

ЭКДИСТЕРОИДЫ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ: ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ДЕЙСТВИЯ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, КОМПЬЮТЕРНЫЕ МОДЕЛИ И КОФАКТОРЫ (ОБЗОР)

Тимофеев Н.П.

КХ БИО, г. Коряжма

Экдистероиды . самый распространенное и многочисленное семейство стероидных веществ в биосфере, механизмы проявления активности которых остаются неясными. Компьютерные модели, позволяя делать доступные для проверки опытом предсказания, имеют значительный потенциал для виртуального просеивания продуктов нового химического синтеза . с целью предварительной идентификации соединений с фармакологической, инсектицидной или противопаразитарной активностью

Физиологические действия. Экдистероиды представляют самый распространенный и самый многочисленный класс стероидных соединений в биосфере; они участвуют в жизнедеятельности практически всех классов организмов, выполняя множественные функции. Присутствие экдистероидов не ограничено членистоногими (насекомыми и ракообразными), имеется отчетная документация об их обнаружении в одноклеточных простейших, древних группах кишечнорастных (медузы, полипы, кораллы), а также в моллюсках, кольчатых и плоских червях (цестодах и трематодах), нематодах (рис. 1).

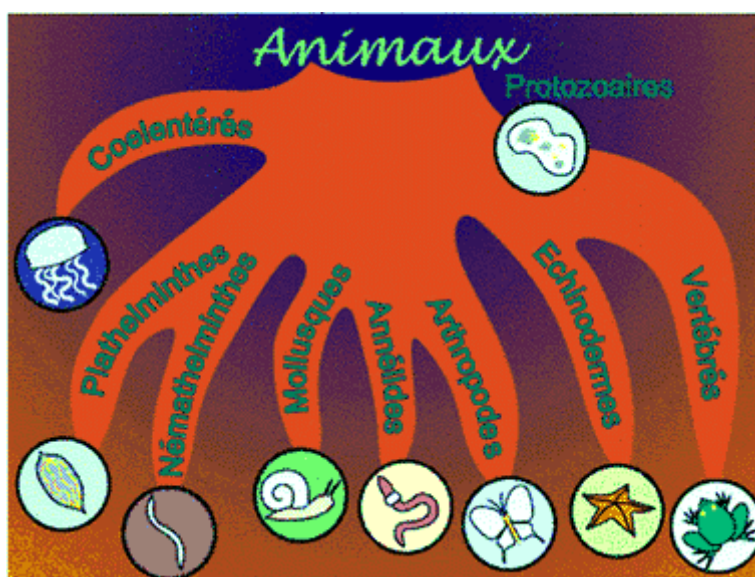


Рис. 1. Присутствие экдистероидов в царстве животных (по www.quasimodo.versailles.inra.fr/ecdyzone)

Кроме гормональных функций, осуществляемых у насекомых, физиологическая их роль в других классах беспозвоночных, растениях и млекопитающих остается неясным. Предполагается, что у человека она могла бы заключаться в общерегулирующих воздействиях на организм. Широкое распространение экдистероидов в биосфере закономерно приводит к вопросу относительно механизмов проявления ими биологической активности: как у членистоногих при эндогенном синтезе, так и у человека и млекопитающих при поступлении извне с пищей.

Не являясь истинными эндогенными гормональными сущностями, при сочетании определенных условий экдистероиды могут обладать гормоно- или витаминopodobными действиями. Фармацевтическое использование экдистероидов содержащих растений уходит корнями в глубины племенных культовых обрядов аборигенов, населяющих древнюю Русь,

Сибирь, Китай и Монголию, Северную Америку, Южную Америку, Индию. В представлении многих народов они были связаны с суевериями и легендами

В официальной научной медицине экистероид 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 разных органов, для заживления ран и язв, лечения ожогов. В спортивной и военной медицине препараты на их основе служат для адаптации и повышения работоспособности здорового человека в условиях лимитирующих факторов, в т.ч. преодоления чрезвычайных физических и психических нагрузок. Вне официальной медицины в наибольшей степени распространено профилактическое использование в качестве адаптогенных, анаболических, антидепрессивных, гемореологических, ноотропных и противоопухолевых средств.

Многие из экистероид 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, производимого из экистероид содержащего растения *Taxus baccata*, оценивается в 2.3 миллиардов долларов. Другими важными источниками для производства новых противораковых средств являются тисс коротколистный – *Taxus brevifolia*; китайский гриб-трутовик – *Polyporus umbellatus*; рапонтikum или левзея сафлоровидная – *Rhaponticum carthamoides*.

Историческая длительность научно-исследовательских работ в области экистероидов насчитывает около 50 лет. Несмотря на столь значительный промежуток времени и огромное число публикаций – более 3 тысяч статей по ключевому слову *ecdysteroids* в научных журналах; около 4.5 тысяч статей в Интернете (www.scirus.com), эти вещества во многих отношениях еще остаются до конца непознанными и окутанными множеством легенд. Несмотря на значительные усилия по исследованию, множество открытых вопросов по экистероидам остаются, особенно относительно механизмов проявления биологической активности и их роли в природных взаимоотношениях между растениями и фитофагами, млекопитающими и паразитическими организмами.

Исследования по компьютерному моделированию активности. Познание механизмов активности экистероидов – одно из главных направлений биомедицинской науки, которое в сочетании с современными методами биотестирования и компьютерного объемного моделирования пытается объяснить ключевые взаимодействия лиганда и рецептора в связке “структура-активность”, предсказать оптимальную конфигурацию и конформационное состояние идеального соединения – с целью осуществить искусственный синтез первых высокоактивных соединений.

Множество исследований ведется по молекулярному конструированию отдельных элементов экистероидного гетерокомплекса, обеспечивающих надежную, безотказную и безопасную их работу в реальном организме. Это поиск оптимальной пространственной ориентации (путем перебора аминокислотных остатков в активных центрах белковых молекул), обеспечение органо- и тканеспецифичности, перестройка боковых радикалов лигандов, искусственный синтез агонистов и антагонистов.

Необходимость построения компьютерных моделей, описывающих взаимосвязь биологической активности со структурными особенностями строения их лигандов, вызвана прежде всего практической потребностью. Цель – предсказать искусственные лиганды, которые, обладая высокой активностью, были бы доступны методом химического синтеза. Несмотря на 40 лет интенсивных исследований, до настоящего времени не было синтезировано ни одного соединения лиганда, способного в полной мере заменить естественные экистероиды. Методом химической трансформации могут быть получены

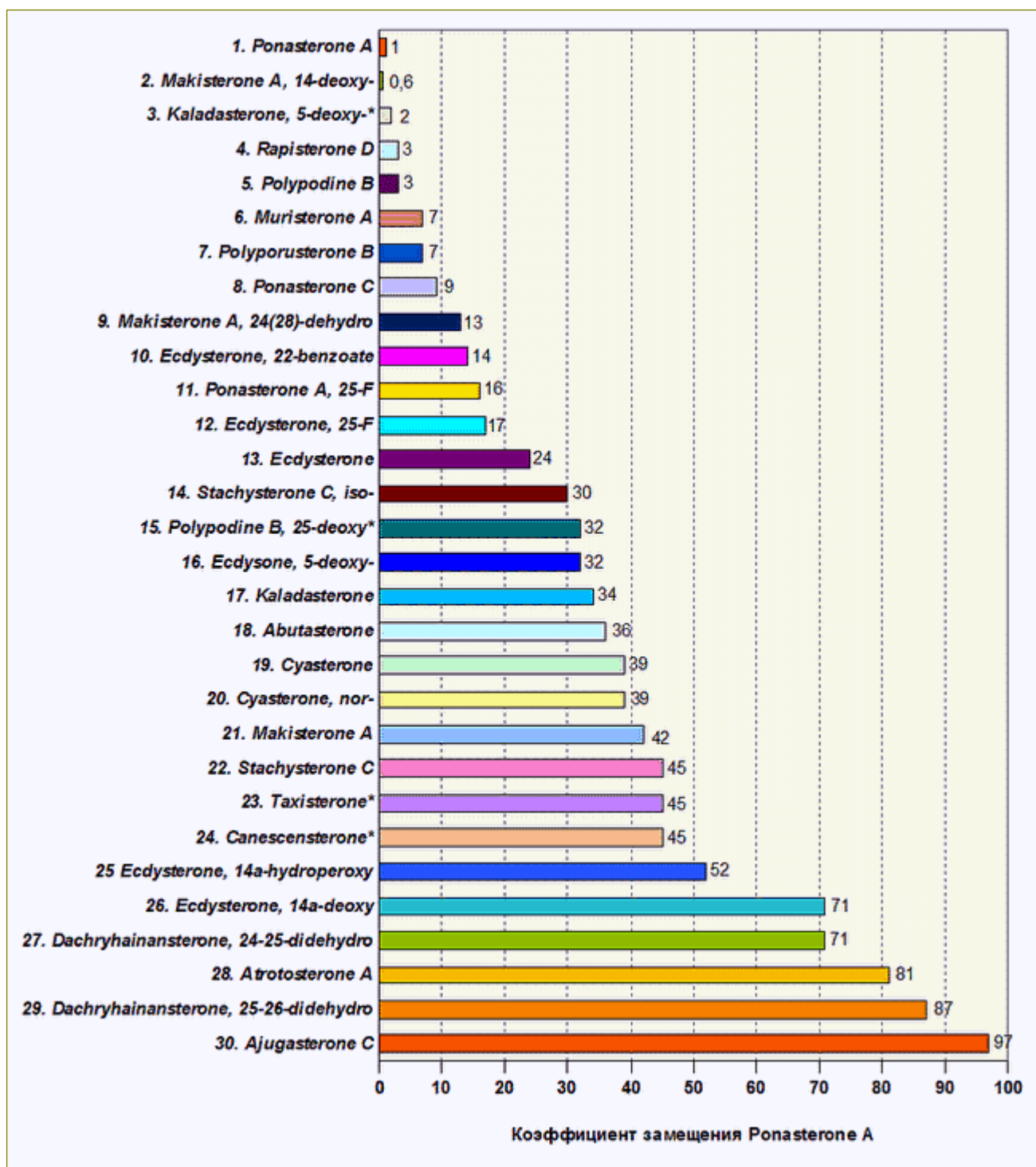


Рис. 3. База данных по биологической активности изолированных экдистероидов: Соединения с убывающей активностью от 1 (контроль) до 100-кратной

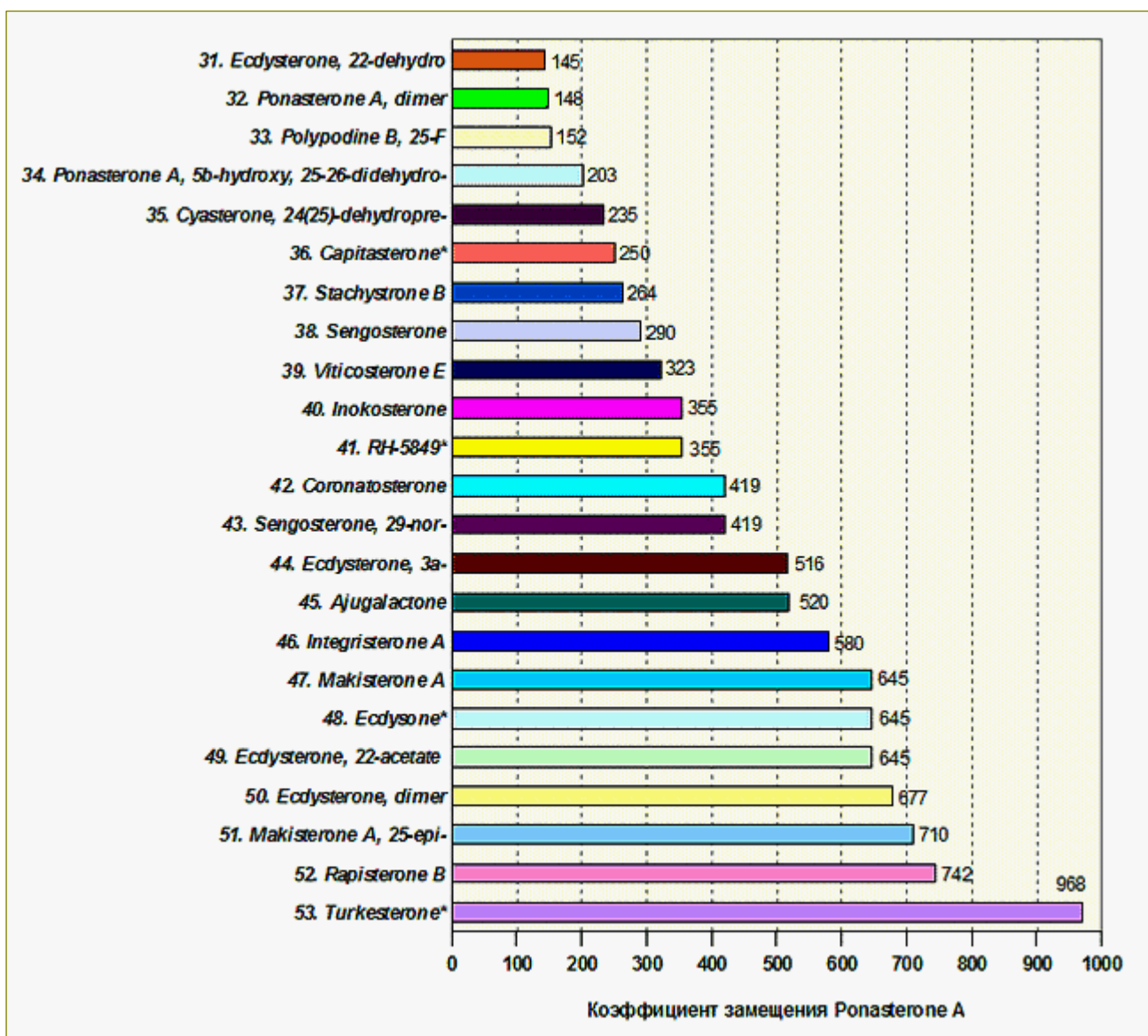


Рис. 4. База данных по биологической активности изолированных экдистероидов (продолжение): Соединения с убывающей активностью от 100 до 1000-кратной к контролю

Разработка алгоритмов мощного машинного программного обеспечения (CoMFA – comparative molecular field analysis; 4D-QSAR – 4-dimensional quantitative structure-activity relationship) позволили провести комплексный молекулярный анализ параметров фармакофорных элементов лигандов, характеристик взаимодействия их с модельным рецептором и делать выводы относительно проявления активности (Ravi и др., 2001). Первые компьютерные модели CoMFA, базирующиеся на сведениях о кристаллическом строении лиганда, были довольно несовершенными, предсказывая сверхвысокую активность слабоактивным или инертным соединениям (табл. 1).

4D-QSAR-модели имеют преимущество перед CoMFA в том, что могут принять во внимание многократные конформационные изменения во время взаимодействия с рецептором. Последние усовершенствованные варианты 4D-QSAR-анализа учитывают до 10 000 конформаций для каждой молекулы с периодом времени от 10 ps до 300 K (Dinan, 2003). Сравнение лучших 4D-QSAR моделей с поздними моделями CoMFA показывает, что оба алгоритма имеют более высокие величины оправдываемости предсказаний (Norman и др.,

2003; табл. 2). Но они все еще несовершенные, чтобы предсказать молекулярное строение и соответствовать ожидаемой активности соединений с отличающейся структурой с наблюдаемой.

Табл. 1. Результаты предсказания активности экдистероидов методами CoMFA
(по Dinan и др., 1999; Bourne и др., 2002; с изменениями)

Экдистероид	Активность в биотесте		Модель А		Модель В	
	М	-log (EC50)	М	-log (EC50)	М	-log
Ponasterone A	3.1x10 ⁻¹⁰	9.51	8.63	2.3x10 ⁻⁹	8.92	1.2x10 ⁻⁹
5-deoxy-kaladasterone	5.2x10 ⁻¹⁰	9.28	9.52	3.0x10 ⁻¹⁰	8.84	1.4x10 ⁻⁹
Dachryhainansterone	5.2x10 ⁻⁹	8.28	8.75	1.8x10 ⁻⁹	10.25	5.6x10 ⁻¹¹
20-hydroxyecdysone	7.5x10 ⁻⁹	8.12	7.46	3.5x10 ⁻⁸	6.96	1.1x10 ⁻⁷
Muristerone A	2.2x10 ⁻⁸	7.66	7.67	2.1x10 ⁻⁸	7.69	2.0x10 ⁻⁸
Kaladasterone	3.4x10 ⁻⁷	6.47	8.92	1.2x10 ⁻⁹	8.59	2.6x10 ⁻⁹
25-hydroxy-dachryhainansterone	2.6x10 ⁻⁷	6.59	8.52	3.0x10 ⁻⁹	10.23	5.9x10 ⁻¹¹
Ecdysone	1.1x10 ⁻⁶	5.96	6.06	8.7x10 ⁻⁷	5.03	9.4x10 ⁻⁶
Podecdysone B	1.2x10 ⁻⁵	4.92	10.34	4.6x10 ⁻¹¹	10.96	1.1x10 ⁻¹¹
Ketodiol	6.3x10 ⁻⁶	≤5.2	5.53	3.0x10 ⁻⁶	6.47	3.4x10 ⁻⁷
Ecdysone-2,3-acetonide	3.2x10 ⁻⁵	≤4.5	7.60	2.5x10 ⁻⁸	6.59	2.6x10 ⁻⁷
20-hydroxyecdysone-2,3,22-	1.6x10 ⁻⁵	<4.8	6.02	9.6x10 ⁻⁷	6.74	1.8x10 ⁻⁷
2β,3β,6α-trihydroxy-5β-	4.0x10 ⁻⁵	≤4.6	4.90	1.3x10 ⁻⁵	7.76	1.7x10 ⁻⁷
2β,3β,6β-trihydroxy-5β-cholestane	4.0x10 ⁻⁵	≤4.6	5.57	2.7x10 ⁻⁶	8.14	7.2x10 ⁻⁹
2,14,22,25-tetradecoxy-5α-edysone	4.0x10 ⁻⁵	≤4.6	5.82	1.5x10 ⁻⁶	6.95	1.1x10 ⁻⁷
5α-ketodiol	4.0x10 ⁻⁵	≤4.6	4.22	6.0x10 ⁻⁵	5.66	5.2x10 ⁻⁶
Castasterone	1.0x10 ⁻³	<3	4.67	2.1x10 ⁻⁵	5.39	4.1x10 ⁻⁶
24-epi-castasterone	1.0x10 ⁻⁴	<4	5.53	3.0x10 ⁻⁶	6.78	1.7x10 ⁻⁷
Bombycosterol	4.0x10 ⁻⁵	≤4.6	4.69	2.0x10 ⁻⁵	6.06	8.7x10 ⁻⁷
Calonysterone	neg	neg	7.37	4.3x10 ⁻⁸	7.77	1.7x10 ⁻⁸
iso-homobrassinolide	1.0x10 ⁻⁵	<5	7.09	8.1x10 ⁻⁸	5.52	3.0x10 ⁻⁶
28-homobrassinolide	1.0x10 ⁻⁴	<4	5.99	1.0x10 ⁻⁶	6.00	1.0x10 ⁻⁶

Табл. 2 Соответствие прогноза активности лучших компьютерных моделей наблюдаемым

Экдистероид	Активность в биотесте		Модель А		Модель В	
	М	-log (EC50)	М	-log (EC50)	М	-log
Ponasterone A	3.1x10 ⁻¹⁰	9.51	8.63	2.3x10 ⁻⁹	8.92	1.2x10 ⁻⁹
5-deoxy-kaladasterone	5.2x10 ⁻¹⁰	9.28	9.52	3.0x10 ⁻¹⁰	8.84	1.4x10 ⁻⁹
Dachryhainansterone	5.2x10 ⁻⁹	8.28	8.75	1.8x10 ⁻⁹	10.25	5.6x10 ⁻¹¹
20-hydroxyecdysone	7.5x10 ⁻⁹	8.12	7.46	3.5x10 ⁻⁸	6.96	1.1x10 ⁻⁷
Muristerone A	2.2x10 ⁻⁸	7.66	7.67	2.1x10 ⁻⁸	7.69	2.0x10 ⁻⁸
Kaladasterone	3.4x10 ⁻⁷	6.47	8.92	1.2x10 ⁻⁹	8.59	2.6x10 ⁻⁹
25-hydroxy-dachryhainansterone	2.6x10 ⁻⁷	6.59	8.52	3.0x10 ⁻⁹	10.23	5.9x10 ⁻¹¹
Ecdysone	1.1x10 ⁻⁶	5.96	6.06	8.7x10 ⁻⁷	5.03	9.4x10 ⁻⁶
Podecdysone B	1.2x10 ⁻⁵	4.92	10.34	4.6x10 ⁻¹¹	10.96	1.1x10 ⁻¹¹
Ketodiol	6.3x10 ⁻⁶	≤5.2	5.53	3.0x10 ⁻⁶	6.47	3.4x10 ⁻⁷
Ecdysone-2,3-acetonide	3.2x10 ⁻⁵	≤4.5	7.60	2.5x10 ⁻⁸	6.59	2.6x10 ⁻⁷
20-hydroxyecdysone-2,3,22-	1.6x10 ⁻⁵	<4.8	6.02	9.6x10 ⁻⁷	6.74	1.8x10 ⁻⁷
2β,3β,6α-trihydroxy-5β-	4.0x10 ⁻⁵	≤4.6	4.90	1.3x10 ⁻⁵	7.76	1.7x10 ⁻⁷
2β,3β,6β-trihydroxy-5β-cholestane	4.0x10 ⁻⁵	≤4.6	5.57	2.7x10 ⁻⁶	8.14	7.2x10 ⁻⁹
2,14,22,25-tetradecoxy-5α-edysone	4.0x10 ⁻⁵	≤4.6	5.82	1.5x10 ⁻⁶	6.95	1.1x10 ⁻⁷
5α-ketodiol	4.0x10 ⁻⁵	≤4.6	4.22	6.0x10 ⁻⁵	5.66	5.2x10 ⁻⁶
Castasterone	1.0x10 ⁻³	<3	4.67	2.1x10 ⁻⁵	5.39	4.1x10 ⁻⁶

24-epi-castasterone	1.0x10 ⁻⁴	<4	5.53	3.0x10 ⁻⁶	6.78	1.7x10 ⁻⁷
Bombysterol	4.0x10 ⁻⁵	≤4.6	4.69	2.0x10 ⁻⁵	6.06	8.7x10 ⁻⁷
Calonysterone	neg	neg	7.37	4.3x10 ⁻⁸	7.77	1.7x10 ⁻⁸
iso-homobrassinolide	1.0x10 ⁻⁵	<5	7.09	8.1x10 ⁻⁸	5.52	3.0x10 ⁻⁶
28-homobrassinolide	1.0x10 ⁻⁴	<4	5.99	1.0x10 ⁻⁶	6.00	1.0x10 ⁻⁶

Особенности проявления активности экистероидов в живых системах. Наряду с большим количеством установленных фактов по проявлению общей физиологической активности, отмечается большое различие в дозах и направленности действий индивидуальных экистероидов, очевидно, происходящих путем невыясненных механизмов активации через кофакторы, вторичные посредники и экзогенные метаболиты. Также имеются результаты экспериментальных исследований, в ряде случаев расходящихся с общеизвестными фактами.

В организме человека сами по себе экистероиды инертны. Необходим ряд условий, чтобы активизировать их функции. Для проявления активности необходимо прохождение ими ряда последовательных стадий в качестве лигандов для внутриклеточных или мембранных рецепторов. 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 совместно друг с другом.

В случае с ядерными рецепторами на начальном этапе важным является взаимодействие с шоковыми белками, образование гетеродимерного комплекса с рецепторами производных витамина А – *9-цис-ретиноевой кислоты* (RXR-retinoids), участие в процессе некоторых ионов металлов-микроэлементов; а на заключительном – наличие мультибелковых комплексов, кофакторов транскрипции. Взаимодействие с мембранными рецепторами – еще менее изученная область, где наиболее интересным является взаимодействие с группой трансмембранных 7ТМ-рецепторов, насчитывающей до 2000 участников в организме человека.

Целый ряд экспериментально полученных в последнее время данных позволяет предполагать, что ключевую роль в способности стимулировать закрепление лиганда и транскрипцию играют дополнительные факторы – кофакторы. Главную роль в проявлении биологической активности играют белковые вещества, коактиваторы и корепрессоры транскрипции, или же стрессовые факторы транскрипции, вступающие в прямые белок-белковые взаимодействия с различными рецепторами.

Важную роль в активации экистероидов играют эфиры с жирными кислотами (аккумуляция, хранение и пролонгированная деятельность), гликозиды с сахарами (транспортная функция), вещества белковой структуры (шапероны, коактиваторы и корепрессоры), ионы металлов (стабилизаторы пространственной структуры полипептидной цепи). 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, как например в растениях и доставлены к месту действия с участием приемлемых носителей.

Во взаимодействиях с трансмембранными рецепторами (трансдукция сигнала внутриклеточным мишеням) важная роль принадлежит вторичным посредникам – это пептиды, липиды, аминокислоты, соединения фосфора, кальция и других макро- и микроэлементов. Кроме того, виды-сверпродуценты могут содержать растительные рецепторы экистероидов, а также являться источником множества других нестероидных составов, в частности трансактивационных стрессовых элементов для промоторных участков генов и лигандов для ретиноидных и трансмембранных рецепторов

Фармакологически активная доза экдистероида, достаточная для проявления физиологического эффекта, будет зависеть, кроме как от индивидуальных его характеристик, также и от синергического действия с минорными компонентами, набор которых индивидуален для конкретного вида-носителя. Состав минорных экдистероидов видоспецифичен, что является одной из причин неоднозначного проявления биологической активности экстрактов на млекопитающих. Соединение высокой активности, содержащееся в следовых количествах, может внести более существенный вклад в результирующую активность, чем вещество, присутствующее в высоких концентрациях;

Результаты многих исследований свидетельствуют, что исходная комплексная биологическая активность лекарственного сырья экдистероид содержащих растений в процессе множественных процедур по изоляции индивидуальных мажорных фитоэкдистероидов в значительной степени теряется. В ходе технологических работ извлекаются 1-3 мажорных компонента, остальные удаляются как балластные.

Инактивация. Проявление активности экдистероидов в организме насекомых-фитофагов зависит не столько от их присутствия в органах растений, сколько от взаимного сочетания с другими сопутствующими факторами. Гормональная активность сложного состава фитоэкдистероидов зависит от следующих обстоятельств: а) соотношение между индивидуальными составами не постоянно и меняется в ходе развития растений; б) с прохождением фенофаз меняется распределение по органам растения – уменьшается долевое участие наиболее активных и накапливаются слабоактивные соединения; в) менее активные экдистероиды в организме насекомых (поступающие с пищей или вырабатываемые эндогенно) могут полностью или частично блокировать физиологическое действие более активных соединений.

Механизмы временной инактивации экдистероидов у членистоногих включают образование эфиров с жирными кислотами. Важную роль в процессах обратимой активации экдистероидов играют пептиды, в т.ч. через образование липопротеинов высокой и низкой плотности. Пептиды являются основными носителями биологической активности экдистероидов и важны как для запуска механизмов генной транскрипции через кофакторы, так и предохранения от инактивации. Низкомолекулярные белки стимулируют деятельность фермента фосфатазы, ответственного за высвобождение экдистероидов из конъюгатов и служат фактором негеномного, альтернативного пути активации соединений с гормональной активностью через мембранные рецепторы членистоногих.

Инактивация избытка поглощенных экдистероидов в насекомых может происходить разными путями: через кишечник и гемолимфу, путем образования сложных эфиров с жирными кислотами (C_{22} -эфиры; C_3 -ацетаты), окисление и эимеризацию (C_3 - α -эимеры), фосфорилирование (C_2 , C_3 , C_{22} -фосфаты) и C_{26} -экдизоновые кислоты. Кроме того, образуются неактивные фосфаты C_3 -эимеров. Другой возможный путь инактивации – микробная трансформация в результате симбиотической деятельности бактериальной микрофлоры жуков и тлей, обеспечивающих переваривание пищи в средней кишке.

Литература

1. Bourne PC, Whiting P, Dhadialla TS, Hormann RE, 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. – Vol. 2; Is. 11. – P. 1-11.
 2. Dinan L. Ecdysteroid structure-activity relationships // *Studies in Natural Products Chemistry*, 2003. Vol. 29. – P. 3-71.
 3. Dinan L., Hormann R.E., Fujimoto T. An extensive ecdysteroid CoMFA. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1999. Vol. 13. – P. 185-207.
 4. Hormann R.E, Dinan L., Whiting P. Superimposition evaluation of ecdysteroid agonist chemotypes through multidimensional QSAR // *Comput Aided Mol Des.*, 2003. – Vol. 17; Is. 2-4. – P. 135-153.
- 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.