

УДК 547.92:577.19:615.015.11; 58:633.79:615.45

©Тимофеев

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ЭКДИСТЕРОИДАМ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В МЕДИЦИНЕ, ИНТЕРНЕТ-РЕСУРСЫ, ИСТОЧНИКИ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Н.П.Тимофеев

КХ "БИО";

Россия 165650, г. Коряжма, Архангельской обл., ул. Ленина, 47а-55;
тел.: (818-50) 3-79-33; эл. почта: timfbio@atnet.ru

В обзоре проанализирован современный уровень научных изысканий по экдистероидам, представляющих бурно развивающееся направление биомедицинской химии; рассмотрены области применения, значимость в медицине, важнейшие представители, источники получения и биологическая активность. Показаны исторические ретроспективы и достигнутые уровни исследований при скрининге мировой флоры, идентификации наиболее активных составов и изучению практических возможностей использования. Проанализированы Интернет-ресурсы (базы данных, объем, доступность) по электронным библиотекам, поисковым серверам в разрезе фундаментальных исследований и прикладных разработок, коммерческих предложений. Рассмотрены основные источники и биотехнологические методы получения важнейших представителей экдистероидов - *понастерон*, *муристерон* и *экдистерон*. Отмечено, что химически изолированные экдистероиды чрезвычайно дороги и востребованы главным образом в наукоемких исследованиях. При массовом применении экдистероидов в фармацевтической промышленности перспективно использование неочищенных или слабоочищенных растительных составов из видов-сверхпродукторов, не обладающих токсичностью и не требующих высокочистотных технологий переработки. Для России экономически оправдано культивирование растений из родов *Rhaponticum* и *Serratula*, являющихся видами-сверхпродукторами. Базисная концентрация экдистерона у левзеи или рапонтникума сафлоровидного (*Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin) составляет 0,12-0,57 %, у серпухи венценой (*Serratula coronata* L.) - 0,31-1,15 % в расчете на сухую биомассу. Для первого из них разработана промышленная технология возделывания и открыта возможность создания нового класса высокоактивных фармпрепаратов из надземных органов. Эффективная биологическая активность экстрактов *Rhaponticum carthamoides*, выращенного по особой технологии в условиях агропопуляций, составляет $10^{-11} \dots 10^{-13}$ М, что на 3-4 порядка выше, чем активность высокоочищенных индивидуальных экдистероидов (0,5-10 мг/кг против 5-50 мг/кг).

Ключевые слова: экдистероиды, 20-гидроксиэкдизон, понастерон, муристерон, *Rhaponticum*, биоинфузин

1. ЗНАЧЕНИЕ В МЕДИЦИНЕ

Одним из самых значительных достижений науки последнего времени является разработка технологий использования экдистероидов, синтезируемых растениями, в управлении процессами роста и развития различных организмов. Последнее открытие, добавляя новое содержимое к широко известным адаптогенным и иммуномодулирующим эффектам экдистероид-содержащих препаратов в классической, народной и нетрадиционной медицине (<http://www.sciteclibrary.com/rus/catalog/pages/1502.html>; <http://insectscience.org/3.7>), еще более поднимает значимость и актуальность его для здоровья человека.

Являясь лигандами для внутриклеточных и мембранных рецепторов, их управляющими элементами, экдистероиды обладают способностью изменять гомеостаз организма, воздействуя на рост, дифференциацию и запрограммированную смерть клеток [37], выработку специфических продуктов их метаболизма. 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.

В практической медицине экистероид-содержащие составы используются для предупреждения болезней и поддержания иммунного статуса у здорового человека [39, 53, 99]; занимают важное место в спортивной, космической и военной медицине - для адаптации и повышения работоспособности в условиях лимитирующих факторов, в т. ч. преодоления чрезвычайных физических и психических нагрузок [84, 90, 91]. Могут применяться при трансплантации человеческих органов и кожи [59]; для усиления роста волос, заживления ран и язв, лечения ожогов [43, 80]; улучшения половой функции, стимулирования либидо и устранения дискомфорта в сексуальной жизни [34].

Молекулы экистероидов (рис. 1), представляющие собой группу липофильных полигидроксильированных стероидов, участвуют в жизнедеятельности практически всех классов организмов, выполняя множественные функции. Вопрос о роли их в живой природе до сих пор остается открытым. Доподлинно известно лишь то, что один из главных представителей экистероидов, *20-hydroxyecdysone* (20E), является истинным гормоном линьки для членистоногих (насекомых и ракообразных) и инициирует превращения, происходящих в ходе развития личинки через ряд стадий до куколки, а затем до взрослого насекомого [36, 69]. Для нормального метаморфоза ювенильный гормон и гормоны линьки должны присутствовать в необходимом количестве и в нужный момент развития жизненного цикла. Ювенильный гормон способствует личиночному росту и препятствует метаморфозу. По мере роста личинок концентрация его падает. Периодические линьки вызваны волнами экистероидов (рис. 2), синтезируемых в проторакальных железах под воздействием нейропептидов, вырабатываемых в мозге насекомых [55].

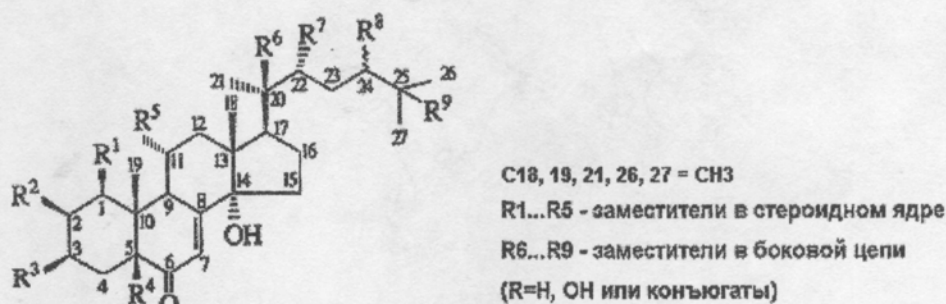


Рисунок 1.
Структурная схема экистероидов

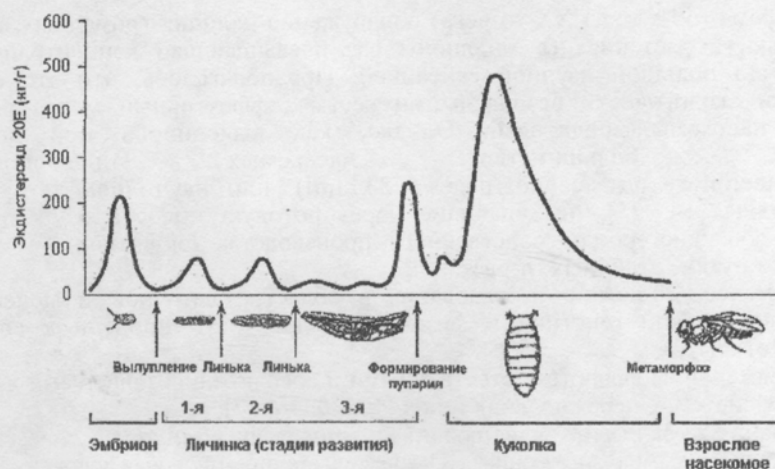


Рисунок 2.
Экистероидный титр в развитии *Drosophila melanogaster* (по [36] с изменениями)

Возникнув очень давно, еще несколько сот миллионов лет назад, экдистероиды приняли участие в сложном коэволюционном пути развития экосистем и адаптации их к окружающей среде. Присутствие экдистероидов характерно, наряду с цветковыми растениями, для таких древних организмов, как папоротники, грибы, мхи, водоросли, голосеменные растения (рис. 3). Считается, что появившиеся в сравнении с растениями на более поздних этапах эволюции насекомые стали использовать их в качестве гормонального фактора развития. Так как действие экдистероидов в качестве гормональных веществ проявляется в чрезвычайно низких концентрациях (10^{-8} ... 10^{-9} М), предполагается, что повышенный синтез их у древних папоротников и голосеменных растений первоначально представлял защитный механизм от поедания насекомыми-фитофагами.

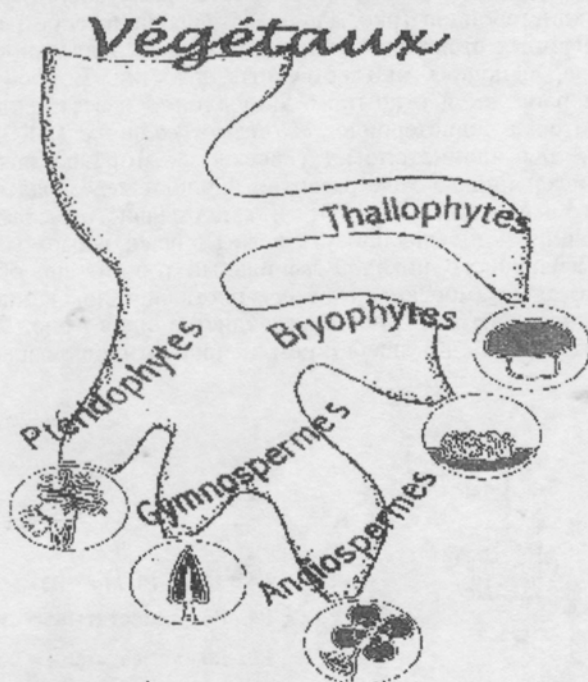


Рисунок 3.

Источники экдистероидов (по <http://www.quasimodo.versailles.inra.fr/ecdyzone>)

В свое время (60-е годы XX-го века) обнаружение наличия громадных количеств гормонов линьки в растениях (в миллионы раз превышающей концентрацию их в насекомых) было большой научной сенсацией. Предполагалось, что это открытие позволит найти экологически безопасный и весьма эффективный метод регуляции численности насекомых-вредителей. Однако, как выяснилось при детальном исследовании, большинство насекомых невосприимчивы (<http://www.sciteclibrary.ru/rus/catalog/pages/4723.html>), или научились детоксировать фитоэкдистероиды [14, 75], поступающие через ротовую полость и стали взамен синтезировать зооэкдистероиды собственного производства (экдизоны) - по другим метаболическим путям, отличных от растений.

Тем не менее, 20-летние исследования в области клеточной и молекулярной биологии, экологической генетики и физиологических наук привели к еще более значительному открытию:

- что экдистероиды являются естественными и абсолютно безопасными лигандами в молекулярных системах переключения генов [10, 30, 56, 67];
- что механизмы экдизон- (экдистероид) индуцированных систем экспрессии генов, подобные в клетках насекомых, применимы и к млекопитающим, включая человека [2, 15, 51];
- что такие системы можно искусственно конструировать, модифицировать и клонировать, создавая рекомбинантные белки-рецепторы и активаторы транскрипции на основе стероидных, тироидных, ретиноидных рецепторов насекомых и млекопитающих, ретро- и альфа-вирусов, бактериофагов и шоковых белков [1, 31, 45, 60, 62].

Значимость последнего открытия чрезвычайно актуальна в постгеномную эру медицины и ожидаются большие объемы инвестиционных вложений в освоение методов молекулярной и генной терапии [32]. С завершением расшифровки генома человека предполагается, что с помощью "генных переключателей" можно будет выключить клетки, продуцирующие ущербные для организма структуры (например, злокачественные новообразования) и остановить развитие болезни, не поддающееся лечению традиционными методами (большая группа наследственных болезней) [37, 68]. Аналогично, можно осуществлять встраивание и точечное включение отсутствующих в клетках организма-хозяина генов, ответственных за продукцию целевых терапевтических агентов, а также запустить в работу факторы регенерации поврежденных тканей [48].

Экдизон-индуцированные системы могли бы использоваться для исследования групповых функций генов как в естественных, так и искусственных системах. При интеграции таких систем с современными компьютерными технологиями появляется возможность оценки свойств любого вещества или биологического объекта, располагая чрезвычайно малыми количествами последних - в пределах 1 нг [4]. Считывая, например, лазерным лучом флуоресцентное излучение таких систем, отражающее результат экспрессии группы сцепленных генов в ответ на введение лекарственного препарата, и сравнивая его с известным профилем, можно заранее предсказать мутагенность или цитотоксичность [18].

Какими бы необычными не казались новые направления использования экдистероидов, тем не менее, экдизон-индуцированные системы не только созданы и запатентованы, но и реализуются в коммерческих масштабах (<http://www.invitrogen.com>; рис. 4). Кроме того, для экдистероидов важными аспектами клинического применения являются многочисленные негеномные эффекты. Механизмы взаимодействия экдистероидов с мембранными рецепторами в качестве сигнальных молекул, активизирующих вторичные мессенджеры, только еще начинают изучаться [11, 68], но этот факт не препятствует широкому практическому использованию экдистероид-содержащих препаратов при нарушениях сердечно-сосудистой, центральной нервной и репродуктивной системы, общего гомеостаза организма [16, 99].

Поэтому сегодня востребованы такие источники экдистероидных молекул или субстанций на их основе, которые бы характеризовались минимальными дозами, высокой активностью, низкой токсичностью, устойчивостью к распаду, быстрым выведением из организма, малой стоимостью и масштабируемостью производства [39, 50, 51].

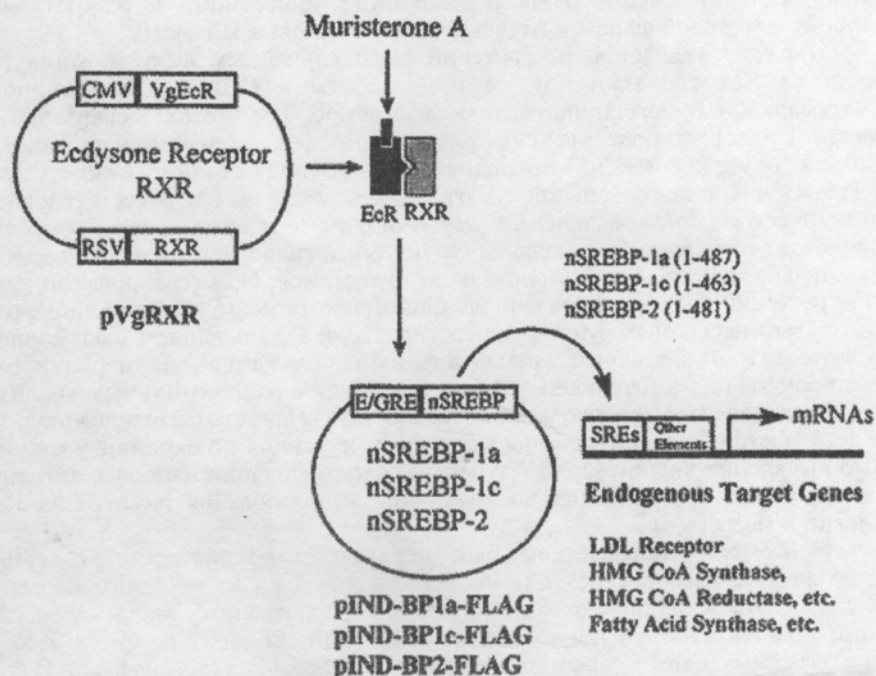


Рисунок 4.

Экдизон-индуцированная система экспрессии гена на основе экдистероида muristerone A, по [47]

Справочно. Потребительский рынок экдистероид-содержащих препаратов не ограничивается только медициной, им являются сегменты рынка, ориентированные на:

1. Здоровье человека (антидепрессанты, иммуно- и секс-стимуляторы, сжигатели жира, противошоковые, антиболевые и ранозаживляющие средства).

2. Физическую культуру и спорт (профессиональный и любительский, туризм).

3. Научные отрасли биотехнологии, генной инженерии и микробиологии (культура клеток и тканей, программируемые включатели и выключатели гена, системы клонирования наследственной информации, плазмидные векторы).

4. Косметические и парфюмерные изделия.

5. Использование в качестве спецсредств ("эликсиры бесстрашия", "концентраторы" физической силы и психической энергии, антигипнотические и противоснотворные средства).

6. Отрасли, связанные с производством животноводческой продукции (мясное и молочное скотоводство, пушное звероводство, шелководство), конный спорт.

7. Промышленное разведение пресноводных и морских ракообразных (омары, langoustes, креветки, дафнии).

8. Защиту урожая растениеводческой продукции от насекомых-вредителей (плодовое садоводство, лесная и амбарная энтомология).

9. Увеличение силы и продуктивности пчелиной семьи.

10. Применение в качестве антипаразитарных (антигельминтных) средств.

11. Использование в качестве регуляторов роста и развития сельскохозяйственных и декоративных культур; управления признаком, устойчивостью и продуктивностью трансгенных растений.

2. ВАЖНЕЙШИЕ ЭКДИСТЕРОИДЫ

Первые исследования по экдизонам с целью выделить гормоны насекомых были начаты в начале 30-х годов немецкими учеными. В 1954 году им удалось изолировать 25 мг слабоочищенного вещества из 500 кг куколок тутового шелкопряда (*Bombix mori*) и кристаллизовать его [6]. В 1963 году установлена общая структура, которая позволила отнести α -ecdysone (экдизон) к стероидам (с молекулярной массой $M=464$). В 1965 году произошла расшифровка строения молекулы рентгеноструктурным методом [27, 33], где в сравнении с β -ecdysterone отсутствует ОН-группа при углеродном атоме C_{20} (рис. 5). Сами по себе эти работы были известны лишь узкому кругу специалистов и возможно, оставались бы такими еще долгое время, если бы не стечение обстоятельств, вызвавшее бурный рост интереса и вложение крупных инвестиций в работы, связанные со скринингом мировой флоры и изучением свойств новых молекул.

Открытие экдизонов из растений было случайным фактом, когда Карел Слама выехал из Чехословакии для научной работы в США и культивировал там на фильтровальной бумаге припавшее насекомое, красноклоп бескрылый (*Pyrrhocoris apterus* L.). Здесь его поджидал сюрприз - метаморфоз насекомого нарушался, и он не мог добиться окукливания на последней личиночной стадии. Секрет заключался в происхождении фильтровальной бумаги. В данном случае она была изготовлена из пихты бальзамической (*Abies balsamea*). С другими бумагами метаморфоз протекал нормально. В процессе экстракции был выделен структурный аналог ювенильного гормона ювабион, избирательно действующий именно на это насекомое. При тестировании других, взятых наугад растений, было установлено наличие в них множества соединений с гормональной активностью насекомых. Метод биотестирования в дальнейшем был модифицирован в ВП-биотест и в настоящее время широко используется для первичного скрининга экдистероидов из растительной флоры в сочетании с радиоиммунным анализом (РИА).

Учитывая экономическую и биологическую важность фитозекдизонов, за последние три десятилетия были приложены значительные усилия по скринингу мировой флоры с целью выявления видов-сверхпродуцентов, идентификации наиболее активных составов и по изучению практических возможностей использования их в различных областях биологии и медицины.

Ponasterone (понастерон) был первым фитозекдистероидом, выделенным и охарактеризованным в 1966 году японскими учеными из хвойного дерева *Podocarpus nakaii* [44]. В дальнейшем он был обнаружен в родственных видах - *Podocarpus macrophyllus*, *Podocarpus reichei*, с концентрацией около 100 мг/кг на сухую массу [28, 57], а также в тисовых - *Taxus canadensis*, *T. chinensis*, *T. cuspidata* (50-80 мг/кг). В конце 70-х и в начале 80-х годов было открыто присутствие *ponasterone* в ракообразных [38, 42], а в 1995 году в грибах из семейства свинушковых - *Paxillaceae*, при концентрации до 50 мг/кг [63].

Ecdysterone (β -ecdysterone, 20-hydroxyecdysone, 20E; экдистерон, 20-

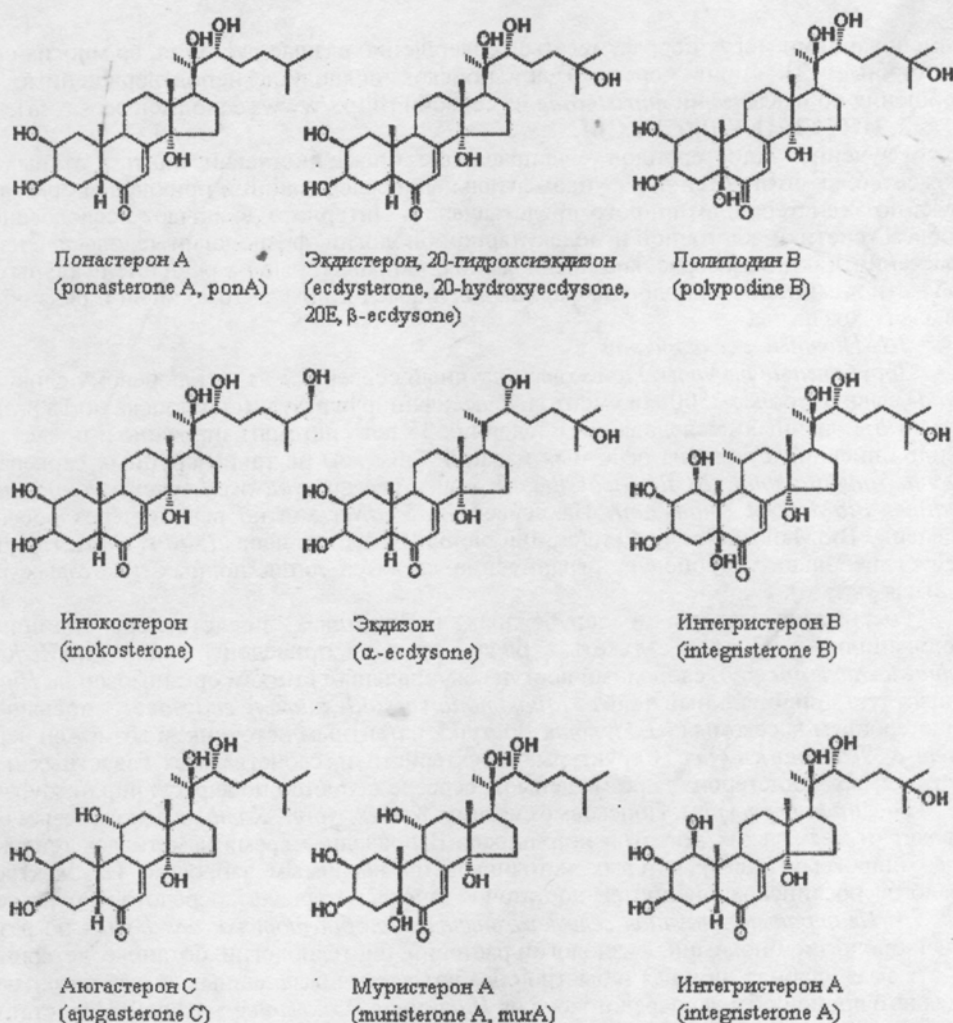


Рисунок 5.
Представители экдистероидов

гидроксиэкдизон) в 1966 году вначале был изолирован из ракообразного *Jasus calandei*, в количестве 2 мг из 1 тонны, и поэтому был назван crustedysone [21]. Затем найден в насекомых: тутовом шелкопряде - *Bombix mori* и *Antharea pernyi*, в количестве 200 мг из 31 кг куколок [25]. После установления структуры в том же году выделен из хвойных и папоротников: сначала в количестве 50 мг из 1 кг *Podocarpus elatus* [26], а затем из корневищ *Polipodium vulgare*, с концентрацией до 10 г/кг [24].

В последующие годы установлено, что ecdysterone содержится в абсолютном большинстве растений [12], включая злаковые (кукурузу - *Zea mays*) и крестоцветные культуры (*Arabidopsis thaliana*). Различие в концентрации достигает от 100 миллионов до 1 миллиарда раз (от 20-300 нг до 20-30 г/кг). Главными отечественными источниками выделения ecdysterone в промышленных масштабах являются многолетние растения рапунтикум сафлоровидный - *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin и серпуха венценосная - *Serratula coronata* L., интродуцированные в различных регионах России.

Muristerone A (муристерон), самый активный, редкий и чрезвычайно дорогой экдистероид из ныне известных, обнаружен в 1972 году немецкими учеными в семенах эндемичных растений из рода *Ipotoea* [7], произрастающих на южных склонах Гималайских гор. *Ipotoea* - самый загадочный, окутанный тайной источник. С момента обнаружения опубликовано около 1,5 тысяч работ, связанных с *Muristerone A*, и только в нескольких первых публикациях упоминается источник выделения [7, 8, 9]. Сложность здесь заключается в том, что номенклатура рода *Ipotoea* чрезвычайно запутана, под этими

наименованиями могут подразумеваться совершенно разные растения, во многих случаях эндемичные [3]. Лишь через 30 лет поисков появились неподтвержденные новые сообщения об извлечении *muristerone* из секвойи (<http://www.sequoiasciences.com>).

3. ИНТЕРНЕТ-РЕСУРСЫ.

Изучение экдистероидов - направление биомедицинской химии, открывающее множество возможностей для фундаментальных исследований и прикладных разработок. Наука по экдистероидам широко представлена в Интернете, включает исследования как проблем генетики, клеточной и молекулярной биологии, физиологии человека, животных и растений, так и коммерческие предложения, направленные на решение реальных задач в области химии, биотехнологии, фармакологии, медицины, энтомологии и ряда областей сельского хозяйства.

3.1. Научные исследования.

Зарубежные ресурсы. Поисковый научный сервер *Scirus* по ключевому слову *ecdysteroids* выводит более 2500 документов, классифицируя результаты поиска по 15 разделам. Результаты научных исследований последних 35 лет систематизированы и представлены в виде описаний статей из печатных изданий (abstract) на таких крупных серверах, как *Ingenta* (ingenta.com), *NCBI* (ncbi.nlm.nih.gov), *Synergy* (blackwell-synergy.com), *PubMed*, *Medline*, *BioMedNet* (bmn.com). На сервер *BioMedNet* можно выйти через российское отделение *BioMail* (molbiol.edu.ru/cgi-bin/biomail), *Medline* через *РФФИ* (intra.ru). Доступ требует небольших процедур, ограничение касается лишь полных текстовых версий (платная услуга).

Российские авторы в зарубежных библиотеках представлены единичными публикациями. Полные тексты ряда статей приведены на *PubMedCentral* (pubmedcentral.nih.gov), свободный доступ к журнальным статьям организован на *HighWire*. Существует специальный сайт (quasimodo.versailles.inra.fr/ecdyzone), посвященный экдистероидам насекомых - *EcdyZone*. Доступ к патентным источникам возможен через *US Patent & Trademark Office*. Структуры, характеристики, свойства всех известных и вновь открываемых экдистероидов размещены на сервере *EcdyBase* по адресу: <http://ecdybase.org>.

Российские ресурсы. Поисковые системы *Yandex*, *Aport*, *Rambler* по ключевым словам выводят от нескольких до сотни источников. В последнее время наметилась тенденция к более широкому охвату сетевых источников по вводимым запросам. Из электронных каталогов российских библиотек достаточно много материала сосредоточено на сервере *ЦНСХБ* (Центральная научная сельскохозяйственная библиотека; cnsxb.ru) - по разделам общей биологии, биохимии, физиологии растений, биотехнологии, ботанике, ветеринарии.

Самая удобная, мощная и быстро обрабатываемая база данных (в т. ч. патентная) до недавнего времени была сосредоточена на *Интегрум-Техно* (integrum.com). Недостаток, как и у других российских ресурсов - в отсутствии краткого описания материала и коммерческая составляющая доступа. В режиме поиска можно найти только названия публикаций, что явно недостаточно для определения важности и значимости материала. После специального запроса и разрешения администрации можно получить пробный доступ, позволяющий ознакомиться с ограниченным объемом информации (до 1 Мб) бесплатно.

В *РФФИ* (Российский фонд фундаментальных исследований; elibrary.ru) тема представлена ограниченно, электронная библиотека практически не содержит ссылок по русскоязычным источникам, нет доступа к полным версиям документов. На сервере *ЦНМБ* (Центральная научная медицинская библиотека; scsml.rssi.ru) в режиме поиска не удалось найти источников по экдистероидам. База данных экдистероид-содержащих растений, произрастающих на Европейском Северо-Востоке России, приведена на сервере Института биологии Коми НЦ УрО РАН, где описана примерно третья часть от видовой разнообразия региона (<http://ib.komisc.ru/biochem/ecdysteroids>).

Главные недостатки российских Интернет-ресурсов - низкая скорость обработки запроса, отсутствие краткого описания материала, всеобщая коммерциализация доступа к полным версиям документов (если таковые имеются). Для зарубежных ресурсов характерно глобальное сетевое объединение источников от ведущих организаций. Сервера характеризуются высокой скоростью обработки информации, оптимизацией аппаратного и программного обслуживания. Скорость получения данных многократно (порой в десятки раз) превышает таковую из российских источников. Проблемы можно свести к формам представления графических и табличных данных, которые не оптимизированы для доступа по медленным линиям связи. Для ускорения загрузки в ряде баз данных представлены только текстовые части публикаций, а графические элементы загружаются в альтернативном режиме.

3.2. *Коммерческие предложения.* При поиске по ключевым словам масштабностью охвата выделяется метапоисковая система *AltaVista* - каждый запрос выдает до полутысячи ссылок. В основной массе это сведения по WEB-страницам отдельных авторов и научных организаций. *On-line* рынок широко представлен индивидуальными высокоочищенными экдистероидами (табл. 1), извлеченными из растительных источников (корпорации *Aldrich-Sigma*, *Biochemicals Net*, *Invitrogen*, *Latoxan*, российская компания *Northern Biochemical Company* и т.д.). Особое место занимают коммерческие фирмы, предлагающие ряд экдистероид-содержащих препаратов из натуральных источников (фирмы *Cytodyne Technologies*, *Gero Vita*, *LifeScience Technologies*, *Natural Elixir*; российская *Mirra* и т.д.).

Существует более десятка компаний, предлагающих биодобавки из порошкообразного (таблетированного) *ecdysterone* для снятия стресса и психологической усталости, повышения физической выносливости, наращивания мышц и усовершенствования тела (бодибилдинг, фитнес). Интересная закономерность: в основе большинства клонов биопрепаратов, различающихся лишь небольшими изменениями в формуле, до недавнего времени лежал *20-hydroxyecdysone*, извлеченный из корней *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin. Поставлялся он еще с конца 80-х годов из России, вначале под названием экдистен (*ecdysten*, *ecdystenium*) [83, 106, 107], а в последнее время высокоочищенные формы предлагаются под названиями *ecdypure* и *ecdylol*.

В конце 90-х годов на пике рекламной компании на Западе было выпущено множество разновидностей пищевых добавок на основе *ecdysterone* (*Russ Olympic*, *Triboxin*, *Cytodyn ZM*, *FirmEase* и т.д.). Когда возник дефицит растительного сырья *Rhaponticum carthamoides*, взамен стал использоваться *20-hydroxyecdysone*, извлеченный из других экдистероид-содержащих растений (*Achyranthes bidentata*, *Cyanotis arachnoidea*, *Pfaffia paniculata*, *Polypodium vulgare*, *Polypodium decumanum* и т.д.). С этого же момента произошел спад массового спроса на препараты на основе химически чистых

Таблица. Экдистероиды в каталоге компании "biochemicals.net"

20-Hydroxyecdysone	Prod.# H-1094
b-Ecdysone, C ₂₇ H ₄₄ O ₇ , CAS [5289-74-7], M.W. 480.6; Purity: >95%, White to Off-White Powder, Soluble in Water 10 mg \$80.00 50 mg \$320.00 Bulk Inquire <i>Most widely occurring ecdysteroid in both plant and animal species.</i>	
Muristerone A	Prod.# M-1060
C ₂₇ H ₄₄ O ₈ , CAS [38778-30-2], M.W. 496.6; Purity: >95%, White Solid 0.5 mg \$70.00 1 mg \$120.00 Bulk Inquire <i>Muristerone A regulates the metamorphosis of Drosophila melanogaster and is used to induce expression of the gene of interest from any of the ecdysone-inducible system expression vectors.</i>	
Ponasterone A	Prod.# P-1083
25-Deoxyecdysterone, 25-Deoxy-20-hydroxyecdysone, 2b,3b,14a,20R,22R-Pentahydroxy-5b-cholest-7-en-6-one, C ₂₇ H ₄₄ O ₆ , CAS [13408-56-5], M.W. 464.6; Purity: >99%, White Solid, Soluble in Methanol, Ethanol, Acetic Acid, DMSO 1 mg \$35.00 5 mg \$140.00 100 mg Inquire <i>Insect steroid hormone involved in regulating metamorphosis. Suitable as an inducer of ecdysone-inducible mammalian expression system.</i>	
STORAGE & HANDLING: -20°C. Store in Tightly Sealed Vial.	

экидистероидов. Потребители стали жаловаться на непостоянство их биологической активности. Появились ряд критических статей, например "The Truth about Ecdysteroids" ("Правда об экидистероидах"), где утверждается, что синтетические экидистероиды никакого физиологического эффекта не оказывают, активность во многих случаях кажущаяся и обусловлена психологическим воздействием рекламы.

Справочно. Сегодня на мировом рынке присутствуют около 200 коммерческих продуктов на основе экидистероидов, 149 из которых описаны в работе Lafont и Dinan [39].

4. ИСТОЧНИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ЭКИДИСТЕРОИДОВ

4.1. *Растительные объекты.* В целом присутствие экидистероидов обнаружено не только в высших цветковых растениях, но и голосеменных, папоротниках, грибах, водорослях и мхах, а также насекомых, ракообразных и нематодах. Последними исследованиями установлено, что практически все наземные и водные высшие растения имеют гены синтеза экидистероидов [12, 66, 82].

Сегодня известно строение более 310 молекул экидистероидов. Наибольшее разнообразие по составу наблюдается среди покрытосеменных. У насекомых обнаружено около 50 структурных аналогов [61]. Из всего многообразия экидистероидных молекул в организмах млекопитающих наиболее активны три - *ponasterone A*, *muristerone A* и *ecdyssterone*. Структурные формулы их различаются только количеством и расположением гидроксильных ОН-групп. Первые два экидистероида не характерны для высших цветковых растений. *Ponasterone* встречается у отдельных представителей папоротникообразных (в т.ч. папоротник-орляк), грибов семейства *Paxillaceae* (свинушка толстая), а также выделен из реликтовых растений семейства подокарповых - *Podocarpaceae* и тисовых - *Taxaceae*. *Muristerone A* характерен для р. *Ipomoea* (вьюнок пурпурный) сем. *Convolvulaceae*. *Ecdyssterone*, хотя и несколько менее активен, но распространен массово среди цветковых растений.

Пути биосинтеза у растений и насекомых, возможно и у грибов, различны. Предшественниками экидистероидов выступают - ацетат, мевалонат, холестерин, кетол, кетодиол, *ecdysone*, *ponasterone*, *2,22-deoxyecdysone*, *22,25-deoxyecdysone* [49, 82]. Биосинтез может быть рассмотрен как образование на первичных стадиях α -*ecdysone* и *ponasterone A*. *Ecdyssterone* (β -*ecdysone*) - как результат окисления этих молекул, который далее может трансформироваться до других структур [70]. В результате ферментативных преобразований получают цис- и транс-изомеры сочленений колец А и В, эпимеры (соединения с α , β конфигурацией ОН групп). В растениях экидистероиды присутствуют в виде хорошо растворимых в воде конъюгатов: с неорганическими кислотами - сульфаты, фосфаты; органическими (карбоновыми, жирными и фенольными) кислотами - ацетаты, бензоаты, кумараты; сахарами - глюкозиды, галактозиды, ксилозиды; с ацетоном и т.д.

C_{27} экидистероиды свойственны для высших представителей растительного мира, для грибов и голосеменных характерны C_{28} аналоги, а для папоротников - соединения со структурой C_{29} . Очень редко, но встречаются C_{30} экидистероиды. В качестве продуктов распада основных экидистероидов ($C_{27}...C_{29}$) могут быть вторичные $C_{19}...C_{24}$ структурные аналоги. Наиболее распространенным экидистероидом является *ecdyssterone*, в качестве дополнительного мажорного компонента в цветковых растениях находят *polypodine B* (полиподин В), *inokosterone* и *ecdysone*; у членистоногих - *ecdysone*, *makisterone* и *ecdyssterone*; в папоротниках и голосеменных - *ponasterone A*, *pterosterone* (*нтеростерон*) и *taxissterone* (*таксистерон*).

Кроме основных, все исследуемые объекты содержат в следовых количествах другие структурные аналоги и их производные (так называемые минорные экидистероиды), число которых может достигать до 30-40 и более единиц. Некоторые эндемичные и редкие, а также произрастающие в специфических эколого-географических условиях виды содержат экидистероиды необычного или аномального строения, нехарактерные для большинства исследованных объектов. В 90-е годы из китайского гриба-трутовика (*Polyporus umbellatus*, Eichhase) выявлены экидистероиды с новыми структурами (*polyporusterone A...G*), в количестве 0.1-3.0 мг/кг [29, 46]. Из грибов *Tapinella panuoides* и *Paxillus atrotomentosus* (свинушка толстая) в этот же период получен новый тип эргостановых экидистероидов (*paxillosterone*, *atrotosterone*, *malakosterone*) и их производные [64, 65].

Ни в одном из видов млекопитающих экидистероиды не обнаружены. Искусственный химический синтез возможен только в отношении вторичных, биологически неактивных или малоактивных продуктов, путем химической трансформации основных экидистероидов. Чаще всего для этих целей используют *ecdyssterone*. Совсем недавно

открыта возможность искусственной фотохимической трансформации, при этом образуются структуры, нехарактерные для химической трансформации, в частности димеры [23].

Исходя из происхождения, источники получения экидистероидов принято подразделять на фито-, зоо- и микозэкидистероиды (т.е., полученных из растений, насекомых с ракообразными и нематодами, грибов). Зоозэкидистероиды, в виду чрезвычайно низких уровней содержания в членистоногих, не могут выделяться в промышленных масштабах. Ценность того или иного вида растения или гриба в качестве сырьевого источника определяется его уникальностью, складывающейся из таких показателей, как: биологическая активность, целевое предназначение, концентрация в биомассе, доступность, экономическая целесообразность [101].

Важнейшими источниками выделения в промышленных масштабах являются растительные источники, которые по способности к биосинтезу экидистероидов условно можно классифицировать на следующие группы (в расчете на сухую массу):

- I. 1-30 г/кг (0.1-3,0 %) - виды-сверхконцентраты;
- II. 0.1-1 г/кг (0.01-0.1 %) - виды с высоким содержанием;
- III. 10-100 мг/кг (0.001-0.01 %) - растения с умеренным содержанием;
- IV. 0.5-10 мг/кг (0.00005-0.001 %) - растения с низким содержанием;
- V. 0.1-0.5 мг/кг и ниже - виды со следовыми концентрациями.

В целом различия в уровнях концентрации экидистероидов в растениях достигают огромных величин - 8-9 порядков (от 20-300 нг/кг до 20-30 г/кг). Обычное содержание составляет очень малую величину - тысячные и сотые доли процента от сухого веса. Но встречаются растения, у которых отдельные органы в узком возрастном и вегетационном диапазоне могут концентрировать значительные количества экидистероидов. В среднем один вид-сверхконцентратор приходится на несколько тысяч других видов. К числу важнейших экидистероид-содержащих растений, являющихся видами-сверхконцентраторами и служащими промышленными источниками получения экидистероидов, относятся *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin и *Serratula coronata* L. На эти виды возлагаются большие надежды в разработке новых классов фармпрепаратов и биологически активных добавок к пище, а также экологически безопасных средств борьбы с насекомыми-вредителями [99, 104]; <http://www.ib.komisc.ru/t/ru/ir/vt/02-55/03.html>).

Среди покрытосеменных растений имеется незначительное число других видов с повышенным содержанием экидистероидов в отдельных органах, главным образом эсдистероне, представляющие интерес для научных изысканий. Детальные исследования, проведенные во флоре Европейского Северо-Востока [66], показывают, что в целом распределение экидистероид-содержащих растений по таксонам соответствует аналогичному распределению в других регионах. Обнаружено присутствие их в подавляющем числе видов, но лишь 4 % обладали положительным ответом в биотесте на радиоиммунную активность, куда относятся виды с высоким и умеренным содержанием. Эти данные согласуются с работами других исследователей, показывающих, что значимые концентрации экидистероидов характерны для 5-6 % растений [61].

Виды вторичного значения во флоре России: некоторые разновидности *Silene* - смолевки и *Lychnis* - зорьки; *Coronaria flos-cuculi* L. - горицвет кукушкин; *Helleborus purpurascens* - морозник красноватый и *Helleborus caucasicus* - морозник кавказский; *Paris quadrifolia* L. - вороний глаз обыкновенный; *Ajuga reptans* - живучка ползучая; *Sagina procumbens* L. - мшанка лежащая; *Potamogeton natans* - рдест плавающий и *Potamogeton perfoliatus* - рдест пронзеннолистный; *Pulmonaria officinalis* - медуница лекарственная; *Butomus umbellatus* - сусак зонтичный; *Androsace filiformis* - проломник нитевидный и т.д. [66].

К сожалению, все эти растения обладают рядом отрицательных качеств, не позволяющих использовать их в промышленных масштабах. Главный сдерживающий фактор - они труднодоступны, встречаются рассеянно или одиночно, только в дикорастущем виде и не известны в культуре. Довольно часто это мелкорослые, ползучие, розеточные, лесные, луговые или водные растения; ядовитые или слаботоксичные. Места их произрастания приурочены к припойменным зарослям луговых кустарников, лесным опушкам и вырубкам, заболоченным торфяникам, пустырям, обочинам дорог и канавам, берегам озер, рек и речек или же подножиям скал на высокогорных участках. Жизненная стратегия этих растений строится на совместном произрастании с другими видами под пологом лесных насаждений, в составе лугов или качестве сорняков в культурных посевах. Интродукция в абсолютном большинстве случаев не проводилась или представляет серьезные трудности.

4.2. Методы биотехнологии. В виду сложности выделения и очистки экдистероидов из растительной биомассы, высокой себестоимости конечных продуктов, разработаны технологии получения экдистероидов биотехнологическими методами (культуры клеток, тканей, трансформированных корней). Так как гены биосинтеза экдистероидов присутствуют во всех органах растений, каллусные культуры, размножающиеся на искусственной питательной среде, могут быть получены из любой быстрорастущей ткани - семядолей, гипокотыля, листьев, побега, почек, корней. В культуре клеток могут синтезироваться *ecdysterone* и некоторые другие компоненты вторичного значения у родов *Ajuga*, *Serratula*, *Rhaponticum*, *Pteridium*, *Polypodium*. Однако наиболее активные экдистерониды - *muristerone* и *ponasterone*, в искусственных условиях не синтезируются.

Первые работы с каллусными и суспензионными культурами *Rhaponticum carthamoides* в России были начаты около 10 лет назад [85]. Синтез экдистероидов в каллусных культурах было исчезающе малым. У других видов переход к культивированию растительных клеток также сопровождался резким снижением биосинтетического потенциала. В целом содержание экдистероидов в культуре клеток на порядок ниже, чем в природе. При продолжительном культивировании снижается общее содержание и изменяется долевое соотношение между индивидуальными соединениями. Кроме того, синтезируются неидентифицированные экдистероиды. Содержание *ecdysterone* в культуре клеток по разным видам составляет (в перерасчете на сухое вещество): *Rhaponticum carthamoides* - 0.001-0.01; *Serratula coronata* - 0.02-0.09; *Ajuga reptans* - 0.015-0.1 [71]. Более успешные результаты получены в Японии с культурами клеток из заростков *Polypodium vulgare*, производящими до 0.7 % *ecdysterone* [49].

Технология культуры тканей из проростков *Rhaponticum carthamoides* предусматривает помещение асептически вырезанных эксплантов в питательную среду, где при продолжительном культивировании достигается получение активно размножающихся однородных паренхимных и меристемных тканей, не регенерирующие в органы растений [89]. Структура каллусной ткани, скорость ее роста зависят от комбинирования факторов питания и освещенности. В целом биосинтез экдистероидов в суспензионных культурах несколько выше, чем в культуре клеток, но уровень нестабилен и нарастание концентрации *ecdysterone* происходит очень медленно [82].

Наиболее перспективным методом биотехнологии является культура трансформированных корней (*hairy roots*). При инокулировании стерильных проростков штаммами *Agrobacterium rhizogenes* происходит инфекция и агробактериальная трансформация корневой системы в виде бородачатых корней. У *Rhaponticum carthamoides* через месяц после заражения наблюдается образование корней или опухолей, из которых начинается спонтанная регенерация модифицированных растений. За 4 недели масса бородачатых корней увеличивается в 4-6 раз. Состав экдистероидов, в сумме составляющая 0.02-0.03 %, различен в сравнении с корневищами природных растений [86]. Технология бородачатых корней позволяет достичь биосинтез *ecdysterone* у *Ajuga reptans* до 0.12 %, *Serratula tinctoria* - 0.1-0.2 % [82].

Метод получения экдистероидов через культуру бородачатых корней имеет как преимущества, так и значительные недостатки. Преимущество технологии в сравнении с полевой культурой проявляется в виде непрерывного источника воспроизводства, быстрого роста и частоты регенерации особей; не требуются внешние гормоны роста, как в случае с культурой клеток и тканей. Источником питания является сахароза. Технология осуществима на многих культурах, модифицированные корни характеризуются высокой скоростью роста и генетической стабильностью, высокими уровнями вторичных метаболитов, сопоставимых с концентрацией природных растений. Кроме фитоэкдистероидов, вторичными метаболитами бородачатых корней являются алкалоиды, полиацетиленовые соединения, гликозиды, полифенолы, танины, флавоноиды, сапонины и т.д.

Однако коммерческое применение таких систем ограничено значительными недостатками, которые подробно рассмотрены в обзоре Giri и Narasu [20]. Главные ограничения - необходимость в специально разработанных моделях биореакторов с автоматизированными системами управления, позволяющих свободное вертикальное развитие культур; требуется тщательный подбор оптимальной питательной среды, температуры и освещения. Важнейший параметр - оптимальная морфология корней, от которого зависят плотность и аэрация особей, трудно реализуется, так как существующее большое число разнообразных морфологий связано с различными штаммами плазмид. Возникают трудности с обеспечением равномерной аэрации и перемешивания, последствиями которых является развитие застойных зон и брожение, омертвление тканей

и потеря жизнеспособности особей. Накопление конечного продукта тормозится насыщением его концентрации. Требуется постоянная фильтрация и обновление жидкой среды. Возникают трудности в сборе и обработке урожая, необходимость частичного удаления корней в резервуаре и т.п.

В целом методы биотехнологии не получили широкой реализации при получении экдистероидов. Измененный состав вторичных метаболитов, полученных методами биотехнологии, ведет к потере биологической активности, свойственной природным растениям. Поэтому такие системы используются только для получения химически чистых экдистероидов. Кроме того, как показывает мировой опыт, мало иметь экдистероид, необходимо обеспечить его высокую активность, причем в минимальных концентрациях, как у *muristerone A* и *ponasterone A*. В противном случае химически чистые вещества не находят массового сбыта. Показателем в этом плане пример Китая, буквально за несколько лет сумевший наладить выпуск *ecdysterone* из генетически модифицированных корней *Rhaponticum carthamoides*, тысячекратно превышающим его производство в России (*Canfo Chemicals CO, Ltd*; <http://www.alibaba.com>). В результате возникло перепроизводство вещества, цены на мировом рынке резко упали, технология стала невыгодной.

5. АКТИВНОСТЬ

5.1. Химически изолированные экдистероиды. Активность изолированных экдистероидов определяется путем биотестирования с клетками насекомых, содержащих естественные экдистероидные рецепторы (EcR). Наиболее активны и нашли широкое практическое применение *ponasterone A*, *muristerone A*, *ecdysterone*. В зависимости от специфики объекта, положенного в основу биотестирования, может проявляться преимущественное связывание их с теми или иными рецепторами, но в целом первоначальная активность примерно одинакова и составляет 10^{-9} (10^{-8} – 10^{-10}) М [22]. Имеются и другие экдистероиды с 5, 6, 7 или даже 8 ОН-группами, но все они существенно менее активны в изолированном виде. В работе [67] получен следующий убывающий ряд активности: *muristerone A*, *ponasterone A*, *polypodine B*, *20E*, *22-acetate 20E*, *2-deoxy-20E*. Из минорных компонентов в биотестах значимы некоторые производные *muristerone* (*kaladasterone*) и *ajugasterone* (*dachryhainasterone*) [5].

Активность экдистероидов в реальном организме по сравнению с результатами биотестирования на клеточных культурах значительно различается, дозы являются тканеспецифичными. В экдизон-индуцированных системах эффективные дозы *muristerone A* и *ponasterone A* в качестве отдельных лигандов на трансгенных мышах равны 10^{-5} ... 10^{-7} М (рис. 6). Несмотря на редкость и дороговизну (\$120–135 за 1 мг), предпочтение в научных экспериментах часто отдается *muristerone*. Проблемы при использовании *ponasterone* заключаются в его неустойчивости – через 3 часа рецепторный комплекс с его участием распадается на 50 % в буферном растворе, в то время как с *muristerone* только на 5 % [40].

Что же касается *ecdysterone*, если в биотестах с клетками насекомых биоактивность его довольно высока и составляет около 10^{-8} М [67], то в экдизон-индуцированных системах активность снижена на 2–3 порядка. Активность других экдистероидов – *polypodine B*, *ecdysterone*, *inokosterone*, *makisterone* еще ниже, а у *α -ecdysone*, *2-deoxyecdysone*, *22-acetate-ecdysone* она еще ниже [51].

В клетках млекопитающих ни один из членов суперсемейства стероидных рецепторов, кроме как EcR, не способен к взаимодействию с изолированными экдистероидами в качестве лигандов [15, 41]. Этот факт является весьма положительным, так как позволяет избежать отрицательных побочных и непредвиденных эффектов при использовании экдистероидов в качестве генных переключателей в экдизон-индуцированных системах.

Результаты экспериментов по ингибированию или стимулированию синтеза белка, анаболической активности экдистероидов относятся: а) к веществам недостаточно высокой степени очистки (95 % и ниже); б) изолированных из растения-продуцента *Rhaponticum carthamoides*; в) через невыясненные механизмы активации со вторичными посредниками [54, 92, 93, 102]. В многочисленных экспериментах в области клеточной и молекулярной биологии, при работе с индивидуальными соединениями высокой степени очистки (99 %), а также с другими источниками выделения, например с *Serratula coronata* [76, 88], анаболический эффект *ecdysterone*, *muristerone* и *ponasterone* без участия посредников не зафиксирован.

Для активизации транскрипции генов применяются гибридные экдистероид/ретиноидные рецепторы (EcR/RxR) и их модификации с другими ядерными

рецепторами, где присутствие R α R-партнера необходимо для стабилизации гетеродимерного комплекса и закрепления к элементам ответа, предшествующего активизации механизмов генной экспрессии. В реальном организме могут взаимодействовать не только агонисты эрдистероидов, но и лиганды второго партнера гетеродимерного комплекса (ретиноидного рецептора), что значительно расширяет диапазон их биологической активности (рис. 6В). Кроме того, эффективные дозы снижаются до 10^{-9} - 10^{-10} М, если происходит локальное целевое воздействие на орган-мишень [2].

Вышесказанное справедливо только по отношению к высокоочищенным (свыше 98-99 %), изолированным от первичных источников составам. Искусственно созданные системы на их основе чрезвычайно дороги и используются большей частью в научных исследованиях. При массовом использовании эрдистероидов в фармацевтической промышленности перспективно использование неочищенных или слабоочищенных растительных составов из видов-сверхпродукторов, не обладающих токсичностью и не требующих высокотехнологичных технологий переработки.

Справочно: Способ получения химически чистых эрдистероидов состоит из последовательных операций по измельчению сырья, экстракции и упариванию экстракта, разбавлению водой, фильтрованию, рекстракции гидрофобных сопутствующих веществ углеводородным растворителем, осаждению балластных соединений, экстракции фитостероидов из водного слоя с упариванием, хроматографической очистке на колонке с оксидом алюминия, упариванию элюата, селективного элюирования эрдистероидов с сорбента растворителем и концентрировании полученных фракций, перекристаллизации и вакуумной сушки после растворения продукта в метаноле с последующим упариванием, или же фильтрации с предварительным вымораживанием при температуре от -40 до -70° С [13, 17, 19, 52, 72, 74, 83, 87, 105].

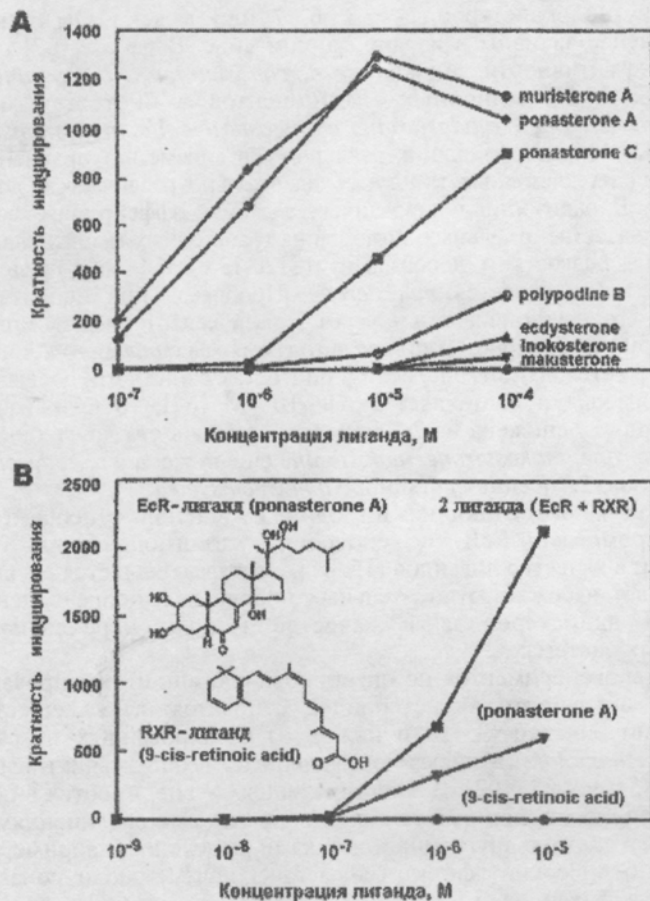


Рисунок 6.

Активность изолированных эрдистероидов (по [51] с изменениями): А - в качестве одиночного лиганда с DmEcR; В - синергический эффект 2-х лигандов с EcR/RXR.

5.2. Неочищенные составы *Rhaponticum carthamoides*. Химически изолированная фракция экистероидов (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 $10^{-4} \dots 10^{-12}$ М [103]. Эффективная иммуномодулирующая активность CD²⁺-розеткообразования с человеческими Т-лимфоцитами достигалась при концентрации 1 μ М (10^{-6} М); с индексом стимуляции, равным 1.132 [58].

Естественные экистероид-содержащие субстанции могут обладать значительно более высокой активностью, чем химически изолированные соединения (рис. 7). Культивирование популяций лимфоцитов *in vitro* в присутствии экстракта *Rhaponticum carthamoides* способно вызвать пролиферацию клеток селезенки в концентрации $10^{-13} \dots 10^{-14}$ М (в расчете на ecdysterone). На фоне неспецифически активизирующих агентов ConA (Т-митоген) и LPS (В-митоген) пролиферация стимулируется вплоть до 10^{-15} М [77].

В настоящее время ведутся разработки нового класса экистероид-содержащих фармпрепаратов, характеризующихся прежде всего сверхнизкими дозами действующих веществ (<http://www.kstu.ru/jchem&cs/russian/n5/1vr29/29.htm>). Новые препараты вырабатывают из надземной части *Rhaponticum carthamoides*, выращиваемого по особой технологии в условиях агропопуляций (<http://homepages.atnet.ru/timfbio/randser.htm>) [96, 97, 100]. Лекарственное сырье, употребляемое при их изготовлении, позволяет многократно снизить используемые в настоящее время дозы - на 3-4 порядка в расчете на 20-hydroxyecdysone [98].

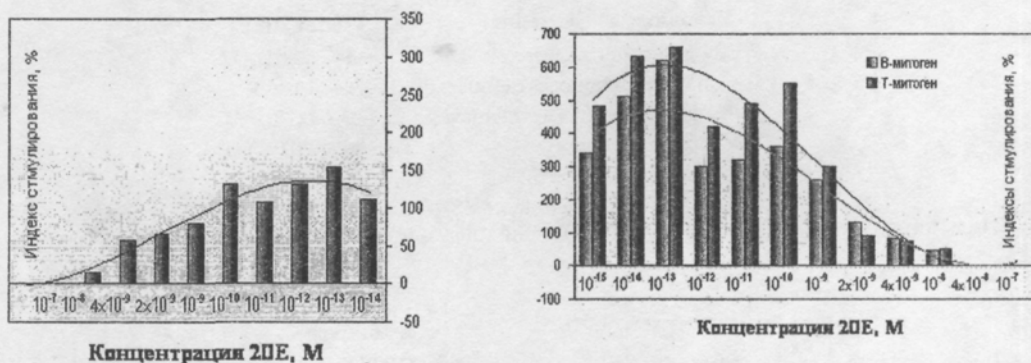


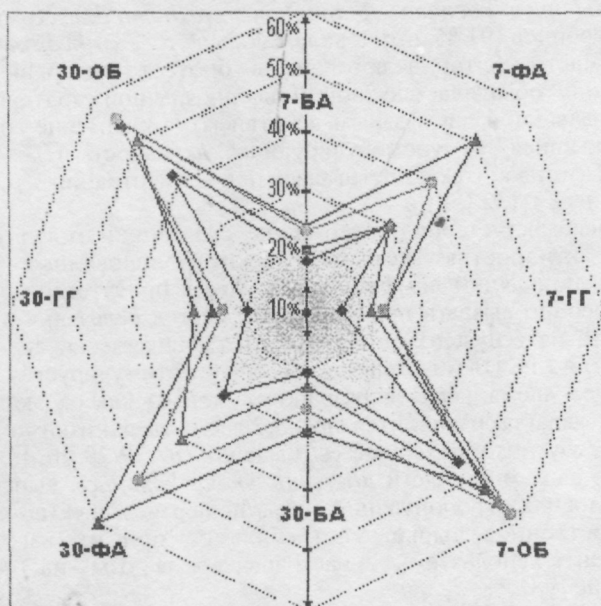
Рисунок. 7.

Стимулирование пролиферации клеток экстрактом *Rhaponticum carthamoides*: слева - спонтанная, справа - индуцированная, по [77] с изменениями

Например, эффективные дозы фармпрепаратов "Биоинфузин" и "БЦЛ-ФИТО" составляют 0.5-10.0 мкг/кг биомассы по ecdysterone, или $10^{-12} \dots 2 \cdot 10^{-13}$ М [78, 99]. Это не ошибка и не опечатка, потому что средняя суточная доза химически чистого 20-hydroxyecdysone и препаратов на его основе равна 5-50 мг/кг массы тела [35, 43, 69, 73, 76, 81, 88, 92, 102].

Особенность механизма действия новых фармпрепаратов - стимулирующая активность малых и ингибирующее действие больших доз на пролиферативные процессы в организме. Даже однократное введение их способно вызвать существенный анаболический и иммуностимулирующий эффект на клеточном и гуморальном уровне [78, 79, 95]. При 7-и дневном курсе применения достигается значительный иммуностимулирующий эффект последствия, который сохраняется на высоком уровне в течение 30 дней (рис. 8). Немаловажен и тот факт, что неочищенные экистероид-содержащие составы показывают выраженный производственный анаболический эффект в условиях массового производственного использования (рис. 9).

Примечания: 1. **Препарат Биоинфузин** предназначен для внутримышечного и внутривенного введения. Применяется для повышения общей резистентности организма при патологических состояниях различной этиологии, усиления половой активности, лечения респираторных заболеваний. Биоинфузин обладает иммуномодулирующим действием, вызывая увеличение в сыворотке крови гамма-глобулинов на 30 % и на 20 %



Условные обозначения:
 7, 30 - дни с начала опыта;
 БА - бактерицидная активность;
 ФА - фагоцитарная активность;
 ОБ - общий белок;
 ГГ - гамма-глобулины.

Дозы 20Е:
 —♦— Контроль
 —▲— 10^{-12} М
 —▲— 4×10^{-13} М
 —●— 2×10^{-13} М

Рисунок 8.

Иммуномодулирующий эффект препарата "Биоинфузин" (курс - 7-кратное введение; по [78])

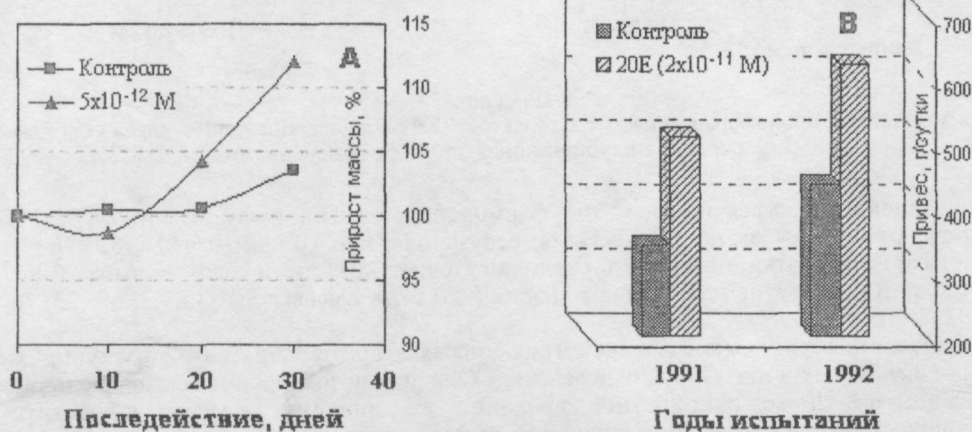


Рисунок 9.

Анаболический эффект малых доз экдистероидов: А - 1-кратное внутримышечное введение, по [95] В - производственные испытания в течение 3-х месяцев, по [94]

повышая фагоцитарную активность лейкоцитов. Суточные дозы *Биоинфузина* по 20-гидроксиэкдизону составляют: 0.1-0.5 мг/кг (10^{-12} ... $2 \cdot 10^{-13}$ М). ЛД₅₀ в опытах на острую токсичность равнялась 9.5 г/кг по препарату, что свидетельствует о высокой безопасности препарата.

2. **Препарат БЦЛ-ФИТО** предназначен для лечебно-профилактического использования в ветеринарной практике, применяется при заболеваниях желудочно-кишечного тракта у различных видов домашних и общественных животных. Обладает

высокой антагонистической активностью к кишечной палочке, стрептококкам, протее, стафилококкам и возбудителям дизентерии. Для него характерна высокая степень целлюлозолитической активности, что делает невозможным развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры. Наряду с антибактериальными свойствами, препарат обладает также анаболическим и иммуностимулирующим эффектом.

БЦЛ-ФИТО не оказывает негативного влияния на качество получаемой продукции, не вызывает у животных осложнений. С успехом заменяет целый комплекс антимикробных лекарственных средств: антибиотиков, сульфаниламидов, нитрофуранов, являясь при этом экологически чистым продуктом. Противопоказаний к применению не установлено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Изучение экдистероидов - направление биологии, открывающее широкий простор фундаментальным и прикладным научным разработкам. Познавание роли и механизмов биологической активности экдистероидов открывает путь к реальному осуществлению самых смелых проектов человечества - научиться управлять жизнедеятельностью различных организмов, целенаправленно манипулируя состоянием активности определенных генов по принципу включено-выключено. В практическом плане это могло бы помочь избавиться от ряда неизлечимых в настоящее время болезней и перейти от химического к экологически чистому, биологическому синтезу многих важных веществ.

Информация по экдистероидам широко представлена в Интернете, включает исследования в области генетики, клеточной и молекулярной биологии, физиологии человека, животных и растений, так и прикладные исследования, направленные на решение практических задач в области химии, биотехнологии, фармакологии, медицины, энтомологии и ряда областей сельского хозяйства. Экдистероидами занимаются крупнейшие лаборатории мира. Различные государства в качестве их источника предлагают местные виды растений из папоротниковых, выюнковых, хвойных, тисовых и амарантовых.

Для России экономически оправдано культивирование растений из родов *Rhaponticum* и *Serratula*, являющихся видами-сверхконцентраторами. Базисная концентрация *ecdysterone* у левзеи или рапонтикума сафлоровидного (*Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin) составляет 0,12-0,57 %, у серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) - 0,31-1,15 % в расчете на сухую массу. Для первого из них разработана промышленная технология возделывания и открыта возможность создания нового класса высокоактивных фармпрепаратов из надземных органов. Вторым видом проходит интродукционное изучение в различных регионах России.

При массовом использовании экдистероидов в фармацевтической промышленности перспективно использование неочищенных или слабоочищенных растительных составов из видов-сверхпродуцентов, не обладающих токсичностью и не требующих высокочрезмерных технологий переработки. Эффективная биологическая активность экстрактов *Rhaponticum carthamoides*, выращиваемого по особой технологии в условиях агропопуляций, составляет $10^{-11} \dots 10^{-13}$ М. Это примерно на 3-4 порядка выше, чем активность высокоочищенных индивидуальных экдистероидов. Устойчивые результаты в сопоставимых дозах получены в экспериментах по биотестам, опытах с лабораторными животными и в условиях широкомасштабных производственных условий. Ключевую роль в необычно высокой активности *Rhaponticum carthamoides* следует искать в сложном химическом составе растения, обуславливающего комплексное взаимодействие экдистероидов с другими метаболитами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Aarnisalo P., Kim C.-H., Lee J. W., Perlmann T.* (2002) *J. Biol. Chem.* **277**(38), 35118-35123.
2. *Albanese C., Reutens A. T., Bouzahzah B., Fu M., D'Amico M., Link T., Nicholson R., Depinho R. A., Pestel R. G.* (2000) *FASEB J.* **14**, 877-884.
3. *Austin D.F., Huaman Z.* (1996) *Taxon.* **45**, 3-38.
4. *Bassett J., Douglas K., Buskirk S., Bondarenko A.* (2002) Method and system for analyzing biological response signal data. US Patent 6,453,241.
5. *Bourne C., Whiting P., Dhadialla T.S., Hormann R.E., Girault J.-P., Harmatha J., Lafont R., Dinan L.* (2002) *Journal of Insect Science*, **2**(11), 11 pp.
6. *Butenandt A., Karlson P.* (1954) *Z. Naturforsch.* **9b**, 389-391.
7. *Canonica L., Danieli B., Weisz-Vincze G., Ferrari G.* (1972) *Chem. Commun.*, 1060-1061.
8. *Canonica L., Danieli B., Ferrari G., Krepinsky J., Weisz-Vincze I.* (1975) *Phytochemistry*, **14**, 525-527.
9. *Canonica L., Danieli B., Ferrari G., Krepinsky J., Haimova M.* (1977) *Gazzetta Chimica Italiana*, **107**, 123-130.
10. *Carlson G. R., Cress D. E., Dhadialla T. S., Hormann R. E., Le D. P.* (2001) Ligands for modulating the expression of exogenous genes via an ecdysone receptor complex. US Patent 6,258,603.
11. *Constantino S., Santos R., Gisselbrecht S., Gouilleux F.* (2001) *European Cytokine Network*, **12**(2), 365-367.
12. *Dinan L., Savchenko T., Whiting P.* (2001) *Cellular and Molecular Life Sciences*, **58**(8), 1121-1132.
13. *Dinan L., Harmatha J., Lafont R.* (2001) *J. Chromatogr. A*. **935**(1-2), 105-123.
14. *Dinan L.* (2001) *Phytochemistry*, **57**, 325-339.
15. *Evans R.M., Saez E.* (2001) Formulations useful for modulating expression of exogenous genes in mammalian systems, and products related thereto. US Patent 6,333,318.
16. *Falkenstein E., Tillmann H.C., Christ M., Feuring M., Wehling M.* (2000). *Pharmacol. Rev.*, **52**(4), 513-56.
17. *Ferrari G.* (1980) Process for the preparation of polyhydroxylated steroids, lysergol and ergolinic alkaloids. US Patent 4,198,344.
18. *Friend S. H., Stoughton R.* (2001) Methods of determining protein activity levels using gene expression profiles. US Patent 6,324,479.
19. *Galjautdinov I.V., Odinkow V.N., Baltaev U.A., Khalilova A.Z., Dzhemilev U.M.* (2000) Method of preparing ecdysteroids and ecdysterone concentrate from plant raw. Patent 2160115, Russia.
20. *Giri A., Narasu L.M.* (2000) *Biotechnology Advances*, **18**, 1-22.
21. *Hampshire F., Horn D.H.S.* (1966) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 37-38.
22. *Harmata J., Dinan L.* (1997) *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **35**, 219-225.
23. *Harmatha J., Dinan L., Lafont R.* (2002) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**(2), 181-185.
24. *Heinrich G., Hoffmeister H.* (1967) *Experientia*, **23**, 995.
25. *Hocks P., Wiechert R.* (1966) *Tetrahedron Lett.* **26**, 2989-2993.
26. *Hoffmeister H., Grutzmacher H.F.* (1966) *Tetrahedron Lett.* **33**, 4017-4023.
27. *Huber R., Hoppe W.* (1965) *Chem. Ber.* **98**, 2403-2424.
28. *Imai S., Fujioka S., Nakanishi K., Koreeda M., Karokawa T.* (1967) *Steroids*, **10**, 557-565.
29. *Ishida H., Inaoka Y., Shibatani J., Fukushima M., Tsuji K.* (1999) *Biol. Pharm. Bull.* **22**(11), 1189-1192.
30. *Jepson I., Martinez A., Greenland A. J.* (2002) Gene switch. US Patent 6, 379,945.
31. *Jessee J., Ciccarone V.C.* (2002). Regulated expression of recombinant proteins using RNA viruses. US Patent 6,451,579.
32. *Juliano R.L., Astriab-Fisher A., Falke D.* (2001) *Molecular Interventions*, **1**, 40-53.
33. *Karlson P., Hoffmeister H., Hummel H., Hocks P., Spiteller G.* (1965) *Chem. Ber.* **98**, 2394-2402.
34. *Kibrik N.D., Reshetnyak J.A.* (1996) *European Neuropsychopharmacology*, **6**(S.4), 167.
35. *Koudela K., Tenora J., Bajer J., Mathova A., Slama K.* (1995) *Eur. J. Entomol.* **92**, 349-354.

36. Kozlova T., Thummel C.S. (2000) Trends in Endocrinology and Metabolism, **11**(7), 276-280.
37. Kucharova S., Farkas R. (2002) Endocr. Regul. **36**(1), 37-60.
38. Lachaise F., Goudeau M., Hetru C., Kappler C., Hoffman J.A. (1981) Z. Physiol. Chem. **362**, 521-529.
39. Lafont R., Dinan L. (2003) Journal of Insect Science, **3**(7), 30 pp.
40. Landon T.M., Sage B.A., Seeler B.J., O'Connor J.D. (1988) J. Biol. Chem. **263**(10), 4693-4697.
41. Mak P., Karathanasis S.K. (1997) Mechanism based screen for retinoid X receptor agonists and antagonists. US Patent **5**, 700,682.
42. McCartney J.F. (1979) Steroids, **34**, 799-806.
43. Meybeck A., Bonte F., Redziniak, G. (1997) 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.
44. Nakanishi K., Koreeda M., Sasaki S., Chang M.L., Hsu H.Y. (1966) Chem. Soc. Chem. Commun. **24**, 915-917.
45. Natesan S., Gilman M.Z. (2000) Compositions and methods for regulation of transcription. US Patent **6**,117,680.
46. Ohsawa T., Yukawa M., Takao C., Muruyama M., Bando H. (1992) Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **40**(1), 143-147.
47. Pai J-T., Guryev O., Brown M.S., Goldstein J.L. (1998) Biol. Chem. **273**(40), 26138-26148.
48. Patrick C.W., Zheng B., Wu X., Gurtner G., Barlow M., Koutz C., Chang D., Schmidt M., Evans G.R. (2001) J. Tissue Eng., B. **7**(3), 303-311.
49. Reixach N., Lafont R., Camps F., Casas J. (1999) Eur. J. Biochem. **266**, 608-615.
50. Rossant J., McMahon A. (1999) Genes & development, **13**(2), 142-145.
51. Saez E., Nelson M. C., Eshelman B., Banayo E., Koder A., Cho G. J., Evans R. M. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 14512-14517.
52. Shibuya T., Ario T., Fukuda S. (2001) Composition. US Patent **6**,224,872.
53. Slama K., Lafont R. (1995) Eur. J. Entomol. **92**, 355-377.
54. Slama K., Koudela K., Tenora J., Mathova A. (1996) Experientia, **52**(7), 702-706.
55. Smith L.S. (1998) Trends in Endocrinology and Metabolism, **9**(7), 301-302.
56. Suhr S.T., Gil E.B., Senut M-C., Gage F.H. (1998) PNAS, **95**, 7999-8004.
57. Takemoto T., Hikino Y., Yin H., Hikino H. (1968) Yakugaku Zasshi, **88**, 359.
58. Trenin S., Volodin V.V. (1999) Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **41**, 156-161.
59. Tsuji K., Shibata J., Okada M., Inaoka Y. (1999) Blood flow amount-improving agent comprising steroid derivative and cosmetic using same. US Patent **5**,976,515.
60. Vegeto E., McDonnell D. P., O'Malley B. W., Schrader W. T., Tsai M.J. (1999) Mutated steroid hormone receptors, methods for their use and molecular switch for gene therapy. US Patent **5**,935,934.
61. Voigt B., Whiting P., Dinan L. (2001) Cellular and Molecular Life Sciences, **58**(8), 1133-1140.
62. Vogtli M., Elke C., Imhof M.O. Lezzi M. (1998) Nucleic Acids Research, **26**(10), 2407-2414.
63. Vokac K., Budesinsky M., Harmata J. (1995) in: Communication presented at the 16th Conference on isoprenoids (Sept 17-23), Prague, pp. 77-78.
64. Vokac K., Budesinsky M., Harmatha J., Pis J. (1998a) Tetrahedron, **54**(8), 1657-1666.
65. Vokac K., Budesinsky M., Harmatha J., Kohoutova J. (1998b) Phytochemistry, **49**(7), 2109-2114.
66. Volodin V., Chadin I., Whiting P., Dinan L. (2002) Biochemical Systematics and Ecology, **30**(6), 525-578.
67. Wang S.F., Ayer S., Segraves W.A., Williams D.R., Raikhel A.S. (2000) Mol. Cell. Biol. **20**, 3870-3879.
68. Wolter S., Mushinski J.F., Saboori A.M., Resch K., Kracht M. (2002) J. Biol. Chem. **277**(5), 3576-3584.
69. Ахрем А.А., Ковганко В.В. (1989) Экдистероиды: химия и биологическая активность, Наука и техника, Минск.
70. Балтаев У.А. (2000) Биоорганическая химия, **26**(12), 892-925.

71. Володин В.В. (1999) Экдистероиды в интактных растениях и клеточных культурах. Автореф. дис. канд....биол. наук, Москва.
72. Володин В.В., Володина С.О. (2000) Способ получения экдистероидов. Патент 2153346, Россия.
73. Гаджиева Р.М., Португалов С.Н., Панюшкин В.В., Кондратьева И.И. (1995) Экспериментальная и клиническая фармакология, **5**, С. 46-48.
74. Гродзинский А.М., Холодова Ю.Д., Мишунин И.Ф., Богу-славский В.А., Зильберс Ю.А., Кляшторная Г.В. (1985) Способ получения б-экдизона из растения рода *Serratula*. Патент 1146050, СССР. *
75. Дайнен Л. (1998) Физиология растений, **3**, 347-359.
76. Зайнуллин В.Г., Мишуров В.П., Пунегов В.В., Старобор Н.А., Башилькова Л.А., Бабкина Н.Ю. (2003) Растительные ресурсы, **2**, 95-103.
77. Зеленков В.Н., Тимофеев Н.П., Колесникова О.П., Кудяева О.Т. (2001) в: Мат-лы I Рос. науч.-практич. конф. "Актуальные проблемы инноваций в создании фитопродуктов на основе нетрадиционных растительных ресурсов и их использование в фитотерапии, РАЕН, Москва, с. 59-62.
78. Ивановский А.А. (2000) Ветеринария, **9**, 43-46.
79. Ивановский А.А., Лагунова О.Н. (2002) БИО, **8**.
80. Ковлер Л.А., Володин В.В., Пиунетлева Е.А. (1998) Экдистероидсодержащие липосомы и их характеристика. Научные доклады Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, **407**, 18 с.
81. Куракина И.О., Булаев В.М. (1990) Новые лекарственные препараты, **6**, 16-18.
82. Лафон Р. (1998) Физиология растений, **3**, 326-346.
83. Маматханов А.У., Шамсутдинов М.Р.И., Шакиров Т.Т. (1980) Химия природных соединений, **5**, 528-530.
84. Новиков В.С., Шамарин И.А., Бортиновский В.Н. (1992) Военно-медицинский журнал, **8**, С. 47-49.
85. Орлова И.В.; Носов А.М.; Лукиа В.Г.; Володин В.В. (1994) Физиология растений, **41(6)**, 907-912.
86. Орлова И.В., Захарченко Н.С., Семенюк Е.Г., Носов А.М., Володин В.В., Бурьянов Я.И. (1998) Физиология растений, **45(3)**, 397-400.
87. Пунегов В.В., Мишуров В.П., Никитина Е.Н. (1999) Способ получения экдистероидов растения рода *Serratula* α -экдизона, β -экдизона и инокостерона. Патент 2138509, Россия.
88. Пчеленко Л.Д., Метелкина Л.Г., Володина С.О. (2002) Химия растительного сырья, **1**, 69-80.
89. Репях С.М., Юшкова Е.В., Величко Н.А. (1996) Биотехнология, **8**, 45-49.
90. Сейфулла Р.Д. (1994) Экспериментальная и клиническая фармакология, **4**, 3-6.
91. Сейфулла Р.Д. (1999) Спортивная фармакология. Спорт-Фарма Пресс, Москва.
92. Сыров В.Н., Айзиков М.И., Курмуков А.Г. (1975) Доклады Академии наук УзССР, **8**, 37-38.
93. Сыров В.Н., Курмуков А.Г. (1976) Фармакология и токсикология, **6**, 690-693.
94. Тимофеев Н.П. (1994) в: Мат-лы III Междунар. конф. по селекции, технологии возделывания и переработки нетрадиционных растений, Симферополь, с. 166-167.
95. Тимофеев Н.П., Ивановский А.А. (1996а) в: Тез. докл. междунар. совещания по фитоэкди-стероидам, Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, с. 133.
96. Тимофеев Н.П., Володин В.В., Фролов Ю.М. (1996b) в: Тез. докл. междунар. совещания по фитоэкди-стероидам, Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, с. 90.
97. Тимофеев Н.П., Володин В.В., Фролов Ю.М. (1998) Растительные ресурсы, **38(3)**, 63-69.
98. Тимофеев Н.П. (2000) Инновационные технологии и продукты. Сб. трудов, **4**, НТФ "АРИС", Новосибирск, с. 26-36.
99. Тимофеев Н.П. (2001) Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. Сб. трудов, **5**, РАЕН, Москва, с. 108-134.
100. Тимофеев Н.П. (2002) Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. Сб. науч. трудов, **6**, РАЕН, Москва, с. 94-107.
101. Тимофеев Н.П. (2003) Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты. Сб. науч. трудов, **9**, РАЕН, Москва, с. 64-86.

102. Тодоров И.Н., Митрохин Ю.И., Ефремова О.И., Сидоренко Л.И. (2000). Химико-фармацевтический журнал, **34(9)**, 3-5.
103. Тренин Д.С., Володин В.В., Бейкин Я.Б., Шлыкова А.Б. (1996) Экспериментальная и клиническая фармакология, **1**, 55-57.
104. Уфимцев К. (2002) Вестник Института биологии, **55**, Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар, с. 8-11
105. Шаталова Т.А., Оганесян Э.Т., Пищуков Ю.Г. (1998) Способ получения фитоэкдизонов. Патент 2112540, Россия.
106. Экдистен (1987). Фармакологическая статья ВФС 42-1722-87.
107. Экдистерон (1987). Фармакологическая статья ВФС 42-1714-87.

STUDIES ON ECDYSTEROIDS: USING IN MEDICINE, INTERNET-RESOURCES, SOURCES, AND BIOLOGICAL ACTIVITY

N.P. Timofeev

"БИО", Koryazhma, Russia
 Lenin str., 47a-55, Koryazhma, Arkhangel'skaya oblast, 165650; tel.: (818-50) 3-79-33;
 e-mail: timfbio@atnet.ru

Modern studies on ecdysteroids is reviewed representing a promising and rapidly developing area of biomedical chemistry. This paper deals with fields of application, medical importance, major representatives, sources, and biological activity. Historical retrospective views and the achieved research levels are shown while the world flora screening, identification of most active formulas, and study of practical application possibilities. The Internet-resources (databases, volume, availability) at electronic libraries, search servers are analyzed for fundamental investigations and applied now-how, commercial offers.

Basic sources and biotechnological methods of production of the major representatives of ecdysteroids - *ponasterone*, *muristerone*, and *ecdysterone* are considered. It is emphasized that chemically isolated ecdysteroids are extremely expensive and asked for mainly in science intensive investigations. To satisfy the mass demand for ecdysteroids in the pharmaceutical industry, non-purified or weakly purified plant formulations from super producer species with null toxicity rate that do not require high-expensive processing technologies have good prospects.

In the case of Russia, cultivating *Rhaponticum* and *Serratula* plants representing super concentrator plant species is economically sound. The basic *ecdysterone* concentrations in plants of *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin and *Serratula coronata* L. comprise 0.12-0.57 % and 0.31-1.15 % dry weight, respectively. Regarding the former species, there has appeared an industrial growing technology and a new class of pharmaceutical preparations from its aboveground shoots is being developed. The effective biological activity rate of extracts from *Rhaponticum carthamoides* grown with a special technology in agropopulations accounts for $10^{-11} \dots 10^{-13}$ M, that is 3-4 orders of magnitude higher than the activity rate of highly purified individual ecdysteroids (0,5-10 µg/kg against 5-50 mg/kg).

Key words: ecdysteroids, 20-hydroxyecdysone, ponasterone, muristerone, *Rhaponticum*, Bioinfusin