

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

На правах рукописи

АХМЕД ИСМАИЛ

ФИТОСТЕРОИДЫ СЕРПУХИ НЕВООРУЖЕННОЙ (*SERRATULA INERMIS*)
И ИХ ВЛИЯНИЕ НА БИОСИНТЕЗ НУКЛЕОТИДОВ И НУКЛЕИНОВЫХ
КИСЛОТ В ТКАНЯХ ЦЫПЛЯТ С РАЗЛИЧНОЙ ОБЕСПЕЧЕННОСТЬЮ
ВИТАМИНОМ D₃

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



00373767 (X)

77.1
Робота виконана на кафедрі органічної хімії Українського державного університету і в відділі біохімії стериноїдів ім. А.В.Палладина АН України

Научний керівник: доктор біологічних наук,
професор КОЛОДОВА Ю.Д.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук ЧАЯЛО П.П.
доктор біологічних наук ЛЕВИЦКИЙ Б.Л.

Ведуща організація – Київський університет ім. Тараса Шевченка

Захист дисертації состоится "20" сентября 1993 г.
в 14 годин на засіданні спеціалізованого ради Д 016.07.01 по захисті дисертацій в Інституті біохімії ім. А.В.Палладина АН України (252030, г. Київ, ул. Лесютовича, 9).

С дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту біохімії АН України.

Автореферат розісланий "16" августа 1993 г.

Учений секретар спеціалізованого ради *Кирсенко* КИРСЕНКО О.В.

Актуальность темы. В последние годы во всем мире возрос интерес исследователей к фитостероидам, которые, являясь природными биологически активными соединениями, оказывают положительное воздействие на организм человека и животных.

Известно, что эрдистерон вызывает усиление синтеза РНК, белка и гликогена в печени, сердце и мышцах млекопитающих (анаболический эффект), стимулирует эритропоэз, обладает тонизирующими и адаптогенными свойствами. Кроме того, у теплокровных он обладает гепатопротекторной, гипогликемической, гиполипидемической, антиатеросклеротической, психотропной, антирадикальной, антиоксидантной и др. видами активности /Т.А.Громова и др., 1977; Ю.Д. Холодова, 1979, 1987; М.А.Ташмухамедова и др., 1986; А.А.Ахрем, Н.В.Ковганко, 1989; В.Н.Сыров, 1992/.

Способность стимулировать процессы биосинтеза белка и отсутствие выраженных побочных эффектов при применении эрдистерона /А.Г.Курмуков, В.Н.Сыров, 1980/ свидетельствуют о целесообразности изучения механизмов его действия с точки зрения использования в лечебной практике. Кроме того, эрдистерон представляет собой активный и ныне доступный препарат для изучения молекулярных основ гормонального действия, что становится актуальным ввиду открытия двухфазного характера механизма активации генов стероидными гормонами.

В течение последнего десятилетия основное внимание исследователей было уделено изучению анаболического эффекта эрдистерона, его адаптивных свойств. Препарат эрдистерона "эрдистен" нашел применение в клинической практике. В то же время исследованием конкретных молекулярных механизмов влияния эрдистерона на обмен веществ у теплокровных посвящены лишь единичные работы /Ireland R.C., Berger E.M., 1982; Katalou R.E. et al., 1982; Schenkel H. et al., 1983; Hiruma K. et al., 1990; Сыров, 1984/.

Многие эффекты эрдистерона на обмен веществ у теплокровных могут найти свое объяснение в свете известных молекулярных механизмов действия эрдистероидов на насекомых, освещенных в литературе /Koolman J., 1982; Ю.Д.Холодова, 1987; А.А.Ахрем, Н.В.Ковганко, 1989; Koolman J., 1990/. Так, адаптогенное действие

эктистерона – возможный результат индукции биосинтеза белков теплового шока или так называемых стрессорных белков и актина, психотропное действие – результат возможной индукции биосинтеза ацетилхолинэстеразы и т.д.

Известны две схемы механизма активации генов эктистероном у насекомых, в основу которых положены гипотеза Карлсона (прямое действие гормона на репрессоры генов) и гипотеза Крегера (опосредованное действие гормона на геном через одну из сигнальных (мессенджерных) систем клеток). Важным моментом во второй схеме является двухфазность действия стероидного гормона, причем вторичная активация генов требует для своего протекания биосинтеза белков, который запускает продукты первичных процессов.

Ранее было показано, что фитозктистероиды способны усиливать лечебный эффект витамина D_3 при лечении рахита /Ю.Д.Холодова, 1979/, в т.ч. самостоятельно индуцировать специфический витамин D-зависимый Ca^{2+} -связывающий белок. В то же время конкретные механизмы, способные запустить этот эффект эктистерона, остаются неясными.

Оценить значимость эктистерона при лечении рахита и его способность занять определенное место среди других известных препаратов – стимуляторов действия витамина D_3 – пока не представляется возможным из-за недостаточного количества исследований в данной области, особенно на уровне целостного организма.

Учитывая вышесказанное, изучение механизма действия эктистерона на биосинтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот клетки в условиях D-гиповитаминоза, т.е. недостаточности одного из регуляторов процессов пролиферации и дифференцировки клеток – $I, 25(OH)_2D_3$, весьма актуально.

Несомненно актуальной задачей современной биоорганической химии, биохимии и биотехнологии является также поиск доступного растительного сырья, содержащего эктистероиды, их химическая идентификация, отработка условий культивирования и сбора сырья, обеспечивающих максимальное содержание в нем этих ценных продуктов. Изучение состава эктистероидов и особенностей их накопления в растениях с последующим выделением может способствовать разработке новых лекарственных препаратов и выяснению роли и механизмов

действия эрдистероидов как фармакологически активных средств.

Проведенный до настоящего времени скрининг большого количества растений, в т.ч. произрастающих в Украине, показал, что концентрация эрдистероидов в них подвергается сезонным колебаниям и различна в различных органах растения. Довольно высокое содержание (1-2%) эрдистероидов обнаружено у произрастающих на территории Украины растениях рода *Serratula* (серпуха) - *S. heranthemoides*, *S. coronata* L., *S. inermis* Gilib. /Ю.Д.Холодова и др., 1979; И.А.Новосельская и др., 1981; Т.А.Ревина и др., 1986; К.Миладера и др., 1992; М.Л.Саад и др., 1992/.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось выделение и исследование химической природы эрдистероидов из серпухи невооруженной (*Serratula inermis* Gilib.), изучение их биологической активности и механизмов влияния на биосинтез нуклеиновых кислот при различной обеспеченности организма витамином Д₃. Кроме того, необходимо было установить оптимальные сроки сбора сырья с целью получения максимального содержания эрдистероидов для производства и исследования препаратов на их основе.

Для достижения намеченной цели были определены следующие задачи:

1. Выяснить особенности накопления эрдистерона в надземной части растений серпухи *S.inermis* в зависимости от типа органа и фазы развития растения.

2. Выделить в индивидуальном виде и с помощью физико-химических методов идентифицировать эрдистероиды из наиболее богатого ими органа *S.inermis*.

3. Изучить в хроническом опыте антирахитическую активность различных препаратов эрдистерона из *S. inermis* в организме птиц:

- а) как активаторов лечебного действия витамина Д₃,
- б) как самостоятельных антирахитических препаратов.

4. Исследовать особенности действия эрдистерона на биосинтез нуклеиновых кислот в ранней и поздней фазах его действия.

5. Определить у живорных с экспериментальным Д-гиповитаминозом ранние биохимические изменения, обеспечивающие антирахитический эффект эрдистерона:

- а) влияние эрдистерона на процесс всасывания кальция в тонком кишечнике;

- б) изменения в обмене нуклеиновых кислот и их предшественников — пуриновых и пиримидиновых нуклетидов в ^Нэритроцитах тонкого кишечника;
- в) изменения в белковом и липидном обмене в эритроцитах тонкого кишечника и сыворотке крови.

Научная новизна. Впервые описан полный состав экидистероидов *S.inermis*. Впервые изучены особенности обмена нуклеиновых кислот и их предшественников — пуриновых и пиримидиновых нуклетидов, а также оксипуринов в ранней и поздней фазе действия экидистерона у птиц. Изучен механизм гормонального действия (активации генов) экидистерона в организме птиц. Выявлены особенности раннего действия экидистерона на обмен веществ у птиц, определяющие его биологическое действие в условиях Д-типовитаминоза.

Показано, что в организме типокровных экидистерон действует по типу классического стероидного гормона, причем модуляция им геномных событий в ткани-мишени имеет двухфазный характер, что предполагает первоначальную активацию экидистероном одной из сигнальных (мессенджерных) систем клеток, предпочтительно — Са-чувствительной фосфолипидзависимой.

Обнаружена положительная корреляционная связь между экидистерон-индуцируемыми изменениями величины внутриклеточных пулов гуаниннуклетидов и мочевой кислоты, с одной стороны, и суммарной ДНК — с другой, что предполагает возможное участие указанных соединений в механизме регуляции экидистероном экспрессии генов.

Теоретическое значение и практическая ценность работы.

Из цветочных корзинок *S. inermis* изолировано и достоверно идентифицировано шесть экидистероидов — витикостерон В, 2-дезоксикэкидистерон, полиподин В, иктегристирон А, 26-оксикэкидистерон. Определен количественный состав экидистероидов и особенности накопления главного компонента — экидистерона — в наземной части растения. Показано, что *S.inermis* является эффективным продуцентом экидистероидов.

Изучена антирахитическая и адаптогенная активность экидистерона и препаратов на основе сырья *S. inermis*, БТИ-4 и БТИ-8Лв организме птиц.

Результаты исследований существенно дополняют сведения о механизмах действия экидистерона на метаболизм нуклеиновых кислот и их предшественников — пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов. Исследованные препараты — экидистерон, БТИ-4 и БТИ-8Л из *S.inermis* можно рекомендовать для комплексного лечения рахита в педиатрии и ветеринарии совместно с витамином D₃.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на Конференции профессорско-преподавательского состава Украинского государственного аграрного университета (Киев, 1991, 1992), IV Международном симпозиуме по анализу стероидов (Венгрия, 1991), научных семинарах отдела биохимии стероидов Института биохимии АН Украины (Киев, 1991, 1992), VI Украинском биохимическом съезде (Киев, 1992), научном семинаре Института биохимии им. А.В.Палладина АН Украины (Киев, 1993).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, изложенных в 6 главах, выводов и списка использованной литературы. Общий объем диссертации включает 151 страницу машинописного текста, 7 таблиц и 25 рисунков. Список литературы содержит 207 наименований.

Научные консультации проводили д.б.н., проф. Холодова Ю.Д. и к.б.н. Кошурба А.В.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выделение и идентификация экидистероидов *S.inermis*. В опытах использовали сердуху невооруженную (*Serratula inermis* Gilib.), которую взяли для размножения в старой природной дубрава дендрозаповедника "Александрия", а также дубового леса Томиловского лесничества.

Фенологические наблюдения за *S.inermis* и отбор проб для анализов экидистероидов проводили как в природных условиях (дубрава дендропарка "Александрия"), так и в условиях культуры (участок — маточник редких лекарственных растений дендропарка "Александрия").

Количественное определение экистерона в *S.inermis* осуществляли по методу Холодовой /1987/ с использованием реакции Чу-гаева.

Принадлежность выделенных индивидуальных компонентов к классу экистероидов и их идентификацию проводили с помощью физико-химических методов исследования: УФ-ИК-, ПМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, а также сравнением их подвижности при ТСХ с известными стандартами.

УФ-спектры записывали на спектрофотометре Spereord UV VIS, ИК-спектры - на UR-20, спектры ПМР - на приборе INM-4H-100 с рабочей частотой 200 МГц. Использовали растворители C_5D_5N , CD_3OD , в качестве внутреннего стандарта-тетраметилсилан.

Масс-спектры снимали на приборе MX-1303 с системой прямого ввода веществ в ионный источник.

Изучение биологической активности и механизмов действия экистерона и препаратов на его основе. Биологическую активность экистерона из *S. inermis*, а также гаденовых препаратов БТИ-4 и БТИ-8Л из этого сырья испытывали на цыплятах с экспериментальным Д-гиповитаминозом. Препараты использовали в качестве стимуляторов лечебного действия витамина D_3 , либо как самостоятельные антирахитические добавки к рахитогенной диете.

При изучении механизмов действия (ранняя и поздняя фазы действия 0-2 ч и 24-72 ч после однократного введения) использовали водно-спиртовые растворы кристаллического экистерона, выделенного и очищенного нами из цветочных корзинок *S.inermis*. Экистерон вводили цыплятам *per os* в количестве 10 мкг (10^{-8} М) на 100 г массы. Животных забивали через 30, 60 и 120 мин (экспериментальный Д-гиповитаминоз) или через 30, 60, 120 мин и 1, 2, 3 суток после введения экистерона (нормальные животные).

Скорость транспорта кальция в эритроцитах тонкого кишечника цыплят с Д-гиповитаминозом оценивали по интенсивности всасывания $^{45}CaCl_2$ (15 ТБк/моль) из просвета кишечника (введение за 10 мин до забоя в количестве 18,5 мБк на 100 г массы тела) при введении *per os* экистерона в дозе 10 мкг на 100 г за 10, 20, 30, 60, 120 и 180 мин до забоя.

Скорость биосинтеза нуклеиновых кислот оценивали на включению метки $I-^{14}C$ глицина (2100 ТБк/моль) (РНК и ДНК) или метил- 3H_2 тимидина (1570 ТБк/моль) (ДНК), которые вводили внутрибрюшинно за

10 мин (глицин) или за 30 мин (тимидин) до забоя. Оба предшественника вводили в количестве 1,85 МБк на 100 г массы тела.

Скорость биосинтеза *de novo* предшественников нуклеиновых кислот — пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, а также оксипуринов оценивали по включению метки $I-^{14}C$ глицина, определяли скорость биосинтеза не только нуклеотидных и белковых, но и липидных компонентов исследованных тканей.

Радиоактивность проб определяли на сцинтилляционном счетчике фирмы "Beckman" (США).

Кислоторастворимые пуриновые и пиримидиновые компоненты экстрагировали из гомогенатов тканей циплят 5%-ной охлажденной $HClO_4$ и затем гидролизovali 1 н. $HClO_4$ при $100^{\circ}C$ в течение 1 ч до пуриновых оснований и пиримидиновых монофосфатов. Раствор нейтрализовали KOH для удаления хлорной кислоты, и продукты гидролиза разделяли ионообменной хроматографией на катионообменнике Дауэко 50x4 ("Serva", Германия) (H^+ -форма, 200-400 меш, колонка 8x1 см), используя градиентное элжирование: водой (УМР, мочева кислота), 0,2 н. $HClO_4$ (СМР, ксантин), 0,4 н. $HClO_4$ (гипоксантин), 1 н. $HClO_4$ (гуанин) и 2 н. $HClO_4$ (аденин). При необходимости фракции, содержащие пиримидиновые нуклеотиды и мочева кислота, рехроматографировали на анионообменнике Дауэко 1x8 ("Serva", Германия), (Cl^- -форма, 200-400 меш, колонка 12x1,2 см), используя градиентное элжирование формиатом аммония /Kammen, Hurlbert, 1959/.

Пиримидиновые монофосфаты, пуриновые основания и оксипурины идентифицировали по хроматографической подвижности на ионообменниках соответствующих стандартов (аденин и гуанин — фирмы "Calbiochem", США; гипоксантин, ксантин, УМР и СМР — "Reanal", Венгрия; мочева кислота — "Реахим", Украина), а также путем анализа спектров поглощения в области 200-300 нм.

Количество пуриновых оснований и пиримидиновых монофосфатов определяли, используя известные коэффициенты молярной экстинкции. Сканирование спектров проводили на спектрофотометре Speccord UV VIS (Германия).

Фракции суммарной РНК и суммарной ДНК выделяли из осадков гомогенатов тканей по методу Шмидта и Тангаузера после отделения фракции свободных нуклеотидов /Pilbakesity, Karasek, 1970/. Коли-

чество ДНК и РНК определяли спектрофотометрически /Спирин, 1968/.

Липиды из тканей экстрагировали хлороформ-метанолом по Фольчу.

В сыворотке крови определяли мочевую кислоту спектрофотометрически после разделения кислоторастворимой фракции на катионообменнике, общий белок (по Лоури), содержание Са, Рi и холестерина, — с помощью стандартных наборов фирмы "Chemapol" (Чехо-Словакия).

Проводили корреляционный анализ и статистическую обработку экспериментальных данных /Лакин, 1980/.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В последние годы в Институте биохимии им. А. В. Палладина АН Украины (г. Киев) в Институте химии растительных веществ АН Узбекистана (г. Ташкент), в ряде научных учреждений АН Беларуси установлено, что экидистероиды проявляют различные виды биологической активности в организме животных и человека.

Возникла потребность в поисках источников растительного сырья с высоким содержанием экидистероидов, разработке методов их идентификации, выделения и количественного определения. На базе отдела биохимии старинов Института биохимии АН Украины и кафедры биоорганической химии Украинского аграрного университета проведен скрининг большого числа растений Украины и разработаны химические и биологические методы их тестирования /Холодова, 1976, 1979; Ахмед и соавт., 1991; Миладера и соавт., 1992; Саад и соавт., 1992/.

Нами изучены биологические особенности одного из растений рода *Serratula* — *S. inermis* Gilib., динамика накопления мажорного компонента — экидистерона в различных органах растения в зависимости от фазы его развития, определены сроки сбора сырья для получения максимального выхода экидистерона.

S. inermis введена в производственную культуру в Дендрозаповеднике "Александрия" (г. Белая Церковь). Там же созданы производственные участки с целью получения сырья для выделения фитоэкидистероидов.

Мы показали, что содержание экидистерона было максимальным

в цветных корзинках дикорастущей *S.inermis* в фазе цветения (1,58-1,84%) и несколько меньше в фазе бутонизации (1,29-1,44%). В листьях оно составляло 0,18% и 0,22% соответственно.

При культивировании в полевых условиях содержание экидестерола в цветочных корзинках снижалось до 1,10%. Однако в последнем случае отмечалось значительное увеличение урожайности растения: так, трехлетний куст в культуре имел в среднем 7000 корзинок, в то время, как в природных условиях - всего лишь 50-60. По нашим расчетам содержание экидестерона в культивируемом растении на 3-ий год вегетации может составить до 200 кг с 1 га, что позволяет отнести культуру *S.inermis* к достаточно перспективным источникам этого ценного стероида.

Выделение и идентификация индивидуальных фитостероидов *S.inermis*. Используя метод колоночной хроматографии, мы выделили из цветочных корзинок *S.inermis* 6 экидестероидов (I-VI) и установили их структуру с помощью УФ-, ИК-, ПМР-спектроскопии и масс-спектрометрии (рис. 1).

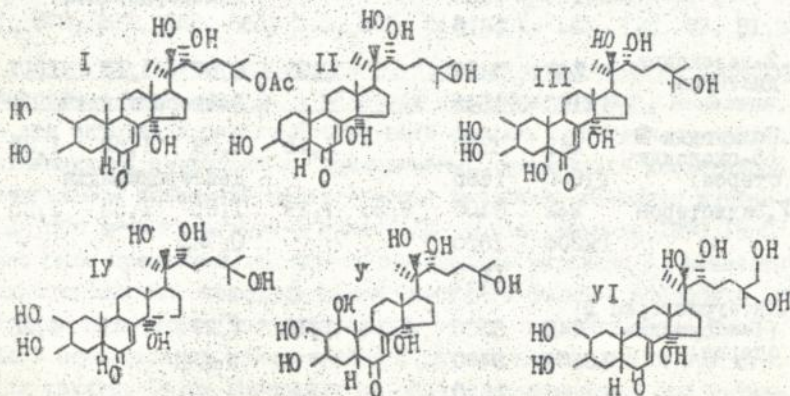


Рис. 1. Структурные формулы экидестероидов *S.inermis*.

I - витикостерон В (25-ацетат экидестерона) $C_{29}H_{46}O_8$,
 II - 2-дезоксизэкидестерон $C_{27}H_{44}O_6$, III - полиподин В (5-оксизэкидестерон) $C_{27}H_{44}O_8$, IV - экидестерон $C_{27}H_{44}O_7$, V - интетристерон А (1-оксизэкидестерон) $C_{27}H_{44}O_8$, VI - 26-оксизэкидестерон $C_{27}H_{44}O_8$.

Из очищенного метанольного извлечения сухих соцветий *S. inermis* путем хроматографии на окиси алюминия, элируя колонку системой хлороформ-метанол возрастающей полярности (0-10% метанола), выделили соединения I, затем II, III и IV. Их принадлежность к классу экистероидов подтверждается УФ- и ИК-спектрами, характером масс- и ПМР-спектров, а также сравнением на ТСХ с известными стандартами. Эти вещества идентифицированы как витикостерон В, 2-дезоксизкистерон, полиподин В и экистерон. Их характеристики представлены в табл. I.

I. Спектральные характеристики идентифицированных экистероидов соцветий *S. inermis*

Экистероиды	УФ-спектр, λ_{max} , нм	ИК-спектр, ν , см ⁻¹ , КВ ₂	ПМР-спектр, δ , м.д.				
			C ₇ -H	C ₁₈ -Me	C ₁₉ -Me	C ₂₁ -Me	C _{26/27} -Me
I. Витикостерон В (25-ацетат экистерона)	243 11100	1720 1650 1615		1,20	1,07	1,60	1,45
					Дейтеропиридин		
II. 2-дезоксизкистерон	243 12100	3450 1645		0,93	0,87	1,17	1,17
					Дейтеропиридин		
III. Полиподин В (5-оксизкистерон)	243 11600	3340 1685		1,15	1,09	1,52	1,35
					Дейтеропиридин		
IV. Экистерон	242 12200	3400 1650 1610	6,20	1,19	1,05	1,55	1,35
					C ₅ D ₅ N		
V. Интегристерон А (1-оксизкистерон)	245 10600	3350 3480 1670	6,14	1,10	1,29	1,45	1,25
					C ₅ D ₅ N		
VI. 26-оксизкистерон	245 10200	3430 1655		1,21	1,07	1,58	1,48
					Дейтеропиридин		

Путем хроматографии экстракта соцветий на силикагеле при элировании смесью растворителей хлороформ-метанол-вода

(60:32:6) выделили вещество V и в более полярной системе - вещество VI, которые на основании изученных УФ-, ИК-, ПМР- и масс-спектров идентифицировали с I-оксиэктистероном, найденным нами ранее в цветочных корзинках *S.xeranthemoides* /Холодова и соавт., 1976/, и 26-оксиэктистероном - одним из распространенных метаболитов в половой системе насекомых (Rimpler, 1969/. Соотношение метаболитов в цветочных корзинках 0,025:0,05:1:100:1:0,25.

Полоса поглощения сопряженного кетона в ИК-спектре проявляется в области 1640-1670 см^{-1} , полоса поглощения гидроксильной группы - 3300-3480 см^{-1} . В полипептиде В присутствие 5-оксигруппы рядом с 6-кетогруппой сдвигает полосу ее поглощения на 30 см^{-1} (1685 см^{-1}). В витикостероне Е полоса 1720 см^{-1} свидетельствует о наличии эфирной группировки.

Масс-спектры имеют пики молекулярного иона M^+ в I - M^+ ди-ацетонида при m/e 602, II - M при m/e 464, III, IV и VI - при m/e 496. Для эктистерона (IV) и I-оксиэктистерона (V) приводим фрагментацию: IV - 462, 444, 426, 411, 408, 363, 345, 344, 328, 327, 309, 301, 300, 125, 99, 81, 69; V - 478, 460, 442, 424, 409, 391, 379, 374, 368, 361, 343, 325, 316, 301, 143, 125, 99, 81, 69.

Изучение эффективности препаратов эктистероидов из *S.inermis* совместно с витамином D₃ в условиях D-гиповитаминоза. Известно, что при активации белоксинтезирующей системы экзогенными предшественниками пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов достигалось значительное повышение эффективности лечебного действия витамина D₃ при лечении рахита у цыплят /Копруба, Кокунин, 1979, 1980/. Можно было предположить, что использование витамина D₃ совместно с эктистероидами, стимулирующими биосинтез белка и абсорбцию Ca^{2+} в тонком кишечнике /Холодова, 1979/, будет способствовать быстрой нормализации минерального и других видов обмена при лечении рахита. опыты проводили на обычно используемой при изучении рахита модели - экспериментальном D-гиповитаминозе у цыплят. В течение 30 дней, начиная с однодневного возраста, цыплята всех групп содержались на рахитогенной диете (группа 0, рахит). Животные подопытных групп ежедневно дополнительно получали препараты на основе эктистероидов из *S.inermis* - 10 мкг эктистерона (группа 2), 100 мкг галенового препарата БТИ-4 (группа 3), 100 мкг

галенового препарата БТИ-8Л, содержащего сумму эрдистероидов и липиды (группа 4) или 100 мкг липосомальной формы препарата БТИ-8Л (группа 5). Часть животных из каждой группы в течение 10 дней, начиная с 20 дня опыта, получали ежедневно лечебную дозу витамина Д₃ (40 МЕ). Препараты эрдистерона и витамин Д₃ вводили пер ос. За норму служили животные, с первого дня опыта ежедневно получавшие физиологические дозы (13 МЕ) витамина Д₃.

Данные, представленные на рис. 2, 3, свидетельствуют о положительном действии исследуемых препаратов на белоксинтезирующую систему в эритроцитах тонкого кишечника цыплят (ткань - мясьень действия витамина Д₃) при лечении рахита. Максимальное стимулирующее действие наблюдали в группах 3 (БТИ-4) и 5 (БТИ-8Л, липосомальная форма). Об этом свидетельствуют также данные табл. 2, в которой представлены биохимические показатели сыворотки крови цыплят с Д-гиповитаминозом, получавших лечебные дозы витамина Д₃.

Как уже отмечалось выше, именно изменения в белковом обмене рассматриваются как решающие для нормализации минерального гомеостаза при лечении рахита. Общепринято для тестирования обеспеченности витамином Д определять уровни Са и Рі в сыворотке крови. Мы ввели дополнительные показатели - уровни мочевой кислоты, холестерина и тимоловую пробу, которые, как показывают данные табл. 2, достоверно отражают состояние экспериментальных животных, коррелируя с изменениями уровней Са и Рі.

Гипохолестеринемическое действие эрдистерона было установлено Холодовой и сотр. /Миронова и соавт., 1982/. Что касается показателней белкового обмена - уровней мочевой кислоты - конечного продукта деградации белкового азота у птиц и тимоловой пробы, - то они могут быть рекомендованы как хорошие дополнительные тесты для определения статуса витамина Д в организме. Данные табл. 2 указывают на существенную нормализацию минерального, белкового и липидного обменов в течение 10-дневного курса лечения птиц с Д-гиповитаминозом "минимальной" лечебной дозой витамина Д₃ (40МЕ) совместно с препаратами БТИ-4 (гр. 3) и БТИ-8Л, липосомальная форма (гр. 5). В других группах - эрдистерон (гр. 2), БТИ-8Л (гр. 4) действие препаратов менее выражено.

Отметим, что в отсутствие витамина Д₃ использование препара-

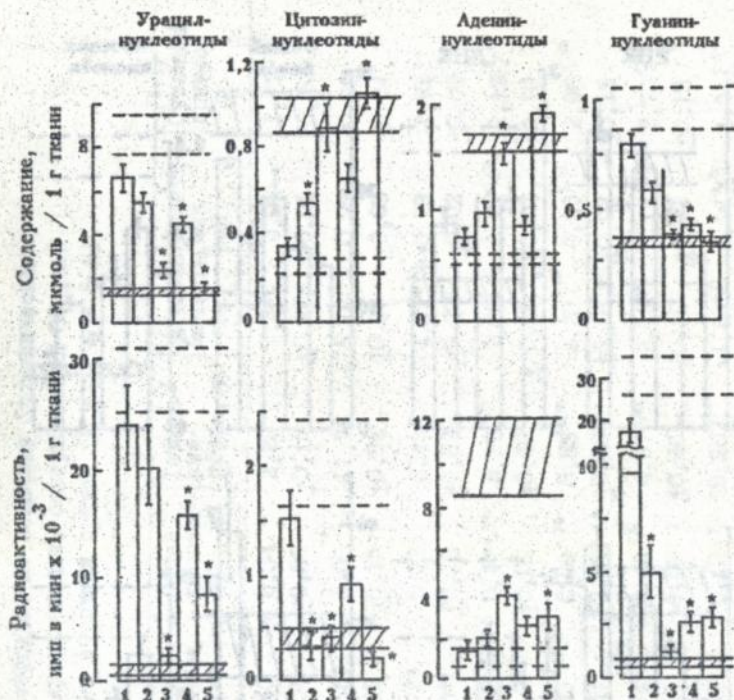


Рис. 2. Влияние препаратов экидистероидов из *S.inermis* на величину внутриклеточных пулов (зверху) и скорость биосинтеза нуклеотидов по пути *de novo* (включение метки I-¹⁴C глицина, t = 10 мин, внизу) в энтероцитах тонкого кишечника цыплят в процессе лечения рахита.

Заштриховано - уровень нормы, незаштриховано - уровень Д-гиповитаминоза (рахит).

1 - контроль (рахитогенная диета (РД) + 40 МЕ Д₃), 2 - РД + 40 МЕ Д₃ + 10 мкг экидистерона, 3 - РД + 40 МЕ Д₃ + 100 мкг БТИ-4, 4 - РД + 40 МЕ Д₃ + 100 мкг БТИ-8Л, 5 - РД + 40 МЕ Д₃ + 100 мкг БТИ-8Л (липоосмальная форма).

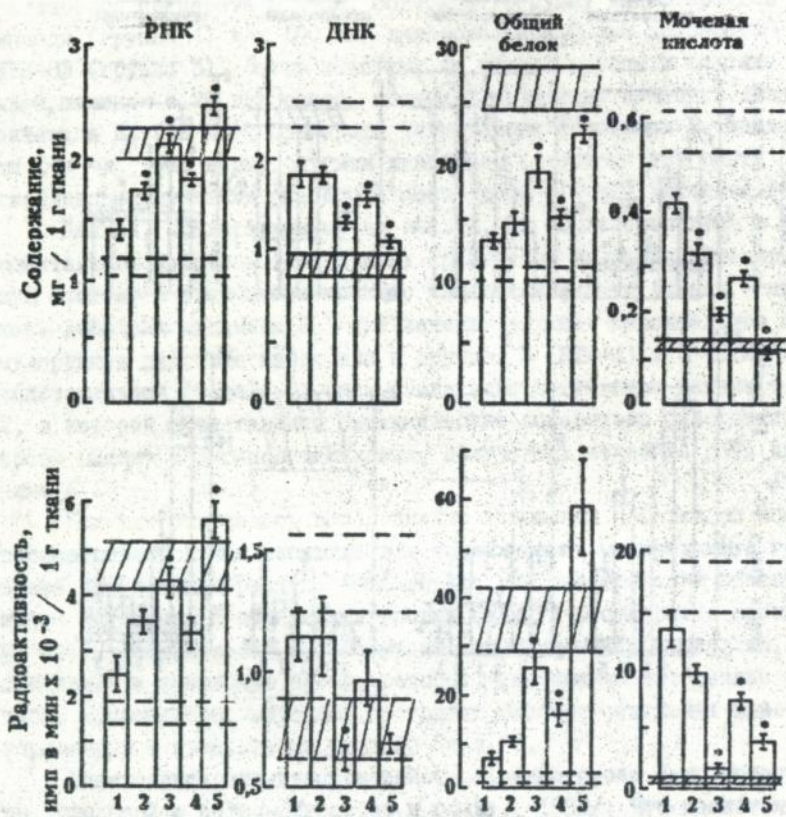


Рис. 3. Влияние препаратов экидистероидов из *S.inermis* на величину внутриклеточных пулов (вверху) и скорость биосинтеза (включение метки I-¹⁴C глицина, t = 10 мин, внизу) нуклеиновых кислот, белков и липидов в этероцитах тонкого кишечника цыплят в процессе лечения ракета. Обозначения см. рис. 2.

2. Влияние препаратов экистероидов на величину биохимических показателей в сыворотке крови цыплят, содержащихся 30 дней на рахитогенной диете, и их суточный привес ($M \pm m$, $n = 5-8$)

Группа и условия опыта	Ca, мм	Pi, мм	Общий белок, мг/мл	Общие липиды, мг/мл	Общий холестерин, мм	Тимоловые пробы, ед.	Мочевая кислота, мм	Креатинин, мм	Суточный привес, г
Норма	2,82 $\pm 0,17$	4,58 $\pm 0,32$	22,73 $\pm 1,20$	8,50 $\pm 0,54$	0,34 $\pm 0,06$	2,28 $\pm 0,18$	1,46 $\pm 0,21$	0,08 $\pm 0,01$	1,77 $\pm 0,06$
0. Рахит	1,13 $\pm 0,12$	1,14 $\pm 0,14$	9,55 $\pm 1,52$	3,65 $\pm 0,32$	1,08 $\pm 0,15$	11,76 $\pm 0,92$	5,18 $\pm 0,39$	0,33 $\pm 0,03$	0,80 $\pm 0,04$
I. Контроль	1,43 ^x $\pm 0,12$	1,28 $\pm 0,14$	11,33 $\pm 1,43$	4,72 ^x $\pm 0,32$	0,79 $\pm 0,15$	8,49 ^x $\pm 0,82$	4,31 ^x $\pm 0,27$	0,29 $\pm 0,02$	1,92 ^x $\pm 0,08$
2.+ экистерон	1,74 ^x $\pm 0,19$	1,33 $\pm 0,09$	14,05 ^x $\pm 1,38$	4,60 $\pm 0,77$	0,47 ^{x,xx} $\pm 0,06$	5,18 ^{x,xx} $\pm 0,48$	2,38 ^{x,xx} $\pm 0,15$	0,23 ^{x,xx} $\pm 0,02$	2,32 ^{x,xx} $\pm 0,10$
3.+ БТИ-4	2,20 ^{x,xx} $\pm 0,06$	1,85 ^{x,xx} $\pm 0,07$	14,96 ^x $\pm 2,29$	7,95 ^{x,xx} $\pm 0,59$	0,39 ^{x,xx} $\pm 0,06$	3,83 ^{x,xx} $\pm 0,40$	2,23 ^{x,xx} $\pm 0,16$	0,20 ^{x,xx} $\pm 0,02$	2,98 ^{x,xx} $\pm 0,15$
4.+ БТИ-8Л	1,72 ^{x,xx} $\pm 0,06$	1,40 $\pm 0,28$	14,0 $\pm 1,51$	6,34 ^{x,xx} $\pm 0,33$	0,46 ^{x,xx} $\pm 0,07$	4,97 ^{x,xx} $\pm 0,46$	2,15 ^{x,xx} $\pm 0,16$	0,19 ^{x,xx} $\pm 0,02$	2,70 ^{x,xx} $\pm 0,13$
5.+ БТИ-8Л, липосомы	2,35 ^{x,xx} $\pm 0,09$	1,74 ^{x,xx} $\pm 0,04$	16,23 ^{x,xx} $\pm 1,39$	8,38 ^{x,xx} $\pm 0,94$	0,42 ^{x,xx} $\pm 0,06$	3,20 ^{x,xx} $\pm 0,28$	1,66 ^{x,xx} $\pm 0,15$	0,16 ^{x,xx} $\pm 0,01$	4,04 ^{x,xx} $\pm 0,18$

^x - $p < 0,05$ по отношению к значению при рахите

^{xx} - $p < 0,05$ по отношению к значению в контроле (группа I).

тов также приводило к улучшению биохимических показателей сывотки крови цыплят с Д-гиповитаминозом, ускоренного их роста и выживаемости, однако эти адаптогенные эффекты не приводили к значительной нормализации исследуемых показателей. Наиболее эффективными были препараты БТИ-4 и БТИ-3Д в форме липосом.

Обращает на себя внимание нормализация процесса деградации белкового азота - синтеза мочевой кислоты и ее выделение из тканей в кровяное русло для последующей экскреции из организма. Ранее было показано, что синтез мочевой кислоты тесно взаимосвязан с синтезом гуаниновых нуклеотидов по пути *de novo* /Кокунин и состр., 1987, 1988/. Гуаниновые нуклеотиды являются ключевыми регуляторами белоксинтезирующей системы, они также значительно усиливают антирахитическое действие витамина D_3 /Кошуруба, Кокунин, 1979, 1980/.

Нами установлены синхронные изменения величины пулов гуаниннуклеотидов (рис. 2) и суммарной ДНК (рис. 3) ($r_{ДНК-G} = 0,778$, $r < 0,05$, $n = 7$). Наличие достоверной положительной связи между изменениями пулов гуаниннуклеотидов и ДНК указывает на то, что одним из механизмов усиления препаратами эрдистероидов лечебного действия витамина D_3 может быть торможение биосинтеза гуаниннуклеотидов.

Существует мнение /Спиричев, Конь, 1989/, что основным результатом воздействия недостаточности витамина Д на организм животных и человека является блокирование дифференцировки (синтеза РНК) в быстропролиферирующих энтероцитах тонкого кишечника. Наши данные полностью согласуются с данной концепцией. Действительно, при рахите имеет место, с одной стороны, снижение суммарных пулов РНК, с другой - увеличение суммарных пулов ДНК по отношению к их уровням в норме (рис. 3). В процессе лечения рахита пулы РНК увеличиваются, а ДНК, наоборот, уменьшаются, что подтверждает выдвинутую концепцию о механизме действия витамина D_3 . В свою очередь, эрдистерон, являясь структурно близким к гидроксильрованным активным формам витамина D_3 , усиливает лечебный эффект витамина, очевидно, за счет влияния как на уровне генома, так и регуляции биосинтеза гуаниннуклеотидов: есть литературные данные о прямом участии гуаниннуклеотидов в регуляции биосинтеза ДНК /Nguyen, Sadee, 1986; Daan, Sadee, 1988/.

Данные о включении метки I-¹⁴C глицина в суммарные пулы нуклеотидов кислоторастворимой фракции (рис. 2) и в пулы суммарных нуклеиновых кислот (рис. 3) подтверждают концепцию о роли гуаниннуклеотидов в регуляции биосинтеза ДНК. Использование кратковременной экспозиции метки (10 минут) позволяет уверенно говорить о том, что при рахите в энтероцитах тонкого кишечника скорости биосинтеза и ДНК, и гуаниннуклеотидов выше уровней нормы и в процессе лечения снижаются, причем в подготовленных группах нормализация была выше контрольной с максимальным эффектом в группе 3, где для лечения рахита использовали витамин D₃ совместно с препаратом БТИ-4.

При рахите уровни мочевой кислоты в сыворотке крови повышены и снижаются в процессе лечения (табл. 2). Наблюдаемые нами изменения уровней мочевой кислоты в энтероцитах (рис. 3) коррелируют с изменениями в биосинтезе гуаниннуклеотидов (рис. 2). Коэффициент корреляции Σ UA-G составил 0,855 ($p < 0,01$), а Σ ДНК-UA - 0,826 ($p < 0,01$), что свидетельствует о тесном сопряжении не только биосинтеза мочевой кислоты и гуаниннуклеотидов, но и мочевой кислоты и ДНК, указывая на возможность участия мочевой кислоты в регуляции биосинтеза ДНК. В последние годы появилось несколько работ о возможном участии мочевой кислоты в регуляции пролиферативных процессов, в частности при различных патологических состояниях, в т.ч. и раке /Gadiparthi et al., 1991; Stirpe et al., 1991/.

Суммируя результаты проведенных исследований, можно констатировать, что препараты эрдистерона, особенно БТИ-4 и БТИ-ЭЛ в форме липосом, обладают большой эффективностью при их совместном использовании с витамином D₃ для лечения рахита, нормализуя не только нуклеотидный обмен, но также белковый и липидный.

Изучение биохимических механизмов действия эрдистерона в организме птиц в условиях D-гиповитаминоза. Как было показано выше, препараты эрдистероидов S.inermis - эрдистерон, БТИ-4, БТИ-ЭЛ и его липосомальная форма обладают способностью усилить антирахитическое действие витамина D₃, а также задерживать развитие патологии при его отсутствии, т.е. частично обладают антирахитическими свойствами. Возможной причиной такого физиологиче-

окого действия на теплокровных стероидов растительного происхождения является то обстоятельство, что экистероиды и активные гидроксилированные формы, например, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ витамина D_3 структурно близки друг к другу и синтезируются как в организме теплокровных (витамин D), так и в растениях и насекомых (экистероиды) из общего предшественника — 7-дегидрохолестерина /Ахрем, Ковганко, 1989/, предшественника холестерина на пути синтеза *de novo*.

Обнаружен целый ряд гормонзависимых процессов, например, фосфорилирование — дефосфорилирование, замедленный синтез кортизолного рецептора и др. /Сергеев, Шимановский, 1987/, представляющих собой быстрый ответ клеток на стероидные гормоны. На основе полученных данных высказано предположение, что механизм действия стероидных гормонов осуществляется по меньшей мере двумя путями: 1) модуляцией существующего регуляторного механизма в клетке на уровне трансляции и посттрансляции (фосфорилирование — дефосфорилирование) и других модификаций (ацетилирование, метилирование), зависящих от активации рецептора; 2) индуцированными процессами, зависящими от активации гена, а именно, синтезом РНК и специфических белков, что обуславливает последующие ответы на эти процессы (экспрессия гена).

Сформулирована концепция о гормональном характере физиологического действия активных метаболитов витамина D_3 /Бауман, 1989/, структурно близких экистероидам, т.е. доказано наличие второго (геномного) пути в механизме антирахиического действия витамина D_3 . Что касается первого, т.е. ранней фазы действия, то на ее наличие в механизме антирахиического действия витамина D_3 впервые было указано на основании данных о стимуляции всасывания ^{45}Ca из просвета кишечника /Копруба, Кокунян, 1979, 1980/.

Мы исследовали ранний ответ энтероцитов тонкого кишечника животных с D -гиповитаминозом на введение гормональных количеств (10^{-8} М) экистерона.

Опыты проводили на петушках, которых с однодневного возраста в течение четырех недель содержали на стандартной рахиотенной диете. Таким животным однократно *per os* вводили водный раствор экистерона (10 мкг/100 г массы тела). Через 30, 60 и 120 мин после введения животных забивали и собирали слизистую

тонкого кишечника. Скорость биосинтеза нуклеиновых кислот, их предшественников — пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, мочевой кислоты, а также общего белка определяли по включению метки I-¹⁴C глицина (экспозиция 10 мин).

Всасывание кальция из просвета кишечника оценивали по радиоактивности сыворотки крови после введения *per os* ⁴⁵CaCl₂.

Как видно из рис. 4, уже в интервале 1-3 ч после введения эрдистерон активирует процесс транслокации ⁴⁵CaCl₂ из просвета кишечника в кровяное русло (максимум через 2 ч после введения). Это совпадает по времени с наблюдаемой ранее /Копоруба, Кокунин, 1979, 1980/ активацией всасывания кальция после введения 500 МЕ (12,5 мкг) витамина D₃ пыллетам с экспериментальным D-гиповитаминозом. Причем, в последнем случае активация всасывания Ca (ранняя фаза действия витамина D₃) предшествовала во времени индукции специфического витамин D-зависимого Ca²⁺-связывающего белка (поздняя фаза действия или эффект витамина D₃ на уровне генома), т.е. эффект витамина D₃ имел двухфазный характер.

На рис. 5 представлена динамика изменения внутриклеточных пулов суммарных пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов и скорость их биосинтеза по пути *de novo*. Увеличенный в условиях D-гиповитаминоза пул суммарных урацилнуклеотидов очень быстро нормализуется уже в течение 30 мин после введения эрдистерона (кр. I), возможно, за счет "перекачки" УТР в СТР в СТР-синтезной реакции, поскольку величина пула суммарных цитозиннуклеотидов в течение первого часа после введения эрдистерона резко увеличивается (кр. 2). Таким образом, одним из ранних ответов энтероцитов тонкого кишечника на введение гормональных количеств эрдистерона может быть активация фермента СТР-синтазы, катализирующего единственный путь превращения урацилнуклеотидов в цитозиннуклеотиды. В свою очередь, увеличение пулов цитозиннуклеотидов в период гормонального ответа может положительно сказаться как на синтезе РНК (суммарная РНК энтероцитов на 90% состоит из рРНК GC-типа), так и на синтезе липидов, особенно фосфолипидов, структурных компонентов мембран энтероцитов. Из литературы известно, что нормализация липидного обмена является важным звеном в механизме антирахиитического действия витамина D₃ /Бауман, 1989/. Не исключено, что эрдистерон, активируя синтез СТР, тем самым нормализует и

биосинтез фосфолипидов. В литературе данные о таком действии гормональных доз экдистерона отсутствуют. Что касается фармакологических доз, то показано, что при их хроническом введении наблюдается усиление биосинтеза *de novo* фосфолипидов в сердечной и скелетной мышцах крыс /Всенбаева, 1991/.

Как видно из рис. 5, после введения экдистерона резко снижается скорость включения метки I-¹⁴C глицина в пулы как урацил- (кр. 5), так и цитозиннуклеотидов (кр. 6). Эти данные указывают на то, что после введения экдистерона снижается биосинтез УТР по пути *de novo*, отсюда же и низкая радиоактивность пула цитозиннуклеотидов. Увеличение пула цитозиннуклеотидов (кр. 2), в таком случае, может быть обеспечено только за счет интенсификации превращения в СТР ранее образованного УТР, величина пула которого (кр. 1) в условиях Д-гиповитаминоза значительно выше уровня нормы.

В условиях Д-гиповитаминоза (0 время) внутриклеточные пулы адениннуклеотидов ниже уровня нормы и резко увеличиваются в интервале 30-60 мин после введения экдистерона (рис. 5, кр. 3). В отличие от адениннуклеотидов, пул гуаниннуклеотидов в энтеропитах в условиях Д-гиповитаминоза выше уровня нормы, и в ответ на введение экдистерона величина его резко уменьшается в первые 60 минут после введения. Ранее мы показывали (рис. 2) снижение уровней гуаниннуклеотидов у цыплят, получавших фармакологические дозы препаратов экдистерона совместно с витамином D₃ в процессе лечения рахита. Учитывая это обстоятельство, увеличение пула цитозиннуклеотидов однозначно можно отнести только за счет *de novo* биосинтеза СТР из ранее образованного УТР (учитывая снижение пулов гуаниннуклеотидов, отпадает вариант реутилизации, т.е. увеличение пула цитозиннуклеотидов за счет деградации суммарной РНК GC-типа).

Данные по включению метки I-¹⁴C глицина в пулы пуриновых нуклеотидов указывают на то, что после введения экдистерона резко увеличивается *de novo* синтез адениннуклеотидов (кр. 7) из нециклических предшественников и, наоборот, резко снижается *de novo* синтез гуаниннуклеотидов (кр. 8). Последнее возможно только в случае блокирования пуринового шунта (AMP ← IMP → GMP) на уровне превращения IMP в XMP (IMP-дегидрогеназа), или XMP в GMP (GMP-синтетаза).

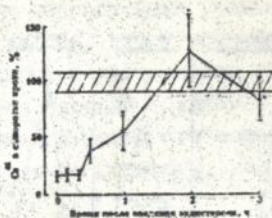


Рис. 4. Динамика изменения скорости всасывания $^{45}\text{CaCl}_2$ из просвета тонкого кишечника цыплят с Д-гиповитаминозом (0 время) после однократного введения эктистерона (норма = 100%).

Тесная корреляция гуаниннуклеотиды — ДНК, обнаруженная нами у животных в процессе лечения рахита, предполагает в раннем ответе на введение эктистерона снижение уровней ДНК, что мы и наблюдали (рис. 6, кр.2). Значительное уменьшение радиоактивности суммарной ДНК (рис. 6, кр.6) предполагает возможное торможение ее биосинтеза (репликации) при введении эктистерона Д-гиповитаминозным животным.

В отличие от ДНК, при введении эктистерона имеет место быстрая нормализация внутриклеточного пула суммарной РНК (рис. 6, кр.1), которая может быть обусловлена возможной активацией ее биосинтеза, о чем свидетельствует интенсивное включение метки $^1\text{-}^{14}\text{C}$ глицина (рис. 6, кр.5). Таким образом, уже в интервале 0–60 мин после введения эктистерона животным с Д-гиповитаминозом мы наблюдали быстрые изменения на уровне генома энтероцитов тонкого кишечника, что предполагает возможную активацию трансляции. На это же указывает динамика изменения скорости биосинтеза белка (рис. 6, кр. 7).

В условиях Д-гиповитаминоза в энтероцитах накапливается большое количество мочевой кислоты (рис. 6, кр.4), которое достоверно снижается уже через 30 мин после введения эктистерона, причем к 60 мин наступает его полная нормализация. Столь быстрое и значительное снижение величины внутриклеточного пула мочевой кислоты может быть обусловлено торможением ее биосинтеза *de novo* (рис. 6, кр. 8).

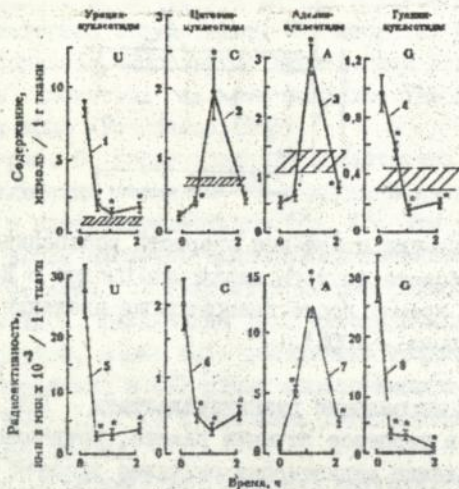


Рис. 5. Динамика изменения внутриклеточных пулов и скорости биосинтеза по пути *de novo* пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в энтероцитах цыплят с Д-гиповитаминозом после введения экдистерона.

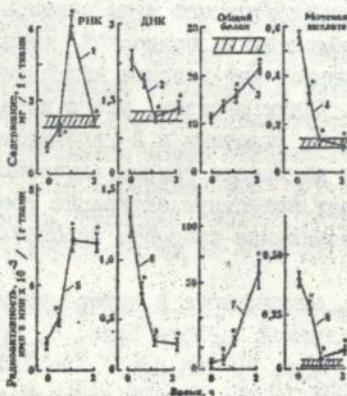


Рис. 6. Динамика изменения внутриклеточных пулов и скорости биосинтеза нуклеиновых кислот, общего белка и мочевой кислоты в энтероцитах тонкого кишечника цыплят с Д-гиповитаминозом после однократного введения экдистерона.

Это может приводить к нормализации уровня мочевой кислоты в сыворотке крови. Если учесть, что у птиц биосинтез мочевой кислоты является самостоятельным и чрезвычайно важным метаболическим путем, регулирующим весь азотный (белковый, нуклеотидный) метаболизм, становится ясной физиологическая роль эрдистерона у теплокровных как одного из гормонов, регулирующих азотный метаболизм.

Наличие столь существенных ранних изменений в сторону их нормализации в обмене нуклеиновых кислот и их предшественников, а также белков и мочевой кислоты в первые 0-60 мин. после введения эрдистерона животным с экспериментальным Д-гиповитаминозом свидетельствует, что между витамином Д₃ и эрдистероном имеет место функциональное сходство, и эрдистерон частично дублирует действие витамина Д₃ в организме птиц.

Как указывалось выше, именно индуцирование процессов, зависящих от активации гена, т.е. синтеза РНК и специфических белков, характеризует классический путь воздействия на клетку-мишень стероидного гормона (экспрессия гена). Как видно из представленных выше данных, эрдистерон в организме теплокровных действует по типу классического стероидного гормона, сходному с действием антирахитического витамина Д₃.

Изучение механизмов гормонального действия эрдистерона в организме птиц с нормальной обеспеченностью витамином Д. В настоящем разделе мы приводим доказательства высокой биологической активности эрдистерона в отношении модуляции биосинтеза нуклеиновых кислот и их предшественников в организме нормальных животных (ткани печени, слизистой тонкого кишечника, селезенки и поджелудочной железы). Активность эрдистерона проявляется как в ранней фазе действия (0-2 ч), аналогично таковой у животных с недостаточностью витамина Д, так и в поздней фазе (24-72 ч), т.е. имеет четкий двухфазный характер, что соответствует современным воззрениям на механизмы действия классических стероидных гормонов.

На рис. 7 представлена динамика изменения суммарных пулов (мкмоль на 1 г ткани) пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов кислоторастворимой фракции и оксипуринов на примере энтероцитов цыплят после однократного введения гормональной дозы (10^{-8} М)

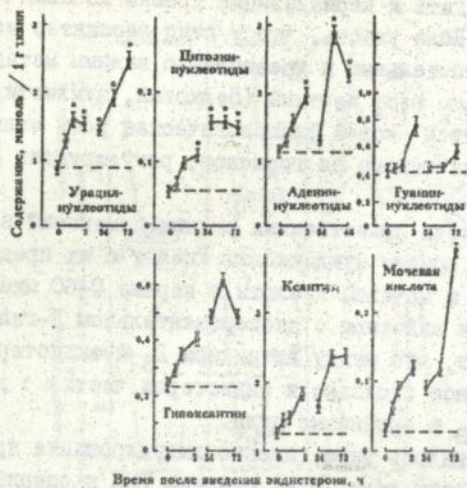


Рис. 7. Динамика изменения внутриклеточных пулов пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов и оксипуринов в энтероцитах цыплят после введения эдистерона.

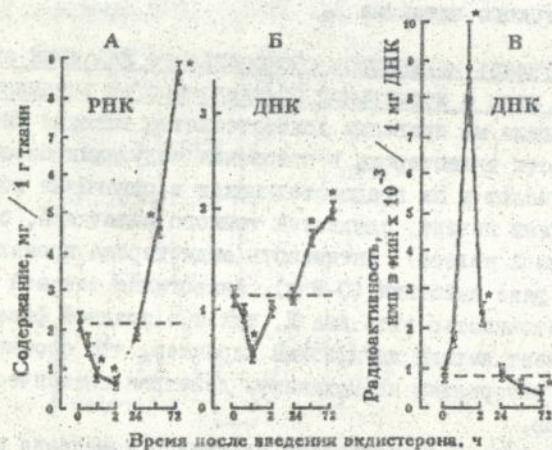


Рис. 8. Динамика изменения внутриклеточных пулов нуклеиновых кислот (А,Б) и скорости биосинтеза ДНК (В) в энтероцитах цыплят после введения эдистерона.

эктистерона. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что нуклеотидные пулы имеют широкую амплитуду изменений как в ранней, так и в поздней фазах гормонального действия эктистерона, причем максимальные отклонения от базовых уровней наблюдали для пулов пуриновых нуклеотидов и оксипуринов.

Общая тенденция к снижению суммарных пулов как РНК, так и ДНК проявилась в ранней фазе действия эктистерона (рис. 8), тогда как эффект гормона в поздней фазе противоположный — содержание нуклеиновых кислот, особенно РНК, увеличивается.

Ранее подобное действие эктистерона наблюдали у насекомых, причем отмечалось, что эктистерон (10^{-8} М) предотвращает деление клеток за счет снижения активностей тимидинкиназы и ДНК-полимеразы. Не исключено, что и у цыплят ингибирование роста (пролиферации) эритроцитов эктистероном в поздней фазе его гормонального действия обеспечивается за счет аналогичных механизмов.

В Ы В О Д Ы

1. Сравнительная оценка содержания эктистерона в различных органах дикорастущих и введенных в полевую культуру растений *Serratula inermis* Gilib. в разные периоды вегетации показала, что максимальное количество эктистерона характерно для цветочных корзинок дикорастущих особей и достигает 1,6–1,8% к весу воздушно сухого сырья. Культивируемый вид несколько уступает в этом отношении дикорастущим растениям (1,3–1,4% эктистерона), однако высокая биологическая продуктивность позволяет рекомендовать его в качестве эффективного сырьевого источника эктистероидов.

2. Из цветочных корзинок *S.inermis* выделено и с помощью физико-химических методов идентифицировано 6 эктистероидов: мажорный компонент эктистерон, полиподин В (5-оксиэктистерон), интегристерон А (1-оксиэктистерон), витикостерон В (25 ацетат эктистерона), часто встречающиеся в растениях, а также реже обнаруживаемые 2-дезоксидектистерон и 26-оксиэктистерон. Соотношение указанных эктистероидов в цветочных корзинках составило соответственно 100:1:1:0,025:0,05:0,35.

3. Испытана биологическая активность различных препаратов на основе эктистероидов *S.inermis* в условиях различной обеспе-

ченности цылят витамином D_3 . Установлено, что как эрдистерон, так и препараты на его основе, применяемые в курсе лечения экспериментального рахита у цылят совместно с витамином D_3 , способствуют ускорению интенсивности роста цылят и нормализации биохимических показателей сыворотки крови (Са, Рi, общее содержание белков, липидов, холестерина, мочевой кислоты, креатинина и др.). Наиболее эффективными были препараты БТИ-4 и БТИ-8Л в форме липосом.

4. Показано положительное воздействие препаратов на биосинтез нуклеотидов и нуклеиновых кислот слизистой тонкого кишечника цылят с Д-гиповитаминозом. Наличие достоверной положительной связи между изменениями содержания гуаниннуклеотидов и ДНК указывает на то, что одним из механизмов усиления препаратами лечебного действия витамина D_3 является торможение ними биосинтеза гуаниннуклеотидов.

5. Отмечена эффективность исследуемых препаратов, в частности БТИ-4 и БТИ-8Л в форме липосом, при адаптации цылят к недостаточности витамина D_3 в диете: ускорение интенсивности роста, увеличение выживаемости и улучшение биохимических показателей сыворотки крови по сравнению с состоянием Д-гиповитаминоза.

6. Показано, что после однократного введения гормональной дозы эрдистерона (10^{-8} М) цылятам с экспериментальным Д-гиповитаминозом имеют место быстрые (в течение 0-120 мин) активация процесса всасывания кальция в кишечнике и нормализация скорости биосинтеза общего белка, нуклеиновых кислот и их предшественников - пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, а также величин их суммарных пулов: увеличение содержания цитозиннуклеотидов, адениннуклеотидов и снижение уровней гуаниннуклеотидов и ДНК.

7. Установлено, что после однократного введения гормональной дозы эрдистерона (10^{-8} М) цылятам с нормальной обеспеченностью витамином D_3 наблюдаются изменения биохимических показателей сыворотки крови, а также модуляция биосинтеза нуклеиновых кислот в тканях печени, слизистой тонкого кишечника, селезенки и поджелудочной железы, которая имеет двухфазный характер. Отмечена тенденция к снижению суммарного содержания РНК и ДНК в энтероцитах цылят в ранней фазе действия эрдистерона (1 ч.) и их уве-

личение, особенно РНК, в поздней фазе (72 ч.). Скорость биосинтеза ДНК в поздней фазе снижается, свидетельствуя об ингибировании пролиферации эритроцитов под влиянием экидистерона. Двухфазный характер действия экидистерона предполагает первоначальную активацию им одной из сигнальных (мессенджерных) систем клеток, предпочтительно Са-чувствительную фосфолипидзависимую систему.

8. Положительная корреляционная связь между экидистерон-индуцируемыми изменениями величины внутриклеточных пулов гуаниннуклеотидов и мочевой кислоты у цыплят с различной обеспеченностью витамином D₃, с одной стороны, и суммарной ДНК, с другой, предполагает возможное участие указанных соединений в механизме регуляции экидистероном биосинтеза ДНК.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Ахмед И., Возиян П.А., Кляшторна Т.Б. та ін. *Serratula tinctoria* L. і *Serratula wolffii* Andrae - перспективні джерела біологічно активних фітоекдистероїдів // Укр.ботан.журн. - 1990. - 47, № 4. - С. 81-84.
2. Kholodova Yu.D., Voziyan P.A., Miladera Ch., Ahmed I. The comparative estimation of colour reaction' sensitivity for the phytoecdysteroids analysis base on the absorption and fluorescence data // Forth symposium on the analysis of steroids. April 24-26, 1990. 6 - Pecs. Hungary. - 1990. - P. 136.
3. Холодова Ю.Д., Кляшторная Т.В., Данильченко М.Б., Ахмед И. и др. Экологически безопасные регуляторы продуктивности насекомых на основе фитоекдистероидов из растений рода *Serratula* // Химизация и агроэкология. - К., 1991. - С. 9-17.
4. Кошурба А.В., Ахмед И., Холодова Ю.Д., Тараканов С.С. Вплив екидистерону на обмін речовин в тканинах курчат за умов Д-гіповітамінозу // VI Укр.біохім.з'їзд. - К., 1992. - С.195.
5. Кошурба А.В., Ахмед И., Тараканов С.С., Холодова Ю.Д. Влияние экидистерона на обмен пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в тканях цыплят // Укр.биохим.журн. - 1992. - 64, № 5. - С. 52-60.
6. Кошурба А.В., Ахмед И., Тараканов С.С., Холодова Ю.Д. Изучение механизмов действия экидистерона. Ранняя фаза действия. // Укр.биохим.журн. - 1993. - 65, № 5.

УБК 40443 3067 100

1. The first part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee. The names are listed in alphabetical order, and the addresses are given in full. The list includes names such as Mr. J. H. Smith, Mr. W. B. Jones, and Mr. C. D. Brown, among others.

2. The second part of the document is a report on the work of the committee during the year. It describes the various projects and activities that were undertaken, and the progress that was made. The report is written in a clear and concise style, and it provides a detailed account of the committee's work.

3. The third part of the document is a list of recommendations and suggestions for the future. These are based on the findings of the committee's work, and they provide a guide for the actions that should be taken in the coming year. The recommendations are presented in a logical and organized manner, and they are supported by the evidence presented in the report.

4. The final part of the document is a concluding statement. This summarizes the main points of the report, and it expresses the committee's confidence in the future. It also includes a list of names and addresses of the members of the committee, and a list of names and addresses of the members of the board of directors.

4327886
AV 27.886