

ХАРАКТЕРИСТИКА СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ КАК ОБЪЕКТА ДЛЯ ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

В.М. Юрин, Т.И. Дитченко, С.Н. Филиппова, М.В. Ключанкова, А.О. Логвина

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

e-mail: yurin@bsu.by

Введение

Получение и использование культуры клеток и тканей растений для промышленного получения физиологически активных веществ соотносится к 60-м годам прошлого века. В 1960 г. была показана возможность выращивания биомассы табака в чанах из нержавеющей стали. В 1977 г. в Японии биомассу табака (*Nicotiana tabacum*) выращивали в биореакторах объемом 20 м³, оборудованных системой механического перемешивания [1].

Культура клеток женьшеня (штамм ИФР Ж-1) впервые в мире была получена в 1960 г. из дикорастущего корня *Panax ginseng* Р.Г. Бутенко [2]. Уже в конце 70-х гг. XIX в. в России на ряде заводов Главмикробиопрома было организовано промышленное производство биомассы культуры клеток данного растения. На ее основе созданы медицинские препараты (настойка «Биоженьшень») и косметические средства (шампунь «Диона», лосьон «Женьшеневый» и др.) [3]. В Японии коммерческое производство биомассы женьшеня, используемой преимущественно в косметической промышленности и в виде пищевой добавки, началось в 1988 г. [1].

В 1974 г. Табата с сотрудниками впервые показали, что в каллусной культуре воробейника (*Lythospermum erythrorhizon*) могут синтезироваться производные шиконина [4]. В 1983 г. начато коммерческое производство шиконина японской компанией Mitsui Petrochemical Industry. Шиконин – красный нафтохиноновый пигмент, аккумулируемый в корнях многих растений семейства *Boraginaceae*. Он обладает антимикробным, противовоспалительным, ранозаживляющим и противоопухолевым действием [5].

В последние годы на основе экстракта из культуры клеток сирени (*Syringa vulgaris*) создан и запатентован препарат с названием DermasytTM для использования в косметических целях (для борьбы с акне и др.). Основным действующим веществом препарата является вербаскозид, его содержание составляет 10% [6]. В России из культуры клеток полисициаса (*Polyscias filicifolia*) производится нутрицевтик «Витагмал». Установлены адаптогенные и антистрессовые свойства названного препарата [3]. Еще один важный пример – получение противоопухолевого агента таксола на основе культуры клеток тиса (*Taxus* sp.), предпринятое фирмой Fyton (США – Германия) [3].

В настоящее время в разных странах более ста видов растений используется для получения важных для фармакопеи веществ [7]. Однако крупномасштабное производство вторичных метаболитов (ВМ) с помощью методов культуры клеток растений можно отметить лишь для относительно небольшого количества продуктов, например, шиконина, таксола, берберина, биомассы женьшеня и др. [8]. Это связано с тем, что для культур клеток и тканей растений *in vitro*, как правило, характерна более низкая биосинтетическая продуктивность по сравнению с интактным растением [9]. Поэтому при использовании клеточных культур актуальным является поиск условий, при которых обеспечивались бы оптимальные ростовые показатели и содержание фармакологически ценных веществ в биомассе.

В промышленной биотехнологии с целью получения биологически активных веществ используются, преимущественно, суспензионные культуры, поскольку для них можно применять аппаратуру и подходы, разработанные для микробиологической ферментации [10]. Их культивируют в больших количествах для получения биомассы, биологически

активных веществ, содержащихся в клетках либо выделяемых в культуральную среду [11]. Однако увеличение клеточной биомассы в результате деления клеток и синтез ВМ зачастую разобщены во времени. Поэтому необходимо хорошо знать морфологические, физиолого-биохимические характеристики суспензионных культур, чтобы получить максимальный выход целевого продукта.

Целью настоящей работы явилось получение суспензионных культур лекарственных растений представителей *Aposynaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Malvaceae*, их выращивание в лабораторных условиях в накопительном режиме, а также исследование цитоморфометрических, физиолого-биохимических показателей полученных клеточных суспензий.

Методы исследования

Объектами исследования служили суспензионные культуры алтея лекарственного (*Althaea officinalis* L.), катарантуса розового (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don), эхинацеи бледной (*Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.), эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* (L.) Moench), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), пажитника греческого (*Trigonella foenum-graecum* L.), барвинка малого (*Vinca minor* L.). Многие из отмеченных лекарственных растений относятся к интродуцированным в условиях Беларуси видам и содержат ВМ, которые проявляют иммуноактивное, адаптогенное, сердечно-сосудистое, гепатопротекторное, противоопухолевое действие [12].

В работе использовалась питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [13] с добавлением фитогормонов. В качестве ауксинов питательные среды содержали либо 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), либо 1-нафтилуксусную кислоту (1-НУК), либо β -индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). В качестве цитокинина использовался кинетин.

Суспензионные культуры инкубировали в темноте при 25°C. Постоянное перемешивание питательной среды обеспечивалось с помощью орбитального шейкера-инкубатора MaxQ 6000 Thermo Scientific со скоростью 120 об/мин. Продолжительность ростового цикла для разных культур составляла от 11 до 25 сут.

Индекс роста рассчитывали как отношение прироста сухой биомассы за определенный интервал культивирования к первоначальной массе суспензионной культуры [12].

Определение дегидрогеназной активности клеток суспензионных культур проводили с помощью тетразолиевого теста. Метод основан на способности живых клеток с помощью дегидрогеназ восстанавливать 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ) до формазана, имеющего красное окрашивание, который извлекается из клеток органическими растворителями и колориметрируется [14].

Анализ цитоморфометрических показателей и степени агрегированности суспензионных культур производили микроскопически [15]. При этом для отдельных культур осуществляли предварительное окрашивание клеток прижизненным красителем нейтральным красным (НК).

Количественное определение содержания фенольных соединений (ФС) в 70%-ных этанольных экстрактах из исследуемых суспензионных культур производили с помощью комплексообразования с реактивом Фолина-Дениса либо Фолина-Чикальтеу [16]. В случае суспензионных культур *Althaea officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida*, *Salvia officinalis*, *Trigonella foenum-graecum* определение содержания ФС (мг/г сух.в.) производили в пересчете на феруловую кислоту, для суспензионных культур *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* – в пересчете на галловую кислоту.

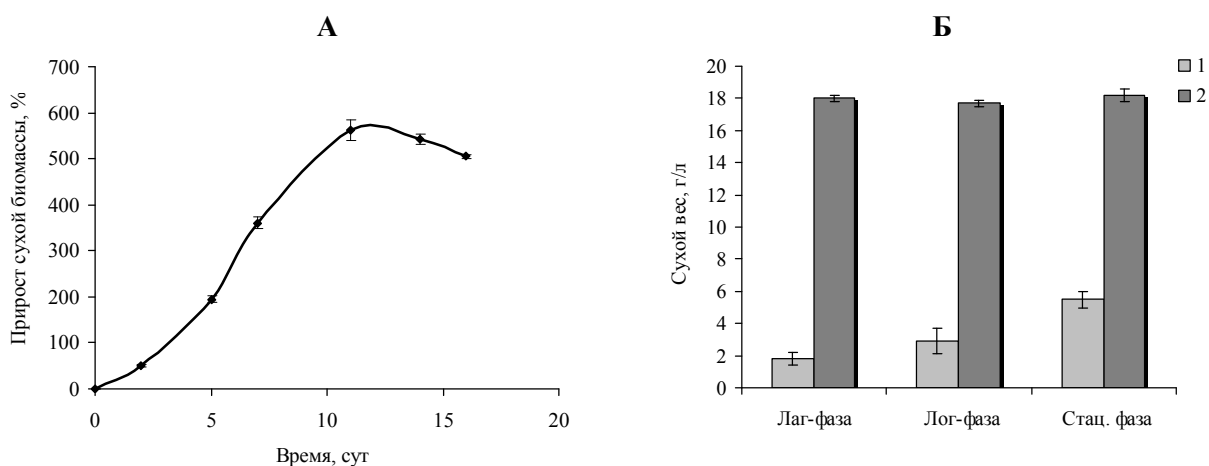
Определение содержания фенолоксилов (ФК) проводили методом прямой спектрофотометрии. Для суспензионных культур *Althaea officinalis*, *Salvia officinalis*, *Trigonella foenum-graecum* содержание суммы ФК измеряли в пересчете на галловую кислоту, а для *Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida* – в пересчете на цикориювую кислоту. Определение суммы флавоноидов (ФЛ) в пересчете на кверцетин проводили с помощью

метода дифференциальной спектрофотометрии, основанного на реакции комплексообразования биофлавоноидов с хлоридом алюминия [17].

Результаты и обсуждение

Althaea officinalis L. Важнейшей характеристикой любой суспензионной культуры растительных клеток является активность ростовых процессов, поскольку от скорости наработки биомассы, величины ее максимального уровня, продолжительности ростового цикла и отдельных его фаз зависит выбор оптимального режима культивирования. В связи с этим на первом этапе исследований проводилось изучение динамики прироста сухой биомассы клеток суспензионных культур в течение ростового цикла.

Из рисунка 1А видно, что суспензионная культура *Althaea officinalis* имеет достаточно короткую лаг-фазу, и уже начиная с 2 сут отмечается достаточно активный прирост сухой биомассы. Период с 5 по 7 сут можно охарактеризовать как фазу линейного роста, после чего происходит постепенное замедление ростовых процессов. На 10–11 сут суспензионная культура *Althaea officinalis* достигает максимума прироста сухой биомассы. При этом стационарная фаза является непродолжительной и уже с 14 сут наблюдается тенденция снижения сухого веса культуры, свидетельствующая о развитии фазы деградации. Таким образом, полученная кривая позволяет заключить, что регулярные пересадки роста суспензионной культуры *Althaea officinalis* на свежую питательную среду необходимо производить каждые 11–12 сут.



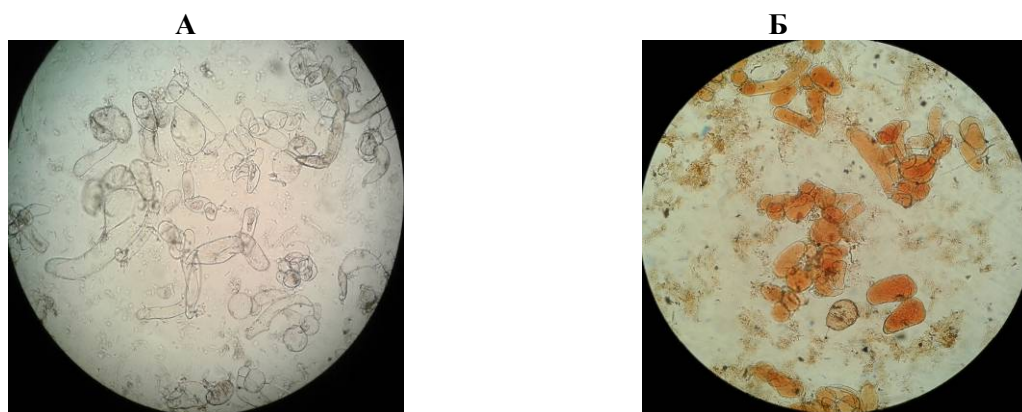
1 – начальная масса инокулюма; 2 – масса культуры в конце цикла выращивания

А – динамика прироста биомассы; Б – влияние объема инокулюма на прирост биомассы

Рисунок 1 – Ростовые характеристики суспензионной культуры *Althaea officinalis*

При субкультивировании суспензионных культур очень важно учитывать плотность суспензии. Если в начале ростового цикла минимальное количество клеток на единицу объема снижается ниже критической эффективной величины, суспензионная культура не будет расти, а при плотности клеток, значительно превышающей критический уровень, удлинится лаг-фаза и фаза экспоненциального роста [18]. В связи с этим было исследовано влияние величины начального инокулюма на прирост биомассы суспензионной культуры. Как видно из рисунка 1Б, независимо от начального объема инокулюма сухой вес культуры в конце ростового цикла находился практически на постоянном уровне и достигал 18 г/л. Расчеты индекса роста показали, что при минимальном из использованных начальных инокулюмов (2 г/л) индекс роста суспензионной культуры был равен $(9,0 \pm 0,1)$ отн. ед., при увеличении объема инокулюма до 3 г/л индекс роста снижался и составил $(5,1 \pm 0,14)$ отн. ед. Самое низкое значение индекса роста $(2,3 \pm 0,06)$ отн. ед. было зарегистрировано в случае использования первоначального инокулюма 5 г/л. Таким образом, можно заключить, что изначально высокая плотность суспензионной культуры приводит к дальнейшему торможению прироста ее биомассы, что, вероятно, связано с более быстрым истощением питательной среды.

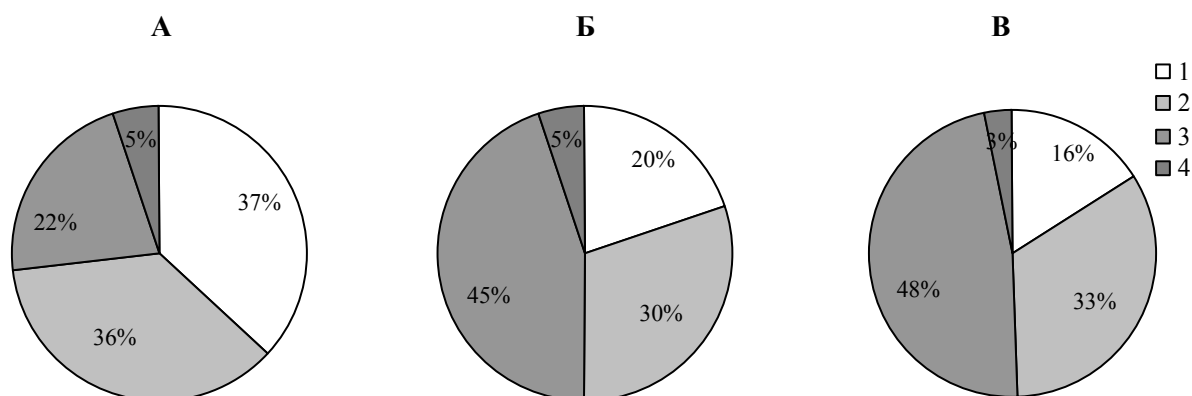
Характерной особенностью суспензионных культур растительных клеток является морфологическая гетерогенность. В клеточных популяциях наряду с делящимися мелкими (диаметр 15-50 мкм) сферическими клетками могут присутствовать более крупные, удлинённые вакуолизованные клетки, которые чаще всего полиплоидны [19]. Типичные фотографии, отражающие цитоморфометрическую характеристику суспензионной культуры *Althaea officinalis*, представлены на рисунке 2. Ее анализ позволяет заключить, что культура отличается значительной морфологической гетерогенностью и включает меристематические клетки, имеющие изодиаметрическую, сферическую форму, а также клетки паренхимного типа, имеющие овальную, вытянутую, в т.ч. изогнутую, форму.



А – контроль; Б – препарат, окрашенный НК

Рисунок 2 – Морфология клеток суспензионной культуры *Althaea officinalis*

Суспензионные культуры растительных клеток никогда не бывают однородными, состоящими только из одиночных клеток. По степени агрегированности в суспензии обычно различают 4 основные фракции: одиночные клетки, мелкие агрегаты, средние агрегаты, крупные агрегаты. В зависимости от целей исследования условия культивирования и состав питательной среды подбирают так, чтобы в суспензии преобладала определенная фракция клеток. Основными признаками хорошей суспензионной культуры служат её высокая степень дезагрегации (5-10 клеток в группе), морфологическая однородность клеток (небольшие размеры, сферические или овальная форма, плотная цитоплазма) и отсутствие дифференциации [20]. В настоящей работе анализ степени агрегированности суспензионной культуры *Althaea officinalis* производили на отдельных стадиях ростового цикла. Полученные результаты представлены на рисунке 3.



1 – одиночные клетки; 2 – мелкие агрегаты; 3 – средние агрегаты; 4 – крупные агрегаты
А – лаг-фаза; Б – лог-фаза; В – стационарная фаза

Рисунок 3 – Степень агрегированности суспензионной культуры *Althaea officinalis* на отдельных стадиях ростового цикла

Следует отметить, что в течение цикла выращивания происходит изменение соотношения одиночных клеток, мелких и средних клеточных агрегатов. В частности, отмечается тенденция к возрастанию доли средних агрегатов по мере увеличения продолжительности культивирования и снижения процента одиночных клеток. Можно предположить, что основной причиной этого является высокая пролиферативная активность исследуемой суспензионной культуры, приводящая к быстрому формированию небольших агрегатов. В целом, можно заключить, что суспензионная культура *Althaea officinalis* относится к среднеагрегированному типу.

Одним из широко используемых показателей метаболической активности клеток суспензионных культур является активность окислительно-восстановительных ферментов – дегидрогеназ, оценку которой проводят с помощью тетразолиевого теста. На рисунке 4 представлены данные о способности клеток суспензионной культуры *Althaea officinalis* к восстановлению экзогенного ТТХ до формазана.

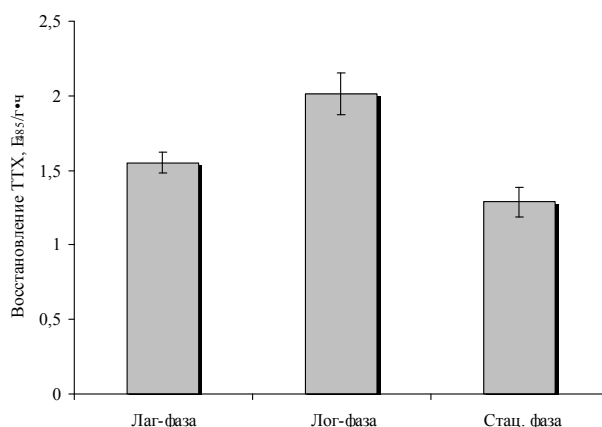
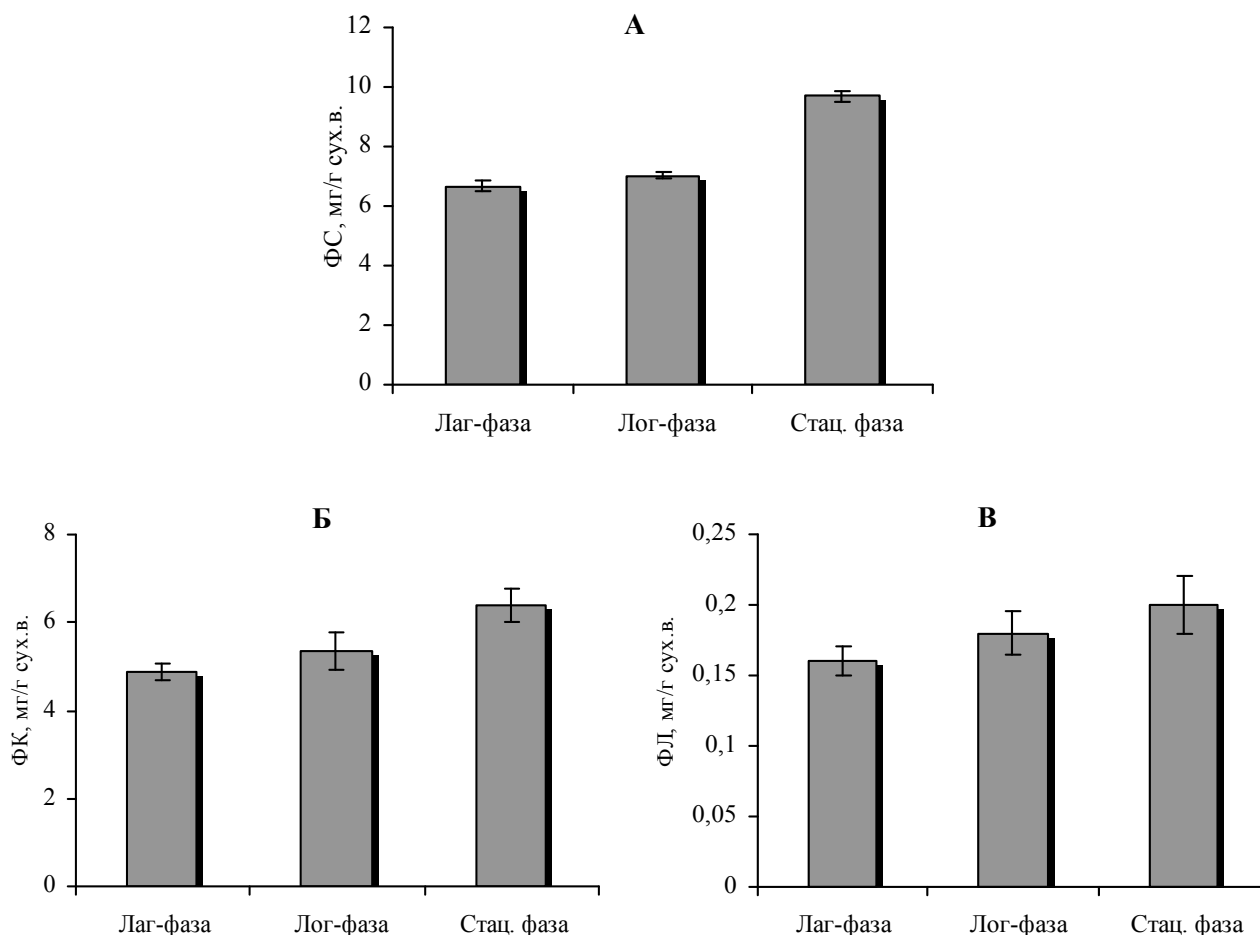


Рисунок 4 – Величины дегидрогеназной активности клеток суспензионной культуры *Althaea officinalis* на отдельных стадиях ростового цикла

Согласно полученным данным наиболее высокая дегидрогеназная активность характерна для исследуемой культуры в фазу логарифмического роста. В стационарную фазу происходит ее снижение. Промежуточное значение занимает величина дегидрогеназной активности клеток в ходе лаг-фазы. Таким образом, можно заключить, что наиболее интенсивно процессы дыхательного метаболизма протекают в исследуемой культуре при активной пролиферации клеток, а также в ходе подготовки к последующим интенсивным делениям.

С целью биохимического анализа суспензионной культуры *Althaea officinalis* в работе получали водно-спиртовые экстракты и проводили количественное определение суммарного содержания ФС, а также уровней накопления отдельных их классов, в частности, ФК и ФЛ. На рисунке 5 представлены данные, отражающие динамику накопления указанных ВМ в клетках исследуемой суспензионной культуры в течение ростового цикла. Установлено, что наиболее высокие уровни содержания суммы ФС отмечаются в культуре, находящейся в стационарной фазе ростового цикла, т.е. при достижении максимума накопления биомассы. Аналогичная тенденция отмечается и в случае ФК. Причем данные соединения составляют значительную часть комплекса ФС в исследуемой культуре, тогда как ФЛ можно рассматривать в качестве минорного его компонента. Причем их содержание незначительно изменяется в течение ростового цикла. Низкий уровень накопления ФЛ, вероятно, обусловлен тем, что синтез указанных соединений фенольной природы представляет собой достаточно сложный и многоступенчатый процесс, который не всегда в полной мере реализуется в культивируемых *in vitro* растительных клетках и тканях.

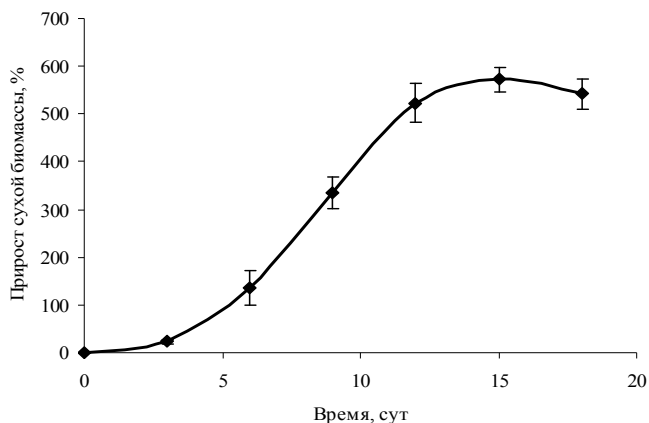


А – содержание ФС; Б – содержание ФК; В – содержание ФЛ

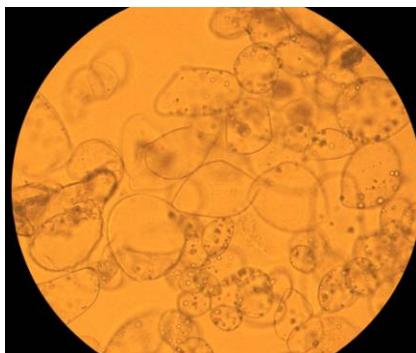
Рисунок 5 – Содержание ВМ фенольной природы в клетках суспензионной культуры *Althaea officinalis* на отдельных стадиях ростового цикла

Таким образом, полученная суспензионная культура сохраняет присущую интактным растениям способность к синтезу ВМ фенольной природы.

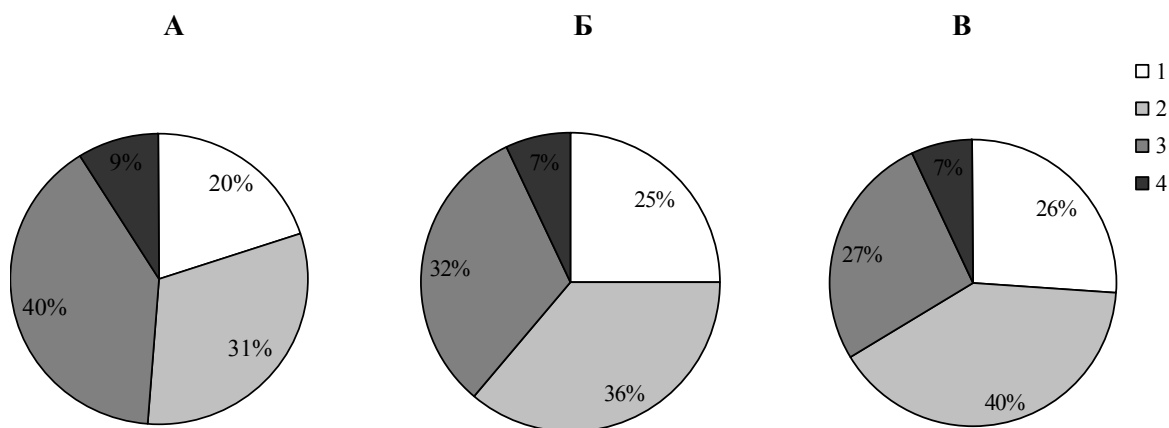
***Catharanthus roseus* (L.) G. Don.** Ростовая кривая суспензионной культуры *Catharanthus roseus* представлена на рисунке 6. Как видно из рисунка, ростовой цикл данной культуры суспендированных клеток составлял около 17 сут. Начальная стадия роста (лаг-фаза), для которой характерно практически полное отсутствие прироста биомассы, занимала не более 3 сут. За лаг-фазой следует лог-фаза, в ходе которой происходит экспоненциальное (логарифмическое) увеличение количества клеток за счет их интенсивного деления, наблюдается ряд цитологических изменений, а также активация клеточного метаболизма. Указанная фаза начиналась, примерно, с 4 сут культивирования и продолжалась до 12 сут. После фазы линейного роста происходило замедление ростовых процессов. Однако данная фаза не была четко выражена. Начиная с 12 сут инкубации, кривая роста выходила на стационарную фазу. После 15 сут культивирования наблюдалась тенденция к снижению сухого веса культуры, что свидетельствовало о наступлении процессов деградации. Таким образом, полученная ростовая кривая суспензионной культуры *Catharanthus roseus* позволяет сделать вывод о необходимости регулярных пересадок каждые 15-16 сут.

Рисунок 6 – Динамика прироста биомассы суспензионной культуры *Catharanthus roseus*

Типичная фотография, отражающая морфологию клеток суспензионной культуры *Catharanthus roseus*, представлена на рисунке 7. Детальный анализ культуры показал, что наряду с мелкими меристематическими клетками округлой или изодиаметрической формы присутствуют паренхимные сильно вакуолизированные клетки более крупного размера овальной и неправильной формы.

Рисунок 7 – Морфология клеток суспензионной культуры *Catharanthus roseus*

Анализ степени агрегированности суспензионной культуры *Catharanthus roseus* проводили на отдельных стадиях ростового цикла (рисунок 8).



1 – одиночные клетки; 2 – мелкие агрегаты; 3 – средние агрегаты; 4 – крупные агрегаты
А – лаг-фаза; Б – лог-фаза; В – стационарная фаза

Рисунок 8 – Степень агрегированности суспензионной культуры *Catharanthus roseus* на отдельных стадиях ростового цикла

Установлено, что процент одиночных клеток и мелких агрегатов увеличивается в процессе инкубации суспензионной культуры, в то время как процент средних агрегатов уменьшается. Вероятно, это связано с высокой пролиферативной активностью клеточной суспензии *Catharanthus roseus*, нарастающей вакуолизацией и тенденцией к разрыхлению клеточных стенок, что приводит к отсоединению одиночных клеток от их агрегатов. Преобладание фракций мелких агрегатов и одиночных клеток позволяет отнести суспензионную культуру *Catharanthus roseus* к слабоагрегированному типу.

Результаты оценки метаболической активности клеток исследуемой суспензионной культуры, полученные на основе их способности к восстановлению экзогенного ТТХ до формазана, представлены на рисунке 9.

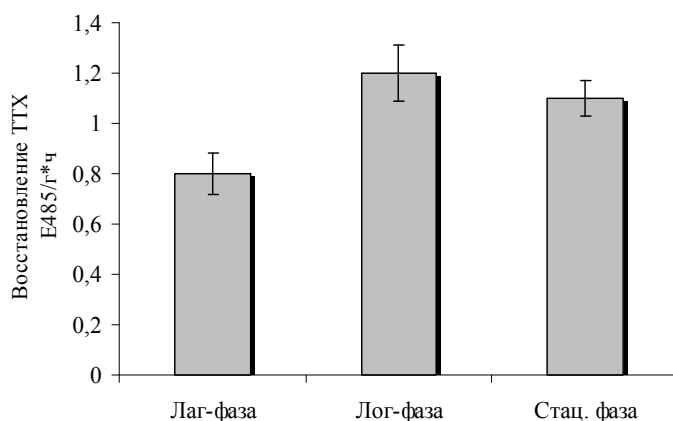
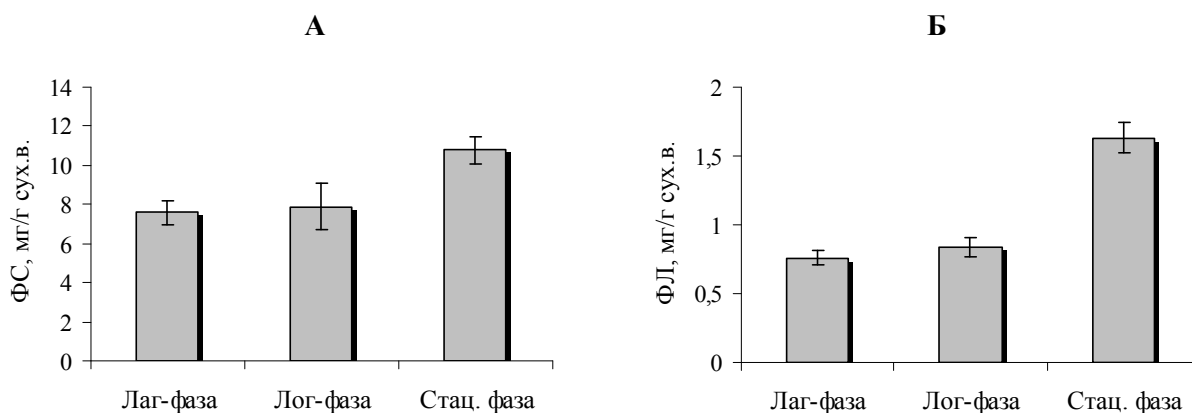


Рисунок 9 – Величины дегидрогеназной активности клеток суспензионной культуры *Catharanthus roseus* на отдельных стадиях ростового цикла

Выявлено, что минимальная величина дегидрогеназной активности наблюдалась на начальной фазе роста – лаг-фазе. В процессе дальнейшей инкубации клеток в ходе лог- фазы роста данный показатель значительно увеличивался. Статистически достоверных различий между величинами дегидрогеназной активности на лог- и стационарной фазе роста показано не было. Таким образом, также как и для суспензионной культуры *Althaea officinalis* процессы дыхательного метаболизма в клетках суспензионной культуры *Catharanthus roseus* наиболее интенсивно протекают на этапе активной их пролиферации, а также при интенсификации синтеза ВМ в ходе стационарной фазы, которое было выявлено в результате количественного определения содержания ФС и ФЛ (рисунок 10).



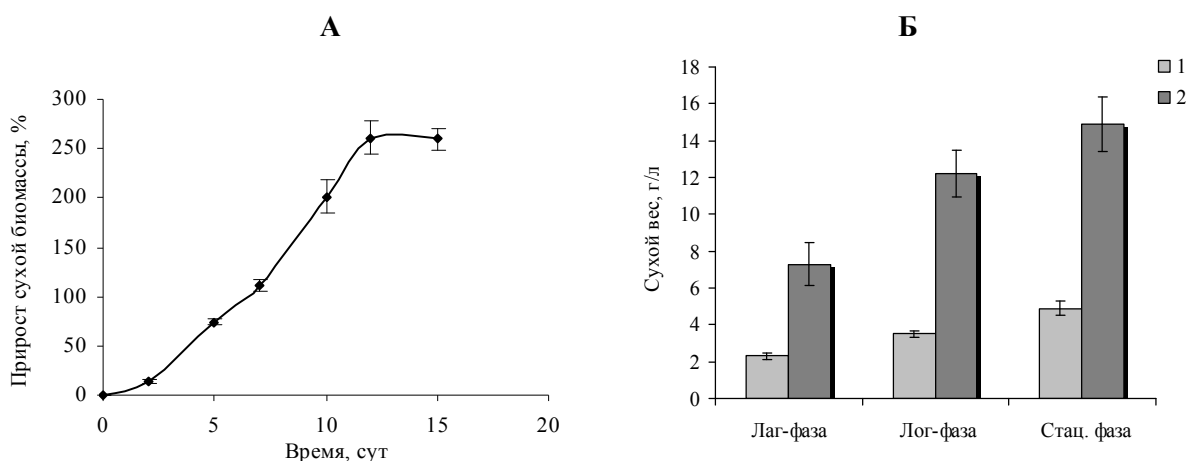
А – содержание ФС; Б – содержание ФЛ

Рисунок 10 – Содержание ВМ фенольной природы в клетках суспензионной культуры *Catharanthus roseus* на отдельных стадиях ростового цикла

Согласно полученным данным в клетках исследуемой суспензионной культуры среди общей суммы ФС биофлавоноиды занимают довольно высокое процентное отношение – около 15%. Также следует отметить, что динамика накопления ФЛ в течение ростового цикла коррелирует с данными по содержанию общей суммы ФС.

Таким образом, можно заключить, что суспензионная культура *Catharanthus roseus* характеризуется достаточно высоким биосинтетическим потенциалом в отношении таких ВМ фенольной природы как ФЛ, проявляющих существенную антиоксидантную и др. виды биологической активности, и может выступать в качестве альтернативы традиционно используемому сырью.

***Echinacea pallida* (nutt.) Nutt.** При изучении закономерностей прироста сухой биомассы суспензионной культуры *Echinacea pallida* была получена кривая роста, которая представлена на рисунке 11А.



1 – начальная масса инокулюма; 2 – масса культуры в конце цикла выращивания

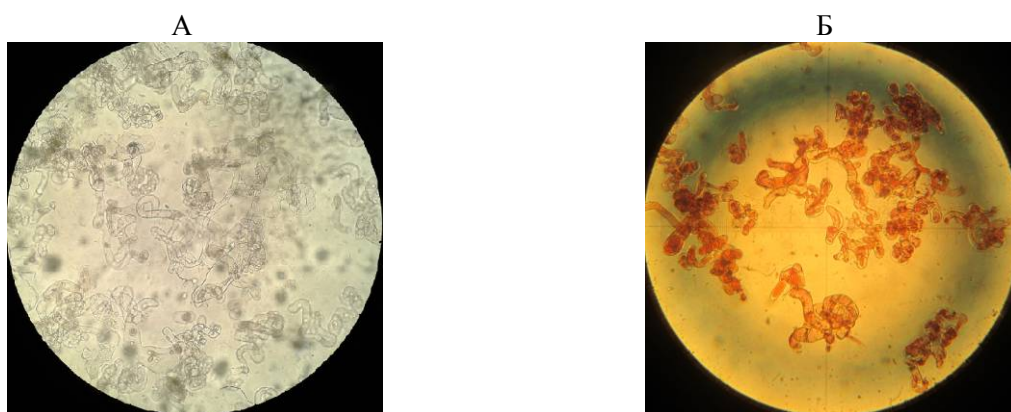
А – динамика прироста биомассы; Б – влияние объема инокулюма на прирост биомассы

Рисунок 11 – Ростовые характеристики суспензионной культуры *Echinacea pallida*

Анализ полученной кривой роста показывает, что лаг-фаза отмечалась в течение первых 2 сут после переноса культуры на свежую питательную среду. Далее по 8 сут происходил ускоренный прирост биомассы, что соответствует фазе логарифмического роста. Фаза линейного роста наблюдалась на 9–12 сут, после чего прирост биомассы останавливался, т.е. культура переходила в стационарную фазу (12–14 сут). Таким образом, особенностью полученной кривой роста являлось отсутствие четко выраженной фазы замедления роста. Оптимальная продолжительность ростового цикла составляет не более 12-13 сут.

При исследовании характера влияния первоначального объема инокулюма на ростовые характеристики суспензионной культуры *Echinacea pallida* было выявлено, что в отличие от суспензионной культуры алтея лекарственного при увеличении первоначального объема инокулюма данной культуры отмечалось возрастание биомассы в стационарную фазу ростового цикла (рисунок 11Б). Наиболее высокое значение индекса роста выявлено при использовании начального объема 3 г/л.

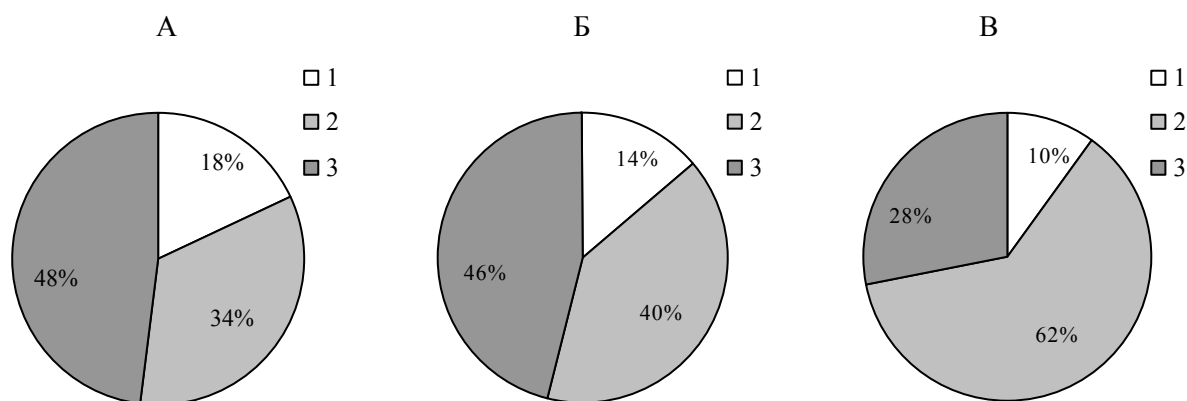
Цитоморфометрические особенности суспензионной культуры *Echinacea pallida* продемонстрированы на рисунке 12. Видно, что в исследуемой суспензионной культуре преобладают клетки вытянутой изогнутой формы, а клетки сферической формы составляют малую ее часть, что существенно отличает данную культуру от рассмотренной выше суспензионной культуры *Catharanthus roseus*.



А – контроль; Б – препарат, окрашенный НК

Рисунок 12 – Морфология клеток суспензионной культуры *Echinacea pallida*

При исследовании степени агрегированности клеточной суспензии *Echinacea pallida* на отдельных стадиях ростового цикла получены данные, представленные на рисунке 13.



1 – одиночные клетки; 2 – мелкие агрегаты; 3 – средние агрегаты

А – лаг-фаза; Б – лог-фаза; В – стационарная фаза

Рисунок 13 – Степень агрегированности суспензионной культуры *Echinacea pallida* на отдельных стадиях ростового цикла

Главной особенностью данной суспензионной культуры по сравнению с другими полученными в настоящей работе культурами явилось отсутствие фракции крупных клеточных агрегатов. Как видно из рисунка 13, в ходе лаг-фазы и лог-фазы в культуре преобладали средние агрегаты. При переходе в стационарную фазу соотношение средних и мелких агрегатов изменялось в сторону мелких клеточных скоплений, включающих от 2 до 5 клеток. Процент одиночных клеток постепенно снижался в течение ростового цикла. В целом можно заключить, что суспензионная культура *Echinacea pallida* относится к слабоагрегированному типу.

На рисунке 14 представлены различия в дегидрогеназной активности клеток исследуемой суспензионной культуры на отдельных стадиях ростового цикла. Самая высокая активность исследуемой группы ферментов отмечалась в фазу логарифмического роста.

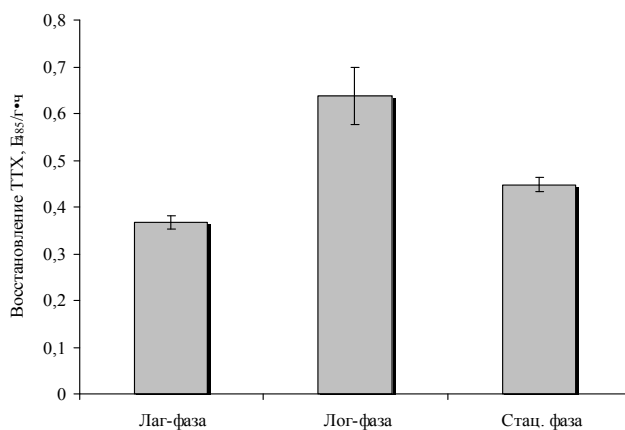
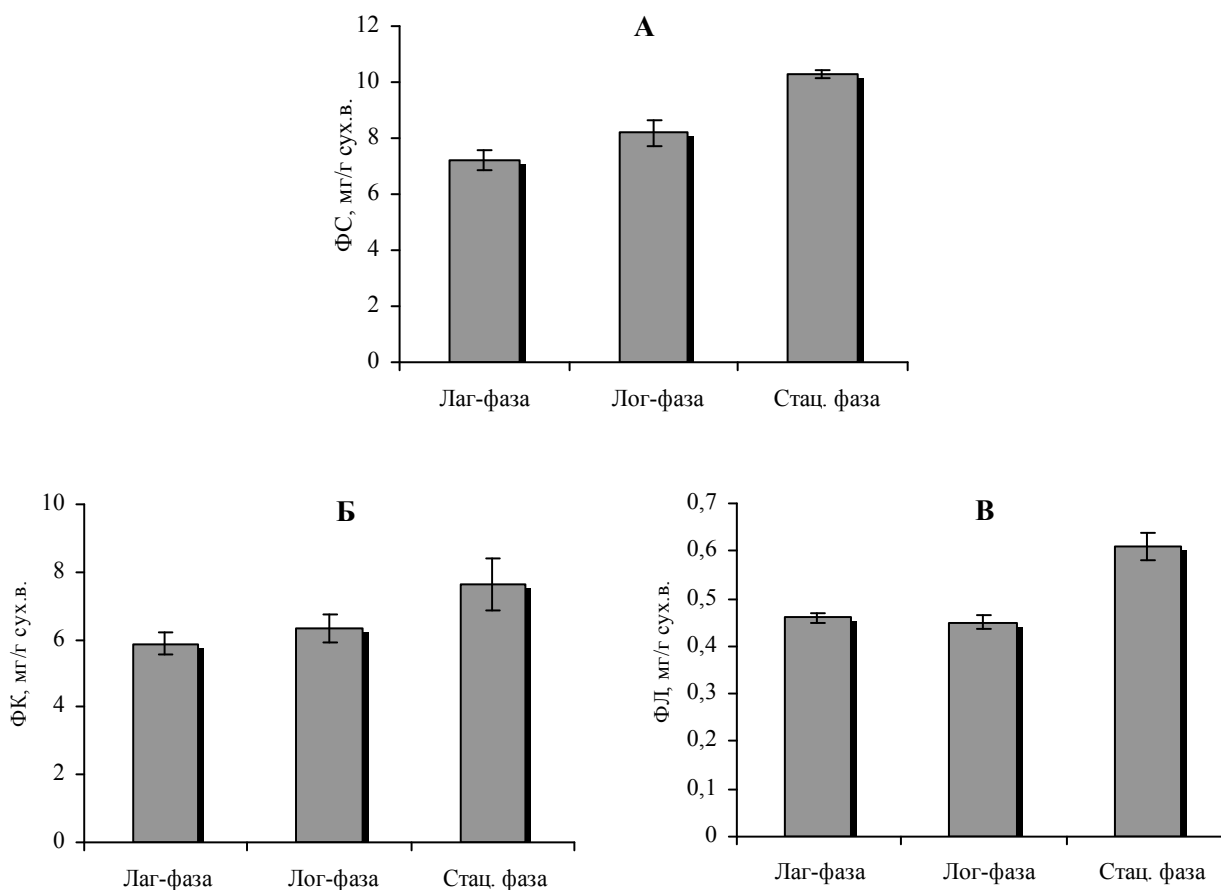


Рисунок 14 – Величины дегидрогеназной активности клеток суспензионной культуры *Echinacea pallida* на отдельных стадиях ростового цикла

Как видно из рисунка 15, наиболее высокое содержание ФС, ФК и ФЛ отмечается в стационарную фазу ростового цикла, тогда как в лаг-фазу и фазу логарифмического роста не обнаружены достоверные различия в величинах анализируемых показателей.

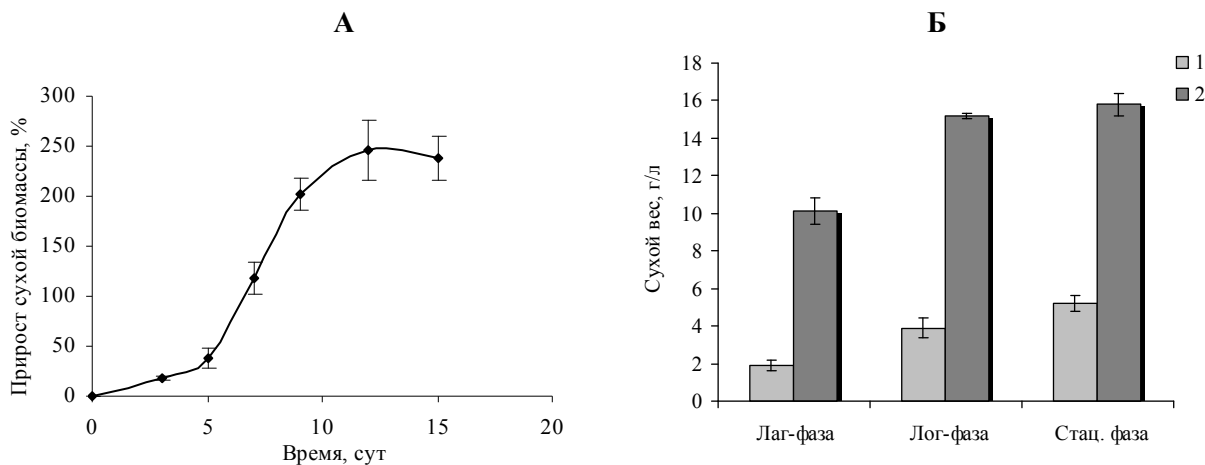


А – содержание ФС; Б – содержание ФК; В – содержание ФЛ

Рисунок 15 – Содержание ВМ фенольной природы в клетках суспензионной культуры *Echinacea pallida* на отдельных стадиях ростового цикла

Полученные данные также свидетельствуют, что ФК являются преобладающей группой фенольного комплекса суспензионной культуры *Echinacea pallida*.

***Echinacea purpurea* (L.) Moench.** При изучении закономерностей прироста биомассы суспензионной культуры *Echinacea purpurea* была получена кривая роста, которая представлена на рисунке 16. Из рисунка видно, что продолжительность лаг-фазы исследуемой культуры составила 3 сут. С 3 по 7 сут отмечалась фаза логарифмического роста, затем с 7 по 9 сут линейная фаза. С 9 по 11 сут культура переходила в фазу замедленного роста, а затем наступала короткая стационарная фаза. Также как и для суспензионной культуры *Echinacea pallida* регулярные субкультивирования целесообразно производить каждые 14-15 сут.



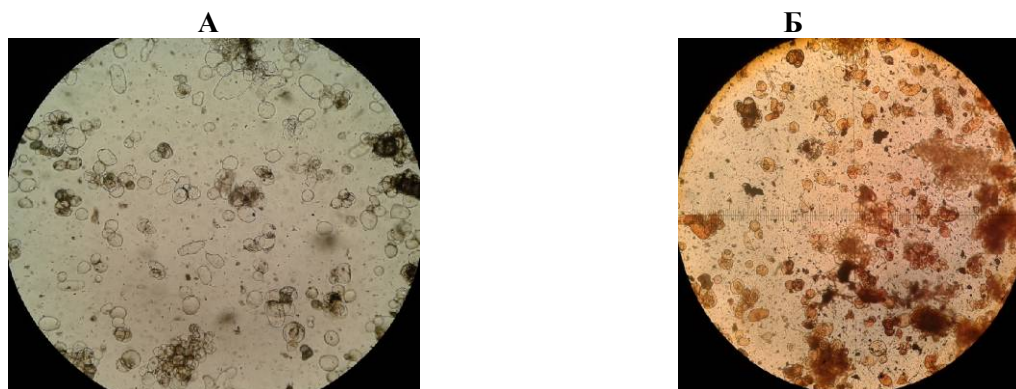
1 – начальная масса инокулюма; 2 – масса культуры в конце цикла выращивания

А – динамика прироста биомассы; Б – влияние объема инокулюма на прирост биомассы

Рисунок 16 – Ростové характеристики суспензионной культуры *Echinacea purpurea*

При увеличении первоначального объема инокулюма от 2 до 4 г/л наблюдался рост массы культуры в конце цикла выращивания. Как видно из рисунка 16Б, при дальнейшем возрастании объема инокулюма до 5,5 г/л увеличения сухого веса культуры в стационарную фазу не наблюдалось. Наиболее высокое значение индекса роста ($4,3 \pm 0,3$ отн.ед.) было установлено при использовании первоначального объема инокулюма, равного 2 г/л.

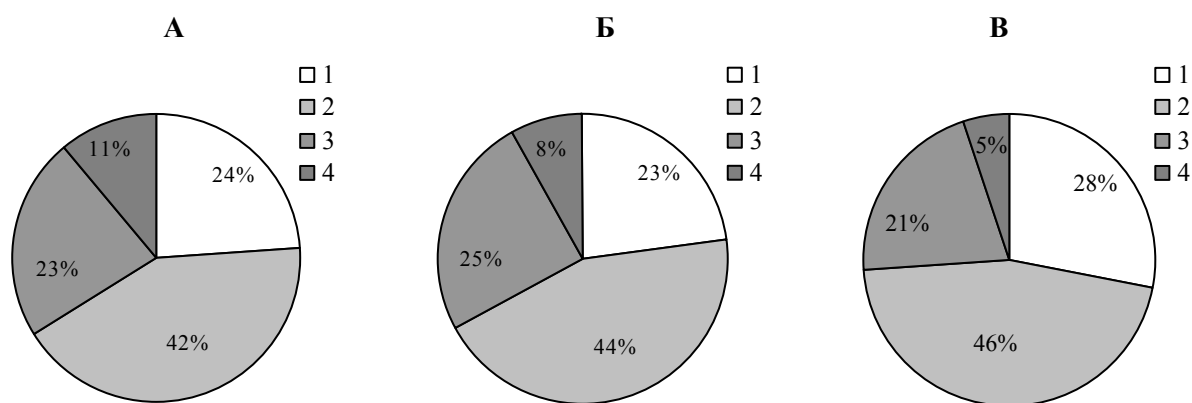
При анализе морфологии клеток суспензионной культуры *Echinacea purpurea* было выявлено, что подавляющее большинство клеток имеет сферическую форму и достаточно мелкие размеры по сравнению с другими ранее описанными культурами (рисунок 17).



А – контроль; Б – препарат, окрашенный НК

Рисунок 17 – Морфология клеток суспензионной культуры *Echinacea purpurea*

На рисунке 18 представлена динамика изменения степени агрегированности суспензионной культуры *Echinacea purpurea* в течение ростового цикла.



1 – одиночные клетки; 2 – мелкие агрегаты; 3 – средние агрегаты; 4 – крупные агрегаты
 А – лаг-фаза; Б – лог-фаза; В – стационарная фаза

Рисунок 18 – Степень агрегированности суспензионной культуры *Echinacea purpurea* на отдельных стадиях ростового цикла

Из рисунка видно, что процент одиночных клеток и мелких агрегатов поддерживаются практически на постоянном уровне. Отмечается тенденция к снижению доли крупных и средних агрегатов. В целом, можно заключить, что культура относится к слабоагрегированному типу, поскольку преобладающими фракциями являются одиночные клетки и мелкие агрегаты.

Далее в работе была произведена оценка дегидрогеназной активности клеток суспензионной культуры *Echinacea purpurea* на отдельных стадиях ростового цикла. Как видно из рисунка 19 повышение дегидрогеназной активности клеток в 1,6 раза отмечается при переходе культуры из лаг-фазы в лог-фазу ростового цикла. Затем к фазе замедления роста способность клеток восстанавливать ТТХ снижается (в среднем в 1,2 раза) и поддерживается на таком же уровне в течение стационарной фазы.

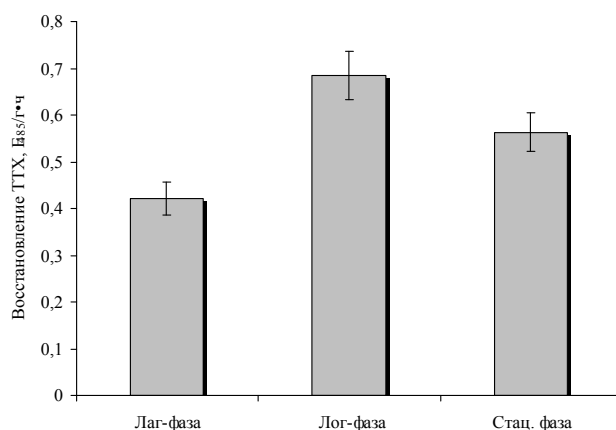
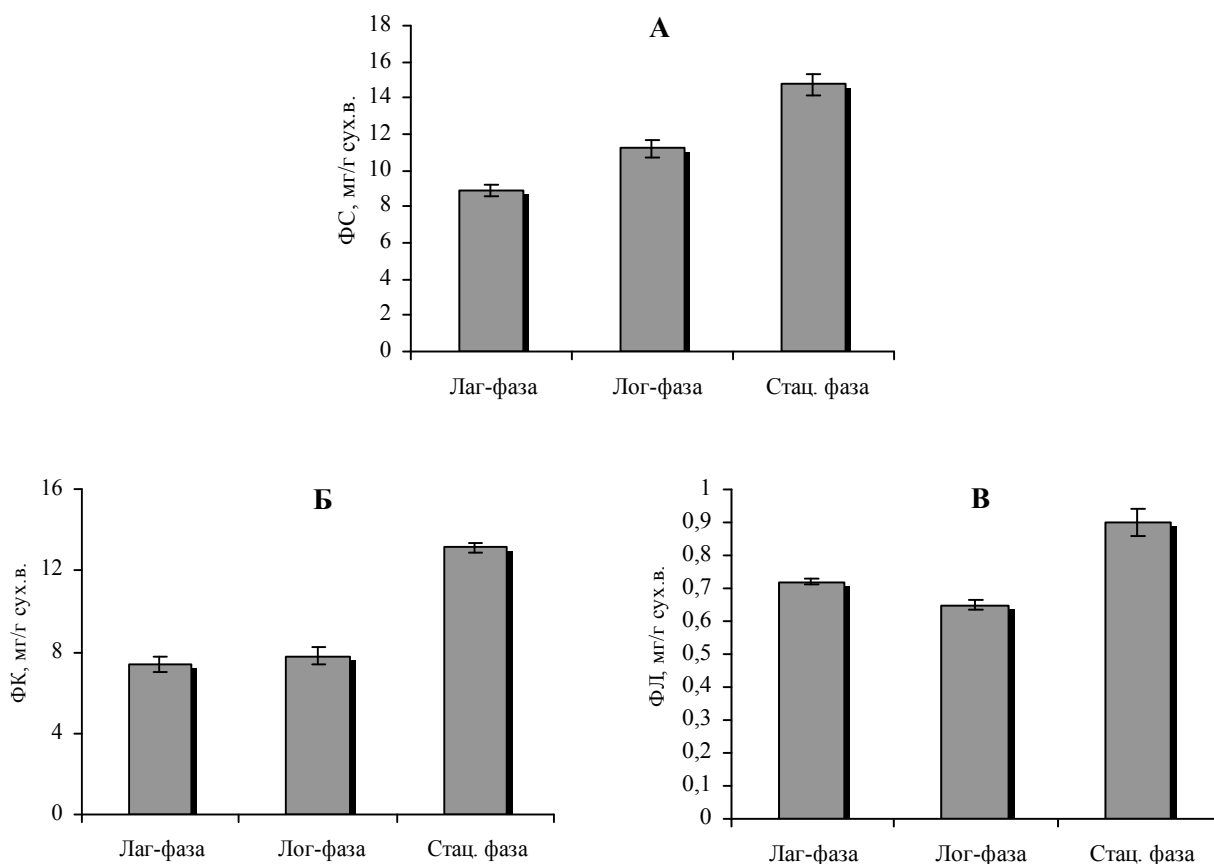


Рисунок 19 – Динамика изменения дегидрогеназной активности клеток суспензионной культуры *Echinacea purpurea* в течение ростового цикла

Количественное определение содержания ФС показало, что суспензионная культура *Echinacea purpurea* характеризуется достаточно высоким биосинтетическим потенциалом. Как видно из рисунка 20А, в стационарную фазу ростового цикла суммарное содержание растворимых ФС достигало 15 мг/г сух. в., что превышало аналогичные показатели для других исследованных в работе суспензионных культур. Содержание ФК находилось практически на одинаковом уровне в лаг- и лог-фазу, тогда как к стационарной фазе происходил рост уровней их накопления. Содержание ФЛ мало изменялось в течение ростового цикла.

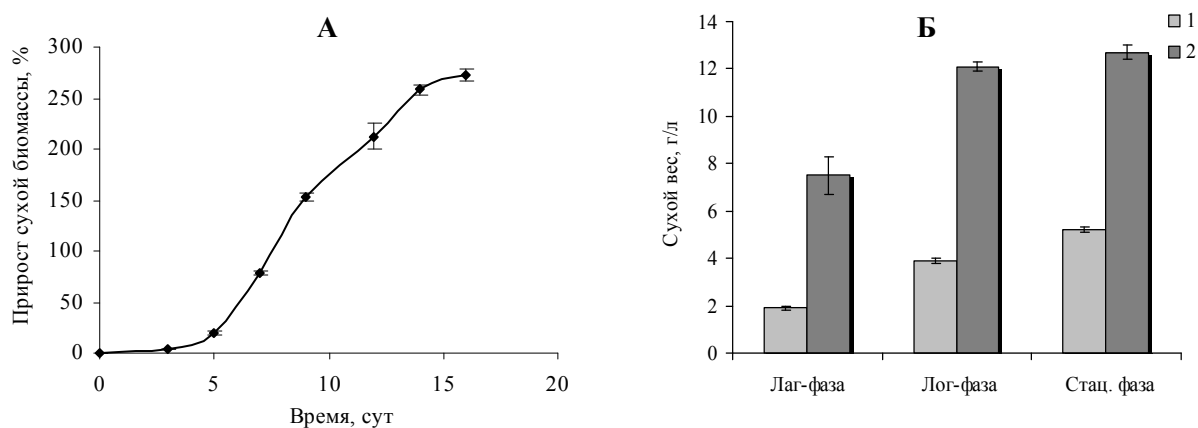


А – содержание ФС; Б – содержание ФК; В – содержание ФЛ

Рисунок 20 – Содержание ВМ фенольной природы в клетках суспензионной культуры *Echinacea purpurea* на отдельных стадиях ростового цикла

Сравнение представленных на рисунках 15 и 20 данных, позволяет заключить, что суспензионная культура *Echinacea purpurea* характеризуется более высоким содержанием ФС по сравнению с клеточной суспензией *Echinacea pallida* и, следовательно, представляет собой более перспективный биотехнологический источник ВМ фенольной природы.

Salvia officinalis L. При изучении закономерностей прироста биомассы суспензионной культуры *Salvia officinalis* была получена следующая кривая роста (рисунок 21А).



1 – начальная масса инокулюма; 2 – масса культуры в конце цикла выращивания

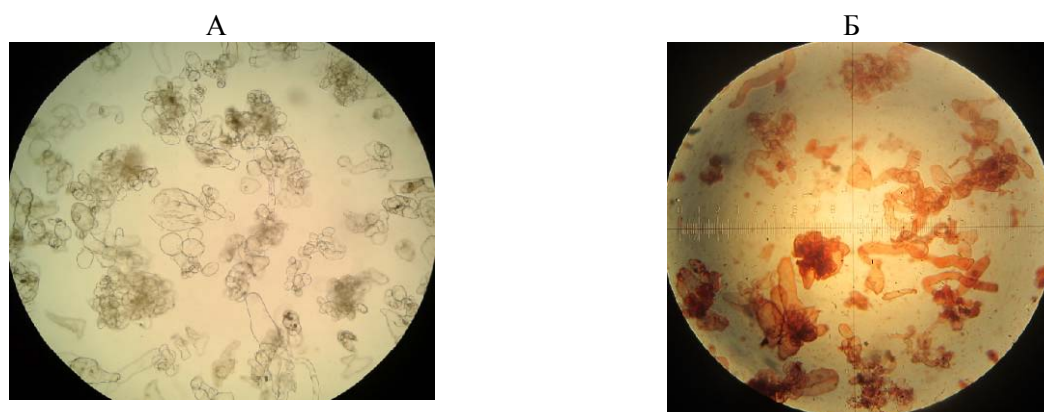
А – динамика прироста биомассы; Б – влияние объема инокулюма на прирост биомассы

Рисунок 21 – Ростовые характеристики суспензионной культуры *Salvia officinalis*

Как видно из рисунка 21А, культура имела достаточно продолжительную по сравнению с другими объектами лаг-фазу. Фазы экспоненциального и линейного роста отмечались на 4–12 сут, затем происходило замедление прироста биомассы, и уже к 14 сут культура переходила в стационарную фазу. Согласно полученным данным в течение 16 сут культивирования фазы деградации зарегистрировано не было.

Начальный объем инокулюма оказывал влияние на величину массы культуры в конце цикла выращивания, также как и для суспензионных культур представителей рода *Echinacea* (рисунок 21Б). Наиболее высокое значение индекса роста было выявлено в случае использования начальной биомассы суспензии равной 1,9 г/л. При ее увеличении до 5,2 г/л индекс роста суспензионной культуры *Salvia officinalis* снижался в 2 раза.

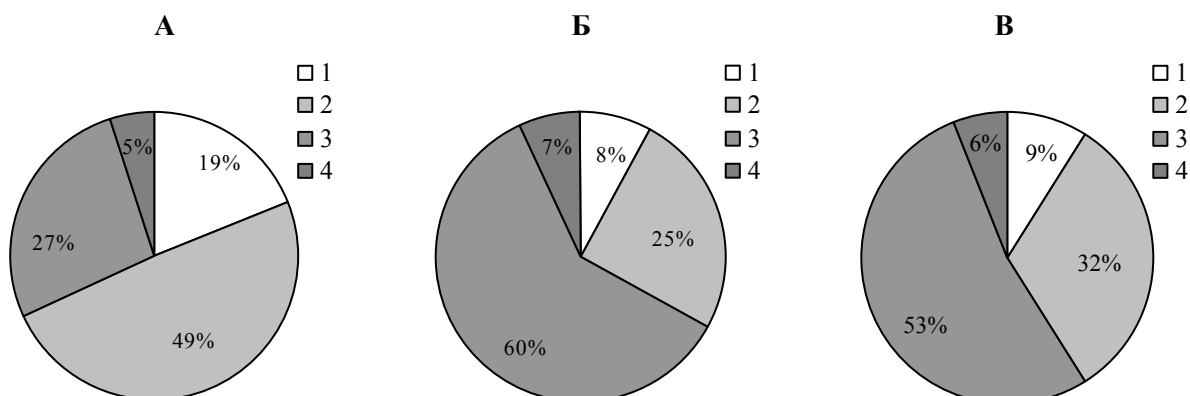
При анализе степени морфологической гетерогенности установлено, что культура включает достаточно разнообразные по форме и размерам типы клеток (рисунок 22). Наряду с клетками округлой формы присутствует большое количество клеток вытянутого червеобразного типа.



А – контроль; Б – препарат, окрашенный НК

Рисунок 22 – Морфология клеток суспензионной культуры *Salvia officinalis*

Данные, отражающие изменение степени агрегированности суспензионной культуры *Salvia officinalis* в течение ростового цикла, представлены на рисунке 23. Следует отметить, существенное возрастание доли средних агрегатов в культуре при переходе в лог-фазу ростового цикла. В стационарную фазу данная фракция также остается преобладающей, что позволяет отнести исследуемую суспензионную культуру к среднеагрегированному типу.



1 – одиночные клетки; 2 – мелкие агрегаты; 3 – средние агрегаты; 4 – крупные агрегаты

А – лаг-фаза; Б – лог-фаза; В – стационарная фаза

Рисунок 23 – Степень агрегированности суспензионной культуры *Salvia officinalis* на отдельных стадиях ростового цикла

Характер изменения дегидрогеназной активности клеток суспензионной культуры *Salvia officinalis* в течение ростового цикла не отличался от данных, полученных для других культур: наблюдалось возрастание способности клеток восстанавливать ТТХ в лог-фазу ростового цикла и ее снижение к стационарной фазе (рисунок 24).

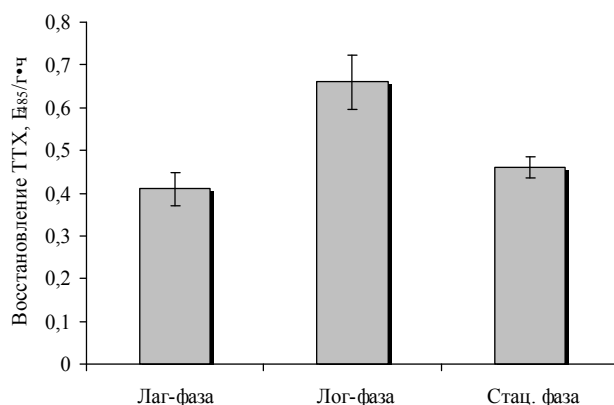
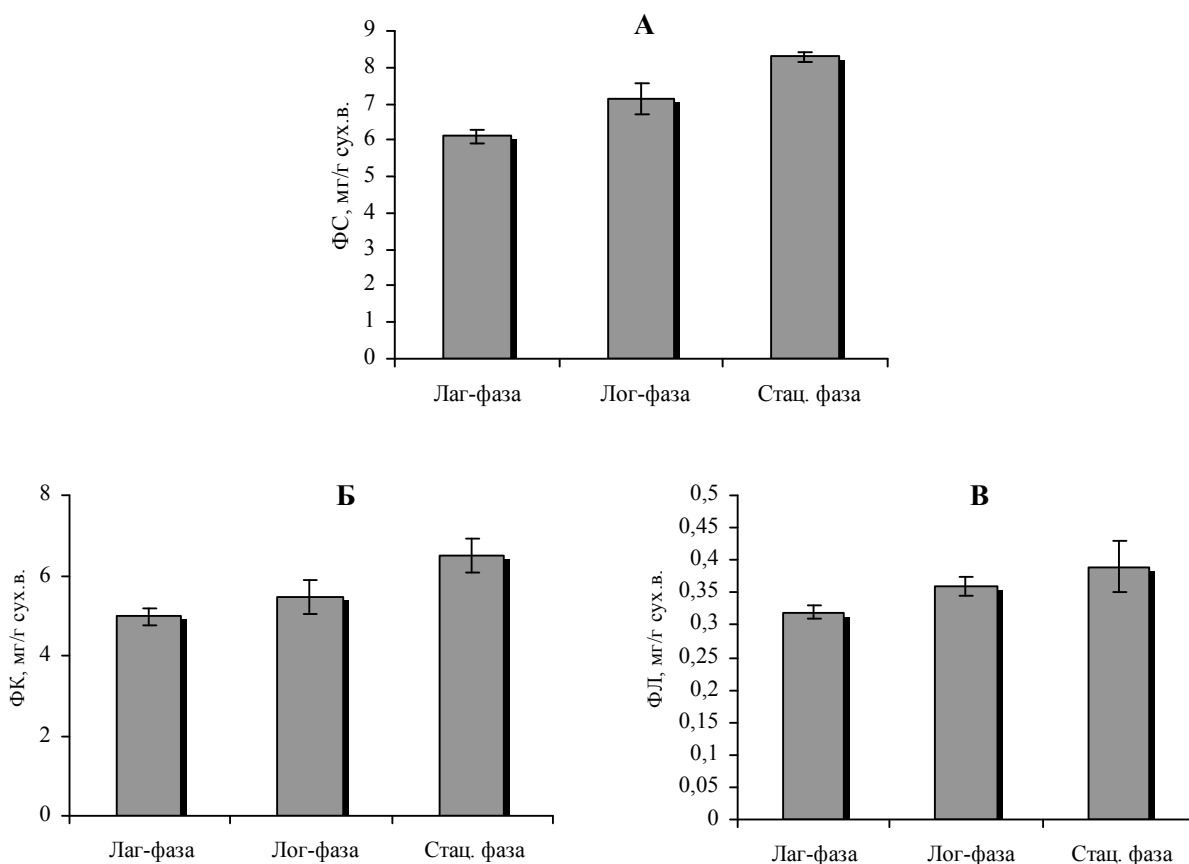


Рисунок 24 – Динамика изменения дегидрогеназной активности клеток суспензионной культуры *Salvia officinalis* в течение ростового цикла

При количественном определении содержания ФС было установлено постепенное повышение уровней их накопления в клетках исследуемой суспензионной культуры в течение ростового цикла (рисунок 25).



А – содержание ФС; Б – содержание ФК; В – содержание ФЛ

Рисунок 25 – Содержание ВМ фенольной природы в клетках суспензионной культуры *Salvia officinalis* на отдельных стадиях ростового цикла

Такая же закономерность наблюдалась и в случае количественного анализа отдельных классов фенольного комплекса – ФК и ФЛ. Следует отметить, что содержание ФК было значительно выше по сравнению с уровнями накопления ФЛ, что позволяет рассматривать суспензионную культуру *Salvia officinalis* в качестве источника простейших растворимых ФС, в частности ФК.

***Trigonella foenum-graecum* L.** Ростова кривая суспензионной культуры *Trigonella foenum-graecum* представлена на рисунке 26.

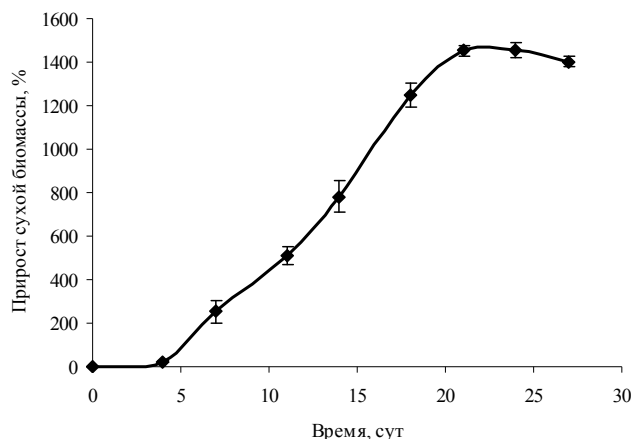


Рисунок 26 – Динамика прироста биомассы суспензионной культуры *Trigonella foenum-graecum*

Установлено, что лаг-фаза длилась в течение первых 4 сут выращивания. С 5 сут наблюдалось резкое повышение ростовой активности культуры, что свидетельствовало о переходе в логарифмическую фазу роста, продолжающуюся вплоть до 18 сут, после чего рост суспендированных клеток замедлялся. После фазы замедления роста, продолжавшейся в течение 3 сут, следовала стационарная фаза, где изменения массы клеток были незначительными. Полученная ростовая кривая суспензионной культуры *Trigonella foenum-graecum* позволяет заключить, что регулярные субкультивирования необходимо производить каждые 20–22 сут.

Цитоморфометрический анализ показал, что в культуре преобладают клетки округлой и неправильной формы, образующие скопления по 6–8 клеток, также встречаются одиночные сильно вакуолизированные крупные клетки червеобразной, спиралевидной, овальной и бобовидной формы. Необходимо отметить, что перечисленные выше типы клеток присутствовали в суспензии клеток на всех этапах ростового цикла.

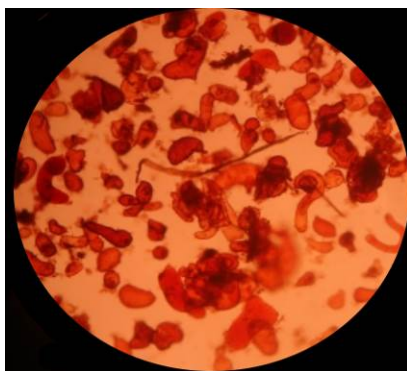
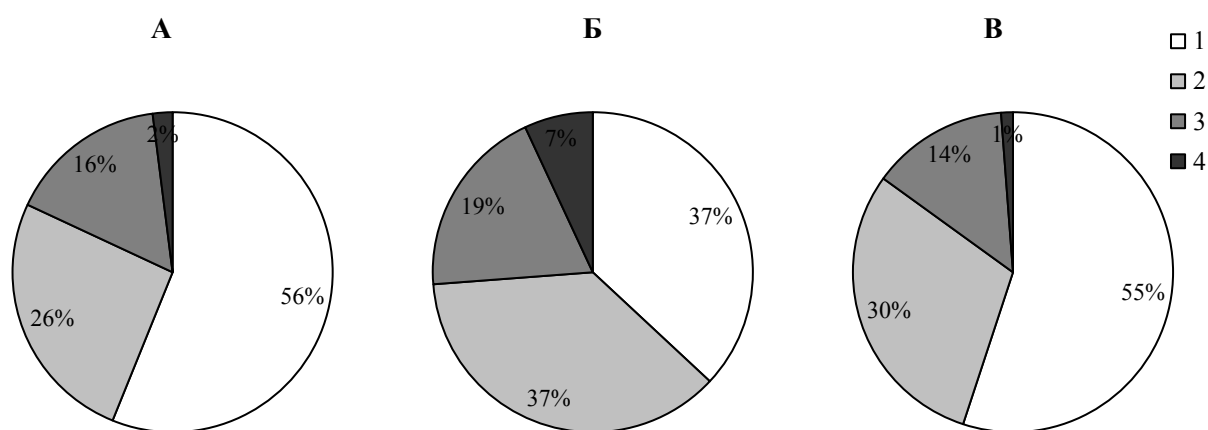


Рисунок 27 – Морфология клеток суспензионной культуры *Trigonella foenum-graecum*

На протяжении всего ростового цикла культуры преобладали одиночные клетки и мелкие агрегаты (рисунок 28). Процентное содержание первых от общего числа фракций составляло 56% в начале ростового цикла. На лог-фазе культивирования их количество уменьшилось до 37%, но уже на стационарной фазе роста число одиночных клеток было сопоставимо с исходным уровнем, наблюдаемым в ходе лаг-фазы. Доля мелких агрегатов в ходе ростового цикла варьировала в меньших пределах. Содержание средних агрегатов в культуре изменялось незначительно. Процент крупных агрегатов повышался от 2% в ходе лаг-фазы роста до 7% к лог-фазе, но далее снижался до 1%. Таким образом, суспензионная культура *Trigonella foenum-graecum* относится к слабоагрегированному типу.



1 – одиночные клетки; 2 – мелкие агрегаты; 3 – средние агрегаты; 4 – крупные агрегаты
А – лаг-фаза; Б – лог-фаза; В – стационарная фаза

Рисунок 28 – Степень агрегированности суспензионной культуры *Trigonella foenum-graecum* на отдельных стадиях ростового цикла

Результаты оценки дегидрогеназной активности клеток представлены на рисунке 29. При переходе культуры в фазу логарифмического роста способность клеток восстанавливать ТТХ возрастала в 2 раза по сравнению с лаг-фазой, а затем незначительно снижалась на стационарной фазе роста.

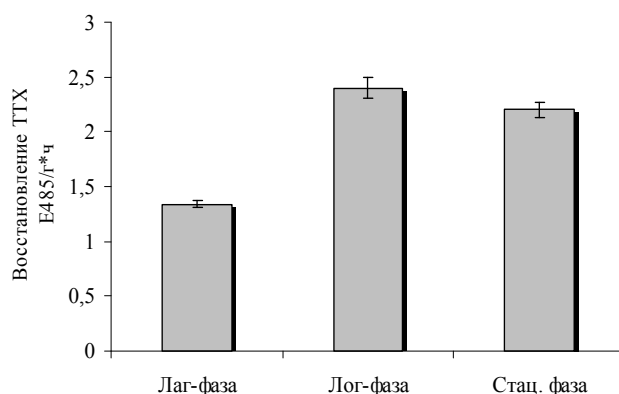
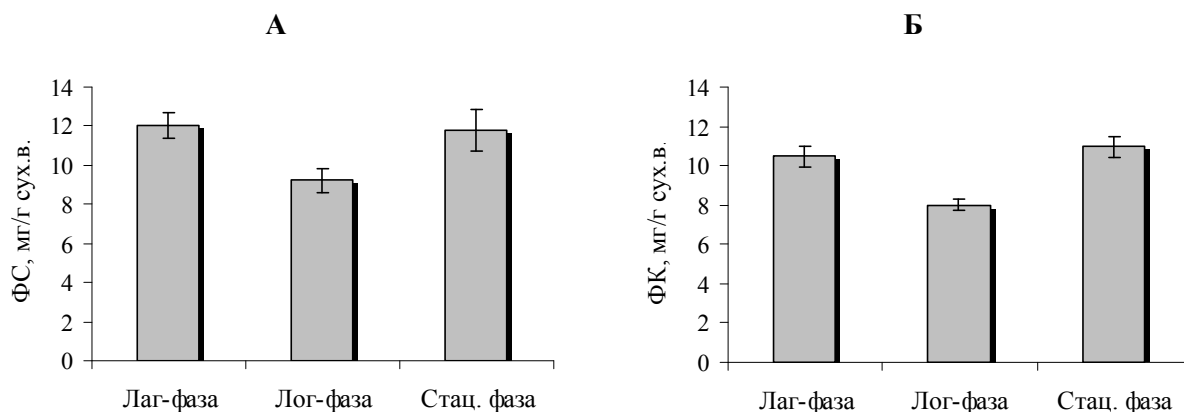


Рисунок 29 – Величины дегидрогеназной активности клеток суспензионной культуры *Trigonella foenum-graecum* на отдельных стадиях ростового цикла

На рисунке 30 представлены данные, характеризующие динамику накопления ВМ фенольной природы в клетках суспензионной культуры *Trigonella foenum-graecum* в течение ростового цикла. В отличие от результатов, полученных для других исследуемых в работе суспензионных культур, наиболее высокое содержание ФС и ФК наблюдалось одновременно на начальной (лаг-фазе) и заключительной (стационарной) фазе роста.



А – содержание ФС; Б – содержание ФК

Рисунок 30 – Содержание ВМ фенольной природы в клетках суспензионной культуры *Trigonella foenum-graecum* на отдельных стадиях ростового цикла

Следует отметить, что продукционный потенциал полученной суспензионной культуры не уступает каллусной ткани, из которой она была инициирована [21]. При этом ФК составляют преобладающее большинство среди общей суммы ФС в клетках исследуемой суспензионной культуры.

***Vinca minor* L.** Ростовая кривая суспензионной культуры *Vinca minor* представлена на рисунке 31. Из рисунка видно, что ростовой цикл данной культуры составлял около 17 сут. Начальная стадия роста занимала 3 сут. Лог-фаза начиналась примерно с 4 сут культивирования и продолжалась до 12 сут. Затем довольно четко отмечалась фаза замедления роста, длительность которой составляла 3 сут. После 15 сут кривая роста выходила на стационарную фазу.

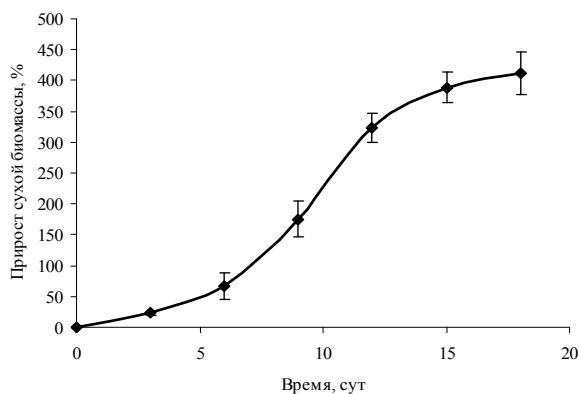


Рисунок 31 – Динамика прироста биомассы суспензионной культуры *Vinca minor*

Типичная фотография, отражающая цитоморфометрическую характеристику суспензионной культуры *Vinca minor*, представлена на рисунке 32. Видно, что наряду с мелкими делящимися меристематическими клетками изодиаметрической формы в суспензионной культуре присутствуют более крупные удлиненные, а также неправильной формы вакуолизированные клетки.

Определение степени агрегированности позволило установить, что суспензионная культура *Vinca minor* относится к слабоагрегированному типу. Согласно представленным на рисунке 33 результатам, в течение ростового цикла отмечалась тенденция к уменьшению количества одиночных клеток при одновременном возрастании фракции мелких агрегатов. Количество средних и крупных агрегатов практически не изменялось.

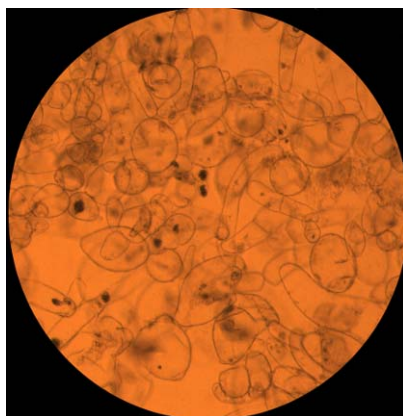
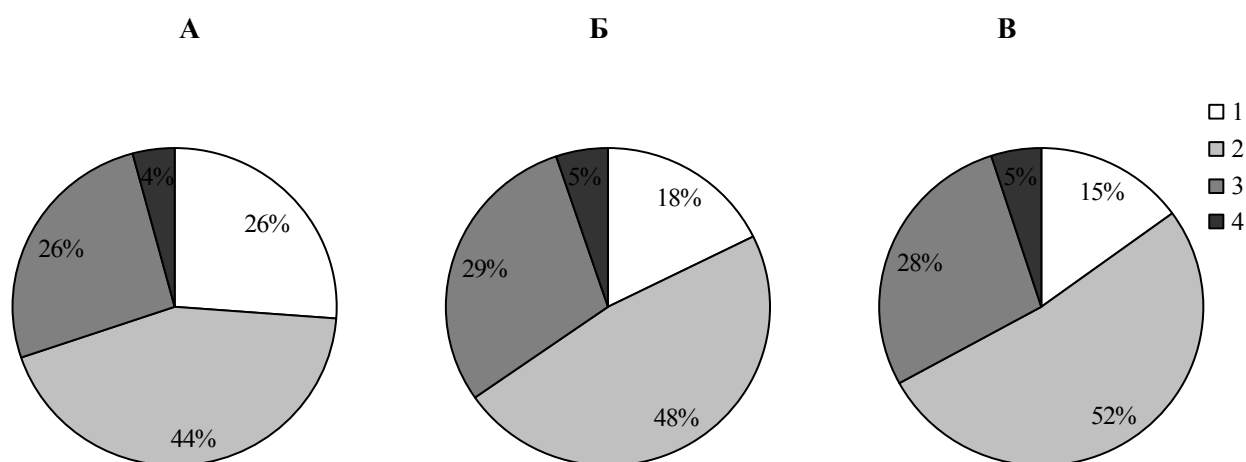


Рисунок 32 – Морфология клеток суспензионной культуры *Vinca minor*



1 – одиночные клетки; 2 – мелкие агрегаты; 3 – средние агрегаты; 4 – крупные агрегаты

А – лаг-фаза; Б – лог-фаза; В – стационарная фаза

Рисунок 33 – Степень агрегированности суспензионной культуры *Vinca minor* на отдельных стадиях ростового цикла

Минимальная величина дегидрогеназной активности клеток суспензионной культуры *Vinca minor* наблюдалась во время лаг-фазы (рисунок 34). В процессе дальнейшей инкубации клеток данный показатель постепенно увеличивался. Однако статистически достоверных различий между величинами дегидрогеназной активности клеток на лог- и стационарной фазах роста показано не было.

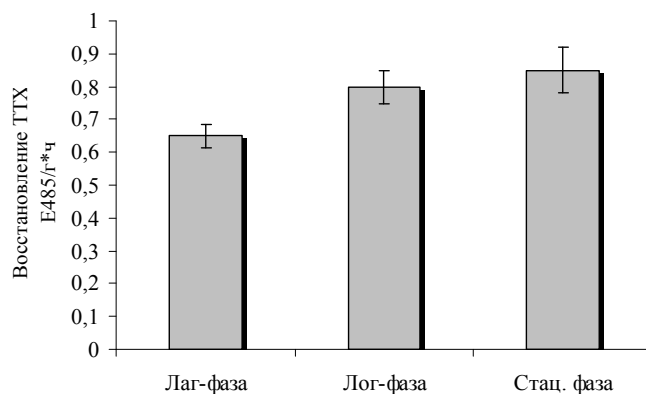
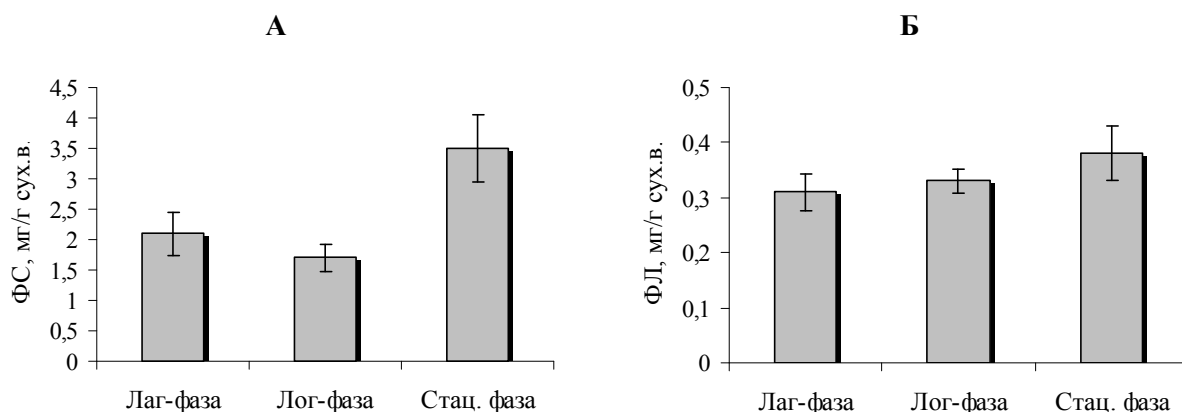


Рисунок 34 – Величины дегидрогеназной активности клеток суспензионной культуры *Vinca minor* на отдельных стадиях ростового цикла

Для анализа способности клеток суспензионной культуры *Vinca minor* к синтезу ВМ фенольной природы было проведено количественное определение их суммарного содержания, а также суммы ФЛ. На рисунке 35 представлены данные, характеризующие динамику накопления вышеуказанных соединений в клетках суспензионной культуры в течение ростового цикла. Максимальное содержание ФС наблюдалось в ходе стационарной фазы роста (в среднем в 2 раза выше по сравнению с лаг- и лог- фазами). При анализе содержания ФЛ на отдельных фазах ростового цикла статистически достоверных различий в их накоплении установлено не было.



А – содержание ФС; Б – содержание ФЛ

Рисунок 35 – Содержание ВМ фенольной природы в клетках суспензионной культуры *Vinca minor* на отдельных стадиях ростового цикла

Заключение

В работе получены стабильные суспензионные культуры 7 видов лекарственных растений: *Althaea officinalis*, *Catharanthus roseus*, *Echinacea pallida*, *Echinacea purpurea*, *Salvia officinalis*, *Trigonella foenum-graecum*, *Vinca minor*. Проведен их цитоморфометрический анализ, включающий описание степени морфологической гетерогенности, определение типа суспензионной культуры в зависимости от степени агрегированности. Установлено, что большинство исследуемых культур относится к слабоагрегированному типу. Среднеагрегированными являются суспензионные культуры *Althaea officinalis* и *Salvia officinalis*. Морфологическая гетерогенность наименее выражена для суспензионных *Echinacea purpurea* и *Trigonella foenum-graecum*. Наряду с высокой степенью дезагрегации морфологическую однородность клеток указанных культур можно рассматривать в качестве несомненных достоинств, которые важны с биотехнологической точки зрения.

С целью выявления физиолого-биохимических особенностей исследуемых суспензионных культур получены кривые их роста, определена оптимальная продолжительность цикла выращивания, а также проанализирован характер влияния начального объема инокулюма на величину сухой биомассы в конце цикла выращивания. Наиболее высокими показателями прироста биомассы характеризуются суспензионные культуры *Trigonella foenum-graecum*, *Catharanthus roseus*, *Althaea officinalis*. Продолжительность ростового цикла варьирует от 11-12 сут (суспензионная культура *Althaea officinalis*) до 20-22 сут (суспензионная культура *Trigonella foenum-graecum*). Однако для большинства культур она равна 15-16 сут. Показано, что изначально высокая плотность клеточной суспензии приводит к дальнейшему торможению прироста ее биомассы, в связи с чем, целесообразно определение оптимального размера начального объема инокулюма для каждой конкретной культуры. В частности, для суспензионных культур *Althaea officinalis*, *Echinacea purpurea*, *Salvia officinalis* данный показатель не должен превышать биомассу, соответствующую 2 г сух.в. культуры на 1 литр питательной среды.

Клетки всех исследованных суспензионных культур накапливают ВМ фенольной природы. При этом наиболее высокий уровень их продукции отмечается при переходе в стационарную фазу ростового цикла. Исключение составляет суспензионная культура *Trigonella foenum-graecum*, которая характеризуется практически равными уровнями содержания суммы ФС в ходе лаг-фазы и стационарной фазы. Наиболее высокий биосинтетический потенциал в отношении суммы ВМ фенольной природы и, в частности, ФК, в стационарную фазу ростового цикла выявлен для суспензионной культуры *Echinacea purpurea*, тогда как максимальное содержание ФЛ обнаружено для суспензионной культуры *Catharanthus roseus*, что позволяет рассматривать данные культуры как альтернативу традиционно используемому лекарственному сырью.

Установленные закономерности выступают в качестве теоретической основы для масштабирования технологии глубинного культивирования клеток исследуемых лекарственных растений в накопительном режиме.

Список литературы

1. Ермишин, А.П. Биотехнология растений и биобезопасность: пособие / А.П. Ермишин, Е.В. Воронкова. – Мн.: БГУ, 2015. – 359 с.
2. Бутенко, Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. - М.: Наука, 1964. - 272 с.
3. Носов, А.М. Культура клеток высших растений: от теории к практике / А.М. Носов // Биология в школе. – 2004. – № 5. – С. 4–8.
4. Tabata, M. Recent advances in the production of medicinal substances by plant cell cultures / M. Tabata // Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application. – 1977. – P. 3–16.
5. Карпук, В.В. Фармакогнозия: учеб. пособие (Классическое университетское издание) / В.В. Карпук. – Мн.: БГУ, 2011. – 340 с.
6. Toso, R.D. Plant cell culture technology: a new ingredient source / R.D. Toso, F. Melandri // Personal care. – 2010. – № 1. – P. 35–38.
7. Karuppusamy, S A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures / S. Karuppusamy // Journal of Medicinal Plants Research. – 2009. – Vol. 3, № 13. – P. 1222–1239.
8. Bioprocess consideration for production of secondary metabolites by plant cell suspension cultures / S. Chattopadhyay [et al.] // Biotechnology and Bioprocess Eng. – 2002. – Vol. 7, № 3. – P. 138–149.
9. Юрин, В.М. Имобилизованные клетки лекарственных растений / В.М. Юрин. – Германия: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2014. – 130 с.
10. Misawa, M. Plant Tissue Culture: an alternative for production of useful metabolite / M. Misawa // FAO Agricultural Services Bulletin. – 1994. – № 108. – P. 1–87.
11. Биотехнология культур клеток и тканей животных и растений / С.Е. Строгов [и др.] // Биотехнология биологически активных веществ / под ред. И.М. Грачевой, Л.А. Ивановой. – М.: Элевар, 2006. – С. 71–88.
12. Разработка эффективных способов депонирования каллусных культур ценных лекарственных растений / С.Н. Филиппова [и др.] // Труды БГУ. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2015. – Т. 10, ч. 1. – С. 205–220.
13. 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.
14. Еникеев, А. Г. Об использовании 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида для оценки жизнеспособности культур растительных клеток / А. Г. Еникеев, Е. Ф. Высоцкая, Л.А. Леонова // Физиология растений. – 1995. – Т. 42, № 3. – С. 423–426.
15. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учебное пособие / И.К. Сорокина [и др.]. – Саратов: СГУ, 2002. – 45 с.

16. Slinkard, K. Total phenol analysis: automation and comparison with manuel methods / K. Slinkard, V.L. Singleton // American journal of enology and viticulture. – 1977. – Vol. 28. – P. 49-55.
17. Запрометов, М.Н. Фенольные соединения. Распространение, метаболизм и функции в растениях / М.Н. Запрометов. – М.: Наука, 1993. – 272 с.
18. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин [и др.]. – К.: Наук. Думка, 1980. – 488 с.
19. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. - М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
20. Биотехнология: теория и практика: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений / Н.В. Загоскина [и др.] ; ред. Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко. – М.: Оникс, 2009. – 493 с.
21. Логвина, А.О. Содержание фенольных соединений и антиоксидантный потенциал каллусных линий и нативных растений *Trigonella foenum-graecum* / А.О. Логвина // Труды БГУ. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2014. – Т. 9, ч. 1. – С. 58–63.

CHARACTERIZATION OF CELL SUSPENSION CULTURE AS AN OBJECT FOR INDUSTRIAL PRODUCTION OF PHARMACOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

V.M. Yurin, T.I. Ditchenko, S.N. Filipava, M.V. Klyuchankova, H.O. Lohvina

Belarusian State University, Minsk, Belarus

e-mail: Yurin@bsu.by

Single cell suspension culture technique is very important for obtaining of biologically active substances from pharmacologically valuable plants. Stable suspension cultures of 7 medicinal plant species (*Althaea officinalis*, *Catharanthus roseus*, *Echinacea pallida*, *Echinacea purpurea*, *Salvia officinalis*, *Trigonella foenum-graecum* and *Vinca minor*) were obtained during the experiments. Species-specific and physiologically-biochemical characteristics of the studied cultures were determined. The obtained regularities serve as a theoretical basis for scaling investigational medicinal plant cell culture technology deep in the storage mode.