

5.4.5 Культура растительных клеток как источник получения биологически активных веществ

Роль биотехнологии в решении сырьевых проблем фармацевтической отрасли промышленности. Культура растительных клеток как источник получения биологически активных веществ.

Промышленные биотехнологии направлены на производство продуктов растительного происхождения с использованием в качестве объектов культур клеток и реже - органов растений (прежде всего корней, в том числе трансформированных).

Биотехнологические коллекции растительных объектов

Многие лекарственные растения относятся к редким или исчезающим видам, поэтому биотехнологические коллекции не только важны для экологических целей (сохранения видов), но и имеют большое экономическое значение. Существуют два принципиально различных подхода к таким коллекциям. Если важно сохранить уникальные генотипы, то нельзя допускать образования популяций клеток *in vitro*, то есть возникновения каллусных культур (иначе за счет соматической вариабельности могут потеряться ценные свойства сорта). В этом случае в качестве объектов хранения можно использовать пробирочные особи, органы или ткани растений.

При необходимости сохранения не конкретного генотипа, а генофонда вида возможно консервировать морфогенные или эмбриогенные культуры клеток. В качестве примера можно привести криосохранение в коллекции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН эмбриогенных культур клеток эндемичных видов *Dioscorea caucasica* Lipsky и *D. balcanica* Kosanin (*диоскореи кавказская и балканская*). После криоконсервации культуры полностью сохранили способность к соматическому эмбриогенезу и из них были получены растения-регенеранты.

В ряде зарубежных стран сформированы и эффективно функционируют коллекции клеток, органов и растений, культивируемых *in vitro*. Кроме того, организованы криобанки, где в жидком азоте поддерживают образцы фитоматериала, принадлежащего к разным систематическим группам. Многие из них относятся к разряду редких и исчезающих растений и сохраняются как национальное достояние.

В США (Корваллис, штат Орегон) функционирует репозиторий

хранилище, где насчитывается 500 тыс. образцов хозяйственно ценных, а также редких и исчезающих растений, представляющих 10 тыс. видов. Тут хранится *in vitro* ряд лекарственных растений, например шлемник трех видов: *Scutellaria baicalensis* Georgi, *Scutellaria lateriflora* L., *Scutellaria racemosa* Pers. Из европейских коллекций можно отметить германскую, в которой поддерживают более 700 образцов различных линий клеточных культур, принадлежащих к 80 семействам растений, причем большинство синтезирует фармакологически важные вторичные метаболиты. Подобные репозитории существуют во Франции, Италии, Испании, Бельгии, Польше, Румынии, Мноннн, Индии и других странах. Российская коллекция клеточных культур, учрежденная в 1978 г., в настоящее время включает два специализированных хранилища - клеток высших растений и генетически трансформированных корней растений, которые насчитывают около 100 различных штаммов и линий культур клеток и находятся в Институте физиологии растений РАН.

При низких положительных температурах содержатся коллекции из 500 образцов вегетативно размножаемых растений в ВИРе им. Н.И. Вавилова и коллекции клеточных культур, большинство – лекарственные растения (более 2 000 клеточных линий) - в Институте клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины.

В 2005 г. Центральный ботанический сад ПАП Беларуси получил Свидетельство Министерства природных ресурсов и охраны окружающей среды Республики Беларусь на коллекцию асептических культур хозяйственно полезных растений. В течение 2011—2012 гг. в ее состав включены лекарственные виды: многоколосник морщинистый (*Agastache rugosa*), кадило сарматское (*Melitis sarmatica*), наперстянки (*Digitalis purpurea*, *D. lanata*, *D. grandiflora*), рута душистая (*Huta graveolens* L.), шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi), синюха голубая (*Polemonium coeruleum* L.), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.), воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.), стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni), зверобой кустарниковый (*Hipericum patulum*), полынь беловойлочная (*Artemisia hololeuca*), расторопша пятнистая (*SiLybum marianum* L.); отдельные виды и сорта сирени (*Syringa* L.), родорендрона (*Rhododendron* L.), голубики (*Vaccinium corymbosum* L.), голубики, пальчатокоренника (*Dactylorhiza* Neck.).

Чтобы снизить затраты на долговременное содержание коллекций ценного растительного материала и уменьшить вероятность потерь образцов, в странах - членах ФАО, в том числе в России, широко

используют криосохранение. Разработаны методы консервации для более чем 200 видов, а именно: для неортодоксальных семян и тканей, культивируемых *in vitro*.

Использование биотехнологических методов для создания новых форм

Уникальный и эффективный способ повышения генетического разнообразия - использовать соматическую вариативность наряду с андрогенезом, гиногенезом, эмбрио- культурой. Известно, что культивирование клеток растений *in vitro* способно вызывать не меньшие перестройки генома, чем химические мутагены или различные виды излучений.

Лекарственные растения-регенеранты с повышенным биосинтезом биологически активных веществ (БАВ) получены на Украине. В отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси разработана биотехнологическая схема клеточной селекции многоколосника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze), получения соматических генотипов с повышенным содержанием БАВ. Биохимический анализ выявил высокую активность синтеза фенольных соединений и флавонолов в отобранных регенерантах, с максимальными значениями для соматического 11. Разработанная маркерная RAPD+ISSR система дифференцирования генотипов *A. rugosa* позволила оценить дискретность генотипов измененных особей, а также исходной формы и идентифицировать соматический 11 как наиболее генетически удаленный от нее.

Биотехнологии получения БАВ растительного происхождения

Использование растений и синтезируемых ими БАВ в современной медицине значительно возрастает. При этом наибольший интерес представляют препараты, характеризующиеся противоопухолевой активностью, повышающие продолжительность и качество жизни (адаптогены, биостимуляторы, среди них - иммуностимуляторы), а также кардиологические и противомикробные лекарственные средства. В связи с этим важной задачей становится поиск возобновляемых источников БАВ растительного происхождения. Сбор растений в дикой природе представляет существенную опасность для сохранения видов. Плантационное выращивание часто нерентабельно, большой проблемой при этом является получение исходного посадочного материала, особенно для видов, плохо

размножающихся семенами.

Культура клеток высших растений может служить альтернативным способом изготовления фитосырья для медицины, ветеринарии, парфюмерии и пищевой промышленности.

Суть его состоит в получении биомассы в стерильных условиях в биореакторах большого объема. Преимущества этого метода достаточно ощутимы.

Это практически абсолютная экологическая чистота процесса выращивания культуры клеток; гарантированное получение растительной биомассы с заданными характеристиками независимо от сезона, климатических и погодных условий; высокие скорости ее производства – до 2 г с литра среды за сутки (для сравнения: прирост корня женьшеня на плантации - 1-2 г в год); отсутствие в ней пестицидов, гербицидов, радиоактивных соединений и других поллютантов; возможность использования стандартного оборудования микробиологических производств (биореакторов, постферментационных систем и др.).

В ряде случаев биомасса клеток *in vitro* превосходит по свойствам полученную от природного или плантационного растения. Культура клеток оказывается незаменимой в случае, когда необходимо произвести сырье редких, исчезающих или тропических видов лекарственных растений. В числе инноваций в биотехнологию следует отметить генетическую трансформацию особей с помощью диких штаммов почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes* и последующего получения корней, способных к длительному развитию на относительно простых питательных средах, не содержащих ростовых веществ.

Таким образом, в практике создания, поддержания и использования биотехнологических коллекций существуют следующие направления, связанные с получением БАВ; сохранение лекарственных генетических ресурсов путем формирования криобанков и банков депонирования растительного материала *in vitro*; клональное микроразмножение растений (включая соматический эмбриогенез) для развития селекционных достижений и производства высококачественного посадочного материала; использование культуры растительных клеток и тканей как суперпродуцентов биологически активных веществ; биотехнологии промышленного получения природных фитопрепаратов различного назначения.

Примерами коммерчески полезных растительных вторичных метаболитов являются никотин, пиретрины и ротенон, которые используются в ограниченных количествах в качестве пестицидов, некоторые стероиды и алкалоиды, которые используются в производстве лекарств в фармацевтической промышленности. Стероиды и алкалоиды относятся к стероидным сапогенинам, сердечные гликозиды, противоопухолевые Катрантус (ранее Vinca) алкалоиды, алкалоиды красавки (например, атропин, гиосциамин и скополамин), кокаин, колхицин, алкалоиды опия (кодеин, морфин и папаверин), физостигмин, пилокарпин, хинин, хинидин, резерпин, и Д-тубокурарин. Другие вторичные метаболиты растений, используются в ограниченных количествах, в качестве фармакологических средств для изучения различных биохимических процессов. Например, дитерпеновых эфиров (среди которых форбол производные) из латексов различных видов *Euphorbia* (семейство молочай) являются мощным раздражителями и полезны при изучении химического канцерогенеза.

=====

КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ И КЛЕТОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ — НОВЫЙ ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

В решении задач расширения источников получения ЛРС, повышения стабильности и импортозамещения сырьевой базы перспективным направлением представляется метод биотехнологии, основанный на выращивании клеток и тканей ЛР на искусственных питательных средах.

Биотехнологические способы получения массы клеток ЛР возникли на основе развития метода культуры тканей.

Под «культурой тканей растений» принято понимать выращивание *in vitro* (в стерильных искусственных условиях) изолированных клеток, тканей, органов и их частей.

С начала 1970-х гг. список фармакологически ценных вторичных продуктов биосинтеза, обнаруженных в культурах тканей, стал значительно возрастать: с единичных до десятков и более видов растений. Способность

некоторых культур к образованию соединений, не обнаруженных в исходных растениях, позволила рассматривать их как продуценты принципиально иных, нетрадиционных БАВ (убихинон-10 в культуре ткани табака, антраценгликозиды в культурах ткани следующих видов: хинное дерево и наперстянка, алкалоиды перакин, вомиленин и другие в культуре ткани раувольфии змеиной). Эти факты указывают на возможность направленного синтеза природных соединений в культуре ткани путем введения в состав питательной среды простых, доступных соединений для их биотрансформации ферментной системой культур тканей в ценные ФАВ. В настоящее время подготовлена к промышленному использованию технология биотрансформации карденолида дигитоксина в дорогостоящий дефицитный дигоксин.

В 1983 г. японская фирма *Mitsui Petrochemical Industries* опубликовала технологию получения шиконина с помощью культуры клеток воробейника красного (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.), что явилось началом эры биотехнологии, когда биотехнологическое использование культур клеток и тканей в качестве сырья в промышленных масштабах стало реальностью.

В России широкое производство продуктов культуры ткани растений началось с выпуска экстракта культивируемой биомассы женьшеня. Экстракт биомассы женьшеня, или препарат *Биоженьшень*, стали использовать в качестве БАД к кремам, лосьонам, а в пищевой промышленности — для приготовления тонизирующих напитков. Фармакологический комитет при МЗ РФ разрешил применение настойки из биоженьшеня в качестве аналога по действию корня женьшеня. В г. Харькове (Украина) из биомассы культуры ткани раувольфии змеиной (*Rauwolfia serpentina* Benth.) было налажено производство ценного антиаритмического ЛС *Аймалин*.

Культивирование растительных клеток и тканей на искусственной питательной среде в биореакторах помогает решить многие экономические, экологические и технологические задачи, а также преодолеть ряд проблем:

- свести к минимуму влияние географических, климатических, сезонных, эдафических и прочих условий;
- добиться стандартности накапливаемых БАВ;
- регулировать процесс биосинтеза БАВ с использованием разных технологических режимов;
- выращивать культуры на малых площадях и использовать базу и технологии для синтеза практически всех классов ФАВ в дальнейшем;
- научиться получать ФАВ, свойственные интактному растению

(никотин, кодеин, хинин, диосгенин), и синтезировать новые БАВ;

- изучить возможность использования культуры растительных клеток для биотрансформации БАВ в конечные ЛС;
- получить возможность промышленного производства биомассы экзотических растений, малодоступных для нашей страны, например таких, как рау-вольфия, диоскорея, унгерея и др.;
- добиться экономической рентабельности биотехнологического производства БАВ и сокращения посевных площадей под ЛР.

В 1980-х гг. на базе метода культуры ткани возникли новые направления биотехнологии, важнейшим из которых была клеточная инженерия. Изучалось поведение отдельных изолированных клеток в культуре, воздействие на клетки мутагенных факторов и условий внешней среды для получения новых форм растений, получение гибридных растений с помощью протопластов (частей клеток, лишенных оболочки).

Способность клеток в культуре тканей при изменении условий культивирования давать начало целому растению привела к созданию промышленных клеточных технологий микрклонального размножения растений, позволяющих в короткие сроки (2—3 мес., а не несколько лет, затрачиваемых при использовании обычных методов) размножать ценные генотипы.

Наряду с культурами клеток и тканей растений развиваются способы культивирования органов растений *in vitro* (например, культивирование волосатых корней, измененных с помощью бактерий рода *Agrobacterium*, в качестве альтернативного источника продуктов жизнедеятельности растений, где по условиям роста и скопления клеток возникают субпопуляции с повышенной дифференцировкой, — самые продуктивные клетки по БАВ).

Культивирование тканей растений можно осуществлять на агаризованных питательных средах, имеющих плотную консистенцию, или в жидкой среде. В первом случае ткани образуют скопление недифференцированных клеток, называемых каллусом или биомассой, во втором — клетки при размножении образуют суспензии.

Из сравнения каллусных и суспензионных культур следует, что выход продуктов вторичного метаболизма выше в каллусных культурах, но при этом управление процессом культивирования легче осуществлять при работе

с суспензионными культурами. Использование технологий получения каллусных культур из ЛРС дает такие преимущества, как надежность и стабильность биомассы и выхода продуктов вторичного метаболизма, а также возможность использования каллусной системы для иммобилизации с последующей биотрансформацией.

Развитие суспензионного метода выращивания (в жидкой питательной среде) позволило превратить культуры тканей растений в удобную модель для исследований. Разрабатываются способы культивирования, сочетающие применение жидкой питательной среды и твердого субстрата, поддерживающего тканевую массу на поверхности, — так называемые иммобилизованные клеточные культуры. В качестве подложки могут использоваться гели из агарозы, альгината, нейлона, полиуретана, полиакриламида, шарики из стекла и др. Иммобилизованные каллусные клетки прекращают рост, но продолжают синтез метаболитов, выделяя их в среду. Основные преимущества иммобилизации — выделение клетками метаболитов в питательную среду, из которой их легко извлечь. Кроме того, иммобилизованные клеточные культуры растений часто используют для биотрансформации.

Довольно часто синтез метаболитов в суспензионной культуре останавливается на промежуточных этапах, не давая необходимого конечного продукта. В этом случае для получения конечного продукта необходима биотрансформация этих метаболитов с помощью культур других растений (или даже клеток бактерий) в целях повышения биологической активности конкретной химической структуры. Так, растения наперстянки шерстистой (*Digitalis lanata* Ehrh.) в большом количестве синтезируют дигитоксин, а не дигоксин. Для соответствующей биотрансформации с успехом используют недифференцированную суспензионную культуру наперстянки, которая с помощью ферментов осуществляет необходимое превращение БАВ. Другой пример: клетки суспензионной культуры из корня женьшеня (*Panax ginseng* C. A. Mey.) способны биотрансформировать (гликозилировать) фенольные соединения — продукты жизнедеятельности клеток его каллусной культуры.

Таким образом, культура ткани представляет собой периодически пересаживаемую бесформенную массу клеток, способную к неограниченному росту и синтезу специфических продуктов.

Факторы, влияющие на продуктивность культур тканей

Способность культур тканей к накоплению вторичных продуктов обмена

является уже установленным фактом. Однако, как правило, клеточные культуры характеризуются низким содержанием требуемых веществ. Чтобы служить ЛРС, в котором содержание вторичных метаболитов достаточно велико, культуры тканей растений необходимо изучить, а затем отобрать высокопроизводительные штаммы.

Тем не менее для многих культур попытки ученых определить условия накопления БАВ, характерных для родительских растений, остаются безрезультатными. В частности, в каллусной культуре не удается получить накопление эфирных масел, которые в естественных условиях синтезируются в особых железках на эпидермисе. Нередко культуры тканей продуцируют вещества иной природы, чем интактные растения: так, коробочки мака снотворного — источники получения морфина, но культура ткани этого растения под влиянием элиситоров образует сангвинарин. Клетки хинного дерева (*Cinchona ledgeriana* Moens ex Trimen) в культуре накапливают не алкалоиды, а антрахиноны.

На выход вторичных продуктов в культуре ткани влияют следующие факторы: происхождение ткани, условия культивирования, клеточная дифференциация *in vitro*.

Происхождение ткани. Обычно для введения в культуру ткани проводят поиск наиболее продуктивных растений с целью, чтобы эта способность была перенесена и в культуру. Указанный вопрос обсуждается до сих пор, так как экспериментальные данные довольно противоречивы.

Например, культуры тканей барвинка (катаранта) розового, полученные из высокоалкалоидных растений, имели тенденцию к синтезу большего количества алкалоидов, чем культуры, полученные от малопродуктивных растений. Наибольшее со

держание тропановых алкалоидов (0,02 %) отмечено в культуре ткани белены черной, хотя растение не дает такой высокой продуктивности алкалоидов. В то же время клеточные культуры растения дубуасия наркотическая (*Duboisia myoporoides* R. Br.), наиболее богаты тропановыми алкалоидами (5 %), не накапливали значительного количества алкалоидов.

Условия культивирования. Питание. Важнейшим фактором создания эффективной биотехнологической системы является разработка питательной среды, которая обеспечивает потребности продуцента в химических компонентах, требуемых для оптимального синтеза целевого продукта.

Часто при введении в культуру тканей нового вида растений исследователь испытывает большое количество сред, рекомендованных для

других видов растений. Этот процесс занимает длительное время и часто не приносит ожидаемого успеха. В последнее время при оптимизации питательных сред используются методы математического планирования биологического эксперимента, которые обладают большой эффективностью и позволяют в короткие сроки подобрать питательные среды, способствующие высокой продуктивности культуры ткани.

Источник углерода (обычно сахаразы) — важнейший компонент среды и должен усваиваться клетками растений, переходящими на гетеротрофный тип питания. Для включения автотрофного питания необходимы гормональные и иные изменения состава среды и фотоэкспозиция культур. Однако у многих видов получение фотосинтезирующих культур, эмбриоидов и регенерация культур в растение сопровождается определенными трудностями.

В среде, где все питательные вещества в избытке, увеличение концентрации сахаразы, как правило, приводит к увеличению биомассы. В некоторых случаях увеличение сахаразы может оказать положительный эффект и на выход действующих веществ. Так, в культуре ткани катаранта розового при увеличении концентрации сахаразы в 4 раза концентрации серпентина и антоцианов увеличились в 2,6 раза. Концентрация алкалоидов в клетках растений эшшольция (*Eschscholtzia* Cham.) увеличивалась в 7 раз при увеличении концентрации сахаразы в 4 раза. Но содержание фенольных соединений, продуцируемых этими клетками, не изменилось, что указывает на независимую регуляцию различных биосинтетических путей.

Для некоторых культур разработаны способы двухэтапного выращивания, когда ткани после накопления достаточной биомассы переносят в продукционные среды, способствующие максимальному синтезу БАВ. Примерами эффективных продукционных сред являются среда А. Г. Волосовича и других (1982), а также жидкая питательная среда, содержащая 8 % сахаразы, без фитогормонов с уменьшенным содержанием фосфора, обеспечивающая в 4—8 раз более высокую продукцию алкалоидов клетками суспензионной культуры эшшольция, чем целого растения.

Стрессовые факторы. Количество образованных вторичных продуктов в культуре ткани может резко возрастать под влиянием некоторых стрессовых факторов (воздействие продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, осмотического шока, токсических ионов тяжелых металлов и т. д.). Вторичные продукты растений часто являются фитоалексинами, и их синтез в растительной клетке происходит в ответ на действие продуктов жизнедеятельности микроорганизмов для защиты от фитопатогенов. При

добавлении к культуре ткани элиситоров (компоненты стенок грибного мицелия или какие-либо другие продукты жизнедеятельности микроорганизмов) интенсивность синтеза клетками растений некоторых фармакологически ценных веществ возрастает. Поэтому Институт биотехнологии (г. Саскачеван, Канада) в целях уменьшения себестоимости конечного продукта предложил промышленный способ получения сангвинарина из клеточных культур мака путем элиситации алкалоида гомогенатом из мицелия гриба питиум (*Pythium aphanidermatum* (Edson.) Fitzp.).

Кроме элиситоров грибного и микробного происхождения биосинтез вторичных продуктов могут стимулировать химические вещества. Так, сульфат ванадия способствовал увеличению почти в 2 раза содержания индольных алкалоидов аймалицина и катарантина в культивируемых клетках барвинка розового (*Vinca rosea* L.). В настоящее время не известен ни механизм воздействия $VaSO_4$ на синтез вторичных продуктов, ни место его аккумуляции. Тем не менее обработка клеток ванадием способствовала сокращению периода роста, увеличению выхода индольных алкалоидов и, в отличие от грибных элиситоров, не требовала выращивания грибов и получения из них элиситора.

Способы выращивания. В большинстве микробных систем продукты, синтезируемые микроорганизмами, продуцируются из клетки непосредственно в среду, в связи с чем эффект обратного ингибирования продуктом реакции очень мал. В культуре ткани, как правило, при увеличении концентрации продукта в клетке выше пороговой, срабатывает эффект обратного ингибирования, вследствие чего дальнейшее накопление вещества прекращается. Данное явление часто обуславливает низкое содержание искомых веществ в клетках культуры. Чтобы избежать этого эффекта, исследователи неоднократно предпринимали попытки удалить продукт реакции из клетки по мере его синтеза. Так, для увеличения проницаемости клеток хинного дерева (*Cinchona ledgeriana* Moens ex Trimen) в культуре и ускорения выхода внутриклеточных алкалоидов применяли диметилсульфоксид. Однако даже при высокой концентрации сурфактанта высвобождение алкалоидов протекало медленно, и большинство обработанных мембран не восстанавливалось.

Для некоторых суспензионных культур весьма экономичным оказался способ выращивания в виде двухфазной системы: водной фазы (питательная среда с растущими клетками) и нетоксичной липофильной фазы (триглицериды или парафины). В результате липофильные вещества,

синтезируемые клетками в процессе их роста, переходят в липофильную фазу. Например, суспензионная культура ромашки росла в двухфазной системе, состоящей из водного раствора питательной среды и нетоксичной липофильной фазы (триглицерид миглиол) в течение 22 дней. В результате жирорастворимые продукты, синтезируемые культурой ткани ромашки, накапливались в фазе миглиола в 60 раз большей концентрации, чем в однофазной системе.

Клеточная дифференциация *in vitro*. В настоящее время большое число экспериментальных данных свидетельствует о том, что образование и накопление вторичных продуктов в растениях — сложный, пространственно организованный процесс, который часто в той или иной форме включает транспортировку этих соединений на клеточном и субклеточном уровнях. В ряде случаев показано резкое разграничение мест первичного синтеза и накопления алкалоидов. Установлено, что эти процессы могут быть локализованы в пределах одного и того же органа или

даже одной и той же ткани, но в различных клетках, что говорит об эпигенетическом контроле процесса пространственного разобщения синтеза и накопления конечного продукта. В частности, люпиновые алкалоиды растений семейства Бобовые синтезируются в зеленых частях растений, а накапливаются в корнях. Тропановые алкалоиды синтезируются в корнях, но транспортируются в стебли.

В культурах тканей растений так же, как и в растениях, накопление вторичных метаболитов часто тесно связано со степенью тканевой дифференциации. В культурах ткани обычно формируются секреторные каналы, млечники, слизевые клетки, железки или специализированные клетки, где накапливаются конечные продукты, т. е. наблюдается процесс разобщения синтеза и накопления вторичных веществ.

Установлено, например, что практически все клетки в каллусе маклейи обладают способностью синтезировать изохинолиновые алкалоиды, однако их накопление осуществлялось лишь в специализированных, так называемых «алкалоидных» клетках. В культуре ткани женьшеня обнаружены секреторные каналы, типичные для растений семейства Аралиевые.

Исследователи, работающие с культурами тканей, отмечают, что с образованием в каллусе морфологических структур (побегов, корней, эмбриоидов) содержание искомым продуктов в культуре увеличивается. Например, культура ткани красавки (*Atropa belladonna* L.) при недифференцированном росте не продуцирует гиосциамин, а при

образовании в каллусе корней начинает синтезировать его. Кардиогликозиды в культуре ткани наперстянки шерстистой синтезировались только с образованием эмбриоидов.

Важным диагностическим признаком культуры ткани раувольфии змеиной являются выделительные образования с различной степенью морфологической специализации: клетки-идиобласты и удлиненные секреторные структуры типа млечников. Исследования показали, что основная масса алкалоидов находится именно в них, и максимальное содержание алкалоидов наблюдается в период увеличения количества млечников. Индукция морфогенеза в культуре ткани мака привела к появлению алкалоидов тебаина и морфина, тогда как недифференцированные каллусные ткани накапливали сангвинарин и допамин. Содержание гликоалкалоидов в культуре ткани паслена дольчатого при переходе к эмбриогенезу увеличивалось более чем в 10 раз и достигало 1 % сухой массы клеток, что близко к содержанию гликоалкалоидов во взрослом растении.

Обнаружена корреляция между ультраструктурной организацией пластид (этиопластов и хлоропластов) и биосинтетической способностью каллусных культур чайного растения, что подчеркивает важную роль хлоропластов в образовании фенольных соединений. Ультраструктура клеточных линий коптиса японского, образующих алкалоиды типа протоберберина, существенно отличалась от клеточных линий, не способных к синтезу алкалоидов: в продуцирующих алкалоиды клетках перед началом синтеза алкалоидов обнаружен больший объем вакуолей, чем в непродуцирующих клетках. Кроме того, в продуцирующих клетках можно было наблюдать многочисленные везикулы, содержащие в цитоплазме электронно-плотный осадок.

Селекция — основа биотехнологического использования культур

Промышленное применение культур тканей ЛР в качестве ЛРС предполагает использование высокопродуктивных и стабильных клонов. Известно, что культи-

вирование клеток *in vitro* может сопровождаться значительным генетическим разнообразием. Речь идет о так называемой соматоклональной изменчивости, которая возникает при длительном культивировании каллуса. Соматоклональные варианты, сохраняя основные свойства прототипа, часто значительно отличаются от него устойчивостью к вирусам, болезням, экологическим стрессам, а иногда несколько измененной биосинтетической

способностью и более высокой продуктивностью, т. е. могут затрагивать хозяйственно ценные признаки. На изменчивости клеток в культуре *in vitro* основана селекция штаммов, обеспечивающая большой выход ценных продуктов метаболизма.

Для увеличения спектра изменчивости используют обработку мутагенами, а также селективные условия культивирования клеток. Спонтанно возникшие или индуцированные мутанты в популяции отбираются на устойчивость к созданным жестким условиям: высоким концентрациям солей, экстремальным температурам, гербицидам, токсинам и др. В результате многих экспериментов удается отобрать устойчивые линии и получить растения-регенераты из стабильной клеточной линии.

Часто успех опыта зависит от методов оценки селекционного материала. Так, для количественной оценки содержания аймалина в культуре ткани раувольфии змеиной разработан простой и быстрый метод, основанный на сравнении интенсивности окраски пятен сока каллусных культур, нанесенных на фильтровальную бумагу и обработанных цветным реактивом, со шкалой стандартов. Метод позволяет исключить неперспективные варианты и сократить число культур, подлежащих окончательной проверке.

Успешным оказался способ селекции, основанный на отборе окрашенных участков культуры ткани. Известно, что окраска тканей растений является наследственным признаком, связанным с их химическим составом. Связь между окраской тканей и их химическим составом была использована в селекции культур тканей, высокопродуктивных по содержанию антоцианидинов. После 12 пересевов содержание антоцианидинов увеличилось в 3 раза. Селекция промышленных штаммов воробейника краснокорневого была осуществлена путем отбора и пересадок красных участков каллуса. Высокоалкалоидные культуры ткани барбариса — продуцента берберина — также были получены в результате клонирования и отбора желтых участков каллуса.

Высокопродуктивные клоны культуры ткани табака были селектированы благодаря полуколичественному методу определения алкалоидов с реактивом Драгендорфа. Ярко-голубую флуоресценцию серпентина в УФ-свете ($\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ нм}$) использовали в селекции высокоалкалоидных штаммов суспензионной культуры катарантуса розового. Селекция культур тканей с высоким содержанием изохинолиновых, акридоновых и индольных алкалоидов основана на измерении их флуоресценции.

Важным условием биотехнологического использования культур тканей

является их стабильность, гарантирующая стандартность ЛРС. Такие культуры- суперпродуценты, как амми зубная (*Ammi visnaga* [L.] Lam.), раувольфия змеиная (*Rauwolfia serpentina* Benth.), воробейник красный (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.), на протяжении многих лет зарекомендовали себя как устойчивые. Но для многих тканевых культур, например барвинка розового (*Catharanthus roseus* [L.] G. Donf.), единственным путем сохранения высокой продуктивности является регулярный поддерживающий отбор, их нестабильность — серьезное препятствие к промышленному использованию.

Клеточная селекция — одна из наиболее перспективных клеточных технологий для создания сортов не только важнейших сельскохозяйственных, но и ЛР. В настоящее время проводится большое количество исследовательских работ по созданию высокопродуктивных штаммов и растений-регенератов методами гибридизации соматических (неполовых) клеток путем слияния протопластов и генной инженерии.

Хотя методы соматической гибридизации и генной инженерии (с введением в ядерный геном генов синтеза фармакологически ценных веществ) еще не получили промышленного развития, однако ученые считают, что за ними будущее и генная инженерия станет естественным приемом в создании новых необходимых человеку ЛР — продуцентов ЛС.

Трансгенными называются растения тех видов, в которых успешно функционируют гены (или ген), пересаженные из растений или животных других видов. Делается это для того, чтобы растение-реципиент получило новые удобные для человека свойства: повышенную устойчивость к вирусам, гербицидам, вредителям и болезням растений. Было обнаружено, что опухолеобразующие Ti-плазмиды агробактерий (*Ti* — *tumor inducing*), представляющие миникольцевые ДНК, являются великолепной природной векторной системой, которую в настоящее время используют для переноса генов в растения. Плазмидная тДНК (*transferred DNA*) обладает двумя свойствами, делающими ее по существу идеальным вектором для введения чужеродных генов в клетки растений. Во-первых, круг хозяев агробактерий очень широк: они трансформируют клетки практически всех двудольных растений (иногда даже однодольных, в том числе злаков). Во-вторых, интегрированная в состав генома растения тДНК наследуется как простой доминантный признак в соответствии с законами Менделя, а ее гены имеют собственные промоторы (регуляторная область гена, определяющая время и место его экспрессии), под контролем которых могут экспрессироваться вставленные в тДНК чужеродные гены. С помощью Ti-плазмид

агробактерий уже получены следующие продукты: морозоустойчивая свекла, светящаяся в сумерках газонная трава, устойчивый к колорадскому жуку картофель и даже банан, съедая который, человек получает «прививку от тропических болезней».

Во всем мире активно ведутся работы по созданию на основе трансгенных растений так называемых «съедобных вакцин», которые в дальнейшем можно будет использовать для предупреждения наиболее опасных болезней. Например, ученые Сибирского отделения РАН разрабатывают противотуберкулезную вакцину, для чего используют гены человека, кодирующие синтез специфических антител, и вводят их в геном клеток растений, а их коллеги из Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси намерены получить картофель, содержащий иммуноглобулины.

В зависимости от условий клетки в культуре *in vitro* могут делиться анархически, образуя неорганизованную каллусную массу, либо менять программу своего поведения и делиться организованно с образованием зачатков корней, стеблей, зародышей. Из этих зачатков растений в культуре *in vitro* затем можно регенерировать растения.

Клеточная селекция — одна из наиболее перспективных клеточных технологий для создания сортов не только важнейших сельскохозяйственных, но и ЛР. В настоящее время проводится большое количество исследовательских работ по созданию высокопродуктивных штаммов и растений-регенератов методами гибридизации соматических (неполовых) клеток путем слияния протопластов и генной инженерии.

Хотя методы соматической гибридизации и генной инженерии (с введением в ядерный геном генов синтеза фармакологически ценных веществ) еще не получили промышленного развития, однако ученые считают, что за ними будущее и генная инженерия станет естественным приемом в создании новых необходимых человеку ЛР — продуцентов ЛС.

В последние годы число информационных сообщений, касающихся синтеза вторичных метаболитов в культурах тканей растений и имеющих значимость для фармацевтической промышленности, возросло. По-видимому, переход от научных разработок к промышленному производству ЛС с использованием клеточных культур ЛР только начинается.