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

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

Киров 2012

УДК 547.92+615.015.11

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 доктор 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

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

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 действияэкдистероидов 21
5.1. Особенности лиганд-рецепторного взаимодействия экдистероидов 21
5.2. Конструирование оптимизированных моделей рецепторов 25
6. Изучение действия экдистероидов в медицинеи 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

Введение

Экдистероиды составляют самое распространенное и многочисленное семейство стероидных соединений в биосфере; они участвуют в жизнедеятельности практически всех классов организмов, выполняя множественные функции. Присутствие экдистерондов характерно как для растительного, так и животного мира. Наиболее массово они обнаружены в папоротниках, голосеменных и высших цветковых растениях, членистоногих (насекомые и ракообразные), в некоторых одноклеточных простейших, древних группах кишечнополостных (медузы, полипы, кораллы), а также в моллюсках, кольчатых и плоских червях (цестоды и трематоды), нематодах. Ни одним из видов млекопитающих экдистероиды не синтезируются, а в организм человека и других теплокровных они поступают вместе с растительной пищей.

Исходя из происхождения и источников получения, их принято подразделять на фито-, зоо- и микоэкдистероиды (т. е. растения, насекомые с ракообразными и нематодами, грибы). Зооэкдистероиды (экдизоны) содержатся в членистоногих в следовых количествах и не могут рассматриваться в качестве потенциальных источников промышленного использования. Первичный химический синтез экдистероидов осуществляется, как правило, из более активных природных соединений. Методом химической трансформации могут быть получены малоактивные продукты вторичного значения. Аналогичные проблемы возникают при использовании методов биотехнологии – биосинтез в условиях культуры тканей, клеток или модифицированных корней сопровождается накоплением неидентифицированных или неактивных соединений.

Исходя из активности и доступности, практическое значение имеют фитоэкдистероиды; они содержатся практически во всех растительных объектах, но различия в уровнях концентрации достигают огромных величин – до 8-9 порядков. Присутствие повышенных их количеств характерно, наряду с отдельными родами цветковых растений, для таких древних организмов, как папоротники, грибы, мхи, водоросли, голосеменные растения.

Фитоэкдистероиды обнаружены в таксонах растений, как близко, так и далеко отстоящих в филогенетическом плане друг от друга. В отделе *Magnoliophyta* экдистероиды идентифицированы во всех 10 подклассах, 40 порядках и более 80 семействах разного уровня эволюционного развития. Обычное их содержание составляет очень малую величину – менее 0,00001%; примерно у 4-5% растений – сотые и тысячные доли от сухого веса; лишь у незначительного числа видов мировой флоры концентрация достигает 0,5-1,5% в расчете на сухую биомассу.

Некоторые из экдистероид, содержащих растительные источники, являются экономически важными объектами в масштабах мирового коммерческого рынка. Например, среди 25 пользующихся наибольшим спросом фармацевтических препаратов значение финансового сбыта противоракового препарата *Taxol*, вырабатываемого из экдистероид содержащего растения *Taxus baccata*, было оценено в 2,3 миллиардов долларов.

Другими важными источниками для производства новых противораковых средств признаны: тисс коротколистный – *Taxus brevifolia*; китайский гриб-трутовик – *Polyporus umbellatus*; рапонтикум, или леузея сафлоровидная, – *Rhaponticum carthamoides*. Учитывая медико-биологическую значимость данного класса соединений в улучшении качества жизни человека, в настоящее время ведущими лабораториями разных стран проводится скрининг мировой флоры с целью идентификации видов-сверхпродуцентов, биотестирование и молекулярное моделирование активности всех известных и вновь открываемых экдистероидов для выявления наиболее важных составов. Современный уровень научных изысканий по экдистерондам включает как фундаментальные исследования в области генетики, клеточной и молекулярной биологии, биомедицинской химии, физиологии человека, животных и растений, так и прикладные направления, ориентированные на решение задач в области химии синтеза и технологии природного сырья, биотехнологии, фармакологии, медицины, энтомологии и ряда областей сельского хозяйства. За последнее десятилетие началось широкое коммерческое использование трех важнейших фитоэкдистерондов: *ponasterone (ponA)*, *muristerone (murA)* и *ecdysterone* (синонимы: *20-гидроксиэкдизон, 20-hydroxyecdysone, 20E*).

В патентной базе США (*US Patent & Trademark Office*), режиме поиска по ключевым словам, наибольшее число патентов зарегистрировано по *muristerone*. Быстрыми темпами растет число заявок на патенты (pregrant), особенно с использованием высокоактивных составов. Число поданных заявок за период 2001-2005 гг., где упоминаются фитоэкдистероиды *ponasterone* и *muristerone*, в 1,6 раза выше, чем число патентов за 1976-2004 гг. с этими же экдистероидами (201 заявка против 124-х патентов). Среднегодовое число поданых за последние 4 года заявок с использованием *muristerone* составляет 33, *ponasterone* – 18, *ecdysterone* – 8, по всем остальным экдистерондам – 7. В предыдущие 20 лет в среднем за год патентовались 1-3 работы.

Историческая длительность научно-исследовательских работ в области экдистероидов насчитывает около 50 лет. Несмотря на столь значительный промежуток времени и огромное число публикаций (около 3 тысяч статей по ключевому слову *ecdysteroids* в научных журналах; более 5 тысяч статей в Интерне-

те (www.scirus.com)), эти вещества во многих отношениях еще остаются до конца непознанными и окутанными множеством легенд. По механизмам действия экдистероидов 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 фитоэкдистерондов 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 употреблять 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 экдистероидов – левзеи сафлоровидной *(Rhaponticum* или *Leuzea carthamoides)*, чтобы испытать на себе весь спектр физиологических воздействий, описанных в литературе.

Познание молекулярных механизмов проявления активности экдистероидов – 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 составов, способных к проявлению высокой биологической активности в живых системах. Разработка теоретических основ молекулярных механизмов активации экдистероидов 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 куколок 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 значительное усилия по исследованию, множество открытых вопросов по зоо- и фитоэкдистероидам 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. Доподлинно известно лишь то, что один 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 $10^{-7}...10^{-9}$ 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 экдистероидов предполагаются в отношении моллюсков, гельминтов и кольчатых червей. Некоторые морские организмы (например, пикногонды и кораллы) секретируют весьма высокие уровни экдистероидов, что интерпретируется исследователями как средство защиты от нападения хищников. Например, выброс экдистероидов *Pycnogonum litorale* против десятиногого рамообразного *Carcinus maenas* вызывает нарушение гормонального равновесия и отпугивание последнего.

Что же касается человека и других млекопитающих, при сочетании определенных условий экдистероиды могут обладать гормоно- или витаминоподобными 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, экдистероиды 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

элиминация начинается через 4–10 мин, через 2 часа радиоактивная метка экдистероидов в крови не обнаруживается. При пероральном введении процесс всасывания из кишечника в сравнении с внутривенным является более длительным.

Экдистероиды относятся к низкотоксичным веществам, $ЛД_{50}$ для *20-hydroxyecdysone* составляет 6,4 г/кг, при внутривенном и 9,0 г/кг при пероральном введении. Полупериод их распада в организме сравнительно невелик. Различия в длительности связаны с дозами используемых соединений, способами их введения, интенсивностью абсорбции в кровь, видами подопытных животных и т.д. Например, для овец полупериод распада *20-hydroxyecdysone* равен 0,2 ч при внутривенном введении, 0,4 ч – при пероральном и 2,0 ч – при внутримышечном введении. У крыс этот период был равен 0,13 ч (8 мин) при внутривенном введении. У мужчин этот показатель в крови при дозе 0,2 мг/кг в ходе перорального введения составил 9 ч для *20-hydroxyecdysone* и 4 часа для *a-ecdysone*. Для *ponasterone A* длительность полурасхода при внутрибрюшной инъекции составила 0,8 ч.

Установлено, что *20-hydroxyecdysone* после приема не разрушается под воздействием кислотно-щелочного содержимого пищеварительного тракта и не оказывает отрицательного воздействия на ассоциации микроорганизмов, обитающих в нем. Выделительный путь – через печень и желчь в кишечник (кал) и мочу. Через сутки после приема *20-hydroxyecdysone* почти полностью элиминируется из организма. В лаборатории допингового контроля (Олимпийский Атлетический Центр, Греция) методами газовой хроматографии было обнаружено, что при приеме перорально 20 мг препарата *ecdysten* остаточное количество экдистероида *20-hydroxyecdysone* через 21 час было равно 0,19% от исходного. Одновременно, наряду с основным, использованным в эксперименте экдистероидом, в моче спортсменов идентифицировано появление новых метаболитов, в частности менее активных *2-deoxyecdysterone* и *deoxyecdysone*. Данный факт может быть объяснен микробиальной трансформацией *20-hydroxyecdysone* под действием анаэробных бактерий, заселяющих кишечник человека.

Физиологические эффекты экдистероидов на организм человека и теплокровных животных весьма разнообразны. Они регулируют минеральный, углеводный, липидный и белковый обмен. Способность их к нормализации уровня сахара в крови может быть полезной при лечении сахарного диабета. Экдистероиды нормализуют также уровни холестерина; снимают воспаление печени, вызванное токсическим гепатитом; обладают способностью дублировать действие витамина D_3, проявляя антирахитичный эффект. Известно проявление ими антиоксидантных, противомикробных, противовоспалительных и ранозаживляющих свойств. Кроме того, они оказывают иммуно-модуляторное, адаптивное, стрессопротективное и ноотропное действие, а также противосудорожный эффект при спонтанной эпилепсии. Установлено стимулирование кроветворной функции (эритропоэз), усиление регенерации и возрастание концентрации эритроцитов и гемоглобина в крови при использовании *20-hydroxyecdysone*.

Наблюдается повышение активности элементов защитной системы крови – лимфоцитов и нейтрофилов, усиление функций фагоцитоза.

Ацетаты и производные *20-hydroxyecdysone* также стимулировали биосинтез ДНК в лимфоцитах человека и животных, активированных поликлональными митогенами.

Экдистероиды являются причиной анаболического эффекта, стимулируя биосинтез белка в печени, почках и скелетной мускулатуре.

Подробный обзор физиологических эффектов действия экдистероидов приведен в работе R. Lafont и L. Dinan. Авторы отмечают, что наряду с большим количеством опубликованной за последние три десятилетия информации, имеются результаты экспериментальных исследований, не подтверждающих в ряде случаев общеизвестные факты. Данные по противоопухолевой активности неоднозначны. Так, например, отмечен случай, когда *20-hydroxyecdysone* стимулировал рост опухоли молочной железы при подкожной инъекции в течение 5 дней, а *a-ecdysone* вызывал опухолевое поражение у лабораторных животных. Японские исследователи не выявили противовоспалительного эффекта *20-hydroxyecdysone* в дозе 5 мг/кг, полученного из корней бразильского растения *Pfaffia iresinoides*, применяемого в течение 7 дней.

Сведения по анаболической активности экдистероидов также неоднозначны. Анаболический эффект выявлен лишь для некоторых индивидуальных соединений, в частности *20-hydroxyecdysone, viticosterone E, turkesterone*, выделенных из растений рода *Rhaponticum*. При этом дозы *20-hydroxyecdysone*, вызывающие положительный эффект, могут различаться на несколько порядков – от сверхмалых доз, равных 0,02-0,035 мг/кг в день, до очень больших концентраций, равных 5-20 мг/кг, – или же проявляться с незначительным эффектом, составляющим 112-116% относительно контроля. Анаболический эффект сопоставимых доз экдистероидов из многих других источников, в частности, изолированных из *Serratula coronata*, не зафиксирован.

2. Фармакологическое использование

В официальной научной медицине экдистероид содержащие натуральные составы используются при нарушениях работы сердечно-сосудистой, центральной нервной и репродуктивной системы, в качестве тонизирующих и стимули-

рующих средств при умственном и физическом утомлении, пониженной работоспособности, ослаблении 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 экдистероидов в качестве адаптогенных, анаболических, антидепрессивных, гемореологических, ноотропных и противоопухолевых средств. Не являясь истинными эндогенными гормональными веществами, при сочетании определенных условий экдистероиды могут обладать гормоно- или витаминоподобным действием. Фармацевтическое использование препаратов на основе экдистероид 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 фитоэкдистероидов, 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 микоэкдистероиды *polyporusterone 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 китайских учеых подтверждают значительную противораковую активность *P. umbellatus*, эффективность торможения им развития опухолей.

Bombyx mori L. – тутовый шелкопряд, личинки насекомых 4-5-летнего возраста содержит зооэкдистероиды *20-hydroxyecdysone* и *ecdysone*, а также соединения вторичного значения – *makisterone A*, *makisterone C*, *2 deoxy-20-hydroxyecdysone*, *3-dehydroecdysone*, *3-epi-ecdysone3-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 фитоэкдистероиды *ponasterone*, *20-hydroxyecdysone*, *pterosterone*, *makisterone*. Использовались в древней Руси в качестве магических растений, озаряющих интуицию, прогоняющих кошмары и злую силу.

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

Pfaffia – сума, или бразильский женьшень, корневища содержат *20-hydroxyecdysone*. Известен у народностей Южной Америки как «para 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 американскому и азиатскому женьшеню (*Panax spp.*). *Ipomoea* – вьюнок пурпурный, синтезирует редкие фитоэкдистероиды *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 экдистероидов и галлюциногенных алкалоидов.

Achyranthes bidentata и *A. aspera* – соломоцвет двузубый и соломоцвет шершавый, содержат *20-hydroxyecdysone*, *cyasterone*, *isocyasterone*, *sengosterone*. 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 врачебных 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 камней в почках, зубной боли и бессонницы, водобоязни, кишечных расстройств и для снятия раздражительности.

Taxus baccata – тис европейский, синтезирует *ponasterone*, *20-hydroxyecdysone*, *makisterone*, *dochryhainansterone*, *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 экдистероиды *20-hydroxyecdysone*, *canescensterone*, *calonysterone*, *scabrasterone*, *calonysterone*, *24-epi-abutasterone* и т.д. Некоторые виды из этого рода использовались в древних

храмах Западной Индии более чем 2000 лет назад. Обладают тонизирующим, успокаивающим, нормализирующим 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 фитоэкдистероидов, в т.ч. такие высокоактивные соединения, как *rapisterone D, dachryhainansterone, 24(28)-dehydro-makisterone A, 22-benzoate-ecdysterone, 5-deoxy-kaladasterone, 20-hydroxyecdysone (ecdysterone), polypodine B, ajugasterone C, makisterone A* и *C, integristerone, leuzeasterone, carthamosterone, coronotasterone* и т.д.

R. carthamoides является «легендой древней восточной медицины», у коренных 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 cao*. 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, противоопухолевое, 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 экдистероид содержащие виды. Современный по-

ставщик китайских лекарственных трав и экстрактов (около 500 видов), компания Hunan kinghong Bio-resource, Ltd. (http://www.aerospace.com), включает в основном те же самые широко известные виды. В настоящее время среди 172 различных экдистероид 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, *Cyanotis* – 14, *Polypodium* – 4, *Achyranthes* и *Ajuga* – по 1%. Кроме того 22% препаратов выпускается без указания видов-источников из химически изолированных экдистероидов (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 экдистероид содержащих составов лежат эффекты стимуляции специфического и неспецифического иммунитета, усиления резистентности и повышения границ адаптации организма к различного рода инфекциям, физической и психической нагрузке, интоксикации; 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 фитоэкдистероидов (полученных преимущественно из растений сем. *Caryophyllaceae*):

- экдистероиды обладают антиоксидантным действием, ингибируют перекисное окисление липидов;
- увеличивают активность и поверхностный заряд, микровязкость 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 антитоксическую резистентность;
- повышают работоспособность и обеспечивают профилактику утомления в отягощенных условиях;
- обладают антистрессовой, адаптогенной и иммунотропной активностью;
- оказывают ноотропное, в частности психоэнергизирующее 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 экдистеронд содержащих растений рода *Pfaffia*, 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, активизируемых при истощающей физической нагрузке;
- обладают анаболизирующими эффектами, необходимость 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. Экдистероиды в биологических тестах

В 70-80-х годах были проведены многочисленные исследования по выявлению биологической активности экдистероидов в биотестах с использованием методов воздействия на личинки насекомых (оросолка кормового рациона химически очищенными соединениями, погружение в водные и спиртовые экстракты, инъекции). В лабораторных условиях добавление фитоэкдистероидов 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 экдистероидов, измельченных листьев и экстрактов в питательном корме от губительного воздействия микрофлоры. В настоящее время распространенным экспресс-методом оценки биологической активности экдистероидов и их синтетических аналогов является биотестирование с клетками насекомых, содержащих естественные экдистероидные рецепторы (ВП-биотест), в сочетании с радиоиммунным анализом (РИА).

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

virescens; *Choristoneura fumifurani*; *Aedes aegypti* и т.д. Метод позволяет также оценить относительную активность составов, оказывающих экдистероидподобное 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-hydroxyecdysone*. 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 *muristerone*, 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 реакций фототрансформации *20-hydroxyecdysone*, в частности *14α-hydroperoxy-20E*, *14α-deoxy-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 сообразно их биологическому действию:

- брассиностероиды, оказывающие влияние на рост и развитие растений;
- специфичные субстанции защитного свойства (репеленты, антифиданты, ялы), активные против травоядных животных и паразитических грибов: кукурбитацины, карденолиды, буфадиенолиды, 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 биосинтезе стероидов.

Наиболее близки к экдистероидам брассиностероиды, оба класса имеют C27...C29 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 биотесто, 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 как слабоактивного *24-hydroxycarthamosterone* ($2{,}0\times10^{-5}$М). Наиболее способны взаимодействовать в качестве антагонистов кукурбитацины, 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 экдистерона *ponasterone A*. Активность витанолидов и лимоноидов незначительная или очень слабая (соответственно $2{,}5\times10^{-6}$М – для *2,3-dihydro-3β-hydroxywithacnistine*; 10^{-4}...10^{-5} М – для *prieurianin и rohitukin*).

Другие вторичные метаболиты (алкалоиды, брассиностероиды, карденолиды, хромены, гликоалкалоиды, лигнаны, фенилпропаны, тригерпеноиды) были неактивными или цитотоксичными. 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 (*tebufenozide, 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 экдистероиды. 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 экдистероидов, присутствующих в живых системах. В целом активность экдистероидов различается на 6 порядков и простирается от 10^{-10} до 10^{-4} М.

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

Коэффициенты биологической активности индивидуальных фитоэкдистероидов, 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 экдистероида *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 – *silenosterone*. Неактивны: *silenoside B, D, E, F, G, H; ecdysone-3-epi; ecdysone-22-phosphate; 20-hydroxyecdysone-22-palmitate* и др.

4. Структурное разнообразие экдистероидов

Сочетание результатов биотестирования экдистероидов с современными методами компьютерного объемного моделирования позволяет познавать молекулярные механизмы проявления биологической активности и теоретически объяснять ключевые моменты взаимодействия экдистероида-лиганда и его рецептора в связке «структура-активность». Необходимость построения искусственных моделей, описывающих взаимосвязь активности со структурными особенностями 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 экдистероиды. 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 экдистероидов 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 микроэкдистероидов и их ближайших структурных аналогов. Такие работы были проведены в течение последних двух десятилетий. Было установлено, что в результате ферментативных преобразований в биосистемах экдистероиды присутствуют в виде транс- и цисизомеров, 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 экдистероидов 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 пространственных характеристик молекул экдистерондов, взятых за основу при построении первых компьютерных моделей: существенным является *A/B цис*-кольцевое сочленения, *6-оxо-7-ене* группировка, полная боковая цепь стерина, наличие 14-α-OH-группы. Кроме того, C2β, C3β, и C20R-гидроксильные группы усиливают биологическую активность, а C25 гидроксил уменьшает ее.

В дальнейших разработках были учтены донорно-акцепторные связи гидроксильных групп, рассмотрены области взаимодействия лиганда с рецептором (C2, C12-атомы, C22-боковая цепь). Установлено, что закрепление экдистероида на родственном рецепторе является результирующим вкладом множественных взаимодействий гетероатомов C2, C3, C20, C22, большого диполя при C6, гидрофобной боковой цепи при C22. Кроме того, определено, что проявление активности очень чувствительно к минимальным конформационным изменениям диполей углеродных атомов C20 и C22. Первые программные методы CoMFA-анализа (comparative molecular field analysi), базирующиеся на сведениях о кристаллическом строении экдистерондов-лигандов, были довольно несовершенными, предсказывая сверхвысокую активность слабоактивным или инертным соединениям. Например, активность экдистеронда *podecdysone B* оказывается увеличенной на 6 порядков (с 10^{-5} M до 10^{-11} M), *castasterone* – на 3 порядка (с 10^{-3} M до 10^{-6} M), *25-hydroxy-dochryhainansterone* – на 4 порядка (с 10^{-7} M до 10^{-11} M), а неактивному *calonysterone* предсказывается активность 10^{-8} M. Одновременно эти модели снижали реальную активность важнейших фитоэкдистероидов *ponasterone A* и *20-hydroxyecdysone* 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 экдистероида 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 ps до 300 K. Сравнение лучших 4D-QSAR моделей с последними методами CoMFA-анализа показывает, что оба алгоритма имеют более высокие величины оправдываемости предсказаний на фоне ранних 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 строения молекул экдистерондов.

5. Молекулярные механизмы действия экдистероидов

5.1. Особенности лиганд-рецепторного взаимодействия экдистероидов

Молекулярные механизмы проявления активности экдистероидов сложны. Для активации их функций необходимо прохождение ими ряда последовательных стадий в качестве лигандов для внутриклеточных или мембранных рецепторов. Роль экдистероидов как лигандов состоит в переключении между двумя состояниями транскрипционного механизма генов по принципу включено-выключено, и/или в трансмембранной передаче сигналов внутриклеточным мишеням 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 смодулировать определенный сигнал, работая обособленно или одновременно друг с другом.

Наиболее изучены молекулярные механизмы активации ядерных рецепторов, биологическая деятельность которых запущена через непосредственное взаимодействие с липофильными лигандами. Проникая через плазматическую мембрану внутрь клетки, экдистероиды 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-экдистероида 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 экдистерондов (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 экдистероиды, ретиноиды (производные витамина А), витамин $Д_3$, тиреоидные гормоны, ненасыщенные жирные кислоты (эйкозаноиды) и т.д.

Сюда же относятся рецепторы, локализованные в центральной нервной системе – NURR-1 и NGFI; 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 (LXRα, 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 запрещение 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 экдистероидного рецептора у различных классов (насекомые, ракообразные) и отрядов (чешуекрылые, двукрылые и т.д.) членистоногих. По этой причине чувствительность к одному и тому же лиганду у различных видов различная.

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 активизировать целевые функции. Узнавание специфического партнера (лиганда) рецептором является начальным этапом в цепоче сложных процессов, необходимых для проявления биологической активности, и основан на точечном взаимодействии нескольких элементов LBD-домена с экдистероидной молекулой. Экдистероид должен подходить к обязательной по лиганду гидрофобной впадине, так называемому «карману», как ключ к замку. Только в этом случае образуются стабильные и не распадающиеся во времени структуры. Существует большое количество экдистероидных 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 экдистероида, 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-экдистероида. 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-*цис*-ретиноевой кислоты, ведущая к образованию комплекса EcR/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 EcR/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-*цис* и 11-*цис* изомеров, а затем до ретиналей – 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-*цис*-ретиналь входит в состав зрительного пигмента родопсина и принимает участие в физиологических процессах, связанных со светоощущением. 9-*цис*-ретинальдегид при участии цинк-содержащих ферментных белков необратимо трансформируется в лиганд RXR – 9-*цис*-ретиноевую кислоту (9-*cis* RA), кислотную форму витамина А. Кроме главного лиганда – 9-*цис*-ретиноевой кислоты, активизировать RXR-рецептор способны также некоторые производные хлорофилла, в частности фитановая кислота.

Физиологически бездействующая форма экдистероидного рецептора EcR 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 взаимодействию 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-цис-ретиноевой кислоты – вызывает диссоциацию ингибиторов и корепрессоров от его партнера (рецептора EcR) 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 экдистероида на несколько порядков.

Аналогично слабое закрепление 20-hydroxyecdysone, физиологически активного лиганда EcR у насекомых, стимулируется дополнением USP, аналога RXR, приводящего к сродству с рецептором в диапазоне наномолярной концентрации. Косвенное влияние на активацию EcR могут оказать и другие стероидные рецепторы, в частности DXR-38 через кооперацию с USP. У млекопитающих в активации экдистероидов 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 EcR-рецептора необязательно, одновременное закрепление двух лигандов может привести к синергично-фантомной активации деятельности целевого гена.

5.2. Конструирование оптимизированных моделей рецепторов

Второе направление в области компьютерного моделирования активности экдистероидов 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 органо- 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 экдистероид-индуцированных систем, которые бы показывали улучшенную 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 направленным 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 экдистероидом-лигандом, связь с которым не распадается в течение длительного времени.
3. Усиление активности молекулярных конструкций экдистероидных 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 экдистероид-, ретиноид-, тиреоид-, эйкозаноидных рецепторов; участков активации 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 экдистероидами, 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 экдистероид содержащих составов

Массовые экдистероид содержащие растения во флоре России сосредоточены в семействе гвоздичных *(Caryophyllaceae)* – роды *Lychnis, Silene, Sagina, Petrocoptis*. Некоторые виды растений из этих родов содержат до 1-2% экдистероидов в биомассе и до недавнего времени рассматривались как наиболее перспективный источник для получения новых экдистероид 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 фитоэкдистероидов. Если, к примеру, *Rhaponticum carthamoides* синтезирует множе-

ство высокоактивных соединений, сопоставимых с активностью экдистеронда *ponasterone A (rapisterone D, polypodine B, dachryhainansterone*, производные *koladasterone makisterone A)*, то в растениях рода *Silene* достаточно много неактивных составов – *silenoside A; silenosterone 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 экдистероидов, 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-hydroxyecdysone. 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 экдистероидами, изолированными из других видов растений. Адаптогенное действие экдистероидов *Serratula coronata L.* 91% чистоты изучали в Институте биологии Коми НЦ УрО РАН. По результатам исследований сделан вывод, что по величине тонизирующего эффекта экдистеронная фракция *S. coronata* (препарат *ecdysten-S*, содержащий 75% *20-hydroxyecdysone*) во многом схожа с экдистероидной 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 экдистеронной фракцией *S. coronata* (препарат *ecdysone*, содержащий 80,5% *20-hydroxyecdysone*).

М.Б. Плотников с соавторами (1999) провели сравнение гемореологической активности экстрактов из надземной части двух экдистеронд содержащих видов растений – *Lychnis chalcedonica L.* и *R. carthamoides* (Willd.) Iljin – в модельных опытах на крысах с предварительно моделированным инфарктом миокарда. Экстракты содержали примерно одинаковую концентрацию *20-hydroxyecdysone* (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 скорость деформируемости эритроцитов была значительно лучшей у *R. carthamoides*, чем у *L. chalcedonica*.

Сравнительная биологическая активность экдистеронд содержащих растений рода *Serratula* и *Rhaponticum* изучалась Ганневым Ш.Г. в биотестах по индуцированию окукливания личинок насекомых *Musca domestica L.* и *Califora 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. lyratofolia* S.*)*, несмотря на присутствие экдистероидов во всех органах, активными были только надземные части, корни проявляли нулевую или крайне незначительную активность, сопоставимую с контролем.

Химически изолированная фракция экдистерондов – 91% (в т. ч. включающая 75% *20-hydroxyecdysone*), – выделенная из надземной части *Serratula coronata*, в биотесте на реакцию спонтанного Е-розеткообразования обладала сложной и неоднозначной модуляционной активностью «доза-эффект» (названной двухфазным действием) в диапазоне концентраций 10^{-4}...10^{-12}М. Эффективная иммуно-модуляторная активность CD2+-розеткообразования с человеческими Т-лимфоцитами достигалась при концентрации 1 μМ (10^{-6}М), с индексом стимуляции 1,132.

Комплексные экдистероид 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}...10^{-14} М (в расчете на *20-hydroxyecdysone*). На фоне неспецифически активизирующих агентов ConA (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-hydroxyecdysone* 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-hydroxyecdysone* в жидких препаратах примерно равна 0,05%, или 0,5 мг/мл. Установлено стимулирование пролиферации клеток экстрактом *Rhaponticum carthamoides*. Эффективная высшая суточная доза химически чистого *20-hydroxyecdysone* 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 экдистероидов, 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 экдистероидных рецепторов с их лигандами происходит через последовательную цепь событий, где важную роль играют комплексы экдистероидов с водорастворимыми белками, каротиноидами, флавоноидами, ненасыщенными жирными кислотами, микроэлементами и другими физиологически активными веществами.

6.2. Препараты Биоинфузин и ФАНТ

В последние годы разработаны научные основы создания агропопуляций левзеи в качестве промышленно возделываемого лекарственного растения. Установлены особенности жизненного цикла, факторы устойчивости в ценозе, структура биомассы и динамика накопления экдистеродов 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 возможности для разработки новых, обладающих высокой активностью дешевых фармацевтических препаратов из левзеи. В частности, созданы два препарата, которые находят свое применение в ветеринарной медицине, - Биоинфузин и ФАНТ (автор Ивановский 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, выявленная 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%.

$ЛД_{50}$ 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-гидроксиэкдизона. Препарат применялся как телятам, так и поросятам 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-hydroxyecdysone*, равны 0,1-0,5 мкг/кг (10^{-12}...$2\cdot10^{-13}$ М).

Фитокомплекс на основе левзеи 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–синергисты (L.plantarum, R.albus, B.subtilis) и экстракт левзеи сафлоровидной. Расфасован в полиэтиленовые пакеты или бутыли емкостью от 500 до 2000 г. Содержит 0,005% *20- hydroxyecdysone*.

Для него характерна высокая степень целлюлозолитической активности, что делает затруднительным развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры в кишечнике. Препарат обладает также анаболическим и адаптогенным эффектом. ФАНТ 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-hydroxyecdysone* 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 (30-35^0 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 экдистероидов:

1. Ретиноидный рецептор RXR является неохотным партнером димеризации с экдистероидным рецептором EcR, и необходимы очень высокие концентрации экдистероидов для возбуждения экдизон-индуцированных систем;
2. Диапазон активных лигандов по существу ограничен исключительно экдистероидом *muristerone 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 экдистероидов, 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 экдистероидных рецепторов, запрещая им димеризоваться и взаимодействовать с другими корегуляторными белками в отсутствии 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 шаперонны также нуждаются в дополнительных составах-помощниках, в качестве которых выступают иммунокомпетентные 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, названных 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 экдистероидного 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 отсутствии 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.

структуре хроматина становится доступной для запуска механизмов транскрипции и приводит к экспрессии чувствительных генов. Лиганды же антагонисты, хотя и могут вызвать димеризацию рецептора, стимулируют такую трансформацию LBD, которая не позволяет связывать коактиваторы. Предполагается, что функциональные участки, служащие для привлечения дополнительных активизирующих 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. Многоточечное 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 приемлемых носителей.

6.4. Взаимодействия со стрессовыми белками

Истоки высокой биологической активности у важнейших экдистероид 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 экдистероидов, 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 репарацию 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 экдистероид содержащими субстанциями, опосредованы через систему вторичных мессенджеров. В этих случаях экдистероиды 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, заканчивающимися 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 метаболическую активность или проводимость ионного канала. Результатом является изменение ферментативной активности, цитоплазматической концентрации иона, ведущее к возникновению клеточного ответа. Вторичный мессенджер, появляющийся внутри клетки в ответ на внеклеточную аппликацию лиганда и обес-

печивающий передачу сигнала от рецепторов к внутриклеточным мишеням, состоит, как правило, из нескольких белковых компонентов, совокупность которых составляет каскад передачи сигнала. Помимо белковых посредников, в передачу 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. EcR.

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, экдистероид) 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 противоастматических средств, бета-блокаторов (от сердечно-сосудистых болезней), антагонистов ангиотензина (при гипертонии), опиатов (противоболевые средства). Лиганды, действующие через 7ТМ-рецепторы, включают широкое разнообразие химических соединений: ионы кальция и калия; аминокислоты; моноамины (серотонин, гистамин, допамин, адреналин, норадреналин, ацетилхолин, катехоламин 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 паращитовидной 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 экдистероид содержащих субстанций также обусловлено взаимодействием с ТМ-рецепторами. Физиологические действия и перечень терапевтических показаний по использованию экдистероидов в медицинской практике во многом схожи с действием лигандов трансмембранных рецепторов и включают регуляцию минерального, углеводного, липидного и белкового обмена; проявление антиоксидантных, иммуно-модуляторных свойств и т.д.

Предполагается, что во взаимодействиях с трансмембранными рецепторами (трансдукция сигнала внутриклеточным мишеням) важная роль принадлежит вторичным посредникам экдистероид содержащих соединений – пептидам, липидам, аминокислотам, соединениям фосфора, кальция, калия, а также другим макро- и микроэлементам. В частности, в отношении экдистероид содержащего растения *S. coronata* было показано, что проявление антиоксидантной активности биологически активного комплекса, содержащего 5% *20-hydroxyecdysone*, в значительной степени обусловлено присутствием аминокислоты аргинина. Вклад последнего в снижение максимальной интенсивности хемилюминесценции, индуцированной перекисью водорода (H_2O_2), составило 72,6%; Fe^{2+} – 76,7%. Кроме того, известно, что присутствие широкого спектра экдистероидных 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, ксилозиды), ацетоном и т.д.

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

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

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

Заключение

Экдистероиды 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 экдистероиды не синтезируются, в большинстве случаев они передаются от растений, где осуществляется их биосинтез, нижеследующим звеньям пищевой цепочки. Физиологические эффекты экдистероидов на организм человека и теплокровных животных весьма разнообразны. Широкое распространение экдистероидов в природе закономерно приводит к вопросу относительно уровней и механизмов проявления ими биологической активности. Разработка теоретических основ молекулярных особенностей проявления активности экдистероидов – 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 экдистеронные рецепторы (BII-биотест). Результаты биотестов более 300 индивидуальных соединений из источников животного и растительного происхождения позволили создать единую базу данных структурного разнообразия экдистероидов, присутствующих в живых системах. Установлено, что экдистероиды существуют в виде C17-C30 молекул, среди которых чаще всего распространены и высокоактивны C27-C29 структуры. Наибольшей активностью обладают индивидуальные экдистероиды эволюционно отдаленных групп: *ponasterone A, muristerone, rapisterone D*, а также производные *kaladasterone* и *makisterone A, polypodyne B*.

Зооэкдистероиды, циркулирующие в гемолимфе насекомых, малоактивны, за исключением *20-hydroxyecdysone*. Близкие по химической структуре брассиностероиды, витанолиды, лимоноиды, кукурбитацины, а также алкалоиды, брассиностероиды, карденолиды, хромены, гликоалкалоиды, лигнаны, фенилпропаны и тритерпеноиды не действуют как агонисты или антагонисты экдистероидов в BII биотесте. Продукты искусственного химического синтеза также неактивны, кроме нескольких соединений из класса *bisacylhydrazines*, обладающих слабой активностью в биотестах. Поиск оптимальной конфигурации и конформационного состояния модельных экдистероидов 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 экдистероидов. 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 порядков. Однако нужно признать, что на сегодняшний день искусственные модели все еще несовершенные, чтобы учитывать все тонкости структурного разнообразия строения молекул экдистероидов.

Второе направление в области компьютерного моделирования активности экдистероидов развивается в области молекулярного усовершенствования конструкций рецепторов, которые бы оказывали 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 активации (факторов экспрессии генов). В реальных системах с клетками млекопитающих, в отличие от биотестов (опытов с искусственными пробироч-

ными системами *in vitro*), возникают важные ограничения в проявлении активности экдистероидов. Большинство химически очищенных от вторичных метаболитов экдистероидов, 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 или 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-rexinoids), 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 экдистероид содержащих растений в медицине можно ожидать суммирования негеномного и геномного эффекта действия фитоэкдистероидов 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 экдистероидов в растениях и культуре ткани Serratula coronata // Физиология растений. - 1998.- №3.- С.382-389.
2. Ахмед И. Фитоэкдистероиды серпухи невооруженной (Serratula inermis) и их влияние на биосинтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот в тканях цыплят с различной обеспеченностью витамином $Д_3$: Автореф. канд...биол. наук. - Киев. - 1993.- 27с.
3. Ахрем А.А., Ковганко В.В. Экдистероиды: Химия и биологическая активность. - Минск: Наука и техника, 1989. - 327с.
4. Балтаев У.А. Фитоэкдистероиды – структура, источники и пути биосинтеза в растениях // Биоорганическая химия. - 2000.- Т.26.- №12. - С.892-925.
5. Володин В.В., Тимофеев Н.П., Колегова Н.А. Содержание 20-гидроксиэкдизона в различных экдистероид содержащих лекарственных препаратах // Международное совещание по фитоэкдистероидам. - Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 1996. - С.138.
6. Володин В.В., Чалин И.Ф. Обзор: Экдистероиды 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-гидроксиэкдизона и его ацетатов // Растительные ресурсы, 1999. - Т.35. - №2. - С.76-81.
8. Гаджиева Р.М., Португалов С.Н., Пауюшкин В.В.и др. Сравнительное изучение анаболизирующего действия препаратов растительного происхождения экдисена, леветона и «Прайм-Плас» // 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 фитоэкдистероидов 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., Гордеев В.А. и др. Превентивное и терапевтическое действие фитоэкдистероидов 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. Фитоэкдистероиды – перспективы применения в хирургической практике // От коллатерального кровообращения к органосберегающим операциям.- Рязань, 1999. -С.211-214.
13. Дармограй В.Н., Петров В.К., Ухов Ю.И. Теоретическое и клиническое обоснование концептуальной модели механизма действия фитоэкдистероидов // Биохимия на рубеже XXI века. Межрег. сб. науч. тр. Рязань, 2002. - С.489-492.
14. Зелеихов В.Н., Тимофеев Н.П., Колесникова О.П. и др. Выявление биологической активности для водных экстрактов листовой части лекиеа сафлоровидной на модели in vitro // Мат. I Росс. науч.-практич. 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. Фитоэкдистероиды растений семейства Caryophyllaceae: Автореф. док...хим. наук. - Новосибирск: Институт биоорганической 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, биоинфузина, грамина и бактоцеллолактина для повышения естественной резистентности животных // Диссертация на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук. - Москва, 2001. – 280 с.
18. Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А. и др. Антиоксидантный эффект 20-гидроксиэкдизона в модельных системах // Военно-медицинский журнал, 1999. - №3. - С.35-38.
19. Курмуков А.Г., Сыров В.Н. Противовоспалительные свойства экдистерона // Медицинский журнал Узбекистана, 1988. - №10. - С.68-70.
20. Лафон Р. Фитоэкдистероиды 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. Орджоникидзе - Москва: Литтерра, 2003. - 320с.
22. Миронова В.Н., Холодова Ю.Д., Скачкова Т.Ф. Гипохолестеролемический эффект фитоэкдизонов в экспериментальной гиперхолестеролемии на крысах // Вопросы медицинской химии, 1982. -№3. - С.101-104.
23. Осинская Л.Ф., Саад Л.М., Холодова Ю.Д. Антирадикальные свойства и антиоксидантная активность экдистерона // 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 Lychnis chaldedonica L. и Rhaponticum carthamoides (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 иммунотропического действия фитоэкдистероидов // 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.П., Султанов М.В. Действие фитоэкдистероидов на желчеотделительные функции печени в норме и при экспериментальном гепатите // Фармакология и токсикология, 1986. - №3. - С.100-103.

30. Тимофеев Н.П. Исследования по экдистероидам: 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 экдистероидов. Ч. I. Ponasterone и muristerone // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: Сб. трудов. Вып. 7. – М.: РАЕН, 2003. – С. 11.
33. Тимофеев Н.П. Фитоэкдистероиды: 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 рапонтика // Международное совещание по фитоэкдистероидам.- Сыктывкар: Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, 1996. - С.133.
35. Тимофеев Н.П., Кокшаров А.В. Макроэлементный профиль Rhaponticum carthamoides (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-фармацевтический журнал, 2000. - Т.34. - №9. - С.24-26.
37. Томашко К.Х., Гюклер Р. Экологическое значение экдистероидов у морских артропод // Международное совещание по фитоэкдистероидам. - Сыктывкар: Коми НЦ УрО РАН, 1996. - С.43-44.
38. Хатымов Р.В., Муфтахов М.В., Мазунов В.А. и др. Особенности масс-спектров резонансного захвата электронов молекулами экдистероидов // Известия Академии наук: Серия химическая, 2002. - Вып.2. - С.291-294.
39. Шаин С.С., Терехин А.А. Растения против стрессов. - Москва: Оверлей, 2002. - 160с.
40. Aarnisalo P., Kim C-H., Lee J.W., Perlmann T. Defining requirements for heterodimerization between the retinoid X receptor and the orphan nuclear receptor Nurr1 // 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., Kalman A., Argay G., Kalasz H. The analysis and crystallographic characterization of 20-hydroxy edysone // Curr Med Chem, 2000. -Vol.7.- No.12. - P.1305-1312.
43. Butenandt P. Karlson. Uber die isolierung eines metamorphose-hormones der insekt n in kristallisierten form. Z // Naturforsch, 1954. - No.9b. - P.389-391.
44. Carlson G.R., Cress D.E., Dhadialla T.S., Hormann 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., Hormann 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., Gathori 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, CatteshallLane 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., Hormann R.E., Dinan L. 4D-QSAR Analys of a Set of Ecdysteroids and a Comparasion 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. Anti diabetic 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. Voelimy 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.

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

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