

# ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛРС.

Выращивание ЛР и получение ЛРС  
в культуре (агро- и *in vitro*).

Биотехнологические источники ЛРС  
для получения лекарственных  
средств (ЛС).



# Выращивание ЛР и получение ЛРС в культуре (агро- и *in vitro*):

- Сохранение биоразнообразия и рациональное использование ресурсов ЛР (современ.подходы);
- Агрокультура и интродукция ЛР;
- Культуры растительных тканей и клеток *in vitro*;
- Методы клеточной и генной инженерии и перспективы их использования для биотехнологического получения ЛС.

**Фармакогнозия, как показывает история ее развития, имеет стратегически важную роль для стабильного развития страны.**

Потому наряду с необходимостью иметь в перечне ЛС ряд жизненно важных аборигенных ПРП, **охрана лекарственных растительных ресурсов, поддержание и умножение биоразнообразия, создание банка ценных природных генов и целых геномов** – задача к-рую в настоящее время решают ботанич. сады и заповедники, ин-ты АН является одним из главн.условий обеспечения **лекарственной безопасности населения страны.**

- **В Беларуси эта проблема стоит довольно остро.**
- В связи с антропогенным влиянием и изменениями экологических условий многим ценным ЛР грозит исчезновение – они внесены в **«Красную книгу»**, к-рая содержит названия видов, требующих защиты от полного уничтожения. В **«Красной книге»** указываются прошлое и нынешнее распространение исчезающих видов растений, особенности воспроизводства, причины сокращения численности и меры, необходимые для их сохранения и восстановления.
- **Наука формирует не только перечень (каталог) ЛРС на основе изучения и рационального использования богатства флоры РБ и других государств, но и разрабатывает новые способы сохранения и умножения флористического биоразнообразия.**

Как уже отмечалось в предыдущих лекциях,  
в настоящее время сырьевая база ЛРС  
формируется на основе:

- ) заготовок от дикорастущих ЛР;
- ) заготовок от выращиваемых в агрокультуре и интродуцируемых ЛР;
- ) закупок по импорту;
- ) новых биотехнологических путей получения ЛС – культуры клеток ЛР *in vitro*, молекулярной генетики и др.

# Дикорастущие ЛР

- ◆ **Морфологические группы сырья** такие как
- ◆ **корневища** аира, **корни** одуванчика, **почки** березы, **плоды** боярышника, рябины, жостера, черники, можжевельника, **листья** земляники лесной, крапивы двудомной, вахты трехлистной, брусники, **цветки** липы, пижмы, **трава** горца перечного, спорыша, зверобоя продырявленного и пятнистого, тысячелистника обыкновенного, пастушьей сумки, хвоща полевого, пустырника пятилопастного, чабреца, чистотела, **побеги** багульника болотного, **коры** крушины, калины, дуба, и др. **заготавливаются почти всегда от дикорастущих растений.**

**Основными источниками ЛРС являются промышленные заготовки от дикорастущих и возделываемых растений**

Дефицит ЛРС стараются покрыть, гл. обр., за счет увеличения его производства от агро-культурвируемых и интродуцируемых растений.

Перспективным направлением расширения сырьевой базы является также рост культуры клеток и тканей ЛР на искусств. питательных средах, с использованием различных других биотехнологий.

# АГРО-КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЛР

- применяется человеком давно как путь, облегчающий их сбор и использование.
- В настоящее время для РБ выращивание ЛР в агрокультуре имеет определяющее значение.
- Потребность в ЛРС, *с одной стороны*, и интенсивное развитие сельского хозяйства, связанное с потерей  $\sim 1/3$  территории республики из-за загрязнения в связи с аварией на Чернобыльской АЭС и с распашкой в России, Украине и Казахстане огромных целинных пространств, *– с другой*, настоятельно требуют создания промышленного лекарственного растениеводства.
- Возделываемые виды ЛР являются источником ЛРС, обеспечивающим ныне **более половины его массы**, заготавливаемой в странах СНГ.
- В настоящее время в СНГ в промышленную культуру расте...



# Возделывание ЛР в агро-культуре и повышение продуктивности

*Перевод в культуру ЛР имеет еще один важный аспект: качественная сторона сырья и необходимость выведения сортов с высоким содержанием ФАВ.*

В настоящее время оценивать продуктивность ЛР только по заготавливаемой товарной массе уже нельзя. Важно, чтобы одновременно в ней находилось и максимальное количество действующих веществ.

Это особенно значимо, если из ЛРС выделяют индивидуальные вещества, применяемые в качестве ЛС (например, морфин, платифиллин, резерпин, хинин, стрихнин, диосгенин для синтеза кортизона и др.), хотя высокое содержание ФАВ нужно также и для ЛРС, применяемого в виде суммарных препаратов (напр., для настойки или экстракта валерианы очень существенно, чтобы в сырье было возможно большее количество свободной валериановой кислоты и

■ Несмотря на то, что определенный контроль за биогенезом ФАВ возможен и в условиях естественного произрастания ЛР, тем не менее, за этим процессом лучше следить в условиях культуры ЛР. Более того, в условиях культуры можно в какой-то мере управлять биосинтезом, делать его направленным, что очень важно для практики фармации.

■ Выращивание ЛР на плантациях разрешает механизировать работы по посеву, уходу, уборке сырья. Наличие современных стационарных сушилок и цехов по первичной переработке сырья позволяет в значительной степени улучшить его качество.

■ Возделывание ЛР в специализированных хозяйствах дает возможность использовать агротехнические и агрохимические приемы, вести селекционную работу, позволяющие увеличить продуктивность растений и получать ЛРС с более высоким содержанием ФАВ.

■ Названные преимущества делают труд по заготовке ЛРС на плантациях более

# Способы повышения продуктивности ЛР

- ◆ На продуктивность ЛР в процессе их выращивания можно воздействовать :

- 1) традиционным **генетико-селекционным** путем;
- 2) **молекулярно-биологическим** и **биотехнологическим** выведением высокопродуктивных сортов ЛР, которые завершаются получением растений-регенерантов и последующей адаптацией их к выращиванию в почве;
- 3) **физиологическим** путем (с помощью агротехнических и агрохимических приемов).

- ◆ На всех направлениях есть **определенные достижения.**

- ◆ Повышению производства ЛРС способствуют правильные севообороты, внесение удобрений, защита растений от вредителей, болезней, сорняков, проведение мелиоративных работ, проведение работ по семеноводству.

- ◆ Возможны использование механизированных приемов возделывания, увеличение урожайности путем улучшения агротехники и селекции растений, повышение качества сырья за счет проведения сбора в оптимальные сроки и обеспечения рациональных условий сушки.

♦ Сотрудниками ВИЛАР разработаны и внедрены в хозяйства новые, более прогрессивные приемы посева, ухода, уборки и механизации приемов выращивания ЛР.

Например, размножение **алоэ** укорененными верхушками растений ускоряет развитие культуры и повышает урожай сырьевой массы. Вершкование **валерианы и синюхи** повышает урожай их корневищ до 50%.

Омолаживание плантаций **шалфея лекарственного** путем весеннего срезания старых побегов увеличивает урожай листьев этого растения в 2-3 раза и улучшает их качества.

♦ Внесение гранулированного суперфосфата при посеве всех лекарственных культур упрощает проведение сева и повышает их урожай.



- ◆ Установлены также оптимальные сроки и дозы внесения **удобрений** под основные лекарственные культуры.
- ◆ Широко проводятся исследования по испытанию **гербицидов** на посевах ЛР и их предшественников. Разработаны технологии применения гербицидов для борьбы с сорняками на плантациях **диоскореи амми зубной, мяты, стальника полевого, ревеня тангутского, ромашки аптечной и р. далматской.**
- ◆ Обнаружено, что растения ***Digitalis lanata Ehrh.***, зацветающие на первом году, содержат меньше карденолидов, чем зацветающие на второй год. Поэтому, с целью повышения содержания ФАВ в

- **Непрерывно улучшающийся отбор ЛР, сочетается с методами сознательной переделки их.**
- Для этой цели широко используются **разные формы гибридизации** (межвидовая, межсортовая), а также метод искусственной **полиплодии** с помощью колхицина.
- **Межвидовая гибридизация часто дает весьма интересные результаты.**

Например, при скрещивании *Papaver somniferum* L. и *Papaver orientale* L. гибриды, помимо многолетности, отличаются активным биосинтезом папаверина и тебаина и сохранением морфинности.

У **пасленовых удвоение хромосомного комплекса** увеличивает количество алкалоидов в листьях, а скрещивание диплоидных и тетраплоидных форм мяты перечной дает триплоидные гибриды с очень высоким качеством эфирного масла.

# Интродукция ЛР

- Под интродукцией ЛР понимают не только введение в культуру дикорастущих видов в пределах их ареала, но и завезенных видов, не встречавшихся ранее ни в диком, ни в культивируемом состоянии.
- **Понятие «интродукция» тесно связано с понятиями «акклиматизация» и «натурализация».**

**«Акклиматизация»** – это приспособление растения к новым климатич. условиям, отличным от условий ареала.

Под **«натурализацией»** понимается высшая степень акклиматизации, при к-рой растение настолько приспособляется к новым условиям обитания, что может само-стоятельно размножаться, давать самосев и не уступать в ценозах другим видам в борьбе за существование.

Следует подчеркнуть: выращивание ЛР в открытом грунте агро-культивированием их еще не является – это только первый шаг на пути к интродукции.

Успешные опыты по интродукции отдельных растений проводились в сухих субтропиках Туркмении и Крыма.

- Но основными районами промышленной интродукции теплолюбивых ЛР были влажные и сухие субтропики Аджарии, Абхазии, Западной Грузии, Сочи.
- В XVIII-XX вв. на Кавказском побережье Черного моря появились: агава американская, алоэ древовидное, гранат, диоскорея дельтовидная, камелия эвгенольная, катарант розовый, магнолия крупноцветковая, лавр благородный, олеандр, пальмы (сем. *Arecaceae*), пассифлора инкарнатная, паслен дольчатый, папайя дуболистная, почечный чай, раувольфия (3 вида), стеркулия платанолистная, стефания гладкая, цитрусовые, чайный куст, эвкалипты и др. виды.
- Еще свыше 100 тропических ЛР для здравоохранения Беларуси, как предполагают, могут выращиваться в условиях Юга России, Северного Кавказа.



- **Интродукция** – сложный биологический процесс.

При ее проведении **необходимо знать**: пределы выносливости интродуцента, реакцию на свет, температуру, влажность почвы и воздуха; нужно знать его эдафические и фило-генетические особенности, географическое происхождение, другие биологические свойства вида, выработанные в результате постоянного взаимодействия со средой.

Интродукторам необходимо сопоставлять и анализировать сумму активных температур ареала и нового места культуры, световой режим, сумму осадков, снежный покров и др.

- Несмотря на общую тенденцию увеличения числа интродуцированных видов, этот путь возможен не для всех ЛР.
- Ученые НПО “ВИЛАР” выделяют ~70 дикорастущих ЛР, которые из-за своих биоэкологических особенностей ввести в промышленную культуру не удастся (адонис весенний, аир болотный, багульник болотный, горец птичий, плауны).



- **Введение в культуру новых ЛР – длительный и трудоемкий процесс, осуществляемый в течение нескольких этапов:** сбор посевного или посадочного материала, изучение биологических, эдафических, фото-климатических особенностей ЛР, проведение экспериментальных посевов и выявление оптимальной зоны размещения новых культур, отбор хозяйственно ценных популяций, разработка эффективных способов возделывания.
- **Введение в культуру однолетников требует, как правило, 3-4 года, многолетников – 6-10 лет.**



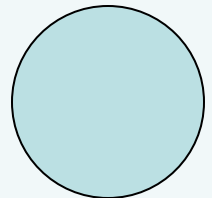
# В культуру, как правило, вводят:

- ЛР, дающие крупнотоннажное сырье (валериана лекарственная, наперстянка шерстистая, ромашка аптечная, облепиха крушиновидная);
- источники новых ЛС с необеспеченной сырьевой базой (вздутоплодник сибирский, рапонтикум сафлоровидный, копеечник альпийский);
- ЛР, не известные в диком виде, а только в культуре (мята перечная);
- ЛР с ограниченными ареалом или запасами сырья (красавка обыкновенная, марена красильная, женьшень);
- ЛР с обширным ареалом, но произрастающие спорадически и не образующие зарослей (зверобой продырявленный и з. пятнистый, бессмертник песчаный, синюха голубая);
- редкие или исчезающие виды ЛР.
- иноземные ЛР, не имеющие аналогов во флоре РБ (алоэ, каланхоэ, ноготки лекарственные) и РФ (где начато культивирование таких растений как кассия, почечный чай, эрва шерстистая и др.);

**Биотехнологические источники  
ЛРС для получения ЛС  
КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ И КЛЕТОК ЛР –  
НОВЫЙ ИСТОЧНИК ПОЛУЧЕНИЯ ЛРС**

- Биотехнология как наука возникла в 1950-х гг. и в настоящее время является одним из приоритетных направлений науки.
- Сейчас с достижениями в области биотехнологии связывают повышение благосостояния человечества в будущем и увеличение продолжительности жизни людей.
- *Микроорганизмы* стали основой для производства ряда полезных продуктов (органических кислот, этанола для технических целей, ферментов, витаминов, антибиотиков и т. п.).
- Культивируемые в условиях *in vitro* *клетки растительные* и *животные* нашли применение в сельском хозяйстве (растениеводстве, животноводстве), при получении физиологически активных веществ, фармацевтических препаратов, моноклональных антител и других продуктов.
- В биологической промышленности используются различные *биомолекулы, иммобилизованные ферменты, биосенсоры и биочипы*, что позволило решить часть технологических проблем и обозначить новые захватывающие горизонты.
- Важными новыми направлениями стали *криопрезервация* и *нанобиологические технологии*.

- Важную роль в современной **биотехнологии** (научной и промышленной) начинает играть **генетическая инженерия**.
- Она предоставила исследователям новую, исключительно ценную возможность изменения генетической программы бактериальных, растительных и животных клеток.
- И это направление исследований уже дает большие научные и практические результаты.
- Очень важен вклад биотехнологии в защиту окружающей среды.

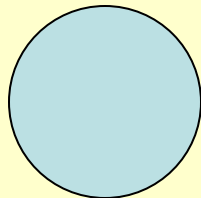


- **Биотехнология** — не только наука, но и одна из перспективных и высоко-рентабельных отраслей производства.
- В **США** насчитывается более 1500 компаний биотехнологического типа (во всем мире их более 3 тыс.), в числе которых крупные химические и фармацевтические концерны, такие как *American Cyanamid, Du Pont, Merck, Monsanto, Novartis* и др.
- В **западноевропейской** биотехнологической индустрии занято >600 не менее известных биотехнологических компаний.
- В других странах (Китай, Индия, Бразилия, Мексика, ЮАР ), где инвестиционный климат не столь благоприятен и бизнес менее активен, главную роль в создании биотехнологических предприятий играют крупные корпорации и государство.
- В **Беларуси** государство уделяет большое внимание развитию биотехнологии, поощряя также развитие предпринимательства.



# Основные этапы развития биотехнологии

- Люди в течение тысячелетий успешно применяли микробиологическую ферментацию для сохранения и улучшения вкуса пищи, производства спиртных напитков, сыров и т.п.
- Работы **Л. Пастера** послужили основой развития в XIX—XX вв. производства ряда органич. растворителей (ацетона, этанола, изо-пропанола, бутанола), др. химических в-в с использованием микроорганизмов.
- Открытие **А. Флемингом, Х. Флори и Э. Чейном** в 1940 г. химиотерапевтической активности пенициллина стало основой производства антибиотиков. Годовой оборот этой отрасли сегодня составляет около 3,5 млрд. долларов.
- Биотехнология использует культуры бактерий, клеток растений и животных, метаболизм и биологические возможности которых обеспечивают выработку **специфических веществ**.
- В фармацевтич. промышленности она охватывает разработку вакцин, синтез **аминокислот, витаминов, полисахаридов, антибиотиков, алкалоидов, ферментов, интерферонов, гормонов** и других БАВ.



- Возможности биотехнологии значительно изменились развитием технологии рекомбинантных ДНК.
- Американские ученые С. Коэн и Г. Бойер в 1973 г. разработали стратегию переноса гена из одного организма в другой.
- Стало возможным не просто отбирать высокопродуктивные штаммы микроорганизмов и эукариотических клеток, но и **создавать принципиально новые виды** используя их в качестве **«биологич. фабрик»** по производству различных продуктов: **интерлейкинов, интерферонов, инсулина, вирусных антигенов, вакцин гормона роста и множества др. белков.**
- Это быстродействующий, эффективный, мощный инструмент, обеспечивающий создание организмов с заранее заданными генетическими характеристиками

Технология рекомбинантных ДНК позволяет получать в промышленных масштабах ценные низкомолекулярные в-ва и макромолекулы, которые в естественных условиях образуются в минимальных количествах.

Биотехнология дает возможность воспроизводить нужные продукты в неограниченных количествах, применяя новые технологии, позволяющие переносить гены в клетки-продуценты или в целый организм (трансгенные животные и растения), синтезировать пептиды, создавать искусственные вакцины.

**В промышленном масштабе биотехнология теперь представляет собой биоиндустрию.**

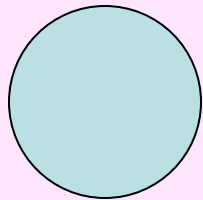
- В 1983 г. японской фирмой "Mitsui Petrochemical Industries" опубликована технология получения шиконина с помощью культуры клеток *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc., что явилось началом эры фармацевтической биотехнологии: биотехнологическое использование культур клеток и тканей в качестве ЛРС в промышленных масштабах стало реальностью.
- В России широкое производство продуктов культуры ткани растений началось с выпуска экстракта культивируемой биомассы женьшеня. Экстракт биомассы **женьшеня** (под названием "**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 как аналога по действию из корня женьшеня.
- Позже в г. Харькове (Украина) из биомассы культуры ткани *Rauwolfia serpentina* Benth. было организовано производство ценного антиаритмического ЛС **айметина**.

- **Технологии низкого уровня** – это технологии традиционные, в известной мере устаревшие. К ним относятся технологии биологич. очистки сточных вод, получения биотоплива, некот. виды микробиологического синтеза.
- Они характеризуются низкой наукоемкостью, базируются на использов. рабоч. систем, полученных методами традиционной селекции.
- Стало ясно, что использование технологий низкого уровня – это тупиковый путь. Выходом из него стало использование прорывных технологий, базирующихся на новейших достижениях науки и техники.
- В свое время таковыми стали **технологии микробиологического синтеза** (например, получение антибиотиков), **клеточная инженерия** (например, гибридизация соматических клеток и клонирование организмов), **генетическая инженерия** (напр., получение векторов переноса ДНК и создание трансгенных организмов).

**Интенсивные высокие биотехнологии** (в противоположность экстенсивным) реализуются с привлечением специалистов высочайшей квалификации, с исп. уникального оборудования и самых современных материалов.

Эти биотехнологии применяют в медицине, а также для создания организмов с заранее заданными свойствами.

Нужно отметить, что интенсификация высоких технологий, в отличие от интенсификации технологий низкого уровня, заключается в повышении качества ресурсного и информационного обеспечения.



Технологии разных уровней неразрывно связаны между собой: с одной стороны, высокие технологии базируются на технологиях низкого уровня, для их осуществления требуется определенный ресурсный, энергетический и информационный фундамент, с другой – достижения высоких технологий используются на низших уровнях биотехнологических производств.

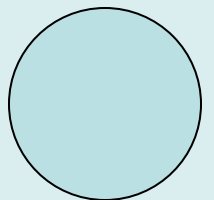
**Высокие технологии представляют собой величайшее достижение человеческого разума.**

Однако по ряду параметров они не только не превосходят технологии низкого уровня, но даже уступают им.

В частн., высокие технологии требуют все больших вложений всех видов ресурсов, они не решают проблемы получения экологически чистой продукции, а само биотехнологическое производство может представлять угрозу для человека и окружающей среды.

# Выращивание ЛРС в культуре (*in vitro*):

- Современные подходы к сохранению биоразнообразия и рациональному использованию ресурсов ЛР;
- Культуры растител. тканей и клеток *in vitro*;
- Методы клеточной и генной инженерии и перспективы их использования для биотехнологического получения ЛС.





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

- Под "**культурой тканей растений**" принято понимать выращивание в стерильных искусственных условиях изолированных клеток, тканей, органов и их частей.

**Историю развития метода культуры ткани** начинают опыты Г. Габерландта (1902, Германия), который впервые показал возможность выращивания клеток, изолированных из растительного организма. Затем исследования Ф. Уайта (1931, США) и Р. Готре (1932, Франция) позволили определить условия для воспроизведения деления и роста клеток в культуре, и метод культуры тканей приобрел современные черты. В СССР работы в этой области были начаты в 1957 г. в Ин-те физиологии растений Р. Г. Бутенко.

- **В последующие годы** были разработаны технические основы метода: отработана методика вычленения тканей и клеток из растений, получения каллусов, сохранения стерильности, усовершенствованы составы питательных сред.
- **В результате этого стало возможным** использовать метод культуры тканей для длительного выращивания недифференцированных растительных клеточных масс – **каллусов**, затем был разработан метод **выращивания растительных клеток в суспензионной культуре** и **получения биомассы от единичных клеток**, что позволило выделять однородный в генетическом и физиологическом отношении

## • Методика получения культуры ткани сейчас хорошо отработана и не вызывает затруднений.

- Чтобы получить культуру ткани, из любой части растения вырезают кусочек ткани 0,5-1,0 см (эксплант) и помещают на питательную среду. Для пересева на новую среду из образовавшегося каллуса берут кусочек размером 2-4 мм.
- Органы и ткани, культивируемые *in vitro*, перед помещением на питательную среду должны быть стерильными.

Стерилизуются исходные кусочки ткани растений (экспланты), питательная среда; асептически в специальных боксах стерильным инструментом проводятся манипуляции с выращиванием объектов.

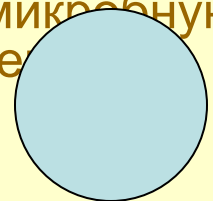
Чашки Петри, пробирки, пипетки, колбы и иные сосуды, в которых культивируются ткани и клетки, закрываются так, чтобы предотвратить инфицирование в течение продолжительного времени.

- Асептика является обязательной и необходимой для культивирования как отдельных клеток, так и фрагментов ткани или органа растения.

Эпифитная микрофлора на тканях растений может выявиться в культуре ткани позже.

Внутреннее заражение растительной ткани чаще всего встречается у тропических и субтропических ЛР.

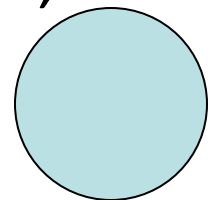
Поэтому, кроме поверхностной стерилизации с использованием дезинфицирующих веществ, применяют антибиотики, убивающие микробную флору внутри ткани, однако нужно подбирать антибиотики направленного действия.



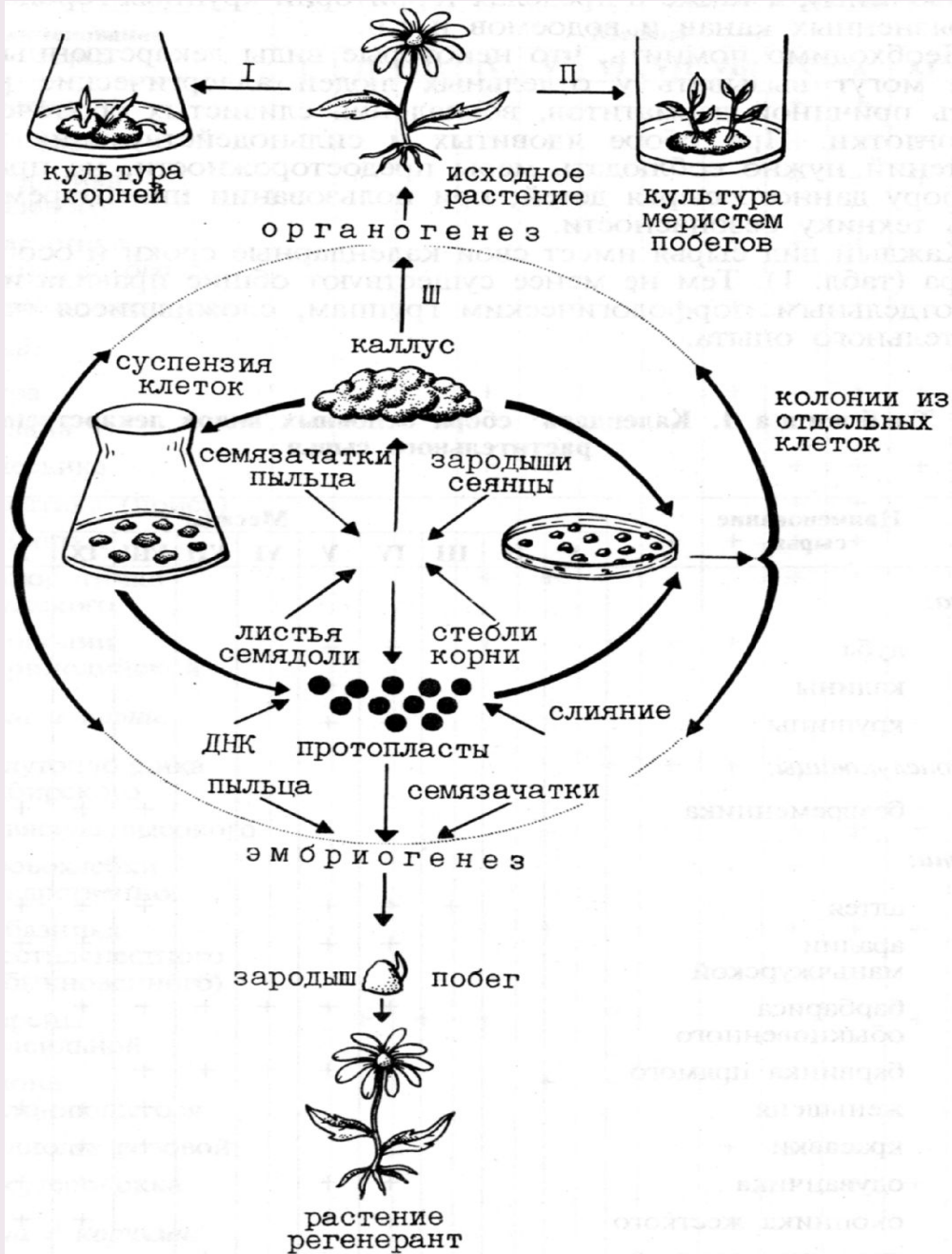
# Наиболее популярна среда разработана М.Мурасиге и Ф.Скугом (1962)

№ п.п.	Название вещества	Концентрация, мг/л	Компонент среды
1	$KNO_3$	1900,0	Макроэлементы
2	$NH_4NO_3$	1650,0	
3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440,0	
4	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370,0	
5	$KH_2PO_4$	170,0	
6	$Na_2ЭДТА \cdot 2H_2O$	37,3	Микроэлементы
7	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,2	
8	$MnSO_4 \cdot 7H_2O$	22,3	
9	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	
10	$H_3BO_3$	6,2	
11	KJ	0,83	
12	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	
13	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	
14	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	
15	Мезоинозит	100,0	Витамины
16	Никотиновая кислота	0,5	
17	Пиридоксин.HI	0,5	
18	Тиамин.HI	0,1	Фитогормоны
19	$\beta$ -индолил-уксусная к-та	2,0	
20	Кинетин	0,2	Аминокислота
21	Глицин	2,0	
22	Сахароза	30000,0	Углевод
23	Агар	30000,0	Отвердитель среды

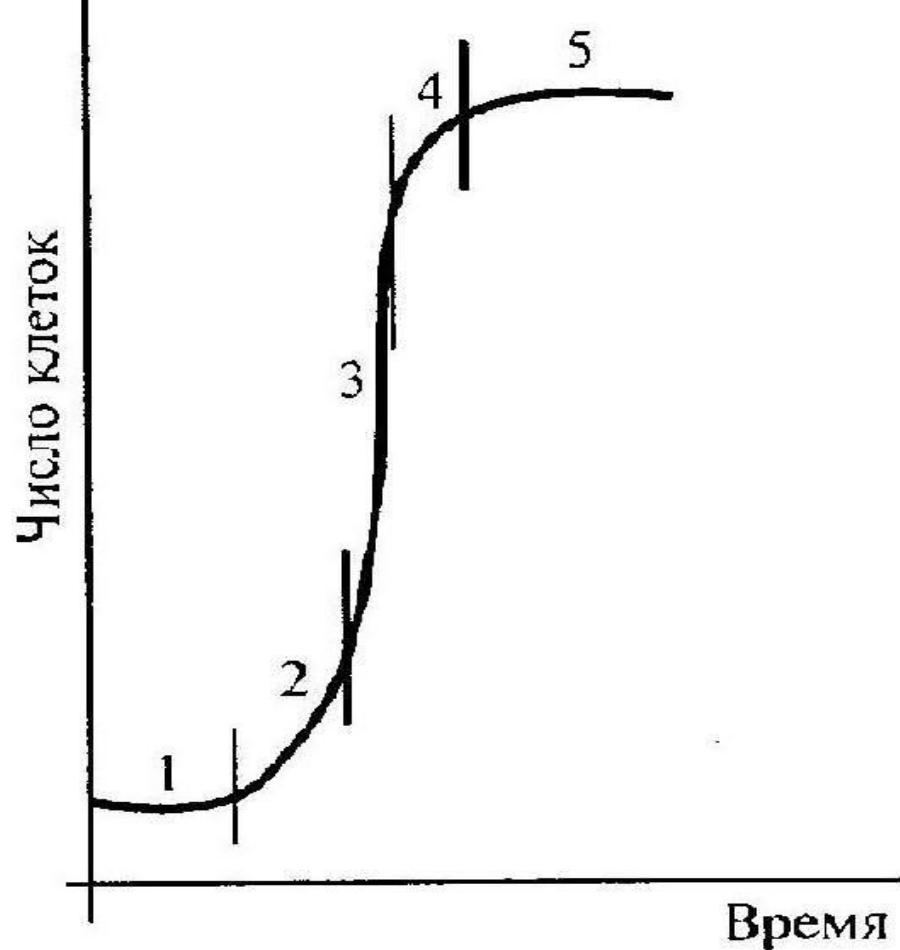
- На этой среде можно инициировать и поддерживать рост большого числа культур растительных тканей.
- Основу питательных сред составляют минеральные соли – макроэлементы (азот в нитратной и аммонийной форме, соли К, Mg, фосфаты) и микроэлементы (Cu, Co, Mo, B, J и др.), дополняемые углеводами, витаминами, фитогормонами.
- В природе каллусообразование – естественная реакция на повреждение растений.
- В культуре изолирован. тканей при помещении экспланта на питательную среду его клетки дедифференцируются и переходят к делению, формируя в течение нескольких дней однородную бесформенную массу серовато-белого или желтоватого цвета – каллус.
- Каллусы образуются на эксплантах из различных органов и частей растений: стебля, листа, корня, зародышей и проростков семян, тканей клубня, цветка, плодов и т.д. – обычно из фрагментов паренхимы.



# Схема получения каллусной и суспензионной культур растений, а из них растений-регенерантов



- ▶ **Формирование каллуса** длится обычно 1-2 месяца. Образовавшийся каллус в асептических условиях разделяют и переносят на свежую питательную среду.
- ▶ **Пересаженные ткани** растут в контролируемых условиях при температуре 24-28°C. Периодичность субкультивирования тканей зависит от скорости роста биомассы.
- ▶ **Каллусная клетка** развивается аналогично другим клеткам, проходя соответственно такие циклы, как деление, растяжение, дифференцировка, старение и отмирание.
- ▶ **Кривая роста каллусной ткани** имеет S-образный характер и включает 5 фаз разной длительности у разных растений:
  - 1 – латентная (лаг-фаза – клетки адаптируются и готовятся к делению);
  - 2 – линейная (рост каллусной ткани идет с постоянной скоростью);
  - 3 – экспоненциальная (время максимальной митотической активности; клетки ускорен, масса каллуса увеличивается);
  - 4 – стационарная (интенсивность деления резко снижается);



**Рис. 3.2.** Модельная кривая  
 ростового цикла при периоди-  
 ческом выращивании каллус-  
 ных тканей. Фазы роста:

1 — латентная; 2 — логарифмическая;  
 3 — линейная; 4 — замедления; 5 —  
 стационарная

- ▶ **Тотипотентность** растительных клеток обуславливает то, что культивируемые каллусные клетки и ткани сохраняют многие физиологические особенности, свойственные клеткам растения, из которого они были получены. Сохраняются, например, такие свойства, как морозостойкость, устойчивость к абиотическим факторам (засоление, температура, фотопериодическая реакция), а главное — **способность к синтезу вторичных метаболитов**.
- ▶ Наряду с этими общими чертами, у каллусных клеток появляются свои, характерные только для них особенности.
- ▶ Например, длительно культивируемые *in vitro* клетки высших растений образуют специфическую популяцию соматических клеток, относящуюся к типу неполовых.
- ▶ Наиболее характерные свойства этой популяции — **физиологическая асинхронность и генетическая гетерогенность**.



- ▶ Стабильность синтеза вторичных метаболитов как целевого продукта зависит, как правило, от стадии культивирования и дифференцировки клеток.
- ▶ Однако вопрос, как связан синтез вторичных метаболитов с ростовыми процессами, пока не совсем ясен.
- ▶ **Вторичные метаболиты синтезируются и накапливаются в значительных количествах, как правило, либо во время экспоненциальной фазы, когда ростовые процессы особенно активны, либо в период стационарной фазы роста клеток, когда прирост клеточной массы прекращается.**
- ▶ Однако есть культуры (напр., *Catharanthus roseus* (L.) G. Donf.), которых синтез вторичных метаболитов сопровождает **весь период роста.**
- ▶ **Синтез вторичных соединений может коррелировать с процессом дифференцировки в культуре клеток.**
- ▶ Напр., в суспензионной культуре *Papaver somniferum* L. синтез алкалоидов начинается после того, как дифференцируется большое количество специализированных клеток млечников, предназначенных для депонирования метаболитов.

Синтез вторичных метаболитов в клетках культуры связан в основном с **пластидами** и **эндоплазматическим ретикулумом**.

В клетках, не способных к транспорту метаболитов, продукты вторичного синтеза обычно накапливаются в **вакуолях** и **свободном пространстве (апопласте)**.

Отметим, что клетки каллусной культуры синтезируемые метаболиты **обычно не транспортируют** в питательную среду или др. клетки,

хотя некоторые культуры составляют

Культивирование тканей растений можно осуществлять как на агаризованных питательных средах (плотной консистенции), так и в жидкой среде.

В первом случае ткани образуют скопление недифференцированных клеток, называемых **каллусом** или биомассой, во втором – клетки при размножении образуют **суспензии**.

**Сравнение каллусных и суспензионных культур показывает, что:**

выход продуктов вторичного метаболизма выше именно 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** по выходу биомассы и 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, полиуретана, полиакриламида, нейлона, шарики из стекла.

▶ **Иммобилизованные каллусные клетки прекращают рост, но продолжают синтез метаболитов, выделяя их в среду.**

▶ **Основные преимущества иммобилизации – выделение клетками метаболитов в 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 доходя до получения необходимого целевого продукта.

В этом случае получение конечного продукта требует биотрансформации этих метаболитов с помощью культур других растений (или даже клеток бактерий) с целью повышения биологической активности конкретной химической структуры.

Так, наперстянка (*Digitalis lanata* Ehrh.) в большом количестве синтезирует **дигитоксин**, вместо необходимого **дигоксина**.

Для соответствующей биотрансформации с успехом используют недифференцированную суспензионную культуру наперстянки, которая с помощью ферментов производит необходимое превращение БАВ.

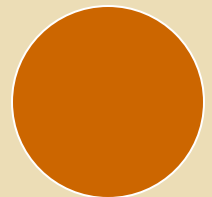
Культура клеток женьшеня корневого происхождения способна биотрансформировать (гликозилировать) **фенольные в-ва** – продукты жизнедеятельности суспензионной культуры клеток *Panax ginseng* C.A. Mey.).

▶ До 70-х годов спектр соединений, образуемых культурами тканей в количествах, характерных для целого растения, был ограничен.

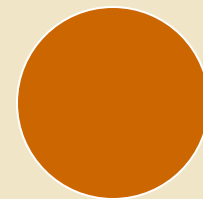
Это – никотин, который в больших количествах (0,7%) синтезировали клетки табака, диосгенин в культуре диоскореи (1,6%), виснагин, содержание которого в каллусе амми зубной было в 20 раз >, чем в растении.

▶ Экспериментальные данные, накопившиеся к этому периоду, указывали, что биосинтез многих соединений в недифференцированных тканях сильно репрессирован, а появление вторичных продуктов часто было связано с регенерацией корней, побегов и других морфологических структур, т.е. с процессом дифференцировки тканей.

▶ С начала 70-х годов список фармакологически ценных вторичных продуктов биосинтеза, обнаруженных в культурах тканей, значительно расширился.



- ▶ Т.о., в XX веке публикации о выращивании тканей растений в жидкой питательной среде в виде суспензионной культуры знаменовали постепенный поворот от пробирок и колб к получению больших количеств биомассы в специальной аппаратуре – хемостатах, ферментерах, турбидостатах.
- ▶ В это же время наметились возможные области применения клеточных культур в промышленности.
- ▶ Первоначально разрабатываемый как чисто теоретическое направление метод культуры тканей, начиная с середины 60-х годов XX века, входит в арсенал особой научно-производственной деятельности, известный под названием **биотехнологии.**



# Культивирование растительных клеток и тканей на искусственной питательной среде в биореакторах помимо решения ряда экономических экологических и технологических задач

позволяет 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;
- ▶ возможность промышленного производства биомассы экзотических растений, малодоступных для нашей страны, например, таких как раувольфия, диоскорея, унгерея и др.;
- ▶ добиться экономической рентабельности биотехнологического производства ФАВ и сокращения посевных площадей под ЛР.



- В 80-е годы на базе метода культуры ткани возникли новые направления биотехнологии, важнейшим из них стала **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 тканей при изменении условий культивирования давать начало целому растению привела к созданию промышленных клеточных технологий **микрклонального размножения растений**, позволяющих в короткие сроки (2-3 месяцев, а не лет, затрачиваемых при использовании обычных методов) размножать ценные генотипы.
- Наряду с культурами клеток и тканей растений развиваются способы культивирования органов растений *in vitro* – напр., "волосатых" корней, **изменяемых с помощью *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).

- ▶ Способность культур тканей к накоплению вторичных продуктов обмена является уже установленным фактом. Однако, как правило, клеточные культуры характеризуются низким содержанием искомым веществ. Чтобы служить ЛРС, в котором содержание вторичных метаболитов достаточно велико, культуры тканей растений должны быть изучены и отобраны высоко производительные штаммы.
- ▶ Тем не менее, для многих культур попытки ученых определить условия накопления продуктов, характерных для родительских растений, остаются неудачными.
- ▶ Так, в каллусной культуре как правило 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 образуют сангвинарин. Клетки *Cinchona ledgeriana* Moens ex Trimen в

# На выход вторичных продуктов в культуре ткани влияют факторы:

- ▶ **Происхождение ткани.** Обычно для введения в культуру ткани проводят поиск наиболее продуктивных растений в надежде, что эта способность будет перенесена и в культуру.
- ▶ **Условия культивирования.** А) **Питание.** Важнейшим фактором создания эффективной биотехнологической системы является разработка питательной среды, обеспечивающей потребности продуцента в химических компонентах, требуемых для оптимального синтеза целевого продукта.

В среде, где все питательные вещества в избытке, **увеличение концентрации сахарозы, как правило, приводит к увеличению биомассы.** В некоторых случаях увеличение сахарозы может оказать **положительный эффект на выход действующих веществ.** Б) **Для 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. В) Для некоторых культур разработаны **способы 2-этапного выращивания,** когда ткани после накопления достаточной биомассы **переносят в продукционные среды, способствующие максимальному синтезу БАВ.** Г) **Стрессовые факторы.** Образование вторичных продуктов в культуре ткани может резко возрасти под влиянием некоторых стрессовых факторов (продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, осмотического шока, токсинов ионов тяжелых металлов и т. д.)

# Селекция – основа биотехнологического использования культур

▶ Промышленное применение культур тканей ЛР в качестве ЛРС предполагает использование высокопродуктивных и стабильных клонов.

Известно, что культивирование клеток *in vitro* может сопровождаться значительным генетическим разнообразием.

Речь идет о так называемой **соматоклональной изменчивости**, к-рая возникает при длительном культивировании каллуса.

Успех часто зависит от методов оценки селекционного материала. Известно, например, что окраска тканей растений является наследственным признаком, связанным с их химическим составом.

**Высокоалкалоидные культуры ткани барбариса – продуцента берберины получили в результате отбора желтых участков каллуса.**

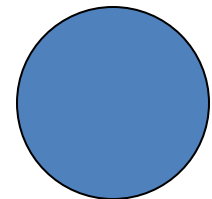
Важным условием биотехнологического использования культур тканей является их стабильность, гарантирующая стандартность ЛРС.

Сейчас развиваются работы по созданию высокопродуктивных штаммов и растений-регенерантов методами **гибридизации соматических клеток путем слияния протопластов и генной инженерии**. Хотя методы генной инженерии (с введением в ядерный геном генов синтеза ФАВ) не получили промышленного развития, однако ученые считают, что за ними будущее и **генная инженерия** станет обычным приемом в создании новых нужных человеку ЛР – продуцентов ЛС.

В 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 человека. Например, ученые Института биофизики и клеточной инженерии НАН РБ намерены получить **картофель, содержащий иммуноглобулины**,

а их коллеги из Сибирского Отделения РАН ведут разработку противотуберкулезной вакцины, для чего используют гены человека, кодирующие синтез специфических антител, и вводят их в геном клеток растений. Растения вырабатывают белковые антитела, находящие применение в медицине

- Было обнаружено, что у **опухолеобразующих агробактерий Ti-плазмиды** (от *Tumor inducing*), являющиеся мини-кольцевыми ДНК, представляют **великолепную нативную векторную систему**, 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 преобразуют клетки всех 2-дольных и 1-дольных растений, □ (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.**



- В зависимости от условий клетки ЛР в культуре *in vitro* могут делиться либо 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.
- Стеблевая верхушечная меристема, как правило, свободна от вирусной инфекции, микоплазм и возбудителей других инфекций, поэтому культиви-рование апикальных меристем, а затем быстрое клональное размножение здоровых растений – основа получения посадочного материала растений, свободного от инфекции.
- Велико значение культуры тканей высших растений для быстрого клонального микроразмножения растений: от материнской клетки за год этим методом можно получить  $10^5$ - $10^6$  растений. Растения-регенеранты затем адаптируются к почвенным условиям и переводятся в агрокультуру.
- Сейчас – это основное направление в биотехнологии сельскохозяств-х и ЛР.
- Технологии клонального микроразмножения – важное дополнение к традиционной селекции растений. Становится возможным быстро размножать уникальные генотипы или новые сорта экономически

- В заключение в качестве примеров приведем используемые в клинической практике ЛС, полученные из каллусных и суспензионных культур клеток ЛР: **шикониин** (кожные заболевания), **дигоксин** (сердечно-сосудистые заболевания), **берберин** (кишечные расстройства – в качестве бактерицидного средства), **диосгенин** (противозачаточное средство), **панаксозиды** (адаптогены, укрепляющие иммунитет).

При производстве настоек женьшеня плантационное выращивание этой культуры по выходу панаксозидов по-прежнему имеет преимущество перед каллусным сырьем, однако препараты, получаемые из каллусного сырья, менее токсичны.

- Можно сказать, что переход от научных разработок к промышленному производству продуктов с использованием клеточных культур только



# Биосенсоры

В роли биосенсоров могут выступать все типы биологических структур: ферменты, антитела, рецепторы, нуклеиновые кислоты и даже живые клетки.

Идея создания такого рода устройств возникла сравнительно недавно в 1960-х гг. Ее впервые высказали Л. Кларк и К. Лионе в 1967 г.

Идея состояла в использовании ферментного электрода, т.е. электро-химического датчика с иммобилизованным на его поверхности энзимом.

Затем в обиход вошло понятие «биосенсор».

**Хеми-** и **биолюминесцентные** датчики — регистрируют световое излучение с различной длиной волны, испускаемое продуктами ферментативной реакции, находящимися в возбужденном состоянии. Конструкция включает колонку с иммобилизованными на носителе ферментами (люциферазой, пероксидазой) и светоприемное устройство.

Запатентованный в систему этого типа датчиков аналитический метод

**Биосенсоры** — это аналитические устройства, в которых чувствительный слой, содержащий биологический материал, реагирует на присутствие определяемого компонента и генерирует электрический сигнал, функционально связанный с наличием и концентрацией этого вещества.

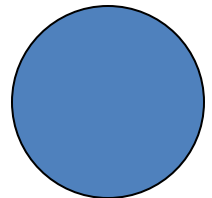
Биоматериалом могут служить ферменты, ткани, бактерии, дрожжи, антигены/антитела, липосомы, органеллы, рецепторы, ДНК, а также клетки, которые иммобилизованы на физических датчиках.

**Следовательно, биосенсорная технология**

- Большинство биосенсоров используется для анализа биологических жидкостей.
- Так, в крови находятся тысячи различных соединений, и бывает необходимо быстро и эффективно определить концентрацию нужного соединения, например глюкозы. Для людей, страдающих диабетом, это жизненно важный клинический анализ. Биосенсоры обеспечивают такую возможность.
- **Функционально биосенсоры сопоставимы с датчиками живого организма — биорецепторами, способными преобразовывать все типы сигналов.**

- **Биосенсоры можно использовать также для:**

- измерения пищевой ценности, свежести и безопасности продуктов питания;
- экспресс-анализа крови непосредственно у кровати больного;
- обнаружения и измерения степени загрязнения окружающей среды;
- детекции и определения количества взрывчатых в-в, токсинов и возможного биологического оружия;
- извлечения металлов из сточных вод;
- изготовления водородных солнечных элементов;
- очистки природных и сточных вод.



# Биочипы

- Прообразом современных биочипов послужил Саузерн-блотт, изобретенный в 1975 г. Э. Саузерном. Он использовал меченую нуклеиновую кислоту для определения специфической последовательности фрагментов ДНК, зафиксированных на твердой подложке.
- Эти миниатюрные приборы используют для анализа специфических взаимодействий биологических макромолекул. Зондами в таких чипах могут служить олигонуклеотиды, фрагменты геномной ДНК, РНК, белки, рецепторы, лиганды и др.
- За короткое время биочипы выделились в самостоятельную область анализа с приложениями — исследования фундаментальных проблем молекулярной биологии и молекулярной эволюции до практического применения в медицине, фармакологии, экологии, судебно-медицинской экспертизе и др.

Существует несколько разновидностей биочипов — матричные (с иммобилизованной ДНК), микрофлюидные (капиллярные) и биочипы с использованием микросфер с цветовой кодировкой.

**У современных микрочипов размеры ячеек лежат в пределах 50-200 микрон; характерные объемы, относящиеся к отдельной ячейке, составляют от 1 нл до 1 мкл; значения концентраций анализируемых макромолекул находятся обычно в пределах до 10 мкМ. Общее число ячеек на чипе составляет  $10^3$ - $10^5$ , а его линейные размеры составляют приблизительно 1 см.**

Микрозонды, которые должны взаимодействовать с образцом, наносят на подложку размером с почтовую марку. Каждый микрозонд имеет форму капельки, составляющей ~100 микрон в диаметре. Все ячейки одного микрозонда одинаковы по размеру и

расположены с плотностью 10-20 миллионов на  $1 \text{ мм}^2$

**Чипы**, на которых проходит ферментативная реакция, имеют более редкое расположение ячеек, чем **чипы**, на к-рых идет ДНК-реакция. Такая технология позволяет на одном биочипе разместить анализатор фактически всего генома человека — от 30 до 100 тыс. генов. При этом детектируется наличие участков ДНК длиной от 6 до нескольких тысяч нуклеотидов — в зависимости от поставленной задачи.

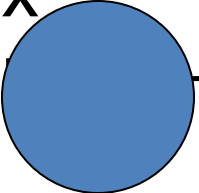
**Во всех многопараметрических биочипах используют механизм химического взаимодействия.** Молекулы исследуемого образца соединяются со своей «парой» (микрозондом), помещенной в одну из нескольких тысяч ячеек на чипе: нити ДНК соединяются со своей комплементарной парой, антиген — со своим антителом, субстрат — со своим ферментом, и т.д.

**Наличие того или иного вещества или гена в образце определяют по люминесцентному свечению на прореагировавшем чипе.**

Флуоресценция является основным, но далеко не единственным методом изучения гибридизации. В частности, данные о характере гибридизации можно получить также с помощью

При взаимодействии биочипа с исследуемым образцом, предварительно обработанным светящимся (флуоресцен-тным) красителем, в соответствующих ячейках происходит химическая реакция, и тогда эти ячейки начинают светиться — тем сильнее, чем интенсивнее процесс.

Анализ прореагировавших чипов производится автоматически с помощью анализатора (чип-детектора), к-рый представляет собой широкопольный микроскоп, соединенный с видеокамерой и компьютером. По сути, именно в выявлении и сопоставлении наиболее ярко светящихся ячеек и заключается работа прибора — анализатора биочипов. Так определяются различные характеристики образца, например присутствие в организме тех или иных возбудителей инфекций или наличие в геноме либо измененных генов.





# Нанобиотехнологии

- **Нанотехнологии** — это совокупность научных знаний, способов и средств, направленных на регулируемую сборку (синтез) из отдельных атомов и молекул разных веществ, материалов с размером структ. элементов до 1 нм (миллиардная доля метра).
- Напр., толщина клеточной мембраны — 6-10 нм; размеры вирусов — от 20 до 300 нм; характерные размеры молекул белков — от 10 до 100 нм.
- Минимальный размер углеродных нанотрубок, синтезированных в настоящее время, ~ 0,4 нм.

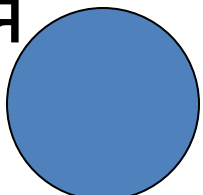
Наночастицы предполагается использовать как лекарственные препараты нового поколения, а также как ***контейнеры для адресной доставки лекарств*** в клетки-мишени.

Напр., лекарство можно сделать из порошка, состоящего из наночастиц с особыми свойствами. Эти частицы будут «проскакивать» через стенку сосуда или кишечную стенку и попадать к месту назначения быстрее, что сделает лечение более эффективным.

Можно, «посадив» наночастицу на лекарство, превратить его в средство направленного действия, заставить «садиться» на ту ткань, которую необходимо разрушить (к примеру, опухоль) или, наоборот, защитить (напр., сердце).

Т.о., наночастицы позволят доставлять лекарство точно к месту болезни, увеличивая тем самым эффективность лечения и минимизируя побочные эффекты. Применение наночастиц открывает также новые возможности для контролируемого вывода терапевтических веществ.

Но ученые говорят не только о возможных выгодах применения нанотехнологий, а также о возможных рисках (!). Специалисты обращают внимание на отсутствие «порога» действия наноматериалов и значительные выбросы их производстве



- СПАСИБО ЗА
- ВНИМАНИЕ!

