

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования**

**«ВЯТСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

**А.А. Ивановский, Н.П. Тимофеев,
С.Н. Копылов, Е.Ю. Тимкина**

ЭКДИСТЕРОИДЫ

Ивановский А.А., Тимофеев Н.П., Копылов С.Н., Тимкина Е.Ю. Экдистероиды: Учебно-методическое пособие. - Киров: ФГБОУ ВПО Вятская ГСХА, 2012. - 45 с.

Рецензенты:

Ермолина С.А. – зав. кафедрой физиологии и биохимии Вятской ГСХА доктгор ветеринарных наук, доцент;

Шуплецова О.Н. – старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений и микроорганизмов НИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого, кандидат биологических наук, доцент.

Учебно-методическое пособие рассмотрено и утверждено к изданию методической комиссией факультета ветеринарной медицины Вятской государственной сельскохозяйственной академии (протокол № 71 от 20.06.2012 г.).

В учебно-методическом пособии проанализирована биологическая активность экдистероидов, исходя из базы данных структурного разнообразия и ключевых моментов взаимодействия их с биологическими объектами. Показаны современные достижения в области изучения активности отдельных соединений методами биотестирования, прогнозирования активности программными средствами. Рассмотрены механизмы действия и условия, необходимые для проявления фармакологической активности экдистероидов в медицине и ветеринарии.

Учебно-методическое пособие предназначено для научных и практических работников, студентов высших учебных заведений, обучающихся по биологическим специальностям, в том числе, по специальности «Ветеринария».

© ФГБОУ ВПО Вятская ГСХА, 2012

© Ивановский Александр Александрович, Тимофеев Николай Петрович, Копылов Сергей Николаевич, Тимкина Елена Юрьевна, 2012

Оглавление

Введение	4
1. Механизмы действия экдистероидов	7
2. Фармакологическое использование	9
3. Экдистероиды в биологических тестах	15
4. Структурное разнообразие экдистероидов	18
5. Молекулярные механизмы действия экдистероидов	21
5.1. Особенности лиганд-рецепторного взаимодействия экдистероидов	21
5.2. Конструирование оптимизированных моделей рецепторов	25
6. Изучение действия экдистероидов в медицине и ветеринарии	27
6.1. Различия в активности экдистероид содержащих составов	27
6.2. Препараты Биоинфузин и ФАНТ	30
6.3. Кофактор активности	32
6.4. Взаимодействия со стрессовыми белками	34
6.5. Эффекты с трансмембранными рецепторами	35
Заключение	38
Список литературы	41

те (www.sci.gov.com)), эти вещества во многих отношениях еще остаются до конца непознанными и окутанными множеством легенд. По механизмам действия экдистерондов много неизученного, особенно по молекулярным аспектам. Известная науке информация накладывается на добросовестные заблуждения и предубеждения отдельных исследователей, что выражается в экстраполяции отдельных фактов проявления активности некоторых из этих соединений во всеобщую закономерность. Поступление экдистерондов в организм с рационом питания еще не означает автоматического проявления их активности; примерно из 20 тысяч потенциальных растительных источников (5% растений с повышенным содержанием фитозкдистерондов из мировой флоры) реально используются не более двух десятков видов.

Имеются многочисленные примеры, когда высокая концентрация экдистерондов в пище не оказывала никакого воздействия на человека. Например, можно упреждать сколь угодно много зеленого салата из листьев шпината огородного (*Spinacia oleracea*), молодых побегов серпухи венценосной (*Serratula coronata*) или съедобных видов папоротников (*Polypodium*), не испытав при этом никакого влияния экдистерондов, содержащихся в фитомассе. И наоборот, достаточно употребить 10-50 мг побегов другого продуцента экдистерондов – левзеи сафлоровидной (*Rhaponticum* или *Leuzea carthamoides*), чтобы испытать на себе весь спектр физиологических воздействий, описанных в литературе.

Познание молекулярных механизмов проявления активности экдистерондов – одно из главных направлений биомедицинской науки, которое в сочетании с современными методами биотестирования и компьютерного объемного моделирования пытается объяснить ключевые моменты взаимодействия экдистеронда-лиганда в его рецептора в связке «структура-активность», предсказать оптимальную конфигурацию и конформационное состояние идеального соединения с целью осуществить искусственный химический синтез составов, способных к проявлению высокой биологической активности в живых системах. Разработка теоретических основ молекулярных механизмов активации экдистерондов в живых системах, исходя из результатов биотестирования усовершенствованных лигандов и их рецепторов, важно для прикладного использования этих соединений в качестве фармацевтических, инсектицидных или противопаразитарных средств.

1. Механизмы действия экдистерондов

Более чем полвека прошло с тех пор, как экдистеронды были впервые изолированы, а затем идентифицированы из кулолок тутового шелкопряда *Bombyx mori*. В растениях эти вещества впервые обнаружены примерно сорок лет назад. Хотя значительный прогресс был достигнут в понимании того, как экдистеронды регулируют развитие членистоногих, их роль в мире животных и растений все еще непонятна. Несмотря на значительные усилия по исследованию, множество открытых вопросов по зоо- и фитозкдистероидам остаются, особенно относительно механизмов проявления биологической активности и их роли в природных взаимоотношениях между растениями и фитофагами, млекопитающими и паразитическими организмами.

Экдистеронды могут влиять на функции жизнедеятельности практически всех классов организмов, но вопрос о роли их в живой природе до сих пор остается открытым. Дополнительно известно лишь то, что одним из главных их представителей, физиологически активный *20-hydroxyecdysone*, и некоторые другие (*makisterone C*, *25-deoxyecdysone*) являются истинными гормонами линьки для членистоногих (насекомые и ракообразные) в концентрациях $10^{-7} \dots 10^{-9}$ М (молярная масса) и инициируют превращения, происходящие в эмбриогенезе и ходе развития личинки с метаморфозом до взрослого насекомого. Периодические линьки вызваны пиками экдистерондов, синтезируемых в проторакальных железах под воздействием нейропептидов, вырабатываемых в мозге насекомых. Аналогичные физиологические действия экдистерондов предполагаются в отношении моллюсков, гельминтов и кольчатых червей. Некоторые морские организмы (например, гидрии и кораллы) секретируют весьма высокие уровни экдистерондов, что интерпретируется исследователями как средство защиты от нападения хищников. Например, выброс экдистерондов *Euspongia litovale* против десятиного ракообразного *Carcinus maenas* вызывает нарушение гормонального равновесия и отпугивание последнего.

Что же касается человека и других млекопитающих, при сочетании определенных условий экдистеронды могут обладать гормоно- или витаминopodobными действиями, но не являются при этом истинными эндогенными гормональными сущностями. В большинстве случаев они передаются от растений, где осуществляется их биосинтез, нижеследующим звеньям пищевой цепочки. Будучи введенным в организм человека и теплокровных животных, экдистеронды распространяются в потоке крови по внутренним органам и вызывают быстродействующие, наступающие в течение нескольких минут, а также длительные, продолжающиеся множество суток, эффекты. При внутримышечной инъекции

рующих средств при умственном и физическом утомлении, повышенной работоспособности, ослабления функций разных органов. Могут применяться для заживления ран и язв, лечения ожогов.

В спортивной и военной медицине препараты на их основе служат для адаптации и повышения работоспособности здорового человека в условиях лимитирующих факторов, в т.ч. преодоления чрезвычайных физических и психических нагрузок.

В нетрадиционной медицине в наибольшей степени распространено профилактическое использование экистероидов в качестве адаптогенных, анаболических, антидепрессивных, гемореологических, ноотропных и противоопухолевых средств. Не являясь истинными эндогенными гормональными веществами, при сочетании определенных условий экистероиды могут обладать гормоноподобным витаминоподобным действием. Фармацевтическое использование регуляторов на основе экистероидов содержащих папоротников и цветковых растений, грибов и насекомых уходит корнями в глубины племенных культовых обрядов аборигенов, населяющих древнюю Русь, Сибирь, Китай и Монголию, Северную Америку, Южную Америку, Индию. Важнейшие их представители, установленные современными методами исследований как сверхпродуценты фитозэкистероидов, были известны еще в глубокой древности. В представлении многих народов они были связаны с суевериями и легендами. Наиболее известные их представители:

Polyporus umbellatus (Eichhase) – китайский гриб-трутовик, содержащий микозэкистероиды *polyporasterone A* и *G*. Известны древние китайские источники об использовании этого вида в качестве «лекарства от крестьян» еще за 2000 лет до нашей эры. Современные исследования ютэйских ученых подтверждают значительную противораковую активность *P. umbellatus*, эффективность торможения им развития опухолей.

Bombux mori L. – тутовый шелкопряд, личинки насекомых 4-5-летнего возраста содержат зоозэкистероиды *20-hydroxyecdysone* и *ecdysone*, а также соединения вторичного значения – *makisterone A*, *makisterone C*, *2-deoxy-20-hydroxyecdysone*, *3-dehydroecdysone*, *3-epi-ecdysone*, *3-epi-ecdysone*, *3-epi-2-deoxyecdysone*, *3-epi-22-deoxy-20-hydroxyecdysone*, *3-epi-22-deoxy-20.26-dihydroxyecdysone*, *3-epi-22-deoxy-16β,20-dihydroxyecdysone*.

Polypodium – папоротники, содержат фитозэкистероиды *ponasterone*, *20-hydroxyecdysone*, *pterosterone*, *makisterone*. Использовались в древней Руси в качестве магических растений, озаряющих интуицию, прогоняющих кошмары и злую силу.

Система корневищ папоротника *P. lepidoptera*, произрастающего в лесах Южной Америки, используется акалогичным образом перуанскими племенами в ритуальных обрядах.

Pfaffia – сума, или бразильский женьшень, корневища содержат *20-hydroxyecdysone*. Известен у народностей Южной Америки как «рага todo», или как «лекарство от всех вещей»; растение знаменито своими адаптогенными и тонизирующими свойствами. Впервые описан европейцами в 1656 году и был назван «бразильским женьшенем» из-за подобия его действия американо-азиатскому женьшеню (*Panax spp.*). *Ipomoea* – вьюнок пурпурный, синтезирует редкие фитозэкистероиды *muristerone*, *kaladasterone*, а также *calonysterone*, *makisterone*. Используются эндемичные виды, произрастающие на южных склонах Гималайских гор. Существует культ регионального использования семян некоторых видов аборигенами Северной Америки в качестве психозомиметических средств, физиологический эффект которых обусловлен совместным действием экистероидов и галлоциногенных алкалоидов.

Achyrocline bidentata и *A. aspera* – соломоцвет двузубый и соломоцвет шершавый, содержат *20-hydroxyecdysone*, *cyasterone*, *isocyasterone*, *senyosterone*. Китайское название первого вида означает «превосходное лекарственное средство». Присутствует во многих сохранившихся формулах врачей различных императорских династий Китая, Японии, Вьетнама как тонизирующее, усиливающее биологическое начало и эффективность действия других лечебных компонентов средство.

Второй вид, *A. aspera*, у аборигенов Индии почитался как растение, приносящее удачу и отпугивающее ядовитых насекомых, змей. Использовался в народной медицине как отхаркивающее, жаропонижающее, бактерицидное и диуретическое средство, а также в качестве снадобья от малярии в почках, зубной боли и бессонницы, водобоязни, кишечных расстройств и для снятия раздражительности.

Taxus baccata – тис европейский, синтезирует *ponasterone*, *20-hydroxyecdysone*, *makisterone*, *dachryhainosterone*, *taxisterone*. Наиболее известен как священное дерево древних кельтов дохристианской эры. Символизировал вечную жизнь из-за его исключительной жизнеспособности и долговечности (продолжительность жизни отдельных особей может достигать более 2000 лет). Многие тисовые заповедники связаны с христианскими святынями на Британских островах, Польше, Венгрии, Украине, Кавказе.

Vitex – витекс, или священные деревья; содержат экистероиды *20-hydroxyecdysone*, *canescensterone*, *calonysterone*, *scabrasterone*, *calonysterone*, *24-epi-abuasterone* и т.д. Некоторые виды из этого рода использовались в древних

храмах Западной Индии более чем 2000 лет назад. Обладают тонизирующим, успокаивающим, нормализующим половую функцию действием. Известны способностью восстанавливать баланс женских половых гормонов, регулировать менструальный цикл, снимать тяжесть предменструального синдрома и течения климакса.

Leuzea или *Rhaponticum carthamoides* – левзея сафлоровидная, синтезирует более 50 индивидуальных фитостероидов, в т.ч. такие высокоактивные соединения, как *rapisterone D*, *dactylochinsterone*, *24(28)-dehydro-makisterone A*, *22-benzoate-ecdysterone*, *5-deoxy-kaladasterone*, *20-hydroxyecdysone (ecdysterone)*, *polypodine B*, *ajugasterone C*, *makisterone A* и *C. integristerone*, *leuzeasterone*, *carthamasterone*, *coronolasterone* и т.д.

R. carthamoides является «легендой древней восточной медицины», у юрских жителей Сибири и Монголии использовался в качестве источника духовной и физической силы. Этноботаническое начало растений рода *Rhaponticum* уходит корнями в глубины древней восточной медицины, где оно использовалось под названием *Lou lu* и *Lou sao*. Фармакологическое использование препаратов на основе *R. carthamoides* не прерывалось со времен древней китайской, тибетской и монгольской медицины до наших дней. Известно, что в IX веке арабские купцы вывозили корневища растений из Китая в страны Ближнего Востока. Выращивание растения в практических целях практиковалось в аптекарских садах X века.

У русских переселенцев в XI-XII веке на Алтае ходило поверье о чудодейственной силе этого растения, которое лечит от 14 недугов и возвращает молодость. Народная мудрость гласила, что сила растения копится в неокостенелых рогах-пантах маралов. Поэтому у аборигенов существовал обычай, по которому молодой юноша, перед тем как жениться, должен вначале добыть панты (рога) горного марала (*Cervus elaphus sibiricus*).

Основными направлениями использования *R. carthamoides* в современной врачебной практике являются:

- приобретение физической выносливости, стимулирование сексуальной активности, тонизирующее, общеукрепляющее, ранозаживляющее, противовоспалительное, анаболическое;
- при заболеваниях нервной и сердечно-сосудистой систем, гемореологическое и т.д.

Наиболее известная система использования лекарственных средств разработана в китайской и тибетской медицине. Среди 2270 видов китайских лекарственных средств, включающих минералы, растения, грибы и животные ткани, представлены все главнейшие эдистероид содержащие виды. Современный по-

ставщик китайских лекарственных трав и экстрактов (около 500 видов), компания Hualan Kinghong Bio-resource, Ltd. (<http://www.aerospace.com>), включает в основном те же самые широко известные виды. В настоящее время среди 172 различных эдистероид содержащих препаратов, предлагаемых на мировом коммерческом рынке, около 36% долевого участия занимают препараты из *R. carthamoides*.

Относительная доля других видов в структуре источников составляет: *Pfaffia* – 28, *Cynanotis* – 14, *Polypodium* – 4, *Achyranthes* и *Ajuga* – по 1%. Кроме того 22% препаратов выпускается без указания видов-источников из химически изолированных эдистероидов (в т.ч. 6% в виде смеси разных источников), полученных главным образом по методам биотехнологии из *Polypodium*, *Serratula* и *Ajuga* (культуры клеток, тканей и генетически модифицированных корней).

В основе фармакотерапевтического действия эдистероид содержащих составов лежат эффекты стимуляции специфического и неспецифического иммунитета, усиления резистентности и повышения граница адаптации организма к различного рода инфекциям, физической и психической нагрузке, гипоксикации; улучшения переносимости жары, холода, кислорода, недостатка солнечного света. Общетонизирующий эффект развивается постепенно и выражается в усилении стрессоустойчивости организма, активации метаболизма, эндокринной и вегетативной регуляции, сопровождаясь усилением аппетита и секреции желез желудочно-кишечного тракта, повышением тонуса полых органов. Помимо этих эффектов, отмечается восстановление сниженного сосудистого тонуса, незначительное повышение артериального давления и улучшение ритмичности работы сердца, не ярко выраженный психостимулирующий эффект.

Исходя из комплексных исследований Ярославской государственной медицинской академии, В.А. Дармограй с соавторами, указывают на следующие закономерности фармакологического действия фитостероидов (полученных преимущественно из растений сем. *Caryophyllaceae*):

- эдистероиды обладают ангиопротекторным действием, ингибируют перекисное окисление липидов;
- увеличивают активность и поверхностный заряд, текучесть мембран эритроцитов и их резистентность к осмотическому, температурному и кислотному гидролизу;
- обладают протекторным действием в отношении УФ-индуцируемого и перекисного гемолиза эритроцитов;
- повышают фагоцитарную активность нейтрофилов в крови, увеличивают концентрацию белка и гамма-глобулинов, уменьшают исходно повышенное количество холестерина;

- увеличивают содержание гликогена в печени, активизируют белоксинтезирующие процессы, обладают гепатопротекторным действием;
- оказывают мощное ранозаживляющее действие при химических, термических, криогенных, механических повреждениях тканей, являясь стимулятором регенерации;
- способны стимулировать различные формы иммунитета – естественную, противомикробную и антиоксидантную резистентность;
- повышают работоспособность и обеспечивают профилактику утомления в отягощенных условиях;
- обладают антистрессовой, адаптогенной и иммуностимулирующей активностью;
- оказывают ноотропное, а частично психостимулирующее действие;
- не угнетают жизнедеятельность микроорганизмов *in vitro*;
- не изменяют формулу периферической крови и СОЭ;
- во всех исследованиях отмечается нелинейная, как правило, параболическая зависимость графиков «концентрация-эффект».

Японские исследователи обращают внимание на такие эффекты экидистеронидов содержащих растений рода *Rafania*, как:

- тонизирующее;
- антидепрессивное при психологической неустойчивости, различных фобиях и возбужденных состояниях;
- иммунорезистентное при профилактике болезней, индуцированных агрессией бактерий, вирусов и грибов;
- снятие различных форм аллергических реакций, дерматитов, астматических состояний;
- облегчение аутоиммунных состояний (гемолитическая анемия; ревматоидный артрит, раковые опухоли);
- лечение язв и колитов;
- увеличение физической силы;
- возрастание сексуальной активности, улучшение репродуктивного потенциала;
- облегчение течения процесса синдрома менопаузы.

Р.Д. Сейфулла, основываясь на 20-летнем опыте использования препаратов *R. carthamoides* в спортивной фармакологии, приводит следующие закономерности адаптогенного их действия:

- тонизируют центральную нервную систему, улучшают процессы обучения, памяти, условнорефлекторную деятельность, синаптическую передачу импульсов в симпатических и парасимпатических волокнах периферической нервной системы;
- нормализуют деятельность эндокринной системы организма;

- улучшают реологические свойства и микроциркуляцию крови в сосудах головного мозга и работающих мышц;
- контролируют процесс образования и расхода энергии в исполнительных клетках (мышц, печени, почек, мозга и других органов);
- восстанавливают гуморальный и клеточный иммунитет, нарушенный в ходе тренировочного и соревновательного процесса;
- проявляют антиоксидантное действие, предотвращают гипоксию и токсические эффекты свободно-радикального окисления ненасыщенных жирных кислот, активируемых при истощающей физической нагрузке;
- обладают анаболическими эффектами, необходимостью в которых возникает при интенсивной физической работе (тренировке) во избежание падения массы тела и деструкции белков у спортсменов;
- не обладают токсичностью и не являются допинговыми соединениями.

3. Экидистерониды в биологических тестах

В 70-80-х годах были проведены многочисленные исследования по выявлению биологической активности экидистеронидов в биотестах с использованием методов воздействия на личинки насекомых (отрастка кормового рациона химически очищенными соединениями, погружение в водные и спиртовые экстракты, инъекции). В лабораторных условиях добавление фитозкидистеронидов в искусственную питательную среду приводило к необратимым изменениям в развитии: гибели отродившихся гусениц; нарушениям процессов линьки и аномалиям, снижающим жизнеспособность особей: индуцированию сверхнормального количества линек, преждевременному окукливанию, появлению гусениц с несколькими головными капсулами.

Однако данный метод далек от совершенства, так как требует достаточно долгого времени для проявления реакций метаморфоза, кроме того, при этом не всегда удается обеспечить сохранность химически изолированных экидистеронидов, измельченных листьев и экстрактов в питательном корме от губительного воздействия микрофлоры. В настоящее время распространенным экспресс-методом оценки биологической активности экидистеронидов и их синтетических аналогов является биотестирование с клетками насекомых, содержащих естественные экидистеронидные рецепторы (ВП-биотест), в сочетании с радиоиммунным анализом (РИА).

В биотестах могут использоваться различные изоформы экидистеронидных рецепторов, выделенных из следующих видов насекомых: *Drosophila melanogaster*; *Plodia interpunctella*; *Bombyx mori*; *Manduca sexta*; *Chironomus tentans*, *Heliothis*

virescens; *Choristoneura fumifurax*; *Aedes aegypti* и т.д. Метод позволяет также оценить относительную активность составов, оказывающих экдистероид-подобное или экдистероид-ингибирующее действие (лиганды-агонисты и лиганды-антагонисты).

В зависимости от специфики объекта, положенного в основу биотестирования, может проявляться преимущество различных экдистероидов с теми или иными рецепторами. Поэтому для уточнения полученных результатов используются параллельные биотесты со вкусовыми хеморецепторами членистоногих, в частности краба *Carcinus maenas*. Физиологически активным у насекомых является экдистероид *20-hydroxycastane*. Активность его в биотестах равна 10^{-8} М (молярная масса). Другие зооэкдистероиды, циркулирующие в гемолимфе членистоногих, малоактивны (10^{-4} - 10^{-6} М). Самая высокая биологическая активность у фитоэкдистероидов *ponasterone A* и *miristerone*, составляющая 10^{-9} - 10^{-10} М.

Среди продуктов конверсии основных фитоэкдистероидов наибольшей активностью обладают структуры, нехарактерные для химической трансформации, но синтезируемые в зеленых частях растений в ходе реакции фототрансформации *20-hydroxycastane*, в частности *14 α -hydroperoxy-20E*, *14 α -dial-20E* (10^{-8} М) и димеры. Димеры возможны и в отношении *ponasterone A*, *ajugasterone C*.

Растения могут быть источником других стероидных соединений, которые, присутствуя в остаточных количествах совместно с исследуемым веществом, могли бы взаимодействовать с экдистероидными рецепторами как агонисты (химическое соединение, которое при взаимодействии с рецептором изменяет его) или антагонисты, и тем самым проявлять скрытую активность в биотестах. Кроме экдистероидов, имеются еще две группы растительных стероидов, которые могут быть классифицированы согласно их биологическому действию:

- брассиностероиды, оказывающие влияние на рост и развитие растений;
- специфичные субстанции защитного свойства (респеленты, антифиданты, яды), активные против травоядных животных и паразитических грибов: кукурбитациты, карденолиды, буфалиенолиды, сапогенины, витанолиды и стероидные алкалоиды.

Присутствие аллелохимических (приносящих пользу животному) веществ в растениях, структурно связанных с гормонами позвоночных (эстрогены, андрогены, прогестероны и т.д.), строго не доказано. L. Dinan и др. полагают, что более ранние сообщения об их наличии и местонахождении на основе цветных реакций и низкоэффективных хромато-графических методов являются неочевидными. В других случаях, когда зафиксирована аналогичная эстрогенам активность, эффекты эти могут быть обусловлены промежуточными продуктами обмена веществ в био синтезе стероидов.

Наиболее близки к экдистероидам брассиностероиды, оба класса имеют С27...С29 структуру. Всего из растительных объектов изолировано около 40 индивидуальных брассиностероидов, включая папоротники.

В опытах с высокоочищенными составами, когда исключалась возможность действия остаточных количеств ферментов и других метаболитов, влияние брассиностероидов на экдистероид отзывчивые системы не было обнаружено. Также экдистероиды не обладали никакой активностью в биотестах с брассиностероид чувствительными растениями.

Авторы делают заключение, что естественные брассиностероиды не действуют как агонисты или антагонисты экдистероидов в ВП биотеста, соответственно естественные экдистероиды не обладают активностью брассиностероидов. Многочисленные синтетические аналоги также не оказывали влияния на результаты тестирования, за исключением одного состава, активность которого в 2000 раз была ниже *ecdysterone*.

В работе L. Dinan и др. приводятся результаты ВП биотеста с 4500 видов растений. Показано, что явные нестероидные агонисты с экдистероидной активностью в биотестах с клетками насекомых не были идентифицированы. Лиганды-антагонисты среди экдистероидов также не выявлены, кроме неактивного *24-hydroxycarthamosterone* ($2,0 \times 10^{-5}$ М). Наиболее способны взаимодействовать в качестве антагонистов кукурбитациты, но сравнительная активность их невысокая и зависит от структурных особенностей строения.

Самые важные соединения – *cucurbitacine B* и *D*, имели активность 7×10^{-7} М, что в 2400 раз меньше контрольного экдистероида *ponasterone A*. Активность витанолидов и лимонидов незначительная или очень слабая (соответственно $2,5 \times 10^{-6}$ М – для *2,3-dihydro-3 β -hydroxywithacristine*; 10^{-4} ... 10^{-5} М – для *prieurlanin* и *rohikain*).

Другие вторичные метаболиты (алкалоиды, брассиностероиды, карденолиды, хромены, гликоалкалоиды, лигнаны, фенилпропаны, тригерпенонды) были неактивными или шототоксичными. Среди них удалось обнаружить лишь несколько фенилпропанов и алкалоидов со слабой антагонистической активностью, не сравнимой с активностью экдистероидов.

Продукты искусственного химического синтеза в подавляющем большинстве случаев являются неактивными, самый значительный класс лигандов, идентифицированных на сегодняшний день, это *bisacylhydrazines*. Первые искусственно синтезированные нестероидные агонисты экдистероидов среди них были описаны в 1988 году компанией *Rohm & Haas*, специализирующейся на разработке инсектицидов. Коммерчески доступными являются RH-5849 (*1,2-dibenzoyl, 1-tert-butyl hydrazide*) и RH-5992 (*rebufenozide, 3,5-dimethylbenzoic*

acid 1-1 (1,1-dimethylethyl) - 2 (4-ethylbenzoyl) hydrazide)). Эти составы хотя и активизировали в биотестах рецепторы *Manduca sexta* и *Drosophila melanogaster* в концентрациях 10^{-7} М, но все же они недостаточно эффективны, чтобы заменить экистероиды. В альтернативных биотестах со вкусовыми сенсиллами членистоногих активность их оказалась нулевой.

Результаты биотестов более 300 индивидуальных соединений из животных и растительных источников позволили создать единую базу данных экистероидов, присутствующих в живых системах. В целом активность экистероидов различается на 6 порядков и простирается от 10^{-10} до 10^{-4} М.

Было обнаружено, что наибольшей активностью обладают индивидуальные экистероиды эволюционно отдаленных групп: *ponasterone A* – из ракообразных, папоротников и голосеменных растений; редких и экологически изолированных видов: *rapisterone D*, производные *kaladasterone* и *makisterone A*, *polypodine B* – из эндемика лезвев сафлоровидной (*R. carthamoides*); *maristerone* – из горных растений рода *Ipsomea*.

Коэффициенты биологической активности индивидуальных фитоэкистероидов, содержащихся в характерных для флоры России видах растений из рода *Lychnis*, *Serratula*, *Silene* и *Rhaponticum*, распределяются в следующем убывающем порядке, исходя из требуемого молярного количества для замещения наиболее активного экистероида *ponasterone A* (1 – контроль):

2 – *kaladasterone*, 5-deoxy-5a; 3 – *rapisterone D* и *polypodine B*; 13 – *makisterone A*, 24(28)-dehydro; 14 – *ecdysterone*, 22-benzoate; 17 – *dachryhainansterone*; 24 – 20-hydroxyecdysone (*ecdysterone*, 20E); 42 – *makisterone A*; 97 – *ajugasterone C*; 323 – *viticosterone E* (*ecdysterone*, 25-acetate); 355 – *inokosterone*; 419 – *coronatasterone* (*ecdysterone*, 3-epi); 580 – *integristerone A*; 645 – *makisterone C*; 968 – *turkesterone*; 2 125 – 20-hydroxyecdysone, 2 deoxy; 3 546 – *ecdysone*; 19 355 – *ecdysone*, 3-dehydro; 48 387 – *poststerone*; 132 258 – *silenoside A*; 148 387 – *silensterone*. Неактивны: *silenoside B*, D, E, F, G, H; *ecdysone-3-epi*; *ecdysone-22-phosphate*; 20-hydroxyecdysone-22-palmitate и др.

4. Структурное разнообразие экистероидов

Сочетание результатов биотестирования экистероидов с современными методами компьютерного объемного моделирования позволяет познавать молекулярные механизмы проявления биологической активности и теоретически объяснять ключевые моменты взаимодействия экистероида-лиганда и его рецептора в связке «структура-активность». Необходимость построения искусственных моделей, описывающих взаимосвязь активности со структурными осо-

бенностями пространственного их строения, вызвана прежде всего практической потребностью.

Несмотря на 40 лет интенсивных исследований, до настоящего времени не было идентифицировано ни одного соединения, способного в полной мере заменить естественные экистероиды. Природные же сырьевые источники высокоактивных соединений труднодоступны, число их ограничено, технология извлечения сложна, а себестоимость слишком высока. Главная цель таких исследований, базирующихся на использовании мощного программного обеспечения и ресурсов электронно-вычислительных систем – предсказать молекулярное строение искусственных лигандов (молекулы взаимодействующие с комплементарным участком определенной структуры), которые, обладая высокой активностью, были бы доступны методом химического синтеза.

Поиск оптимальной конфигурации и конформационного состояния модельных структур экистероидов на основе программного анализа физических их характеристик представляет первое направление в области искусственного моделирования биологической активности и позволяет производить предсказания для новых продуктов искусственного синтеза (агонистов и антагонистов), полученных путем перестройки боковых радикалов-лигандов. Наиболее значимые из них доступны для проверки в биотестах с естественными рецепторами. Для построения оптимизированных моделей лиганда, выявления связи между его активностью и молекулярной структурой необходимы сведения о разнообразии строения и сравнительной активности всех доступных фито-, зоо- и микробных экистероидов и их ближайших структурных аналогов. Такие работы были проведены в течение последних двух десятилетий. Было установлено, что в результате ферментативных преобразований в биосистемах экистероиды присутствуют в виде транс- и цис-изомеров, сочленений колец А и В, эпимеров с различной конфигурацией ОН-групп, водорастворимых и жирорастворимых конъюгатов с органическими и неорганическими кислотами, сахарами и т.д. Существуют также отклонения от стандартных структур в форме стереоизомеров, дополнительных двойных связей, псевдо-молекулярных отрицательных ионов, окси-групп и гидроксильных группировок в различных положениях стероидного ядра и боковых цепей:

При изучении кристаллических структур основных экистероидов выявлено, что пространственная их модель зависит от характера взаимодействия с молекулами растворителя – образуются 2 или 3 модификации, обладающие различной конформационной свободой вращения боковых цепей. Эти исследования привели к важным заключениям о структурных особенностях строения, оказывающих влияние на биологическую активность. На их основе были сделаны вы-

воды относительно взаимосвязи между соотношением активности и пространственными характеристиками молекул экистерондов, взятых за основу при построении первых компьютерных моделей: существенным является *А/В* *цис*-кольцевое сочленения, *6-α-7-ε*-группировка, полная боковая цепь стерина, наличие 14- α -ОН-группы. Кроме того, С2 β , С3 β , и С20R-гидроксильные группы усиливают биологическую активность, а С25 гидроксил уменьшает ее.

В дальнейших разработках были учтены донорно-акцепторные связи гидроксильных групп, рассмотрены области взаимодействия лиганда с рецептором (С2, С12-атомы, С22-боковая цепь). Установлено, что закрепление экистероида на родственном рецепторе является результирующим вкладом множественных взаимодействий гетероатомов С2, С3, С20, С22, большого диполя при С6, гидрофобной боковой цепи при С22. Кроме того, определено, что проявление активности очень чувствительно к минимальным конформационным изменениям диполей углеродных атомов С20 и С22. Первые программные методы CoMFA-анализа (comparative molecular field analysis), базирующиеся на сведениях о кристаллическом строении экистерондов-лигандов, были довольно несовершенными, предсказывая сверхвысокую активность слабоактивным или инертным соединениям. Например, активность экистероида *podocdysone B* оказывается увеличенной на 6 порядков (с 10^{-5} М до 10^{-11} М), *castasterone* – на 3 порядка (с 10^{-3} М до 10^{-6} М), *25-hydroxy-dochryhainansterone* – на 4 порядка (с 10^{-7} М до 10^{-11} М), а неактивному *calonysterone* предсказывается активность 10^{-8} М. Одновременно эти модели снижали реальную активность важнейших фитоэкистерондов *ponasterone A* и *20-hydroxycdysone* примерно на порядок.

В настоящее время разработаны алгоритмы мощного машинного программного обеспечения 4D-QSAR (4-dimensional quantitative structure activity relationship), которые позволяют проводить комплексный молекулярный анализ параметров фармакофорных элементов лигандов, характеристик взаимодействия их с модельным рецептором и формулировать выводы относительно ожидаемого проявления активности. 4D-QSAR-модели могут принять во внимание многократные конформационные изменения молекулы изучаемого экистероида во время взаимодействия его с рецептором. Усовершенствованные алгоритмы 4D-QSAR-анализа могут учитывать до 10 тысяч конформаций для исследуемой молекулы, со сдвигом шага времени от 10 пс до 300 К. Сравнение лучших 4D-QSAR моделей с последними методами CoMFA-анализа показывает, что оба алгоритма имеют более высокие величины оправданности предсказаний на фоне равных разработок. Результаты оптимизированных алгоритмов компьютерного моделирования во многих случаях близки к результатам биотестирования, расхождение в активности обычно не превышает 1-2 порядка.

Однако нужно признать, что на сегодняшний день искусственные модели все еще несовершенные, чтобы учитывать все тонкости структурного разнообразия стероидных молекул экистерондов.

5. Молекулярные механизмы действия экистерондов

5.1. Особенности лиганд-рецепторного взаимодействия экистерондов

Молекулярные механизмы проявления активности экистерондов сложны. Для активации их функций необходимо прохождение ряда последовательных стадий в качестве лигандов для внутриклеточных или мембранных рецепторов. Роль экистерондов как лигандов состоит в переключении между двумя состояниями транскрипционного механизма генов по принципу включено-выключено, и/или в трансмембранной передаче сигналов внутриклеточным мессенджерам через каскад вторичных мессенджеров. Также возможны прямые, без участия лигандов, белок-белковые взаимодействия экзогенных или эндогенных пептидов с различными классами рецепторов. Все три механизма способны модулировать определенный сигнал, работая обособленно или одновременно друг с другом.

Наиболее изучены молекулярные механизмы активации ядерных рецепторов, биологическая деятельность которых заложена через непосредственное взаимодействие с липофильными лигандами. Проникая через плазматическую мембрану внутрь клетки, экистеронды образуют с соответствующими белками-рецепторами сложные комплексы, способные достигать регуляторных участков хроматина в ядре и инициировать транскрипцию чувствительных генов. В этом процессе важно, что на первом этапе для пространственной стабилизации стероидного рецептора после присоединения лиганда-экистероида необходимы белки-помощники (шапероны), а также некоторые ионы металлов-микроэлементов; на втором – образование гетерокомплекса с рецепторами производных витамина А, а на заключительном – наличие мультибелковых комплексов, кофакторов транскрипции.

Рецепторы экистерондов (EcR) относятся к большой группе суперсемейства ядерных стероид-, тиреоид-ретиноидных рецепторов (EcR, RAR, VDR, TR, PPAR), происходящих эволюционно, как предполагают, от одного общего предка. Для каждого из рецепторов имеются свои ближайшие аналоги у человека и других млекопитающих. В качестве их лигандов, регуляторов транскрипции, выступают экистеронды, ретиноиды (производные витамина А), витамин Д₃, тиреоидные гормоны, ненасыщенные жирные кислоты (эйкозаноиды) и т.д.

Сюда же относятся рецепторы, локализованные в центральной нервной системе – NURR-1 и NGF1; печени и кишечнике – LXR; печени, почках и кишечнике – FAR (фарнезил-активированный рецептор) и другие, для которых лиганды еще не идентифицированы. Структурно гомологичная группа состоит более чем из 100 членов. Из этого перечня лишь EcR характерен для беспозвоночных (насекомые, ракообразные, нематоды, кольчатые черви), остальные системы активированы в млекопитающих. Ближайшим аналогом EcR в организме млекопитающих является LXR (LXR α , RLD1, LXR, UR, NER, RIP15, OR1), лигандами которого служат оксистеролы, производные холестерина (22 (R) - и 24 (S)-hydroxycholesterol; 24 (S), 25-epoxycholesterol; 7-hydroxycholesterol).

Рецепторы имеют общую модульную структуру, включающую несколько главных, функционально независимых друг от друга областей: домен E, ответственный за присоединение лиганда к рецептору (LBD – ligand binding domain); домен C, связанный с определенной последовательностью аминокислот в целевых генах (элементами ответа RE) и регулирующий транскрипцию (DBD – DNA binding domain); домен D, являющийся своеобразным шарниром, вокруг которого может происходить пространственное изменение взаимного положения доменов LBD и DBD. Домен DBD включает в себя участок из 9 цистеинов, 8 из которых способны связывать ионы металлов, образуя 2 так называемых «цинковых пальца» или выступа, стабилизирующих пространственную структуру рецептора и участвующих в образовании белковых комплексов. LBD-домен является многофункциональной областью, которая, кроме закрепления лиганда, отвечает за взаимодействие с белками теплового шока (hsp), гетеродимеризацию со вторым партнером-рецептором и задержание транскрипции в отсутствие «родного» лиганда. Рецепторы содержат также зоны, служащие для присоединения дополнительных факторов, необходимых для активации транскрипции: участок AF-1 (домен A/B), который вносит вклад в независимую от лиганда активацию рецептора, и участок AF-2 (домен F), расположенный в лиганд-зависимой области рецептора.

Существует гомология в строении доменов ядерных рецепторов – все они имеют обширные участки нуклеотидной последовательности, во многих деталях совпадающие друг с другом. Различия в реакционной способности обусловлены комбинацией небольшого числа неидентичных аминокислотных остатков. Например, DBD-домен у всех членов суперсемейства состоит из 66-68 (60-70) остатков аминокислот, из которых инвариантны только 20, включая 9 цистеинов.

У большинства типов ядерных рецепторов млекопитающих имеются подтипы и изоформы, обусловленные видовой принадлежностью (α , β , γ). Существуют также изоформы эрдистероидного рецептора у различных классов (насе-

комые, ракообразные) и отрядов (чешуекрылые, двукрылые и т.д.) членистоногих. По этой причине чувствительность к одному и тому же лиганду у различных видов различна.

Функционирование рецепторов непосредственно связано с конформацией полипептидной цепи, которая определенным образом уложена в пространстве. Не будучи связан с лигандом, биополимер-рецептор не способен к ответу, так как не может принять специфическую, необходимую для проявления активности пространственную структуру. Под действием лиганда происходит изменение структуры рецептора, конформационный переход, обусловленный поворотом макромолекулы около химических связей в цепи. Активность лиганда определяется характером его взаимодействия с рецептором. Взаимодействие может привести к достижению конформационной структуры, заставляющей рецептор стать дееспособным (лиганд-агонист) или же бездействующим (лиганд-антагонист). Лиганд-агонист может не только разрешить деятельность, но и запретить ее (репрессировать). В присутствии лиганда-антагониста рецептор не может активировать целевые функции. Узнавание специфического «фиттера» (лиганда) рецептором является начальным этапом в череде сложных процессов, необходимых для проявления биологической активности, и основан на точечном взаимодействии нескольких элементов LBD-домена с эрдистероидной молекулой. Эрдистероид должен подходить к обязательной по лиганду гидрофобной «падице», так называемому «карману», как ключ к замку. Только в этом случае образуются стабильные и не распадающиеся во времени структуры. Существует большое количество эрдистероидных лигандов, различающихся небольшими изменениями в структурном строении. Однако, имея даже незначительное различие, многие из них неустойчивы в комплексе с рецептором и диссоциируют обратно. Поэтому в таких случаях требуются высокие концентрации лигандов для полного насыщения рецептора.

Фармакологически активная доза эрдистероида, достаточная для проявления биологического эффекта, будет зависеть, кроме как от индивидуальных его характеристик, также и от множества других сопутствующих факторов. С одним и тем же сложным биополимером могут одновременно взаимодействовать несколько разных лигандов. Взаимное влияние лигандов является кооперативным, т.е. ответ на действие одного лиганда усиливается при закреплении другого. В случае с димерным рецептором дополнительный лиганд является синергическим активизирующим фактором, который, вызывая частичное изменение пространственной структуры рецептора, делает возможным установление прочной связи основного лиганда-эрдистероида. После закрепления лиганда члены рассматриваемой группы суперсемейства ядерных рецепторов (EcR, RAR, VDR, TR,

PPAR, NURR-1, FAR, LXR и др.) в качестве моно- и гетеродимеров сами по себе неактивны или малоактивны. На втором этапе для активации любого из них требуется гетеродимеризация с рецептором 9-*cis*-ретиноевой кислоты, ведущая к образованию комплекса EсR/RXR. В этом они отличны от андроген-, прогестерон-, эстроген-, глюкокортикоидных рецепторов (AR, PR, ER, GR), способных активизироваться в форме гомодимеров, т.е. без участия рецептора-партнера и их лигандов.

У насекомых гомологом RXR является белковая молекула USP (ultraspiracle protein), при гетеродимеризации образуется комплекс EсR/USP. Лигандом USP, как предполагают, служат фосфолипиды или ювенильный гормон. Соответствие последовательности аминокислот в пептидной цепи между USP и RXR идентично на 80% в ДНК-обязательной (DBD) и на 49% в лиганд-обязательной (LBD) области; конформационное расхождение показано для двух петель в пространстве. Поэтому USP и RXR способны взаимно заменять друг друга при формировании гетеродимера с рецепторами производных витамина А и Д, ненасыщенных жирных кислот, гормона щитовидной железы, а также иными рецепторами и стимулировать закрепление этих рецепторов к целевым отзывчивым элементам при запуске механизмов генной транскрипции.

В организме человека лиганды ретиноидного рецептора RXR синтезируются в ходе биохимической трансформации ретинола, который при участии соответствующих ферментов вначале окисляется до 9-*cis* и 11-*cis* изомеров, а затем до ретиноидов – альдегидных форм витамина А.

Основным природным источником ретиноидов является каротин растений: при распаде β-каротина в кишечнике и печени образуются 2 молекулы витамина А (ретинола, полного *транс*-изомера). 11-*cis*-ретиноаль входит в состав зрительного пигмента родопсина и принимает участие в физиологических процессах, связанных со световосприятием. 9-*cis*-ретиноальдегид при участии цинк-содержащих ферментных белков необратимо трансформируется в лиганд RXR – 9-*cis*-ретиноевую кислоту (9-*cis* RA), кислотную форму витамина А. Кроме главного лиганда – 9-*cis*-ретиноевой кислоты, активизировать RXR-рецептор способны также некоторые производные хлорофилла, в частности фитавовая кислота.

Физиологически бездействующая форма эрдистеронидного рецептора EсR существует как олигомерный комплекс с белками теплового шока в цитоплазме клетки. В таком состоянии полипептидная цепь рецептора свернута, деятельность его репрессирована. После закрепления родственного лиганда рецептор диссоциирует от ингибирующего комплекса. Корепрессоры высвобождаются, и лиганд-обязательная область принимает конформацию, способную к взаимодей-

ствию со вторым рецептором, после чего происходит пространственная стабилизация структуры гетеродимера.

Для эффективной трансдукции сигнала необходимо, чтобы в системе одновременно присутствовали оба лиганда. Рецептор RXR после закрепления родного лиганда – 9-*cis*-ретиноевой кислоты – вызывает диссоциацию ингибиторов и корепрессоров от его партнера (рецептора EсR) и включает наведенное конформационное изменение. Кооперативное связывание лигандов с рецепторами вызывает сродство всех субъединиц к принятию такого наиболее благоприятного пространственного положения, в результате чего происходит резкий переход гетерокомплекса от бездействующей к активной форме при минимальных концентрациях лиганда. Чем выше число участвующих в процессе факторов активации, тем быстрее происходит переход от отсутствия реакции к максимально возможному ее значению. Как результат, возможно снижение фармакологической дозы эрдистероида на несколько порядков.

Аналогично слабое закрепление 20-hydroxyecdysone, физиологически активного лиганда EсR у насекомых, стимулируется дополнением USP, аналога RXR, приводящего к сродству с рецептором в диапазоне наномолярной концентрации. Косвенное влияние на активацию EсR могут оказать и другие стероидные рецепторы, в частности DXR-38 через кооперацию с USP. У млекопитающих в активации эрдистероидов может иметь значение кооперация RXR и NGFI-B, являющихся аналогами USP и DXR-38. Присутствие дополнительной субъединицы изменяет конформацию димера и стимулирует образование устойчивой пространственной структуры, не распадающейся в течение длительного времени. Хотя присутствие второго лиганда для функциональной деятельности EсR-рецептора необязательно, одновременное закрепление двух лигандов может привести к синергично-фантомной активации деятельности целевого гена.

5.2. Конегруирование оптимизированных моделей рецепторов

Второе направление в области компьютерного моделирования активности эрдистероидов развивается в области молекулярного усовершенствования конструкций отдельных узлов, участков и элементов рецепторов, взаимодействующих с лигандами и обеспечивающих надежную, безотказную и безопасную их работу в реальном организме. Это поиск оптимальной пространственной ориентации (путем перебора аминокислотных остатков в активных центрах белковых молекул), обеспечение ортогональности и тканеспецифичности, синтез гибридных и мутантных рецепторов, введение дополнительных модулей активации (факторов экспрессии генов).

Важность работ по конструированию оптимизированных моделей рецепторов состоит в том, что существует необходимость усовершенствования существующих экдистеронид-чувствительных систем, которые бы позволяли улучшить деятельность по доступным для массового использования лигандам. Множество исследований в области клеточной и молекулярной биологии направлены на конструирование видоизмененных и более совершенных рецепторов, позволяющих эффективное взаимодействие активного центра с субстратом.

Направления исследований можно выделить в 5 блоков:

1. Современные методы сайт-направленного мутагенеза позволяют создавать функционально работающие химерные конструкции димеров путем обмена соответствующих областей между разными рецепторами. Основываясь на модульной структуре членов суперсемейства стероидных соединений, теоретически возможна разработка рецепторов, способных связывать лиганды, строение которых значительно отличается от известных природных экдистероидов. Кроме того, возможны сложные конструкции гибридных белковых молекул с рецепторами, не затрагивающие доменные участки последних. Рецепторы в таких комплексах могут быть взаимно связаны друг с другом без потери активности функций отдельных блоков.
2. Знание структуры и роли отдельных, функционально самостоятельных доменных участков белка-рецептора позволяет заменить определенные пептидные цепи, участвующие в узнавании лиганда, на другие, более совершенные. В частности, изменение активности рецептора может быть достигнуто перестройкой лиганд-обязательной области (LBD). Мутантные рецепторы могут быть произведены заменой одной или нескольких аминокислот на другие, или же стиранием части из них в карбоксильной (С-концевой) области белка-рецептора (приблизительно от 1 до 120 аминокислот). Как следствие, точечные изменения в первичной структуре белковой молекулы рецептора могут привести к управляемым изменениям в ее пространственной конфигурации и способствовать формированию оптимальной структуры, необходимой для лучшего взаимодействия с лигандом. В результате активный центр рецептора приобретает способность к более стабильному взаимодействию с экдистеронидом-лигандом, связь с которым не распадается в течение длительного времени.
3. Усиление активности молекулярных конструкций экдистеронидных систем может быть достигнуто введением дополнительных областей трансактивации (VP-16, TAF-1, TAF-2, TAU-1, TAU-2 и т.п.). Подходящие области активации подбираются из известных природных источников: например, из N-концевой области пептидной цепи членов суперсемейства экдистеронид-, ретиноид-, ти-

фонд-, эйкозаноидных рецепторов; участков активирующих факторов транскрипции, например, вируса герпеса (VP16), дрожжей (GAL4), стрессовых белков растений (HSF), факторов клеточного роста и т.д.

4. Участок промотора, воспринимающего элемент рецептора, может быть видоизменен путем введения одного или нескольких стрессовых элементов (HSE-последовательностей аминокислот) или же целевой заменой отдельных их модулей на более совершенные. Белковые элементы-конструкции, воспринимающие действие стрессовых факторов, широко распространены в природе, в частности в растениях, и могут быть активированы действием высокой, низкой температуры или же некоторыми другими факторами внешнего или внутреннего воздействия. Примеры иных подходящих факторов экспрессии генов включают различные иммуно-модуляторы и стимуляторы (цитокины, факторы роста клетки, кроветворения, интерлейкины, интерфероны, антигены, полипептидные гормоны и т.п.).
5. Считается перспективным, чтобы искусственные конструкции рецепторов и их комплексы одновременно включали в себя, наряду с приемлемыми носителями рецептора, также векторы экспрессии и лиганды. Перечень таких фармацевтически активных составов, которые не имеют прямых неблагоприятных эффектов и нежелательных последствий и могут использоваться в комбинации с экдистеронидом, включают аминокислоты, органические кислоты, ферментные белки, ионы металлов, витамины, различные соли, вещества гормонального, стимулирующего или ингибирующего характера.

6. Изучение действия экдистероидов в медицине и ветеринарии

6.1. Различия в активности экдистеронид содержащих составов

Массовые экдистеронид содержащие растения во флоре России сосредоточены в семействе гвоздичных (*Caryophyllaceae*) – роды *Lychnis*, *Silene*, *Sagina*, *Petrococtis*. Некоторые виды растений из этих родов содержат до 1-2% экдистеронидов в биомассе и до недавнего времени рассматривались как наиболее перспективный источник для получения новых экдистеронид содержащих препаратов. Однако при исследовании биологической активности в биотестах выявлено, что она проявляется у незначительной части, главным образом, на уровне слабых активностей экстрактов.

Можно предполагать, что одной из причин такого положения является присутствие в растениях большого числа слабоактивных или неактивных фито-экдистеронидов. Если, к примеру, *Rhaponticum carthamoides* синтезирует множе-

ство высокоактивных соединений, сопоставимых с активностью экистеронд *polasterone A* (*rapisterone D*, *polypodine B*, *dachryhainansterone*, производные *koladasterone makisterone A*), то в растениях рода *Silene* достаточно много неактивных составов – *silenoside A*; *silensterone silenoside B, D, E, F, G, H*.

Возможно, что по схожей причине, связанной с утерей большинства минорных компонентов в ходе химико-технологических работ по изоляции 1-2-х мажорных экистерондов, экстракты *R. carthamoides*, содержащие всю их сумму, в сравнении с высокоочищенными препаратами обладают значительно более высокой активностью при минимальных дозах. Анаболический эффект малых доз неочищенных экстрактов *R. carthamoides* на беспородных белых мышах установлен как 0,035 мг/кг по 20-гидрохуесдиолу. Увеличенная до 0,387 мг/кг доза в первые 10 дней после внутримышечного введения тормозила проявление анаболического эффекта. Минимальная доза химически изолированной субстанции (препарат *ecdysten*), необходимая для проявления анаболического эффекта, равна 5-10 мг/кг. Увеличение дозы до 20 мг/кг приводит к ингибированию биосинтеза белка и РНК в поджелудочной железе мышей, причем менее очищенные 10% и 2%-е экстракты сильнее тормозят начало процесса биосинтеза во времени.

В литературе опубликованы сравнительные результаты экспериментов с экистерондами, изолированными из других видов растений. Адаптогенное действие экистерондов *Serratula coronata* L. 91% чистоты изучали в Институте биологии Коми НЦ УрО РАН. По результатам исследований сделан вывод, что по величине тонизирующего эффекта экистерондная фракция *S. coronata* (препарат *ecdysten-S*, содержащий 75% 20-гидрохуесдиолу) во многом схожа с экистерондной фракцией *R. carthamoides*, но дозы были увеличенными. Некоторые эффекты, в частности анаболический, который наиболее ярко выражен для *R. carthamoides*, у *S. coronata* в сопоставимых дозах отсутствовали. Анаболический эффект отсутствовал и в другой серии экспериментов с 96,5%-ной экистерондной фракцией *S. coronata* (препарат *ecdysone*, содержащий 80,5% 20-гидрохуесдиолу).

М.Б. Плотников с соавторами (1999) провели сравнение гемореологической активности экстрактов из надземной части двух экистеронд содержащих видов растений – *Lychnis chalcadonica* L. и *R. carthamoides* (Willd.) Шип – в модельных опытах на крысах с предварительно индуцированным инфарктом миокарда. Экстракты содержали примерно одинаковую концентрацию 20-гидрохуесдиолу (0,74 и 0,71% соответственно). Курс перорального введения длился 5 дней, разовые дозы составляли 150 мг/кг. В эксперименте были получены сопоставимые показатели уменьшения вязкости плазмы крови, но разница

в показателях снижения концентрации фибриногена и скорости деформируемости эритроцитов была значительно лучшей у *R. carthamoides*, чем у *L. chalcadonica*.

Сравнительная биологическая активность экистеронд содержащих растений рода *Serratula* и *Rhaponticum* изучалась Ганневым Ш.Г. в биотестах по индуцированию окукливания личинок насекомых *Musca domestica* L. и *Calliphora erythroserhala* Mg. Соцветия, листья и корни растений рода *Rhaponticum* (*R. karatavicum*, *R. nitidum*, *R. integrifolium*) проявляли высокую сравнимую активность на всем протяжении сроков вегетации. У растений рода *Serratula* (*S. algida* L. и *S. lyratafolia* S.), несмотря на присутствие экистерондов во всех органах, активными были только надземные части, корни проявляли нулевую или крайне незначительную активность, сопоставимую с контролем.

Химически изолированная фракция экистерондов – 91% (в т. ч. включающая 75% 20-гидрохуесдиолу), – выделенная из надземной части *Serratula coronata*, в биотесте на реакцию спонтанного Е-росткообразования обладала сложной и неоднозначной модулирующей активностью «доза-эффект» (названной двухфазным действием) в диапазоне концентраций $10^{-6} \dots 10^{-12}$ М. Эффективная иммуно-модуляторная активность CD2⁺-росткообразования с человеческими Т-лимфоцитами достигалась при концентрации 1 мкМ (10^{-6} М), с индексом стимуляции 1,132.

Комплексные экистеронд содержащие субстанции обладают значительно более высокой активностью, чем химически изолированные соединения. Культивирование популяций лимфоцитов *in vitro* в присутствии экстракта *Rhaponticum carthamoides* было способно вызвать пролиферацию клеток селезенки в концентрации $10^{-13} \dots 10^{-14}$ М (в расчете на 20-гидрохуесдиолу). На фоне неспецифически активизирующих агентов СоА (Т-митоген) и LPS (В-митоген) пролиферация стимулируется вплоть до 10^{-15} М.

По данным двухэтапного фармакологического скрининга, исходя из сопротивляемости к повреждающим воздействиям на фоне контроля, препараты *R. carthamoides*, включающие сумму действующих веществ (настойки и экстракты из корневищ) по эффективности превосходили препарат *ecdysten*, содержащий изолированные и высокоочищенные действующие начала растения. Коэффициенты их адаптогенной активности составили соответственно 0,92 и 0,52 – по сопротивляемости к радиальным перегрузкам; 0,59 и 0,32 – к гипоксии; 0,40 и 0,24 – к 24-часовому стрессу; 0,42 и 0,21 – к гормональной дисфункции; 0,34 и 0,30 – к токсичности этанола; 0,12 и 0,05 – к острой гипотермии.

В экспериментах А.С. Саратикова с соавторами, проведенных в Томском медицинском институте, было выявлено, что эффективность стимулирующего

влияния 20%-го экстракта *R. carthamoides* на умственную деятельность человека зависит от величины принимаемой дозы. В дозе 10 капель/сутки число ошибок в корректурном тесте у испытуемых лиц на фоне контроля уменьшилось на 64,6%; при увеличении дозы до 20 и 40 капель эффективность распознавания символов снизилась соответственно до 42,4 и 34,4%.

Зная концентрацию 20-гидрохуссусона в очищенных и неочищенных препаратах *R. carthamoides*, производимых различными предприятиями и фирмами России, Узбекистана и США, можно рассчитать сравнительную биологическую активность. Разовая доза приема жидкого экстракта составляет 20-30 капель, или 0,5 мл (г) для взрослого человека массой 50-70 кг. Максимальные суточные дозы жидкого экстракта с высокой эффективностью, использованные в условиях военно-морского подводного плавания, не превышали 4 г/день на человека. Средняя концентрация 20-гидрохуссусона в жидких препаратах примерно равна 0,05%, или 0,5 мг/мл. Установлено стимулирование пролиферации клеток экстрактом *Rhaphanistrum carthamoides*. Эффективная высшая суточная доза химически чистого 20-гидрохуссусона и препаратов на его основе на порядок выше (10^{-7} М) и равна 50-100 мг/кг.

Таким образом, наряду с большим количеством экспериментально установленных фактов биологической и физиологической активности экистероидов, отмечается большое различие в дозах и направленности действий индивидуальных соединений, очевидно, происходящих путем невыясненных механизмов активации через кофакторы, вторичные посредники и метаболиты. По всей вероятности, активация экистероидных рецепторов с их лигандами происходит через последовательную цепь событий, где важную роль играют комплексы экистероидов с водорастворимыми белками, квертиноидами, флавоноидами, ненасыщенными жирными кислотами, микроэлементами и другими физиологически активными веществами.

6.2. Препараты Биоинфузин и ФАНТ

В последние годы разработаны научные основы создания агропопуляций лезвен в качестве промышленно возделываемого лекарственного растения. Установлены особенности жизненного цикла, факторы устойчивости в ценозе, структура биомассы и динамика накопления экистероидов в отдельных органах и онтогенезе. Определены оптимальные сроки и методы заготовки, режимы переработки растительного материала; экономические составляющие производства. Рентабельность производства основывается на изначально высокой биологической активности лекарственного сырья, которая позволяет обходиться меньшими

ее дозами и многократно снижать производственные издержки. Все это открывает возможность для разработки новых, обладающих высокой активностью дешевых фармацевтических препаратов из лезвен. В частности, созданы два препарата, которые находят свое применение в ветеринарной медицине, - Биоинфузин и ФАНТ (автор Ивсановский А.А.).

Биоинфузин предназначен для внутримышечного и внутривенного введения. Применяется для повышения общей резистентности организма в период патологических состояний различной этиологии, усиления половой активности, лечения респираторных заболеваний. Особенность механизма действия - стимулирующая активность малых и ингибирующее действие больших доз на пролиферативные процессы в организме.

Препарат оказывает сильный биостимулирующий эффект на организм. Об этом свидетельствуют такие показатели естественной резистентности в сыворотке крови, как общий белок и его фракции, лизоцимная, бактерицидная, нейтрофильная и антителообразующая, фагоцитарная активность клеток. Рост всех исследуемых показателей на 7-й день в сравнении с контролем составляет в среднем 15-30% и более. Биологическая активность, выявляемая через показатели антителообразующих клеток селезенки и гамма-глобулиновой фракции сыворотки крови, превосходит контрольные цифры в 1,5-2 раза. Анаболический эффект препарата после однократного введения белым мышам соответствует 10-12%.

LD₅₀ биоинфузина для белых мышей составляет 9,5 г/кг, что свидетельствует о полной безопасности препарата. Выпускается в герметически закрытых стеклянных флаконах по 10, 20, 50, 100 и 200 мл. Содержит 0,0005% 20-гидроксиэкизиона. Препарат применялся как телятам, так и пороссятам для повышения общей резистентности организма животных. Кратность при внутривенном введении - 1 раз в сутки, длительность курса 5-7 дней. Дозы составляют 0,02-0,05 мл/кг. При внутримышечном введении ежедневные дозы в 2 раза выше. Суточные дозы, рассчитанные по концентрации 20-гидрохуссусона, равны 0,1-0,5 мг/кг (10^{-12} ... $2 \cdot 10^{-13}$ М).

Фитокомплекс на основе лезвен сафлоровидной ФАНТ предназначен для лечебно-профилактического использования в ветеринарной практике, применяется для терапии и профилактики заболеваний желудочно-кишечного тракта у телят и поросят, может быть использован и в птицеводстве. Представляет сухую кормовую смесь, сочетающую в себе микроорганизмы-сывергисты (*L.plantarum*, *R.albus*, *B.subtilis*) и экстракт лезвен сафлоровидной. Расфасован в полиэтиленовые пакеты или бутылки емкостью от 500 до 2000 г. Содержит 0,005% 20-гидрохуссусона.

Для него характерна высокая степень целлолозоинтегической активности, что делает затруднительным развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры в кишечнике. Препарат обладает также анаболическим и адаптогенным эффектом. ФАКТ не оказывает негативного влияния на качество получаемой продукции, не вызывает побочных эффектов. С успехом заменяет целый комплекс кормовых антибиотиков, являясь при этом экологически чистым продуктом. Противопоказаний к применению не установлено.

С профилактической целью препарат применяют 1 раз в сутки (с кормом или питьем) из расчета 0,5 г/кг независимо от возраста. Суточная доза по *20-hydroxycyclozone* равна 5-10 мкг/кг ($1...2 \cdot 10^{-11}$ М). Продолжительность курса от 15 до 30 дней. При диарейном синдроме дозу препарата можно увеличивать до 1 г/кг и применять методом выпаивания после растворения в теплой воде (30-35° С) один раз в сутки в течение 5-7 дней.

6.3. Кофакторы активности

В реальных системах с клетками млекопитающих, в отличие от биотестов (опыты с искусственными пробирочными системами *in vitro*), возникают важные ограничения в проявлении активности эрдистероидов:

1. Ретиноидный рецептор RXR является неохотным партнером димеризации с эрдистероидным рецептором EcR, и необходимы очень высокие концентрации эрдистероидов для возбуждения эрдизон-индуцированных систем;
2. Диапазон активных лигандов по существу ограничен исключительно эрдистероидом *testosterone A*. В своих работах R. Lafont и L. Dinan приводят следующие недостатки искусственных регуляторных систем экспрессии генов в системах с клетками млекопитающих: большинство химически очищенных от вторичных метаболитов эрдистероидов, за редким исключением, не проявляют активности; используемые дозы очень высоки, а максимальные уровни экспрессии незначительны; скорость катаболизма в организме высокая. Целый ряд экспериментально полученных в последнее время данных позволяет предполагать, что ключевую роль в способности стимулировать закрепление лиганда на рецепторе и последующую транскрипцию играют дополнительные факторы.

Особенную значимость активация функций транскрипционного регулирования через кофакторы приобретает для условий, приближенных к естественным. При этом на каждом этапе лиганд-рецепторного взаимодействия требуются свои специфические условия и факторы:

1. Деятельность полипептидной цепи ядерного рецептора вне связи его с лигандом свернута в комплексе с белками теплового шока Hsp40, Hsp56, Hsp70, Hsp90 и т.д. Функция связанных с рецепторами hsp-белков (шаперонов) состоит в стимулировании репрессии эрдистероидных рецепторов, запрещая им димеризоваться и взаимодействовать с другими корегуляторными белками в отсутствие закрепления родственного лиганда или другого стимулирующего сигнала. После закрепления узнаваемого лиганда следующая функция шаперонов – способствовать нуклеотидной цепи рецептора развернуться в пространстве и сопроводить ее из цитоплазмы в клеточное ядро. Для осуществления функциональной деятельности сами шапероны также нуждаются в дополнительных составах-помощниках, в качестве которых выступают иммунокомпегентные белки. Hsp40 и Hsp70 часто могут связываться друг с другом и действовать координированным способом, стабилизируя конформационное изменение рецептора через лиганд-обязательную область.
2. Установлено существование соединений, называемых корегуляторами, или факторами-посредниками транскрипции (GTF – general transcription factors; TIF – transcription intermediary factors; TAF – transcription associated factors и т.д.), ответственных за активацию транскрипции ядерных рецепторов после закрепления лиганда. Сюда относятся эволюционно интегрированные с определенными рецепторами семейства белков: SRC (steroid receptor coactivator), RIP (receptor interacting protein), CBP (coactivator binding protein), RAP (receptor associated proteins), NCoA (nuclear coactivator), NcoR (nuclear corepressor, гомологичен SMRT) и т.д.

Известно множество различных коактиваторов транскрипции и менее всего исследованы корепрессоры. Совсем недавно удалось выявить новый тип белка-репрессора (alien mediated repression), функционально предрасположенного к взаимодействию с EcR-рецептором. Этот белок широко распространен среди насекомых, растений, человека и других млекопитающих (90-95% идентичности аминокислотного состава) и является ответственным за инактивацию эрдистероидного рецептора.

Существуют видоспецифичные варианты интеграции корегуляторов в мультибелковые комплексы (SRC-1/NcoA-1; TIF-2/RIP-1/NcoA-2 и т.д.). Целевое выражение гена в отсутствие лиганда активно подавлено через образование репрессивных конструкций, запрещающих формирование активных центров на ядерных рецепторах. В присутствии лиганда, когда репрессоры не способны связать сложный рецептор EcR/RXR, корепрессоры высвобождаются и LBD-область принимает уникальную конформацию, позволяющую взаимодействовать поверхность рецептора с мультибелковыми комплексами активаторов.

Структура хроматина становится доступной для запуска механизмов транскрипции и приводит к экспрессии чувствительных генов. Лиганды же антагониста, хотя и могут вызвать димеризацию рецептора, стимулируют такую трансформацию LBD, которая не позволяет связывать коактиваторы. Предполагается, что функциональные участки, служащие для привлечения дополнительных активирующих факторов AF-1 и AF-2, ответственны за отстыковывание корепрессоров от рецептора.

Механизмы, регулирующие их деятельность, на сегодняшний день плохо изучены. Существует антагонистическая и синергическая деятельность нескольких коактиваторов за закрепление на димере. Многоочечное кооперативное взаимодействие между ними приводит к образованию устойчивых комплексов, например, TIF-2 и SRC-1. Одни корегуляторы взаимодействуют с AF-1, другие с AF-2 участком; к примеру, CBP/p160 и CBP/p300 являются AF-2 коинтеграторами, а CBP/p160/PCAF функционируют совместно как ферменты ацетилирования хроматина.

Таким образом, приведенное изложение показывает, сколь сложным является изложенный процесс. Ключевыми моментами для проявления биологической активности являются: взаимодействие лиганда с рецептором, образование гетеродимерного комплекса и участие различных кофакторов в процессе. Регулирующие лиганды для многих корепрессоров и коактиваторов еще не идентифицированы. Лигандами дополнительных белков-рецепторов могут являться самые различные вещества, и не всегда регуляторная их роль может быть определена. Они могут оказаться в пределах клетки-мишени различными способами: активный лиганд или гормон синтезируются в классическом эндокринном органе и транспортируются в клетку; могут являться метаболитами, синтезируемыми в пределах целевой клетки или экзогенно и доставленными к месту действия с участием приемных носителей.

6.4. Взаимодействия со стрессовыми белками

Истоки высокой биологической активности у важнейших эдистеронид содержащих растений (*Rhaponicum*, *Taxus*, *Ipomoea*) следует искать в специфичности вторичного обмена веществ, связанной с эволюционной адаптированностью к суровым условиям жизнеобитания в горных системах Сибири, Средней Азии, Монголии, Китая и Индии. Реликты плейстоценового флористического комплекса стали обладателями особой формы метаболизма, при которой устойчивость к экстремальным условиям жизни (аномально низкие и высокие температуры, широкие колебания освещенности, кислотность почвы, дефицит влаги,

избыток ионов металлов и т.д.) обеспечивается продуцированием эдистеронидов, водорастворимых стрессовых белков и других сопутствующих веществ.

Известно, что ткани и органы растений, подвергнутых стрессу, например экспозиции при аномально высоких или низких температурах, стимулируют синтез активных стрессовых факторов транскрипции HSF (heat stress transcription factors). HSF индуцируют экспрессию генов стресса через аминокислотные последовательности шоковых элементов (HSE) на промоторных участках.

Фактор, названный HSF-1, ответственен за регулирование синтеза семейства стрессовых белков (hsp-белков), различающихся между собой последовательностью аминокислот и молекулярной массой. Многие из них являются молекулярными шаперонами (Hsp10, Hsp27, Hsp56, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp104, Hsp110) или структурами, ответственными за реперацию поврежденных молекул (ubiquitin). Часть этих HSF-белков могут быть активными и в отсутствии стресса и способны инициировать экспрессию генов в клетках млекопитающих при наличии соответствующих условий.

6.5. Эффекты с трансмембранными рецепторами

Многие примеры широко известных разнообразных физиологических эффектов, производимых эдистеронид содержащими субстанциями, опосредованы через систему вторичных мессенджеров. В этих случаях эдистерониды чаще всего влияют на клеточный метаболизм, не проникая внутрь клетки: они разносятся с током крови ко всем тканям и взаимодействуют с мембранными рецепторами тех клеток, которые чувствительны к данным молекулам. Лиганд предназначен, чтобы активировать вторичный мессенджер, запрещая или стимулируя деятельность мембранного белка как напрямую, так и конкурируя за рецептор с другими агонистами.

Связывание лиганда с мембранным белком приводит к конформационным изменениям, заманивающимися физиологическими преобразованиями в клетке. Активированный тем или иным способом рецептор передает сигнал к внутриклеточным мишеням.

Таким образом, происходит трансмембранная передача сигналов при участии интегрированных в мембрану рецепторов – сигнал модулирует его металлическую активность или проводимость ионного канала. Результатом является изменение ферментативной активности, цитоплазматической концентрации ионов, ведущее к возникновению клеточного ответа. Вторичный мессенджер, появляющийся внутри клетки в ответ на внеклеточную аппликацию лиганда и обес-

печивающей передачу сигнала от рецепторов к внутриклеточным мишеням, состоит, как правило, из нескольких белковых компонентов, совокупность которых составляет каскад передачи сигнала. Помимо белковых посредников, в передаче сигнала во многих случаях вовлекаются относительно небольшие молекулы, синтезируемые в клетке или доставляемые извне через те или иные носители. Деятельность многих рецепторов модулируется различными средствами, стимулирующими разнообразные пути трансдукции сигнала. Например, FAR (farnesyl activated receptors) – ядерный рецептор, активизированный лигандом фарнезил пирофосфат, участвует в передаче сигналов как через промежуточные звенья метаболизма, так и в прямой транскрипции после гетеродимеризации с другими ядерными рецепторами, в т.ч. EsR.

Группы мембранных рецепторов весьма многочисленны (включают более чем 70 типов). Наиболее значимыми среди них являются трансмембранные белки (ТМ). Классификация их строится как 1ТМ-14ТМ, включающие 1-14 трансмембранных областей. ТМ-рецепторные белки – мономерные интегральные мембранные белки, полипептидная цепь которых один, два раза или многократно пересекает клеточную мембрану. Участок рецептора, взаимодействующий с первичным сигналом, локализован на внешней стороне мембраны, внутренний участок контактирует с эффекторным белком, ответственным за передачу сигнала. Один и тот же лиганд (например, эдистеронид) может инициировать передачу сигнала через несколько и даже десятки ТМ-рецепторов одновременно. Часть рецепторов действуют одновременно как ТМ-рецепторы и ионные каналы, изменяя катионную или анионную проводимость металлов.

Наиболее многочисленным является суперсемейство 7ТМ-рецепторов (до 2000 участников в человеческом организме). Известные 7ТМ-белки составлены из родопсин-подобных светочувствительных рецепторов, однако идентичность последовательности между ними очень низка. Эти рецепторы вовлечены в управление гомеостазом организма путем передачи химических сигналов между клетками через различные регуляторные системы. До настоящего времени лишь несколько сотен 7ТМ были идентифицированы, и проблема состоит в том, что очень трудно характеризовать одиночные рецепторы и найти их лиганды. Через 7ТМ-рецепторы происходят многие процессы регулирования гомеостаза, противовоспалительных эффектов, снятия боли и т.д. Активность их может проявляться в качестве антигистаминных (против аллергии и язвы желудка) и противоагматических средств, бета-блокаторов (от сердечно-сосудистых болезней), викагонистов ангиотензина (при гипергонии), опиатов (противоболевые средства). Лиганды, действующие через 7ТМ-рецепторы, включают широкое разнообразие химических соединений: ионы натрия и калия; аминокислоты; моноами-

ны (серотонин, гистамин, допамин, адреналин, норадреналин, ацетилхолин, норацетиламин и т.д.); липиды (простагландины, тромбоксаны и т.д.); пурины (аденозин, АТР); нейропептиды (тахикинин, нейропептид Y, энкефалин, холецистокинин и т.д.); пептидные гормоны (ангиотензин, брадикинин, глюкагон, кальцитонин, гормон предстательной железы); интерлейкины; гликопротеиновые гормоны - протеазы и т.д.

Таким образом, большое разнообразие используемых в медицине фарм- и биопрепаратов, действующих через мембранные рецепторы, позволяет предполагать, что проявление части разносторонних форм биологической активности эдистеронид содержащих субстанций также обусловлено взаимодействием с ТМ-рецепторами. Физиологические действия и перечень терапевтических показаний по использованию эдистеронидов в медицинской практике во многом схожи с действием лигандов трансмембранных рецепторов и включают регуляцию минерального, углеводного, липидного и белкового обмена; проявление антиоксидантных, иммуно-модулирующих свойств и т.д.

Предполагается, что во взаимодействиях с трансмембранными рецепторами (трансдукция сигнала внутриклеточным мишеням) важная роль принадлежит вторичным посредникам эдистеронид содержащих составов – пептидам, липидам, аминокислотам, соединениям фосфора, кальция, калия, а также другим макро- и микроэлементам. В частности, в отношении эдистеронид содержащего растения *S. coronata* было показано, что проявление антиоксидантной активности биологически активного комплекса, содержащего 5% 20-гидроксиэсдисона, в значительной степени обусловлено присутствием аминокислоты аргинина. Вклад последнего в снижение максимальной интенсивности хемилюминесценции, индуцированной перекисью водорода (H_2O_2), составил 72,6%; Fe^{2+} – 76,7%. Кроме того, известно, что присутствие широкого спектра эдистеронидных молекул в растениях сопровождается конъюгацией их с другими, хорошо растворимыми в воде продуктами вторичного обмена веществ: неорганическими (сульфаты, фосфаты) и органическими кислотами (ацетаты, бензоаты, циннаматы), сахарами (глюкозиды, галактозиды, ксилониды), ацетоном и т.д.

Н.П. Тимофеев и А.В. Кокшаров утверждают, что при исследовании корреляционных связей присутствия эдистеронидов в растительных тканях с сопутствующими соединениями сверхконцентрация 20-гидроксиэсдисона в растительных тканях *R. corthamoides* (в 10 тыс. раз) сопровождалась увеличенным содержанием белка (34%) и сырого жира (4,3–5,1%).

Следовательно, при использовании неочищенных экстрактов из эдистеронид содержащих растений в живых системах можно ожидать суммирования негеномного и геномного эффекта действия эдистеронидов с другими веществами

первичного и вторичного синтеза, что делает успешным использование их при отклонениях в работе регуляторных систем и общего гомеостаза организма.

Заключение

Экдистерониды представляют самое распространенное и многочисленное семейство стероидных соединений в биосфере; они участвуют в жизнедеятельности практически всех классов организмов, выполняя множественные функции. Ни одним из видов млекопитающих экдистерониды не синтезируются, в большинстве случаев они передаются от растений, где осуществляется их биосинтез, нижеследующим звеньям пищевой цепочки. Физиологические эффекты экдистеронидов на организм человека и теплокровных животных весьма разнообразны. Широкое распространение экдистеронидов в природе закономерно приводит к вопросу относительно уровней и механизмов проявления ими биологической активности. Разработка теоретических основ молекулярных особенностей проявления активности экдистеронидов – одно из главных направлений биомедицинской науки, которое в сочетании с современными методами биотестирования и компьютерного объемного моделирования пытается объяснить ключевые моменты взаимодействия экдистероида-лиганда и его рецептора в связке «структура-активность», предсказать оптимальную конфигурацию и конформационное состояние идеального соединения – с целью осуществить искусственный химический синтез продуктов, способных к проявлению высокой биологической активности в живых системах.

В настоящее время распространенным экспресс-методом определения биологической активности является биотестирование с клетками насекомых, содержащих естественные экдистеронидные рецепторы (ВІІ-биотест). Результаты биотестов более 300 индивидуальных соединений из источников животного и растительного происхождения позволили создать единую базу данных структурного разнообразия экдистеронидов, присутствующих в живых системах. Установлено, что экдистерониды существуют в виде С17-С30 молекул, среди которых чаще всего распространены и высокоактивны С27-С29 структуры. Наибольшей активностью обладают индивидуальные экдистерониды эволюционно отдаленных групп: *ponasterone A*, *muristerone*, *rapisterone D*, а также производные *kaladasterone* и *makisterone A*, *polypoddyne B*.

Зооэкдистерониды, циркулирующие в гемолимфе насекомых, малоактивны, за исключением *20-hydroxyecdysone*. Близкие по химической структуре брасиностерониды, витаминды, лимононды, кукурбитацины, а также алхалонды, брасиностерониды, карденолиды, хромены, гликоалкалоиды, лигнаны, фенолпропа-

ны и тритерпеноиды не действуют как агонисты или антагонисты экдистеронидов в ВІІ биотесте. Продукты искусственного химического синтеза также неактивны, кроме нескольких соединений из класса *biacyltubazines*, обладающих слабой активностью в биотестах. Поиск оптимальной конфигурации и конформационного состояния модельных экдистеронидов на основе программного анализа физических их характеристик представляет первое направление в области искусственного моделирования биологической активности и позволяет производить предсказания для новых продуктов искусственного синтеза (агонистов и антагонистов), полученных путем перестройки боковых радикалов лигандов. Наиболее значимые из них доступны для проверки в биотестах с естественными рецепторами. Поэтому компьютерные модели имеют значительный потенциал для отбора среди составов нового химического синтеза с фармакологической, инсектицидной или противопаразитарной активностью. Первые программные методы CoMFA-анализа, базирующиеся на сведениях о кристаллическом строении лигандов, были довольно несовершенными, предсказывая сверхвысокую активность слабоактивным или инертным соединениям. Тем не менее, они, при сочетании их с методами биотестирования, привели к важным выводам относительно взаимосвязи между соотношениями активности и пространственными характеристиками молекул экдистеронидов. Модели 4D-QSAR-анализа могут учитывать многократные конформационные изменения молекулы изучаемого лиганда во время взаимодействия его с рецептором. Сравнение лучших 4D-QSAR моделей с поздними методами CoMFA-анализа показывает, что оба алгоритма имеют более высокие величины оправдываемости предсказаний по сравнению с ранними версиями. Результаты оптимизированных алгоритмов компьютерного моделирования во многих случаях близки к результатам биотестирования, расхождение в активности обычно не превышает 1-2 порядка. Однако нужно признать, что на сегодняшний день искусственные модели все еще несовершенны, чтобы учитывать все тонкости структурного разнообразия строения молекул экдистеронидов.

Второе направление в области компьютерного моделирования активности экдистеронидов развивается в области молекулярного усовершенствования конструкций рецепторов, которые бы показывали улучшенную деятельность по доступным для массового использования лигандам. Это поиск оптимальной пространственной ориентации (путем перебора аминокислотных остатков в активных центрах белковых молекул), обеспечение органо- и тканеспецифичности, синтез гибридных и мутантных рецепторов, введение дополнительных модулей активности (факторов экспрессии генов). В реальных системах с клетками млекопитающих, в отличие от биотестов (опытов с искусственными прибороч-

ными системами *in vitro*), возникают важные ограничения в проявлении активности экдистеронидов. Большинство химически очищенных от вторичных метаболитов экдистеронидов, за редким исключением, не проявляют активности; используемые дозы очень высоки, а максимальные уровни экспрессии незначительны.

Необходим ряд условий, чтобы активизировать их функции в организме. Проявление активности в живых системах зависит не столько от их присутствия в фармацевтических препаратах или пищевых добавках, сколько от взаимного сочетания с другими сопутствующими факторами, прохождения ими ряда последовательных стадий в качестве лигандов для внутриклеточных или мембранных рецепторов. В случае с ядерными рецепторами на начальном этапе важным является взаимодействие со стрессовыми белками, образование гетеродимерного комплекса с рецепторами производных витамина А – 9-цис-ретиноевой кислоты (RXR-retinoids), участие в процессе ионов металлов-микроэлементов; а на заключительном – наличие мультибелковых комплексов, кофакторов транскрипции. Ключевую роль в способности стимулировать закрепление лиганда-экдистероида и запускать транскрипцию играют белковые вещества – коактиваторы и корепрессоры, а также стрессовые факторы, вступающие в прямые белок-белковые взаимодействия с различными рецепторами. При использовании неочищенных экстрактов экдистеронид содержащих растений в медицине можно ожидать суммирования негеномного и геномного эффекта действия фитозкдистеронидов с другими веществами первичного и вторичного синтеза, что позволяет конструировать новые формы препаратов из цельного лекарственного сырья, характеризующихся высокой лечебной и профилактической эффективностью при минимальных дозах.

Список литературы

1. Ануфриева Э.Н., Володин В.В., Носов А.М. и др. Состав и содержание экдистеронидов в растениях и культуре ткани *Setaria setigera* сопостав // Физиология растений. - 1998. - №3. - С.382-389.
2. Ахмед И. Фитозкдистерониды серлукки невооруженной (*Setaria inermis*) и их влияние на биосинтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот в тканях шпалит с различной обеспеченностью витамином D₃: Автореф. канд. биол. наук. - Киев. - 1993. - 27с.
3. Ахмед А.А., Ковганю В.В. Экдистерониды: Химия и биологическая активность. - Минск: Наука и техника, 1989. - 327с.
4. Балтаев У.А. Фитозкдистерониды – структура, источники и пути биосинтеза в растениях // Биоорганическая химия. - 2000. - Т.26. - №12. - С.892-925.
5. Володин В.В., Тимофеев Н.П., Колесникова Н.А. Содержание 20-гидроксизекдистерона в различных экдистеронид содержащих лекарственных препаратах // Международное совещание по фитозкдистероидам. - Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 1996. - С.138.
6. Володин В.В., Чадин И.Ф. Обзор: Экдистерониды в мировой флоре. - Сыктывкар: Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН. -2003.-Вып.67. - С.2-11.
7. Володин В.В., Ширшова Т.И., Бурцева С.А. и др. Биологическая активность 20-гидроксизекдистерона и его ацетатов // Растительные ресурсы, 1999. - Т.35. - №2. - С.76-81.
8. Гаджиева Р.М., Португалов С.Н., Палюшкин В.В. и др. Сравнительное изучение анаболизирующего действия препаратов растительного происхождения экдистерона, леветона и «Трайм-Плюс» // Экспериментальная и клиническая фармакология, 1995. - №5. - С.46-48.
9. Гусак Ю.К., Морозов В.Н., Дармограй В.Н. и др. Фитолечение климактерического синдрома // Актуальные вопросы акушерства и гинекологии: Раздел II Гинекология, 2002. - Т.1. - №1. - 41с.
10. Дармограй В.Н., Гусак Ю.К., Морозов В.Н. и др. Опыт использования фитозкдистеронидов в лечении угрожающего прерывания беременности // Традиционные методы лечения в акушерско-гинекологической практике: Тр. II науч.-практ. конф. Москва, 2003. - С.107-108.
11. Дармограй В.Н., Петров В.К., Гордлеев В.А. и др. Превентивное и терапевтическое действие фитозкдистеронидов при индуцируемых анемиях и лейкопениях // VIII Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство» (Тез. докладов). Москва, 2001. - С.315-316.
12. Дармограй В.Н., Петров В.К., Золотарев Ю.В. и др. Фитозкдистерониды – перспективы применения в хирургической практике // От коллатерального кровообращения к органосохраняющим операциям. - Рязань, 1999. -С.211-214.
13. Дармограй В.Н., Петров В.К., Ухов Ю.И. Теоретическое и клиническое обоснование концептуальной модели механизма действия фитозкдистеронидов // Биология на рубеже XXI века. Матр. сб. науч. тр. Рязань, 2002. - С.489-492.
14. Зеленков В.Н., Тимофеев Н.П., Колесникова О.П. и др. Выявление биологической активности для водных экстрактов листовой части лекарственной сафлоровидной на модели *in vitro* // Мат. I Росс. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы

- инноваций в создании фитопродуктов на основе нетрадиционных растительных ресурсов и их использование в фитотерапии». - Москва: РАЕН, 2001. - С.59-62.
15. Зибарева Л.Н. Фитоэкистерониды растений семейства *Saprotphyllaceae*: Автореф. док...хим. наук. - Новосибирск: Институт биорганической химии СО РАН, 2003. - 31с.
 16. Ивановский А.А. Иммуностимуляторы и их роль в повышении резистентности животных к болезням // Монография. - Киров, 2005. - 66 с.
 17. Ивановский А.А. Фармако-токсикологическая характеристика и применение гистогена, биоинфузия, грамина и бактоцеллолактива для повышения естественной резистентности животных // Диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук. - Москва, 2001. - 280 с.
 18. Кузьченко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А. и др. Антиоксидантный эффект 20-гидроксиэкистерона в модельных системах // Военно-медицинский журнал. 1999. - №3. - С.35-38.
 19. Курмуков А.Г., Сыров В.Н. Противовоспалительные свойства экистерона // Медицинский журнал Узбекистана, 1988. - №10. - С.68-70.
 20. Лафон Р. Фитоэкистерониды и мировая флора: Разнообразие, распространение, биосинтез и эволюция // Физиология растений, 1998. - №3. - С.326-346.
 21. Лекарства и БАД в спорте: Практическое руководство для спортивных врачей, тренеров и спортсменов / Под общей ред. Р.Д. Сейфулла и З.Г. Ордужонова - Москва: Литтерра, 2003. - 320с.
 22. Миронова В.Н., Холодова Ю.Д., Сивцова Т.Ф. Гипохолестеролевый эффект фитоэкистеронидов в экспериментальной гиперхолестеремии на крысах // Вопросы медицинской химии, 1982. - №3. - С.101-104.
 23. Осипская Л.Ф., Саад Л.М., Холодова Ю.Д. Антирадикальные свойства и антиоксидантная активность экистерона // Украинский биохимический журнал, 1992. - №64. - С.114-117.
 24. Плотников М.Б., Алиев О.И., Васильев А.С. и др. Влияние экстракта левзеи сафлоровидной на реологические свойства крови у крыс с артериальной гипертензией // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2001. - Т.64. - №6. - С.45-47.
 25. Плотников М.Б., Алиев О.И., Васильев А.С. и др. Гемореологическая активность экстрактов из надземной части *Luzhnia scaldedonica* L. и *Rhaponticum scaberrimoides* (Willd.) Iljin при экспериментальном инфаркте миокарда // Растительные ресурсы, 1999. - Т.35. - №1. - С.103-107.
 26. Сахибов А.Д., Сыров В.Н., Усманова А.С. и др. Экспериментальный анализ иммуотропического действия фитоэкистеронидов // Доклады АН Узбекской ССР, 1989. - С.55-57.
 27. Сейфулла Р.Д. Спортивная фармакология. - Москва: Спорт-Фарма Пресс, 1999. - 120с.
 28. Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология: Руководство для врачей. - Москва: Медицинское информационное агентство, 2000. - 976с.
 29. Сыров В.Н., Набиев А.И., Султавов М.В. Действие фитоэкистеронидов на желчеотделительные функции печени в норме и при экспериментальном гепатите // Фармакология и токсикология, 1986. - №3. - С.100-103.

30. Тимофеев Н.П. Исследования по экистеронидам: Использование в медицине, Интернет-ресурсы, источники и биологическая активность // Биомедицинская химия, 2004. - Т.50. - Прил. 1. - С.133-152.
31. Тимофеев Н.П. Левзея сафлоровидная: Проблемы интродукции и перспективы использования в качестве биологически активных добавок // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: Сб. науч. трудов. - РАЕН, 2001. - Вып.5. - С.108-134.
32. Тимофеев Н.П. Промышленные источники получения экистеронидов. Ч. I. *Rapastegone* и *puristerone* // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: Сб. трудов. Вып. 7. - М.: РАЕН, 2003. - С. 11.
33. Тимофеев Н.П. Фитозэкистерониды: Фармакологическое использование и активность (Обзор) // Медицинские науки, 2005. - Т.4. - №10. - С.26-66.
34. Тимофеев Н.П., Ивановский А.А. Анаболический эффект малых доз препаратов рапонтника // Международное совещание по фитоэкистеронидам. - Сыктывкар: Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 1996. - С.133.
35. Тимофеев Н.П., Кокшаров А.В. Макроэлементный профиль *Rhaponticum scaberrimoides* (Willd.) Iljin. Мат-лы III Рос. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными природными ресурсами и создания функциональных продуктов». - М.: РАЕН, 2005. - С.84-85.
36. Тодоров И.Н., Митрохин Ю.И., Ефремова О.И. и др. Действие экстрактов левзеи сафлоровидной на биосинтез РНК и белков в органах мыши // Химико-фармацевтическая журнал, 2000. - Т.34. - №9. - С.24-26.
37. Томашко К.Х., Гуклер Р. Экологическое значение экистеронидов у морских артропод // Международное совещание по фитоэкистеронидам. - Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 1996. - С.43-44.
38. Хатьмов Р.В., Муфтахов М.В., Мазунов В.А. и др. Особенности масс-спектров резонансного захвата электронов молекулами экистеронидов // Известия Академии наук: Серия химическая, 2002. - Вып.2. - С.291-294.
39. Швин С.С., Терехин А.А. Растения против стрессов. - Москва: Оверлей, 2002. - 160с.
40. Amisalo P., Kim C.H., Lee J.W., Perlmann T. Defining requirements for heterodimerization between the retinoid X receptor and the orphan nuclear receptor Nur1 // Journal Biol. Chem, 2002. - Vol.277. - No.38. - P.35118-35123.
41. Aranda A. Pascual. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression // Physiological Reviews, 2001. - Vol.81. - No.3. - P.1269-1304.
42. Bathori M., Kálman A., Argay G., Kalasz H. The analysis and crystallographic characterization of 20-hydroxy ecdysone // Curt Med Chem, 2000. - Vol.7. - No.12. - P.1305-1312.
43. Butenandt P. Karlson. Über die isolierung eines metamorphose-hormones der insekten in kristallisierten form. Z // Naturforsch, 1954. - No.9b. - P.389-391.
44. Carlson G.R., Cress D.E., Dhadialla T.S., Hornmann R.E., Le D.P. Ligands for modulating the expression of exogenous genes via an ecdysone receptor complex. US Patent 6,258,603. 2001. July 10.
45. Dinan L. Ecdysteroid structure-activity relationships // Studies in Natural Products Chemistry, 2003. - No.29. - P.3-71.
46. Dinan L., Hornmann R.E., Fujimoto T. An extensive ecdysteroid CoMFA // Journal of Computer-Aided Molecular Design, 1999. - No.13. - P.185-207.

47. Dinan L., Savchenko T., Whiting P. On the distribution of phytoecdysteroids in plants // *Cellular and Molecular Life Sci*, 2001. - Vol.58. - No.8. - P.1121-1125.
48. Fabian L., Argay G., Kalman A., Balbani M. Crystal structures of ecdysteroids: the role of solvent molecules in hydrogen bonding and isostructurality // *Acta Cryst*, 2002. - Vol.58. - No.4. - P.710-720.
49. Hamilton G. Medicinal plants and conservation: issues and approaches. International Plants Conservation Unit, WWF-UK Panda House, Catteshall Lane Godalming, Surrey GU7 1XR, UK., IUCN. 2003. 51pp.
50. Harmatha J., Budesinsky M., Vokac K. Photochemical transformation of 20-hydroxyecdysone: production of monomeric and dimeric ecdysteroid analogues. - *Steroids*, 2002. - No.67. - P.127-135.
51. Harmatha J., Dinan L. Biological activity of natural and synthetic ecdysteroids in the BII bioassay // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1997. - No.35. - P.219-225.
52. 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. - No.2. - P.181-185.
53. Kozlova T., Thummel C.S. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila* // *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2000. - Vol.11. - No.7. - P.276-280.
54. Lafont R. Ecdysteroids and related molecules in animals and plants // *Conference on isoprenoids*, 2003. - Vol.97. - P.280-281.
55. Lafont R., Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: An update // *Journal of Insect Science*, 2003. - Vol.3. - No.7. - 30 p.
56. Ravi M., Hopfinger A.J., Horman R.E., Dinan L. 4D-QSAR Analysis of a Set of Ecdysteroids and a Comparison to CoMFA Modeling // *Journal Chem. Inf. Comput. Sci*, 2001. - No.41. - P.1587-1604.
57. Smith S. Small Brain Neuropeptides // *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 1998. - No.9. - P.301-302.
58. Takahashi H., Nishimoto N. Antidiabetic agents containing ecdysterone or inokosterone // *Journal Patent*, 1992. - No.4. - P.125-135.
59. Trenin S., Volodio V.V. 20-hydroxyecdysone as a human lymphocyte and neutrophil modulator: in vitro evaluation // *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1999. - No.41. - P.156-161.
60. Tsitsimpikou V.V., Tsamis G.D., Siskos P.A., Spyridaki M.H., Georgakopoulos C.G. Study of excretion of ecdysterone in human urine // *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2001. - Vol. 15. - No.19. - P.1796-1801.
61. Voelmy R. Molecular regulatory circuits to achieve sustained activation of genes of interest by a single stress. US Patent 6,342,596. - 2002.January 29.
62. 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. - No.20. - P.3870-3879.

Учебное издание

Ивановский Александр Александрович
 Тимофеев Николай Петрович
 Копылов Сергей Николаевич
 Тимкина Елена Юрьевна

ЭКДИСТЕРОИДЫ

Учебно-методическое пособие

Редактор Зверева А.В.

Заказ № 292. Подписано к печати 15.11. 2012

Тираж 100 экз. Формат 60x84 1/16

Бумага офсетная. Усл.п.л. 2,81

Цена договорная

ФГБОУ ВПО Вятская ГСХА
 610017, г. Киров, Октябрьский проспект, 133
 Отпечатано в типографии Вятской ГСХА