

АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.В.ПАЛЛАДИНА

На правах рукописи

МУХАМЕД ЛАБИБ АБД ЭЛЬ-ГАЛИЛЬ СААД

СЕРПУХА ВЕНЦЕНОСНАЯ /*SERRATULA CORONATA L.* /
КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ

03.00.04 — биохимия

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Киев — 1993

№ 26.996

Работа выполнена на кафедре органической и бионеорганической химии Украинского государственного аграрного университета и в отделе биохимии стеринов Института биохимии им. А.В.Палладина АН Украины

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор ХОЛДОВА Ю.Л.
кандидат сельскохозяйственных наук, профессор БЕЛОНОЖКО М.А.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор СУДЬИНА Е.Г.
доктор биологических наук ПАЛЛАДИНА Т.А.

Ведущая организация - Киевский университет им. Тараса Шевченко

ЛНБ України ім.В.Стефаніка
00814521 (L)



Защита диссертации состоится 19-04 1993 г., в _____ часов на заседании специализированного совета Д 016.07.01 по защите диссертаций в Институте биохимии им. А.В.Палладина АН Украины /252601, г.Киев, ул.Леонтовича, 9/.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биохимии АН Украины.

Автореферат разослан _____ 1993 г.

Ученый секретарь специализированного совета *Кирсенко* Кирсенко О.В.

1993 УВК УДАУ, 138 + 100

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Расширение масштабов поисков и исследований природных биологически активных соединений дало толчок к изучению класса фитостероидов, ранее известных только у насекомых и ракообразных под общим названием эклизоны /Холодова, 1979, 1987; Ахрем, Ковганко, 1989/. Эти полигидроксилированные стерины обладают характерными физиологическими свойствами: проявляют активность гормонов линьки и метаморфоза у насекомых, а также половых феромонов у ракообразных.

Обнаружение гормонов насекомых в большом количестве в растениях было достаточно неожиданным и представляло практический интерес, открывая доступный источник необходимых количеств чистых гормонов для исследований их биологической активности. Функции экдистероидов в растительном организме изучены недостаточно. Не исключено, что фитостероиды участвуют в процессе роста и развития растений /Горовиц и соавт., 1974; Lafont, Horn, 1989/.

Экдистероиды проявляют различные виды биологической активности. На теплокровных они обладают анаболическим, гипогликемическим, гепатопротекторным, адаптогенным, тонизирующим действием /Сыров и соавт., 1978/. Кроме того, они препятствуют развитию атеросклероза, положительно влияют при лечении миокардита и переломов костей /Сыров и соавт., 1986/. Некоторые из перечисленных свойств нашли применение в практике. На основе экдистерона, выделенного из *Rhaponticum earthmoides*, разработан и производится в промышленных масштабах тонизирующий препарат "Экдистен", применяемый при различных заболеваниях, связанных с ослаблением белоксинтезирующих процессов /Сыров, Курмуков, 1976/. На основе экдистероидов растений рода *Serratula* разработан биостимулятор, увеличивающий силу и продуктивность пчелиной семьи и других насекомых /Холодова и соавт., 1990/.

Несомненно, актуальной задачей современной биоорганической химии, биохимии и биотехнологии является поиск доступного растительного сырья, содержащего экдистероиды, их химическая идентификация, разработка методов их аналитического контроля, а также исследование биологической активности и механизмов действия в различных организмах. Изучение состава экдистерои-

дов и особенностей их накопления в органах растений будет способствовать разработке новых лекарственных препаратов и выяснению роли и механизмов действия экистероидов как фармакологически активных средств.

Содержание фитостероидов в растительном материале весьма велико у видов рода *Serratula* L. /Горовиц и соавт., 1974; Холодова, 1987/ и достигает иногда 1-2 %. Наиболее распространенным в растениях представителем экистероидов является экистерон или β -экизон. Он представляет собой C_{27} -стероид гормонального действия, безопасный для окружающей среды и приводящий либо к летальному расстройству метаморфоза на насекомых /Ахрем, Ковганко, 1989; Koelman, 1990/, либо к интенсификации их разведения /Холодова, 1979; Холодова и соавт., 1990/. Для получения экистероидов с целью создания на их основе эффективных препаратов, используемых в биологических исследованиях и для практических целей, необходимы сырьевая база /Ахмед и соавт., 1990/, разработка способов выращивания продуцентов экистероидов и технологии производства культур тканей и клеток растений для обеспечения условий эффективного накопления экистерона в них. Использование арсенала методов культуры клеток и тканей растений послужили толчком для создания технологии, направленной на получение фитостероидов серпухи венценозной в культуре *in vitro*.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось исследование возможности создания сырьевой базы для получения экистероидов серпухи венценозной /*Serratula coronata* L./, изучение их химической природы и биологической активности.

Исходя из цели исследования, поставлены следующие задачи:

1. Ввести в полевую культуру типичное луговое растение - серпуху венценозную и изучить возможности ее выращивания в правобережной лесостепи Украины в качестве технического сырья для получения экистероидов.

2. Определить оптимальные нормы и сочетания органических и минеральных удобрений, густоту стояния серпухи венценозной, обеспечивающих на типичных малогумусных черноземах максимальное содержание экистероидов в растениях.

3. Изучить закономерности накопления экистерона /главно-

го компонента экистероидов серпухи венценосной / в наземной части растений в зависимости от фазы развития, органа, возраста растений, а также режима питания.

4. Выделить экистероиды из растения в индивидуальном виде и установить их структуру.

5. Исследовать возможности спектрофотометрической оценки экистероидов различной структуры.

6. Оценить антиоксидентную активность основных экистероидов данного растения и некоторых их метаболитов.

7. Ввести растение серпухи венценосной в культуру в опытах *in vitro* и изучить:

- возможности получения суспензионной культуры для непрерывного культивирования с целью извлечения вторичных метаболитов;

- сравнительное содержание белков клеточной культуры и полевых растений;

- возможность проведения трансформации клеток плазмидой *Agrobacterium rhizogenes* (R1) для усиления выхода вторичных метаболитов в культуре тканей.

Научная новизна. Впервые в зоне неустойчивого увлажнения правобережной лесостепи Украины типичное луговое растение — серпуха венценосная выращивалась как полевая техническая культура для получения экистероидов. В условиях типичных малогумусных черноземов установлены оптимальные уровни минерального питания и густота растений серпухи венценосной, обеспечивающих ей максимальную урожайность и высокий выход экистероидов с единицы посевной площади. Установлены особенности накопления экистерона в серпухе венценосной в зависимости от фазы развития, типа органов, возраста растений и режима их питания в условиях Киевской области.

Из наземной части серпухи венценосной изолировано и достоверно идентифицировано 7 экистероидов, среди них 5 ранее не были обнаружены в этом растении. С целью выбора оптимального метода аналитического контроля экистероидов впервые проведено сравнительное изучение чувствительности семи цветных реакций на стероиды по отношению к экистероидам различной структуры. Установлены антирадикальные и антиокислительные свойства экистероидов различной структуры.

Разработана технология получения суспензионной клеточной культуры и каллуса серпухи венценосной, а также определены факторы, влияющие на синтез экидистероидов в культуре *in vitro*. Впервые проведено сравнительное изучение новосинтезированных белков в тканях полевых растений и в культуре тканей, как маркеров выхода вторичных метаболитов. Определены оптимальные режимы трансформации клеток и тканей агробактериями, способными усиливать выход вторичных метаболитов.

Теоретическое значение и практическая ценность работ.

Охарактеризован состав экидистероидов еще одного перспективного источника биологически активных стероидов. Выявление антирадикальных и антиокислительных свойств экидистероидов способствует более глубокому пониманию возможных механизмов действия этих ценных биологически активных соединений.

Разработанные способы выращивания серпухи венценосной в условиях *in vivo* и *in vitro* могут быть рекомендованы для практического применения с целью получения экидистероидов и последующего изготовления лекарственных препаратов на их основе. Предложенные методы аналитического контроля могут быть использованы для идентификации экидистероидов и стандартизации препаратов на их основе.

Апробация работ. Результаты исследований докладывались и обсуждались на I Международном конгрессе "Биоконверсия органических отходов для получения биогумуса, биогаза, белковых веществ и охрана окружающей среды" /Киев, 1991/, Конференции профессорско-преподавательского состава Украинского государственного аграрного университета /Киев, 1991/, VI Украинском биохимическом съезде /Киев, 1992/ и научных семинарах отдела биохимии стероидов Института биохимии АН Украины /Киев, 1992/.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, изложенных в 5 разделах, выводов и списка использованной литературы. Общий объем диссертации включает 159 страниц машинописного текста, 16 таблиц и 18 рисунков. Список литературы содержит 217 наименований, в том числе 114 иностранных авторов.

Научные консультации проводили Л.Б.П., проф. Холстова Ю.Д.

д.с.х.н., проф. Белоножка М.А., д.б.н., Галкин А.П. и к.б.н. Коваленко П.Г.

Автор выражает искреннюю благодарность своей супруге за оказанную помощь и поддержку в работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выращивание серпухи венценосной в полевых условиях проводили в 1989-1992 гг. на Агрономической опытной станции Украинского государственного аграрного университета на черноземе типичном малогумусном грубопылевато-легкоуглинистого механического состава, подстилаемого карбонатным лессом. Органические /навоз/ и минеральные - аммиачная селитра /N - 34 %/, суперфосфат /P₂O₅ - 19,5 %/, калийная соль /K₂O - 40 %/ удобрения вносили в соответствии со следующей схемой опытов: I - контроль /без удобрений/, 2-4 - навоз+N₉₀; P₉₀; K₉₀; 5-7 - навоз+N₉₀P₉₀; N₉₀K₉₀; P₉₀K₉₀; 8 - навоз+N₉₀P₉₀K₉₀ соответственно.

Посадку растений провели осенью - в сентябре месяце - из расчета 35 тыс. растений /кустов/ на I га - по 2,5 куста на I линейный метр с шириной междурядий - 70 см.

В полевых и лабораторных исследованиях использовали методики, общепринятые в научных лабораториях НИИ АН Украины.

Изучая влияния условий выращивания на рост и развитие серпухи венценосной, проводили фенологические наблюдения с фиксацией дат наступления у растений основных фаз развития /Вавилов, 1983/; определение по фазам развития высоты растений, площади листовой поверхности, сырой и сухой массы отдельных органов растений, влажности почвы в слоях 0-20 и 20-40 см, нитратного азота - колориметрически с помощью дисульфитофеноловой кислоты, подвижной фосфорной кислоты, обменного калия - методом пламенной фотометрии в вытяжке /Петербургский, 1968/.

В диссертации представлена морфолого-биологическая характеристика серпухи венценосной.

Выделение и идентификацию эклистероидов проводили с помощью разнообразных экстрактивных процедур /Холодова, 1987/, применяя затем колоночную и тонкослойную хроматографию /Galbraith, Horn, 1969/. При этом использовали окись алюминия, силикагель КСК и силикагель "L" 100/160 мкм /ЧСТР/. Применяли следующие системы растворителей: хлороформ-метанол 25:1; 15:1; 9:1; 4:1; 2:1; хло-

роформ-метанол-вода 4:1:0,1. Тонкослойную хроматографию /ТСХ/ проводили на пластинках silufol uv-254. Эклистероиды на ТСХ обнаруживали путем опрыскивания ванилин-серной кислотой с последующим нагреванием в течение 2-5 мин при 110-120 °C /galbraith, horn, 1969/.

Идентификацию выделенных индивидуальных компонентов осуществляли с помощью физико-химических методов исследования: масс-спектр и элементные составы ионов получены на приборе МХ-1310 при ионизирующем напряжении 50 В и температуре 100-140 °C; ИК-спектры получали на спектрофотометре UR-20 в КВ; УФ-спектры - на приборе srecord uv. Спектры ПМР соединений получали на приборе СВ-567 А /100 МГц, "Tesla"/; спектры ЯМР / I_H и I_C / - на приборах MM-250 и MM-300 /Bruker/, растворитель C_5D_5N , O-TMS.

Оптическое вращение определяли на поляриметре "Цейсс". Кривые кругового дихроизма записывали на спектрополяриметре Jasco J-20. Температуры плавления определяли на приборе БОЭЦИУС.

Цветные реакции на эклистероиды различной структуры исследовали с целью выбора наиболее чувствительной и специфичной реакции для аналитических определений. Проводили реакции Чугаева /Холодова и соавт., 1976/, Либегмана-Бурхарда /More, Baumann, 1952/, ЭМА /anderson et al, 1964/, Илька /Розенвейг, 1952/, Портера-Зильберта /Porter, Silber, 1950/, Кобера /Kober, 1931/ и Лиге /clark, 1955/.

Антирадикальные свойства эклистероидов оценивали по их способности устранять супероксидный анион-радикал кислорода O_2^- , генерируемый фотохимической системой /Чумакова, Осинская, 1977/, супероксидустраняющую активность эклистероидов определяли по их способности ингибировать восстановление пара-нитротетразолия хлористого. Суммарную антиокислительную активность эклистероидов определяли по образованию малонового диальдегида в модельной системе, используя липосомы яичного фосфатидилхолина /sevanian et al, 1988/.

Каллус и клеточную суспензионную культуру серпухи венечной из семян и молодых листьев получали, помещая стерильный материал на агаризованную /0,7 %/ среду Мурашиге-Скуга /MC/ /Kuzhina, Skoog, 1962/, содержащую 3 % сахарозы и 0,05 мг/л бензиламинопурина. Каллус индуцировали

на модифицированной питательной среде В₅ /Gamborg, 1988/ и МС, содержащих 5%-ную сахарозу, а также фитогормоны: гибберелло-вую кислоту - 0,5-1,0 мг/л; индолилуксусную кислоту - 0,02-0,2 мг/л; 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту - 0,04-0,4 мг/л и бензиламинопури-н - 0,02-0,5 мг/л. Питательные среды были также обогащены поливинилпирролидоном. Каллус образовывался в темноте при 25 °С в течение 7 недель в чашках Петри. Сформировавшийся каллус /выше 0,3 г/ переносили на свежую питательную среду. После четвертого пассажа была получена клеточная суспензионная культура. Количественное определение эклистероидов в листьях и каллусной суспензионной культуре проводили с помощью хромато-графического разделения метанольного экстракта в тонком слое силикагеля Ls 5/40 М, содержащем 13 % гипса /Холодова, 1977/.

Анализ белков клеточной культуры и листьев полевых растений осуществляли методом электрофореза в ПААГе /Liemli, 1970 ; Smith, 1984/.

Для агробактериальной трансформации клеток использовали дикий вирулентный штамм LBA 9402 из лаборатории биотехнологии Норвич, Великобритания /Hamill et.al, 1987/. Культуру штамма LBA 9402 наращивали в жидкой среде УМВ в течение 48 ч при 28 °С. Совместное культивирование каллуса /0,5 г/с агробактериями /10⁸, клеток в 1 мл/, проводили в жидкой среде МС в течение 48 ч при 28 °С /Komari, 1989/.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование серпухи венценосной в полевых условиях.

Мы предприняли попытку изучить возможность и целесообразность выращивания серпухи венценосной в условиях полевой культуры, изыскать пути повышения ее продуктивности на типичных малогумусных черноземах. В качестве одного из весьма эффективных рычагов повышения почвенного плодородия и получения максимума качественной продукции мы избрали органические и минеральные удобрения.

Анализируя данные по содержанию и динамике подвижных элементов в почве на удобренных и неудобренных вариантах по фазам развития серпухи венценосной, отметим весьма важную, на наш взгляд, тенденцию: на удобренных фонах по сравнению с контролем в первой половине вегетации содержание основных элементов пита-

ния стремительно уменьшается особенно по азоту и калию, достигая минимума в фазе цветения растений. Такой же характер изменений наблюдается при поглощении фосфора, разница лишь в сравнительном уровне его потребления. Обнаруженные особенности усвоения питательных веществ серпухой венценосной свидетельствуют о том, что на удобренных вариантах развиваются более мощные растения и их потребности в почвенном питании, естественно, увеличиваются, достигая максимума к массовому цветению, когда в растениях наиболее активно протекают обменные процессы с включением элементов питания.

В контроле растения к фазе массового цветения наиболее интенсивно поглощают калий, затем - азот и, наконец, - фосфор, кривая поглощения которого более плавная. Следует добавить лишь, что растения на неудобренном фоне, слабее развиваясь, потребляют элементы питания в меньших количествах.

В более поздние фазы развития растений, когда они теряют часть листьев и процессы метаболизма ослабевают, содержание доступных питательных веществ в почве начинает постепенно увеличиваться, что особенно заметно по фосфору и калию. Содержание в почве азота и в этот период продолжает снижаться, расходуясь растениями на постепенно затухающие ростовые процессы.

Органические и минеральные удобрения - весьма мощный и быстролействующий фактор воздействия на рост и развитие растений, формирование отдельных органов и их химический состав. Для нас весьма важно было изучить реакцию серпухи венценосной на регулируемый уровень питания в условиях полевой культуры и установить влияние его на урожайность растений и содержание в них экдистерона. Показатели, представленные в таблице I, свидетельствуют о значительном влиянии используемых удобрений в опыте на рост растений в высоту и формирование листового аппарата - главного фотосинтетического органа растений. Разница в формировании стеблей и листьев растений на удобренных вариантах и контроле достаточно хорошо проявляется уже в начале фазы бутонизации, особенно при внесении азотных удобрений: на контроле высота растений достигает 40 см, а площадь листьев в $2,2 \text{ м}^2$ на 1 м^2 площади, на вариантах с азотом - соответственно 60-75 см, и $2,5-3,6 \text{ м}^2/\text{м}^2$.

Азотные удобрения, внесенные на фоне навоза, способствуют

Таблица I
Влияние удобрений на рост вегетативных органов
серпухи венценосной /среднее за 1990-1992 гг./

Ва- ри- ан- ты	Фазы роста							
	Начало бутони- зации		Массовая бутонизация		Цветение		Начало обжирания листьев	
	высота	площадь	высота	площадь	высота	площадь	высота	площадь
	расте-	расте-	расте-	расте-	расте-	расте-	расте-	расте-
ний,	ний,	ний,	ний,	ний,	ний,	ний,	ний,	
см	м ² /м ²	см	м ² /м ²	см	м ² /м ²	см	м ² /м ²	
1	40	2,2	95	2,7	105	3,6	105	2,7
2	60	3,6	115	4,1	140	4,6	141	3,8
3	50	2,8	100	3,1	136	3,9	136	3,3
4	50	2,7	105	3,2	137	4,0	138	3,4
5	65	2,5	115	3,9	140	4,2	141	3,6
6	67	2,9	120	3,9	145	4,3	147	3,7
7	54	2,4	105	3,3	138	3,8	138	3,1
8	75	3,6	135	4,7	155	5,0	157	3,8

энергичному росту серпухи венценосной к концу массовой бутонизации растений, обеспечивая прирост листовой поверхности по сравнению с контролем на 1,2-2 м²/м², стеблей в высоту - на 20-40 см. Листья становятся мощным аппаратом, обеспечивающим растения необходимыми для жизни метаболитами. Максимальной высоты и размеров листовой поверхности серпуха венценосная достигает к фазе массового цветения, когда растения энергично вступают в формирование генеративных органов. Однако в эту фазу более интенсивный рост растений наблюдается не только на вариантах с внесением азотных удобрений, а и при использовании на фоне навоза фосфорных и калийных удобрений.

Из таблицы следует, что сырая масса технически пригодных для переработки органов серпухи венценосной - прежде всего листьев, как и всего растения, значительно колеблется в зависимости от особенностей питания и фазы развития растений. Разница массы одного усредненного растения на контрольном варианте и наиболее перспективном варианте, где были внесены минеральные удобрения в дозе $90^P 90^K 90$ на фоне 30 т/га навоза, составляет в начале фазы бутонизации 400 г, а в фазу массовой бутонизации - 420 г, цветения - 485 г, по листьям-соответственно 170, 190, 215 г, стеблям - 140, 125 и 185 г.

Из отдельных видов удобрений более сильное влияние на увеличение массы одного растения и биологическую урожайность серпухи венценосной оказали азотные удобрения, причем они сохрани-

ли свое действие по восходящей в продолжение всех контролируемых фаз развития растений. Из парных сочетаний более эффективными оказались азотно-калийные удобрения, которые на фоне навоза обеспечили в условиях опытов близкий к максимальному /вар.8/ сбор листьев, составивший по фазам развития соответственно 203,0; 187,3 и 228,8 ц/га, а также листостебельной части - 400,8; 421,8 и 477,8 ц/га. Другие парные сочетания минеральных удобрений /Np, PK/ на фоне навоза были менее эффективными в увеличении урожайности исследуемых растений.

Максимальную урожайность серпухи венценосной на типичном черноземе обеспечили органические удобрения /30 т/га навоза/ с дополнительным внесением тройного сочетания минеральных удобрений /N₉₀P₉₀K₉₀/. На этом фоне урожайность листьев от более ранних к более поздним фазам роста составила 210,0; 234,5 и 246,8 ц/га, листостебельной массы соответственно 399,0; 484,8 и 519,8 ц/га.

Приведенные результаты исследований подтверждают многократно отмеченную в литературе регулируемую функцию удобрений в формировании урожая сельскохозяйственных культур. Это относится и к серпухе венценосной, которая хорошо адаптируется к условиям полевой культуры и способна при регулируемом питании обеспечить высокую урожайность ценного сырья для получения эклистероидов.

Анализируя содержание эклистероидов в растениях, мы показали его зависимость от органической принадлежности тканей, фаз развития, возраста растения, а также приемов выращивания /табл. 2/. Максимальное содержание эклистерона в растениях первого года жизни отмечено в цветочных корзинах, в растениях второго и третьего года жизни - в фазах отрастания листьев /прикорневая розетка/. Можно предположить, что биосинтез эклистерона происходит в начале роста растений в листьях, а в процессе развития растений он транспортируется в генеративные органы, его содержание в листьях снижается. В трехлетних растениях содержание эклистерона было наиболее высоким. Нами показано также высокое содержание эклистерона в корневой части растений. Так, у трехлетних растений в период массовой бутонизации оно составляло 1,35 %.

При исследовании содержания эклистерона в вегетативных и генеративных органах серпухи венценосной в зависимости от режи-

Таблица 2

Содержание экидистерона в различных органах серпухи венценосной в зависимости от возраста и фазы развития, % к сухой массе растения

Фазы развития	: I-й год : 2-й год : 3-й год			
	1. Образование прикорневой розетки, листья	0,16	1,49	2,06
2. Начало бутонизации: листья	0,17	1,57	2,05	
	бутон	0,19	1,33	1,29
3. Массовая бутонизация: листья	0,12	1,19	1,46	
	бутон	0,21	1,13	1,36
4. Цветение: листья	0,16	0,82	0,98	
	цветочные корзинки	0,24	0,94	1,08
5. Конец вегетации, листья	следы	0,25	0,31	

ма питания были использованы растения, пересаженные из открытого участка Белоцерковского сельхозинститута, урожая 1992 г. Они характеризовались несколько иными исходными показателями содержания экидистерона /табл. 3/. Максимальным содержанием экидистерона по-прежнему отличались листья прикорневой розетки серпухи венценосной: на удобренных вариантах оно достигало 1,12-1,80 % к сухому веществу.

Таблица 3

Содержание экидистерона в растениях серпухи венценосной в зависимости от режима питания, %

Ва-ри-ан-ты	Фазы роста, органы растений			
	: Образование прикорневой розетки : листья	: начало бутонизации : бутон	: массовая бутонизация : бутон	: Цветение, цветки
1	0,67±0,05	0,31±0,03	1,04±0,04	0,67±0,05
2	1,12±0,10	0,31±0,02	1,08±0,05	1,20±0,09
3	1,50±0,11	0,36±0,02	0,93±0,06	1,00±0,04
4	1,80±0,12	0,33±0,03	0,99±0,07	1,12±0,05
5	1,31±0,90	0,34±0,02	0,94±0,05	1,16±0,06
6	1,46±0,12	0,32±0,01	1,04±0,05	1,00±0,05
7	1,65±0,09	0,31±0,02	0,86±0,09	1,08±0,06
8	1,53±0,11	0,33±0,03	0,99±0,05	1,22±0,08

При выращивании серпухи венценосной на типичном черноземе с внесением 30 т/га навоза и минеральных удобрений в дозе $90 \text{ P} 90 \text{ K} 90$ урожайность серпухи венценосной может превысить 500-550 ц/га, что при среднем содержании экидистерона даже около

0,2-0,3 % к сухому веществу всей массы растения обеспечит сбор сырья с содержанием эклистерона в полевых условиях - до 100 кг/га.

Фитоэклистероиды *Serratula coronata* L.

Эклистерон - наиболее распространенный эклистероид в растительном мире. Мы получили его перекристаллизацией из этилацетата суммы эклистероидов, выделенной при экировании бутанольного извлечения растения системой хлороформ-метанол 2:1 на колонке Al_2O_3 , $C_{27}H_{44}O_7$, т.пл. 240-241 °C, $n_D^{20} + 9,7 \pm 2^0$ /с 0,40, метанол/.

По физико-химическим константам, U^* -, ИК-, масс- и ПМР-спектральным данным он аналогичен эталонному образцу.

α -эклизон - первый выделенный из насекомых в кристаллическом виде эклистероид. Нередко обнаруживается в растениях. Выделен нами с использованием системы хлороформ:метанол 4:1 на колонке с силикагелем, $C_{27}H_{44}O_6$, т.пл. 236-237 °C $n_D^{20} + 63,6 \pm 2^0$ /с 0,83, метанол/. По физико-химическим константам и спектральным данным идентифицирован с α -эклизоном.

Эклистерон и α -эклизон были выявлены в серпухе венценосной ранее /Новосельская и соавт., 1981/.

Приведенные ниже соединения были идентифицированы в серпухе венценосной нами впервые.

Полиподин В - широко распространен в растительном мире, но не встречается в тканях животных, обладая тем не менее высокой гормональной активностью - 400 μ по сравнению с эклистероном. Получен при использовании системы хлороформ-метанол 4:1 на колонке с силикагелем, $C_{27}H_{44}O_8$, т.пл. 250-252 °C /из ацетона $n_D^{20} + 93,2 \pm 2^0$ /с 0,28, метанол/.

В U^* -спектре наблюдается максимум поглощения при 241 нм /сопряженная с двойной связью кетогруппировка/.

В ИК-спектре имеет полосу поглощения сопряженной β -кетогруппы при 1685 cm^{-1} . Смещение этой полосы на 25 cm^{-1} в сторону длинных волн по сравнению с соответствующим максимумом в эклистероне свидетельствует о присутствии 5 β -оксигруппы в этом эклистероиде. Положения максимумов и величина дихроичного поглощения $\Delta \epsilon = -5,5253$ нм; $\Delta \epsilon = +3,2330$ нм/ кривой КД характерны для 5 β -оксидэклистероидов. У характер масс - спектрометрического распада указывает на идентичность боковых цепей этого соединения и эклистерона и различие стероидных ядер, выразившееся в наличии дополнительной оксигруппы, положение которой определено с помо-

щью ПМР-спектра.

Смещение в слабое поле сигнала протонной ангулярной группы $\text{CH}_3\text{-I9}$ /1,02 м.д./ указывает на отличие в ближайшем ее окружении в сравнении с экистероном. Совокупность экспериментальных данных позволяет идентифицировать соединение с полиподином В.

Интегристерон А - часто встречается в растениях семейств Гвоздичные и Астровые. Выделен также в другом виде растения рода *Serratula-S.xeranthemoides* /Холодова и соавт., 1979/.

Получен при использовании полярной системы хлороформ-метанол-вода 4:1:0,1. $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_8$, т.пл. 246-248 °С /этилацетат-метанол/, $[\alpha]_D^{20} + 36,0 \pm 2,0$ /с 0,22, метанол/.

В УВ-спектре имеет максимум поглощения 245 нм. В масс-спектре отсутствует пик молекулярного иона. Характер масс-спектрометрического распада исследуемого соединения свойственен экистероиду с боковой цепью, идентичной экистерону, и с 4 оксигруппами в стероидном ядре. Уширенный синглет при 4,15 м.д. в ПМР-спектре обусловлен тремя протонами, геминально расположенными к вторичным ОН-группам. Совпадение значения указанного химсдвига этого соединения и интегристерона А указывает на то, что дополнительная гидроксильная группа по сравнению с экистероном расположена при C_{11} . Значения сигналов протонов метильных групп I, 10 / $\text{CH}_3\text{-I8}$ /, I, 32 / $\text{CH}_3\text{-I9}$ /, I, 24 / $\text{CH}_3\text{-26/27}$ / и I, 46 м.д. / $\text{CH}_3\text{-2I}$ / совпадают со значениями соответствующих сигналов интегристерона А. Соединение на основании физико-химических констант, спектральных данных и при непосредственном сравнении с эталонным образцом идентифицировано с интегристероном А.

20. 22-моноацетонид экистерона встречается в некоторых растениях, как нативный метаболит. Получен с использованием системы хлороформ:метанол 9:1 на колонке с силикагелем. $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_7$; т.пл. 220-222 °С /из этилацетата-гексана/, $[\alpha]_D^{20} + 58,9 \pm 2,0$ /с 0,32, метанол/. В УВ-спектре имеет максимум поглощения - 244 нм. ИК-спектр соединения характерен для экистероидов - в нем имеются полосы поглощения гидроксильных групп /3400-3460 cm^{-1} / и кетогруппы, сопряженной с двойной связью /1660 cm^{-1} /. ПМР-спектр: 0,93 м.д. / $\text{CH}_3\text{-I8}$, с/, 0,91 / $\text{CH}_3\text{-I9}$, с/, I, 25 / $\text{CH}_3\text{-26/27}$, с/, I, 43 / $\text{CH}_3\text{-2I}$, с/, 3,9-4,1 /ОН при С-2 и С-3, м/, 6, II /Н при С-7, д. $J = 2$ Гц/, I, 25; I, 34 /6H, CH_3 - группы изопропилиденовой группировки/.

Перечисленные выше данные, а также наличие в масс-спектре этого вещества молекулярного иона M^+ 520, пиков ионов с m/z 363, 345 и 301 позволяют предположить, что данное соединение является 20,22-моноацетонидом эхдистерона /Galbraith, Horn, 1969; Занни и соавт., 1975/.

Выделенный из растения 20,22-моноацетонид эхдистерона по константам и спектральным данным совпал с заводным образцом, полученным гидролизом 2,3; 20,22-диацетонида эхдистерона разбавленной уксусной кислотой.

2,3; 20,22-диацетонид эхдистерона - нативный метаболит некоторых растений. Выделен при повторной хроматографии маточников, полученных при перекристаллизации эхдистерона, на колонке с силикагелем при элюировании системой хлороформ-метанол 25:1. $C_{33}H_{52}O_7$, т.пл. 230-232 °C /из ацети-аэфира/, $[\alpha]_D^{20} + 36,8 \pm 2^0$ /C 0,30, метанол/.

В УВ-спектре $\lambda_{\text{max}} = 242$ нм свидетельствует о наличии кетогруппы, сопряженной с двойной связью, ИК-спектр характерен для эхдистероидов /1660 cm^{-1} ; 3400-3460 cm^{-1} /. ПМР-спектр: 0,80 м.д. / CH_3 -18, с/, 0,97 / CH_3 -19, с/, 1,23 / CH_3 -26/27, с/, 1,23 / CH_3 -21, с/, 4,11-4,21 /2H при C-2 и C-3, м/, 5,80 /H при C-7 д./.

Дейтерохлороформ.

Эти данные, а также наличие в спектре этого вещества слабого пика молекулярного иона M^+ 560 и пиков ионов с m/z 403, 385 и 341 позволяют предположить, что данное соединение - 2,3; 20,22-диацетонид эхдистерона. По константам и спектральным данным вещество совпадало с заводным образцом, полученным обработкой эхдистерона ацетоном с каталитическим количеством феррогномо-либленовой кислоты /Galbraith, Horn, 1969/.

Птеростерон - структурный изомер эхдистерона, обнаруживаемый в растениях. Получен нами после элюирования колонки после выделения 2,3; 20,22-диацетонида эхдистерона более полярной системой хлороформ-метанол 15:1. $C_{27}H_{44}O_7$ т.пл. 217-218 °C /из метанол-воды/, $[\alpha]_D^{20} + 7,0 \pm 2^0$ /C 0,30, метанол/.

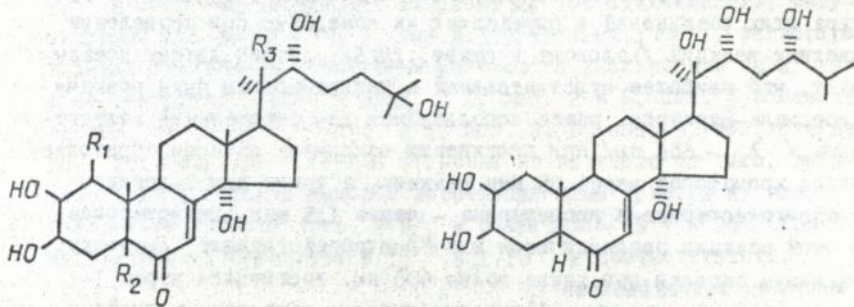
В УВ-свете $\lambda_{\text{max}} = 242$ нм, ИК-спектр /1645/ $\text{C} = \text{O}$, 1625 / $\text{C}=\text{C}$ /, типичен для эхдистероидов.

Показательным в ПМР-спектре птеростерона /Kimpler, 1969/ является наличие сигнала C-26 и C-27 /дублет, $J = 7$ Н / на 1,00 м.д. в отличие от эхдистерона, где этот сигнал является

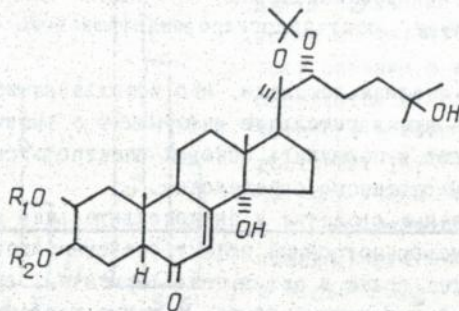
синглетом, I, 35 м.д., а также в масс-спектре-фрагмента с m/z 419 $M-N_{20}-43$, свидетельствующего о положении OH-группы при C-24. По полученным характеристикам вещество совпадало со стандартным птеростероном.

Таким образом, нами впервые идентифицированы в серпухе венценовой 5 экдистероидов - интегристерон А, полиподин В, птеростерон, моноацетонид и диацетонид экдистерона и подтверждено наличие двух ранее описанных в этом объекте /Новосельская и соавт., 1981/ экдистерона и α -экдизона /рис. I/.

Экдистероиды серпухи венценовой (S. Coronata L.)



- I. $R_1 = R_2 = R_3 = H$ α -экдизон
 II. $R_1 = R_2 = H; R_3 = OH$ экдистерон
 III. $R_1 = H; R_2 = R_3 = OH$ полиподин В
 IV. $R_1 = R_3 = OH; R_2 = H$ интегристерон А
 V. птеростерон



- VI. $R_1 = R_2 = H$ 20,22-моноацетонид экдистерона
 VII. $R_1, R_2 = CMe_2$ 20,22-диацетонид экдистерона

Рис. I.

W. R. 0,5; 100; 0,5; 0,3; 0,15; 10; 2,5.

Спектрофотометрические характеристики продуктов цветных реакций с экдистероидамч. Нами была проведена сравнительная характеристика цветных реакций, обычно используемых для определения холестерина и других стероидов, с целью нахождения наиболее чувствительных методов количественного определения экдистероидов.

Наиболее характерными элементами структуры экдистероидов являются вицинальная 2в ; 3в - диольная группировка в кольце А, 5в - атом водорода /чис-А В-сочленение/, $\Delta 7-8$ -сопряженная кетогруппировка в кольце В, 14 α -оксигруппа между кольцами С и Д и боковая цепь в Г7в -положении кольца Д, которая всегда содержит оксигруппу при С₂₂ и часто при С₂₀ и С₂₅. Такая структура этих соединений и определяет их поведение при проведении цветных реакций /Холодова и соавт., 1976/. Анализ данных показывает, что наиболее чувствительной к экдистероидам была реакция Либермана-Бурхарда, ранее используемая для определения холестерина / λ_{\max} - 656 нм/ при достижении максимума окраски образовавшихся хромофоров через 35 мин. реакции, а также для 7-дегидро-7-оксихолестерина и эргостерина - через 1,5 мин. Экдистероиды в этой реакции проявили себя как "быстродействующие" стероиды: максимум окраски при длине волны 400 нм. достигался через 1-2 мин. реакции, что характерно для наличия сопряженных двойных связей. У полиподина В этот максимум был смещен до 425 нм.

Наиболее специфичной для экдистероидов различной структуры оказалась реакция Чугаева, конечные продукты которой имели дополнительные качественно различные максимумы поглощения в зависимости от введения дополнительных ОН-функций или эфирных группировок в структуру пентанпергидрофенантренового скелета либо боковой цепи.

Результаты анализа показали, что использование цветных реакций может дать предварительную информацию о физической структуре экдистероидов и послужить основой спектрофотометрических методов их количественного определения.

Антирадикальные свойства и антиоксидантная активность экдистероидов. Мембранотопный эффект экдистероидов, их воздействие на биосинтез белка и активность ферментных систем, влияние на углеводный и липидный обмен, а также тонизирующие и адаптационные свойства позволяют предположить их способность угнетать перекисное окисление липидов мембран, свойственную стероидным

гормонам позвоночных.

Как следует из полученных данных, эклистерон обладает антирадикальным действием, линейно зависящим от концентрации. Ингибирование препаратом восстановления пара-нитротетразолия составляло 1,65 условных единиц при концентрации 10^{-3} М, превышая более чем в 3 раза степень ингибирования этой реакции при концентрации 10^{-5} М, которая все еще вызывала ингибиторный эффект.

Супероксидустранивающая активность эклистерона как и супероксиддисмутазы обусловлена, очевидно рекомбинацией $O_2^-: 2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Механизм этого действия эклистерона пока неясен.

В системе, содержащей липосомы из фосфатидилхолин, индуцируемый как ферро-/ Fe^{3+} /, так и феррионами / Fe^{2+} /, эклистерон вызывал подавление накопления малонового диальдегида /МДА/ как в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М /рис. 2 А, поз. 2 и Б, поз. 5, соответственно/, так и 10^{-4} М /рис. 2 А, поз. 3, Б, поз. 6, соответственно/. Ингибирующее действие стероида не зависело от того, вызывалось ли окисление липосом восстановленным /рис. 2 А/ или окисленным железом /рис. 2 Б/, и составляло 13 % и 26 % при концентрациях препарата $5 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-4}$ М соответственно.

Из исследованных минорных компонентов эклистероидов серпухи венценосной - α -эклидона, интегристерона А и полиподина В в концентрации 10^{-3} М наибольшей антирадикальной активностью обладал полиподин В /153 % по сравнению с эклистероном/. Его эффект сравним с известным антиоксидантом ионолом, активность которого в концентрации 10^{-3} М достигала 162 % активности эклистерона /табл. 4/. Интегристерон А и α -эклидон, а также 2-дезоксипроизводные α -эклидона и эклистерона / 10^{-3} М/ обладали антирадикальной активностью, составляющей 70 %, 52 %, 50-55 % активности эклистерона. Взятый

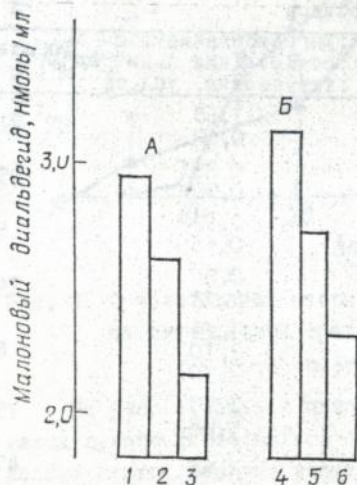


Рис. 2. Антиокислительная активность эклистерона.

для сравнения витамин Д₃ также обладал антирадикальной активностью - 140 % активности эрклистерона.

Антиокислительная активность исследованных эрклистероидов в концентрации 10⁻⁴ М - 5 · 10⁻⁵ М имела несколько иной характер. Ее зависимость от структуры практически не наблюдалась. Эрклистерон, α-эрклизон, их дезоксипроизводные, полипидин В, заметно не различались по способности подавлять накопление малонового диальдегида /МДА/. Интегристерон был практически неактивен. Витамин Е, известный своими антиоксидантными свойствами, тормозил накопление МДА на 19-24 %, известный антиоксидант ионол - до 47 %. Характерно, что антиокислительное действие одного из препаратов на основе суммы эрклистероидов - БТК 5,7 - составляло 45 %.

Таким образом, антиокислительная активность эрклистероидов сравнима с таковой витамина Е, но ниже ионола. Взятый для сравнения витамин Д₃ в концентрациях 5 · 10⁻⁵ - 10⁻⁴ М проявлял прооксидантные свойства, увеличивая продукцию МДА до 25 %.

Таблица 4

Антирадикальная и антиокислительная активность эрклистероидов

Название	Концентрация, М	Ингибирование восстановления п-нитротетразолия, усл.ед.	Торможение МДА, %
Эрклистерон	10 ⁻³	1,65	21
	10 ⁻⁴	0,62	
α-эрклизон	10 ⁻³	0,86	25
	10 ⁻⁴	0,70	
2-дезоксирклистерон	10 ⁻³	0,92	9
	10 ⁻⁴	0,66	
2-дезоксирклизон	10 ⁻³	0,80	14
	10 ⁻⁴	0,72	
Интегристерон А	10 ⁻³	1,11	6
	10 ⁻⁴	2,10	
	10 ⁻⁵	2,10	
Полипидин В	10 ⁻³	2,53	15
	10 ⁻⁴	0,88	
Ионол /2,6-дигидро-бутил-4-метилфенол/	10 ⁻³	2,68	47
Витамин Е /α-токоферол/	10 ⁻⁴	-	22
Витамин Д ₃ /холекальциферол/	10 ⁻⁴	2,22	+25
	10 ⁻⁵	2,30	
БТК-5,7 /сумма эрклистероидов серпухи венечной/	0,1 мл в конц. 1 мг/мл	-	45

Культура клеток серпухи венченокосной в опытах in vitro.

В исследованиях возможности получения каллуса и клеточной суспензионной культуры из семян и молодых листьев серпухи венченокосной с хорошим выходом экидистероидов мы исходили из представлений о том, что их содержание зависит от генотипа растений, эксплантата, его возраста, среды культивирования и режима выращивания. На рис. 3 показан прирост массы сырого вещества /кр.1/ каллусной ткани, из которой в последующем была получена суспензионная культура на среде МС в зависимости от времени при постоянной температуре 25 °С. Здесь же представлены данные об увеличении содержания экидистероидов по мере роста каллусной ткани /кр.2/. Как видно из рис. 3, это увеличение наиболее выражено в экспоненциальной фазе роста клеток.

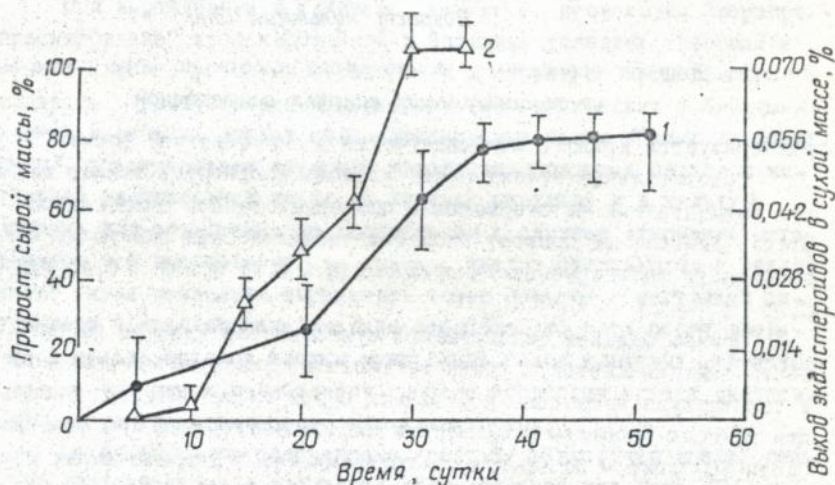


Рис. 3. Прирост сырой массы каллусной ткани серпухи венченокосной на питательной среде МС/1/, а также количественное содержание экидистероидов /2/.

На рис. 4 показан прирост биомассы /масса сырого вещества, масса сухого вещества/, а также числа клеток по мере роста суспензии клеток серпухи венченокосной. При анализе параметров роста суспензионной культуры установлено, что ростовой цикл на модифицированной нами питательной среде В₅ с добавками L-аминокислот составляет 28-30 дней. Прирост биомассы суспензии клеток ха-



Рис. 4. Прирост биомассы, а также числа клеток по мере роста суспензии клеток серпухи венценбной.

рактируется кривой, приближающейся в S-образной форме.

Положительный эффект роста удалось достигнуть также, варьируя концентрации фитогормонов в модифицированной питательной среде. Наибольший прирост биомассы наблюдали при следующих концентрациях фитогормонов /в мг/л/: БАП - 0,1; 2,4 Д - 0,4; ИУК - 0,2; ГК₃ - 1.

Помимо баланса фитогормонов существенное влияние на процессы деления клеток и обмен метаболитов оказывает освещенность и температура процесса. В условиях наших экспериментов наибольший прирост биомассы в суспензии клеток наблюдается при освещенности 500 люкс - до 90 г/л, в то время как в темноте сырая масса составила лишь 65 %, а при освещенности 5000 люкс - 22 % от этой величины.

Оптимальная температура для роста каллуса и суспензионной клеточной культуры в условиях наших экспериментов была в пределах 24-26 °С. Темновая культура каллусной ткани серпухи венценосной при температуре 25 °С по сравнению со световой культурой сохранялась более жизнеспособной.

Инициация роста биомассы достигалась также путем подбора оптимальных концентраций дополнительных источников азота: аминокислот - L-глутамин, L-аргинин и L-аспарагин. Наиболее эффективным оказался L-глутамин в концентрации 100-

130 мг/л, обеспечивший прирост сырой массы клеток до 80 %. Известно /Nashimoto, Yamada, 1987/, что L-глутамин влияет на активность глутаматсинтазы, способствуя большей компактности клеток.

Таким образом, подобранные и оптимизированные нами культуральные среды для вида серпухи венченокосной обеспечивают возможность получения из первичных эксплантатов каллуса, из него - суспензионной культуры.

Получение новых клеточных линий и генетически измененных культур серпухи венченокосной служит реальной основой для получения ценных биологически активных веществ либо путем количественного увеличения биомассы либо усиления необходимого метаболита в клетках методами генетической инженерии растений.

При выращивании в условиях *in vitro* происходит "перепрограммирование" заблокированной в нативных условиях информации генома клеток, возможны перестройки в структуре хромосомного аппарата. Чувствительными маркерами физиологических и биохимических изменений служат новосинтезируемые белки /Галкин и соавт., 1989/. Сравнительное изучение новосинтезированных белков в интактной растительной ткани из полевых растений и в культуре полезно для объяснения ее способности к синтезу вторичных метаболитов при выращивании *in vitro*. Анализ синтезируемых белков может также позволить определить новые подходы к регуляции активности ферментов генетическим способом, то есть после введения в культивируемые клетки чужеродных генов ключевых ферментов синтеза вторичных метаболитов и после обработки клеток синтетическими регуляторами роста или элиситорами.

Из данных электрофореграмм /рис. 5/ видно, что спектр белков, синтезируемых в каллусной суспензионной культуре /Б/ менее разнообразен, чем в листьях полевых растений /А/; В - маркерные белки /"pharmacia", Швеция/. Практически все белки, синтезирующиеся в культуре, за исключением двух полипептидов со значениями M_n 150 и 200 кДа, обнаруживаются и в листьях.

Помимо белков, идентичных каллусным, в листьях обнаруживается ряд специфических полипептидов с разной электрофоретической подвижностью.

Содержание мажорного компонента экидистерона в листьях и репродуктивных органах одно-трехлетних растений превышает такое в клетках суспензии серпухи венченокосной /см. табл. 2/, что

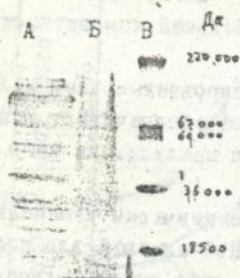


Рис. 5. фракционный состав белков, выделенных из суспензионной клеточной культуры и листьев серпухи венчешной.

коррелирует с более разнообразным спектром белковых фракций листьев на электрограмме.

Как следует из проведенных нами исследований, клеточная суспензионная культура серпухи венчешной содержала небольшой процент экидистероидов. Кроме того, в последующих пассажах каллусных тканей снижалась их общая продуктивность. Эти результаты вместе с ненадежностью использования экзогенных регуляторов роста и нестабильностью роста каллусных тканей серпухи венчешной побудили нас обратиться к генетической трансформации клеток с помощью *ri*-плазмиды *Agrobacterium rhizogenes*.

Благодаря функции энричвания в трансформированных клетках растений фитогормональных генов агробактерий такие клетки растений приобретают опухолевый фенотип, отличающийся способностью к быстрому делению клеток, что открывает перспективы их эффективного использования в биотехнологии. Мы использовали возможности агробактериальной трансформации серпухи венчешной и получения культуры трансформированных тканей с увеличенным содержанием экидистероидов.

О том, что в наших экспериментах образовывалась генетически измененная культура, свидетельствует содержание экидистероидов в нетрансформированной каллусной культуре $0,085 \pm 0,010 \%$ и культуре после трансформации $0,156 \pm 0,015 \%$. Трансформированная каллусная ткань хорошо росла на агаризованной питательной среде МС без фитогормонов.

Следует заметить, что в листьях полевых растений содержание экидистероидов все же превышало их количество в культуре, составляя в однолетних растениях $0,12-0,17 \%$. Интенсивный рост трансформированных клеток серпухи венчешной на безгормональных средах предполагает упрощение способа их выращивания и экономическую эффективность их биотехнологического использования.

Получение новых трансформированных клеток серпухи венчешной, а также способность этих клеток синтезировать стероидные гормоны указывает на принципиальную возможность их использования в качестве источника стероидов.

ВЫВОДЫ

1. Серпуха венценосная в условиях правобережной лесостепи Украины - весьма перспективная техническая культура для получения фитоэкдистероидов. Максимальная урожайность ее листостебельной массы на типичных малогумусных черноземах - 519,8 ц/га обеспечивается при густоте растений 35 тыс./га внесении навоза 30 т/га и полного минерального удобрения $n_{90}P_{90}K_{90}$.

2. Накопление экдистероидов в серпухе венценосной носит различный характер в зависимости от фазы развития, типа органа и возраста растения. Максимальным содержанием отличаются листья прикорневой розетки - в среднем за три года исследований на удобренных вариантах оно достигало 1,12-1,80 % к сухому веществу. Высоким содержанием отличались также цветочные корзинки /0,90-1,22 %/ и корни /до 1,35 %/.

3. Из наземной части растения выделено и с помощью физико-химических и спектроскопических /УФ-, ИК-, ПМР-, масспектрометрия/ методов идентифицировано семь экдистероидов различной структуры: экдистерон, ϵ -экдизон, полиподин В, интегристерон А, 20,22-моноацетонид, 2,3;20,22-диацетонид экдистерона, птеростерон в соотношениях - 100:0,5:0,5:0,3:0,15:10:2,5. Пять последних экдистероидов выявлены нами в этом источнике впервые.

4. Сравнительный анализ семи различных цветных реакций на стероиды выявил наибольшую чувствительность реакции Либермана-Бурхарда и наибольшую специфичность реакции Чугаева в применении к экдистероидам.

5. На моделях *in vitro* установлены антирадикальные и антиокислительные свойства экдистероидов серпухи венценосной и их метаболитов, сравнимые с таковыми известных антиоксидантов.

6. На основе известных сред для культивирования клеток и тканей *in vitro* оптимизирован состав питательных сред и определены условия для получения каллуса и клеточной суспензионной культуры серпухи венценосной. Наибольшее увеличение содержания экдистероидов достигается в экспоненциальной фазе роста, составляя $0,07 \pm 0,01$ % к сухому веществу ткани. Генетическая трансформация клеток с помощью *ri*-плазмиды *Agrobacterium rhizogenes* способствовала увеличению содержания экдистероидов более, чем в 2 раза.

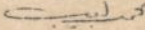
7. Сравнительное изучение новосинтезированных белков в интактной растительной ткани полевых растений и культуре показало более разнообразный спектр белковых фракций нативных полевых растений, что коррелирует с более высоким содержанием эклистероидов в них.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Саад М.Л., Милалера К.Лж., Холодова К.Д., Саатов З., Шатурский Я.П. Биостимуляторы на основе серпухи венечной / *Serratula wolffii, Andrzej.* // Тезисы докл. I Международного конгресса "Биоконверсия органических отходов для получения биогумуса, биогаза, белковых веществ и охрана окружающей среды Киев-Ивано-Франковск, 25-27 марта 1991 // Киев 1991. С. 72-73.
2. Бердичев А.Г., Саад М.Л., Томовська Г.Н., Осинська Л.Ф., Холодова К.Д. Імуномодуляторні та антиоксидантні властивості еклистерону. // Тези доповідей ч. III "VI Український біохімічний з'їзд" // Київ-видавництво УСГА 1992 / - Киев, 1992, с. 94.
3. Осинская Л.Ф., Саад М.Л., Холодова К.Д. Антирадикальные свойства и антиокислительная активность эклистерона // Укр. биохим. журн. 1992. Т.64, № I, с. 114-117.
4. Саад М.Л., Коваленко П.Г., Мелведев Т.В., Корниен Г.В., Гуман Н.В., Холодова К.Д., Галкин А.П. Культура изолированных клеток и тканей серпухи венечной как источник биологически активных фитоеклистероидов // физиология и биохимия культ. растений. - 1992, Т.24, № 6, с. 611-615.
5. Саад М.Л., Коваленко П.Г., Заец В.Н., Корниен Г.В., Шатурский Я.П., Холодова К.Д., Галкин А.П. Сравнительный анализ белков клеточной культуры и полевых растений продуцента эклистероидов *Serratula coronata L.* // Укр. биохим. журн. - 1992, Т.64, № 6, с. 84-87.
6. Саад М.Л., Білоножка М.А., Корнієць Г.В., Шатурський Я.П., Холодова К.Д. Залежність вмісту фітоеклістероїдів у вегетативних та генеративних органах серпін увінчаного / *Serratula*

wolffii, and ~~vae~~ / від рівня мінерального живлення на типових малогумусних чорноземах правобережного Лісостепу України. /Прийнята до друку/. Наукові праці УДАУ. Продуктивність с.г. культур у залежності від факторів урожайності в умовах Лісостепу і Полісся України. Київ, 1993.

7. Бондарь О.П., Саад М.Л., Шатурский Я.П., Холодова Ю.Д. Сравнительная характеристика спектрофотометрических методов определения эклистероидов. // Укр. биохим. журн. 1993, Т.65, № 3 /в печати/.

Мухомов А.С.


470616

Ab 26.996

Ab 26.996