

АППАРАТУРНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК IN VITRO PHLOJODICARPUS SIBIRICUS (STEPH. EX SPRENG.) K. – POL.

М.Т. Ханды^{1,2}, А.Г. Ключин³, С.В. Томилова^{3,4}, А.М. Носов^{3,4}

¹ ФНЦ биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия

² Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова, Якутск, Россия

³ Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

При быстром темпе развития науки и техники в XXI веке, важно обеспечить сохранность окружающей природной среды для будущих поколений. В связи с этим остро встает вопрос об оптимальном использовании растительных ресурсов – в условиях активного применения ценных видов растений, обеспечить сохранение их естественных ареалов. С этой точки зрения актуальны работы по исследованию культур клеток высших растений, синтезирующих ценные вторичные метаболиты и возможности их аппаратного выращивания. Данная технология позволяет получить возобновляемое растительное сырье и имеет ряд преимуществ, основным из которых является радикальное снятие проблемы его дефицита. Кроме того, становится возможным получение биомассы культур клеток и тканей редких и исчезающих видов растений, при этом, получаемое сырье стандартно, полностью свободно от всех видов поллютантов. Все это делает исследования в области культур клеток высших растений крайне востребованными и актуальными.

Вздутоплодник сибирский (*Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K. – Pol.) – эндемик Сибири и Дальнего Востока, ценное лекарственное растение. Корни *Ph. sibiricus* используют для профилактики и лечения сердечнососудистых заболеваний, некоторых неврологических расстройств, нарушений функций желудка и легких [1]. Лечебные свойства *Ph. sibiricus* обусловлены содержанием фенольных соединений, а именно пирано- и гидроксикумаринов. Вздутоплодник сибирский использовали при производстве препаратов спазмолитического действия «Димидин» и «Фловерин», а также комплексного препарата сердечно-сосудистого действия «Сафинор». В настоящее время производство названных препаратов приостановлено из-за отсутствия сырья.

В 2019 году авторами были получены каллусные и суспензионные культуры *Ph. sibiricus* [2], как потенциальные источники редких и новых фенольных соединений. Целью настоящей работы было изучить возможность эффективного аппаратного культивирования клеток вздутоплодника сибирского на основании анализа физиологических показателей в процессе выращивания в двух типах биореакторов.

В качестве объекта исследования использовали суспензионную культуру клеток вздутоплодника сибирского, полученную из каллусов листового происхождения [2].

Для выращивания клеток использовали жидкую питательную среду Мурасиге и Скуга (MS), приготовленную по прописи [3] с добавлением инозитола (0,1 г/л), 3 % сахарозы и регуляторов роста – 2,4 – дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4 – Д) (1,0 мг/л) и 6-бензиламинопурина (БАП) (0,5 мг/л) (Merck, Германия).

Культивирование проводили в биореакторах с различным типом перемешивающего устройства:

1) Микробиологический биореактор с механической мешалкой, общим объемом 7,5 л (New Brunswick, модель MF-107). Перемешивающее устройство – типа «морской винт» (100 об/мин).

2) Барботажный соплоконусный биореактор, общим объемом 21 л (собственная разработка лаборатории биологии культивируемых клеток ИФР РАН). Перемешивающее устройство – барботер с одним отверстием диаметром 6 мм.

В обоих аппаратах использовали одинаковый тип трубчатого аэратора с микроотверстиями для мелкодисперсной подачи воздуха в питательную среду. Скорость подачи воздуха для аэрации – от 0,17 до 0,25 л на 1 л питательной среды в минуту (постепенно повышается из-за уменьшения объема суспензии после отбора проб, в случае барботажного биореактора – это сумма воздуха на барботаж и аэрацию вместе взятые).

Для инокуляции в биореакторы использовали двухнедельную культуру, выращенную в колбах. Исходная плотность сухой биомассы составляла около 0,5–1 г/л. Культивирование проводили при температуре 26±0,1 °C в темноте.

Жизнеспособность культур определяли с помощью окрашивания клеток прижизненным красителем феносафранином (0,1 %-ный раствор) (Merck, Германия) путем подсчета живых (неокрашенных) и мертвых (окрашенных) культивируемых единиц под микроскопом. Для определения сухой биомассы в 1 л среды фиксированный объем суспензии (не менее 10 мл в двух биологических повторностях) фильтровали под вакуумом через бумажный фильтр с помощью воронки Бюхнера [4]. Биомассу высушивали в сушильном шкафу при 50 °C в течение 24 часов.

На основании полученных результатов рассчитывали параметры роста суспензионных культур клеток, такие как индекс роста (I), удельная скорость роста (μ), время удвоения биомассы (τ), максимальное накопление сухой биомассы ($M_{\max}$), экономический коэффициент (Y), продуктивность по биомассе (P).

Для расчетов использовали следующие формулы [4]:

$$I = X_{\max} / X_0, \quad \mu \text{ (сут}^{-1}\text{)} = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1), \quad \tau \text{ (сут)} = \ln 2 / \mu.$$

$$Y = (X_{\max} - X_0) / S_0, \quad P \text{ (г/л} \times \text{сут)} = (X_i - X_0) / (t_i - t_0),$$

где $X_{\max}$ и X_0 – максимальное и начальное значения критерия роста соответственно (сухая биомасса, сырая биомасса, концентрация клеток); X_2 и X_1 – значения критерия роста (концентрация клеток, содержание сырой / сухой биомассы в литре среды) в момент времени t_2 и t_1 , соответственно (рассчитывается для экспоненциальной фазы роста); $X_{\max}$ и X_0 – максимальная и начальная концентрации сухой биомассы (г/л), соответственно; S_0 – начальная концентрация субстрата (сахарозы) в среде (г/л среды); X_0 и X_i – количество сухой биомассы в начале культивирования и в момент времени t_i соответственно.

Для сравнительного анализа при аппаратном выращивании было проведено определение минимальной плотности, при которой культура может быть культивирована. Исходная плотность биомассы при выращивании суспензионной культуры клеток высших растений влияет на многие показатели роста. Поэтому для каждой культуры важно определить границы значений, при которых в периодическом двухнедельном режиме выращивания наблюдается устойчивый рост без ухудшения ростовых и биосинтетических характеристик. При выращивании культуры клеток вздутоплодника сибирского в колбах было использовано значение около 1 г/л сухой биомассы [2]. При аппаратном выращивании культуры возможно негативное воздействие на клетки систем перемешивания и аэрации, особенно для биореакторов с механическим типом перемешивания. Это вызывает необходимость оптимизации начальной плотности культуры, что было проведено для выращивания полученной суспензионной культуры клеток *Phlojodicarpus sibiricus* в биореакторе MF-107.

Использовали два значения начальной плотности клеток – 0,5 и 1 г/л. При плотности 0,5 г/л наблюдали снижение жизнеспособности культуры с 65–70 % до 55 % на протяжении первых двух суток, а затем резкое понижение до 10–11 % на 4 сутки. При этом было равномерное снижение плотности сухой биомассы с 0,5–0,55 до 0,3 г/л. Далее культивирование при этой плотности прекратили. При значении 1 г/л на 3 сутки было небольшое снижение жизнеспособности с 65–70 % до 60–65 %, при этом уменьшилась плотность сухой биомассы с 1,15 до 1,1 г/л. Затем началось увеличение плотности до 8,9 г/л на 24 сутки при сохранении жизнеспособности 60–65 %. Таким образом, начальную плотность в районе 1 г/л можно считать оптимальной для этого типа биореактора. Для сравнения, с этой же начальной плотностью было проведено выращивание культуры клеток вздутоплодника сибирского в барботажном биореакторе. В этом случае снижения плотности биомассы обнаружено не было и жизнеспособности клеток постоянно сохранялась на уровне 65–70 %.

Следующим этапом работ было, исследование ростовых характеристик культур клеток при выращивании в биореакторах. Из полученных результатов следует, что аппаратное выращивание клеток в барботажном биореакторе приводит к стабильному росту культуры с длительностью лаг-фазы около 3-х суток и улучшению ее основных ростовых показателей относительно колб (индекс роста по сухой биомассе $I = 12,7$; максимальное накопление сухой биомассы $M = 15,8$ г/л на 24 сутки культивирования, удельная скорость роста по сухой биомассе – 0,18, продуктивность по сухой биомассе $P = 0,78$ г/(л $\times$ сут), экономический коэффициент $Y = 0,49$). Напротив, при использовании биореактора с механическим перемешиванием отмечено ухудшение ростовых параметров (индекс роста по сухой биомассе – 7,6; удельная скорость роста по сухой биомассе – 0,13 сут $^{-1}$; максимальное накопление сухой биомассы – 8,9 г/л.).

Снижение ростовых показателей при их выращивании в биореакторах с механическим типом перемешивания были получены ранее при работе с культурами клеток других видов (диоскореи *Dioscorea deltoidea* Wall., женьшеня *Panax japonicus* var *reps*, стефании *Stephania glabra* Roxb [5, 6]). При этом улучшение ростовых характеристик в барботажном биореакторе предположительно связано с улучшением аэрации клеток, а ухудшение роста при использовании биореактора с механическим перемешиванием – с повреждающим действием на клетки перемешивающих устройств. Полученные результаты свидетельствуют, что при аппаратурном культивировании суспензионной культуры клеток *Ph. sibiricus* предпочтительной системой ожидаемо оказался барботажный биореактор.

Таким образом, впервые проведено успешное выращивание клеток *in vitro* *Ph. sibiricus* в лабораторных биореакторах различной конструкции и оптимизированы условия аппаратурного выращивания этой культуры с достаточно высокими ростовыми характеристиками.

Работы выполнены при финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки России (FSRG-2020-0019).

ЛИТЕРАТУРА

1. Olennikov D.N., Fedorov I.A., Kashchenko N.I., Chirikova N.K., Vennos C. Khellactone Derivatives and Other Phenolics of *Phlojodicarpus sibiricus* (Apiaceae): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MS/MS and HPLC-UV Profile, and Antiobesity Potential of Dihydrosamidin // *Molecules*. 2019. V. 24 I. 12. P. 2286. doi 10.3390/molecules24122286
2. Ханды М.Т., Кочкин Д.В., Томилова С.В., Галишев Б.А., Ключин А.Г., Носов А.М. Получение и фитохимический скрининг каллусных и суспензионных культур клеток вздутоплодника сибирского *Phlojodicarpus sibiricus* (Steph. ex Spreng.) K. – Pol. / *Биотехнология*. 2020. В печати
3. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. V.15. P.473–497.
4. Носов А.М. Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / Ред. Вл. В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. Москва: БИНОМ, 2012. С. 386–403.
5. Titova M.V., Shumilo N.A., Kulichenko I.E., Ivanov I.M., Sukhanova E.S., Nosov A.M. Features of respiration and formation of steroidal glycosides in *Dioscorea deltoidea* cell suspension culture grown in flasks and bioreactors // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2015. V. 62. № 4. P. 557–563. doi 10.1134/S1021443715040160
6. Titova M.V., Reshetnyak O.V., Osipova E.A., Shumilo N.A., Oreshnikov A.V., Osip'yants A.I., Nosov A.M. Submerged cultivation of *Stephania glabra* (Roxb.) Miers cells in different systems: Specific features of growth and accumulation of alkaloid stepharine // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2012. V. 48. № 7. P. 645–649. doi 10.1134/S0003683812070046