# АКТИВНОСТЬ ЭКДИСТЕРОИДОВ В БИОТЕСТАХ, ИСКУССТВЕННЫХ (КОМПЬЮТЕРНЫХ) МОДЕЛЯХ И ЖИВЫХ СИСТЕМАХ

*Тимофеев Н.П.*

**КХ БИО, г.Коряжма**

***Проанализирована биологическая активность экдистероидов, исходя из базы данных структурного разнообразия и ключевых моментов взаимодействия с рецепторами. Показаны современные достижения в области прогнозирования активности программными средствами CoMFA и 4D-QSAR, приведены сравнительные результаты оптимизированных алгоритмов компьютерного моделирования. Рассмотрены направления исследований по молекулярному конструированию усовершенствованных конструкций рецепторов экдистероидов.***

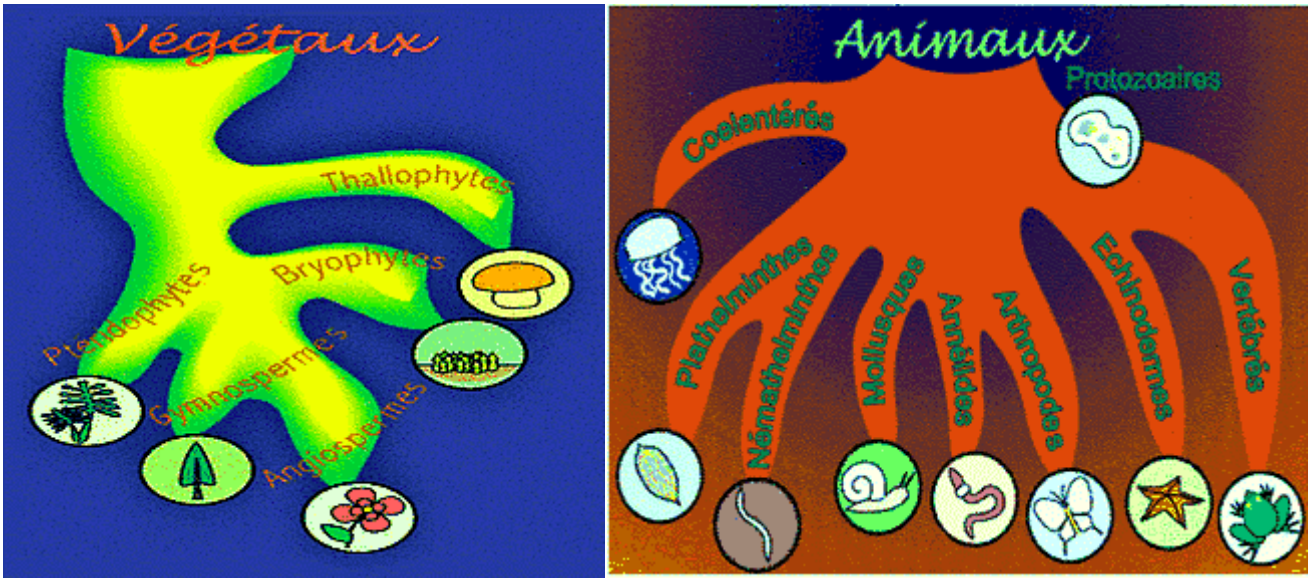
**СОДЕРЖАНИЕ**

**Введение**
**1. Физиологические действия экдистероидов**
**2. Фармакологическое использование**
**3. Активность экдистероидов в биотестах**
**4. Исследования в области компьютерного моделирования активности**
**4.1. Базы данных структурного разнообразия экдистероидов**
**4.1. Результаты экспериментов по моделированию активности лигандов**
**5. Исследования в области конструирования рецепторов**
**5.1. Особенности лиганд-рецепторного взаимодействия экдистероидов**
**5.2. Перспективы конструирования усовершенствованных моделей рецепторов**
**6. Активность экдистероидов в медицине**
**6.1. Различия в активности экдистероид содержащих составов**
**6.2. Кофакторы активности**
**6.3. Взаимодействия со стрессовыми белками**
**6.4. Эффекты с трансмембранными рецепторами**
**Заключение**
**Литература**

## Введение

Экдистероиды составляют самое распространенное и многочисленное семейство стероидных соединений в биосфере; они участвуют в жизнедеятельности практически всех классов организмов, выполняя множественные функции. Присутствие экдистероидов характерно как для растительного, так и животного мира [1-2]. Наиболее массово они обнаружены в папоротниках, голосеменных и высших цветковых растениях (рис. 1А), членистоногих (насекомые и ракообразные), в некоторых одноклеточных простейших, древних группах кишечнополостных (медузы, полипы, кораллы), а также в моллюсках, кольчатых и плоских червях (цестодах и трематодах), нематодах (рис. 1В). Ни одним из видов млекопитающих экдистероиды не синтезируются, 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 следовых количествах и не могут рассматриваться в качестве потенциальных источников промышленного использования. Первичный химический синтез экдистероидов в искусственных условиях не осуществляется, как правило, из более активных природных соединений методом химической трансформации могут быть получены малоактивные продукты вторичного значения [3]. Аналогичные проблемы возникают при использовании методов биотехнологии – биосинтез в условиях культуры тканей, клеток или модифицированных корней сопровождается накоплением неидентифицированных или неактивных соединений [4-5].




**A** **B**

*Рис. 1. Присутствие экдистероидов в царстве животных (слева) и растений (справа); по www.quasimodo.versailles.inra.fr/ecdyzone*

Исходя из активности и доступности, практическое значение имеют фитоэкдистероиды; они содержатся практически во всех растительных объектах, но различия в уровнях концентрации достигают огромных величин – 8-9 порядков [6]. Присутствие повышенных их количеств характерно, наряду с отдельными родами цветковых растений, для таких древних организмов, как папоротники, грибы, мхи, водоросли, голосеменные растения [7]. 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 эволюционной продвинутости [8]. 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 [9-12].

Некоторые из экдистероид содержащих растительных источников 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 2.3 миллиардов долларов [17-18]. Другими важными источниками для производства новых противораковых средств признаны: тисс коротколистный – Taxus brevifolia; китайский гриб-трутовик – Polyporus umbellatus; рапонтикум или левзея 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 [2-3, 7, 11-16].

Современный уровень научных изысканий по экдистероидам включает как фундаментальные исследования в области генетики, клеточной и молекулярной биологии, биомедицинской химии, физиологии человека, животных и растений, так и прикладные направления, направленные 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 фитоэкдистероидов (рис. 2) – ponasterone (ponA), muristerone (murA) и ecdysterone (20-hydroxyecdysone, 20E). В патентной базе США (US Patent & Trademark Office), режиме поис-

ка по ключевым словам, наибольшее число патентов по состоянию на начало 2005 года зарегистрировано по muristerone – 82 (рис. 3А).

Быстрыми темпами растет число заявок на патенты (pregrant), особенно с использованием высокоактивных составов. Число поданных заявок за период 2001-2004 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 поданных за последние 4 года заявок с использованием muristerone составляет 33, ponasterone – 18, ecdysterone – 8, по всем остальным экдистероидам – 7. В предыдущие 20 лет в среднем за год патентовались 1-3 работы. За 2003 год темпы прироста зарегистрированных патентов по отношению к предыдущему периоду времени за 1995-2002 гг. составили 253 % (рис. 3В). По ponasterone этот показатель за 2003 год был равен 333 %, по ecdysterone – 205 %.

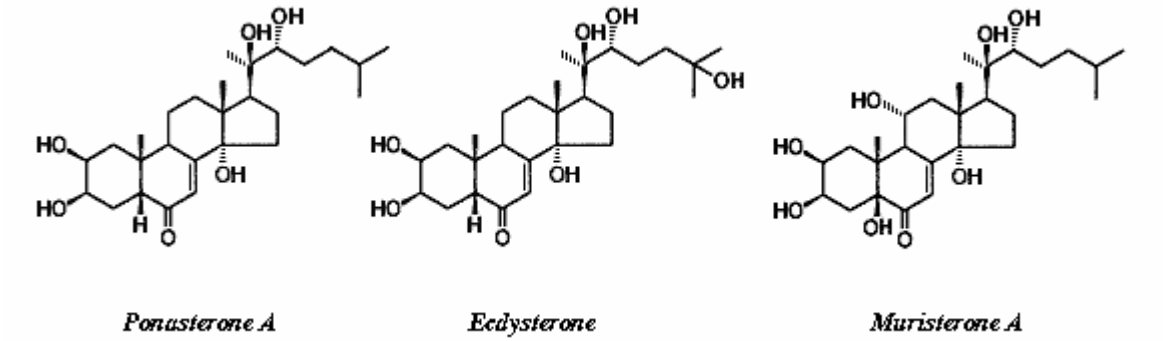



*Рис. 2. Экдистероиды, нашедшие широкое практическое применение*

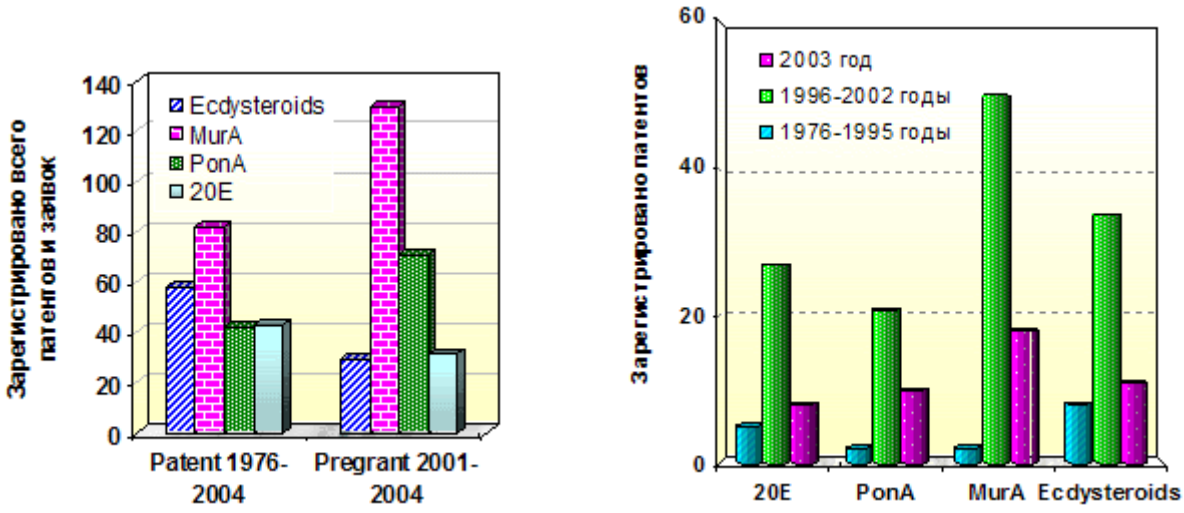



*Рис. 3. Динамика прироста патентной базы США по экдистероидам*

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 Интернете (www.scirus.com), эти вещества во многих отношениях еще остаются до конца непознанными и окутанными множеством легенд.

Проблема здесь подразделяется на несколько моментов:

1. Существует откровенная спекуляция темой, вызванная стремлением заработать на наукообразии, дефиците общедоступной информации. Если проследить за рекламными публикациями в Интернете и массовых изданиях, складывается впечатление, что любые экдисте-

роиды и препараты на их основе, независимо от активности и источников получения, способны творить чудеса – вернуть молодость 70-и летнему старцу, вылечить раковую болезнь, нарастить 7 кг “железных” мускулов в месяц и т.п. Где правда и где ложь, а где заблуждения? А если такие слухи возникают, наверное, имеются единичные случаи реальных фактов под легендами.

Если даже исходить из результатов положительных экспериментов с участием некоторых фитоэкдистероидов из отдельных источников, данный факт не может быть рассмотрен в качестве всеобщей закономерности. Следует иметь в виду, что коммерческий продукт 95 % чистоты еще не характеризует активность конкретного соединения, так как имеются еще и другие соединения, в сотни и тысячи раз более активные при следовых концентрациях, или же неактивные, блокирующие действие основного экдистероида. Поэтому, активность даже 98 % химически очищенных экдистероидов не всегда одинакова от разных источников.

2. По экдистероидам много неизвестного, особенно по молекулярным механизмам их действия. 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 экдистероидов в организм с рационом питания еще не означает автоматического проявления их активности; примерно из 20 тысяч потенциальных растительных источников (5 % растений с повышенным содержанием фитоэкдистероидов из мировой флоры) реально используются не более двух десятков видов.

Имеются многочисленные примеры, когда высокая концентрация экдистероидов в пище не оказывает никакого воздействия на человека. Например, можно употреблять сколь угодно много салата из листьев шпината огородного (Spinacia oleracea), молодых побегов серпухи венценосной (Serratula coronata) или съедобных видов папоротников (Polypodium), не испытав при этом никакого влияния экдистероидов, 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 действий, 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. Физиологические действия экдистероидов

Полвека прошло с тех пор, как экдистероиды были впервые изолированы [19], а затем идентифицированы из куколок тутового шелкопряда *Bombyx mori* [20]. В растениях эти вещества впервые обнаружены примерно сорок лет назад [21]. Хотя значительный прогресс был достигнут в понимании того, как экдистероиды 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.

Экдистероиды 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 (насекомых и ракообразных) в концентрациях 10-7…10-9 М и инициируют превращения, происходящих в эмбриогенезе и ходе развития личинки с метаморфозом до взрослого насекомого [22-23]. Периодические линьки вызваны пиками экдистероидов, синтезируемых в проторакальных железах под воздействием нейропептидов, вырабатываемых в мозге насекомых [24]. Аналогичные физиологические действия экдистероидов предполагаются в отношении моллюсков, гельминтов и кольчатых червей [1].

Некоторые морские организмы (например, пикногониды и кораллы) секретируют весьма высокие уровни экдистероидов (10-3 М), которое интерпретируется исследователями как средство защиты от нападения хищников. Например, выброс экдистероидов *Pycnogonum litorale* против десятиногого ракообразного *Carcinus maenas* вызывает нарушение гормонального равновесия и отпугивание последнего [25].

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 [26-27]. 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 [28-29].

Экдистероиды относятся к низкотоксичным веществам, ЛД50 для *20-hydroxyecdysone* составляет 6.4 г/кг при внутривенном и 9.0 г/кг при пероральном введении [30]. 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 внутривенным введении, 0.4 ч – при пероральном и 2.0 ч – при внутримышечном введении. У крыс полувывод 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 *α-ecdysone.* Для *ponasterone A* длительность полураспада при внутрибрюшной инъекции составила 0.8 ч [31].

Показано, 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 [32-33]. Выделительный путь – через печень и желчь в кишечник (кал) и мочу. Через сутки после приема *20-hydroxyecdysone* почти полностью элиминируется из организма [29]. 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 [34]. Одновременно, наряду с основным, использованным в эксперименте экдистероидом, в моче спортсменов идентифицировано появление новых метаболитов, в частности, менее активных *2-deoxyecdysterone u deoxyecdysone.* Данный факт может быть объяснен микробиальной трансформацией *20-hydroxyecdysone* под действием анаэробных бактерий, заселяющих кишечник человека [30].

Физиологические эффекты экдистероидов на организм человека и теплокровных животных весьма разнообразны. Они регулируют минеральный, углеводный, липидный и белковый обмен [35-39]. Способность их к нормализации уровня сахара в крови может быть полезной при лечении сахарного диабета [40-41]. Экдистероиды нормализуют также уровни

холестерина [35, 42]; снимают воспаление печени, вызванное токсическим гепатитом [43]; обладают способностью дублировать действие витамина D3, проявляя антирахитичный эффект [26].

Известно проявление ими антиоксидантных [44-45], противомикробных [46-47], противовоспалительных [48] и ранозаживляющих свойств [49-50]. Кроме того, они оказывают иммуно-модуляторное [51-52], адаптивное, стрессопротективное и ноотропное действие [53-56], а также противосудорожный эффект при спонтанной эпилепсии [57].

Установлено стимулирование кроветворной функции (эритропоэз), усиление регенерации и возрастание концентрации эритроцитов и гемоглобина в крови при использовании *20-hydroxyecdysone* [58]. Наблюдается повышение активности элементов защитной системы крови – лимфоцитов и нейтрофилов [59], усиление функций фагоцитоза [51-52]. Ацетаты и производные *20-hydroxyecdysone* также стимулировали биосинтез ДНК в лимфоцитах человека и животных, активированных поликлональными митогенами [142]. Показано превентивное и терапевтическое действие фитоэкдистероидов при индуцируемой анемии и лейкопении [54], в лечении угрожающего прерывания беременности [143], нарушений в деятельности половой функции [144], а также климактерического синдрома, вызванного возрастными изменениями в регуляции репродуктивного цикла [145].

Экдистероиды являются причиной анаболического эффекта, стимулируя биосинтез белка в печени, почках и мускульных мышцах [36, 60-62, 146-147]. Это свойство широко используется для коррекции массы тела во время тренировочного процесса и достижения высоких показателей в профессиональном спорте [63-66]. В отличие от синтетических стероидов, высокая расположенность к синтезу протеина при приеме некоторых экдистероид активизированных составов не сопровождается опасными для жизни побочными эффектами. Поэтому они, кажется, являются желательными и достойными заменителями для таких популярных, но запрещенных из-за своей токсичности средств тестостеронового ряда, как *methandrostenolon (dianabol, anabol, reforfit, nerobol, pronabol и т.д.),* используемых в скоростных и силовых видах спорта [56, 67-68].

Подробный обзор физиологических эффектов действия экдистероидов приведен в работе R. Lafont и L. Dinan [30]. Авторы отмечают, что наряду с большим количеством опубликованной за последние три десятилетия информации имеются результаты экспериментальных исследований, не подтверждающих в ряде случаев общеизвестные факты. Так, например, данные по противоопухолевой активности неоднозначны, отмечен случай, когда *20-hydroxyecdysone* стимулировал рост опухоли молочной железы при подкожной инъекции в течение 5 дней, а *α-ecdysone* вызывал опухолевое поражение в жабах и мышах. Японские исследователи не выявили противовоспалительного эффекта *20-hydroxyecdysone* в дозе 5 мг/кг, изолированного из корней бразильского растения *Pfaffia iresinoides,* применяемого в течение 7 дней [69-70].

Также, данные по анаболической активности экдистероидов 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 мкг/кг/день [71] и 0.035 мг/кг [72] – до очень больших концентраций, равных 5-20 мг/кг [62, 147], или же проявляться с незначительным эффектом, составляющим 112-116 % относительно контроля [61]. Анаболический эффект сопоставимых доз экдистероидов из многих других источников, в частности, изолированных из *Serratula coronata,* не зафиксирован [55, 73].

## 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 стимулирующих средств при умственном и физическом утомлении, пониженной работоспособности, импотенции, ослаблении функций раз-

ных органов [53, 56, 74-75]. Могут применяться для заживления ран и язв, лечения ожогов [49, 76-77]; улучшения половой функции, стимулирования либидо и устранения дискомфорта в сексуальной жизни [78-79, 148].

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 [66-80]. Вне официальной медицины в наибольшей степени распространено профилактическое использование в качестве адаптогенных, анаболических, антидепрессивных, гемореологических, ноотропных и противоопухолевых средств [55, 81-83].

Не являясь истинными эндогенными гормональными сущностями, при сочетании определенных условий экдистероиды могут обладать гормоно- или витаминоподобными действиями. 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 [84]. Наиболее известные их представители:

*Polyporus umbellatus* (Eichhase) – китайский гриб-трутовик, содержит микоэкдистероиды *polyporusterone A…G.* Известны древние китайские источники об использовании вида в качестве "лекарства от крестьян" еще за 2000 лет до нашей эры. Современные исследования китайских ученых подтверждают значительную противораковую активность *P. umbellatus,* эффективность торможения им развития опухолей.

*Bombyx mori* L. – тутовый шелкопряд, личинки насекомых 4-5-го возраста содержат 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*, произрастающих в лесах Южной Америки, используются 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 аборигенами Северной Америки в качестве психозомиметических средств, физиологический эффект которых обусловлен совместным действием экдистероидов и галлюциногенных алкалоидов.

*Achyranthes bidentata* и *A. aspera* – соломоцвет 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. 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 сред-

ство, 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, dachryhainansterone, taxisterone*. Один из главных источников противораковых средств в современной медицине. Наиболее известны как священные деревья древних кельтов дохристианской эры. Символизировали вечную жизнь из-за их вечнозеленности, 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 половое поведение 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, coronatasterone* и т.д. (рис. 4).

*R. carthamoides* является “легендой древней восточной медицины,” у коренных жителей Сибири и Монголии использовался в качестве источника духовной, физической и половой силы. Этноботаническое начало растений рода *Rhaponticum* уходит корнями в глубины древней восточной медицины, где они использовалось под названием *Lou lu* и *Lou cao* [85]. 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 интродукторов X века [86]. У русских переселенцев в XI-XII веке на Алтае ходило поверье о чудодейственной силе этого растения, который лечит от 14 недугов и возвращает молодость [82].

По легенде у местных народностей Забайкалья, сила травы такова, что после ее употребления воин одним лишь прикосновением руки может вырвать дерево с корнями. Если отвар травы примет 90-летний старец, у него восстанавливается половая сила и он может жениться на девушке 16 лет. По легенде, траву можно найти в гнезде птицы “харатан-шол”, приносящую ее с гор, или же нужно добыть изо рта убитого охотниками оленя-марала [87]. 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, афродизическое для стимулирования сексуальной активности, тонизирующее, общеукрепляющее, ранозаживляющее, противоопухолевое, анаболическое, гемореологическое; при заболеваниях нервной и сердечно-сосудистой системы и т.д. (http://leuzea.ru).

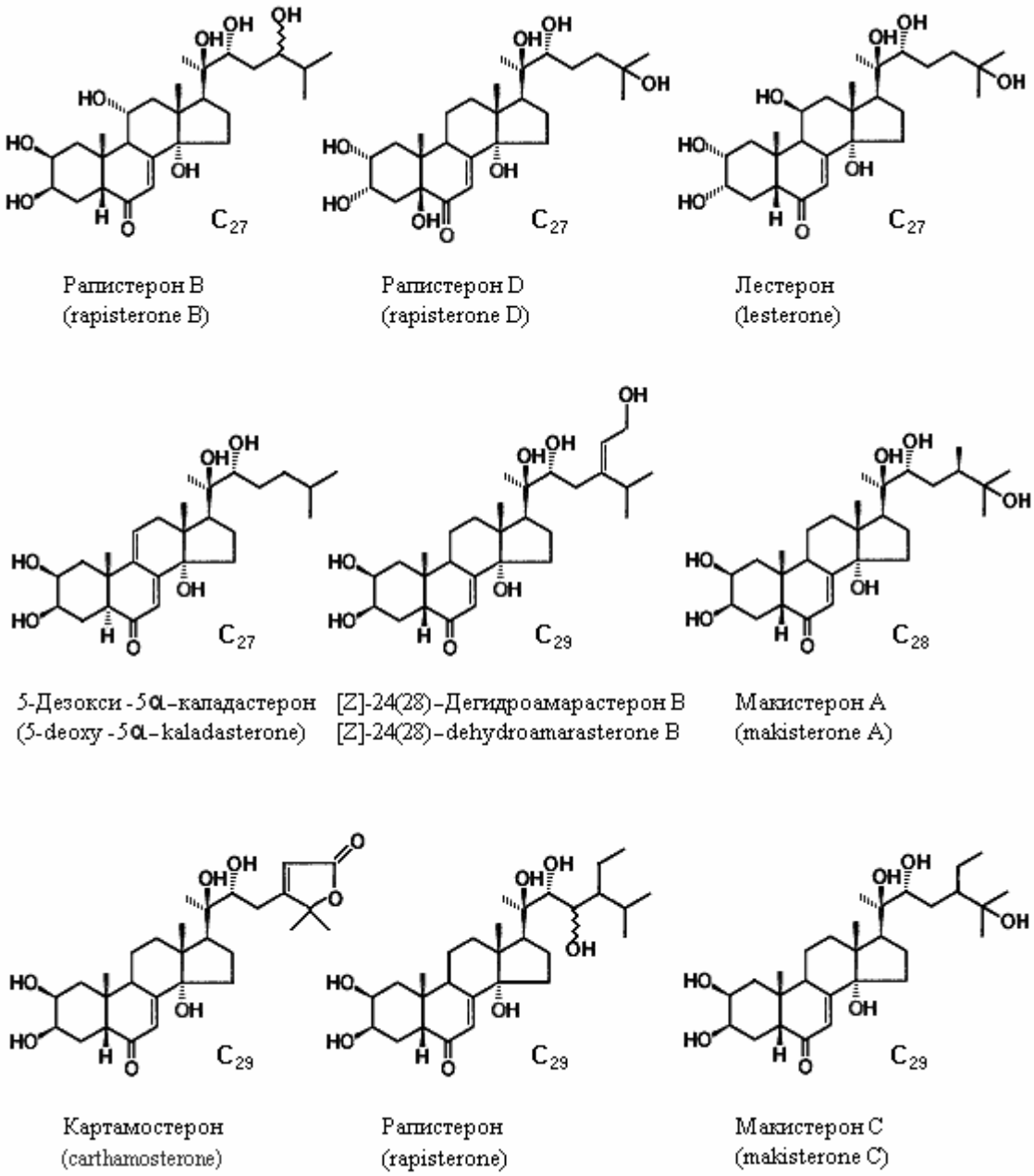



*Рис. 4. Фитоэкдистероиды Leuzea – Rhaponticum carthamoides (Willd.) Iljin*

Наиболее известная система использования лекарственных средств разработана в китайской и тибетской медицине. Среди 2270 видов китайских лекарственных средств [88], включающих минералы, растения, грибы и животные ткани, представлены все главнейшие экдистероид содержащие виды (http://ccat.sas.upenn.edu/~nsivin/index.html). Современный поставщик китайских лекарственных трав и экстрактов (около 500 видов), компания Hunan kinglong Bio-resource, Ltd. (http://www.aerospace.com), включает в основном те же самые широко известные виды (табл. 1).

В настоящее время среди 172 экдистероид содержащих препаратов различных форм, предлагаемых на мировом коммерческом рынке, около 36 % долевого участия занимают препараты из *R. carthamoides* [30, 89]. Относительная доля других видов в структуре источников составляет: *Pfaffia* – 28 %, *Cyanotis* – 14 %, *Polypodium* – 4 %, *Achyranthes* и *Ajuga* – по 1 % (рис. 5). Препараты без указания видов-источников выпускаются из химически изолированных экдистероидов (22 %, 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).

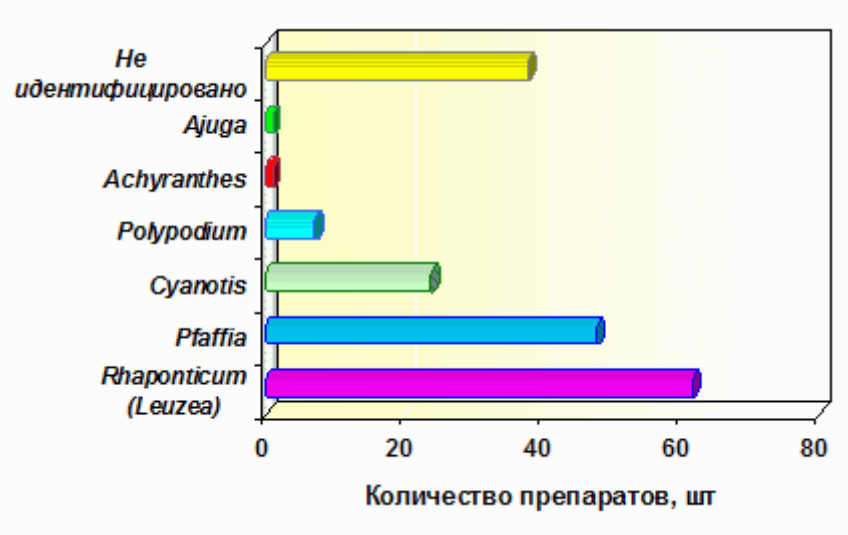



*Рис. 5. Мировой рынок экдистероид содержащих препаратов из растений мировой флоры; по [30, 89]*

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 [77], 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 актопротекторной 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 [90, 91] обращают внимание на такие эффекты экдистероид 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 [66], 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;
- улучшают реологические свойства и микроциркуляцию крови в сосудах головного мозга и работающих мышц;
- нормализуют деятельность эндокринной системы организма;
- 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 свободнорадикального 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. Активность экдистероидов в биотестах

В 70-80-х годах были проведены многочисленные исследования по выявлению биологической активности экдистероидов в биотестах с использованием методов воздействия на личинки насекомых (пропитка 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, снижающих жизнеспособность особей – индуцированию сверхнормального количества линек, преждевременному окукливанию, появлению гусениц с несколькими головными капсулами [92-93].

Однако данный метод далек от совершенства, так как требует достаточно долгого времени для проявления реакций метаморфоза, кроме того, при этом не всегда удается обеспечить со-

хранность 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 ($B_{II}$-биотест), в сочетании с радиоимунным анализом (РИА).

В биотестах могут использоваться различные изоформы экдистероидных рецепторов, выделенных из следующих видов насекомых (EcR): *Drosophila melanogaster* (DmEcR); *Plodia interpunctella* (PiEcR); *Bombyx mori* (BmEcR); *Manduca sexta* (MsEcR); *Chironomus tentas* (CtEcR), *Heliotes virescens* (HvEcR); *Choristoneura fumifurani* (CfEcR); *Aedes aegypti* (AaEcR) и т.д. Метод позволяет также оценить относительную активность составов, оказывающих экдистероид-подобное или экдистероид-ингибирующее действие (лиганды-агонисты и лиганды-антагонисты).

В зависимости от специфики объекта, положенного в основу биотестирования, может проявляться преимущество различных экдистероидов с теми или иными рецепторами. Поэтому для уточнения полученных результатов используются параллельные биотесты со вкусовыми хеморецепторами членистоногих, в частности краба *Carcinus maenas*. Физиологически активным у насекомых является экдистероид *20-hydroxyecdysone;* активность его в биотестах равна 10-8 М. 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 [94]. Димеры возможны и в отношении *ponasterone A, ajugasterone C* [3].

Растения могут быть источником других стероидных соединений, которые, присутствуя в остаточных количествах совместно с исследуемым веществом, могли бы взаимодействовать с экдистероидными рецепторами как агонисты 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 [11]: – брассиностероиды, оказывающие физиологическое влияние на рост и развитие растений; – специфичные субстанции защитного свойства (реппеленты, антифиданты, яды), активные против травоядных животных и паразитических грибов: кукурбитацины, карденолиды, буфадиенолиды, сапогенины, витанолиды и стероидные алкалоиды.

Присутствие аллелохемических веществ в растениях, структурно связанных с гормонами позвоночных (эстрогены, андрогены, прогестероны и т.д.), строго не доказано. L. Dinan и др. [11] полагают, что более ранние сообщения об их наличии и местонахождении на основе цветных реакций и низкоэффективных хроматографических 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 С27…С29 структуру. Всего из растительных объектов изолировано около 40 индивидуальных брассиностероидов, включая папоротники. В опытах с высокоочищенными составами, когда исключалась возможность действия остаточных количеств ферментов и других метаболитов, влияние брассиностероидов на экдистероид отзывчивые системы не было обнаружено [14]. 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 BII биотесте, 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. [95] приводятся результаты BII 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* (2.0x10-5 M). 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* (рис. 6), имели активность 7x10-7 M, что в 2400 раз меньше контрольного экдистероида *ponasterone A*.

Активность витанолидов и лимоноидов незначительная или очень слабая (соответственно 2.5x10-6 M – для *2,3-dihydro-3β-hydroxywithacnistine;* 10-4…10-5 M – для *prieurianin u rohitukin*). Другие вторичные метаболиты (алкалоиды, брассиностероиды, карденолиды, хромены, гликоалкалоиды, лигнаны, фенилпропаны, тритерпеноиды) 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* [3]. 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]* (рис. 7). Эти составы хотя и активизировали в биотестах EcR-рецепторы *Manduca sexta* и *Drosophila melanogaster* в концентрациях 10-7 M, но все же они недостаточно эффективны, чтобы заменить экдистероиды. В альтернативных биотестах со вкусовыми сенсиллами членистоногих активность их оказалась нулевой.

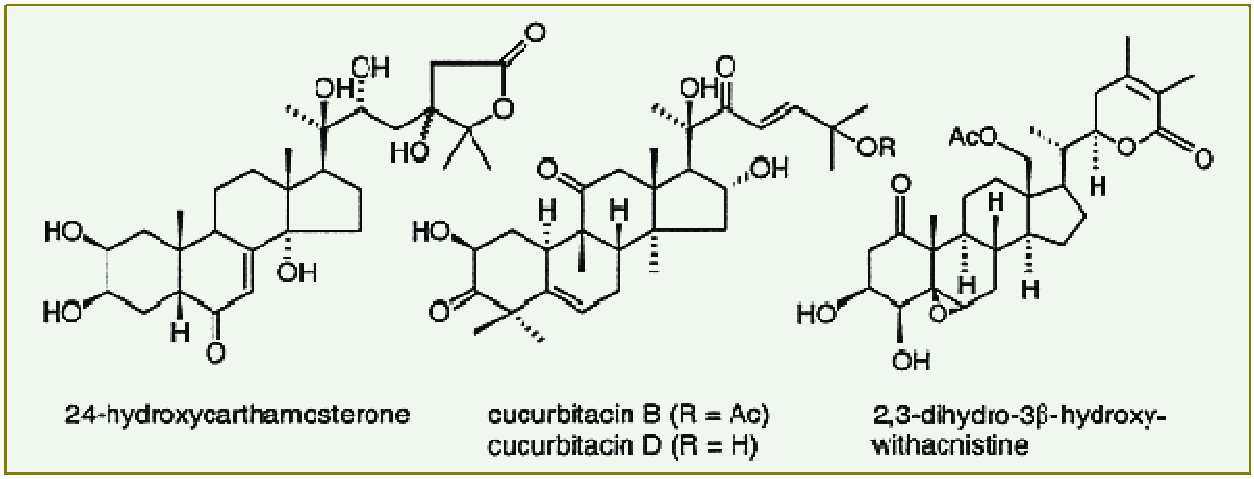



*Рис. 6. Природные антагонисты экдистероидов (по Dinan, 2003)*

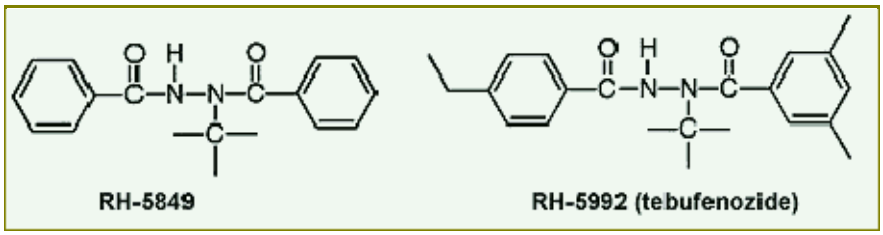



*Рис. 7. Нестероидные агонисты экдистероидов искусственного синтеза*

**Таблица 2**

**Сравнительная активность экдистероидов из различных источников в BII биотесте на агонисты**

| Соединения | Источники получения | EC50 DmEcR1 | | Литературные ссылки | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | M | К3 | [15] | [96] | [14] | [13] | [3] | [97]2 |
| Природные экдистероиды | | | | | | | | | |
| Ponasterone A – контроль | папоротники, грибы, хвойные | $3.1x10^{-10}$ | 1 | | | + | + | | |
| – “ ” – | папоротники, грибы, хвойные | $0.7x10^{-9}$ | 2 | | | | | | + |
| Muristerone A[4] | растения (Ipomoea) | $2.3x10^{-9}$ | 7 | | | | | | + |
| – “ ” – | растения (Ipomoea) | $2.2x10^{-8}$ | 71 | + | | | | | |
| Polypodine B | растения | $1.0x10^{-9}$ | 3 | | | | + | | |
| Dachryhainansterone | растения | $5.2x10^{-9}$ | 17 | | | | | + | |
| Ecdysterone (20E,)[4] | насекомые, растения | $7.5x10^{-9}$ | 24 | + | | | | | |
| Makisterone A | растения | $1.3x10^{-8}$ | 42 | | | + | | | |
| Ajugasterone C | Rhaponticum carthamoides | $3.0x10^{-8}$ | 97 | + | | | | | |
| – “ ” – | Serratula coronata | $6.2x10^{-8}$ | 200 | | + | | | | |
| Stachysterone B | растения | $8.2x10^{-8}$ | 264 | | | | | + | |
| Taxisterone | растения | $9.5x10^{-8}$ | 306 | | + | | | | |
| Kaladasterone | растения | $3.4x10^{-7}$ | 1 097 | | | | | + | |
| Ecdysone (α-ecdysone)[4] | насекомые, растения | $1.1x10^{-6}$ | 3 546 | | + | | | | |
| Turkesterone | растения | $1.3x10^{-6}$ | 4 193 | | | | | + | |
| Podecdysone B | растения | $1.2x10^{-5}$ | 38 710 | + | | | | | |
| Polyporusterone B | грибы-трутовики | $2.1x10^{-9}$ | 7 | | | | | | |
| Atrotosterone A | грибы | $2.5x10^{-8}$ | 81 | | | | + | | |
| Atrotosterone B | грибы | $6.5x10^{-6}$ | 20 968 | | | | + | | |
| Atrotosterone C | грибы | $3.0x10^{-6}$ | 9 677 | | | | + | | |
| Paxillosterone | грибы | $4.2x10^{-7}$ | 1 355 | | | | + | | |
| Malacosterone | грибы | $9.0x10^{-6}$ | 29 030 | | | | + | | |
| 25-OH-atrotosterone A | грибы | $1.0x10^{-5}$ | 32 258 | | | | + | | |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 25-OH-atrotosterone B | грибы | $1.0x10^{-5}$ | 32 258 | | | | + | | |
| Производные ecdysterone | | | | | | | | | |
| 14α-deoxy-20E | фототрансформация | $2.2x10^{-8}$ | 71 | + | | | | | |
| 14β-deoxy-20E | фототрансформация | $8.3x10^{-7}$ | 2 677 | + | | | | | |
| 14α-hydroperoxy-20E | фототрансформация | $1.6x10^{-8}$ | 52 | + | | | | | |
| 14-β-20E | фототрансформация | $1.7x10^{-4}$ | 546 387 | + | | | | | |
| Dimer 20E (7-7'-bis-14-d-8(14)-en-20E) | фототрансформация | $2.1x10^{-7}$ | 677 | + | | | | | |
| 2 deoxy-20E | растения, хим. трансформация | $6.6x10^{-7}$ | 2 125 | | | + | | | |
| 3-α-20E | растения, хим. трансформация | $1.6x10^{-7}$ | 516 | | + | | | | |
| 5-α-deoxy-20E | растения, хим. трансформация | $3.3x10^{-6}$ | 10 645 | | | + | | | |
| 20E 2β-D-glucopyranoside | растения, хим. трансформация | $2.0x10^{-5}$ | 64 516 | | | | + | | |
| 20E 3β-D-glucopyranoside | растения, хим. трансформация | $1.3x10^{-5}$ | 41 935 | | | | + | | |
| 20E 22β-D-glucopyranoside | растения, хим. трансформация | $4.7x10^{-5}$ | 151 613 | | | | + | | |
| 20E 25β-D-glucopyranoside | растения, хим. трансформация | $8.5x10^{-6}$ | 27 419 | | | | + | | |
| 25-deoxyecdysone | растения, хим. трансформация | $1.0x10^{-8}$ | 32 | | | + | | | |
| 22-dehydro-20E | растения, хим. трансформация | $1.7x10^{-7}$ | 546 | | | + | | | |
| 22-acetate-20E | растения, хим. трансформация | $2.0x10^{-7}$ | 645 | | + | | | | |
| Лиганды нестероидные | | | | | | | | | |
| RH 5849 (1,2-dibenzoyl-1-tert-butylhydrazine) | химический синтез | $1.1x10^{-7}$ | 355 | | | | | | + |
| RH 5992 (tebufenozide) | химический синтез | $2.0x10^{-6}$ | 6 450 | | | | | | + |

*Примечания:* 1EcR-рецептор *Drosophila melanogaster;* 2EcR-рецептор *Plodia interpunctella;* 3коэффициент активности (количество, требуемое для замещения экдистероида *ponasterone A*); 4 цитотоксичность, равная 10-3 М [14].

Результаты биотестов более 300 индивидуальных соединений из зоо- 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 (рис. 8, 9). Было найдено, 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* (табл. 2).

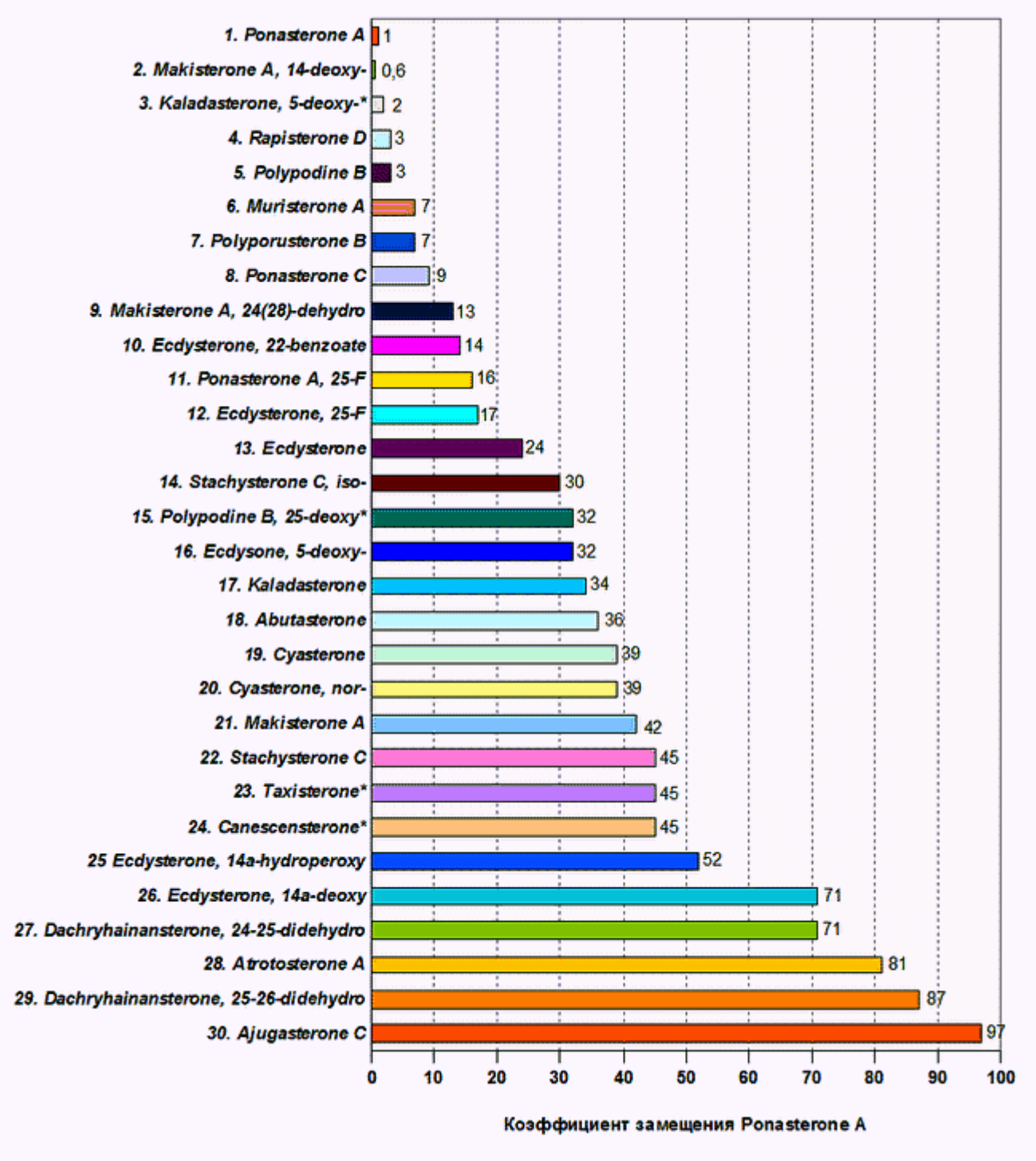



*Рис. 8. База данных биологической активности основных экдистероидов:*

*Соединения с убывающей активностью от 1 (ponasterone A – контроль) до 100-кратной*

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-5α; 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. (по [3] с изменениями).

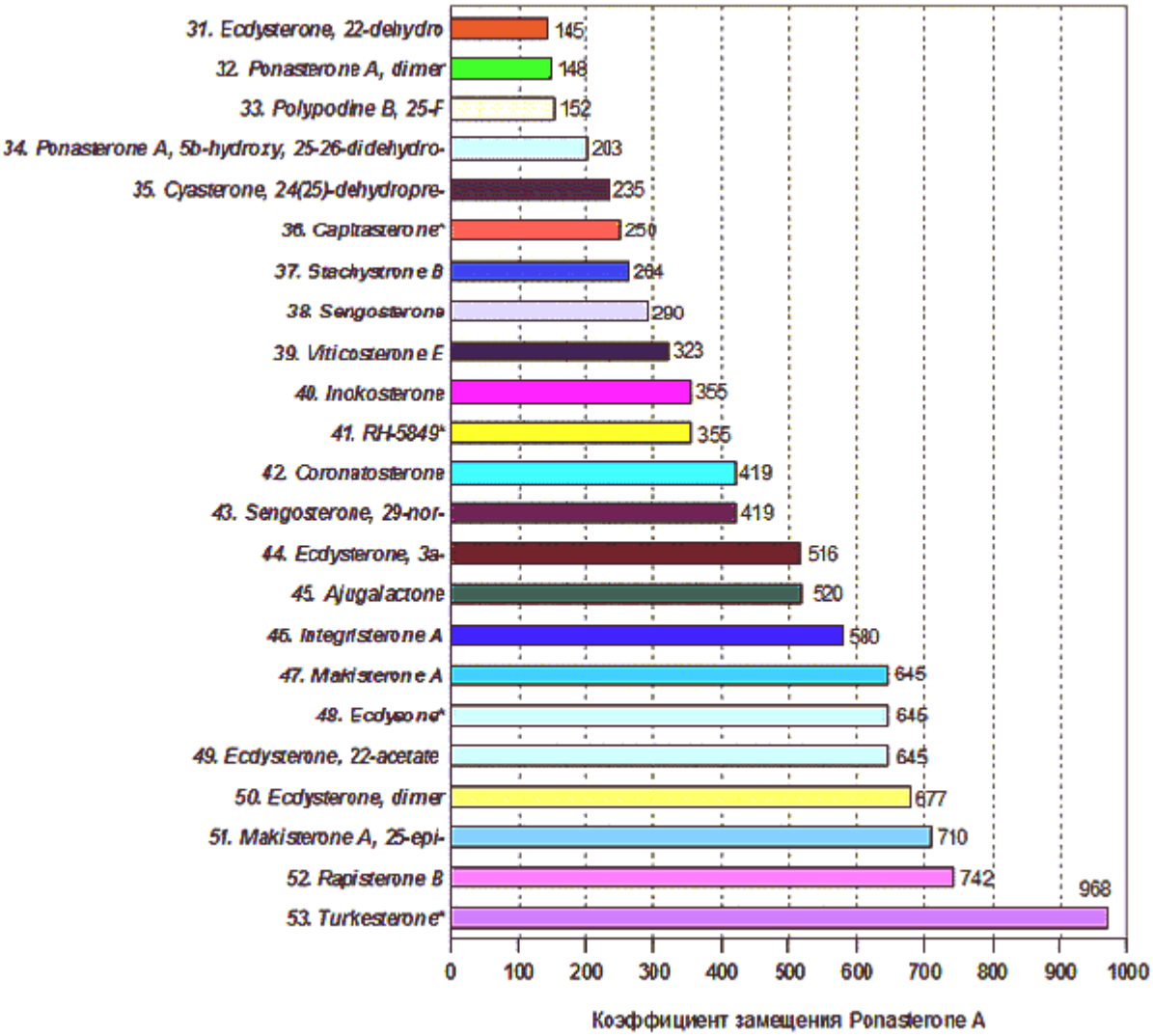



*Рис. 9. База данных биологической активности экдистероидов (продолжение): Соединения с убывающей активностью от 100 до 1000-кратной к контролю (*...возможна и ниже)*

## 4. Исследования в области компьютерного моделирования активности экдистероидов

### 4.1. Базы данных структурного разнообразия 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, простым методом перебора среди продуктов нового химического синтеза 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 ограни-

чено, технология извлечения сложна, а себестоимость слишком высока [3, 5]. Главная цель таких исследований, базирующихся на использовании мощного программного обеспечения и ресурсов электронно-вычислительных систем – предсказать молекулярное строение искусственных лигандов, 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 лптимизированных моделей лиганда, выявления связи между его активностью и молекулярной структурой, необходимы сведения о разнообразии строения и сравнительной активности всех доступных фито-, зоо- и микоэкдистероидов, их ближайших структурных аналогов. Такие работы были проведены в течение последних двух десятилетий.

Было установлено, что экдистероиды существуют в виде С19-С30 структур. С27 экдистероиды свойственны для высших представителей растительного мира, для грибов и голосеменных характерны С28 аналоги, а для папоротников – соединения со структурой С29. Очень редко, но встречаются С30 экдистероиды. В качестве продуктов распада основных экдистероидов (С27…С29) могут быть вторичные С21…С24 (С19) структурные аналоги.

В результате ферментативных преобразований в биосистемах экдистероиды присутствуют в виде транс- и цис-изомеров, сочленений колец А и В, эпимеров с различной конфигурацией ОН-групп, водорастворимых и жирорастворимых конъюгатов с органическими и неорганическими кислотами, сахарами и т.д. (рис. 10). 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 [10, 98-100]. 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 [98, 101].

Эти исследования привели к важным заключениям о структурных особенностях строения, оказывающих влияние на биологическую активность. На их основе были сделаны выводы относительно взаимосвязи между соотношением активности и пространственных характеристик молекул экдистероидов, взятых за основу при построении первых компьютерных моделей: существенным является *A/B цис*-кольцевое сочленения, *6-охо-7-ene* группировка, полная боковая цепь стерина, наличие 14-α-ОН-группы (рис. 10). Кроме того, С2β, С3β, и С20R-гидроксильные группы усиливают биологическую активность, а С25 гидроксил уменьшает ее [102].

В дальнейших разработках были учтены донорно-акцепторные связи гидроксильных групп, рассмотрены области взаимодействия лиганда с рецептором (С2, С12-атомы, С22-боковая цепь). Установлено, что закрепление экдистероида на родственном рецепторе является результирующим вкладом множественных взаимодействий гетероатомов С2, С3, С20, С22, большого диполя при С6, гидрофобной боковой цепи при С22. Кроме того, определено, что проявление активности очень чувствительно к минимальным конформационным изменениям диполей углеродных атомов С20 и С22.

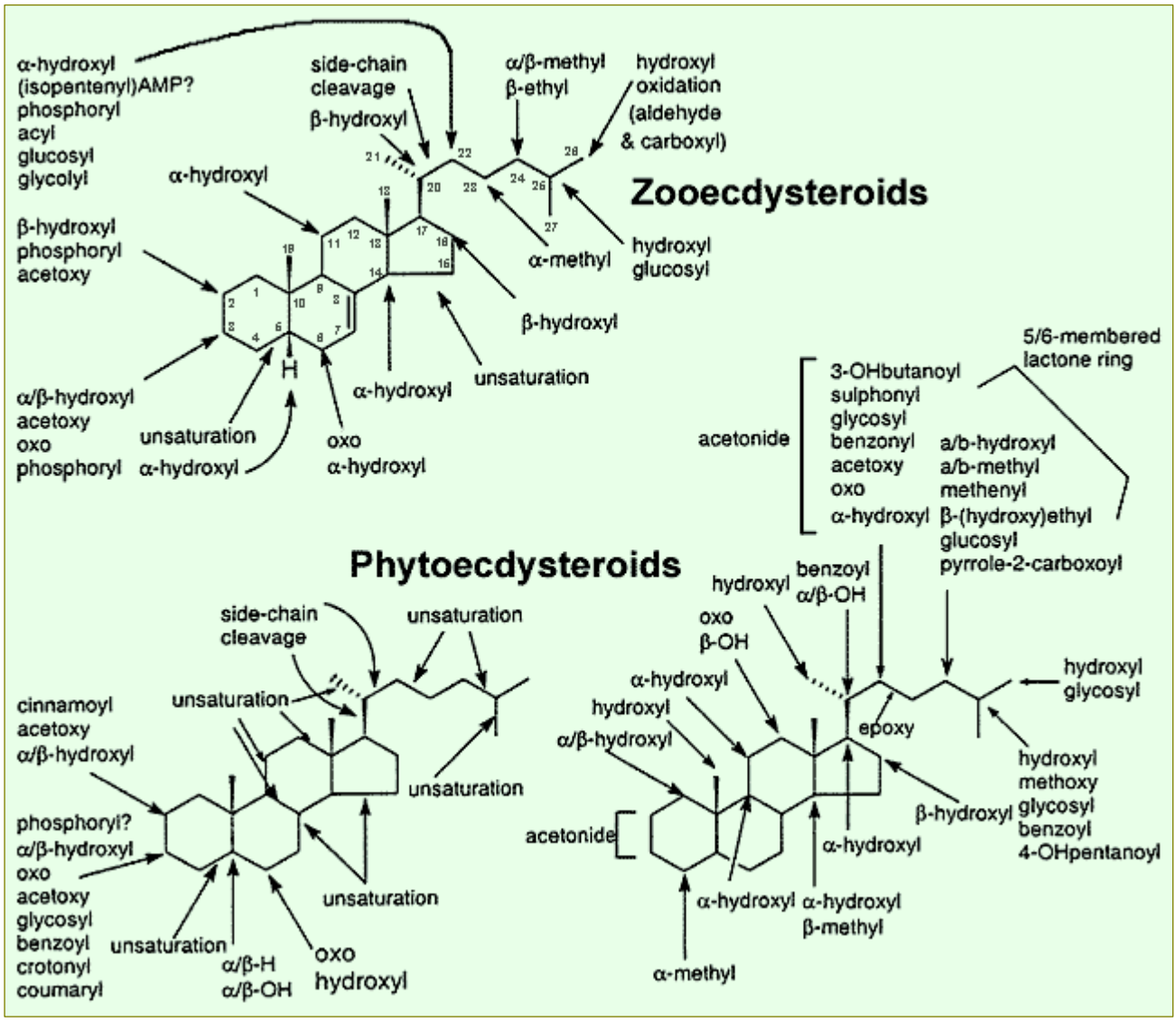



*Рис. 10. Структурное разнообразие строения зоо- и фитоэкдистероидов [3]*

### 4.2. Результаты экспериментов по моделированию активности лигандов

Первые программные методы CoMFA-анализа (comparative molecular field analysi), базирующиеся на сведениях о кристаллическом строении экдистероидов-лигандов, были довольно несовершенными, предсказывая сверхвысокую активность слабоактивным или инертным соединениям (табл. 3). Например, активность экдистероида *podecdysone B* оказывается увеличенной на 6 порядков (с 10-5 М до 10-11 М), *castasterone* – на 3 порядка (с 10-3 М до 10-6 М), *25-hydroxy-dachryhainansterone* – на 4 порядка (с 10-7 М до 10-11 М), а неактивному *calonysterone* предсказывается активность 10-8 М. Одновременно эти модели снижали реальную активность важнейших фитоэкдистероидов *ponasterone A* и *20-hydroxyecdysone* примерно на порядок.

**Таблица 3**

**Результаты моделирования активности экдистероидов и их аналогов на основе методов CoMFA-анализа; по [25, 104]**

| Экдистероид | -log (EC50) | | | Молекулярная активность, М | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | BII-биотест | 1 модель CoMFA | 2 модель CoMFA | BII- биотест | 1 модель CoMFA | 2 модель CoMFA |
| Ponasterone A | 9.51 | 8.63 | 8.92 | $3.1 \times 10^{-10}$ | $2.3 \times 10^{-9}$ | $1.2 \times 10^{-9}$ |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5-deoxy-kaladasterone | 9.28 | 9.52 | 8.84 | $5.2 \times 10^{-10}$ | $3.0 \times 10^{-10}$ | $1.4 \times 10^{-9}$ |
| Dachryhainansterone | 8.28 | 8.75 | 10.25 | $5.2 \times 10^{-9}$ | $1.8 \times 10^{-9}$ | $5.6 \times 10^{-11}$ |
| 20-hydroxyecdysone (ecdysterone) | 8.12 | 7.46 | 6.96 | $7.5 \times 10^{-9}$ | $3.5 \times 10^{-8}$ | $1.1 \times 10^{-7}$ |
| Muristerone A | 7.66 | 7.67 | 7.69 | $2.2 \times 10^{-8}$ | $2.1 \times 10^{-8}$ | $2.0 \times 10^{-8}$ |
| Kaladasterone | 6.47 | 8.92 | 8.59 | $3.4 \times 10^{-7}$ | $1.2 \times 10^{-9}$ | $2.6 \times 10^{-9}$ |
| 25-hydroxy-dachryhainansterone | 6.59 | 8.52 | 10.23 | $2.6 \times 10^{-7}$ | $3.0 \times 10^{-9}$ | $5.9 \times 10^{-11}$ |
| Ecdysone | 5.96 | 6.06 | 5.03 | $1.1 \times 10^{-6}$ | $8.7 \times 10^{-7}$ | $9.4 \times 10^{-6}$ |
| Podecdysone B | 4.92 | 10.34 | 10.96 | $1.2 \times 10^{-5}$ | $4.6 \times 10^{-11}$ | $1.1 \times 10^{-11}$ |
| Ketodiol | ≤5.2 | 5.53 | 6.47 | $6.3 \times 10^{-6}$ | $3.0 \times 10^{-6}$ | $3.4 \times 10^{-7}$ |
| Ecdysone-2,3-acetonide | ≤4.5 | 7.60 | 6.59 | $3.2 \times 10^{-5}$ | $2.5 \times 10^{-8}$ | $2.6 \times 10^{-7}$ |
| 20-hydroxyecdysone-2,3,22-triacetate | <4.8 | 6.02 | 6.74 | $1.6 \times 10^{-5}$ | $9.6 \times 10^{-7}$ | $1.8 \times 10^{-7}$ |
| 2β,3β,6α-trihydroxy-5β-cho1estane | ≤4.6 | 4.90 | 7.76 | $4.0 \times 10^{-5}$ | $1.3 \times 10^{-5}$ | $1.7 \times 10^{-7}$ |
| 2β,3β,6β-trihydroxy-5β-cholestane | ≤4.6 | 5.57 | 8.14 | $4.0 \times 10^{-5}$ | $2.7 \times 10^{-6}$ | $7.2 \times 10^{-9}$ |
| 2,14,22,25-tetradeoxy-5α-ecdysone | ≤4.6 | 5.82 | 6.95 | $4.0 \times 10^{-5}$ | $1.5 \times 10^{-6}$ | $1.1 \times 10^{-7}$ |
| 5α-ketodiol | ≤4.6 | 4.22 | 5.66 | $4.0 \times 10^{-5}$ | $6.0 \times 10^{-5}$ | $5.2 \times 10^{-6}$ |
| Castasterone | <3 | 4.67 | 5.39 | $1.0 \times 10^{-3}$ | $2.1 \times 10^{-5}$ | $4.1 \times 10^{-6}$ |
| 24-epi-castasterone | <4 | 5.53 | 6.78 | $1.0 \times 10^{-4}$ | $3.0 \times 10^{-6}$ | $1.7 \times 10^{-7}$ |
| Bombycosterol | ≤4.6 | 4.69 | 6.06 | $4.0 \times 10^{-5}$ | $2.0 \times 10^{-5}$ | $8.7 \times 10^{-7}$ |
| Calonysterone | неактивен | 7.37 | 7.77 | неактивен | $4.3 \times 10^{-8}$ | $1.7 \times 10^{-8}$ |
| Iso-homobrassinolide | <5 | 7.09 | 5.52 | $1.0 \times 10^{-5}$ | $8.1 \times 10^{-8}$ | $3.0 \times 10^{-6}$ |
| 28-homobrassinolide | <4 | 5.99 | 6.00 | $1.0 \times 10^{-4}$ | $1.0 \times 10^{-6}$ | $1.0 \times 10^{-6}$ |

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 [103]. 4D-QSAR-модели могут принять во внимание многократные конформационные изменения молекулы изучаемого экдистероида во время взаимодействия его с рецептором.

Усовершенные алгоритмы 4D-QSAR-анализа могут учитывать до 10 тысяч конформаций для исследуемой молекулы, со сдвигом шага времени от 10 ps до 300 K [3]. Сравнение лучших 4D-QSAR моделей с последними методами CoMFA-анализа показывает, что оба алгоритма имеют более высокие величины оправдываемости предсказаний на фоне ранних разработок (табл. 4). 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 экдистероидов.

**Таблица 4**

**Соответствие прогноза активности экдистероидов в оптимизированных компьютерных моделях наблюдаемым в биотестах [105]**

| Экдистероид | Активность в биотесте | | Модели CoMFA, -log (EC50) | | | Модели 4D-QSAR, -log (EC50) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M | -log (EC50) | N 1 | N 7 | среднее по 6 моделям | N 1 | N 7 | среднее по 6 моделям |
| Polyporusterone B | $2.1 \times 10^{-9}$ | 8.68 | 7.51 | 6.32 | 7.91 | 6.26 | 7.69 | 7.22 |
| 20-hydroxyecdysone 22-benzoate | $4.3 \times 10^{-9}$ | 8.37 | 6.12 | 6.59 | 6.32 | 6.28 | 5.93 | 6.02 |
| 14-perohydroxy-20-hydroxyecdysone | $1.6 \times 10^{-8}$ | 7.80 | 7.60 | 6.57 | 6.48 | 6.27 | 6.42 | 6.13 |
| Leuzeasterone | $1.7 \times 10^{-8}$ | 7.77 | 7.02 | 5.42 | 7.11 | 6.59 | 7.25 | 7.04 |
| 3-epi-20-hydroxyecdysone | $1.3 \times 10^{-7}$ | 6.89 | 7.26 | 6.78 | 6.60 | 6.88 | 6.78 | 6.92 |
| Makisterone C | $2.0 \times 10^{-7}$ | 6.70 | 7.33 | 7.49 | 6.62 | 5.64 | 6.67 | 7.23 |
| Carthamosterone | $4.4 \times 10^{-7}$ | 6.36 | 7.79 | 6.57 | 6.41 | 7.53 | 7.44 | 7.44 |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Punisterone (Rapontisterone) | $8.3x10^{-7}$ | 6.08 | 7.25 | 6.86 | 7.15 | 6.76 | 6.86 | 7.26 |
| 24-methylecdysone | $1.1x10^{-6}$ | 5.68 | 6.19 | 6.52 | 7.09 | 6.93 | 6.12 | 7.79 |
| 24-epi-abutasterone | $1.2x10^{-6}$ | 5.92 | 6.75 | 7.05 | 7.51 | 7.44 | 7.11 | 7.08 |
| 24-hydroxycyasterone | $2.0x10^{-6}$ | 5.70 | 7.39 | 7.44 | 7.63 | 7.94 | 7.75 | 7.44 |
| 20-hydroxyecdysone 22-acetate | $4.0x10^{-6}$ | 5.40 | 6.44 | 7.01 | 6.23 | 5.68 | 4.75 | 5.94 |
| (5α-H)-dihydrorubrosterone | $5.6x10^{-6}$ | 5.25 | 4.56 | 3.85 | 4.33 | 4.66 | 4.05 | 3.82 |
| (5α-H)2-deoxy-21-hydroxyecdysone | $1.0x10^{-4}$ | 4.00 | 5.81 | 4.24 | 5.0 | 5.4 | 5.3 | 6.3 |
| Rubrosterone | $1.0x10^{-4}$ | 4.00 | 4.97 | 4.67 | 4.82 | 6.21 | 4.26 | 5.58 |
| 14-epi-20-hydroxyecdysone | $1.7x10^{-4}$ | 3.77 | 5.60 | 6.10 | 5.52 | 5.12 | 6.36 | 3.41 |

## 5. Исследования в области конструирования рецепторов

### 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 (рис. 11). 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 [106].

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.

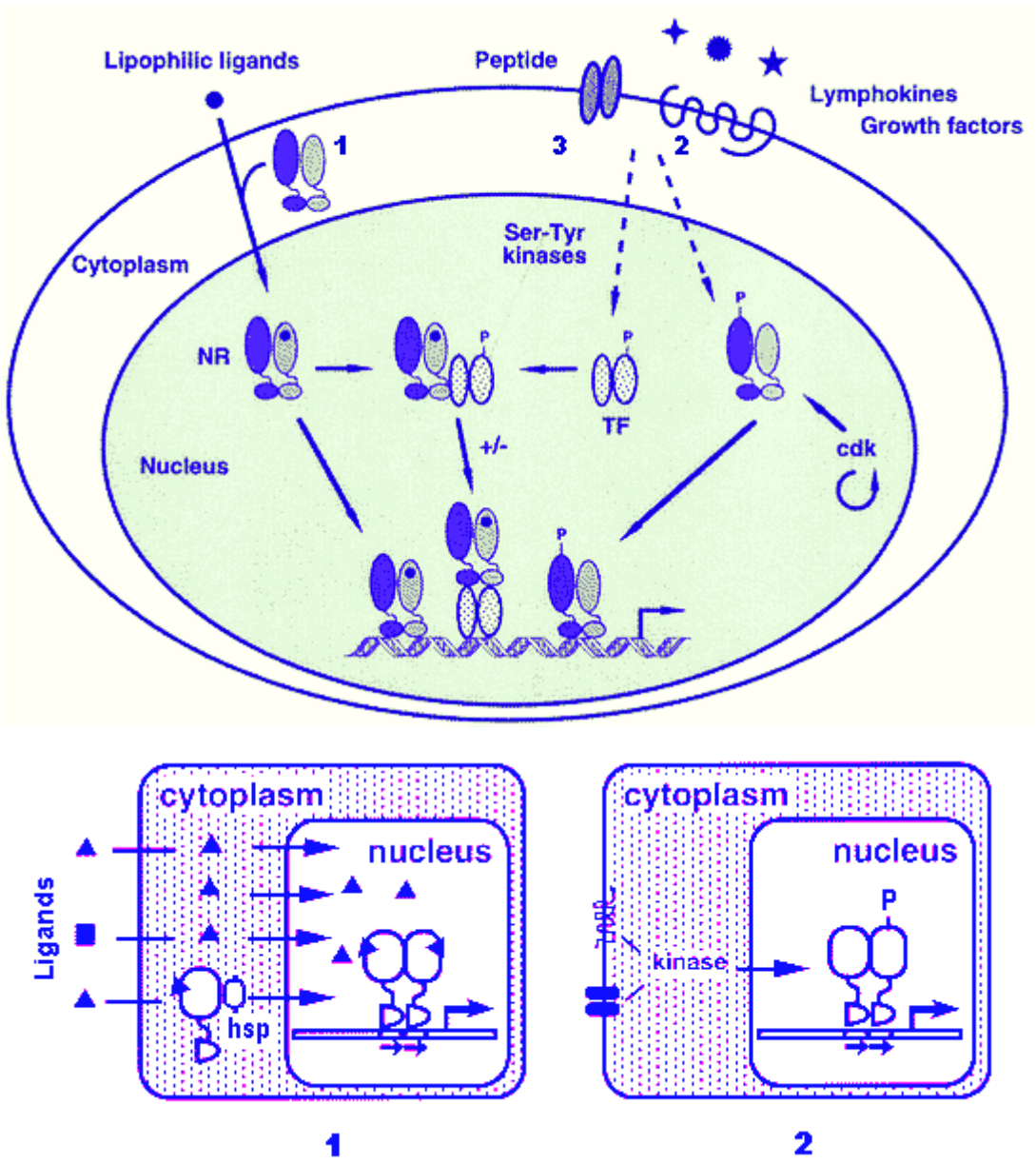


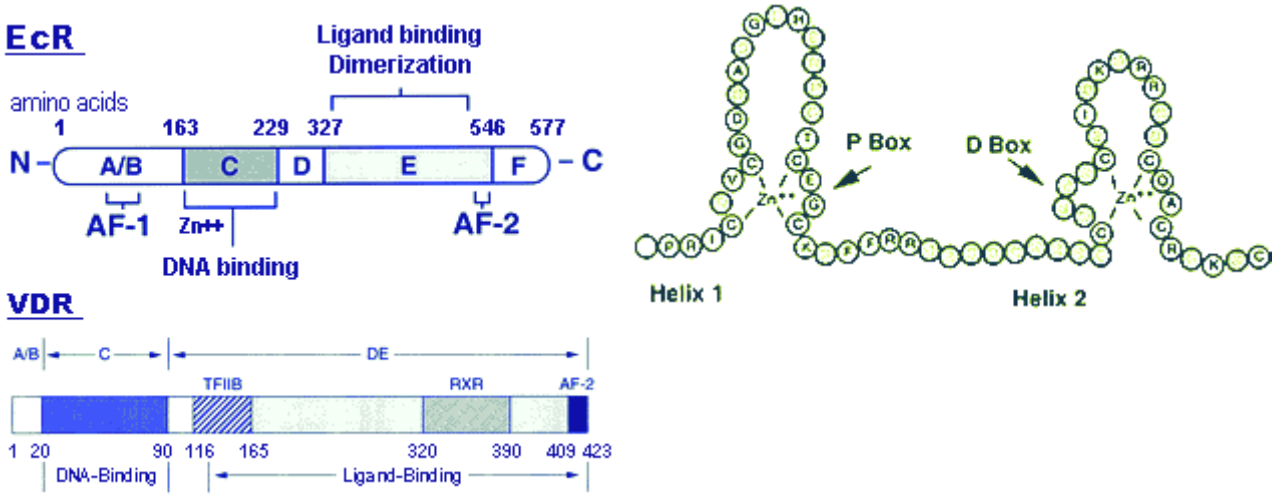

*Рис. 11. Активация ядерных и мембранных рецепторов через липофильные лиганды (1), вторичные метаболиты (2) или белок-белковые взаимодействия (3); по [106-107] с изменениями*

Рецепторы экдистероидов (EcR) относятся к большой группе суперсемейства ядерных стероид-, тиреоид-, ретиноидных рецепторов (EcR, RAR, VDR, TR, PPAR), происходящих эволюционно, как предполагают, от одного общего предка [108]. 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 Д3, 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 [107, 109-110]. Структурно гомологичная группа состоит более чем из 100 членов. Из этого перечня лишь EcR характерен для беспозвоночных – насекомых, ракообразных, нематод, кольчатых червей [1]; остальные системы активизированы в млекопитающих. Ближайшим аналогом EcR в организме млекопитающих является LXR (LXRα, RLD1, LXRß, 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 (рис. 12А), включающие несколько главных, функционально независимых друг от друга областей: домен Е, ответственный за присоединение лиганда к рецептору (LBD – ligand binding domain); домен С, 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 участок в себя из 9 цистеинов, 8 из которых способны связывать ионы металлов, образуя 2 так называемых цинковых “пальца”-выступа (рис. 12В), стабилизирующие пространственную структуру рецептора и участвующие в образовании белковых комплексов.




**А** **В**

*Рис. 12. Модульное строение ядерных рецепторов, по [109] с изменениями:*

*А – функциональные области; Б – участок, связывающий ионы металлов*

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 [111].

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 [109]: Cys-X-X-Cys-X-X-Asp*-X-Ala*-X-Gly*-X-Tyr*-X-X-X-X-Cys-X-X-Cys-Lys*-X-Phe-Ph e-X-Arg*-X-X-X-X-X-X-X-X-X-(X-X-) Cys-X-X-X-X-X-(X-X-X-) Cys-X-X-X-Lys-X-X-Ar g-X-X-Cys-X-X-Cys-Arg*-X-X-Lys*-Cys-X-X-X-Gly*-Met (где X – любая; * – изредка вариационная; в скобках – необязательная аминокислота).

У большинства типов ядерных рецепторов млекопитающих имеются подтипы и изоформы, обусловленные видовой принадлежностью (α, β, γ). Существуют также изоформы экдистероидного рецептора у различных классов (насекомых, ракообразных) 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, заставляющую 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 череде 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, сами по себе, в качестве моно- и гетеродимеров, члены рассматриваемой группы суперсемейства ядерных рецепторов (EcR, RAR, VDR, TR, PPAR, NURR-1, FAR, LXR и др.) неактивны или малоактивны. На втором этапе для активизации любого из них требуется гетеродимеризация с рецептором 9-цис-ретиноевой кислоты, ведущее 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 [111-112]; конформационное расхождение показано для двух петель 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 (рис. 13), а затем до ретиналей – альдегидных форм витамина А [113]. Основным природным источником ретиноидов является каротин растений (рис. 14): 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 [114]. Кроме главного лиганда – 9-цис-ретиноевой кислоты, активизировать RXR-рецептор способны также некоторые производные хлорофилла, в частности фитановая кислота [106].

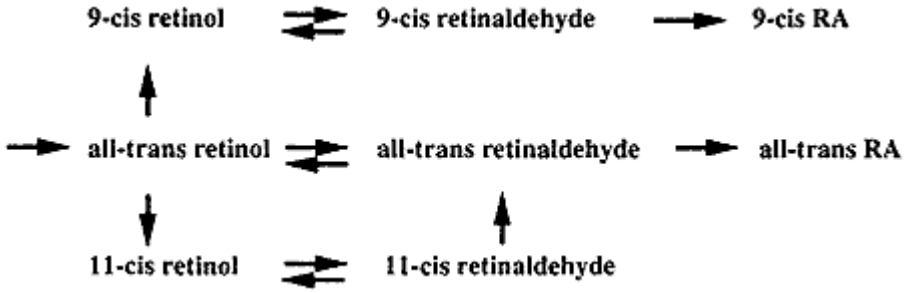



*Рис. 13. Схема биохимической трансформация ретинола; по [113]*

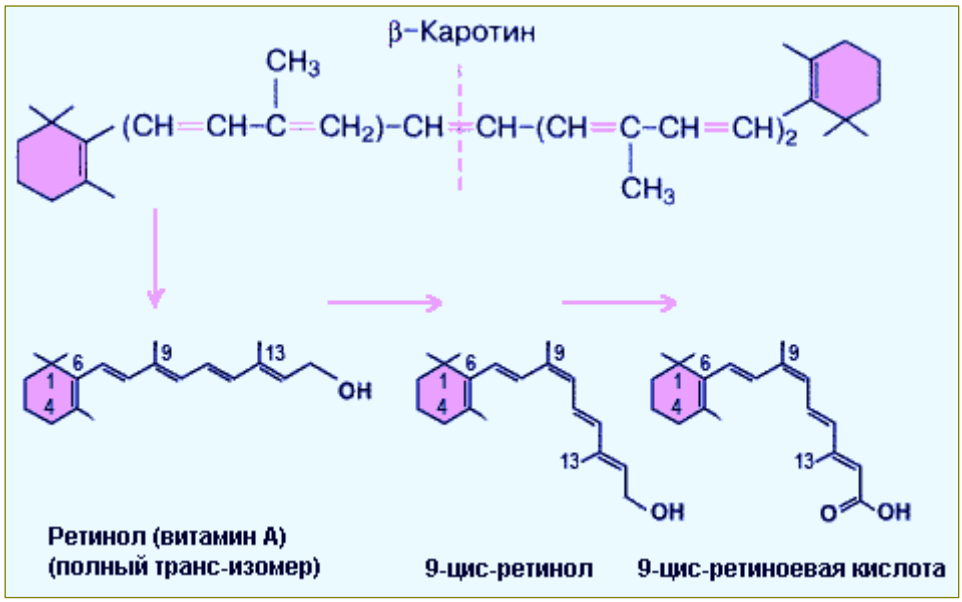



*Рис. 14. Каротин – природный источник 9-цис-ретиноевой кислоты*

Физиологически бездействующая форма экдистероидного рецептора EcR существует как олигомерный комплекс с белками теплового шока в цитоплазме клетки (рис. 11.1). В таком состоянии полипептидная цепь рецептора свернута, деятельность его репрессирована. После закрепления родственного лиганда рецептор диссоцирует от ингибирующего комплекса. Корепрессоры высвобождаются и лиганд-обязательная область принимает конформацию, способную к взаимодействию со вторым рецептором, после чего происходит пространственная стабилизация структуры гетеродимера.

На каждом рецепторе EcR/RXR-димера находятся свои активные центры, потенциально способные связывать индивидуально лиганд-1 и лиганд-2 (рис. 15). 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, что происходит резкий переход гетерокомплекса от бездействующей к активной форме при минимальных концентрациях лиганда. Чем выше число участвующих в

процессе факторов активизации, 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, драматично стимулируется дополнением USP, аналога RXR, приводящего к сродству с рецептором  в диапазоне наномолярной концентрации (рис. 16).

*Рис. 15. Гетеродимерный комплекс EcR/RXR*

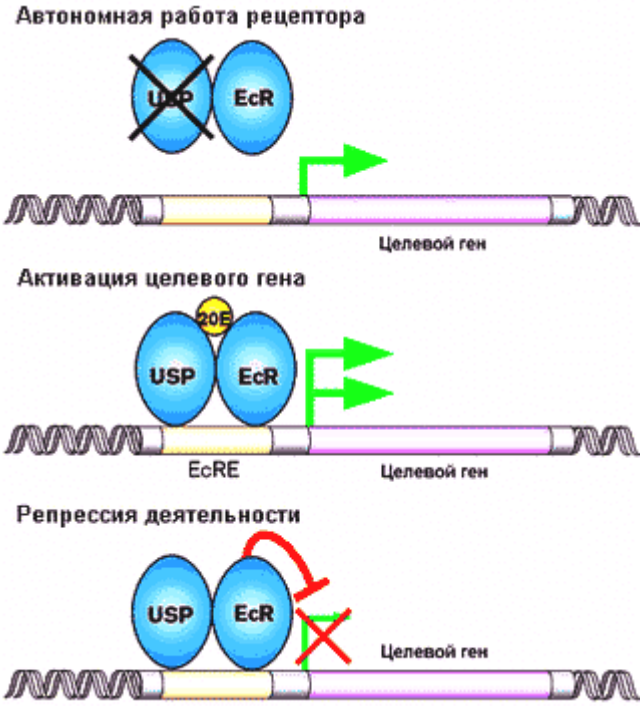



*Рис. 16. Активация целевого гена через димер EcR/USP; по [116]*

Косвенное влияние на активацию EcR могут оказать и другие стероидные рецепторы, в частности DXR-38 через кооперацию с USP [115]. В 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 распадающуюся 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. Перспективы конструирования усовершенствованных 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 оптималь-

ной 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 [97, 109, 117-118]. Направления исследований можно выделить в следующие 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 возможно разработка рецепторов, способных связывать лиганды, строение которых значительно отличается от известных природных экдистероидов. Кроме того, возможны сложные конструкции гибридных белковых молекул с рецепторами, не затрагивающих 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 другой, более совершенный. 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 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, не

имеющих прямых неблагоприятных эффектов и нежелательных последствий и которые могут использоваться в комбинации с экдистероидами, включают аминокислоты, органические кислоты, ферментные белки, ионы металлов, витамины, различные соли, вещества гормонального, стимулирующего или ингибирующего характера.

## 6. Активность экдистероидов в медицине

### 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* [12]. Часть видов растений из этих родов содержит до 1-2 % экдистероидов в биомассе [119-120] 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 [121].

Можно предполагать, что одной из причин такого положения служит присутствие в растениях большого числа слабоактивных или неактивных фитоэкдистероидов. Если, к примеру, *Rhaponticum carthamoides* синтезирует множество высокоактивных соединений, сопоставимых с активностью экдистероида *ponasterone A – rapisterone D, polypodine B, dachryhainansterone, производные kaladasterone, 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 [72]. Минимальная доза химически изолированной субстанции (препарата *ecdysten*), необходимая для проявления анаболического эффекта, равна 5-10 мг/кг [147]. Увеличение дозы до 20 мг/кг приводит к ингибированию биосинтеза белка и РНК в поджелудочной железе мышей, причем менее очищенные 10 % и 2 % экстракты сильнее тормозят начало процесса биосинтеза во времени [22].

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 [55]. По результатам исследований сделан вывод, что по величине тонизирующего эффекта экдистероидная 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* [62, 122], у *S. coronata* в сопоставимых дозах отсутствовали. Анаболический эффект отсутствовал и в другой серии экспериментов с 96.5 % экдистероидной фракцией *S. coronata* (препарат *ecdysone,* содержащий 80.5 % *20-hydroxyecdysone*) [73].

М.Б. Плотников с соавторами [123] провели сравнение гемореологической активности экстрактов из надземной части двух экдистероид содержащих видов растений – *Lychnis chalcedonica* L. и *R. carthamoides* (Willd.) Iljin – в модельных опытах на крысах с предварительно индуцированным 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 скорости деформируемости эритроцитов была значительно лучшей у *R. carthamoides,* чем у *L. chalcedonica.*

Сравнительная биологическая активность экдистероид содержащих растений рода *Serratula* и *Rhaponticum* изучалась Ганиевым Ш.Г. [86] 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* I. 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 экдистероидов (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 [124]. Эффективная иммуно-модуляторная активность CD2+-розеткообразования с человеческими Т-лимфоцитами достигалась при концентрации 1 μM (10-6 М); с индексом стимуляции, равным 1.132 [59].

Комплексные экдистероид содержащие субстанции обладают значительно более высокой активностью, чем химически изолированные соединения (рис. 17). 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 [125].

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 [126]. 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 (табл. 5).

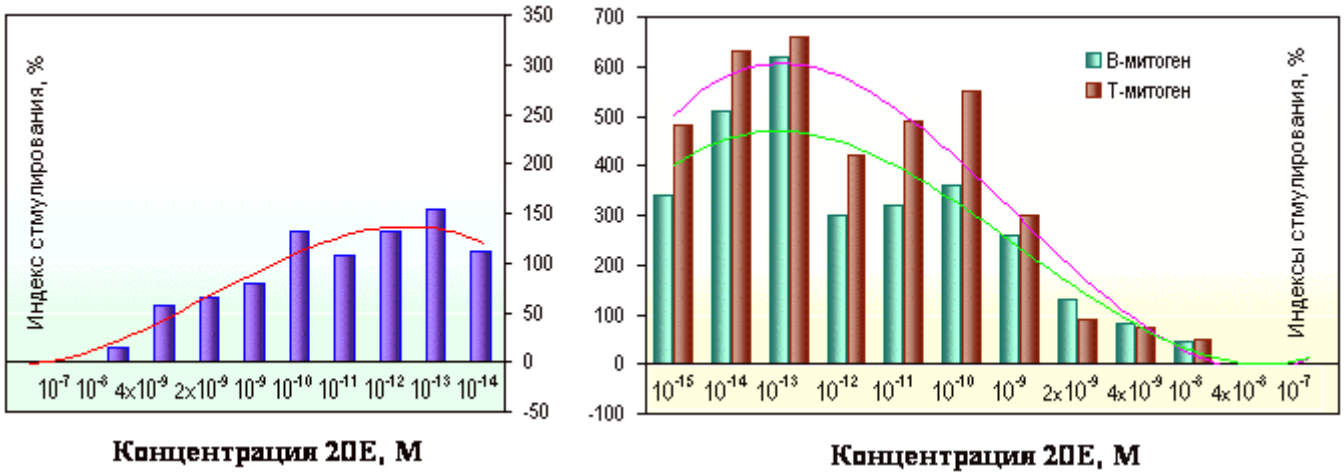



*Рис. 17. Стимулирование пролиферации клеток экстрактом Rhaponticum carthamoides: слева – спонтанная, справа – индуцированная; по [125] с изменениями*

**Таблица 5**

**Сравнительная характеристика адаптогенной активности экдистероид содержащих препаратов из R. carthamoides; по [126] с изменениями**

| Факторы воздействия | Коэффициент активности* | |
|---|---|---|
| | экстракт корневищ** (0,04 % 20E) | Ecdysten** (86 % 20E) |
| 1. Радиальные перегрузки | 0.92 | 0.52 |
| 2. Гипоксия | 0.59 | 0.32 |
| 3. 24-часовой иммобилизационный стресс | 0.40 | 0.24 |
| 4. Гормональная дисфункция | 0.42 | 0.21 |
| 5. Интоксикация этанолом | 0.34 | 0.30 |
| 6. Мышечные нагрузки | 0.15 | 0.16 |
| 7. Острая гипотермия | 0.12 | 0.05 |
| 8. Острая гипертермия | 0.06 | 0.07 |
| 9. Мышечные нагрузки при гипоксии | 0.02 | -0.04 |
| 10. Допановая интоксикация | -0.41 | -0.44 |

*Примечания.* *… сопротивляемость к повреждающим действиям на фоне контроля; **…концентрация 20E.

В экспериментах А.С. Саратикова с соавторами [53], проведенных в Томском медицинском институте, было выявлено, что эффективность стимулирующего влияния 20 % экстракта *R. carthamoides* на умственную деятельность человека зависит от величины принимаемой дозы. В дозе 10 капель/сутки число ошибок в корректурном тесте у испытываемых 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 [127], 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 [80]. Средняя концентрация *20-hydroxyecdysone* в жидких препаратах примерно равна 0.05 %, или 0.5 мг/мл [128].

В данном примере минимальная расчетная доза *20-hydroxyecdysone* составит 5 мкг/кг (250 мкг на 50 кг массы тела), а биологическая активность – 10-11 М. Максимальная доза равна 40 мкг/кг или около 10-10 М. Для сравнения, рекомендованные разовые дозы таблетированного препарата *ecdysten* из этого же вида растения составляют 5-10 мг [127] или 4300-8600 мкг (10-8 М) по *20-hydroxyecdysone* на человека. Эффективная высшая суточная доза химически чистого *20-hydroxyecdysone* и препаратов на его основе выше на порядок (10-7 М) и равна 50-100 мг/кг [129, 147].

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. Кофакторы активности

В реальных системах с клетками млекопитающих, в отличие от биотестов (опытов с искусственными пробирочными системами *in vitro),* возникают важные ограничения в проявлении активности экдистероидов [117, 130]:

1. Ретиноидный рецептор RXR является неохотным партнером димеризации с экдистеро-

идным рецептором EcR, и необходимы очень высокие концентрации экдистероидов для возбуждения экдизон-индуцированных систем.

2. Диапазон активных лигандов по существу ограничен исключительно экдистероидом *muristerone A*.

R. Lafont и L. Dinan [30] приводят следующие недостатки искусственных регуляторных систем экспрессии генов в системах с клетками млекопитающих: большинство химически очищенных от вторичных метаболитов экдистероиды, 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. [131]. 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 шапероны также нуждаются в дополнительных составах-помощниках, в качестве которых выступают иммунокомпетентные белки. Hsp40 и Hsp70 часто могут связываться с друг с другом и действовать координированным способом, стабилизируя конформационное изменение рецептора через лиганд-обязательную область [132].

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. [107, 133-134].

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 [135].

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 [136]. В присутствии лиганда, когда репрессоры не способны связать сложный рецептор EcR/RXR, корепрессоры высвобождаются и LBD-область принимает уникальную конформацию, позволяющую взаимодействовать поверхность рецептора с мультибелковыми комплексами активаторов. Структура хроматина становится доступной для запуска механизмов транскрипции и приводит к экспрессии чувствительных генов. Лиганды же антагониста, хотя и могут вызвать димеризацию рецептора, стимулируют такую трансформацию LBD, которая не позволяет связывать коактиваторы.

3. 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 понимаемы. 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 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 доставлены к месту действия с участием приемлемых носителей.

### 6.3. Взаимодействия со стрессовыми белками

Истоки высокой биологической активности у важнейших экдистероид содержащих растений (*Rhaponticum, 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 [137], при которой устойчивость к экстремальным условиям жизни (аномально низким и высоким температурам, широким колебаниям освещенности, кислотности почвы, дефициту влаги, избытку 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 [118]. 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 (рис. 11.3) и способны инициировать экспрессию генов в клетках млекопитающих при наличии соответствующих условий. Пример такой цепи, активизированной с участием естественного HSF, поступающего извне, или вырабатываемого эндогенно в организме млекопитающих, насекомых и птиц, показан на рис. 18. Фактор транскрипции состоит из двух субъединиц – экдистероидного рецептора DmEcR и ретиноидного рецептора RXR. Система активна в присутствии лиганда *muristerone* или других аналогов фитоэкдистероидов.

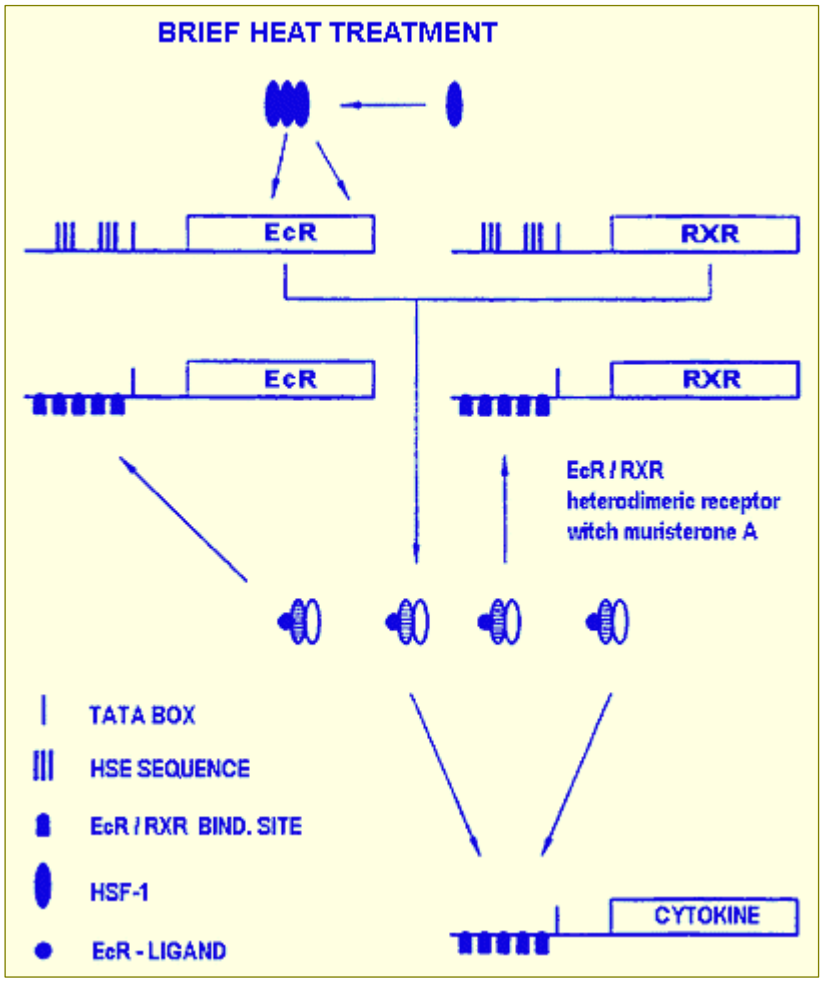



*Рис. 18. Активация экдистероидных рецепторов стресс-белками; по [118] с изменениями*

### 6.4. Эффекты с трансмембранными рецепторами

Многие примеры широко известных разнообразных физиологических эффектов, производимых экдистероид содержащими субстанциями, опосредованы через систему вторичных мессенджеров [138]. 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 (рис. 11.2). 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, заканчивающихся физиологическими изменениями 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 каталитическую активность или проводимость ионного канала. Результатом является изменение ферментативной активности, метаболического процесса или цитоплазматической концентрации иона, ведущее к возникновению клеточного ответа.

Вторичный мессенджер, появляющийся внутри клетки в ответ на внеклеточную аппликацию лиганда и обеспечивающий 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 мо-

дулируется различными средствами, стимулирующими разнообразные пути трансдукции сигнала. Например, FAR (farnesyl activated receptors) – ядерный рецептор, активизированный лигандом – фарнезил пирофосфатом, участвует в передаче сигналов как через промежуточные звенья метаболизма, так и в прямой транскрипции после гетеродимеризации с другими ядерными рецепторами [109], 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 [139]. 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 составов – это пептиды, липиды, аминокислоты, соединения фосфора, кальция, калия [140], а также других макро- и микроэлементов. 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 % [140].

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), с ацетоном и т.д. [7, 10]. Н.П. Тимофеев и А.В. Кокшаров [141] указывают, что при исследовании корреляционных связей присутствия экдистероидов 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 %).

Таким образом, при использовании неочищенных экстрактов из экдистероид содержащих растений в живых системах можно ожидать суммирования негеномного и геномного эффекта действия экдистероидов 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 экдистероидные рецепторы (BII-биотест). Результаты биотестов более 300 индивидуальных соединений из зоо- и источников 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 как 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 ан-

тагонистов), 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 порядка. 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 показывали улучшенную деятельность по доступным для массового использования лигандам. Это поиск оптимальной пространственной ориентации (путем перебора аминокислотных остатков в активных центрах белковых молекул), обеспечение органо- и тканеспецифичности, синтез гибридных и мутантных рецепторов, введение дополнительных модулей активации (факторов экспрессии генов).

В реальных системах с клетками млекопитающих, в отличие от биотестов (опытов с искусственными пробирочными системами *in vitro),* возникают важные ограничения в проявлении активности экдистероидов. Большинство химически очищенных от вторичных метаболитов экдистероиды, 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 фармпрепаратах или пищевых добавках, сколько от взаимного сочетания с другими сопутствующими факторами, прохождения ими ряда последовательных стадий в качестве лигандов для внутриклеточных или мембранных рецепторов.

В случае с ядерными рецепторами на начальном этапе важным является взаимодействие со стрессовыми белками, образование гетеродимерного комплекса с рецепторами производных витамина А – 9-цис-ретиноевой кислоты (RXR-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 адаптогенной и фармакологической активностью при минимальных дозах.

**Литература**


1. *Rees H.H.* Ecdysteroid biosynthesis and inactivation in relation to function // Europ. J. Entomol., 1995, 92(1), P.9-39.
2. *Lafont R.* Ecdysteroids and related molecules in animals and plants // Conference on Isoprenoids 2003. Chem. Listy, 97, P.280-281.
3. *Dinan L.* Ecdysteroid structure-activity relationships // Studies in Natural Products Chemistry, 2003, 29, P.3-71.
4. *Ануфриева Э.Н., Володин В.В., Носов А.М., Гарсиа М., Лафон Р.* Состав и содержание экдистероидов в растениях и культуре ткани *Serratula coronata* // Физиология растений, 1998, 3, С.382-389.
5. *Тимофеев Н.П.* Исследования по экдистероидам: Использование в медицине, Интернет-ресурсы, источники и биологическая активность // Биомедицинская химия, 2004, 50 (Прил. 1), С.133-152.
6. *Тимофеев Н.П.* Промышленные источники получения экдистероидов. Часть I. Ponasterone и muristerone // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. Сб. науч. трудов. М., РАЕН, 2003, 9, С.64-86.
7. *Балтаев У.А.* Фитоэкдистероиды – структура, источники и пути биосинтеза в растениях // Биоорганическая химия, 2000, 26(12), С.892-925.
8. *Володин В.В., И. Чадин И.Ф.* Обзор: Экдистероиды в мировой флоре // Вестник Института биологии Коми НЦ УрО РАН, 2003, 67, С.2-11.
9. *Bandara B.M.R., Jayasinghe L., Karunaratne V., Wannigama G.P., Bokel M., Kraus W., Sotheeswaran S.* Ecdysterone from stem of *Diploclisia glaucescens* // Phytochemistry, 1989, 28(4), P.1073-1075.
10. *Лафон Р.* Фитоэкдистероиды и мировая флора: Разнообразие, распространение, биосинтез и эволюция // Физиология растений, 1998, 3, С.326-346.
11. *Dinan L., Savchenko T., Whiting P.* On the distribution of phytoecdysteroids in plants // Celluar and Molecular Life Sci., 2001, 58(8), P.1121-1132.
12. *Volodin V., Chadin I., Whiting P., Dinan L.* Screening plants of European North-East Russia for ecdysteroids // Biochemical Systematics and Ecology, 2002, 30(6), P.525-578.
13. *Harmatha J., Dinan L.* Biological activity of natural and synthetic ecdysteroids in the BII bioassy // Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1997, 35, P.219-225.
14. *Voigt B., Whiting P., Dinan L.* The ecdysteroid agonist/antagonist and brassinosteroid-like activities of synthetic brassinosteroid/ecdysteroid hybrid molecules // Celluar and Molecular Life Sciences, 2001, 58(8), P.1133-1140.
15. *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, 32(2), P.181-185.
16. *Bathori M., Pongracz Z.* Phytoecdysteroids – from isolation to their effects on humans // Curr Med Chem, 2005, 12(2), P.153-172.
17. *Laird S.A., ten Kate K.* Linking biodiversity prospecting and forest conservation. In Sellling forest environmental services (ed. S. Pagiola, J. Bishop and N. Landell-Mills). Earthscan, London, UK, 2002, P.151-172.
18. *Hamilton A.* Medicinal plants and conservation: issues and approaches // Coordinator, People and Plants Initiative, and Member, Plants Conservation Committee and Medicinal Plants Specialist Group, IUCN, 2003 // International Plants Conservation Unit, WWF-UK Panda House, Catteshall Lane Godalming, Surrey GU7 1XR, UK.
19. *Butenandt A., Karlson P.* Über die isolierung eines metamorphose-hormones der insekten in kristallisierten form // Z. Naturforsch, 1954, 9b, P.389-391.
20. *Hocks P., Wiechert R.* 20-Hydroxyecdyson, isoliert aus insekten // Tetrahedron Lett., 1966, 26, P.2989-2993.

21. *Nakanishi K., Koreeda M., Sasaki S., Chang M.L., Hsu H.Y.* Insect hormones. The structure of ponasterone A, an insect-moulting hormone from the leaves of *Podocarpus nakaii* Hay // J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1966, 24, P.915-917.
22. *Ахрем А.А., Ковганко В.В.* Экдистероиды: Химия и биологическая активность. Минск, Наука и техника, 1989, С.327.
23. *Kozlova T., Thummel C.S.* Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila* // Trends in Endocrinology and Metabolism, 2000, 11(7), P.276-280.
24. *Smith S.* Small Brain Neuropeptides // Trends in Endocrinology and Metabolism, 1998, 9, P.301-302.
25. *Томашко К.Х., Гуклер Р.* Экологическое значение экдистероидов у морских артропод // Международное совещание по фитоэкдистероидам. Сыктывкар, Коми НЦ УрО РАН, 1996, С.43-44.
26. *Ахмед И.* Фитоэкдистероиды серпухи невооруженной *(Serratula inermis)* и их влияние на биосинтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот в тканях цыплят с различной обеспеченностью витамином Д3: Автореф. канд....биол. наук. Киев, 1993, С.27.
27. *Slama. K., Lafont R.* Insect hormones – ecdysteroids: their presense and actions in vertebrates (Reviw) // Eur J Entomol., 1995, 92, P.355-377.
28. *Hikino H, Ohizumi Y, Takemoto T.* Absorption, distribution, metabolism and excretion of insect-metamorphosing hormone ecdysterone in mice // Chemical Pharmaceutical Bulletin, 1972, 20, P.2454-2458.
29. *Lafont R., Girault J.P., Kerb U.* Excretion and metabolism of injected ecdysone in the white mouse // Biochemical Pharmocology, 1988, 36(6), P.1177-1180.
30. *Lafont R., Dinan L.* Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update // Journal of Insect Science, 2003, 3(7), P.30.
31. *Albanese C., Reutens A. T., Bouzahzah B., Fu M., D'Amico M., Link T., Nicholson R., Depinho R. A., Pestel R. G.* Sustained mammary gland-directed, ponasterone A-inducible expression in transgenic mice // FASEB J., 2000, 14, P.877-884.
32. *Selepcova L. Jalc D. Javorsky P., Baran M.* Influence of *Rhaponticum carthamoides* (Willd) Iljin on the growth of ruminal bacteria in vitro and on fermentation in an artificial rumen (Rusitec) // Arch Tierernahr., 1993, 43(2), P.147-156.
33. *Иванов В.И.* Питательные и стимулирующие свойства рапонтика сафлоровидного в силосованном и искусственно высушенном виде // Сб. науч. тр. М., ВНИИ кормов, 1987, 37, С.165-177.
34. *Tsitsimpikou C., 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, 15(19),P.1796-1801.
35. *Uchiyama M., Yoshida T.* Effect of ecdysterone on carbohydrate and lipid metabolism // Invertebrate Endocrinology and Hormonal Heterophylly. Berlin, Springer-Verlag., 1974, P.401-416.
36. *Сыров В.Н., Айзиков М.И., Курмуков А.Г.* Влияние экдистерона на содержание белка, гликогена и жира в печени, сердце и мышце белых крыс // Доклады Академии наук УзССР, 1975, 8, С.37-38.
37. *Catalan R.E, Martinez A.M, Aragones M.D, Miguel B.G, Robles A, Godoy J.E.* Alterations in rat lipid metabolism following ecdysterone treatment // Comp Biochem Physiol [B], 1985, 81(3), P.771-775.
38. *Kosovski M.I., Syrov V.N., Mirakhmedov M.M., Katkova S.P., Khushbaktova Z.A.* The effect of nerobol and ecdysterone on insulin-dependent processes linked normally and in insulin resistance // Probl Endokrinol, 1989, 35(5), P.77-81.
39. *Kholodova Iu. D., Tugai V.A., Zimina V.P.* Effect of vitamin D3 and 20-hydroxyecdysone on the content of ATP, creatine phosphate, carnosine and Ca2+ in skeletal muscles // Ukr Biokhim Zh., 1997, 69(3), P.3-9.

40. *Молоковский и др., Давыдов В.В., Тюленев В.В.* Активность препаратов адаптогенных растений в экспериментальном диабете // Проблемы эндокринологии, 1989, 6, С.82-87.
41. *Takahashi H., Nishimoto N.* Antidiabetic agents containing ecdysterone or inokosterone. J. Patent, 1992. N 04,125,P.135.
42. *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.
43. *Сыров В.Н., Набиев А.Н., Султанов М.В*. Действие фитоэкдистероидов на желчеотделительные функции печени в норме и при экспериментальном гепатите. Фармакология и токсикология, 1986, 3, С.100-103.
44. *Осинская Л.Ф., Саад Л.М., Холодова Ю.Д.* Антирадикальные свойства и антиоксидантная активность экдистерона // Украинский биохимический журнал, 1992, 64, С.114-117.
45. *Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А., Донченко Г.В.* Антиоксидантный эффект 20-гидроксиэкдизона в модельных системах // Военно-медицинский журнал, 1999, 3, С.35-38.
46. *Володин В.В., Ширшова Т.И., Бурцева С.А., Мельник М.В.* Биологическая активность 20-гидроксиэкдизона и его ацетатов // Растительные ресурсы, 1999, 35(2), С.76-81.
47. *Osipova S.O., Islamova Zh.I., Syrov V.N., Badalova N.S., Khushbaktova Z.A.* Ecdysten in the treatment of giardiasis // Med Parazitol (Mosk), 2002, 1, P.29-33.
48. *Курмуков А.Г., Сыров В.Н.* Противовоспалительные свойства экдистерона // Медицинский журнал Узбекистана, 1988, 10, С.68-70.
49. *Дармограй В.Н., Ухов Ю.И., Сысыкин А.А., Петров В.К., Рывкин О.М., Потехинский С.М.* Эффективность применения фитоэкдистероидной мази при химическом ожоге // Информ. листок. Ряз. ЦНТИ, Рязань, 1996, 54-96, С.4.
50. *Дармограй В.Н., Петров В.К., Золотарев Ю.В., Ковалев Э.А*. Фитоэкдистероиды – перспективы применения в хирургической практике // В кн.: От коллатерального кровообращения к органосберегающим операциям. Рязань, 1999, С.211-214.
51. *Сахибов А.Д., Сыров В.Н., Усманова А.С., Абакумова О.Ю.* Экспериментальный анализ иммунотропического действия фитоэкдистероидов // Доклады АН Узбекской ССР, 1989, С.55-57.
52. *Кузьмицкий Б.Б., Голубева М.Б., Конопля Н.А., Ковганко Н.В., Ахрем А.А.* Новые перспективы в поиске иммуномодуляторов среди соединений стероидной структуры // Фармакология и токсикология,1990, 3, С.20-22.
53. *Саратиков А.С., Краснов Е.А., Шадрина Г.Д., Зотова М.И., Нехода М.Ф, Аксенова Р.А., Алексеева Л.П.* Химико-фармакологическое исследование корней левзеи сафлоровидной // Известия Сибирского отделения Академии наук СССР. Серия биологических наук. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-е, 1970, 2(10), С.88-95.
54. *Дармограй В.Н., Петров В.К., Гордлеев В.А., Ухов Ю.И.* Превентивное и терапевтическое действие фитоэкдистероидов при индуцируемых анемиях и лейкопениях // VIII Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство», Тез. докладов. М., 2001, С.315-316.
55. *Пчеленко Л.Д., Метелкина Л.Г., Володина С.О.* Адаптогенный эффект экдистероид содержащей фракции *Serratula coronata* L. // Химия растительного сырья, 2002, 1, С.69-80.
56. Лекарства и БАД в спорте: Практическое руководство для спортивных врачей, тренеров и спортсменов / Под общей ред. Сейфулла Р.Д. и Орджоникидзе З.Г. М., Литтерра, 2003, С.320.
57. *Hanaya R., Sasa M., Ishihara K., Akimitsu T., Iida K., Amano T., Serikawa T., Arita K., Kurisu K.* Antiepileptic effects of 20-hydroxyecdysone on convulsive seizures in spontaneously epileptic rats // Jpn J Pharmacol, 1997, 74(4), P.331-335.

58. *Сыров В.Н., Назирова С.С., Кушбактова З.А.* Результаты экспериментального изучения фитоэкдистероидов в качестве стимуляторов электропоэза у лабораторных животных. Экспериментальная и клиническая фармакология, 1997, 3, С.41-44.
59. *Trenin S., Volodin V.V.* 20-hydroxyecdysone as a human lymphocyte and neutrophil modulator: in vitro evaluation // Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1999, 41, P.156-161.
60. *Айзиков М.И., Курмуков А.Г., Сыров В.Н.* Физиологическая активность и корреляция изменения белкового, углеводного и жирового обмена под влиянием экдистерона и неробола // Фармакология природных веществ, 1978, С.107-125.
61. *Slama K., Koudela K., Tenora J., Mathova A.* Insect hormones in vertebrates: anabolic effects of 20-hydroxyecdysone in *Japanese quail* // Experientia, 1996, 52(7), P.702-706.
62. *Тодоров И.Н., Митрохин Ю.И., Ефремова О.И., Сидоренко Л.И.* Влияние экдистерона на биосинтез белков и нуклеиновых кислот в органах мышей // Химико-фармацевтический журнал, 2000, 34(9), С.3-5.
63. *Гаджиева Р.М., Португалов С.Н., Панюшкин В.В., Кондратьева И.И.* Сравнительное изучение анаболизирующего действия препаратов растительного происхождения экдистена, леветона и “Прайм-Плас” // Экспериментальная и клиническая фармакология, 1995(5), С.46-48.
64. *Португалов С.Н., Панюшкин В.В., Абрамова Т.Ф.* Сравнение анаболизирующего действия недопинговых препаратов растительного происхождения: экдистена, леветона и "Прайм плас" // Теория и практика физической культуры, 1996, 9, С.47-49.
65. *Сейфулла Р.Д.* Научно-методические рекомендации о применении новых комбинированных адаптогенов растительного происхождения в спортивной медицине: Методические рекомендации. М.: ВНИИФК, 1998, С.28.
66. *Сейфулла Р.Д.* Спортивная фармакология. М.: Спорт-Фарма Пресс, 1999, С.120.
67. *Чермник Н.С.* Действие метандростенола и экдистерона на физическую выносливость животных и белковый обмен в скелетных мышцах. Фармакология и токсикология, 1988, 51(6), С.57-60.
68. *Португалов С.Н., Сейфулла Р.Д., Панюшкин В.В., Азизов А.П.* Изучение действия недопинговых анаболизирующих препаратов растительного происхождения на физическую работоспособность высококвалифицированных гребцов. Науч. труды 1996 года. М.: ВНИИФК, 1997, С.281-292.
69. *Takei M, Endo K., Nishimoto N., Shiobara Y., Inoue S., Matsuo S.* Effect of ecdysterone on histamine release from rat peritoneal mast cells // Journal of Pharmaceutical Sciences, 1991, 80, P.309-310.
70. *Taniguchi S.F., Bersani-Amado C.A., Sudo L.S., Assel S.M.C., Oga S.* Effect of Pfaffia iresinoides on the experimental inflammatory process in rats. Phytotherapy Research, 1997, 11, P.568-571.
71. *Purser D.B., Baker S.K.,* Ecdysones used to improve productivity of ruminants. US Patent 5,922,702. 1999, July 13.
72. *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.
73. *Зайнуллин В.Г., Мишуров В.П., Пунегов В.В., Старобор Н.А., Башлыкова Л.А., Бабкина Н.Ю.* Биологическая эффективность двух кормовых добавок, содержащих экдистероиды *Serratula coronata* L. // Растительные ресурсы, 2003, 39(2), 95-103.
74. *Кушке Э.Э., Алешкина Я.А.* Левзея сафлоровидная. М.: Медгиз, 1955, С.11.
75. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование, *Сем. Asteraceae.* СПб, Наука, 1993, 7, С.161-163.
76. *Meybeck A., Bonte F., Redziniak G.* Use of an ecdysteroid for the preparation of cosmetic or dermatological compositions intended, in particular, for strengthening the water barrier

function of the skin or for the preparation of a skin cell culture medium, as well as to the compositions. US Patent 5,609,873. March 11, 1997.
77. *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.
78. *Мирзаев Ю.Р., Сыров В.Н.* Влияние фитоэкдистероидов на половую активность крыс-самцов // Доклады АН УзССР, 1992, 3, С.47-49.
79. *Kibrik N.D., Reshetnyak J.A.* Therapeutical approaches to sexual disadaption // European Neuropsychopharmacology, 1996, 6 (S.4, no. 1004), P.167.
80. *Яковлев Г.М., Новиков В.С., Хавинсон В.Х.* Резистентность, стресс, регуляция. Л.: Наука, 1990, С.238.
81. Растения в медицине. Составители: Волынский Б.Г., Бендер К.И., Фрейдман С.Л. и др. Изд-во СГУ, 1983, С. 485.
82. *Шаин С.С., Терехин А.А.* Растения против стрессов. М.: Оверлей, 2002, С.160.
83. *Плотников М.Б., Алиев О.И., Васильев А.С., Маслов М.Ю., Дмитрук С.Е., Краснов Е.А.* Влияние экстракта левзеи сафлоровидной на реологические свойства крови у крыс с артериальной гипертензией // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2001, 64(6), С.45-47.
84. *Тимофеев Н.П.* Фитоэкдистероиды: Фармакологическое использование и активность (Обзор). Медицинские науки, 2005, 4(10), С.26-66.
85. *Guo D., Lou Z.* Textual study of Chinese drug loulu // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 1992, 17(10), P.579-581.
86. *Ганиев Ш.Г.* Экдизонсодержащие растения родов *Serratula* L., *Rhaponticum* Ludw. Узбекистана и прилегающих районов: Автореф. дис...канд. биол. наук / Ташкент, Ун-т им. В.И. Ленина, 1980, С.28.
87. *Постников Б.А.* Маралий корень *(Rhaponticum carthamoides)* и основы введения его в культуру. Новосибирск, СО РАСХН, 1995, С.276.
88. *Shiu-Ying Hu.* An Enumeration of Chinese Materia Medica, HK, 1980, http://ccat.sas.upenn.edu/~nsivin/index.html
89. *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. М., РАЕН, 2001, 5, С.108-134.
90. *Nishimoto N., Shiobara Y., Inoue S.S., Fujino M., Takemoto T., Yeoh C.L., Oliveira F.D., Akisue G., Akisue M.K., Hashimoto G.* Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides* // Phytochemistry, 1988, 27, P.1665–1668.
91. *Shibuya T., Ario T., Fukuda S.* Composition. US Patent 6,224,872. May 1, 2001.
92. *Arnault C., Slama K.* Dietary effects of phytoecdysones in the leek-moth, *Acrolepiopsis assectella* Zell. (Lepidoptera: Acrolepiidae) // J. Chem. Ecol, 1986, 12(10), P.1979-1986.
93. *Gu S.H., Iwashita Y., Kawasaki H.* Changes in the moulting character of "Sanminsho" of the silkworm and its endocrine events // J. Sericult. Sc. Japan, 1988, 57(4), P.328-334.
94. *Harmatha J., Budesinsky M., Vokac K.* Photochemical transformation of 20-hydroxyecdysone: production of monomeric and dimeric ecdysteroid analogues // Steroids, 2002, 67, P.127-135.
95. *Dinan L., Hormann R.E., Fujimoto T.* An extensive ecdysteroid CoMFA. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 1999, 13, P.185-207.
96. *Odinokov V.N, Galyautdinov I.V., Nedopekin D.V., Khalilov L.M., Shashkov A.S., Kachala V.V., Dinan L., Lafont R.* Phytoecdysteroids from the juice of *Serratula coronata* L. (Asteraceae) // Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 32(2), P.161-165.
97. *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. July 10, 2001.

98. *Bathori M., Kalman A., Argay G., Kalasz H.* The analysis and crystallographic characterization of 20-hydroxyecdysone // Curr Med Chem., 2000, 7(12), P.1305-1312.
99. *Golbraikh A., Bonchev D., Tropsha A.* Novel chirality descriptors derived from molecular topology // J. Chem. Inf. Comput. Sci., 2000, 41(1), P.147-158.
100. *Хатымов Р.В., Муфтахов М.В., Мазунов В.А., Недопекин Д.В., Галяутдинов И.В., Одиноков В.Н.* Особенности масс-спектров резонансного захвата электронов молекулами экдистероидов // Известия Академии наук. Серия химическая, 2002, 2, С.291-294.
101. *Fabian L., Argay G.., Kalman A., Bathori M.* Crystal structures of ecdysteroids: the role of solvent molecules in hydrogen bonding and isostructurality // Acta Cryst., 2002, 58(4), P.710-720.
102. *Horn D.H.S., Bergamasco R.* In: Comparative Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (Kerkut G.A., Gilbert L.I., Eds.). Oxford: Pergamon Press, 1985, 7, 185-248.
103. *Ravi M., Hopfinger A.J., Horman R.E., Dinan L.* 4D-QSAR Analys of a Set of Ecdysteroids and a Comparasion to CoMFA Modeling // J. Chem. Inf. Comput. Sci., 2001, 41, 1587-1604.
104. *Bourne P.C., Whiting P., Dhadialla T.S., Hormann R.E., Girault J-P., Harmatha J., Lafont R., Dinan L.* Ecdysteroid 7,9(11)-dien-6-ones as potential photoaffinity labels for ecdysteroid binding proteins // Journal of Insect Science, 2002, 2(11), 1-11.
105. *Hormann R.E., Dinan L., Whiting P.* Superimposition evaluation of ecdysteroid agonist chemotypes through multidimensional QSAR // Comput Aided Mol Des., 2003, 17(2-4), 135-153.
106. *Giguere V.* Orphan nuclear receptors: From gene to function // Endocrine Reviews, 2001, 20(5), 689-725.
107. *Aranda A., Pascual A.* Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression // Physiological Reviews, 2001, 81(3), 1269-1304.
108. *Evans R.M.* The steroid and thyroid hormone receptor superfamily // Science, 1988, 240, 889-895.
109. *Evans R.M., Saez E.* Formulations useful for modulating expression of exogenous genes in mammalian systems, and products related thereto. US Patent 6,333,318. December 25, 2001.
110. *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 // J. Biol. Chem., 2002, 277(38), 35118-35123.
111. *Jepson I., Martinez A., Greenland A. J.* Gene switch. US Patent 6,379,945. April 30, 2002.
112. *Billas I.M., Moulinier L., Rochel N., Moras D.* Crystal Structure of the Ligand-binding Domain of the Ultraspiracle Protein USP, the Ortholog of Retinoid X Receptors in Insects // J. Biol. Chem., 2001, 276(10), P.7465-7474.
113. *Romert A., Tuvendal P., Simon A., Dencker L., Eriksson U.* The identification of a 9-cis retinol dehydrogenase in the mouse embryo reveals a pathway for synthesis of 9-cis retinoic acid // Developmental Biology, 1998, 95(8), P.4404-4409.
114. *Ross S.A., McCaffery P.J., Drager U.C., De Luca L.M.* Retinoids in Embryonal Development // Physiological Reviews, 2000, 80(3), P.1021-1054.
115. *Baker K.D., Shewchuk L.M., Kozlova T., Makishima M., Hasell A., Wisely B., Caravella J.A., Lambert M.H., Reinking J.L., Krause H., Thumell C.S., Willson T.M., Mangelsdorf D.J.* The Drosophila orphan nuclear receptor DHR-38 mediates an atypical ecdysteroid signaling pathway // Cell, 2003, 113, P.731-742.
116. *Buszczak M., William A. Segraves W.A.* Drosophila metamorphosis: The only way is USP? // Current Biology, 1998, 8(24), P.879-882.

117. *Suhr S.T., Gil E.B., Senut M-C., Gage F.H.* High level transactivation by a modified *Bombyx* ecdysone receptor in mammalian cells without exogenous retinoid X receptor // PNAS, 1998, 95, P.7999-8004.
118. *Voellmy R.* Molecular regulatory circuits to achieve sustained activation of genes of interest by a single stress. US Patent 6,342,596. January 29, 2002.
119. *Зибарева Л.Н., Еремина В.И.* Динамика содержания экдистероидов в видах рода *Silene* L., выращиваемых в Сибирском ботаническом саду (г. Томск) // Растительные ресурсы, 1996, 32(1-2), С.106-110.
120. *Зибарева Л.Н.* Фитоэкдистероиды растений семейства *Caryophyllaceae.* Автореф. док…хим. наук. Новосибирск, Институт биоорганической химии СО РАН, 2003, С.31.
121. *Zibareva L., Volodin V., Saatov Z., Savchenko T., Whiting P., Lafont R., Dinan L.* Distribution of phytoecdysteroids in the Caryophyllaceae // Phytochemistry, 2004, 64(2), P.499-517.
122. *Тодоров И.Н., Митрохин Ю.И., Ефремова О.И., Сидоренко Л.И.* Действие экстрактов левзеи сафлоровидной на биосинтез РНК и белков в органах мыши // Химико-фармацевтический журнал, 2000, Т. 34(9), С.24-26.
123. *Плотников М.Б., Алиев О.И., Васильев А.С., Маслов М.Ю., Чернышева Г.А., Краснов Е.А., Зибарева Л.Н.* Гемореологическая активность экстрактов из надземной части *Lychnis chaldedonica* L. и *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin при экспериментальном инфаркте миокарда // Растительные ресурсы, 1999, 35(1), С.103-107.
124. *Тренин Д.С., Володин В.В., Бейкин Я.Б., Шлыкова А.Б.* Экдистероидная фракция надземной части *Serratula coronata* L. в реакции спонтанного Е-розеткообразования и агаромиграционном тесте in vitro // Экспериментальная и клиническая фармакология, 1996, 1, С.55-57.
125. *Зеленков В.Н., Тимофеев Н.П., Колесникова О.П., Кудаева О.Т.* Выявление биологической активности для водных экстрактов листовой части левзеи сафлоровидной на модели in vitro // Мат-лы I Рос. науч.-практич. конф. “Актуальные проблемы инноваций в создании фитопродуктов на основе нетрадиционных растительных ресурсов и их использование в фитотерапии. М., РАЕН, 2001, С.59-62.
126. *Федоров В.Н., Раков А.А., Смирнов Н.А., Стовичек В.Г., Смирнов А.В., Арбузов Е.Е., Попков В.В., Федорова Т.Б., Вдовиченко В.Д., Аршинов А.В., Султанов С.Ш., Ситников И.Г., Сошин А.Б., Ефременко Л.В.* Сравнительная эффективность фармакопейных препаратов адаптогенов / Мат-лы VI Междунар. науч-практич. конф. “Нетрадиционное растениеводство, экология и здоровье”. Главы 6,7,8. – Симферополь, Национальная Академия Наук Украины, 1997, С.486-487.
127. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. В 2-х частях. Часть 1. М.: Медицина, 1993, С.736.
128. *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.
129. Лекарственные средства: 4000 препаратов, свойства, применение, противопоказания. Справочник (Под ред. М.А. Клюева). М.: Книжный Дом «Локус»; Гомель: Агенство «РИД», 1995, С.704.
130. *Vogtli M., Elke C., Imhof M.O. Lezzi M.* High level transactivation by the ecdysone receptor complex at the core recognition motif // Nucleic Acids Research, 1998, 26(10), P.2407-2414.
131. *Vegeto E., McDonnell D. P., O'Malley B. W., Schrader W. T., Tsai M.J.* Mutated steroid hormone receptors, methods for their use and molecular switch for gene therapy. US Patent 5,935,934. August 10, P.1999.

132. *Cheung J., Smith D.F.* Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update // Molecular Endocrinology, 2000, 14(7), P.939-946.
133. *Jenster G., Spencer T.E., Burcin M.M., Tsai S. Y., Tsai M-J., O'Malley B.W.* Steroid receptor induction of gene transcription: A two-step model // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, P.7879-7884.
134. *Zhu Y., Kan L., Qi C., Kanwar Y.S., Yeldandi A.V., Rao M.S., Reddy J.K.* Isolation and Characterization of Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) Interacting Protein (PRIP) as a Coactivator for PPAR // J Biol Chem, 2000, 275(18), P.13510-13516.
135. *Dressel U., Thormeyer D., Altincicek B., Paululat A., Eggert M., Schneider S., Tenbaum S. P., Renkawitz R., Baniahmad A.* Alien a highly conserved protein with characteristics of a corpressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily // Mol. Cel. Biol., 1999, 19(5), P.3383-3394.
136. *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, 20, P.3870-3879.
137. *Соболевская К.А.* Интродукция растений в Сибири. Новосибирск: Наука, 1991, С.184.
138. *Kholodova Yu.D.* Phytoecdysteroids: biological effects, application in agriculture and complementary medicine // Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal, 2001, 73, P.21-29.
139. *Elling C. E., Holst L. B., Schwartz T. W., Gerlach L. O, Pedersen J. T.* Method of identifying ligands of biological target molecules. US Patent Application 20020061599. May 23, 2002.
140. *Кузьменко А.И., Морозова Р.П., Николенко И.А., Корниец Г.В., Донченко Г.В.* Влияние витамина D3, аргинина и биологически активного комплекса из Serratula coronata на свободнорадикальное окисление липидов при D-гиповитаминозе // Украинский биохимический журнал, 1999, 71(2), С.69-74.
141. *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". Москва, РАЕН, 2005, С.84-85.
142. *Фомовская Г.Н., Бердышев А.Г., Холодова Ю.Д.* Иммуно-модуляторный эффект экдистерона // Украинский биохимический журнал, 1992, 64(2), С.56-61.
143. *Дармограй В.Н., Гусак Ю.К., Морозов В.Н., Гусак Н.Ю., Зотов В.В., Назимова С.В., Кривошеева Г.А.* Опыт использования фитоэкдистероидов в лечении угрожающего прерывания беременности // Традиционные методы лечения в акушерско-гинекологической практике: Тр. II науч.-практ. конф. М., 2003, С.107-108.
144. *Mirzaev I.R., Syrov V.N., Khrushev S.A., Iskanderova S.D.* Effect of ecdystene on parameters of the sexual function under experimental and clinical conditions // Eksp Klin Farmakol, 2000, 63(4),C.35-37.
145. *Гусак Ю.К., Морозов В.Н., Дармограй В.Н., Гусак Н.Ю.* Фитолечение климактерического синдрома // Актуальные вопросы акушерства и гинекологии. Раздел II, Гинекология, 2002, 1(1), С.41.
146. *Otaka T., Okui S., Uchiyama M.* Stimulation of protein synthesis in mouse liver by ecdysone // Chem. Pharm. Bull., 1969, 17(1), C.75-81.
147. *Сыров В.Н., Курмуков А.Г.* Об анаболической активности фитоэкдизона-экдистерона, выделенного из *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin // Фармакология и токсикология, 1976, 6, С.690-693.
148. *Соколов С.Я.* Фитотерапия и фитофармакология: Руководство для врачей. М.: Медицинское информационное агентство, 2000,С.976.