

ОТЧЕТ ЗА 2010 ГОД ПО ПРОЕКТУ РФФИ 08-04-98840-р_север_а

Статус отчета: зарегистрирован

Дата подписания: 25.12.2010

Подписал: Тимофеев Николай Петрович

Дата регистрации: 27.12.2010

Отчет распечатан: 27.12.2010

Форма 501. КРАТКИЙ НАУЧНЫЙ ОТЧЕТ

- 1.1. Номер проекта
08-04-98840
- 1.2. Руководитель проекта
Тимофеев Николай Петрович
- 1.3. Название проекта
Управление продуктивностью, накоплением действующих веществ и биологической активностью важнейших лекарственных растений Европейского Севера
- 1.4. Вид конкурса
р_север_а - Региональный конкурс СЕВЕР
- 1.5. Год представления отчета
2011
- 1.6. Вид отчета
итоговый (2008-2010)
- 1.7. Аннотация
Проект направлен на разработку научных основ создания и управления функционированием искусственных экосистем лекарственных растений, связанных с синтезом ценных биологически активных веществ – фитостероидов (ФЭС), и необходимых для решения задач сохранения здоровья человека – лечения и профилактики сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, повышения его адаптации к действию неблагоприятных факторов среды обитания.

В течение 2008-2010 гг., исходя из необходимости выявления факторов, регулирующих рост, развитие и максимальную продуктивность экдистероид синтезирующих (ЭС) растений с улучшенным содержанием целевых веществ и высокой биологической активностью в лекарственном сырье, проведен широкий комплекс научных исследований.

Базируясь на впервые установленных нами природных закономерностях фундаментального характера – зависимости биосинтеза ФЭС от ростовых процессов и участия в них гломусовых грибов *spp. Glomus* (Glomeraceae: Glomeromycota) в жизнедеятельности ЭС-растений – а) изучали эколого-биохимические механизмы их взаимодействия на различных этапах онто-генеза; б) выявляли ответную реакцию эндомикоризы (синхронность и изменчивость развития грибных структур, плотность мицелия и везикул) на стрессовые и технологические факторы (влажность почвы, pH среды, частоты и интенсивность отчуждения продукции, высоких доз азота, фунгицидов; в) изучали сроки и нормы изъятия продукции, не влияющие отрицательно на микробно-растительные взаимодействия, формирование продукции и синтез ФЭС; г) исследовали возможность управления синтезом и накоплением ФЭС через использование регуляторов роста и развития (фитогормоны), устанавливали их влияние на распределение потоков органического вещества (водорастворимые экстракты и сахара) в пределах растения и симбиотических структур; д) оценивали корреляционные связи между качественным составом ФЭС в лекарственном растительном сырье и проявлением их биологической активности в гормональных взаимодействиях агропопуляций ЭС-растений с беспозвоночными.

Работы проводили в полевых и лабораторных условиях, на базе из 12 агропопуляций ЭС-растений в возрасте 1-21 лет (62° с.ш., подзона средней тайги). Использовали популяционные, модельные, ценоотические, лабораторные (анатомические, морфологические, микробиологические, биохимические, агрохимические) и статистические методы исследований.

По результатам исследований впервые установлены природные закономерности, которые позволяют управлять длительностью жизни, ростом и развитием, формированием продуктивности, биосинтезом экдистероидов в фитомассе. Выявлена тесная мета-биологическая интеграция ЭС-растений с эндомикоризой (гломусовыми грибами), установлены регуляторные механизмы, лежащие в основе их эколого-биохимических взаимодействий – с образованием общих путей биосинтеза и катаболизма органических веществ. Экспериментально показано, что контролируя эффективность симбиоза везикулярно-арбускулярной микоризы и ЭС-растений биологическими, технологическими или агрохимическими методами – можно управлять продуктивностью, биосинтезом и накоплением биологически активных веществ в лекарственном сырье.

Открыты корреляционные связи между действием стрессовых факторов и биосинтезом экдистероидов в эндомикоризе. Установлены режимы биотических, абиотических и технологических факторов культивирования, не влияющие отрицательно на микробно-растительные взаимодействия, формирование продуктивности и биосинтез ФЭС. Показана возможность целенаправленного управления формированием продуктивности популяций через использование регуляторов роста и развития – за счет распределения и

концентрирования органо-минеральных веществ по различным органам. Теоретически обоснована и экспериментально доказана зависимость биологической активности ФЭС от его качественного состава.

Исследования по Проекту соответствуют приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы в области живых систем (утвержденных Президентом РФ 21 мая 2006 г) – это управляемый биологический син-тез лекарственных средств и биотехнологические процессы производства лекарственного сырья, новые методы контроля их качества, биологические средства питания и защиты животных. Результаты исследований представлялись за 3 года на 10-и Международных конференциях и симпозиумах, в т.ч. за 2010 г – на 4-х. По материалам исследований опубликовано всего 28 научных публикаций, в т.ч. 6 статей в рецензируемых научных журналах по списку ВАК (за 2010 г – 16, из них 3 по списку ВАК).

- 1.8. Полное название организации, где выполняется проект
Крестьянское хозяйство "БИО"

"Исполнители проекта согласны с опубликованием (в печатной и электронной формах) научных отчетов и перечня публикаций по проекту"

Подпись руководителя проекта

Форма 502. КРАТКИЙ НАУЧНЫЙ ОТЧЕТ НА АНГЛИЙСКОМ ЯЗЫКЕ

- 2.1. Номер проекта
08-04-98840
- 2.2. Руководитель проекта
Timofeev Nikolay Petrovich
- 2.3. Название проекта
Control of productivity, accumulation working substances and biological activity of major medicinal plants on European North
- 2.4. Год представления отчета
2011
- 2.5. Вид отчета
итоговый (2008-2010)
- 2.6. Аннотация
The design is directed on working out of scientific bases of building and control of functioning of artificial ecosystems of the medicinal plants bound to synthesis of active materials valuable biologically - phytoecdysteroids, and necessary for solving the problems of preservation of health - treatments and prophylactics of cardiovascular and cancer diseases, increases of its acclimatization to action of unfavorable ecological factors of the environment.

Within 2008-2010, proceeding from necessity of revealing of factors growth-regulating, development and the maximum productivity of ecdysteroids synthesizing (Es) plants with the enriched content of target substances and high biological activity in medicinal raw materials, the wide complex of scientific researches was carried.

Basing on for the first time positioned by us connatural laws of fundamental character – dependences of biosynthesis phytoecdysteroids on growth processes and participation in them vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi ssp. *Glomus* (Glomeraceae: Glomeromycota) in ability to live of Es-plants –

1. Studied ecological biochemical mechanisms of their interaction at various stages of an ontogenesis;
2. Revealed response endomycorrhizal (synchronism and variability of development of fungal structures, density of mycelium and vesiculs) on stressful and technology factors (humidity of soil, acidity, frequency and intensity of alienation of production, high doses of nitrogen, fungicides);
3. Studied terms and norms of withdrawal of production, not influencing negatively on microbial-plants – interactions, formation of production and synthesis ecdysteroids;
4. Investigated possibility of control of synthesis and accumulation phytoecdysteroids through used of growth regulators and developments (phytohormones), set their influence on distribution of streams of organic matter (the water-soluble extracts and sugar) within a plant and symbiotic structures;
5. Estimated correlation communications between qualitative composition phytoecdysteroids in medicinal vegetative raw materials and exhibiting of their biological activity in hormonal interactions of agropopulations of Es-plants with invertebrates.

Works were made in field and laboratory conditions, on base from 12 agropopulations of Es-plants at the age of 1-21 years (62° n.l., a subband of a centre taiga). Population, modeling, coenoses, laboratory (anatomical, morphological, microbiologic, biochemical and agro-chemical) and statistical methods of researches were used. By results of researches connatural laws which allow were operated longevity, growth and development, productivity formation, biosynthesis of ecdysteroids in phytomass for the first time are positioned.

Metabolic integration of Es-plants with endomycorrhizal fungi was revealed; the regulatory mechanisms were positioned underlying their ecological-biochemical interactions – with formation of the general paths of biosynthesis and a catabolism of organic matters. It was experimentally shown that supervising efficiency of a symbiosis vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and Es-plants biological, technological or agrochemical methods – can be

operated productivity, biosynthesis and accumulation biologically active substances in medicinal raw materials.

Correlation communications between action of stressful factors and biosynthesis of ecdysteroids in endomycorrhiza were opened. Modes of biotic, abiotic and technology factors the cultivation which is not influencing negatively on microbial vegetative interactions, formation of efficiency and biosynthesis ecdysteroids were positioned.

Possibility of purposeful management by formation of productivity of populations through used of growth regulators and development – at the expense of allocation and concentrating of organ mineral materials on various members was shown. Dependence of biological po-tency phytoecdysteroids on its qualitative composition was theoretically proved and experimentally proved.

Researches under the Project correspond to priority directions of development of a scientifically-technological complex of Russia for 2007-2012 in the field of alive systems (the Russian Federations confirmed by the President on May, 21st 2006) is a managed biological synthesis of medical products and biotechnological processes of manufacture of the medicinal raw materials, a new quality monitoring of their quality, biological means of a feed and animal protection

The results of researches were represented for 3 years at 10 International conferences and symposiums, including for 2010 – on four. On materials of researches it is published only 28 scientific publications, from them 6 articles in leading reviewed scientific journals (for 2010 – 16, from them 3 in leading reviewed scientific journals).

- 2.7. Полное название организации, где выполняется проект
Крестьянское хозяйство "БИО"

Подпись руководителя проекта

Форма 503. РАЗВЕРНУТЫЙ НАУЧНЫЙ ОТЧЕТ

- 3.1. Номер проекта
08-04-98840
- 3.2. Название проекта
Управление продуктивностью, накоплением действующих веществ и биологической активностью важнейших лекарственных растений Европейского Севера
- 3.3. Коды классификатора, соответствующие содержанию фактически проделанной работы
04-120
- 3.4. Объявленные ранее (в исходной заявке) цели проекта на 2010 год
Проект направлен на разработку научных основ создания и управления функционированием искусственных экосистем лекарственных растений, связанных с синтезом ценных биологически активных веществ – фитозкдистероидов (ФЭС), и необходимых для решения задач сохранения здоровья человека – лечения и профилактики сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, повышения его адаптации к действию неблагоприятных факторов среды обитания.
- На 2010 год, исходя из необходимости выявления факторов, регулирующих рост, развитие и максимальную продуктивность эkdистероид синтезирующих растений с улучшенным содержанием целевых веществ и высокой биологической активностью в лекарственном сырье, а также базируясь на впервые установленных нами в 2008-2009 гг. природных закономерностях фундаментального характера – зависимости биосинтеза ФЭС от ростовых процессов и участия в них гломусовых грибов *ssp. Glomus (Glomeraceae: Glomeromycota)* в жизнедеятельности ЭС-растений, ставились следующие новые задачи:
1. Изучить эколого-биохимические механизмы их взаимодействия ЭС-растений и микоризы на различных этапах онтогенеза.
 2. Выявить ответную реакцию эндомикоризы (синхронность и изменчивость развития грибных структур, плотность мицелия и везикул) на стрессовые и технологические факторы – влажность почвы, pH среды, частота и интенсивность отчуждения надземной продукции, высокие дозы азота, фунгициды.
 3. Изучить сроки и нормы изъятия продукции, не влияющие отрицательно на микробно-растительные взаимодействия, формирование продукции и синтез ФЭС, установить корреляционные связи.
 4. Исследовать возможность управления синтезом и накоплением ФЭС через использование регуляторов роста и развития (фитогормоны), установить их влияние на распределение потоков органического вещества (водорастворимые экстракты и сахара) в пределах растения и симбиотических структур.
 5. Оценить корреляционные связи между качественным составом ФЭС в лекарственном растительном сырье и проявлением их биологической активности в гормональных взаимодействиях агропопуляций ЭС-растений с беспозвоночными.
- 3.5. Степень выполнения поставленных в проекте задач
Проект направлен на разработку научных основ создания и управления функционированием искусственных экосистем лекарственных растений, в том числе левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum carthamoides*) и серпухи венценосной (*Serratula coronata*), связанных с синтезом ценных биологически активных веществ – фитозкдистероидов (ФЭС). *R. carthamoides* официально включен в Госфармаколею СССР и РФ IX-XII изданий, начиная с 1961 г., а также в Госреестр лекарственных средств. Ведется работа по включению *S. coronata* в Фармаколею России, Казахстана и Украины.

Эти два вида являются основой новых лекарственных средств и адаптогенных препаратов, необходимых для решения задачи сохранения здоровья населения – профилактики и лечения от сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний, реабилитации в послеоперационный период, адаптации к действию неблагоприятных факторов среды обитания, восстановления после тяжелых физических нагрузок и стимулирования деятельности нервной системы (Саратиков и др., 1970; Яковлев и др., 1991; Беспалов и др., 1999; Opletal e.a., 1997; Сейфулла, 1999; Плотников и др., 1999, 2001; Лекарства и БАД, 2003; Разина, 2006; Маслов и др. 2007; Васильев и др., 2008; Gaube e.a., 2008). ФЭС обладают также анаболическим эффектом и перспективны для Спорта высоких достижений и интенсификации животноводства (Сейфулла, 1999; Lafont & Dinan, 2003).

Продуцируемые экдистероид синтезирующими (ЭС) растениями целевые вещества применяются: а) в производстве новых фармпрепаратов от сердечно-сосудистых и раковых заболеваний; б) при разработке методов генотерапии (экдизон-индуцированные системы); в) в медико-биологических методах повышения работоспособности человека (адаптогены для спор-та, военной и классической медицины); г) в новейших биомедицинских и ветеринарных технологиях жизнеобеспечения и про-дуктивности животных. Выделяемые из фитомассы растений экдистероиды являются объектами и инструментами современных исследований по клеточной биологии и молекулярной генетике (экдизон-индуцированные системы экспрессии генов), биомеди-цинской химии; применяются в профессиональном спорте (препараты "Экдистен" и их аналоги на основе экдистерона), при разработке экологически безопасных инсектицидов (Saez et al., 2000; Wang et al., 2000; Dinan & Lafont, 2006).

Нигде в мире ЭС-растения не возделывают в масштабах, удовлетворяющих нужды фармацевтической промышленности. Много-численные скрининговые биохимические изыскания, предпринятые в различных географических регионах, показали, что для требуемого расширения сырьевой базы наиболее перспективны два сверхконцентратора экдистероидов – *R. carthamoides* и *S. coronata*. Концентрация экдистероидов в рассматриваемых видах в 10-100 тысяч раз превышает содержание их в других расте-ниях – достигая 0.5-1.5 % у *R. carthamoides*, 1.2-3.1 % у *S. coronata* в расчете на сухую массу (Растительные ресурсы, 1993; Тимофеев и др., 1998; Ануфриева и др., 1998; Володина, 2006). Содержание ФЭС в фитомассе *R. carthamoides* и *S. coronata* может превышать другие виды на 4-6 порядков (Растительные ресурсы, 1993). В настоящее время в 15 государствах проводятся работы по их интродукции, в т.ч. регионах Европейского Севера (Тимофеев, 2007).

Проблема познания управляющих факторов, регулирующих продуктивность и биосинтез ФЭС, весьма актуальна, но она не ре-шена – ни в теоретическом, ни практическом плане. Несмотря на способность к биосинтезу ФЭС у всех представителей мировой флоры, источниками могут служить только отдельные виды дикорастущих растений (Тимофеев, 2007). У традиционных, истори-чески давно возделываемых в сельском хозяйстве видов, биосинтез ФЭС блокируется на уровне генной экспрессии, причины ко-торых остаются неизвестными (Лэфон, 1998). Культивирование отдельных органов или тканей ЭС-растений методами биотехно-логии также сопровождается утратой способности к синтезу ФЭС (Ануфриева и др., 1998; Фитоэкдистероиды, 2003; Тимофеев, 2004). Химическими методами первичный синтез ФЭС не реализован и возможен только в отношении вторичных продуктов, пу-тем химической трансформации других экдистероидов, предварительно выделенных из тех же растений (Lafont & Dinan, 2003).

Нами выдвинута гипотеза, что жизнедеятельность ЭС-растений сопряжена с формированием микоризы, участвующей в биосинтезе и накоплении биологически активных веществ (ФЭС). Для симбиоза характерна тесная метаболическая интеграция с растением-хозяином, включающей образование общих путей биосинтеза и катаболизма различных веществ (Тихонович и Проворов, 2003).

Хотя известно о способности к микоризообразованию практически у всех наземных растений (Brundrett, 2002) (отсутствие мико-ризы является вторичным вследствие перехода к факультативности), она исследована только у 3 % (Barker e.a., 1998). В по-следнее десятилетие работы в этом направлении были расширены, однако чаще всего они носят общий описательный характер и не связаны ни с детальным исследованием сопряженного развития микоризы с растением-хозяином в онтогенезе в условиях естественной природной среды, ни с биосинтезом каких-либо биологически активных веществ.

Как указывается в 2-х новейших критических обзорах по микоризе, опубликованных в 2009-2010 гг., требуется переосмысление традиционных взглядов о микоризе (Smith e.a, 2009; Helgason & Fitter, 2010), чаще всего представленных как посредника в по-лучении питательных веществ из почвы, главным образом фосфора. Экспериментальные исследования обычно являются крат-косрочными, охватывающими лишь отдельные стадии роста и развития, часто у однолетних растений в искусственных емкостях, изолированных от естественной почвы и видового разнообразия гломусовых грибов в природной среде, в строго заданных ком-натных (тепличных) условиях, без учета специфики воздействия разнообразных природных факторов среды и ответа на них. Поэтому актуальным является изучение механизмов колонизации растений в онтогенезе микоризными грибами, специфики их взаимодействия с окружающей средой и сопряженного синтеза биологически активных веществ (Тихонович и Проворов, 2009).

В ходе предыдущих этапов исследований нами была установлена фундаментальная закономерность (Тимофеев, 2008-2009), что: а) биосинтез и накопление ФЭС находится в положительной корреляционной зависимости от ростовых процессов и вели-чины продуктивности надземных органов ЭС-растений; б) климатические условия Европейского Севера (низкая температура, длинный световой день и высокая относительная влаж-ность воздуха) благоприятны для формирования продуктивности и не лимитируют биосинтез и накопление ФЭС; г) жизнедеятельность изучаемых видов растений тесно связана с эндомикоризой – симбиотическими взаимоотношениями с гло-мусовыми грибами из рода *Glomus* (Glomeraceae: Glomeromycota).

Отсюда выдвинута гипотеза, что через механизмы, лежащие в основе эколого-биохимических взаимодействий везикулярно-арбускулярной микоризы и ЭС-растений, можно управлять продуктивностью, биосинтезом и накоплением ФЭС – регулируя био-логическими, технологическими или агрохимическими методами эффективность микробно-растительных взаимоотношений.

Состав и соотношение экидистероидов – важнейшая проблема качества лекарственных растений. Наряду с большим количеством экспериментально установленных фактов биологической активности экидистероидов, отмечается большое различие в дозах и направленности действий индивидуальных соединений. Имеются многочисленные примеры, когда высокая концентрация суммы экидистероидов не оказывает никакого воздействия на организм, а сами данные по физиологической активности экидистероидов неоднозначны (Lafont & Dinan, 2003; Федоров и др., 1997; Тимофеев, 2005). Дозы, вызывающие положительный эффект, могут различаться на несколько порядков – от сверхмалых доз, равных 0.02-0.035 мкг/кг/день (Тимофеев и Ивановский, 1996; Purser & Baker, 1999) – до очень больших концентраций, равных 5-20 мг/кг (Сыров и Курмуков, 1976; Тодоров и др., 2000).

Всего из растений мировой флоры на апрель 2010 года выделено более 440 индивидуальных экидистероидов (<http://ecdybase.org>), в т.ч. у *R. carthamoides* известно около 65, у *S. coronata* – более 20 экидистероидов (Тимофеев, 2009). Со-став мажорных (основных по массовой доле) ФЭС обоих видов одинаков, ими являются 20-гидроксиэкидизон (синонимы: экиди-стерон, 20-hydroxyecdysone; сокращенно 20E), инокостерон (inokosterone, In), экидизон (ecdysone, E) (Фитоэкидистероиды, 2003).

В целом активность экидистероидов различается на 6 порядков и простирается от 10⁻¹⁰ до 10⁻⁴ М (Harmatha & Dinan, 1997; Har-matha e.a., 2002; Odnokov e.a., 2002; Dinan, 2003). Биологическая активность 20-гидроксиэкидизона в биотестах высокая и равна 7.5 x 10⁻⁹ М, инокостерон сравнительно малоактивен – 1.1-2.0 x 10⁻⁷ М, экидизон является слабоактивным – 1.1 x 10⁻⁶ М (Dinan, 2003). Если исходить из соотношения активностей, inokosterone в 15 раз, а ecdysone в 148 раз менее активны, чем 20-hydroxyecdysone.

Исходя из прошлогодних результатов наших исследований (Научный отчет РФФИ-2008), количественный и качественный состав ФЭС (соотношение между высокоактивными и слабоактивными соединениями) в фитомассе ЭС-растений не постоянен и может меняться в широких пределах (десятки раз). Следствием изменчивости биохимического состава ФЭС в растениях может быть неоднозначное проявление биологической активности, что важно для их стандартизации с целью последующего использования в качестве лекарственных средств, или в молекулярной генетике в экидизон-индуцированных системах экспрессии генов (Тимофеев, 2006а).

Знание факторов, влияющих на качественный состав и изменчивость содержания действующих веществ в расте-ниях необходимо также для получения сырья, обогащенного высокоактивными составляющими – как с целью снижения затрат на химическую его переработку при получения продуктов высокой степени очистки, так и для оптимизации терапевтических доз в медицине и в наукоемких биотехнологических исследованиях экидистероидов (ЭС-переключатели генов).

Объекты

Исследования проводили на юго-востоке Архангельской области, входящей в подзону средней тайги. Для выполнения проекта, начиная с 1989 г., была создана исследовательская база из 12 агропопуляций изучаемых видов ЭС-растений в возрасте 1-21 лет, расположенных на основных почвах Европейского Севера, каждая на площади 1-4 га (62° с.ш., Котласский р-н).

Методы

В течение 2010 г. проведен широкий комплекс исследований. Работы проводили в полевых и лабораторных условиях, согласно общего плана. Использовали популяционные, модельные, анатомо-морфологические, микробиологические, биохимические, аг-рохимические, статистические методы исследований.

Применяли сочетание следующих методов научных исследований:

а) на уровне популяций – методы онтогенеза и методологические подходы симбиогенетики межродственных организмов (Ра-ботнов, 1983; Заугольнова и др., 1988; Тихонович и Прворов, 2003-2007);

б) на уровне индивидуальных растений – изучали рост, развитие, морфологическую структуру, продуктивность и минеральный состав фитомассы (Методические указания, 1986; Справочник, 1996);

в) при изучении характеристик микоризы использовали морфолого-анатомические методы (структура мицелия, ветвление, раз-меры и плотность гиф и везикул) – цифровой штангенциркуль ORION 862 IP 67, аналитические весы BP 221S с точностью 0,1 мг; цифровой фотоаппарат SAMSUNG OPS NV7);

г) при изучении внутреннего строения микоризы – микробиологические методы (окраска и идентификация гломусовых грибов через микроскопы БИОЛАМ-И, МИКМЕД-1 с увеличением в 150-600 раз: мацерация, делигнификация в 16 % КОН, экстракция при 100 С, окраска лактофенолом голубым и лактофенолом пикриновым в молочной кислоте) (Зольникова и Воробьев, 1992; Бетехтина, 2004);

д) при изучении биосинтеза экидистероидов – биохимические методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ), с компьютерной обработкой данных (Пунегов и Савиновская, 2001).

е) накопление экстрактивных веществ – методами фармакопеи (водная и спиртовая экстракция);

з) химсостав фитомассы и микоризы, образцы почв – общепринятыми методами.

Математическую обработку данных проводили стандартными методами статистики. Результаты

пересчитаны на сухое вещество. В экспериментах моделировали факторы биотического, абиотического и антропогенного воздействия, устанавливали критиче-ские и оптимальные режимы. Ответную реакцию микоризы (колониализация, рост, развитие и строение, биосинтез ФЭС) изучали круглогодично, как во время основных фаз развития растений – отрастания, стеблевания, бутонизации, цветения, плодоноше-ния, осенней вегетации, отмирания, так и во время фазы покоя и оттаивания почвы из-под снежного покрова.

В качестве стрессовых факторов исследовали воздействие низких и высоких температур, замораживание почвы до -15 С, почвы с уровнем кислотности от 4.1 до 7.4, переувлажнение и засуху в почвенном слое, внесение высоких и низких доз азота и фос-фора, 2 вида фунгицида (Радомил и Танос). В качестве технологических факторов – внесение 3 видов органических (активный ил, навоз, компост) и 6 видов минеральных удобрений, междурядные обработки прикорневой зоны, различные режимы отчуж-дения биомассы (0-30-50-80 %, 1 или 2х2 раза в год). В качестве регуляторов роста испытывали 2 вида фитогормонов (гиббе-реллин и гетероауксин). Реакцию эндомикоризы учитывали по обилию грибных структур, изменчивости развития мицелия и ве-зикул, уровню биосинтеза ФЭС.

Результаты

По результатам комплексных исследований впервые установлены природные закономерности, которые позволяют управлять длительностью жизни, ростом и развитием, формированием продуктивности, биосинтезом и накоплением высокоактивных дей-ствующих веществ в фитомассе экидистероид синтезирующих лекарственных растений – в зависимости от возраста, условий ок-ружающей среды, антропогенных и технологических факторов культивирования.

Выявлена тесная метаболическая интеграция ЭС-растений с эндомикоризой (гломусовыми грибами), установлены регуляторные механизмы, лежащие в основе их эколого-биохимических взаимодействий – с образованием общих путей биосинтеза и катабо-лизма органических веществ. Экспериментально показано, что контролируя эффективность симбиоза везикулярно-арбускулярной микоризы и ЭС-растений биологическими, технологическими или агрохимическими методами – можно управлять продуктивностью, биосинтезом и накоплением биологически активных веществ в лекарственном сырье.

Открыты корреляционные связи между действием стрессовых факторов и биосинтезом экидистероидов в эндомикоризе. Установ-лены режимы биотических, абиотических и технологических факторов культивирования, не влияющие отрицательно на мик-робно-растительные взаимодействия, формирование продуктивности и биосинтез ФЭС. Показана возможность целенаправлен-ного управления формированием продуктивности популяций через использование регуляторов роста и развития – за счет рас-пределения и концентрирования органо-минеральных веществ по различным органам.

Теоретически обоснована и экспериментально доказана в эколого-биохимических взаимоотношениях агропопуляций ЭС-растений с беспозвоночными, имеющими гормональные рецепторы экидистероидов, зависимость биологической активности ФЭС от его качественного состава.

Вид конечной научной продукции. Проект является фундаментальным научным исследованием; конечной продукцией вы-ступают новые теоретические знания и экспериментальные данные, используемые при создании новых технологий и продуктов, в прикладных разработках для живых систем, направленные на сохранение жизни и здоровья человека и животных.

Впервые в мировой практике установлены природные механизмы и закономерности, лежащие в основе биосинтеза ценных био-логически активных веществ – экидистероидов. Разработаны научные основы создания и управления функционированием план-таций лекарственных растений в промышленных масштабах, связанные с биосинтезом ФЭС, сбалансированных по количеству, качеству, антропогенной нагрузке и широко востребованных в самых различных отраслях народного хозяйства. Показаны методы управления продуктивностью, биосинтезом, качественным составом ФЭС и реализацией потенциала биологи-ческой активности ЭС-растений в искусственных экосистемах через формирование и регулирование микробно-растительных взаимоотношений симбиотических структур.

Проект имеет множество прикладных приложений для инновационного развития экономики РФ, области использования которых перечислены ниже – в виде публикаций в ведущих научных журналах по списку ВАК, сборниках научных трудов, докладов на Международных конференциях и Всероссийских симпозиумах, на Интернет-сайте <http://leuzea.ru>

Значимость результатов для народно-хозяйственного комплекса РФ

Исследования по проекту соответствуют приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы в области живых систем (утвержденных Президентом РФ 21 мая 2006 г) – это управляемый биологический син-тез лекарственных средств и биотехнологические процессы производства лекарственного сырья, новые методы контроля их ка-чества, биологические средства питания и защиты животных и т.д.

Результаты получены впервые в результате 20-летних исследований, являются абсолютно новыми и соответствуют мировому уровню. Области использования – биомедицинские и ветеринарные технологии иммунокоррекции и генотерапии; системы жиз-необеспечения и защиты человека; производство новых фармакологических препаратов для повышения работоспособности че-ловека и его жизнедеятельности в экстремальных условиях; производство препаратов и пищевых добавок с высокими функцио-нальными и потребительскими характеристиками; использование в составе кормовых добавок для ускорения синтеза белка, снижения смертности и повышения продуктивности сельскохозяйственных животных.

Результаты могут быть использованы для комплексного инновационного развития экономики

Архангельской области на межот-раслевоом уровне: а) создание собственной возобновляемой сырьевой базы ЭС-растений в АПК; б) практическое использование синтезированной продукции в регионе (медицина военная и традиционная, спорт, фармацевтическая промышленность, живот-новодство); в) поставки полученной продукции на российский и международный коммерческий рынок.

Полученные результаты имеют особую практическую значимость для реализации долгосрочных задач нацпроекта "Здоровье" – снижения заболеваемости и смертности трудоспособного населения от сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний (Вязьмин и др., 2008), повышения адаптации и резистентности организма к тяжелым природно-климатическим условиям Севера (Яковлев и др., 1991). Данные по качественному и количественному составу ФЭС могут быть использованы при идентификации и комплексной оценке подлинности фармпрепаратов и БАДов из растений, введенных в официальную фармакопею, или же их фальсификации.

Особую ценность имеют результаты по микоризе – после дополнительных исследований выявленная нами возможность массо-вого их производства в симбиозе с ЭС-растениями позволяет использовать их с любыми сельскохозяйственными, комнатными, садовыми и декоративными культурами, картофелем и овощами – для стимулирования роста и формирования продуктивности, защиты от патогенов.

Представление результатов исследований

Всего за 3 года ведения Проекта (2008-2010 гг.) результаты исследований представлялись в виде докладов на 10 научных мероприятий (Международные и Всероссийские конференции и симпозиумы: 2008 год – Сыктывкар, Мичуринск, Уфа, Белгород; 2009 год – Барнаул, Москва, Белгород; 2010 год – Мичуринск, Новосибирск, Санкт-Петербург).

В рамках за 2010 год участие в 4-х научных мероприятиях: 1) на IX Междунар. научно-методической конференции «Интродук-ция нетрадиционных и редких растений» (г. Мичуринск, Наугоград РФ; 21-25 июня 2010 г.); 2) на VI Всерос. конференции «Химия и технология растительных веществ» (Санкт-Петербург, Институт химии РАН, 14-18 июня 2010 г.); 3) на Симпозиуме «Раз-работка лекарственных и физиологически активных соединений на основе природных веществ» (СПб-Репино, Некоммерческое партнерство институтов РАН «Орхимед», 16-18 июня 2010 г.); 4) на II Всерос. научно-практич. конф. ботаников «Перспективы развития и проблемы современной ботаники» (Новосибирск, Центр. Сиб. БотСад СО РАН, 05-08 октября 2010 г.):

Всего за 3 года по материалам исследований Проекта опубликовано 28 научных публикаций, в т.ч. 6 статей в рецензируемых научных журналах по списку ВАК (см. прил. 1). По материалам исследований 2010 года подготовлено и сдано в печать 16 науч-ных публикаций, из которых опубликованы 16, в т. ч. 3 статьи в рецензируемых научных журналах по списку ВАК

Открыт доступ к результатам законченных экспериментальных исследований через Интернет-сайт <http://leuzea.ru>. Цель – ин-формация и пропаганда широких слоев населения и бизнес-структур по возможностям народно-хозяйственного и коммерческо-го использования результатов научных исследований, продвижение их в инновационную сферу, для разработки прикладных технологий на стыке биологии, сельского хозяйства, медицины и фармацевтики

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТ, ВЫПОЛНЕННЫХ В 2010 ГОДУ

Изучение процессов, лежащих в основе природного биосинтеза и регуляции уровней накопления вторичных метаболитов в ле-карственных растениях, а также выявление факторов, регулирующих максимальную их продуктивность с высоким содержанием действующих веществ в исходном сырье, является актуальной как в научном плане, так и в прикладном для народного хозяйст-ва и важно для управления потенциалом экономически важных видов в условиях промышленно возделываемых плантаций.

По результатам предыдущих исследований (Научные Отчеты за 2008 и 2009 год) нами было установлено, что:

- а) биосинтез ФЭС находится в положительной корреляционной зависимости от ростовых процессов и величины продуктивности надземных органов ЭС-растений;
- б) климатические условия Европейского Севера (низкая температура, длинный световой день и высокая относительная влаж-ность воздуха) благоприятны для формирования продуктивности и не лимитируют биосинтез и накопление ФЭС;
- г) жизнедеятельность изучаемых видов растений тесно связана с эндомикоризой – симбиотическими взаимоотношениями с гло-мусовыми грибами из рода *Glomus* (Glomeraceae: Glomeromycota).

Отсюда проверяли гипотезу, что через механизмы, лежащие в основе эколого-биохимических взаимодействий везикулярно-арбускулярной микоризы и ЭС-растений, можно управлять продуктивностью, биосинтезом и накоплением ФЭС – регулируя био-логическими, технологическими или агрохимическими методами эффективность микробно-растительных взаимоотношений.

В экспериментах моделировали факторы биотического, абиотического и антропогенного воздействия, устанавливали критиче-ские и оптимальные режимы. Ответную реакцию микоризы (колонизация, рост, развитие и строение, биосинтез ФЭС) изучали круглогодично, как во время основных фаз развития растений – отрастания, стеблевания, бутонизации, цветения, плодоноше-ния, осенней вегетации, отмирания, так и во время фазы покоя и оттаивания почвы из-под снежного покрова.

варианте с гиббереллином наибольшее содержание сахаров наблюдалось в розеточных листьях *R. carthamoides*, которое возросло к фазе цветения от 9.5 до 14.5 % (в контроле 7.0 и 11.1 %).

При использовании гиббереллина выход водных экстрактов был наибольшим во всех фазах развития (44-47 против 33-39 % в контроле). Одновременно, и уровень накопления ФЭС во взрослых розеточных листьях был выше контроля – 0,23 против 0,17 %. В стеблевых листьях генеративных побегов влияние гиббереллина на содержание сахаров не выявлено, а уровень ФЭС в концентрирующих их элементах (семенах) был ниже контроля – 0,26 от 0,38 %.

Таким образом, при оценке действия разных видов фитогормонов по конечному результату, гиббереллин имел преимущество как перед контролем, так и перед гетероауксином. В расчете на 1 га площади за 2 укоса преимущество гиббереллина по выходу экстрактивных веществ из лекарственного сырья из розеточных листьев составило в 1.27 раза (2752 кг против 2156 кг при водной экстракции).

5. Выполнена оценка коррелирующих связей между качественным составом ФЭС в лекарственном сырье и проявлением их биологической активности; установлена зависимость от различных факторов

Экспериментально показано в гормональных взаимодействиях агропопуляций ЭС-растений с беспозвоночными (которые содержат рецепторы ФЭС), что проявление биологической активности ФЭС зависит от состава индивидуальных соединений в фитомас-се, и что менее активные экидистероиды в повышенных количествах могут блокировать физиологическое действие более активных соединений.

Установлено, что изменчивость качественного состава ФЭС в растениях (соотношение между высокоактивными и малоактивными соединениями) связано с развитием их во время онтогенеза и вегетации, воздействием на популяцию стрессовых экологических или антропогенных факторов. Ответная реакция корреляционно прослеживается также и через эндомикроизу.

Теоретически обосновано, что присутствие в лекарственном сырье низкомолекулярных пептидов, стрессовых белков, производных каротина (цис-ретиноевой кислоты) – усиливает активность ФЭС через кооперативное взаимодействие с экидистероидным комплексом рецептора (EcR/USP или EcR/RxR), активируя или репрессируя его целевые функции. Результаты опубликованы на русском и английском языке – в журнале Сибирский экологический журнал, Contemporary Problems of Ecology (2009, NN 5-6).

Литература

1. Barker S.J., Tagu D., Delp G. Update on Plant-Microbe Interactions Regulation of Root and Fungal Morphogenesis in Mycorrhizal Symbioses // *Plant Physiol.*, 1998, Vol. 116. – P. 1201-1207
2. Brundrett M.C. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants // *New Phytologist*, 2002. Vol. 154, Is 2. – P. 275-304.
3. Dinan L. Ecdysteroid structure-activity relationships // *Studies in Natural Products Chemistry*, 2003; Vol. 29. – P. 3-71.
4. Dinan L., Lafont R. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals (Review) // *J Endocrinology*, 2006, Vol. 191. – P. 1-8.
5. Gaube F., Wolf S., Pusch L., Werner U., Kroll T.C., Schrenk D., Hartmann R.W., Hamburger M. Effects of *Leuzea carthamoides* on Human Breast Adenocarcinoma MCF-7 Cells Determined by Gene Expression Profiling and Functional Assays // *Planta Med.*, 2008, Vol. 74, No 14. – P. 1701-1708.
6. Harmatha J., Dinan L. Biological activity of natural and synthetic ecdysteroids in the BII bioassay // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1997. N 35. – P. 219-225
7. Harmatha J., Dinan L., Lafont R. Biological activities of a specific ecdysteroid dimer and of selected monomeric structural analogues in the B(II) bioassay // *Insect Biochem Mol Biol.*, 2002. Vol. 2, N 2. – P. 181-185.
8. Helgason T., Fitter A.H. Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota) // *Journal of Experimental Botany*, 2010. Vol. 60, Is. 9. – P. 2465-2480.
9. Lafont R., Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update // *Journal of Insect Science*, 2003. V. 3; N 7. – 30 pp.
10. Odnokov V.N., Galyautdinov I.V., Nedopekin D.V., Khalilov L.M., Shashkov A.S., Kachala V.V., Dinan L., Lafont R. Phytoecdysteroids from the juice of *Serratula coronata* L. (Asteraceae) // *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002. Vol. 32, N 2. – P. 161-165
11. Opletal L., Sovova M., Dittrich M., Solich P., Dvorak J., Kratky F., Cerovsky J., Hofbauer J. Phytotherapeutic aspects of diseases of the circulatory system. 6. *Leuzea carthamoides* (Willd.) DC: The status of research and possible use of the taxon [Review]. *Ceska a Slovenska Farmacie*, 1997. V. 46 (6). – P. 247-255.
12. Saez E., Nelson M. C., Eshelman B., Banayo E., Koder A., Cho G. J., Evans M. Identification of ligands and coligands for the ecdysone-regulated gene switch // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, N. 97. – P. 14512-14517.
13. Smith F.A., Grace E.J., Smith S.E. More than a carbon economy: nutrient trade and ecological sustainability in facultative arbuscular mycorrhizal symbioses // *New Phytologist*, 2009. Vol. 182, Is 2. – P. 347-358.
14. Wang S., Ayer S., Segraves W.A., Williams D.R., Raikhel A.S. Molecular determinants of differential ligand sensitivities of insect ecdysteroid receptors // *Mol. Cell. Biol.*, 2000, N. 20. – P. 3870-3879.
15. Ануфриева Э.Н., Володин В.В., Носов А.М., Гарсия М., Лафон Р. Состав и содержание экидистероидов в растениях и культуре ткани *Serratula coronata* // *Физиология растений*, 1998. Т. 45; N 3. – С. 382-389.
16. Бетехтина А.А. Эндомикориза травянистых растений: распространенность и экологическое значение: Автореф. дис...канд. биол. наук. – Екатеринбург, Ин-т экологии растений и животных УрО РАН, 2006. – 23 с.
17. Государственная фармакопея СССР. Издание IX, X, XI (в 2-х т.). – М.: Медицина, 1961; 1968; 1987; 1990.
18. Государственный реестр лекарственных средств (Лекарственные растения и сырье). – М., 1995; 1998. – С. 353.

19. Заугольнова Л.Б., Жукова А.А., Комаров А.С., Смирнова О.В. Ценопопуляции растений (очерки популяционной биологии). – М.: Наука, 1988. – 184 с.
20. Зольникова Н.В., Воробьев Н.М. Методы исследования грибов, образующих с растениями микоризу арбускулярно-везикулярного типа. – СПб, ВНИИ с.-х.микробиологии, 1992. – 44 с.
21. Интродукция *Serratula coronata* L. на Европейском Северо-Востоке (Мишуров В.П., Зайнуллин В.Г., Рубан Г.А., Савиновская Н.С., Пунегов В.В., Башлыкова Л.А.). – Сыктывкар, Коми научный центр УрО РАН, 2008. – 192 с.
22. Катенин А.Е. Микориза растений Северо-Востока Европейской части СССР. – Ленинград, Лен. отд-е "Наука", 1972. – 140 с.
23. Лафон Р. Фитоэкидистероиды и мировая флора: Разнообразие, распространение, биосинтез и эволюция // Физиология растений, 1998, Т. 45; № 3. – С. 326-346.
24. Лекарства и БАД в спорте: Практическое руководство для спортивных врачей, тренеров и спортсменов / Под общей ред. Сейфулла Р.Д. и Орджоникидзе З.Г. – М.: Литтерра, 2003. – 320 с.
25. Лобакова Е.С. Ассоциативные микроорганизмы растительных симбиозов: Автореф. дис...д-ра биол. наук. – М.: МГУ, 2004. – 287 с.
26. Маслов Л.Н., Гузарова Н.В. Кардиотропные и антиаритмические свойства препаратов *Leuzea carthamoides*, *Aralia mandshurica*, *Eleutherococcus senticosus* // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2007, Том 70; № 6. – С. 48-54.
27. Методические указания по селекции многолетних трав: Фенологические наблюдения. Оценка селекционного материала (структура урожая). – М.; ВНИИ кормов им. В.Р. Вильямса, 1985. – С. 90-103.
28. Научно-прикладной справочник по агроклиматическим ресурсам СССР (ежегодные данные). Архангельская область. – Ар-хангельск, Северное территориальное управление по гидрометеорологии и мониторингу окружающей среды, 1992-1996. – 237 с.
29. Некратова Н.А. Изучение ценокомплексов дикорастущих сырьевых растений как одна из задач ботанического ресурсове-дения [на примере *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin] // Растительные ресурсы, 1992. Т. 28; Вып. 2. – С. 1-13.
30. Плотников М.Б., Алиев О.И., Васильев А.С., Маслов М.Ю., Чернышева Г.А., Краснов Е.А., Зибарева Л.Н. Гемореологическая активность экстрактов из надземной части *Lychnis chaldedonica* L. и *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin при эксперимен-тальном инфаркте миокарда // Растительные ресурсы, 1999. Т. 35; Вып. 1. – С. 103-107.
31. Плотников М.Б., Алиев О.И., Васильев А.С., Маслов М.Ю., Дмитрук С.Е., Краснов Е.А. Влияние экстракта левзеи сафлоро-видной на реологические свойства крови у крыс с артериальной гипертензией // Экспериментальная и клиническая фар-макология, 2001. Т. 64; № 6. – С. 45-47.
32. Положий А.В., Некратова Н.А. Рапонтник сафлоровидный – *Rhaponticum carthamoides* (Willd) Iljin // Биологические особен-сти растений, нуждающихся в охране. – Новосибирск, 1986. – С. 198-226.
33. Постников Б.А. Маралий корень и основы введения его в культуру. – Новосибирск, СО РАСХН, 1995. – 276 с.
34. Проворов Н.А. Эволюция микробно-растительных симбиозов: филогенетические, популяционно-генетические и селекцион-ные аспекты // Автореферат дис... доктора биол. наук. Санкт-Петербург, РСХА, 2009. – 78 стр.
35. Пунегов В.В., Савиновская Н.С. Метод внутреннего стандарта для определения экидистероидов в растительном сырье и ле-карственных формах с помощью ВЭЖХ // Растительные ресурсы, 2001. Том. 37; Вып. 1. – С. 97-102.
36. Работнов Т.А. Фитоценология. – М.: МГУ, 1983. – 296 с.
37. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Т. 7. Сем. Asteraceae. – СПб.: Нау-ка, 1993. – С. 161-163.
38. Саратиков А.С., Краснов Е.А., Шадрин Г.Д., Зотова М.И., Нехода М.Ф, Аксенова Р.А., Алексеева Л.П. Химико-фармакологическое исследование корней левзеи сафлоровидной // Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук. Вып. 2. – Новосибирск: Наука. Сиб. отд-е, 1970, № 10. – С. 88-95.
39. Сейфулла Р.Д. Спортивная фармакология. – М.: Спорт-Фарма Пресс, 1999. – 120 с.
40. Справочник лаборанта-химика по анализу кормов (Под ред. Разумова В.А.). – М.: Россельхозиздат, 1996. – 304 с.
41. Сыров В.Н., Курмуков А.Г., Об анаболической активности фитоэкидизона-экидистерона, выделенного из *Rhaponticum car-thamoides* (Willd.) Iljin // Фармакология и токсикология, 1976, №6. – С. 690-693.
42. Тимофеев Н.П. Возраст и динамика плотности агропопуляций *Rhaponticum carthamoides* и *Serratula coronata* (Asteraceae) на европейском Севере // Растительные ресурсы, 2005. Том 41, № 3. – С. 1-14.
43. Тимофеев Н.П. Достижения и проблемы в изучении биологии лекарственных растений *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin и *Serratula coronata* L. (Обзор) // Сельскохозяйственная биология. Серия "Биология растений", 2007, № 3. – С. 3-17.
44. Тимофеев Н.П. Достижения и проблемы в области изучения, использования и прогнозирования биологической активности экидистероидов (Обзор) // Бутлеровские сообщения, 2006а. Том 8, № 2. – С. 6-34.
45. Тимофеев Н.П. Исследования по экидистероидам: Использование в медицине, Интернет-ресурсы, источники и биологиче-ская активность // Биомедицинская химия, 2004а. Том. 50; № S1. – С. 133-152.
46. Тимофеев Н.П. Накопление и изменчивость содержания действующих веществ (экидистероидов) в лекарственном сырье левзеи сафлоровидной // Сельскохозяйственная биология. Серия "Биология растений", 2009а, № 1. – С. 106-117.
47. Тимофеев Н.П. Продуктивность и динамика содержания фитоэкидистероидов в агропопуляциях *Rhaponticum carthamoides* и *Serratula coronata* (Asteraceae) на Европейском Севере // Растительные ресурсы, 2006б. Т. 42; Вып. 2. – С. 17-36.
48. Тимофеев Н.П. Экологические взаимоотношения агропопуляций экидистероид содержащих растений *Rhaponticum car-thamoides* (Willd.) Iljin и *Serratula coronata* L. с насекомыми-фитофагами // Сибирский экологический журнал, 2009б, Т. 16, № 5. – С. 765-780.
49. Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиогенетика микробно-растительных взаимодействий //