



Производство вторичных метаболитов на основе культуры клеток и органов растений

В настоящее время получено более 30 видов различных изолированных клеточных культур лекарственных растений, продуцирующих БАВ либо на уровне соответствующего интактного растения, либо в большем количестве.

В настоящее время в клинической практике используются лекарственные средства, полученные на основе каллусных и культур клеток растений: шиконин (кожные заболевания), дигоксин (сердечно-сосудистые заболевания), берберин

(кишечные расстройства), диосгенин (противозачаточное средство), панаксозиды (адаптогены, укрепляющие иммунитет).



В нашей стране заготавливаются десятки тысяч тонн ЛРС (лекарственные растительные средства). Однако потребность в БАВ (биологически активные вещества), содержащихся в растениях, с каждым годом возрастает, а природные запасы лекарственных растений снижаются. Указанные обстоятельства потребовали изыскания новых путей получения БАВ. Одним из них является принципиально новый метод получения этих веществ, основанный на использовании в качестве сырья изолированных тканей и клеток, растущих на искусственных питательных средах.

Доказано, что в этих условиях растительные клетки способны синтезировать различные БАВ подобно тому, как это происходит при выращивании самого растения.

Вещества, которые производит растение в природе, образуются в клеточной культуре, а некоторые из них — в больших количествах. Например, содержание сапонинов в суспензионной культуре *Atragepe speciosa* Weinm к 3-му пересеву увеличивалось почти в 2,5 раза по сравнению с листьями дикорастущего растения.



Культуры клеток и тканей в фармакологии

Применяются для изучения фармакологических свойств новых препаратов и прогнозирования безопасности их применения.

В фармакологических исследованиях в основном применяются культуры растительных клеток и тканей.

Растения с давних времен использовали не только в качестве источника питания, но и как поставщиков широкого набора химических соединений, включая лекарственные препараты, инсектициды, пищевые добавки, отдушки и красители.



Клетка из практически любой ткани растения, в отличие от животной клетки, способна в условиях *in vitro* к делению и дифференцировке с последующим формированием целого растения. Это направление широко применяется в селекции и биотехнологии. Культура клеток, тканей и органов растений используется для выращивания клеточной биомассы растений, прежде всего лекарственных, с целью получения из нее ценных соединений, в генетико-селекционной работе, а также для изучения фундаментальных проблем физиологии и генетики растений, фитопатологии, онтогенеза растений и др.

Для сохранения генофонда растений созданы банки меристемных тканей, хранящихся в условиях криоконсервации.



Исследования в области культуры тканей и клеток различных растений проводятся в последние десятилетия во многих странах, особенно в США, Англии, Японии.

Основные направления исследований — получение штаммов культур лекарственных растений и скрининг выделяемых ими БАВ, полученных в условиях культур тканей растений, для выявления наиболее эффективных лекарственных веществ.

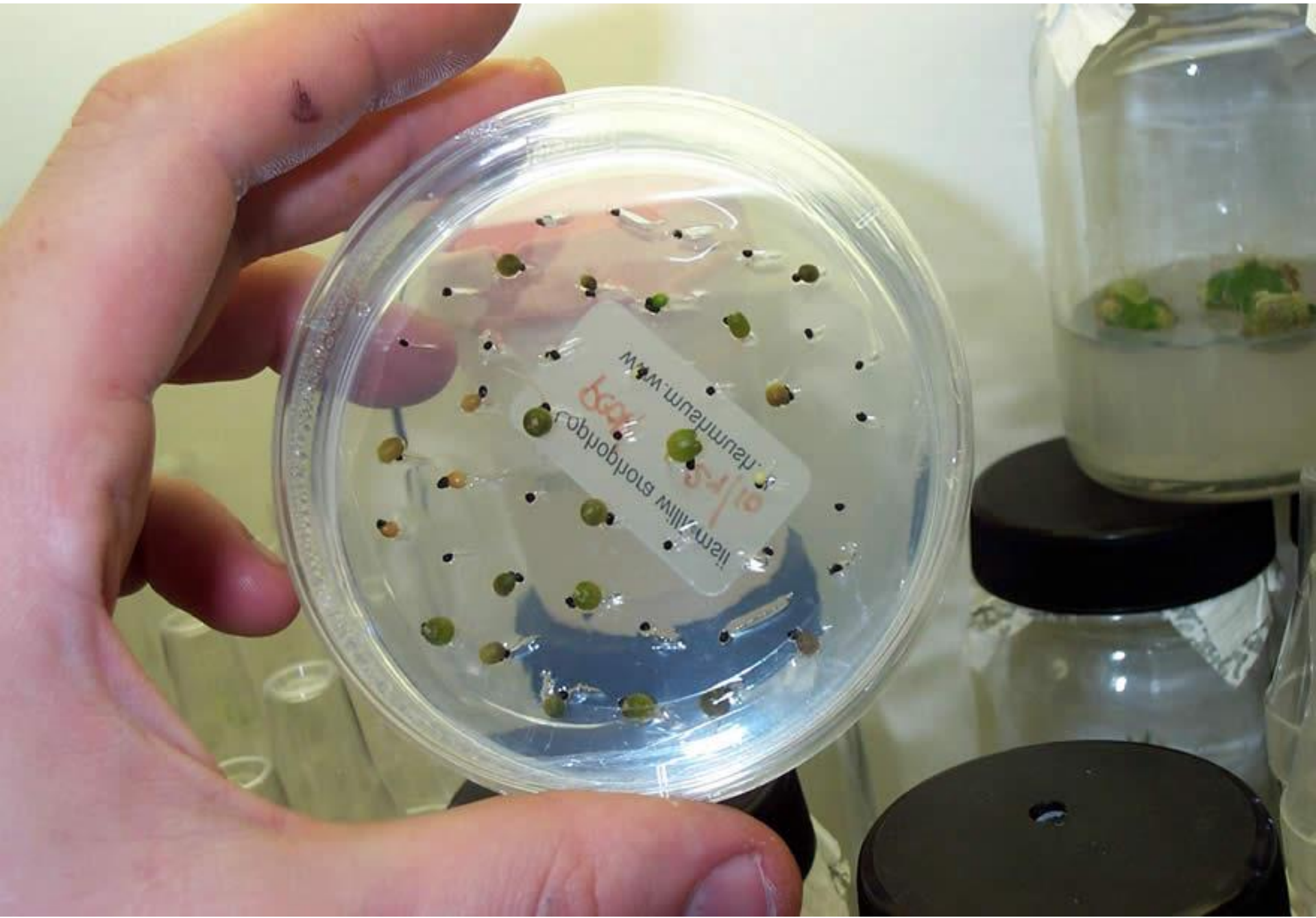


В настоящее время наиболее перспективно использование культур клеток растений для получения:

- **противоопухолевых препаратов** (типа таксола, камптотецина);
- **антивирусных препаратов**, особенно анти-ВИЧ (типа кастаноспермина);
- **адаптогенных и стимулирующих препаратов** (из биомассы различных видов женьшеня, полисциаса, родиолы розовой, маральего корня), ;
- **индивидуальных БАВ** (гинзенозидов, терпеноидных гликозидов и др.) **с широким спектром активности.**

Объекты для культивирования *in vitro*

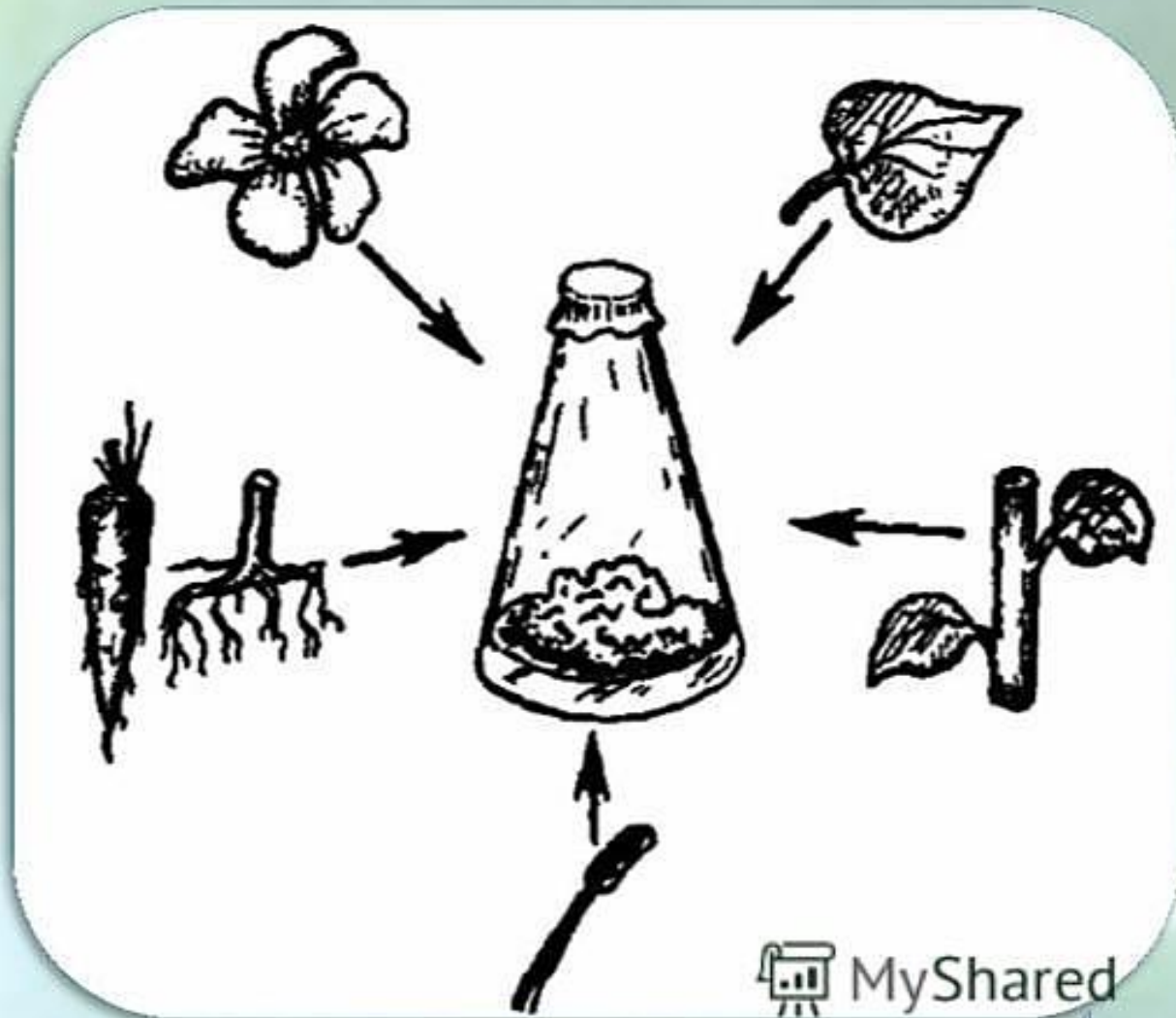




www.wmshu.edu
01/15/10
Item Alliv eronqobors willu/wai

Каллусную ткань *in vitro* можно получить практически из любой живой ткани растения.

Выбор экспланта определяется целями исследования. Необходимо убедиться, что выбранный эксплант находится в подходящем биологическом состоянии.



ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ:



Эксплант - часть растения, иссеченная в стерильных условиях и подготовленная для культивирования на питательной среде.



Инокулят - суспензия клеток, являющаяся исходной для клеточной культуры и используемая для посева на питательную среду.

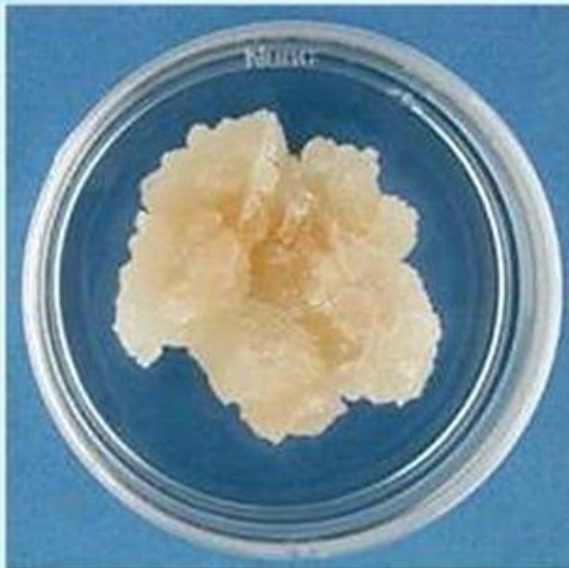


Каллус - масса недифференцированных клеток, образующаяся при повреждении растения или при их культивировании на искусственных средах.

Выбор экспланта

Двудольные травянистые
Однодольные травянистые
Зерновые культуры
Голосемянные

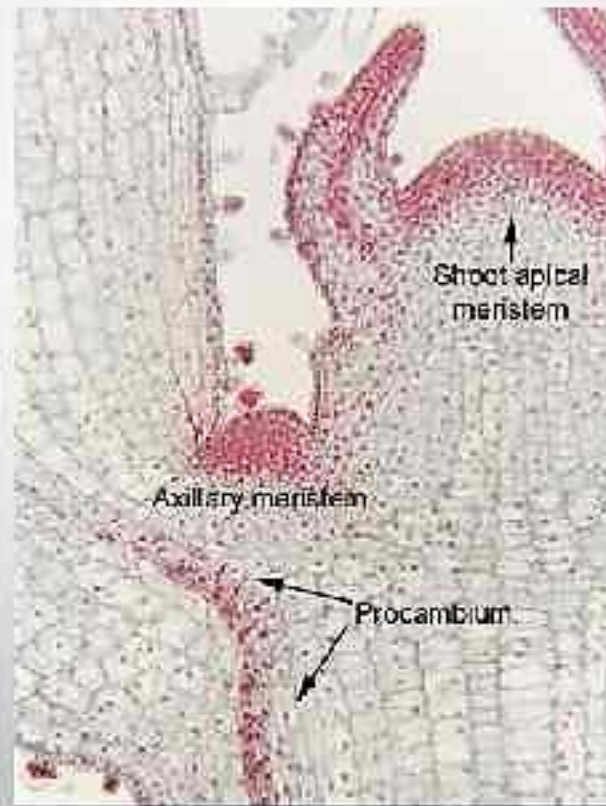
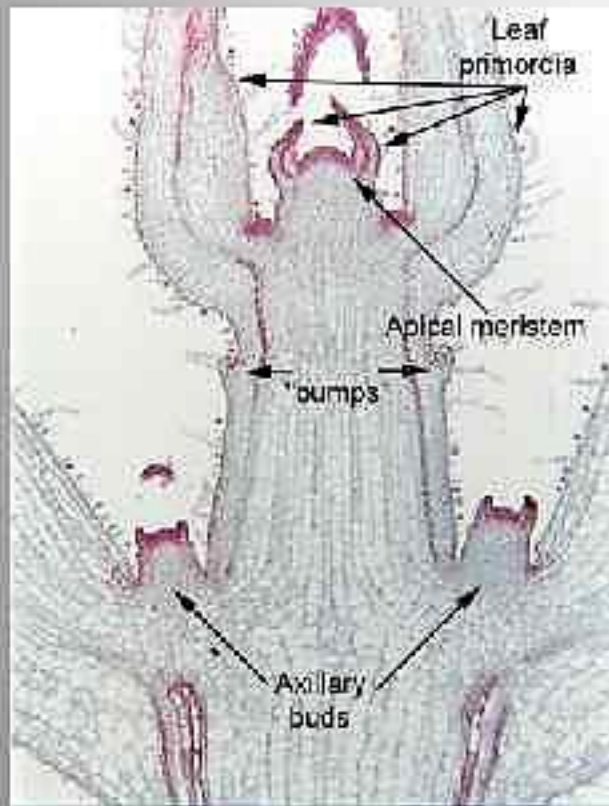
Снижение
способности к
каллусогенезу

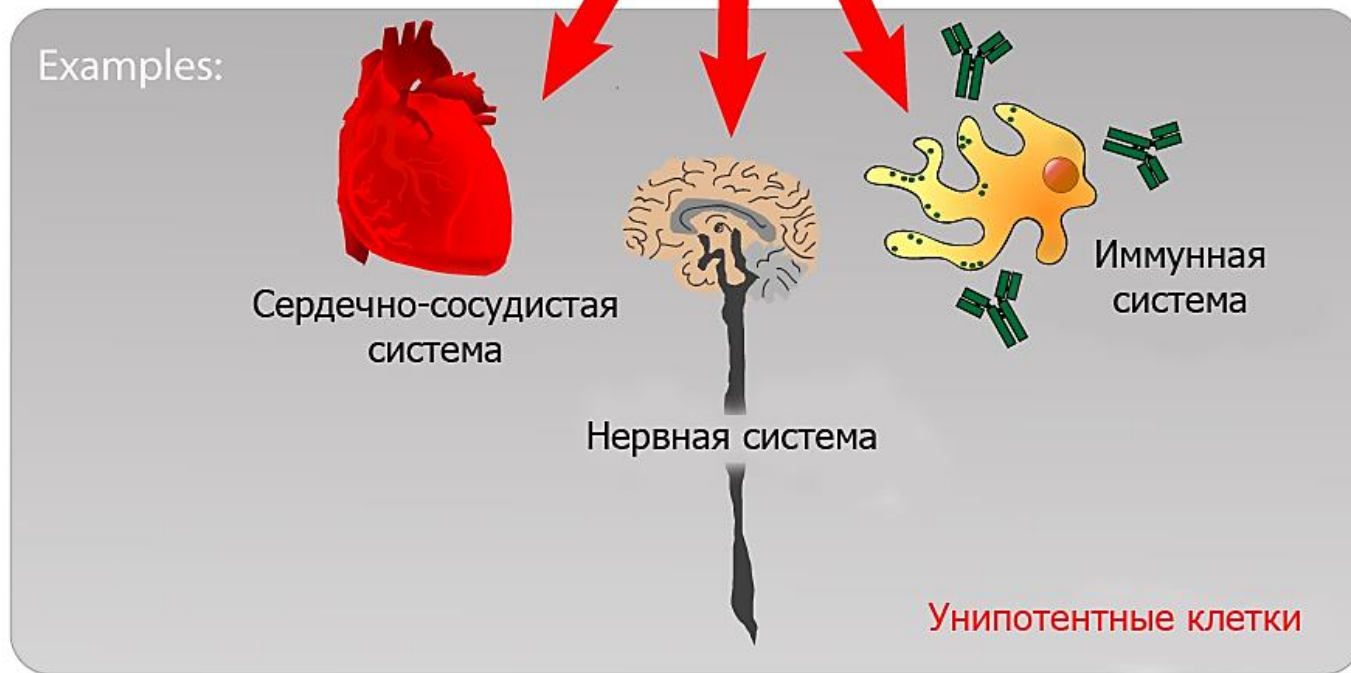
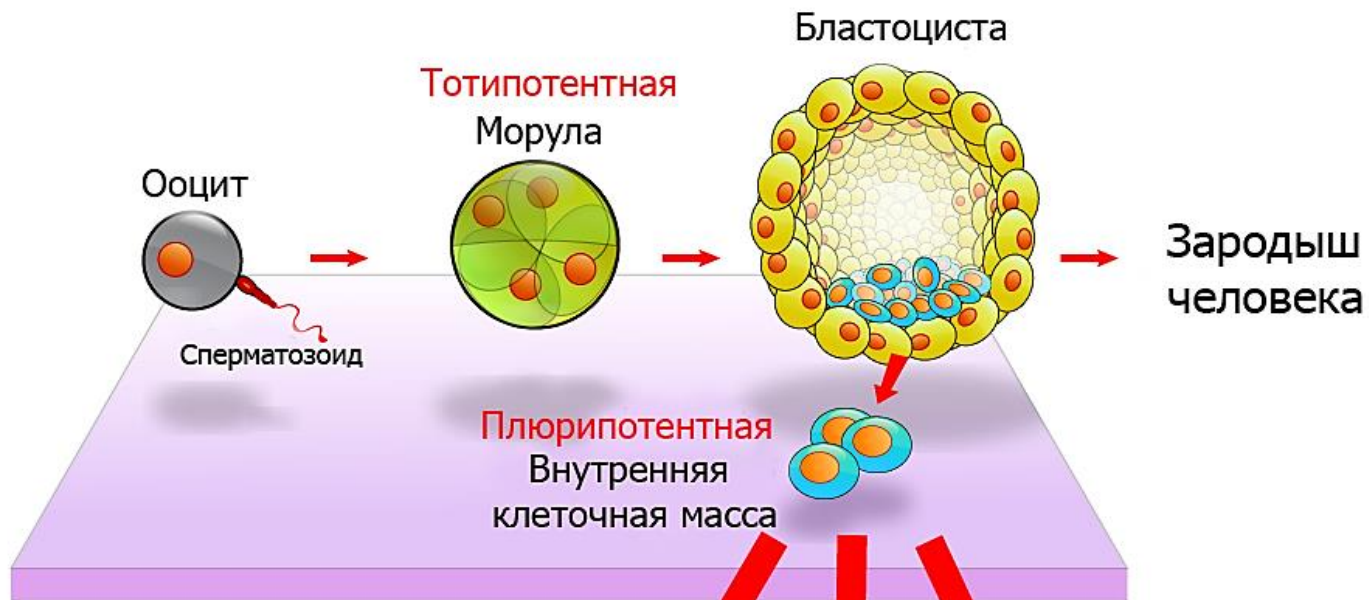


Для образования каллусной ткани клетки экспланта должны **дедифференцироваться**, т.е. утратить характеристики исходной ткани

“ТОТИПОТЕНТНОСТЬ” КЛЕТОК РАСТЕНИЙ БЫЛА ПОСТУЛИРОВАНА ИЗ-ЗА:

1. Способности растений к вегетативному размножению.
2. Способности апикальных меристем поддерживать рост растений на протяжении веков (секвойи, эвкалипты, дубы)
3. Гипотетической возможности регенерировать растения из культивируемых *in vitro* клеток.



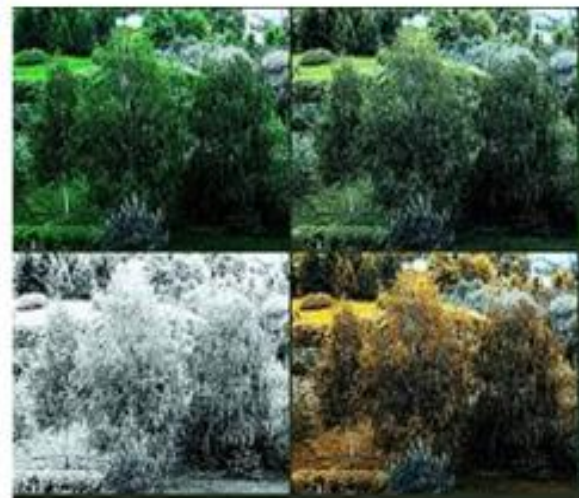






Преимущества культур клеток:

1. Получение экологически чистых продуктов независимо от климата, сезона, погоды



Преимущества культур клеток:

2. Создание клеточных линий-сверхпродуцентов

| Соединение | Вид растения | Содержание в культуре клеток, % от сухой массы | Содержание в интактных растениях, % от сухой массы | Отношение содержания клетки/растение |
|----------------------|-----------------------------------|--|--|--------------------------------------|
| Антоцианы | <i>Vitis sp.</i> | 16 | 10 | 1,6 |
| | <i>Euphorbia milli</i> | 4 | 0,3 | 13,3 |
| | <i>Perilla frutescens</i> | 24 | 1,5 | 16 |
| Антрахиноны | <i>Morinda citrifolia</i> | 18 | 2,2 | 8 |
| Берберин | <i>Coptis japonica</i> | 13 | 4 | 3,3 |
| | <i>Thalictrum minor</i> | 10 | 0,01 | 1000 |
| Розмариновая кислота | <i>Salvia officinalis</i> | 36 | 3,0 | 9 |
| | <i>Colus blumel</i> | 27 | | |
| Шиконин | <i>Lithospermum erythrorhizon</i> | 20 | 1,5 | 13 |
| Аймалицин | <i>Catharanthus roseus</i> | 1,0 | 0,3 | 3,3 |
| Гинзенозиды | <i>Panax ginseng</i> | 27 | 4,5 | 6 |
| Никотин | <i>Nicotiana tabacum</i> | 3,4 | 2,0 | 1,7 |

Преимущества культур клеток:

3. Сохранение редких и исчезающих растений-продуцентов

За год прирост корня женьшеня в тайге составляет 1 г (на 1 г исходного веса), на плантации – 3 г



При выращивании суспензии клеток женьшеня в биореакторе (50 л) прирост биомассы составляет

**2 г на 1 л среда за сутки,
что в 1000 раз больше, чем при
выращивании на плантации**

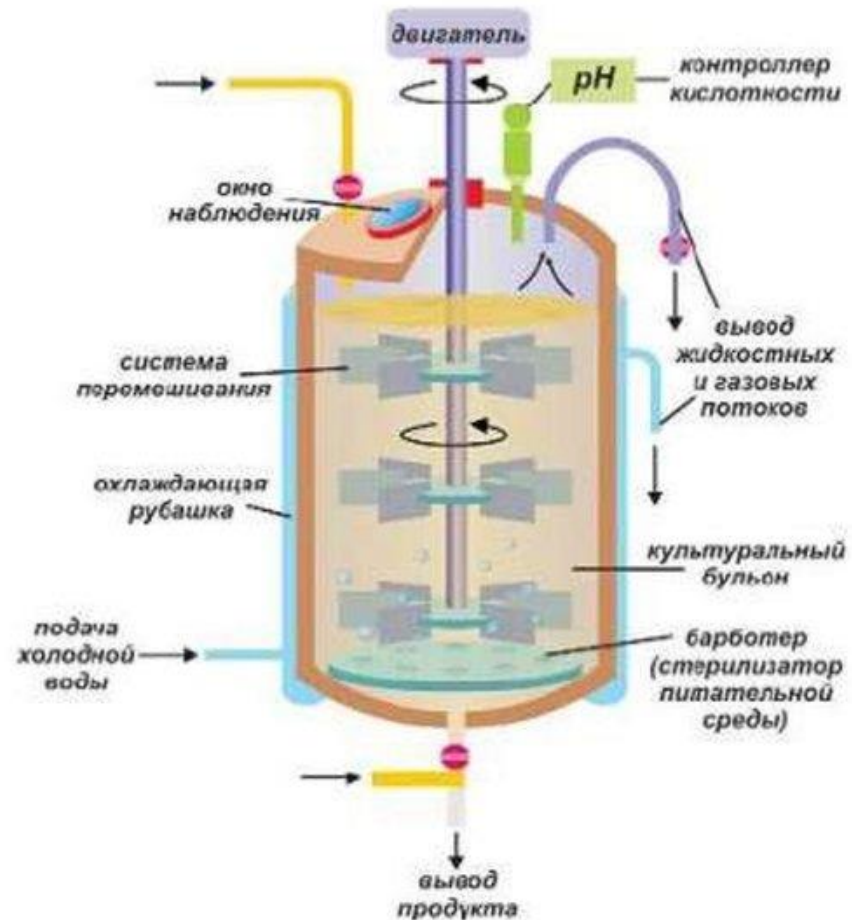
Преимущества культур клеток:

4. Экономия площадей



Преимущества культур клеток:

5. Возможность оптимизировать и стандартизировать условия выращивания



Преимущества культур клеток:

6. Возможность автоматизации процессов



Вторичные метаболиты (ВМ)

Фармацевтическая промышленность

Карденолиды (сердечные гликозиды): наперстянки, строфанта, ландыша

Антимикробные и противовоспалительные ВМ: протоберберины, шиконин, розмариновая кислота, полисахариды эхинацеи

Противораковые агенты: паклитаксел (таксол), подофиллотоксин, винкристин, винбластин, камптотецин

Биологически активные добавки (БАД), иммуномодуляторы: полисахариды эхинацеи, сапонины женьшеня, солодки и аралии

Пищевая, косметическая, текстильная промышленность

Пигменты для производства косметики: арбутин, картамин, шиконин

Пигменты для окраски текстиля: антоцианин из молочая эуфорбии

Пищевые пигменты: бетацианин, различные антоцианины

Биотрансформация в суспензионных культурах



Если синтез вторичных метаболитов в культуре останавливается, не достигая конечного результата, то для получения продукта применяют процесс биотрансформации. Суть процесса заключается в превращениях исходного субстрата клеточными культурами растений.

Например, культуры клеток лебеды и картофеля способны трансформировать индолил-3-уксусную кислоту в индолил-3-ацетил-L-аспарагиновую кислоту.

Япония, 1983 г. – коммерческое получение шиконина с помощью суспензионной культуры воробейника краснокорневого в биореакторе вместимостью 750 л.



Шиконин является субстанцией для **лекарственных средств** в основном ранозаживляющего действия; ингредиентом в составе ряда **парфюмерно-косметических изделий** (например, в качестве противовоспалительного красителя в составе помады); ингредиентом в составе **пищевых продуктов** (например, в качестве красителя-антиоксиданта).

Биотехнологический способ получения шиконина дешевле, стабильнее, не зависит от импорта и других внешних условий. Содержание производных шиконина в культуре клеток достигает 12,6 % от сухой массы клеток.

Получение противоопухолевого препарата таксола на основе культуры клеток тиса (*Taxus sp.*) – фирма Фyton (США - Германия)

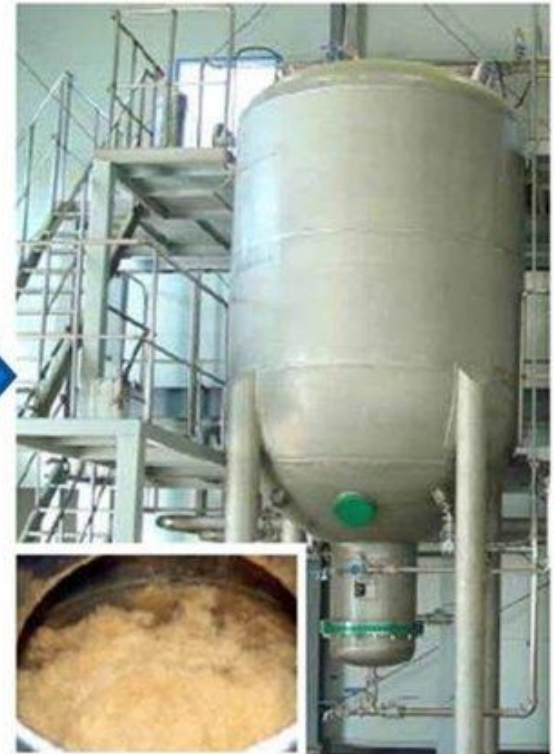
Taxol production (Phyton Biotech, Germany).



Inoculation bioreactor



Medium sterilizer



10 tons bioreactor

Получение биомассы женьшеня настоящего в Республике Корея



Wild mountain ginseng



Callus induction from root explant



Adventitious root induction from callus



Selection of root line



Bioreactor culture



Scaled up production



Harvest



Dry

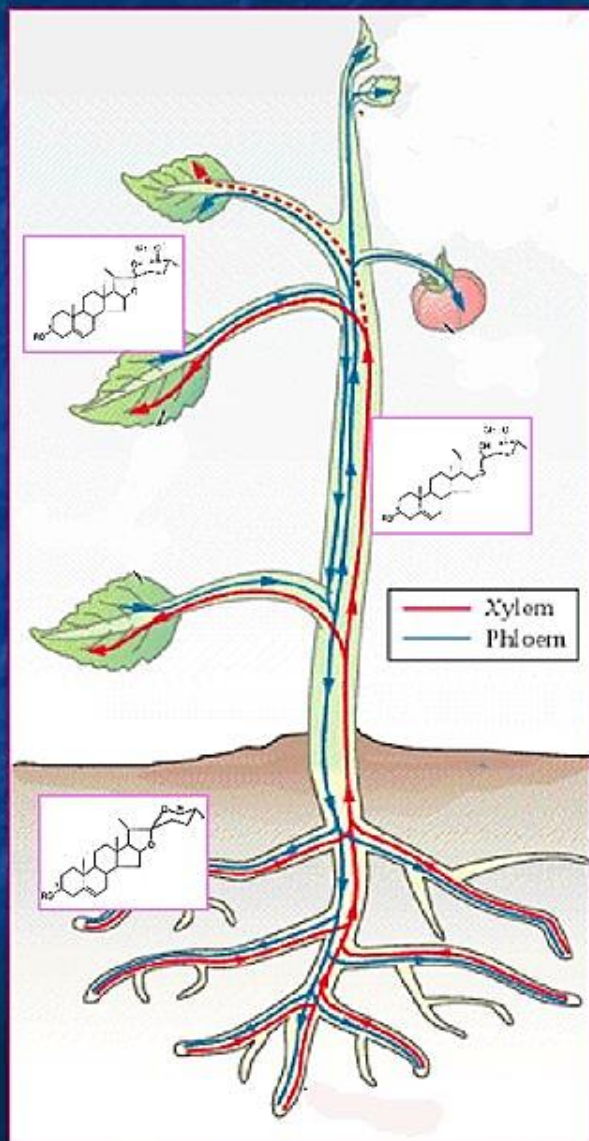


Final product

Особенности вторичного метаболизма растительных клеток в культуре *in vitro*

| Признак | Клетки | |
|--|--|-------------------------------|
| | <i>in vivo</i> | <i>in vitro</i> |
| Стабильность синтеза вторичных метаболитов | Как правило, стабильны | Возможны различные варианты |
| Локализация процессов синтеза, транспорта и накопления вторичных метаболитов | В большинстве случаев разведены по отдельным органам | Осуществляются в одной клетке |
| Связь процесса вторичного метаболизма с клеточной дифференцировкой | Вторичный метаболизм – особенность дифференцированных клеток | Возможны различные варианты |

Вторичный метаболизм тонко скоординирован в пространстве и во времени и на уровне интактного растения.

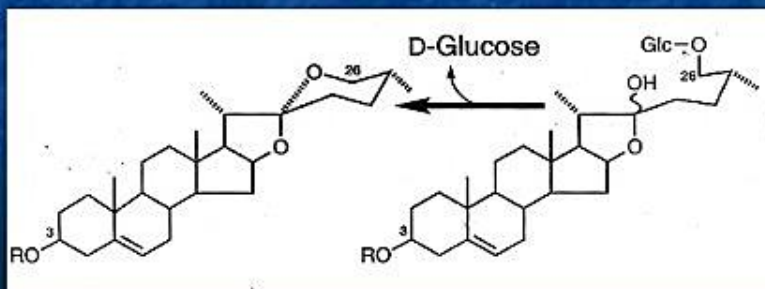


Синтез стероидных гликозидов происходит в листьях в водорастворимой (фуростаноловой) форме.

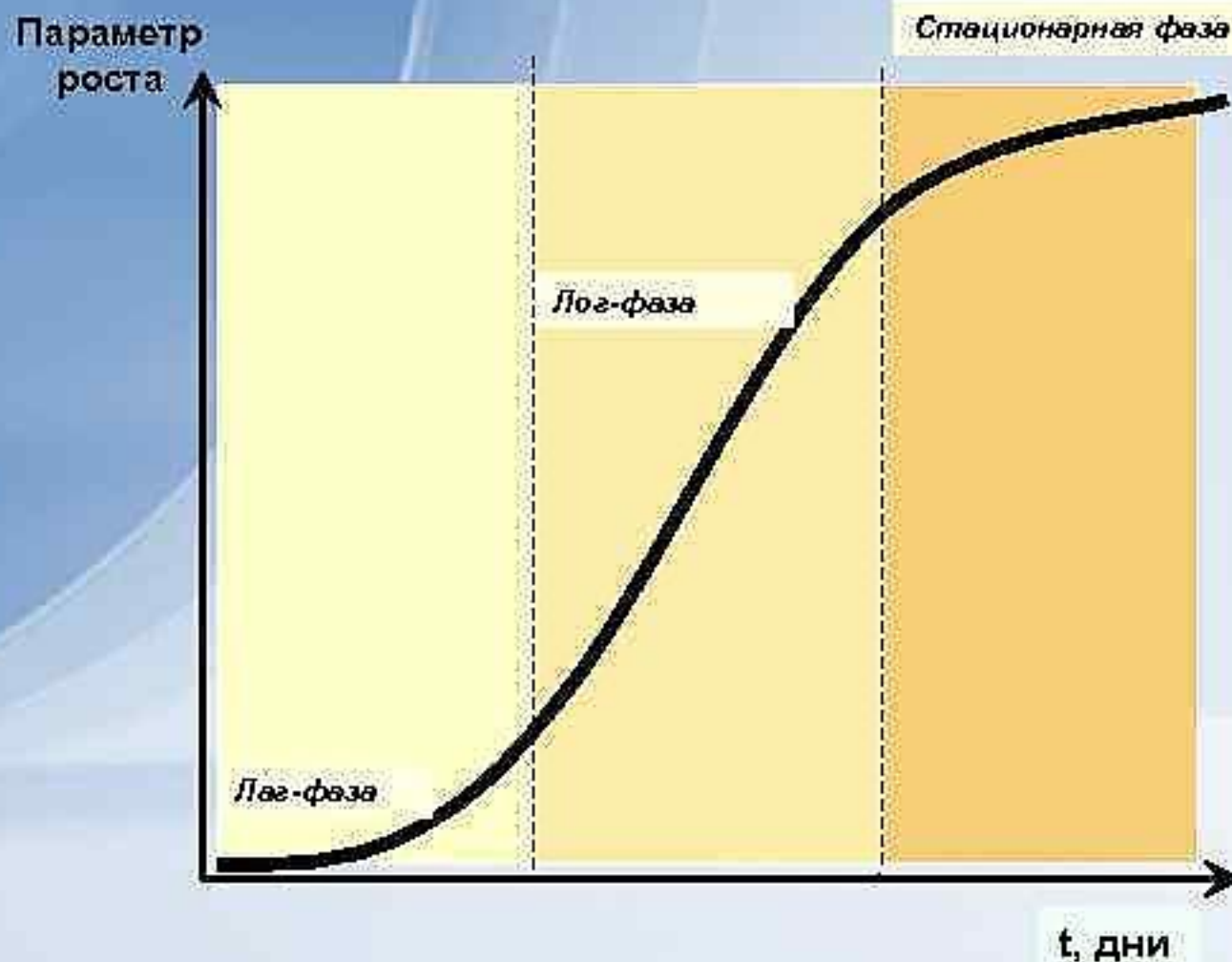
Транспорт осуществляется по флоэме.

Накопление происходит в эпидермальных тканях листьев и стеблей в фуростаноловой форме, в корневищах – в паренхиме в водонерастворимой спиростаноловой форме

Фуростаноловый и спиростаноловые гликозиды отличаются наличием лишь одного остатка глюкозы, но кардинально - по биологической активности.



Связь накопления вторичных метаболитов с ростом клеток



Антоцианы
Некоторые фенольные соединения
Сесквитерпены
Антрахиноны

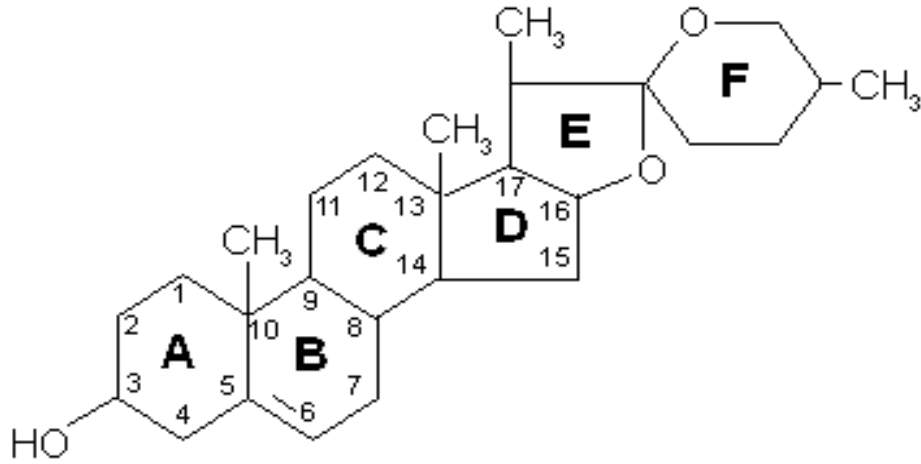
Серпентин
Никотин
Бетацианин
Берберин
Диосгенин
Сангвинарин

Хлорогеновая кислота
Шиконин
Виснагин

Накопление вторичных метаболитов в культуре клеток растений зависит от ряда факторов.

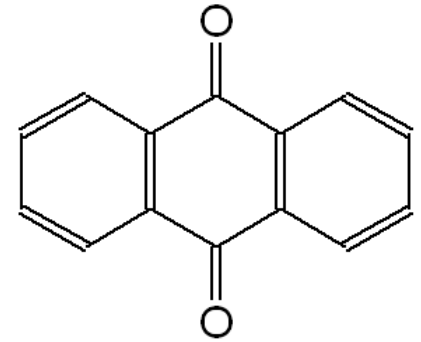
- Во-первых, выход продукта определяется генотипом донорного растения, правильным выбором его ткани или органа для введения в культуру.
- Во-вторых, на выход продукта влияет гетерогенность культивируемых клеток по способности к синтезу вторичных метаболитов.
- В-третьих, в качестве факторов, оказывающих влияние на накопление вторичных метаболитов в культуре клеток растений, выступают состав питательной среды и физические условия культивирования.

Dioscorea floribunda (ямс)



диосгенин (стероидный гликозид)

Morinda citrifolia (нони)



Антрахиноны



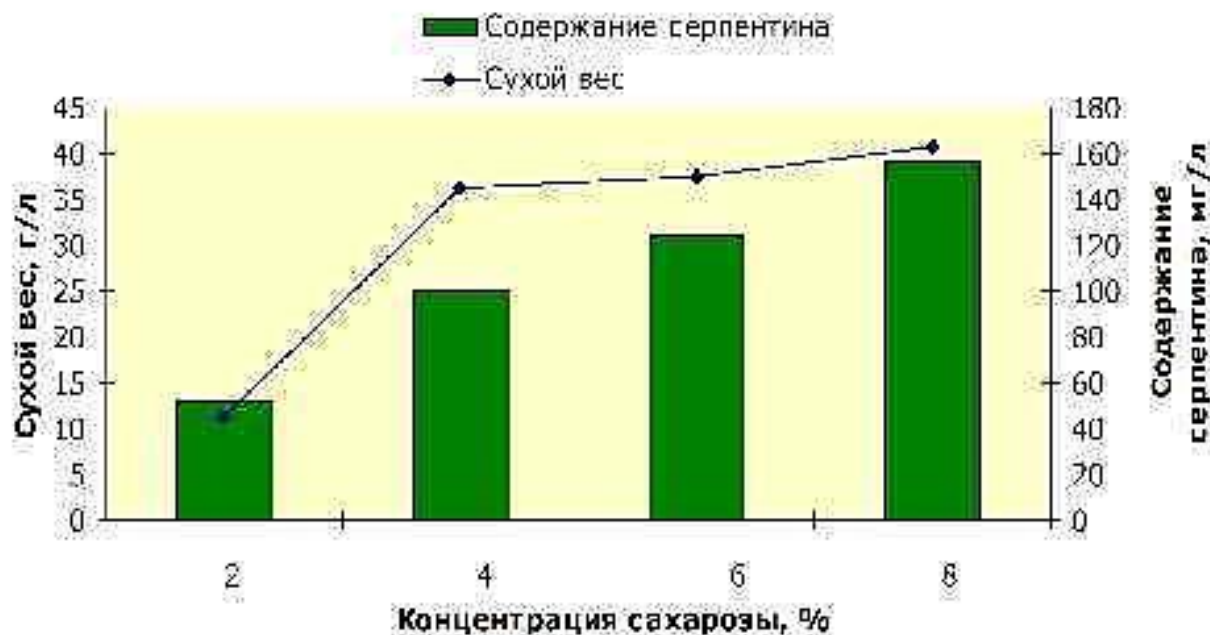
Регуляция образования вторичных метаболитов с помощью фитогормонов:

- ✓ Действие фитогормонов специфично (зависит от вида растения, природы вторичного соединения, клеточного штамма и т.д.).
- ✓ Снижение уровня ауксинов в питательной среде, в первую очередь 2,4-Д, в большинстве случаев приводит к повышению продукции вторичных метаболитов.
- ✓ Варьируя концентрации ауксинов и цитокининов, можно оказать значительное влияние на процессы синтеза каждой конкретной культурой искомого вещества.

Регуляция образования вторичных метаболитов с помощью углеводов:

✓ Увеличение концентрации сахарозы в питательной среде приводит к повышению выхода вторичных метаболитов

Влияние концентрации сахарозы в питательной среде на рост и продукцию серпентина суспензионной культурой *Catharanthus*



Регуляция образования вторичных метаболитов с помощью макроэлементов:

✓ Дефицит азота в питательной среде во многих случаях приводит к повышению выхода вторичных метаболитов

Влияние концентрации нитрата в питательной среде на образование капсаицина клетками *Capsicum frutescens*

| Концентрация NO_3^- (ммоль/л) | Содержание капсаицина, мкг/г сух.в. |
|---|--|
| 0 | 484 |
| 5 | 375 |
| 10 | 166 |
| 25 | 178 |
| 50 | 111 |

✓ Дефицит фосфора в питательной среде либо полное его исключение стимулирует синтез вторичных метаболитов

Добавление в среду предшественников вторичных метаболитов

- ✓ Позволяет усилить биосинтез и накопление вторичных метаболитов

Влияние предшественников алкалоидов на увеличение биомассы и продукцию алкалоидов суспензионной культурой *Catharantus roseus*

| Предшественники | Конц-я предшест. (мг/л) | Прирост биомассы, % | Сод-е алкалоидов, % |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|
| Контроль | 0 | 100 | 100 |
| Индольные соединения | | | |
| Шикимовая кислота | 50 | 100 | 122 |
| Индол | 50 | 110 | 98 |
| Триптамин | 100 | 75 | 67 |
| L-Триптофан | 500 | 175 | 284 |
| D-Триптофан | 500 | 65 | 55 |

Влияние температуры на биосинтез вторичных метаболитов

- ✓ Температурные оптимумы для роста культуры клеток и биосинтеза вторичных метаболитов не всегда совпадают
- ✓ Температурные сдвиги в процессе культивирования могут приводить к изменениям не только количества продуцируемых вторичных метаболитов, но также и их качественного состава
- ✓ Низкие температуры, как правило, способствуют ослаблению ингибирующего влияния 2,4-Д на образование вторичных метаболитов

ТИПЫ БИОРЕАКТОРОВ

1 ГРУППА

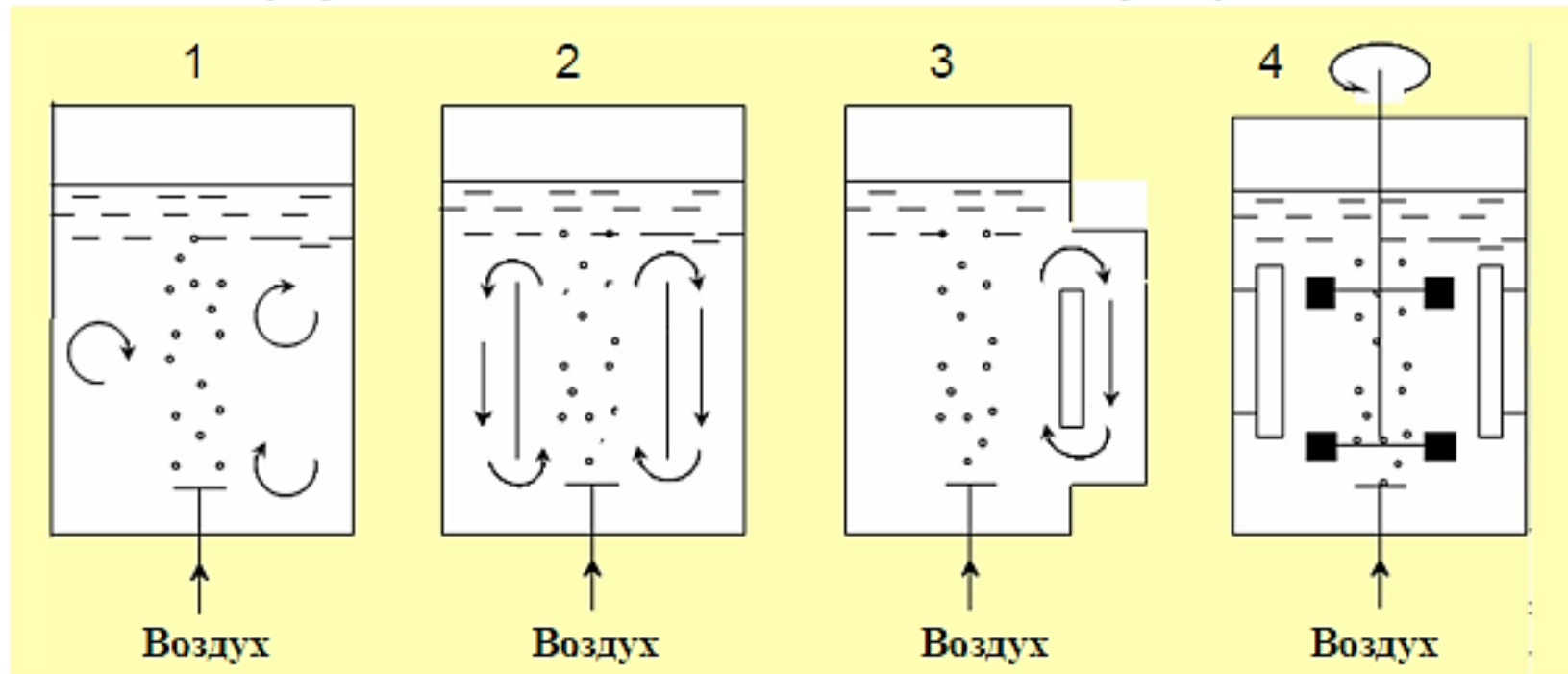
(СПОСОБ ПЕРЕМЕЩИВАНИЯ –
АЭРИРОВАНИЕ ВОЗДУХОМ):

- 1 – барботажный биореактор;
- 2 – аэролифтный биореактор;
- 3 – биореактор с вынесенной циркуляционной петлей;

2 ГРУППА

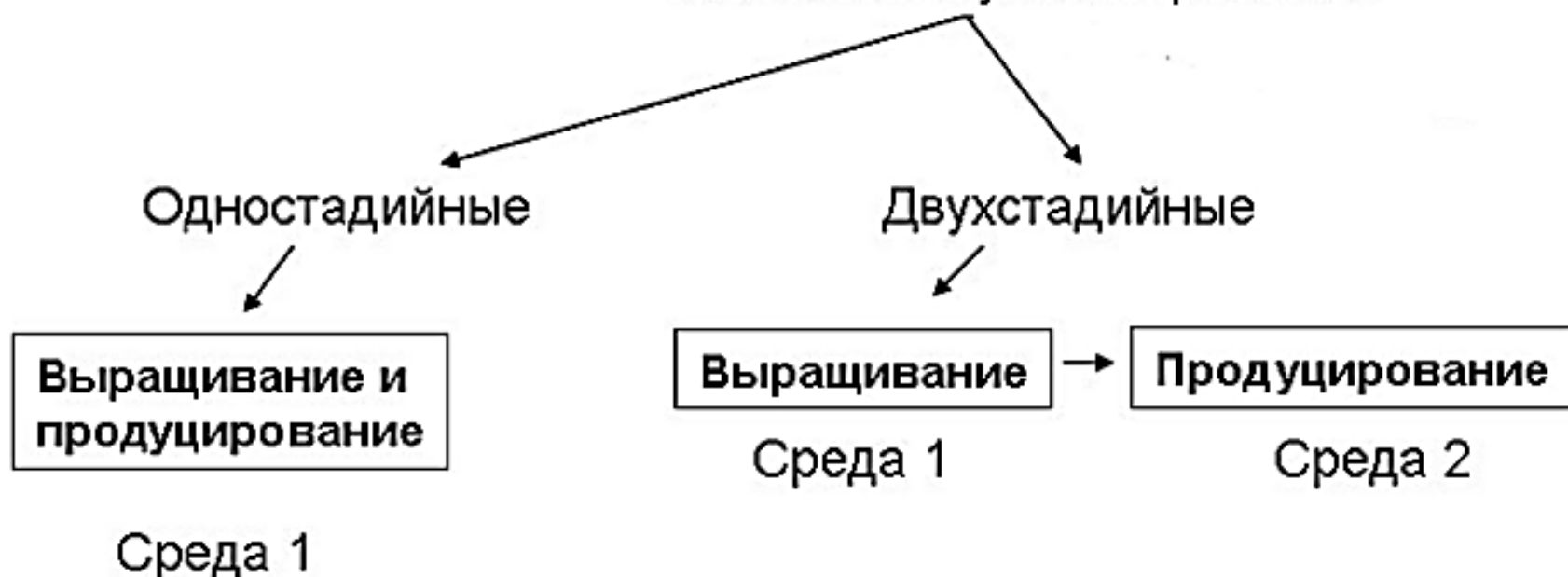
(СПОСОБ ПЕРЕМЕЩИВАНИЯ –
МЕХАНИЧЕСКИЙ):

- 4 – биореактор с механическим перемешивающим устройством



Принципиальные схемы биореакторов, наиболее часто применяемых для культивирования клеточных суспензий

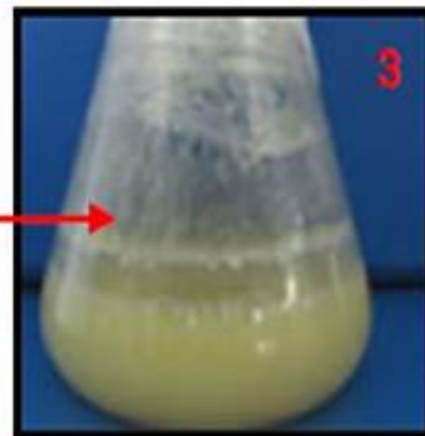
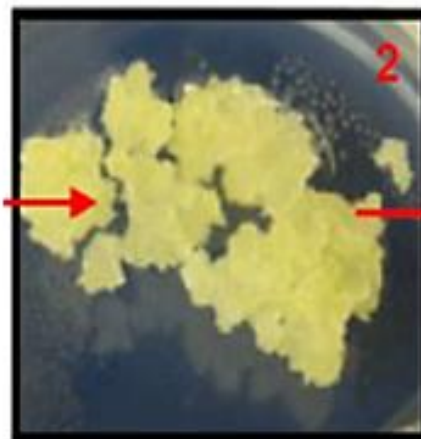
Технологии культивирования



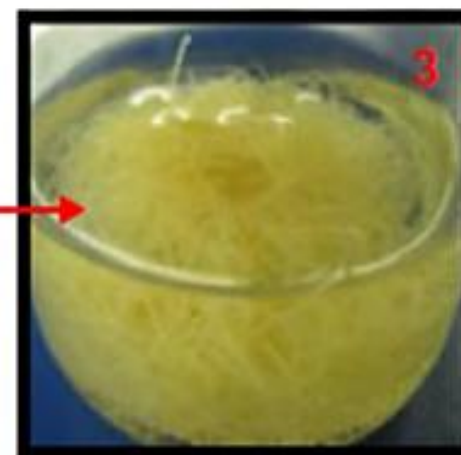
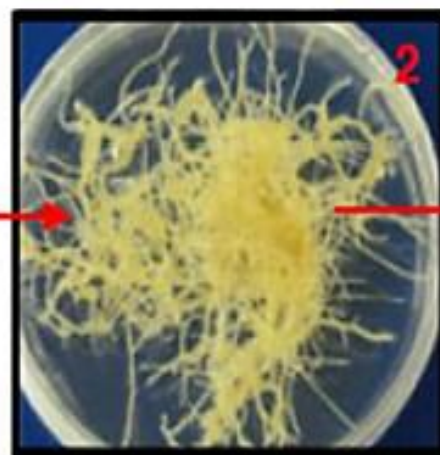
Двухстадийное культивирование:

- первый этап заключается в образовании больших количеств биомассы клеток;
- второй – создание условий для активного синтеза метаболитов.

**Источники
получения
вторичных
метаболитов**



Суспензионная культура



Культура трансформированных корней

Этапы работы по созданию технологий получения БАВ на основе культивируемых растительных клеток

Экономически обоснованный выбор объекта



Введение объекта в культуру *in vitro*
(получение каллусной культуры)



Изучение полученной биомассы по качественному
и количественному составу вторичных
метаболитов



Оптимизация питательной среды и параметров
выращивания





Получение высокопродуктивных клеточных
линий



Первичное использование лучших линий в
суспензионной культуре



Выращивание продуктивной и устойчивой
суспензионной культуры в условиях,
приближающихся к производственным



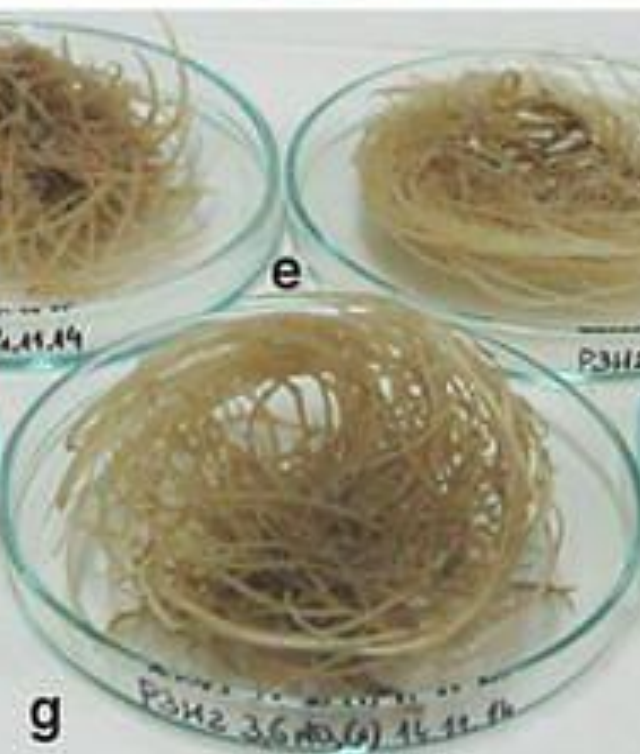
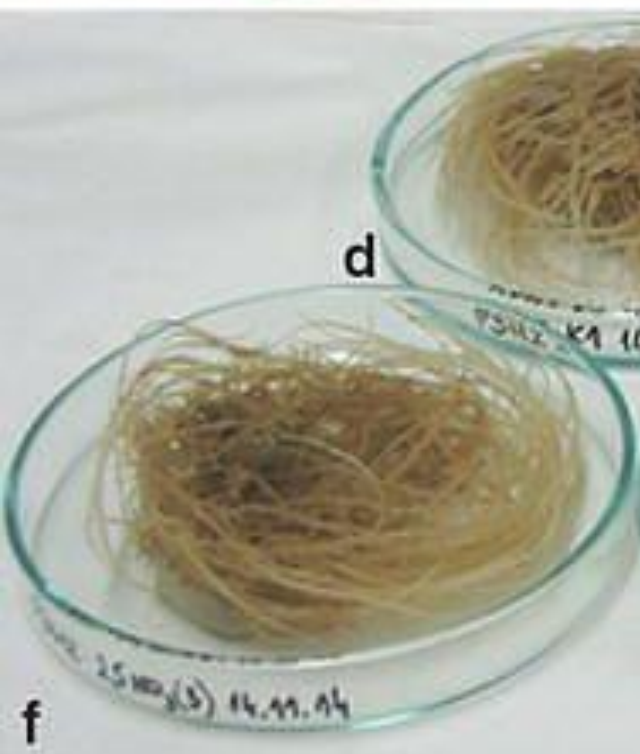
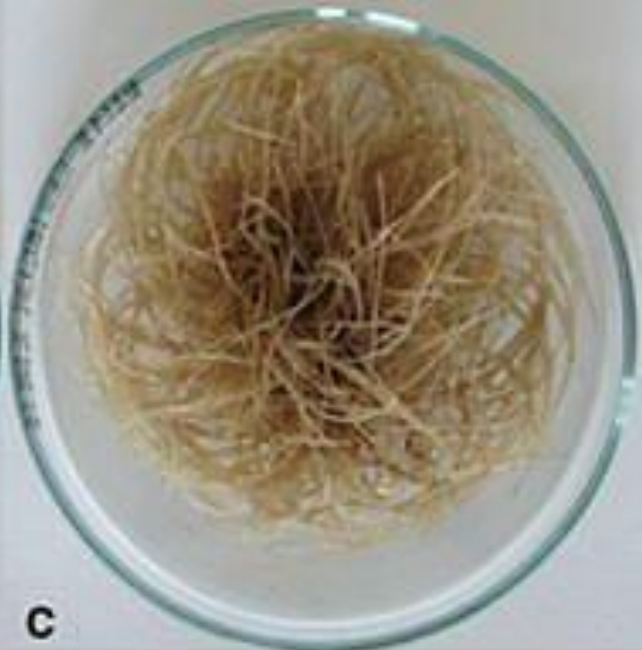
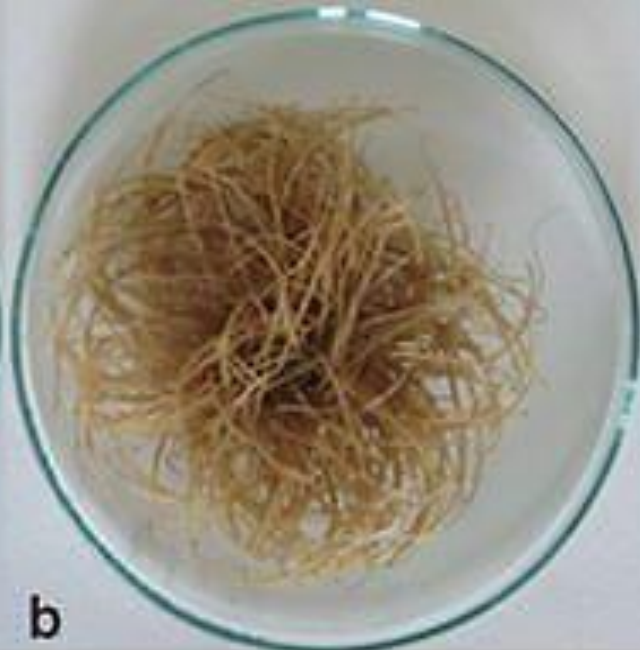
Составление технического регламента на
производство биомассы

Суспензионные культуры растительных клеток



Суспензионные культуры, растут в виде суспензии, то есть в жидкой питательной среде. Клетки тяжелее окружающей их жидкости, поэтому, чтобы они не затонули и не задохнулись, используя весь растворенный кислород, их надо постоянно перемешивать. Такие культуры обычно выращивают в колбах, на специальных качалках. Частота вращения качалки тоже важна – с одной стороны необходимо добиться перемешивания, а с другой – не вызвать механический стресс.

Суспензионные культуры - отдельные клетки или группы клеток, выращиваемые во взвешенном состоянии в жидкой среде. Представляют собой относительно однородную популяцию клеток, которую легко подвергнуть воздействию химических веществ. Их получают, помещая каллусную ткань в колбу с жидкой питательной средой и затем длительно перемешивают на качалке, удаляя при пересадках крупные агрегаты.



Примеры лекарственных веществ, полученные на основе каллусных культур

- Стевиозид - естественный подсластитель и заменитель сахара, успешно используется вместо искусственных подслащивающих веществ. Исходное растение - *Stevia rebaudiana Bertoni*.
- Арглабин – противоопухолевое соединение. Исходное растение - *Artemisia glabella Kar. et Kir*. Входит в состав одноименного препарата.
- Лаптаконитин - дитерпеновый алкалоид , аритмическое средство. Исходное растение - *Aconitum septentrionale Koelle*. Входит в состав препарата Аллапинин.



Биотрансформация на примере стероидных гликозидов



Digitalis lanata L.

Биотрансформация дигитоксина в дигоксин за счет реакции β -12-гидроксилирования, катализируемой ферментом, содержащимся в клетках наперстянки, впервые была проведена в ФРГ и включала манипуляции с использованием свободных суспензионных культур и целых иммобилизованных клеток

β -Метилдигитоксин и связанные с ним продукты биотрансформации



| R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | |
|----------------|----------------|------------------|----------------|--------------------------|
| -H | -H | -CH ₃ | -H | β -метилдигитоксин |
| -OH | -H | -CH ₃ | -H | β -метилдигоксин |
| -H | -H | -глюкоза | -H | пурпуреагликозид А |
| -OH | -H | -глюкоза | -H | диацетилланатозид С |



Panax



***Berberis vulgaris* L**



***Rauwolfia serpentina* Benth**



Cell strain of *Panax ginseng*



***Thalictrum minus* L.**

Источник гипотензивных и противоаритмических индольных алкалоидов. Клеточной селекцией с использованием химических мутагенов получен высокопродуктивный штамм, накапливающий аймалин, содержание которого составляет около 50% от суммы алкалоидов, синтезируемых культурой.



Раувольфия змеиная - перспективный источник гипотензивных и противоаритмических индольных алкалоидов. Получен высокопродуктивный штамм, накапливающий противоаритмический алкалоид **аймалин**, содержание которого составляет около 50% от суммы алкалоидов, синтезируемых культурой.

Rauwolfia serpentina Benth.



Berberis vulgaris L.



Thalictrum minus L.

Суспензионная клеточная культура василистника мало продуцирует **берберин** - растительный антибиотик и противоопухолевое средство, при этом более 80% синтезируемых тканями алкалоидов секретирруется в культуральную жидкость



Picrorrhiza kurroa Royle ex Benth.



Lithospermum officinale L.

Коптис японский - производство противоопухолевого алкалоида **берберина** из культуры клеток,
Воробейник - **шиконин** - природного антибиотика широкого спектра действия (Япония).



Taxus baccata L.

Тис обыкновенный (**таксол** – вещества, обладающего противоопухолевой активностью). В США разрешен к применению первый лекарственный препарат таксола – паклитаксел (фирма «Бристоль-Майерс») – для терапии наиболее опасных форм рака.



Catharanthus roseus (L.) G.Don

Катарантус розовый (барвинок розовый), продуцирующего противораковые алкалоиды, механизм действия которых связан с блокадой тубулина и остановкой клеточного деления в метафазе. Стоимость субстанции **Винкристина** на мировом рынке достигает 30 тыс. долларов за 1 кг., **Винбластин** – около 20 тыс. за кг.



Rosmarinus officinalis

В Германии разработали способ получения розмариновой кислоты из культуры клеток каллуса розмарина. Розмариновая кислота – вещество, обладающее противоопухолевой активностью и природный антибиотик широкого спектра действия.



Nicotiana

Из культуры клеток табака получен убихинон 10.
На основе убихинона получают препарат для лечения
инсультов и купирования спастических процессов.



Aristolochia manshuriensis Kom.

Культура
трансформированных
клеток кирказона
маньчжурского

Трансгенная культура кирказона маньчжурского является источником ценного препарата кардиотропного действия, предупреждающего развитие инфаркта миокарда и эффективного при постинфарктной реабилитации.



Экстракт, полученный из суспензионной культуры княжика сибирского, обладает ноотропными свойствами, соизмеримыми по уровню активности с дикорастущим сырьем.

Atragene sibirica L.



Macleaya cordata



Маклея является источником алкалоидов сангвинарина и хелеритрина, входящего в состав препарата «Сангвиритрин», обладающего антимикробным действием.

