

УДК 581.1, 581.6, 58.085, 576.5

**М. В. Титова, О. В. Решетняк, Е. А. Осипова, Е. С. Суханова,
А. И. Осипьянц, Н. А. Шумило, А. В. Орешников, А. М. Носов**

**ГЛУБИННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК
Stephania glabra (Roxb) Miers:
ОПТИМИЗАЦИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА
ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД**

*Проведена оптимизация условий культивирования двух штаммов суспензионной культуры клеток *Stephania glabra* (Roxb.) Miers – продуцента алкалоида стефарина при выращивании культуры в колбах и в барботажном биореакторе. Показано, что снижение концентрации ауксина (2,4-Д) в среде не оказывает существенного влияния на ростовые показатели, однако ведет к повышению (в 1,5 раза) и стабилизации уровня синтеза стефарина для обоих штаммов. Установлено, что уровень накопления биомассы и алкалоида стефарина в культуре клеток *St. glabra* в значительной степени зависит от условий культивирования, а также, по-видимому, обусловлен различной способностью к адаптации у исследованных клеточных штаммов.*

Ключевые слова: *стефарин, алкалоиды, суспензионная культура клеток, *Stephania glabra* (Roxb.) Miers.*

Введение. Культура клеток высших растений представляет собой экспериментально созданную популяцию соматических клеток, которая является уникальной биологической системой, нуждающейся в тщательнейшем изучении. Помимо теоретического интереса к исследованию поведения растительных клеток вне организма, культура клеток имеет прямое практическое значение. Хорошо известно, что в настоящее время более 25 % всех лекарственных препаратов создаются на базе растительного сырья. Между тем возможности их получения в достаточных количествах ограничены сокращающимися ресурсами дикорастущих растений. В связи с этим культуры клеток лекарственных растений представляют собой перспективный источник биологически активных веществ. Для широкомасштабного производства такого биотехнологического сырья необходимы исследования влияния параметров культивирования на характер роста и биосинтеза вторичных метаболитов в культуре. Системы контроля процессов выращивания клеток *in vitro* создают возможность направленного регулирования биосинтеза путем изменения таких физиологических параметров, как состав сред, физические факторы культивирования и т.д. [1, 2].

Ограниченные возможности для выращивания в нашей стране субтропического растения стефании гладкой *Stephania glabra* (Roxb.) Miers (продуцента группы алкалоидов – стефарина, гиндарина, циклеанина и проч., используемых для производства лекарственных препаратов, применяемых в неврологии [3–6]) ведет к необходимости получения и выращивания культуры клеток стефании гладкой.

В 1992 году Е. А. Осиповой [7] была получена суспензионная культура клеток стефании гладкой, из которой в результате обработки мутагеном нитрозометилмочевинной на среде с парафторфенилаланином были получены штаммы, характеризующиеся стабильными ростовыми характеристиками и присутствием стефарина в биомассе. Следует отметить, что по качественному составу алкалоидов полученные штаммы отличались от интактного растения. Было показано, что в сумме алкалоидов основная доля приходилась на стефарин, тогда как гиндарин, циклеанин и остальные алкалоиды присутствовали в следовых количествах. Подобная избирательность синтеза облегчает выделение и очистку целевого продукта [7, 8].

Однако по данным литературных источников известно, что в большинстве случаев клеточные культуры различных алкалоидсодержащих растений при длительном выращивании достаточно быстро теряют способность к их стабильному синтезу в процессе культивирования либо не способны накапливать алкалоиды в количествах, необходимых для рентабельного получения и выделения биологически активных соединений [9].

Целью работы было изучение возможности оптимизировать рост суспензионной культуры и накопление алкалоида стефарина в клетках *St. glabra* в процессе выращивания за счет варьирования гормонального состава питательных сред и условий культивирования. На основании исследований, проведенных ранее Е. А. Осиповой [7, 8], в качестве оптимизационного фактора был выбран уровень содержания ауксина 2,4-Д в среде.

Задачи исследования:

- 1) изучить ростовые и биосинтетические характеристики двух штаммов *St. glabra* при глубинном выращивании в колбах на средах с различным содержанием 2,4-Д;
- 2) для всех вариантов провести культивирование в биореакторах и оценить полученные результаты с точки зрения перспективы промышленного аппаратного выращивания культур для получения алкалоида стефарина.

Техника эксперимента. Объекты исследования. В качестве объектов исследования использовали 261 и 113 штаммы суспензионной культуры клеток *Stephania glabra* (Roxb.) Miers, полученные в результате мутагенеза и последующей клеточной селекции и депонированные в ВККК ВР ИФР РАН.

Культуры выращивали на модифицированной питательной среде с основой по Мурасиге-Скуга и с добавлением сахарозы и регуляторов роста (в соответствии с [8]). В средах варьировали содержание 2,4-Д: для варианта выращивания на стандартной среде – 0,1 мг/л среды; для варианта с пониженным содержанием 2,4-Д – 0,005 мг/л среды. Для всех вариантов культивирования начальную плотность культуры поддерживали в пределах 1,4–1,8 г/л по сухой биомассе клеток при жизнеспособности культур 85–96 %.

Культивирование в колбах. Для выращивания суспензионных культур клеток в колбах на круговой качалке использовали колбы объемом 0,5 л. Продолжительность цикла субкультивирования составляла две недели. Культивирование проводили в темноте при температуре 26–27°C, влажности 70–75 % и частоте оборотов качалки 80–100 об/мин.

Культивирование в биореакторах. В проведенных ранее экспериментах было показано, что предпочтительной системой для аппаратного глубинного культивирования клеток *St. glabra* являются биореакторы с перемешиванием сжатым воздухом [10]. При проведении данной работы использовали барботажный соплоконусный ферментер (разработка Отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН; общий объем 20 л; рабочий объем 15 л). Аппаратное выращивание проводили в полупроточном режиме.

Для этого в фазу максимального накопления сухой массы в единице объема суспензии (11–14 сутки) производили отлив суспензии и добавляли свежую питательную среду. Разведение рассчитывали таким образом, чтобы концентрация сухой биомассы в начале каждого цикла была не менее 1,4 г/л по сухой биомассе, т.к. при снижении плотности посадки отмечали падение жизнеспособности клеток, уменьшение удельной скорости роста и конечной концентрации биомассы.

В зависимости от фазы ростового цикла расход воздуха на барботаж составлял 0,1–1,0 л/л/мин. Концентрацию растворенного кислорода pO_2 поддерживали на уровне 10–40 % от насыщения при отсутствии интенсивного пенообразования.

Для уменьшения травматического воздействия перемешивания на клетки на начальных фазах роста устанавливали минимальный расход воздуха (по отсутствию седиментации клеток). В период экспоненциального роста интенсивность перемешивания увеличивали до максимально возможной, не приводящей к разрушению клеток (степень повреждения определяли микроскопически).

Температуру суспензии в аппаратах поддерживали на уровне $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Определение ростовых характеристик. Для характеристики роста и физиологического состояния культур использовали накопление сухой и сырой массы клеток, а также жизнеспособность. Для определения сырой и сухой массы суспензию фильтровали под вакуумом, промывали на фильтре дистиллированной водой и высушивали до постоянного веса в темноте при $55\text{--}60^\circ\text{C}$. Жизнеспособность определяли под микроскопом как процент не окрашиваемых 0,025 %-й синькой Эванса клеточных агрегатов от их общего числа в поле микроскопа. Просчитывали не менее 250 агрегатов в трех повторностях.

Анализ алкалоида стефаглабрина сульфата. Для анализа 60 мг высушенной биомассы культуры клеток *St. glabra* заливали 1 мл водного раствора 0,1 % серной кислоты, перемешивали и оставляли на 18–20 часов. 6 мкл надосадочной жидкости наносили микрошприцем на ТСХ-пластины с сорбентом Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия) или ПТСХ-П-А-УФ «Сорбфил» (ЗАО «Сорбполимер», Россия). Пластины помещали в камеру, насыщенную парами системы растворителей хлороформ : бензол : этанол : 25 % раствор аммиака (50 : 80 : 100 : 0,02, по объему), и хроматографировали в восходящем слое сорбента (R_f стефарина равен 0,25) [11]. Количественную оценку содержания алкалоида проводили путем денситометрирования пятна стефаглабрина на пластинке при длине волны 254 нм (денситометр «Сорбфил» ЗАО «Сорбполимер», Россия). Для расчета использовали метод абсолютной калибровки с учетом влажности исследуемой биомассы. В качестве стандарта и для построения калибровочной кривой использовали спиртовые растворы стефаглабрина сульфата (Всероссийский институт лекарственных растений, Москва). Предел детектирования для стефаглабрина сульфата – 0,1 мкг в пятне.

Интерпретация результатов и их анализ. *Культивирование в колбах.* Выращивание суспензионной культуры клеток стефании гладкой в колбах проводили по схеме, описанной выше. Для всех указанных вариантов исследовали особенности роста и накопления алкалоида стефарина, а также рассчитывали индекс роста (I), удельную скорость роста (μ), продуктивность по алкалоиду стефарину (P). Полученные результаты представлены на рис. 1, 2 и табл. 1.

Жизнеспособность клеток во всех экспериментах сохранялась на уровне 85–89 % в начале цикла культивирования и повышалась до 88–96 % к началу стационарной фазы.

Все исследованные варианты отличались достаточно высокими ростовыми показателями – максимальное накопление сухой биомассы не опускалось ниже 16 г/л, удельная скорость роста варьировала в пределах 0,26–0,39, индекс роста составлял 8,90–9,89.

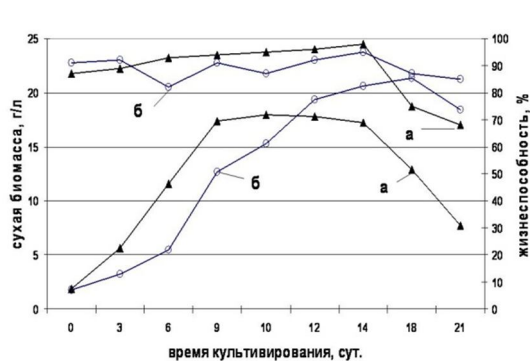


Рис. 1. Накопление сухой биомассы и изменение жизнеспособности при культивировании в колбах 113 штамма суспензионной культуры клеток *St. glabra* на стандартной среде (а) и среде с пониженным содержанием 2,4-Д (б)

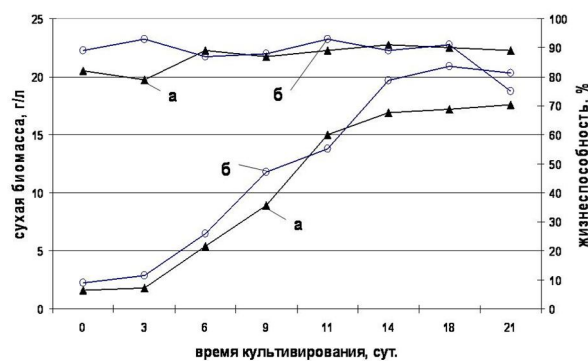


Рис. 2. Накопление сухой биомассы и изменение жизнеспособности при культивировании в колбах 261 штамма суспензионной культуры клеток *St. glabra* на стандартной среде (а) и среде с пониженным содержанием 2,4-Д (б)

Из представленных графиков следует, что рост 261 штамма на обоих вариантах сред характеризуется наличием выраженной лаг-фазы по сухому весу биомассы продолжительностью 2–3 суток (рис.2). В то же время, для кинетики роста 113 штамма по сухому весу лаг-фаза отсутствует (рис. 1). Также можно отметить, что стадия деградации для 113 штамма наблюдается уже на 14 сутки при выращивании на стандартной среде и на 18 – при выращивании на среде № 27 (рис. 1), тогда как для 261 штамма при выращивании на обоих вариантах сред характерно продолжение стадии плато вплоть до окончания субкультивирования – 21 суток (рис. 2). Стадия деградации в 113 штамме сопровождается снижением жизнеспособности культуры, что особенно выражено для варианта на стандартной среде (рис. 1).

Т а б л и ц а 1

Параметры роста и биосинтеза для 113 и 261 штаммов культуры клеток *Stephania glabra* при выращивании на стандартной среде и среде с пониженным содержанием 2,4-Д (колбы)

Штамм	Система культивирования	M_{\max} , г/л	Содержание стеффарина, % к сухой биомассе	P , Мг/л среды	μ , сут ⁻¹	I
113	Стандартная среда	16-19	0,08-0,30	14-67	0,32-0,38	9,45-10,66
	Среда с пониженным содержанием 2,4-Д	16-20	0,10-0,48	16-96	0,27-0,32	9,4-12,2
261	Стандартная среда	15-20	0,10-0,45	17-94	0,29-0,33	9,89-10,47
	Среда с пониженным содержанием 2,4-Д	15-21	0,10-0,63	17-114	0,29-0,34	6,5-10,9

Примечание: M_{\max} – максимальное накопление сухой биомассы, г/л среды, P – продуктивность культуры клеток по стеффарину, мг/л среды, μ – удельная скорость роста в экспоненциальной фазе роста, сут⁻¹, I – индекс роста по сухой биомассе.

Были отмечены сходные закономерности накопления стеффарина в процессе культивирования для всех исследуемых вариантов. Динамика увеличения содержания алкалоида носила «пиковый» характер. Максимальный уровень синтеза фиксировали на 11–14 сутки, что соответствовало фазе замедления роста или стационарной фазе (рис.1–2, табл.1). В конце стадии стационара и в стадии деградации для всех штаммов наблюдали резкое снижение уровня синтеза. В целом более низкий уровень накопления алкало-

идов был показан для штамма 113 (при выращивании на обоих вариантах сред). Максимальное содержание стефarina (0,10–0,63 %) было отмечено для 261 штамма при выращивании на среде с пониженным содержанием 2,4-Д (табл.1), минимальное – в пределах 0,08–0,30 %, – для 113 штамма при выращивании на стандартной среде (табл.1). Такое различие в уровне синтеза может быть обусловлено результатом генетической гетерогенности клеток исходной культуры, из которой были получены исследуемые в данной работе штаммы.

Полупроточное выращивание в биореакторах. Для оценки возможности оптимизации аппаратного культивирования осуществляли полупроточное выращивание суспензионной культуры *St. glabra* на средах с различным содержанием 2,4-Д в барботажных биореакторах.

Культивирование в полупроточном режиме проводили по схеме, отработанной для различных штаммов *St. Glabra* ранее [10]. Для каждого варианта было проведено несколько циклов выращивания в режиме полупотока, каждый мультицикл состоял из 3–4 циклов субкультивирования. Общая продолжительность каждого мультицикла варьировала в пределах 40–60 суток. В ряде экспериментов выращивание осуществляли параллельно в 2–3 биореакторах. Процесс «отлива суспензии-долива среды» проводили при достижении плотности суспензии, соответствующей началу фазы замедления роста. Разбавление средой в каждом цикле проводили до концентрации биомассы, исключая появление лаг-фазы.

Обобщенные данные по основным ростовым и биосинтетическим характеристикам штаммов, полученные в ходе экспериментов, приведены в табл.2.

Т а б л и ц а 2

Параметры роста и биосинтеза для 113 и 261 штаммов культуры клеток *Stephania glabra* при полупроточном выращивании на стандартной среде и среде с пониженным содержанием 2,4-Д (барботажный биореактор)

Штамм	Система культивирования	M_{\max} , г/л	Содержание стефarina, % к сухой биомассе	R , мг/л среды	μ , сут ⁻¹	I
113	Стандартная среда	12-16	0-0,16	10-26	0,20-0,22	8,09-10,70
	Среда с пониженным содержанием 2,4-Д	12-16	0,08-0,20	12-32	0,18-0,21	6,80-9,10
261	Стандартная среда	11-14	0-0,15	8-21	0,17-0,19	8,11-9,57
	Среда с пониженным содержанием 2,4-Д	12-16	0,08-0,27	12-40	0,18-0,28	7,50-9,80

Примечание: обозначения см. в табл.1.

Максимальное накопление сухой биомассы наблюдали на 11–14 день культивирования (12–16 г/л для 113 штамма на двух вариантах сред и для 261 штамма на среде с пониженным содержанием 2,4-Д; 11–14 г/л для 261 штамма на стандартной среде, см. табл.2), что несколько ниже показателей, полученных при выращивании в колбах. Кроме того, было отмечено снижение жизнеспособности клеток в процессе культивирования (на уровне 82–92 % и 78–84 % для 113 и 261 штаммов соответственно для обоих вариантов сред); а также снижение скорости роста (в 1,5 раза для всех вариантов) и продуктивности по стефарину. Содержание алкалоидов при таком способе культивирования не превышало 0,08–0,16 % для обоих штаммов при выращивании на стандартной среде; 0,20 % для 113 штамма и 0,27 % для 261 штамма при выращивании на среде с пониженным содержанием 2,4-Д (табл.2). Однако следует отметить, что в целом для

данного способа культивирования при понижении концентрации 2,4-Д в среде синтез в процессе роста культур был более стабилен для обоих штаммов, а для штамма 261 наблюдали также повышение ростовых характеристик.

Выводы. В проведенной серии экспериментов для двух штаммов суспензионной культуры *St. glabra* были изучены закономерности изменения ростовых показателей и накопления алкалоида стефарина при выращивании в колбах и биореакторах на питательных средах с различным содержанием 2,4-Д. Показано, что снижение концентрации 2,4-Д не оказывает существенного влияния на ростовые показатели, однако ведет к более высокому и стабильному синтезу стефарина для обоих штаммов. Кроме того, необходимо отметить, что уровень накопления биомассы и алкалоида стефарина в культуре клеток *St. glabra* в значительной степени зависит от условий культивирования, в частности от технических характеристик систем выращивания (интенсивности аэрации и перемешивания, конструктивных особенностей), а также, по-видимому, обусловлен различной способностью к адаптации у исследованных клеточных штаммов.

Список литературы

1. DiCosmo, F. Plant cell and tissue culture: Alternatives for metabolite production / F. DiCosmo, M. Misawa // *Biotechnology Advances*. – 1995. – № 3. – P.425-453.
2. Kieran, P.M. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations / P.M. Kieran, P.F. MacLoughlin, D.M. Malone // *Journal of Biotechnology*. – 1997. – Vol.59. – P.39-52.
3. Madan, B.R. Further studies on some pharmacological actions of Gindarine hydrochloride – an alkaloid of *Stephania glabra* (Roxb.) Miers / B.R. Madan, N.K. Khanna, O.P. Mahatma, V. Madan, A.P. Dadhich // *Indian J. Pharmacology*. – 1974. – № 6. – P. 97-102.
4. Cava, M.P. The alkaloids of *Stephania glabra*. A direct chemical correlation of the absolute configuration of some benzyltetrahydroisoquinoline, proaporphine, and aporphine alkaloids. A new protoberberine alkaloid / M.P. Cava, K. Nomura, S.K. Talapatra et al. // *J. Org. Chem.* – 1968. – Vol. 33. – N. 7. – P. 2785-2789.
5. Salo, L.P. Pharmacognostic study of *Stephania glabra* roxb. Miers / L.P. Salo, I.M. Rabinovich // *Farmatsiia*. – 1970. – Vol. 19. – № 2. – P. 32-36.
6. Соколов, С.Я. Справочник по лекарственным растениям / С.Я. Соколов, И.П. Замотаев. – М.: Медицина, 1990. – 464 с.
7. Осипова, Е.А. Вариабельность роста и синтеза стефарина в клоновых популяциях *Stephania glabra* / Е.А. Осипова // Автореф. дис... канд. биол. наук 03.00.12. – М., 1997. – 25 с.
8. Шамина, З.Б. Повышение продуктивности культуры клеток стефании гладкой *Stephania glabra* roxb. Miers / З.Б. Шамина, Т.А. Савина, Е.А. Осипова, Ю.Г. Попов // *Физиология растений*. – 1994. – Т. 41. – № 6. – С. 885-890.
9. Verpoorte, R. Plant cell biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects / R. Verpoorte, R. van der Heijden, J. Schripsema, J.H.C. Hoge, H.J.G. Ten Hoopen // *J. Nat. Prod.* – 1993. – Vol. 56. – № 2. – P. 186-207.
10. Титова, М.В. Выращивание суспензионной культуры клеток *Stephania glabra* roxb. Miers в различных системах: особенности роста и накопления алкалоида стефарина / М.В. Титова, О.В. Решетняк, Е.А. Осипова и др. // *Биотехнология*. – 2011. – № 4. – С. 40-46.
11. Давыденков, В.Н. Количественное определение стефарина в культуре клеток стефании гладкой / В.Н. Давыденков, Н.В. Гареева, А.А. Кириянов, Л.Т. Бондаренко // *Химико-фармацевтический журнал*. – 1988. – Т. 2. – № 3. – С. 326-328.

Статья поступила в редакцию 19.09.11.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Государственный контракт № 16. 552.11.7050) и федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» по направлению «Клеточные технологии» (Государственный контракт № П-403).

*M. V. Titova, O. V. Reshetnyak, E. A. Osipova, E. S. Sukhanova,
A. I. Osipyanz, N. A. Shumilo, A. V. Oreshnikov, A. M. Nosov*

**PROFOUND CULTIVATION OF
STEPHANIA GLABRA (ROXB) MIERS CELLS:
OPTIMIZATION OF PHYTOHORMONES CONTENT OF NUTRITIVE MEDIUM**

*Optimization of the conditions for cultivation of two strains of *Stephania glabra* (Roxb.) Miers suspension cell culture which is an alkaloid stepharin producer in cultivation of the plant in flasks and barbotage bioreactors is carried out. The obtained results showed that auxin content (2,4-D) decrease in the medium does not have a significant effect on growth parameters, but it leads to increase (in 1.5 times) and more stable stepharin production for the both strains. It is ascertained that the level of biomass and alkaloid stepharin accumulation in *St. Glabra* cell culture mostly depends on the cultivation conditions and it appears that it also depends on different ability for adaptation of the studied strains.*

Key words: *stepharin, alkaloids, cell suspension culture, *Stephania glabra* (Roxb.) Miers.*

ТИТОВА Мария Владимировна – научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – вторичный метаболизм, биология культивируемых клеток *in vitro*. Автор 20 публикаций.

E-mail: titomirez@newmail.ru

РЕШЕТНЯК Оксана Владимировна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – вторичный метаболизм, биология культивируемых клеток *in vitro*. Автор 52 публикаций.

E-mail: ox_reshetnyak@mail.ru

ОСИПОВА Елена Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – вторичный метаболизм, биология культивируемых клеток *in vitro*. Автор 25 публикаций.

E-mail: ifr@ippras.ru

СУХАНОВА Елена Сергеевна – научный сотрудник кафедры физиологии растений Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов – биология культивируемых клеток *in vitro*, вторичный метаболизм. Автор 10 публикаций.

E-mail: mushilda@mail.ru

ОСИПЬЯНЦ Андрей Игоревич – студент кафедры физиологии растений Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов – биология культивируемых клеток *in vitro*, вторичный метаболизм. Автор трех публикаций.

E-mail: ifr@ippras.ru

ШУМИЛО Николай Анатольевич – научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – вторичный метаболизм, биология культивируемых клеток *in vitro*. Автор 15 публикаций.

E-mail: ifr@ippras.ru

ОРЕШНИКОВ Александр Викторович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии культивируемых клеток Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Область научных интересов – вторичный метаболизм, биология культивируемых клеток *in vitro*. Автор 35 публикаций.

E-mail: ifr@ippras.ru

НОСОВ Александр Михайлович – доктор биологических наук, профессор кафедры физиологии растений Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов – биология культивируемых клеток *in vitro*, вторичный метаболизм, биотехнология. Автор 270 научных и учебно-методических работ, в том числе пяти монографий и двух учебных пособий.

E-mail: al_nosov@mail.ru