

В.П.БУЛГАКОВ, С.А.ФЕДОРЕЕВ, Ю.Н.ЖУРАВЛЕВ

## Биотехнология — здоровью человека: научные достижения и первые шаги инноваций на Дальнем Востоке

*Рассмотрено состояние дел в области биотехнологии лекарственных растений Дальнего Востока. На примере клеточных культур растений *Aristolochia manshuriensis*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Erithrichium sericeum*, *Maackia amurensis* и *Rubia cordifolia* показано, что культивируемые клетки растений могут заменить традиционные источники сырья и явиться основой для создания новых лекарственных препаратов. Приведены примеры разработок в области генетической инженерии, а также освещены первые шаги инноваций в области биотехнологии растений.*

**Biotechnology for the human health: The scientific advances and the first innovation steps in the Far East.** V.P.BULGAKOV (Institute of Biology and Soil Science, FEB RAS, Vladivostok), S.A.FEDOREYEV (Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok), Yu.N.ZHURAVLEV (Institute of Biology and Soil Science, FEB RAS, Vladivostok).

*The current state of the Far Eastern plant biotechnology is considered. By the example of cell cultures of some medical plants (*Aristolochia manshuriensis*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Erithrichium sericeum*, *Maackia amurensis*, and *Rubia cordifolia*), it has been shown that cultured plant cells can be successfully applied as an alternative raw source for medical usage and serve as a basis for development of new medicines. Examples of the gene engineering developments are given and the first innovation steps in the plant biotechnology are described.*

### Биотехнология лекарственных растений — преимущества и ограничения

Растения являются источником многих лекарственных веществ. Поскольку запасы растительного сырья в природе истощаются, нетрудно представить место биотехнологии растений в будущем. Клетки растений можно выращивать в искусственных условиях на питательных средах неограниченно долго, при этом часть биомассы можно использовать для экстракции целевого продукта, а часть пересаживать на свежую питательную среду для возобновления культуры. Независимость от влияния различных факторов окружающей среды (климат, сезон, погода,

---

БУЛГАКОВ Виктор Павлович — доктор биологических наук, ЖУРАВЛЕВ Юрий Николаевич — академик (Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток), ФЕДОРЕЕВ Сергей Александрович — кандидат химических наук (Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток).

почвенные условия, вредители), более высокий выход и качество продукта делают привлекательной эту технологию для производителей. Производство при умелой организации является экологически чистым, а продукт — свободным от гербицидов и тяжелых металлов.

Перечисленные факторы являются важными, но, пожалуй, не ведущими. На основном месте в настоящее время выходит фактор лекарственной безопасности нашей страны. В условиях, когда постоянно падает доля лекарственных субстанций отечественного производства, представляется важным развивать технологии, создающие надежную сырьевую базу для выработки отечественных препаратов.

Биотехнология растений является еще очень молодой наукой. Поэтому технологиям, которые на ней базируются, присущи и недостатки, среди которых можно отметить следующие. Биотехнологическое сырье пока в большинстве случаев дороже полученного на плантациях. Производство является довольно сложным технологически. И, наконец, ощущается нехватка высокопродуктивных клеточных культур, пригодных для промышленного производства. Последнее обстоятельство легко объяснимо, если учесть, что фундаментальные проблемы регуляции вторичного метаболизма в растениях разработаны еще слабо.

В Биолого–почвенном институте ДВО РАН работы в области биотехнологии растений проводятся совместно с Тихоокеанским институтом биоорганической химии ДВО РАН уже более 15 лет. За это время сложилась дальневосточная школа биотехнологии растений, возглавляемая акад. Ю.Н.Журавлевым, и получены интересные результаты. Ниже мы познакомим читателей с некоторыми разработками последних лет.

### **Культура клеток кирказона маньчжурского как продуцент активного кардиосредства**

Кардиотропные свойства стеблей реликтовой лианы *Aristolochia manshuriensis* (кирказон маньчжурский) известны в народной медицине с древних времен. Поскольку запасы растения в природе очень малы, нами с применением методов клеточной инженерии получен штамм культивируемых клеток кирказона А2s [1], пригодный для промышленного культивирования [8].

Исследование кардиопротекторной активности препаратов кирказона проведено во Всероссийском центре безопасности биологически активных веществ. Установлено, что экстракт из культуры клеток обладает выраженным противоишемическим действием, уменьшает на 40 % зону некроза при индуцированном инфаркте миокарда (табл. 1). Препараты из растения и из клеток уменьшали более чем вдвое частоту развития ранних постокклюзионных аритмий и существенно сокращали длительность аритмии. В дополнение к этим свойствам экстракт из клеток обладал способностью задерживать наступление аритмии. Особенный интерес вызывает тот факт, что препараты кирказона обладают ярко выраженным антигипоксическим действием (табл. 2). Активность препарата из биомассы клеточного штамма А2s по всем показателям не уступает активности экстракта растения. Таким образом, созданы предпосылки для создания нетоксичного высокоэффективного препарата для курсового применения при состояниях ишемии миокарда.

### **Культуры клеток — продуценты полифенолов**

Поиск новых средств, способных задерживать развитие ВИЧ, является актуальной задачей. Недавно группа ученых из университета Северной Каро-

Таблица 1

**Влияние препаратов кирказона маньчжурского на размеры зоны некроза при экспериментальном инфаркте миокарда у крыс**

Условия опыта	Зона ишемии (%) к массе миокарда	Зона некроза (%) к массе миокарда	Зона некроза (%) к зоне ишемии
Контроль	34 ± 2,5	22 ± 2,0	68 ± 4,4
Экстракт лианы кирказона	30 ± 4,3	10 ± 1,3*	41 ± 8,3*
Экстракт клеток кирказона	34 ± 1,6	13 ± 1,8*	40 ± 6,7*
Анаприлин (1 мг/кг)	30 ± 3,5	11 ± 1,6*	39 ± 5,5*
Нитроглицерин (0,5 мг/кг)	32 ± 2,8	17 ± 2,7	55 ± 7,0

\* Различие с контролем достоверно при  $P < 0,05$ .

лины (США) и университета Киуши (Япония) при поддержке компаний «Biotech Research Laboratories» и «Sumitomo Metal Industries» провели поиск анти-ВИЧ средств среди растений китайской медицины. Было найдено растение *Arnebia euchroma*, сем. Boraginaceae, экстракты которого обладали выраженным анти-ВИЧ действием. Действующим веществом оказались рабдозин — сложный тетрамер кофейной кислоты и его калиевые и натриевые соли, которые с  $EC_{50}$  4,0; 1,5 и 2,8 мкг/мл эффективно подавляли развитие вируса иммунодефицита человека.

Растения-продуценты рабдозина являются редкими, и их промышленное использование не представляется возможным. Поэтому мы поставили задачу получить культуры клеток других растений, которые могут являться воспроизводимым источником рабдозина.

В ходе выполнения этой задачи получены культуры клеток растений *Lithospermum erythrorhizon* (воробейник краснокорневой) и *Erithrichium sericeum* (незабудочник шелковистый). Основные полифенолы выделены в индивидуальном состоянии. Структуры этих соединений установлены путем сравнения данных ЯМР-, масс-, а также УФ- и КД-спектров с аналогичными данными, приведенными для этих соединений в литературе. Оказалось, что клетки воробейника синтезируют исключительно (+)-рабдозин, а клетки незабудочника — (-)-рабдозин. Культуры обоих растений продуцируют также в высоком количестве розмариновую кислоту.

Содержание полифенолов в клеточных культурах обоих изучаемых видов провели методом ВЭЖХ-хроматографии, для сравнения содержания полифенолов использовали корни дикорастущих растений (табл. 3). Содержание полифенолов в культуре воробейника корневого составило 1,92 % от сухой массы ткани, что в

Таблица 2

**Влияние различных препаратов кирказона маньчжурского на длительность биоэлектрической активности сердца при асфиксии**

Препарат	Количество опытов	Длительность биоэлектрической активности сердца, мин
Контроль	10	10,7 ± 0,86
Экстракт лианы	10	18,9 ± 0,39*
Экстракт клеток	10	21,3 ± 0,83*
ГОМК ** (200 мг/мл)	10	13,1 ± 0,30

\* Различие с контролем достоверно при  $P < 0,05$ .

\*\* ГОМК — гамма-оксималяная кислота.

Таблица 3

**Содержание полифенолов в корнях и клеточных культурах *Lithospermum erythrorhizon* (BK-39) и *Eritrichium sericeum* (Er-1)**

Материал	Масса сырой ткани, г/л	Рабдозин, %	Розмариновая кислота, %	Сумма полифенолов, %	Сумма полифенолов в 1 л среды
BK-39	290 ± 30	0,82 ± 0,08	1,10 ± 1,0	1,92	363
Корни воробейника		0,002	0,015	0,017	
Er-1	155 ± 15	1,51 ± 0,15	4,50 ± 0,79	6,01 ± 0,84	661
Корни незабудочника		0,200	0,040	0,240	

112 раз выше, чем в корнях природных растений. При этом содержание рабдозина в биотехнологическом источнике в 410 раз выше, чем в природном, а содержание розмариновой кислоты — в 73 раза. Сходная картина получена при анализе культуры и корней незабудочника: содержание полифенолов выше в каллусах в 25 раз, рабдозина — в 7,5 раза, розмариновой кислоты — в 112 раз. Таким образом, наибольшее содержание рабдозина отмечено для клеток воробейника, а розмариновой кислоты — для клеток незабудочника. Рост культуры незабудочника менее активный, чем воробейника, но в результате большего накопления целевых веществ продуктивность (интегральный показатель, объединяющий рост и биосинтетическую активность) у культуры незабудочника выше — 661 мг/л культуральной среды. Таким образом, впервые созданы два источника рабдозина, причем в форме различных диастериомеров, (+)- и (-)-рабдозина.

Оба вещества (рабдозин и розмариновая кислота) могут оказаться полезными для медицины. В последние годы появились сообщения о том, что розмариновая кислота ингибирует образование 5-гидокси-6,8,11,14-эйкозатетраеновой кислоты и лейкотриена В<sub>4</sub>, усиливает выработку простагландина Е<sub>2</sub>. Эти свойства позволяют применить ее для лечения воспалительных аутоиммунных артритов. Фармакологические исследования комплексов полифенолов из клеточных культур начаты в 2003 г.

### **Получение и характеристика гепатопротекторного комплекса полифенолов из культуры клеток *Maackia amurensis***

Дальневосточное растение *Maackia amurensis* содержит комплекс полифенолов, на основе которого в ТИБОХ ДВО РАН создан лекарственный препарат «Максар» для лечения заболеваний печени. Мы получили культуру каллусов *Maackia amurensis* и провели химическое и фармакологическое исследование продуцируемых ею полифенолов [9].

В культуре клеток найдено большое количество биологически активных веществ: изофлавоны (ретузин, генистеин и формомонетин) и птерокарпаны (маакиаин и медукарпин) — 16,7 ± 0,27 мг/г сухой массы клеток (табл. 4). Интересно, что культура не продуцирует стильбены, однако содержит значительное количество изофлавонов и прерокарпатов. Подобные эффекты описаны в литературе для некоторых клеточных культур. Они свидетельствуют о переходе клеток к более «древнему» (примитивному) пути биосинтеза. Однако следует отметить, что другие полученные нами культуры (например, женьшеня, воробейника, марены) содержат наборы вторичных метаболитов, которые в точности повторяют имеющиеся у исходных растений.

Таблица 4

**Содержание полифенолов (мг/г сухой массы) в древесине  
и каллусах маакии амурской**

Компоненты	Стильбены	Изофлавоны	Птерокарпаны	Общее содержание полифенолов
Древесина	12,42 ± 0,35	4,22 ± 0,16	0,63 ± 0,06	17,3
Каллусы	0	12,3 ± 0,34	8,50 ± 0,45	20,8

Тем не менее комплекс полифенолов из клеток маакии полностью предотвращает смертность мышей с индуцированным CCl<sub>4</sub>-гепатитом, уменьшает продолжительность гексеналового сна и жировую дистрофию печени, т. е. не уступает показателям стандартного препарата «Максар» (табл. 5). Поэтому клетки маакии можно рассматривать как возобновимый источник сырья для выработки препарата.

**Генетическая трансформация как инструмент  
повышения биосинтетической способности  
клеточных культур**

Среди методов, которые используются для повышения содержания целевых веществ в клеточных культурах растений, на ведущее место выходят методы генетической инженерии. Мы провели поиск генов-активаторов биосинтетической способности клеток. Такими генами-активаторами оказались гены *rolB* и *rolC*, что было впервые продемонстрировано на женьшене. В 1998 г. эти данные были опубликованы в журнале «Phytochemistry» [3]. История этой разработки примечательна. Оказалось, что аналогичное открытие сделано параллельно группой испанских ученых из университета г. Барселона. Испанские коллеги установили, что ген *rolC* активируют синтез индольных алкалоидов барвинка и опубликовали свои данные в том же 1998 г. в журнале «Journal of Plant Physiology» [11]. И, как это часто бывает в науке, пальма первенства оказалась разделенной между разными странами. Позже эффекты генов подтвердили ученые из Франции, США и других стран, однако все ограничились констатацией факта об их активаторной функции. Однако было бы интересно узнать механизм действия генов *rol* на процессы вторичного метаболизма. Рассмотрим этот вопрос на примере трансгенных культур марены сердцелистной (*Rubia cordifolia*).

Таблица 5

**Гепатопротекторная активность полифенольных комплексов маакии амурской  
при индуцированном CCl<sub>4</sub>-гепатите у мышей**

Показатели	Интактные животные	Опытные группы		
		CCl <sub>4</sub> -гепатит	CCl <sub>4</sub> -гепатит + ПФК растения	CCl <sub>4</sub> -гепатит + ПФК культуры клеток
Летальность, %	0	33	12,5	0
Изменение массы тела, г	+0,95 ± 0,24	-1,63 ± 0,97*	-1,15 ± 0,75*	-1,13 ± 0,64*
Удельная масса печени, г	60,6 ± 3,3	78,3 ± 3,9*	66,0 ± 5,7	70,6 ± 2,6*
Продолжительность гексеналового сна, мин	18,5 ± 0,9	70,2 ± 2,2*	40,5 ± 2,4*, **	45,3 ± 3,0*, **
Жировая дистрофия печени, баллы	0	3,0*	2,1 ± 0,33*, **	1,9 ± 0,22*, **

Примечание. P < 0,05: \* — интактные животные, \*\* — больные CCl<sub>4</sub>-гепатитом.

Корни марены сердцелистной содержат до 0,2 % антрахинонов. Это существенно меньше, чем продуцирует марена красильная — основной источник антрахинонов. Однако антрахиноны *R. cordifolia* представлены на 90 % пурпурином и муньином [10]. Эти вещества не обладают мутагенным действием, в отличие от некоторых антрахинонов марены красильной. А поскольку антрахиноны способны активно растворять камни в почках, создание нетоксичного препарата уриколитического действия является важной задачей.

Мы получили каллусные культуры марены сердцелистной. Оказалось, что они накапливают 0,4—1,2 % пурпурина и муньирина [10]. Стандартными манипуляциями с этими культурами (агрегатная селекция, оптимизация условий культивирования и питательных сред) удалось повысить выход антрахинонов до 1,8 %. Трансформация же клеток марены геном *rolC* привела к резкому увеличению продуктивности культуры — до 3 %, а геном *rolB* — до 6,8 % [6, 7].

Было интересно выяснить, вовлечен ли в активаторную функцию генов *rol* NADPH-оксидазный сигнальный путь, который является основным путем, регулирующим синтез защитных веществ в растениях. Оказалось, что кальций-зависимый NADPH-оксидазный сигнальный путь не вовлечен в активацию синтеза антрахинонов в трансгенных культурах. По-видимому, в них реализуется необычный для растительно-микробных взаимодействий тип регуляции биосинтеза вторичных метаболитов. Важным звеном этого типа регуляции может быть активность серин/треонин фосфатаз типов 1 и A2 [5].

### **Промышленное внедрение клеточных культур. Препараты биошиконина**

Шиконин известен в восточноазиатских странах как эффективный природный антибиотик, не вызывающий привыкания и аллергических реакций. Кроме того, он обладает выраженным противовоспалительным действием и регенерирует кожу и эпителий после тяжелых поражений.

Аналогов препарата в России нет, и из-за рубежа подобные препараты в настоящее время не поступают. Шиконин получают из растения воробейник краснокорневой *Lithospermum erythrorhizon*. Растение является редким видом, запасы которого в природе незначительны. Плантационное возделывание растения требует 5—6 лет и позволяет получить корни с содержанием шиконина 1—2 %.

В БПИ ДВО РАН разработан биотехнологический способ получения шиконина, в результате которого культивируемые клетки воробейника накапливают в течение месячного цикла выращивания 5—6 % шиконина, по химическому составу и свойствам идентичного природному [2, 4]. Полученный штамм (ВК-39) депонирован в Российскую коллекцию клеток высших растений и прошел промышленные испытания.

В 2003 г. в Приморском крае освоено производство препаратов биошиконина в промышленных масштабах. Среди препаратов биошиконина наиболее известно средство «Масло шикониновое». Масло шикониновое эффективно ингибирует грамположительную микрофлору (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. lutea*, *Bacillus subtilis* и др.), обладает противогрибковым действием, является эффективным нестероидным противовоспалительным препаратом, так как нормализует продукцию ключевых медиаторов воспаления — интерлейкинов I и II,  $\gamma$ -интерферона, снижает отек и сосудистую проницаемость в очаге острого воспаления. Антимикробное и противовоспалительное действие средства сочетается с его способностью регенерировать эпителий после различных поражений.

## Заключение

Невозможно в одной статье описать свойства нескольких сотен клеточных линий дальневосточных растений, которые получены и поддерживаются в коллекции БПИ ДВО РАН, однако такой цели и не ставилось. Важно было дать представление о векторе развития этого научного направления и основанных на нем промышленных технологиях. Нам представляется, что Дальнему Востоку, с его богатой и разнообразной флорой, определено важное место в мире в становлении и развитии биотехнологий лекарственных растений. Клеточные культуры могут быть хорошим фундаментом для создания множества эффективных препаратов для медицины. Действительно, теперь любое, даже микроскопическое, растение или растение, которое существует в природе в единичных экземплярах, может быть поставлено на службу здравоохранению. В настоящее время на этом поле складывается благоприятная ситуация для инноваций. Нужно стремиться к созданию мощного научно-производственного комплекса, которому будет по силе решение всех задач в цепочке от научной идеи до выпуска новых препаратов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Булгаков В.П., Журавлев Ю.Н., Кочергина Т.Ю., Гацура В.В., Бабкина Э.Н., Попов А.М., Артюков А.А., Сернов Л.Н., Альшевская Е.К., Розонов Ю.Б. Штамм культивируемых клеток растений *Aristolochia manshuriensis*, используемый для получения препарата, обладающего кардиотропной активностью. Патент РФ N 1708836. МКИ C12N 5/04. Приоритет от 6.03.1990 г.
2. Журавлёв Ю.Н., Булгаков В.П., Писецкая Н.Ф., Козыренко М.М., Старун Т.В., Артюков А.А., Федореев С.А. Штамм культивируемых клеток растений *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. — продукт шиконина. Патент РФ N 1707073. МКИ C12 N 5/04, 5/00. Приоритет от 16.04.90 г. Опубл. 23.01.92. Бюл. № 3.
3. Bulgakov V.P., Khodakovskaya M.V., Labetskaya N.V., Chernoded G.K., Zhuravlev Yu.N. The impact of plant rolC oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures // *Phytochemistry*. 1998. Vol. 49, N 7. P. 1929—1934.
4. Bulgakov V.P., Kozыrenko M.M., Fedoreyev S.A., Mischenko N.P., Denisenko V.A., Zvereva L.V., Pokushalova T.V., Zhuravlev Y.N. Shikonin production by p-fluorophenylalanine resistant cells of *Lithospermum erythrorhizon* // *Fitoterapia*. 2001. Vol. 72. P. 394—401.
5. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Shkryl Yu.N., Glazunov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Yu.N. Effects of Ca<sup>2+</sup> channel blockers and protein kinase/phosphatase inhibitors on growth and anthraquinone production in *Rubia cordifolia* cultures transformed by the rolB and rolC genes // *Planta*. 2003. Vol. 217. P. 349—355.
6. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Khodakovskaya M.V., Glazunov V.P., Radchenko S.V., Zvereva E.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the rolB and rolC genes // *J. Biotechnol.* 2002. Vol. 97. P. 213—221.
7. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Shkryl Yu.N., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Yu.N. The rolB and rolC genes activate synthesis of anthraquinones in *Rubia cordifolia* cells by mechanism independent of octadecanoid signaling pathway // *Plant Sci.* 2004.— In press.
8. Bulgakov V.P., Zhuravlev Yu.N., Fedoreyev S.A., Denisenko V.A., Veselova M.V., Kulesh N.I., Alshevskaya E.K., Radchenko S.V. Constituents of *Aristolochia manshuriensis* cell suspension culture possessing cardiotonic activity // *Fitoterapia*. 1996. Vol. 67, N 3. P. 238—240.
9. Fedoreyev S.A., Pokushalova T.V., Veselova M.V., Glebko L.I., Muzarok T.I., Seletskaya L.D., Bulgakov V.P., Zhuravlev Yu.N. Isoflavonoid production by callus cultures of *Maackia amurensis* // *Fitoterapia*. 2000. Vol. 71, N 2. P. 365—372.
10. Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Glazunov V.P., Chernoded G.K., Bulgakov V.P., Zhuravlev Y.N. Anthraquinone production by callus cultures of *Rubia cordifolia* // *Fitoterapia*. 1999. Vol. 70, N 6. P. 552—557.
11. Palazyn J., Cusidy R.M., Gonzalo J., Bonfill M., Morales S., Picol M.T. Relation between the amount the rolC gene product and indole alkaloid accumulation in *Catharantus roseus* transformed root cultures // *J. Plant Physiol.* 1998. Vol. 153. P. 712—718.