

Н. Л. Шимановский

## РОЛЬ ФИТОИНЖЕНЕРИИ В ПОЛУЧЕНИИ И ПРОИЗВОДСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ГБОУ ВПО "РНИМУ им. Н. И. Пирогова" Минздрава РФ, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1.  
e-mail: shimannn@yandex.ru

Рассмотрены возможности методов биотехнологии и фитоинженерии для продукции физиологически активных веществ (вторичных метаболитов) растительного происхождения. Отмечается, что алкалоиды, флавоноиды, терпены, стероиды и другие соединения растительного происхождения, представляющие интерес для фармации, можно получать с помощью клеточных технологий, культивирования клеток и тканей растений.

**Ключевые слова:** лекарственные растения; вторичные метаболиты растений; фитоинженерия.

Использование фитохимических веществ для лечения различных заболеваний известно с незапамятных времен. Это направление развивалось путем практического применения растительных препаратов, технология получения которых претерпела значительные изменения в последние годы, благодаря бурному развитию аналитической биохимии и молекулярной биологии. Установлено, что растения могут накапливать имеющие высокую биологическую активность метаболиты в специфических участках и структурах, таких как вакуоли, специализированные железы, трихомы на определенных этапах своего развития. Эти метаболиты принято называть "вторичными" метаболитами, некоторые из которых нужны растениям для их жизнедеятельности [1]. Эти метаболиты представляют несомненный интерес для фармации, так как в ряде случаев обладают специфической полезной фармакологической активностью.

Если раньше биологические активные вещества получали из разных отделов растений с помощью экстракции, то в последние годы с помощью методов клеточных и генных технологий появилась возможность получать их, используя методы биоинженерии, применительно к растениям — методы фитоинженерии (фитоинжиниринга). Термин фитоинжиниринг является производным от слов *phyto* (др. греческий — растение) и *engineering* (английский — инженерия, инженерное искусство), что в совокупности обозначает применение современных научных знаний и инновационных технологий для использования высокого потенциала растений, доказанно содержащих биологически активные вещества, которые имеют фармакологическую активность, в качестве основных источников для производства лекарственных препаратов.

Биосинтез вторичных метаболитов происходит из глюкозы через фенилпропаноид, мевалонат, 2-С-метил-D-эритритрол-4-фосфат, аминокислоты, ацетат-малонат (рисунок). Сам путь зависит от генотипа, физиологии растений, климата, условий окружающей среды. Изменчивость этих условий влияет на продукцию основного действующего вещества и присутствующие примеси. В то же время культивирование рас-

тительных клеток позволяет контролировать рост и продукцию фитометаболитов за счет регуляции микроокружения клеток *in vitro* [2, 3]. Особенно это интересно для растений, занесённых в Красную книгу, которые нельзя использовать в качестве сырья для фитофармацевтики.

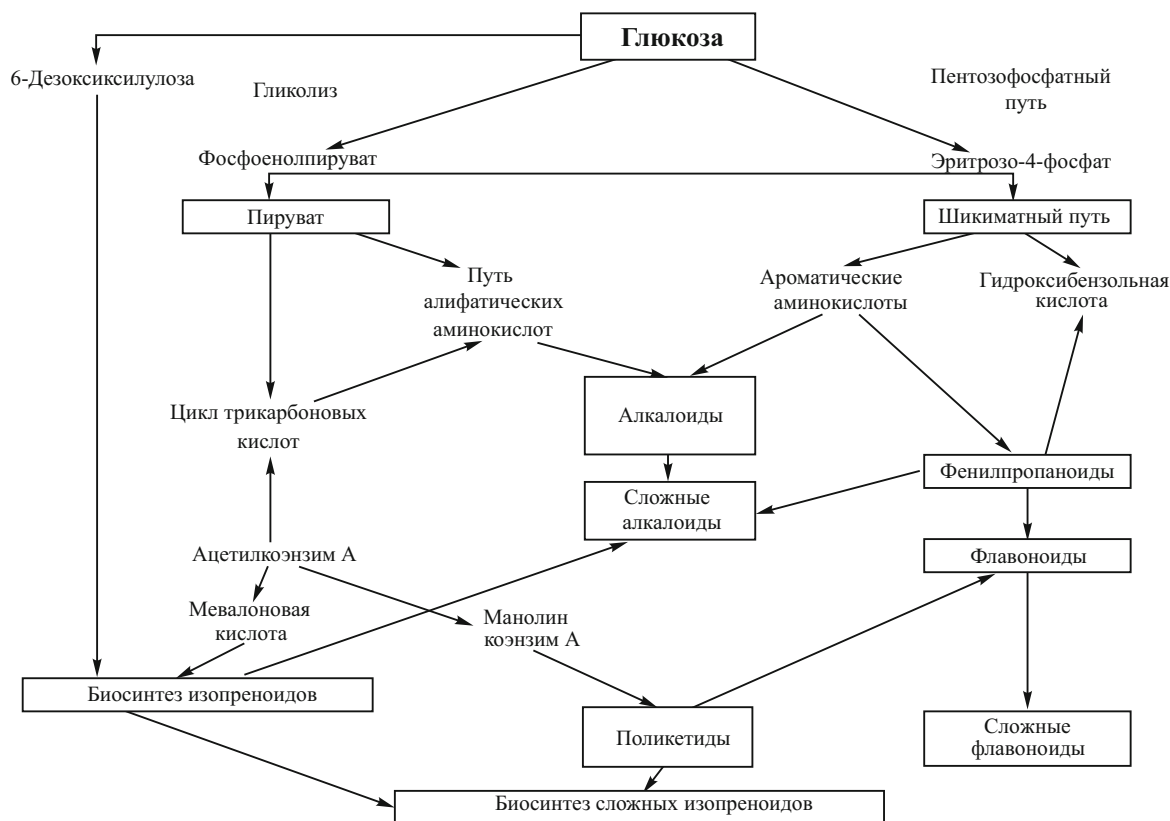
Производство фитохимических веществ в культуре растительных клеток имеет следующие преимущества по сравнению с их экстракцией из целых растений:

1. Устойчивость. Культивируемые клетки можно поддерживать сколь угодно долго в определенной производственной системе независимо от состояния растения в дикой природе, сезонных, климатических или экологических условий.

2. Сохранение. Клеточная культура выращивается при полностью контролируемых условиях. Легче соблюдать требования GMP.

Развитие трансгенных технологий направлено на создание высокопроизводительных клеточных линий, которые можно масштабировать для производства лекарственных веществ *in vitro*, в том числе с использованием клеток редких и исчезающих растений.

Метаболическая инженерия, позволяющая изменять в нужном направлении пути биосинтеза биологически активных веществ в растительных клетках основана на исследованиях экспрессии, особенно повышенной экспрессии генов (оверэкспрессии — избыточной или сильной экспрессии — например, оверэкспрессия гена соматотропина приводит к гигантизму у людей), участвующих в биосинтезе многих вторичных метаболитов, представляющих интерес для фармации [5, 6]. С помощью фитоинженерии можно повысить продуктивность культивируемых растительных клеток *in vitro* на основании углубленного изучения ферментативных реакций и процессов биосинтеза на генном уровне, а также транскриптома и протеома с акцентом на регуляцию различных стадий производства [7, 8]. Одним из ограничений является то, что оверэкспрессия некоторых генов, участвующих в биосинтезе вторичных метаболитов, необязательно приводит к повышению их продукции, что было отмечено для некоторых алкалоидов [9]. Метаболическая инже-



Пути биосинтеза вторичных метаболитов из глюкозы в растительных клетках [4].

рия включает сверхэкспрессию генов ферментов, лимитирующих скорость образования нужных метаболитов или блокирующих ингибирование их образования по обратной связи. Генная инженерия позволяет модифицировать структуру вторичного метаболита для получения новых молекул с улучшенными терапевтическими свойствами сверхэкспрессией генов, кодирующих регуляторные ферменты, участвующих в биосинтетических путях, и таким образом повысить продуктивность растительных клеток *in vitro*. Клонированием генов, участвующих в биосинтезе ряда алкалоидов, таких как никотин, скополамин и берберин были разработаны новые способы их получения [10]. Однако комплекс физиологических факторов, участвующих в биосинтезе метаболитов, требует идентификации многих генов и более тщательного изучения многих путей метаболизма в культивируемых клетках для повышения выхода нужных вторичных метаболитов.

Инженерия путей метаболизма включает также использование ингибирования конкурентных путей биотрансформации промежуточных соединений для более высокой продукции требуемого метаболита. Например, блокированием с помощью антисмысловой молекулы гена ментофурансинтазы, конкурентного пути метаболизма монотерпенов (превращение пулегона в ментофуран), достигается увеличение выработки ментола [11]. Блокированием определенных метаболических этапов можно облегчить накопление предшествующих промежуточных метаболитов. Напри-

мер, за счет уменьшения экспрессии гена кодеинредуктазы посредством ингибирования этого гена с помощью химерной РНК в виде шпильки удалось повысить накопление (s)-ретукулина в трансгенных клетках *Papaver somniferum* и тем самым повысить продукцию кодеина, морфина, тебаина и орипавина [12]. Аналогично, биосинтез вторичных метаболитов можно увеличить генной инженерией регуляторных механизмов. Ингибируя регуляторный ген *DET1* посредством РНК-интерференции можно увеличить продукцию апокаротиноидов и флавоноидов [13]. В клетках катаранта розового (*Catharanthus roseus*) повышение экспрессии гена *ORCA3* приводит к увеличению накопления индолсодержащих терпеноидов в 3 раза [5].

Последние достижения в области биоинформатики в области метаболических путей у растений помогают найти пути повышения продуктивности культивируемых растительных клеток *in vitro* [2, 14]. К наиболее успешным результатам в этой области можно отнести открытие возможности регуляции фенилпропаноидного биосинтетического пути, участвующего в биосинтезе многих вторичных метаболитов растений [15]. Исследования метаболических путей образования фитотерапевтических препаратов с помощью методов молекулярной биологии (ПЦР, клонирование комплементарной ДНК, анализ экспрессии генов) позволили перейти в прегеномную эру метаболической инженерии [14], а анализ биосинтеза метаболитов в культивируемых клетках растений посредством изучения протеомики и маркеров экспрессии генов с помощью био-

информатики способствовали развитию постгеномной эры фитоинженерии [16, 17].

В этом аспекте весьма перспективно применение комплексного подхода, включающего сопоставление результатов исследования метаболома с данными геномной экспрессии путей регуляции биосинтеза фармацевтических веществ в системах культивирования клеток растений *in vitro*. Применение протеомных технологий позволило увеличить эффективность биосинтеза вторичных метаболитов в культурах клеток *Maytenus ilicifolia* [17]. Высокоэффективный противоопухольевый алкалоид камптотецин (СРТ), найденный в ряде природных источников [18], может производиться с помощью культуры растительных клеток. Однако выявление пока только ряда ферментов, участвующих в его биосинтезе (триптофандекарбоксилаза, гераниол-10-гидроксилаза, секологанинсинтаза и стриктозидинсинтаза) затрудняет применение метаболической инженерии в полном объеме.

Таким образом, растения остаются важным источником существующих и новых лекарственных веществ. Комбинаторный биосинтез, клеточные технологии и фитоинженерия открывают новые пути продукции растительными клетками нужных высокоэффективных фармацевтических субстанций.

Универсальные геномные инструменты — комплементарная ДНК-АФЛП (амплификация полиморфных по длине фрагментов ДНК) — теперь можно использовать для генетического скрининга растений и находить гены, полезные для разработки вторичных метаболитов. Проблемой остается интеграция комплексных подходов, таких как протеомика и особенно метаболомика в фитоинженерию при поиске и производстве новых растительных веществ.

## THE ROLE OF PHYTOENGINEERING IN THE PREPARATION AND PRODUCTION OF HERBAL MEDICINES

N. L. Shimanovskii

N. I. Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov Medical University), Moscow, 117997 Russia  
e-mail: shimannn@yandex.ru

Possibilities of using biotechnology and phytoengineering methods for the production of physiologically active substances (secondary metabolites) of plant origin are considered. It is pointed that alkaloids, flavonoids, terpenes, steroids, and other compounds of plant origin that are of interest to pharmacy can be obtained with the help of cellular technologies and cultivation of plant cells and tissues.

**Keywords:** medicinal plants; secondary plant metabolites; phytoengineering.

## ЛИТЕРАТУРА

1. M. Y. Hirai, M. Yano, D. B. Goodenowe, et al., *Proc. Nat. Acad. Scio. USA*, **101**, 10205 – 10210 (2004).
2. H. Gaosheng, J. Jingming, *Production of the useful secondary metabolites through the regulation of biosynthetic pathway in the cell & tissue suspension culture of medicinal plants*; in: *Recent advances in plant in vitro culture*, Gaosheng H., Jingming J. (eds.), INTECH, Rijeka (2012).
3. T. Isah, *Br. J. Pharm. Res.*, **6**(4), 214 – 227 (2015).
4. T. Isah, S. Uma, A. Mujib, *Plant. Cell Tiss Organ Cult.*, **132**, 239 – 265 (2018).
5. L. van der Fits, J. Memelink, *Science*, **289**, 295 – 297 (2000).
6. S. E. O'Connor, *Ann. Rev. Genet.*, **49**, 71 – 94 (2015).
7. G. Farre, D. Blancquaert, T. Capell, et al., *Ann. Rev. Plant. Biol.*, **65**, 187 – 223 (2014).
8. X. Lu, K. Tang, P. Li, *Front. Plant. Sci.*, **7**, 1647 (2016).
9. K. M. Oksman-Caldentey, R. Arroo, *Regulation of tropane alkaloid metabolism in plants and plant cell cultures*; in: *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*, Verpoorte R., Alfermann A. W. (eds.), Springer, New York (2000), pp. 253 – 281.
10. F. Sato, T. Hashimoto, A. Hachiya, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(1), 367 – 372 (2001).
11. S. S. Mahmoud, R. B. Croteau, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **98**(15), 8915 – 8920 (2001).
12. R. S. Allen, A. G. Millgate, J. A. Chitty, et al., *Nat. Biotechnol.*, **22**(12), 1559 (2004).
13. G. R. Davuluri, A. van Tuinen, P. D. Fraser, *Nat. Biotechnol.*, **23**(7), 890 – 895 (2005).
14. S. Sharma, N. Shrivastava, *Planta*, **244**(1), 19 – 38 (2016).
15. S. Nanda, J. N. Mohanty, R. Mishra, R. K. Joshi, *Metabolic engineering of phenyl propanoids in plants*; in: *Transgenesis and secondary metabolism: part of the series reference series in phytochemistry*, Jha S. (ed.), Springer, New York (2016), pp. 1 – 26.
16. S. G. Gandhi, V. Mahajan, Y. S. Bedi, *Planta*, **241**(2), 303 – 317 (2015).
17. T. A. Paz, V. dos Santos, M. C. Inacio, et al., *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, **130**, 255 – 263 (2017).
18. S. S. Malik, J. S. Laura, *Int. J. Cur. Res.*, **6**(5), 6497 – 6507 (2014).

Поступила 30.09.19