (21 сутки) разница во внутриклеточном содержании ФС в иммобилизованных и свободных клетках составляла практически 2 раза. Это свидетельствует о возможности более длительного и эффективного культивирования иммобилизованных клеток *Echinacea purpurea* в качестве источника ФАВ фенольной природы по сравнению со свободными клетками.

Положительный эффект иммобилизации на накопление ФС, в частности гидроксикоричных кислот, в клетках суспензионной культуры эхинацеи пурпурной может быть связан с повышением активности ключевого фермента их биосинтеза – фенилаланинаммиакилазы [28]. Действительно, в работе [29] 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 [30]. В результате этого процесса происходит их перераспределение и преимущественное накопление внутриклеточных растворимых предшественников растительных фенолов.

Как уже отмечалось, в результате иммобилизации растительных клеток наблюдается увеличение экскреции вторичных метаболитов, поэтому в нашей работе также производилось определение содержания ФС в среде культивирования свободных и иммобилизованных клеток *Echinacea purpurea*.

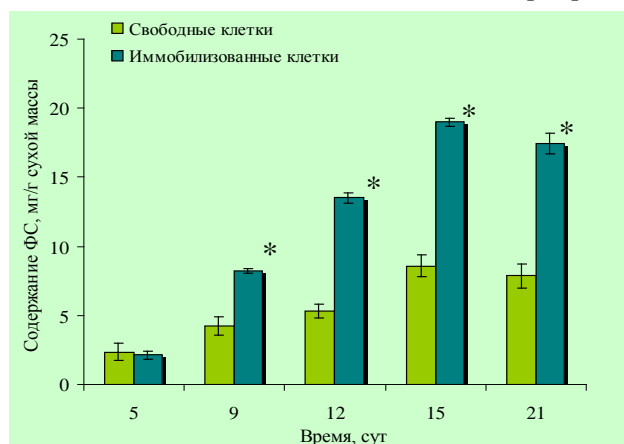


Рисунок 7 – Влияние иммобилизации на содержание фенольных соединений в среде культивирования клеток *Echinacea purpurea*
* – различия между вариантами достоверны при $P \leq 0,05$

На рисунке 7 представлено влияние иммобилизации на содержание ФС в среде инкубации клеток на разных стадиях ростового цикла.

Из рисунка видно, что существенное возрастание выделения ФС из подвергнутых иммобилизации клеток отмечалось, начиная с 9 суток культивирования (лог-фаза). На протяжении стационарной фазы в среде инкубации иммобилизованных клеток содержалось вдвое больше ФС по сравнению с культуральной средой клеточной суспензии. Таким образом, иммобилизация клеток суспензионной культуры *Echinacea purpurea* приводила не только к повышению внутриклеточного содержания ФС, но и их выделения в среду инкубации, что является важным условием для практического использования иммобилизованных растительных клеток.

Определение суммарного содержания ФС в клетках и среде их инкубации для суспензионной и иммобилизованных культур эхинацеи позволило выявить существенное возрастание их продукции при переходе в стационарную фазу цикла выращивания, т. е. при замедлении ростовых процессов (рисунок 8). В этих условиях биосинтетический потенциал иммобилизованных клеток оставался в среднем в 1,8–2 раза выше по сравнению с клетками суспензионной культуры, а примерно 30–35% синтезируемых ФС экскретировалось в среду их инкубации. Следовательно, проведение процедуры иммобилизации клеток суспензионной культуры *Echinacea purpurea* является эффективным приемом для разработки биотехнологического способа их культивирования в качестве источника ФАВ.

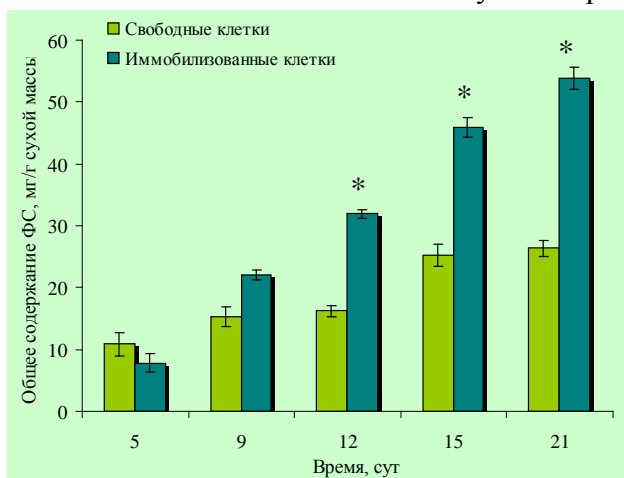


Рисунок 8 – Суммарное содержание фенольных соединений в клетках и среде инкубации суспензионной и иммобилизованной культур *Echinacea purpurea*
* – различия между вариантами достоверны при $P \leq 0,05$

Биосинтез терпеноидных индольных алкалоидов в растении *Catharanthus roseus* начинается реакцией декарбоксилирования триптофана и превращения его в триптамин [31].

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 [32].

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) (рисунок 9А) [32]. Затем в ходе дальнейшего культивирования активность фермента падала.

Активность ТДК в иммобилизованных клетках суспензионной культуры являлась максимальной на 14 сутки культивирования и составляла величину около 6,7 пмоль триптамина (мкг белка мин) (см. рисунок 9А). Кроме того, как видно на рисунке 2 прирост сухой массы иммобилизованных клеток является менее интенсивным по сравнению со свободными.

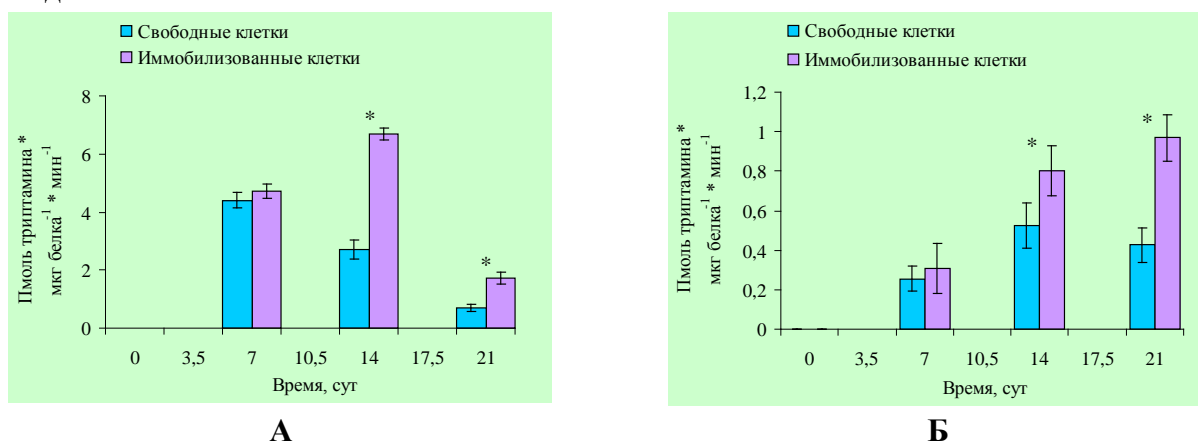


Рисунок 9 – Активность ТДК в клетках суспензионных и иммобилизованных культур *Catharanthus roseus* (А) и *Vinca minor* (Б)

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

Наибольшая ферментативная активность ТДК (0,46 пмоль триптамина / (мкг белка мин) в свободных клетках *Vinca minor* была обнаружена на 14 сутки культивирования, что также соответствовало логарифмической фазе роста культуры (рисунок 9Б). При этом до 21 суток активность сохранялась на прежнем уровне. Как и в случае иммобилизованных клеток суспензионной культуры катарантуса розового, при иммобилизации клеток барвинка малого наблюдалось типичное замедление ростовых процессов по сравнению со свободными клетками (рисунок 2). При этом наибольшая стимуляция активности ТДК в иммобилизованных клетках барвинка малого была отмечена в течение 14–21 суток инкубации (0,8–0,97 пмоль триптамина / (мкг белка мин)), которые соответствовали лог-фазе роста клеток.

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 [33]. При этом иммобилизация приводит к значительной стимуляции активности ТДК на логарифмической фазе роста по сравнению со свободными.

Содержание триптамина в иммобилизованных клетках суспензионной культуры катарантуса розового значительно ниже содержания его в суспендированных клетках в течение всего периода инкубации (рисунок 10А). 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 [32]. Кроме того, нельзя исключить стимуляции экскреции триптамина в среду инкубации клеток при иммобилизации.

При изучении содержания триптамина в свободных и иммобилизованных клетках *Vinca minor* было установлено, что максимальное содержание протоалкалоида наблюдалось на 14–21 сутки инкубации (рисунок 10В). В данном случае содержание триптамина вполне коррелировало с активностью ТДК в иммобилизованных клетках барвинка малого (рисунок 9Б), в которых наибольшая активность фермента, также как и максимальное содержание протоалкалоида, наблюдалось на 14–21 сутки.

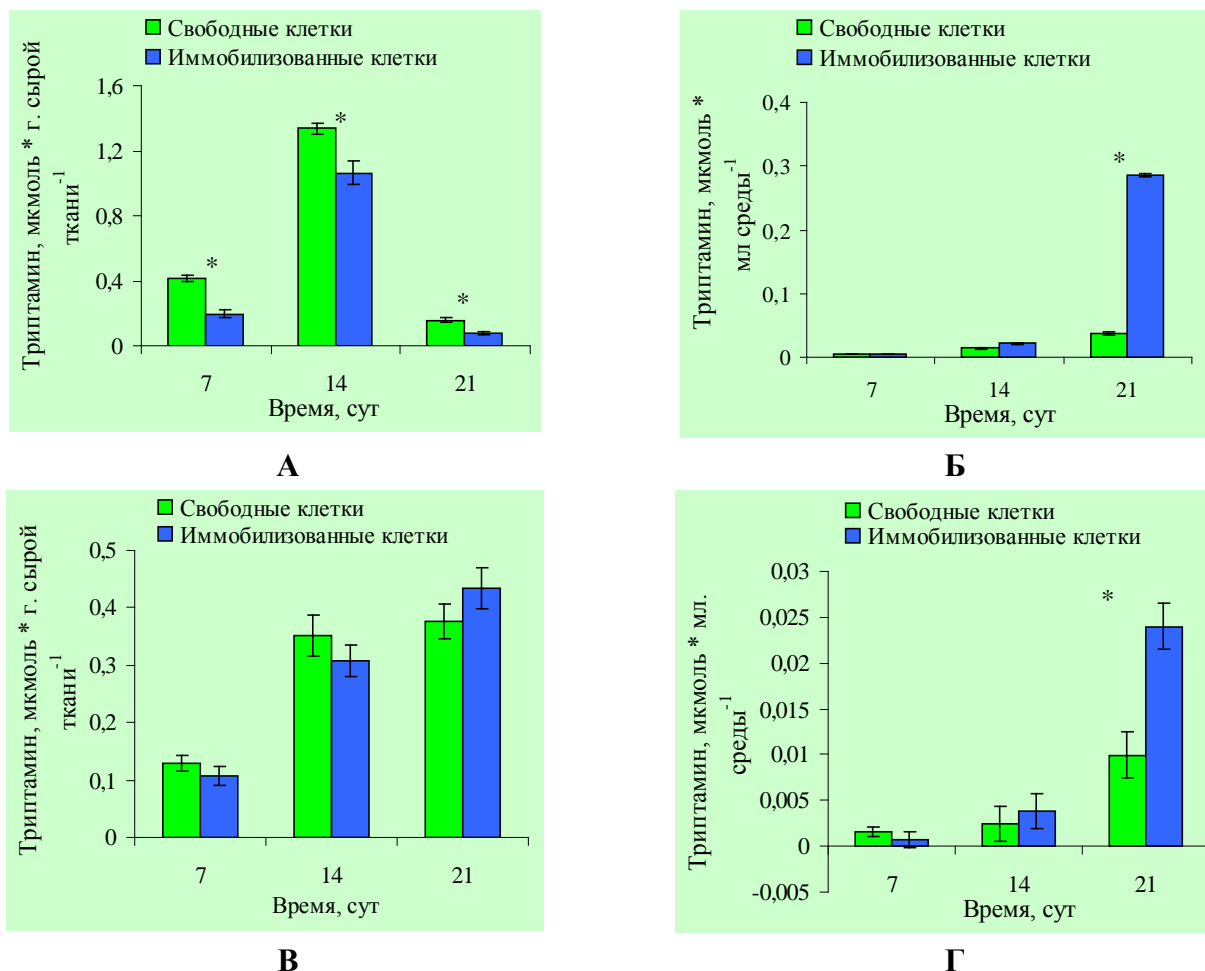


Рисунок 10 – Влияние иммобилизации на содержание внутриклеточного триптамина (А, В) и его экскрецию в среду инкубации (Б, Г) клетками *Catharanthus roseus* (А, Б) и *Vinca minor* (В, Г)

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

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 катарантуса розового подавляющее количество триптамина экскретировалось (рисунок 10Б) [32]. 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. Также было показано, что иммобилизация является индуцирующим фактором для экскреции триптамина в среду культивирования клетками барвинка малого (рисунок 10Г).

Иммобилизация в Ca^{2+} -альгинатном геле клеток барвинка малого стимулирует экскрецию отдельных алкалоидов индольного ряда в среду культивирования (см. рисунок 10) [34].

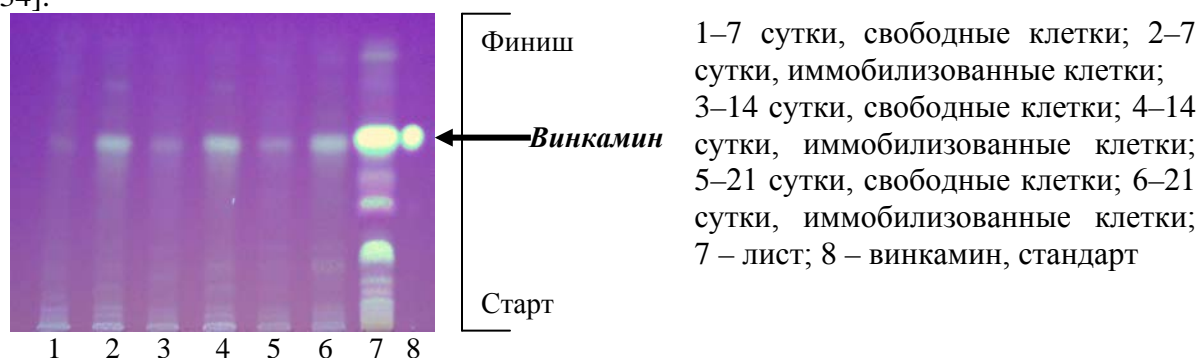


Рисунок 11 – Влияние иммобилизации на экскрецию алкалоидов в среду инкубации клетками *Vinca minor*

При хроматографическом разделении алкалоидов, выделенных из сред инкубации свободных и иммобилизованных клеток барвинка малого, было установлено наличие вещества, совпадающего по величине R_f с винкамином (рисунок 11). Причем интенсивность флуоресценции данного соединения в образцах, полученных при выделении алкалоидов из сред культивирования иммобилизованных клеток, существенно больше, чем в образцах, которые соответствуют экстрактам сред культивирования свободных клеток.

Однако хромато-масс-спектрометрический анализ не показал присутствия в экстрактах сред культивирования иммобилизованных клеток винкамина. Таким образом, соединение, R_f которого имеет одинаковую величину с R_f винкамина, вероятно, является одним из его метаболитов.

Таким образом, было показано, что иммобилизация в Ca^{2+} -альгинатном геле повышает активность ТДК в клетках исследуемых культур во время максимальной метаболической активности клеток (лог-фаза) и индуцирует экскрецию триптамина в среду культивирования на стационарной фазе роста. Впервые показано, что иммобилизация стимулирует экскрецию в среду инкубации клеток культуры *Vinca minor* винкамин-подобного соединения [34].

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.

При иммобилизации клетки растут в тесном физическом контакте друг другом, что благоприятно отражается и на химических контактах. В многоклеточном организме любая клетка окружена другими клетками, но ее положение меняется в ходе онтогенеза в результате деления как этой, так и окружающих клеток. От положения клетки в растении зависит степень и тип дифференциации. Следовательно, физическое окружение влияет на метаболизм клетки, поскольку регуляция синтеза вторичных метаболитов находится как под генетическим, так и под эпигенетическим (внеядерным) контролем, то есть любые изменения в цитоплазме могут привести к количественным и качественным изменениям в образовании вторичных метаболитов.

Таким образом, вторичный метаболизм в крупных агрегатах клеток с небольшим отношением площади к объему отличается от такового изолированных клеток и мелких групп клеток в результате действия градиентов концентрации газов. Аналогично действуют градиенты регуляторов роста, питательных веществ, механического давления. Условия окружения у диспергированных клеток и клеток в виде агрегатов различны, поэтому пути метаболизма у них также различаются.

Иницируемая иммобилизацией стрессовая реакция клетки приводит к активации сигнальных каскадов, в ряде случаев стимулируя синтез вторичных метаболитов. Модуляция метаболической активности клеток при иммобилизации, вследствие возникновения микросреды, как стрессового фактора, и/или элиситорного действия носителя, зависит от вида культуры и пути синтеза конкретного вторичного метаболита. Следовательно, идентификация путей передачи сигнала и компонентов сигнальной трансдукции позволит регулировать и повышать эффективность продукционного процесса различных видов вторичных метаболитов, ферментов и рекомбинантных белков в культурах растительных клеток.

В заключение отметим, что, вероятно, иммобилизация сыграет положительную роль в решении проблемы, связанной с использованием культур растительных клеток и тканей для получения сложных органических соединений.

Список литературы

1. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures / M. Vanisree [et al.] // *Botanical Bull. of Acad. Sinica*. – 2004. – Vol. 45. – P. 1–22.
2. Bodeutsch, T. The effect of immobilization on recombinant protein production in plant cell culture / T. Bodeutsch, E.A. James, J.M. Lee // *Plant Cell Reports*. – 2001. – Vol. 20, № 6. – P. 562–566.
3. Иммобилизованные клетки и ферменты // под ред. Вудворта Дж. М.: Мир, 1988. – 215 с.
4. Велиханова, Г.Ж. Биотехнология растений // Алматы: Конжык, 1996. – 272 с.
5. Биотехнология растений: культура клеток // под ред. Негрука М.: Агропромиздат, 1989. – С. 60–125.
6. Immobilized cell physiology: current data and the potentialities of proteomics / G.-A. Junter [et al.] // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2002. – Vol. 31. – P. 201–212.
7. Murashige, T. Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, S. Skoog // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15. – P.473–479.

8. Юрин, В.М. Оптимизация условий выращивания для повышения содержания биологически активных веществ в культуре клеток сирени обыкновенной / В.М. Юрин, М.П. Шапчиц, А.А. Булатова // Вестник БГУ, сер. 2. – 2008. – № 1. – С. 51–55.
9. 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.
10. Sahai, O.P. Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum* / O.P. Sahai, M.L. Shuler // Biotechnol. Bioeng. – 1984. – Vol. 26, № 2. – P. 111–120.
11. Филипцова, Г.Г. Фотохимическая активность клеток (сообщение 3) / Г.Г. Филипцова, М.П. Шапчиц, В.М. Юрин. // Биологически активные вещества растений в медицине, сельском хозяйстве и других отраслях: Материалы международной научно-практической конф., Минск – Нарочь, 27–30 сентября 2006 / Минск: РИВШ, 2006. – С. 239–244.
12. Имобилизованные растительные клетки. Физиолого-биохимические особенности (сообщение 1) / В.М. Юрин [и др.] // Биологически активные вещества растений в медицине, сельском хозяйстве и других отраслях: Материалы международной научно-практической конф., Минск – Нарочь, 27–30 сентября 2006 / Минск: РИВШ, 2006. – С. 227–231.
13. Юрын, У.М. Імабілізаваныя клеткі мікрыводарасцей: уплыў святла на іонныя патокі / У.М. Юрын, А.П. Кудрашоў // Вес. Акад. навук БССР. Сер. біял. навук. – 1990. – № 6. – С. 54–57.
14. Шапчиц, М.П. Влияние полимерного матрикса на потребление кислорода иммобилизованными клетками суспензионной культуры *Syringa vulgaris* / М.П. Шапчиц, А.П. Кудряшов, В.М. Юрин // Вестник БГУ. Серия 2. – 2011. – № 2. – С. 55–58.
15. Рудковская, Е.Е. Изменение транспортных свойств плазмалеммы иммобилизованных клеток водорослей под действием альгината / Е.Е. Рудковская, А.И. Соколик, В.М. Юрин // Доклады АН Беларуси. – 1996. – Т. 40, № 1. – С. 85–89.
16. Effect of immobilization on K⁺ influx in algae cells / E.E. Rudkovskaya [et al.] // Cellular @ Molecular Biol. Letters. – 1997. – Vol. 2, № 4. – P. 365–369.
17. Юрин, В.М. Имобилизованные растительные клетки. Транспортно-барьерные свойства плазматических мембран (сообщение 2) / В.М. Юрин, А.П. Кудряшов, М.П. Шапчиц // Биологически активные вещества растений в медицине, сельском хозяйстве и других отраслях: Материалы международной научно-практической конференции (Нарочанские чтения – 2), Минск – Нарочь, 27–30 сентября 2006 / Минск: РИВШ, 2006. – С. 231–239.
18. Регуляторное действие полисахаридных носителей на синтез вторичных метаболитов в иммобилизованных растительных клетках / В.М. Юрин [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – Т. 4, ч. 1. – С. 211–218.
19. Юрин, В.М. Оптимизация условий выращивания для повышения содержания биологически активных веществ в культуре клеток сирени обыкновенной / В.М. Юрин, М.П. Шапчиц, А.А. Булатова // Вестник БГУ, сер. 2. – 2008. – №1. – С. 51–55.
20. Культура растительных клеток и тканей: технология получения / В.М. Юрин [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – Т. 4, ч. 2. – С. 168–182.
21. Физиолого-биохимические исследования иммобилизованных растительных клеток / В.М. Юрин [и др.] // Современные проблемы биохимии: учебное пособие / под ред. А.П. Солодкова и А.А. Чиркина / Витебск: УО «ВГУ им. Машерова», 2010. – С. 336–357.
22. Шапчиц, М.П. Влияние условий иммобилизации на накопление фенольных соединений клетками суспензионной культуры *Syringa vulgaris* в ростовом цикле /

М.П. Шапчиц, В.М. Юрин // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: сборник трудов II Международной Интернет-конференции, г. Казань, 10–12 ноября 2011 г. / ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»; редкол. Е.Д. Изотова – Казань, 2011. – С. 377–378.

23. Идентификация фенольных соединений в суспензионной культуре и иммобилизованных клетках сирени (*Syringa vulgaris*) / М.П. Шапчиц [и др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2012. – №1. – С. 52–55.

24. Shapchits, M.P. Influence of immobilization on content of verbascoside in *Syringa vulgaris* cell suspension culture / M.P. Shapchits, A.A. Bulatova, V.M. Yurin // 1st Intern. symp. on secondary metabolites: chemical, biological and biotechnological properties, Denizli, Turkey, 12–15 Sept. 2011 / Pamukkale Univ. Fac. of Science & Arts Dep. of Biology and Chemistry ; ed. S. Söyleyici [et al.]. – Denizli, Turkey, 2011. – С. 149.

25. Toso, R.D. Plant cell culture technology: a new ingredient source / R.D. Toso, F. Melandri // Personal care. – 2010. – № 1. – P. 35–38.

26. Production of acteoside from *Cistanche tubulosa* by β -glucosidase/ S.Y. Zhao [et al.] // Pakistan J. of Pharmaceutical Sciences. – 2011. – Vol. 24, № 2. – P. 135–141.

27. Фитохимический состав представителей рода эхинацея (*Echinacea Moench.*) и его фармакологические свойства (обзор) / В.Н. Самородов [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1996. – №4. – С. 32–37.

28. Дитченко, Т.И. Действие света на активность фенилаланинаммиаклиазы в клеточных культурах *Echinacea purpurea* / Т.И. Дитченко, А.А. Митус // Материалы Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». Десятый съезд белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. – Минск, 2012. – С. 38–40.

29. 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.

30. Capsaicin biosynthesis in cell culture of Capsica / M. Holden [et al.] // J. Inst. Chem. Eng. – 1987. – P. 46–63.

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

32. Иммобилизация – эффективный прием повышения синтеза биологически активных веществ в суспензионной культуре растительных клеток / В.М. Юрин [и др.] // Труды Белорусского государственного университета. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2010. – Т.5, ч. 1. – С. 191–199.

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

34. The regulation of pharmacological active indole alkaloids biosynthesis of immobilized cells of plant family *Apocynaceae* / O.V. Molchan [et al.] // Belarus-Korea Sci. and Technol. Seminar: Proceedings, Minsk, June 27, 2011 / Ministry of Education of the Republic of Belarus, Belarusian National Technical University; editorial board: I.A. Miklashevich [et al.]. – Minsk, 2011. – P. 13.

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL NATURE OF IMMOBILIZED PLANT CELLS METABOLIC ACTIVITIES

V.M. Yurin

Belarusian State University, Minsk, Belarus

The author with coworkers describe the nature of immobilization influence on the cell suspension growth and biosynthesis of physiologically active substances with help of such models as cell cultures of *Syringa vulgaris*(Oleaceae), *Echinacea purpurea* (Asteraceae), *Catharanthus roseus* and *Vinca minor* (Apocynaceae) immobilized in calcium alginate.