

СТЕРОИДНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ РАСТЕНИЙ И КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДИОСКОРЕИ, ИХ МЕТАБОЛИЗМ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2000 г.

И. С. ВАСИЛЬЕВА,
В. А. ПАСЕШНИЧЕНКО

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

I. Введение. II. Общие сведения о стероидных гликозидах. III. Сапогенины и стероидные гликозиды растений и культуры клеток диоскореи. IV. Биосинтез стероидных гликозидов. V. Метаболизм стероидных гликозидов. VI. Биологическая активность стероидных гликозидов. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Сапонины — это исторически сложившееся название большой группы соединений гликозидной природы, обладающих способностью при растворении в воде образовывать стойкую пену. В настоящее время известно, что сапонины являются гликозидами двух видов, различающихся строением неуглеводной части молекулы. К первой группе гликозидов относятся сапонины, которые по своему строению являются гликозидами тритерпеноидов и носят название тритерпеновых гликозидов. Ко второй группе относятся гликозиды стероидов (ряда спиростана и фуростана), они называются стероидными гликозидами.

В последние годы возрос интерес к стероидным гликозидам, изучение которых ведется в нескольких направлениях. С одной стороны эти соединения используются для синтеза гормональных препаратов в фармацевтической промышленности. С другой — возрастает интерес к стероидным гликозидам, как веществам, обладающим широким спектром биологического действия на живые

Принятые сокращения: ОМГ — 3-окси-3-метилглутаровая кислота; МВК — мевалоновая кислота; ИПФФ — изопентенилдифосфат; ДМАФФ — диметилаллилдифосфат.

организмы. У этих соединений была обнаружена способность тормозить рост некоторых форм злокачественных образований; снижать уровень холестерина в крови и стимулировать овуляторные процессы у животных, а также антигрибная, антимикробная и противовирусная активности. Стероидные гликозиды оказались эффективными при лечении ревматизма, бронхиальной астмы, гемолитической анемии, гемодиатеза. Важная роль отводится стероидным гликозидам в усилении устойчивости растений к стрессовым факторам среды и фитопатогенам.

Составная часть стероидных гликозидов — сапогенины, служат исходным сырьем для синтеза стероидных гормонов и их аналогов. Наибольшее значение среди сапогенинов, из которых получают гормональные препараты, имеет диосгенин, ведущее положение которого связано с тем, что в качестве сырья для его получения используют корневища дикорастущих и культивируемых видов диоскорей с высоким содержанием этого стероида. Основными поставщиками сырья для промышленного производства диосгенина является Мексика, страны Центральной Америки, Индия и Китай, где для массовой заготовки используются дикорастущие заросли диоскорей *Dioscorea composita*, *D. floribunda*, *D. tepinapensis*, *D. prazeri*, *D. sylvatica*, *D. belizensis*, *D. zingiberensis*. Кроме корневищ диоскорей в качестве промышленного сырья за рубежом используются агавы, различные виды паслена, пажитника, юкки и ряд других растений.

В нашей стране стероидным сырьем для синтеза гормонов служит соласодин, получаемый из культивируемого паслена дольчатого *Solanum laciniatum*. Однако производство соласодина не рентабельно, поэтому недостаток исходного сырья для медицинской промышленности восполняется за счет импортируемого диосгенина. Экономически выгодным источником для получения диосгенина является растение *D. deltoidea*, в корневищах которой содержится до 6% этого стероида. В последние годы важным и перспективным источником диосгенина и стероидных гликозидов становятся высокопродуктивные штаммы суспензионной культуры клеток *D. deltoidea*, содержащие до 10% стероидных гликозидов.

II. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДАХ

Стероидные гликозиды — это биологически активные соединения, агликоны которых — сапогенины (или генины) — представляют собой C_{27} стероиды с циклопентанопергидрофенантроновым скелетом (кольца А, В, С, D) и метаболически измененной боковой цепью у С—17 атома. В зависимости от строения стероидной

ным и аксиальным положением метильной группы С–27 [1]. Обратимая реакция изомеризации проходит в кислой среде и приводит к образованию смеси с преобладанием более устойчивого (25R)–сапогенина [35]. В растении возможно совместное присутствие (25R)– и (25S)–изомеров, количественное соотношение которых может изменяться во время хранения растительного сырья [106].

Для стероидных гликозидов обязательным является присутствие 3–ОН группы, к которой присоединен углеводный остаток. Гораздо реже встречаются гликозиды, несущие углеводный компонент при С–1, С–2, С–5, С–6 и С–11. Число моносахаров в молекуле может составлять от одного до шести, чаще всего в состав углеводной цепочки входят D–глюкоза, D–галактоза, D–ксилоза, L–рамноза, L–арабиноза. Известны гликозиды, содержащие D–хинозосу, D–апиозу и D–фукозу [1]. Стероидные гликозиды с одной углеводной цепочкой являются монодесмозидами. Нередко углеводная часть представлена двумя цепочками (*бис*–десмозидные гликозиды). В последние годы были выделены эфиры гликозидов. Ацильная группа (остатки уксусной, бензойной, 3–окси–3–метилглютаровой, серной кислот) чаще всего локализована в углеводной части молекулы [1].

Стероидные гликозиды фураностанолового ряда (II) являются *бис*–десмозидными гликозидами. Их сапогенины можно рассматривать как спиростанолы, у которых цикл F разомкнут с образованием двух дополнительных гидроксильных групп — одной полуацетальной у С–22 и второй у С–26, связанной с углеводным остатком, чаще всего с молекулой D–глюкозы. Второй углеводный остаток присоединен к молекуле сапогенина обычно у С–3.

Наличие в молекуле фураностанолового гликозида (V) (схема I) полуацетальной группы при С–22 обуславливает образование при взаимодействии с низшими спиртами (метанол, этанол) алкоксипроизводных (VI). Поскольку выделение и очистка гликозидов связана с использованием спиртов, уже при хроматографировании выделяют смесь 22–окси– и 22–алкоксипроизводных, близких по величине R_f . Окси– или метоксигруппа при С–22 легко подвергается гидрогенолизу над платиновым катализатором в нейтральной среде или восстановлению боргидридом натрия в воде. При кислотном расщеплении продукта восстановления образуется фураностан (VII), так называемый дигидросапогенин. В аналогичных условиях у производных ряда спиростана (VIII) кольцо F не размыкается и соединения, подобные (VII) не образуются [35].

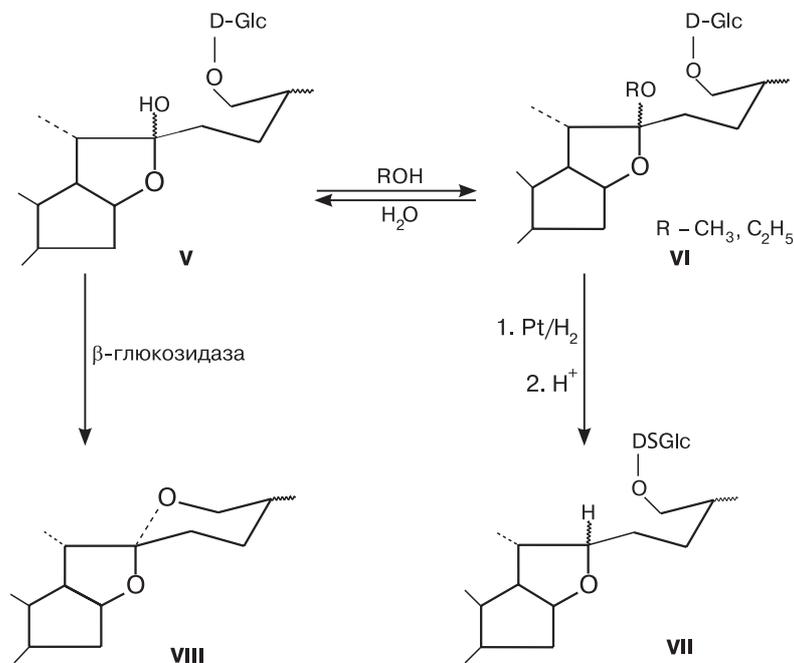


Схема 1. Химические превращения фураностероидных гликозидов.

При кислотном или ферментативном гидролизе фураностероидных гликозидов (V) (схема 1) происходит отщепление молекулы глюкозы от C-26 и замыкание кольца F в стероидной части молекулы с образованием соответствующего спироаналога (VIII) [123, 137]. В свободном виде агликоны фураностероидных гликозидов не встречаются.

Для определения содержания стероидных гликозидов в растительном сырье существуют различные аналитические методы. Из наиболее простых методов качественного анализа сапонинов нужно отметить определение пенообразовательного и гемолитического индексов [1, 206]. Более надежную информацию о наличии стероидных гликозидов в растительных экстрактах можно получить при помощи тонкослойной хроматографии. В качестве обнаруживающих реагентов для определения сапонинов используют раствор 1%-ного ванилина в конц. H_2SO_4 [112], дающий оранжевую окраску с гликозидами спиростанолового ряда и розовую с фураностероид-

выми. Строго специфичным реагентом для обнаружения фураностаноловых гликозидов является реактив Эрлиха (*n*-диметиламинобензальдегид в конц. HCl) [11].

В настоящее время для анализа стероидных гликозидов и их сапогенинов широко используется метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [12, 60, 71].

ИК-спектроскопия широко применяется для идентификации стероидных сапогенинов. Для ИК-спектров фураностаноловых гликозидов характерна уширенная полоса поглощения в области 900 см^{-1} . Наиболее важными для спирокетальной боковой цепи, не имеющей заместителей в кольце F, являются пики при $850\text{--}870$, 900 , 920 и 980 см^{-1} [206]. Определение соотношения интенсивности полос при 900 и 920 см^{-1} позволяет определять к какому (25R)– или (25S)–ряду относится сапогенин [87, 122]. Эпимеры (25R)–ряда поглощают при 900 см^{-1} значительно сильнее, чем при 920 см^{-1} , в то время как у сапогенинов, имеющих S–конфигурацию атома C–25, полоса при 920 см^{-1} интенсивнее полосы при 900 см^{-1} . Кроме того, у (25S)–эпимеров существует полоса при 850 см^{-1} , а у (25R)–эпимеров — около 870 см^{-1} . Для определения суммарного содержания сапогенинов, использовали величину поглощения при 982 см^{-1} [125].

Для выделения и определения строения молекул стероидных гликозидов и их сапогенинов в последние годы активно используются метод ВЭЖХ, совмещенный с масс–спектральным анализом [95, 115, 155], а также ^1H и ^{13}C ЯМР–спектроскопия [72, 73, 74, 94].

Стероидные гликозиды занимают одно из первых мест среди соединений растительного происхождения, используемых для синтеза стероидных гормональных препаратов. Основное количество стероидных медицинских препаратов получают из растительных стероидов, принадлежащих по своей химической природе к трем группам: спиростанам (диосгенин), стероидным алкалоидам (соласодин) и стеринам (холестерин, β –ситостерин, стигмастерин). Однако химическое строение стероидных гликозидов спиростанолового ряда таково, что позволяет с наименьшими усилиями перейти к соединениям прегнанового ряда с 17β –ацетильной боковой цепью, свойственной всем кортикоидам и большинству прогестагенов [35]. Отщепление гликозидной цепи приводит к образованию сапогенина, а раскрытие спиро– и гемикетальной группировки — к 22–кетостероидам, которые могут быть трансформированы в 20–кетопрегнаны. Важное значение при этом приобрела разработанная Маркером и сотр. [157] реакция изомеризации боковой цепи сапогенина — смилагенина (IX) (схема 2), протекающая при нагревании его с уксусным ангидридом. Эта

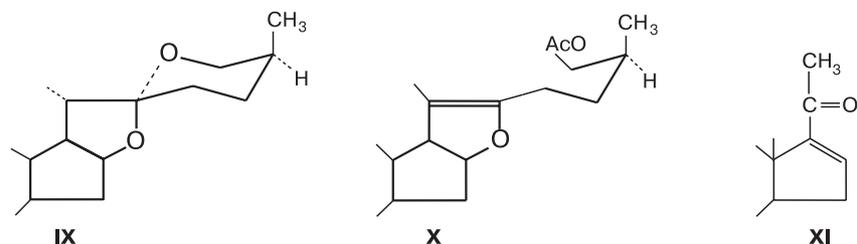
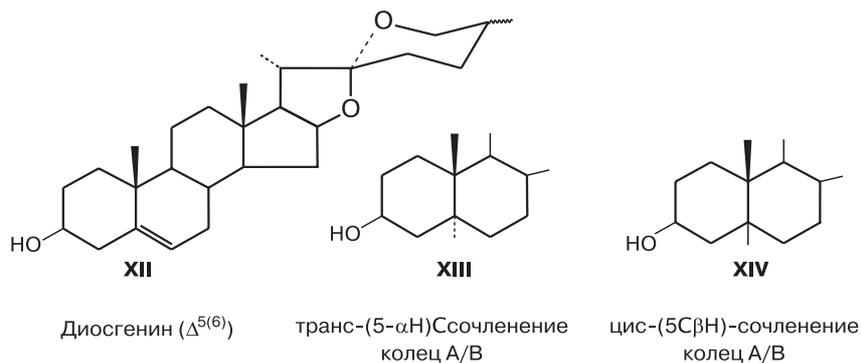


Схема 2. Превращение сапогенинов в производные прегнана.

реакция, называемая реакцией псевдомеризации, приводит к расщеплению кольца F спирокетальной системы с образованием 3,26-диацетата псевдосапогенина (X). Псевдосоединения легко окисляются в Δ^{16} -20-кетоны (XI) [35]. Открытие Маркером простого и экономичного способа деградации боковой цепи сапогенина через псевдосапогенины привело к тому, что реакция псевдомеризации остается ключевой стадией в значительной части промышленных синтезов стероидных гормонов. Наиболее пригодны для синтеза стероидных препаратов сапогенины, обладающие, как диосгенин (XII), $\Delta^{5(6)}$ -связью. Поэтому диосгенин, с $3\beta\text{OH}$ -группой и $\Delta^{5(6)}$ -связью является наиболее удобным видом сырья для производства кортикоидных препаратов. Однако могут найти применение и насыщенные соединения с транс-($5\alpha\text{H}$)- (XIII) и цис-($5\beta\text{H}$)- (XIV) сочленением колец A/B [35].



Ведущая роль диосгенина в фармацевтической промышленности привела к тому, что в поисках дешевого сырья для получения диосгенина было обследовано большое число видов растений.

Растения рода *Dioscorea*, запасующие стероидные гликозиды в подземных органах в больших количествах, оказались наиболее перспективными.

Род *Dioscorea* L. (сем. *Dioscoreaceae* R. Brwn) насчитывает около 650 видов. 122 вида диоскорей были изучены на содержание стероидных гликозидов, в 80 из них были обнаружены стероидные сапогенины, причем 55 видов содержали диосгенин. Почти все содержащие диосгенин виды распространены преимущественно в тропиках, реже в субтропиках или в умеренном климате [19].

Акахори [75] нашел интересную зависимость между морфологическими признаками растений и содержанием сапогенина. Он проанализировал японские виды *Dioscorea* и заметил, что виды с очередным расположением листьев, левосторонне вьющимся стеблем и не имеющие воздушные клубни содержали диосгенин, в то время как в видах с супротивным расположением листьев, правосторонне вьющимся стеблем и съедобными корнями сапогенины не были найдены.

Клубни ряда диоскорей, не содержащие сапогенины — один из древнейших видов пищи у народов тропических стран. Именно отсюда вошло в широкий обиход название «ямс» — синоним для диоскорей в целом. И в наше время ямс является основным пищевым продуктом для жителей тропиков. Наиболее широко культивируемыми ради съедобных клубней видами являются в Африке диоскорей округлая, или «белый ямс» (*D. rotundata*), и диоскорей кайенская, или «желтый ямс» (*D. cayenensis*), а в Азии и на островах Тихого океана — диоскорей крылатая (*D. alata*) и диоскорей съедобная (*D. esculenta*). При этом диоскорей округлая и диоскорей крылатая не встречаются в природе в диком виде. Также только культивируемыми растениями представлена диоскорей супротивная (*D. opposita*) или «китайский ямс». Клубни этих видов диоскорей содержат в большом количестве крахмал, а также белки, витамины и минеральные элементы. Ямс очень перспективная культура для будущего тропического земледелия [31].

Другой перспективной областью применения диоскорей является медицина. Объектами использования здесь являются виды диоскорей, содержащие в своих корневищах биологически активные соединения — стероидные гликозиды. Различные части диоскорей как надземные, так и подземные издавна применялись в традиционной медицине народов Азии, Африки и Латинской Америки как средство против ревматизма, кожных болезней, против

укусов змей и так далее. Научное название «диоскорея» дано в честь прославленного врача древности Диоскорида, жившего в I в. н. э. и было закреплено за родом Карлом Линнеем.

Особо важную роль растения диоскореи, содержащие сапогенины, стали играть после второй мировой войны после возрастания потребности в гормональных препаратах, в связи с их широким спектром терапевтического действия и крайне низкой обеспеченностью сырьем. Одним из основных видов сырья для производства стероидных гормональных препаратов стали растения, содержащие стероидные соединения. Наиболее перспективными в этом отношении оказались диоскореи с высоким содержанием диосгенина.

Впервые диосгенин (около 1%) был выделен в 1936 году Тсукамото и Уно из *D. tokoro* [102]. Позднее Маркер с сотр. изучал растения диоскореи из Центральной Америки такие, как *D. composita*, *D. testudinaria* и *D. lobata*, в корневищах которых он нашел значительное количества сапогенинов [156]. Наибольшее развитие получение сапогенинов из растений диоскореи нашло в Мексике. Наиболее значительные количества диосгенина были найдены в мексиканских тропических видах *D. floribunda*. (содержат в корневищах до 10% диосгенина), *D. spiculiflora* (до 15%), *D. composita* (до 13,2%). Эти виды являются основными источниками стероидных сапогенинов в Латинской Америке и США. Они не только заготавливаются в районах их естественного произрастания, но и вводятся в культуру. Позднее диосгенин в значительных количествах был найден в 23 обследованных видах диоскореи, включая *D. composita*, *D. deltoidea*, *D. floribunda*, *D. tepinapensis*, *D. prazeri*, *D. silvatica*, *D. belizensis* [102].

Высокое содержание диосгенина (от 4% до 6%) было найдено в корнях растений диоскореи из восточной Африки *D. burkilliana*, *D. hirtiflora*, *D. minutiflora*, *D. praehensilis*, *D. preusii*, *D. togoensis*, *D. zanzibarensis*. Особенно высокий уровень диосгенина (16,2%) был найден Тинг с сотр. в корнях китайского вида *D. zingiberensis* [102]. Наиболее перспективными видами диоскорей Вьетнама, в корневищах которых найдены значительные количества диосгенина, являются *D. membranacea* (2,3%) и *D. colletti* (4,4%) [70].

Из евро-азиатских видов почти все изученные виды диоскорей содержат значительные количества сапогенинов, но наибольшее содержание их характерно для видов гималайского происхождения: *D. deltoidea* (5,8%), *D. prazeri* (5,4%), *D. balcanica* (1,0%), *D. caucasica* (2,0%) [102]. Основная ценность этих видов диоскорей определяется тем, что в составе сапогенинов, полученных после кислотного гидролиза стероидных гликозидов этих растений, преобладает в ос-

новном диосгенин с небольшими примесями ямогенина (25S—эпи-мера диосгенина) [102, 191]. Отсутствие примесей других сапогенинов облегчает последующую переработку диосгенина в процессе производства стероидных препаратов.

III. САПОГЕНИНЫ И СТЕРОИДНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ РАСТЕНИЙ И КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДИОСКОРЕИ

САПОГЕНИНЫ И СТЕРОИДНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ РАСТЕНИЙ ДИОСКОРЕИ

Более чем из 70 видов растений рода *Dioscorea L.* и близкого ему рода *Tamus* (содержащего только 4 вида) выделили около 20 различных сапогенинов (таблица), при этом диосгенин (XII) и его эпитимер ямогенин нашли во всех исследованных видах диоскореи, содержащих стероидные гликозиды [191].

Таблица
Стероидные сапогенины растений рода *Dioscorea L.*

Название	C-5	C-25	ОН	C=O
Диосгенин	Δ	R	3 β	—
Ямогенин	Δ	S	3 β	—
Тигогенин	α	R	3 β	—
Неотигогенин	α	S	3 β	—
Смилагенин	β	R	3 β	—
Сарсапогенин	β	S	3 β	—
Гентрогенин	Δ	R	3 β	12
Кореллогенин	Δ	S	3 β	12
Гекогенин	α	R	3 β	12
Изочапагенин	Δ	R	3 β ,12	—
Чапагенин	Δ	S	3 β ,12	—
Гитогенин	α	R	2 α ,3 β	—
Ионогенин	β	R	2 β ,3 α	—
Диотигенин	β	S	2 β ,3 α ,4 β	—
Изодиотигенин	β	R	2 β ,3 α ,4 β	—
Игагенин	β	R	2 β ,3 α ,27	—
Изонартогенин	Δ	R	3 β ,27	—
Токорогенин	β	R	1 β ,2 β ,3 α	—
Когагенин	β	R	1 β ,2 β ,3 α ,5 β	—
Криптогенин	Δ	R	3 β ,26	16,22

При изучении диоскорей японского происхождения *D. tokoro* [162] и *D. tenuipes* [76], помимо диосгенина и ямогенина, выделили редко встречающийся 3α -оксисапогенин [192]. Кроме этого в следовых количествах были найдены ионогенин, когагенин, игагенин. В прорастающих семенах *D. tokoro* [77, 78] был найден изодиотигенин, содержание которого в процессе роста и развития растения значительно уменьшалось. Поскольку во взрослом растении этот сапогенин не был обнаружен, его рассматривают как предшественник диосгенина. Предшественником диосгенина может быть также изонартогенин, обнаруженный в активно растущих тканях *D. quinqueloba* [79]. В мексиканских видах *D. spiculiflora* [213] и *D. chiapasensis* [107] нашли гентрогенин, кореллогенин, чапагенин и изочапагенин. Эти сапогенины являются (25*R*)- и (25*S*)-эпимерами, подобно диосгенину и его (25*S*)-эпимеру ямогенину.

Обнаружение диосгенина и его эпимера ямогенина в корневищах и надземных частях растений диоскорей позволило сделать вывод о том, что присутствие этих сапогенинов в растении можно рассматривать как хемотаксономический признак сем. *Dioscoreaceae* [126, 154]. Соотношение этих двух эпимеров зависит от вида растения, его возраста, а также от времени года и других факторов. В *D. batatas* и *D. cotinifolia* сапогенины обнаружены не были, что объясняется отсутствием необходимых для биосинтеза стероидных гликозидов ферментных систем [86].

В большинстве случаев сапогенины присутствуют в растениях в виде гликозидов. В середине 50-х годов в лаборатории Кавасаки из японского вида *D. septemloba* были выделены первые стероидные гликозиды спиростанолового ряда — диосцин и грацилин, которые представляли собой триозиды диосгенина [208, 209]. К началу 70-х годов количество выделенных гликозидов, структуру которых удалось установить, едва достигало 30 [206]. В последние десятилетия благодаря развитию хроматографии и инструментальных методов анализа природных соединений наметился существенный прогресс в выделении стероидных гликозидов и установлении их строения. В настоящее время известно более 200 гликозидов спиростанолового ряда и более 100 гликозидов фуростанолового ряда.

Фуростаноловые и спиростаноловые гликозиды по химическим свойствам и биологической активности отличаются друг от друга. Изучение фуростаноловых гликозидов было проведено в лаборатории Чеше [206]. Биогенетически взаимосвязь между спиростаноловыми и фуростаноловыми формами стероидных гликозидов не совсем ясна. Ранее предполагали, что фуростаноловые гликозиды

являются предшественниками (промежуточной формой) при биосинтезе спиростаноловых гликозидов. Согласно этой общепринятой гипотезе (см. схему 1) спиростаноловая форма образуется вторично после ферментативного гидролиза специфичной β -глюкозидазой фураностанолового гликозида, сопровождающегося отщеплением молекулы глюкозы от С-26 со спонтанной циклизацией кольца F и образованием спирокетальной группировки [56, 137]. Однако в последнее время в растениях *S. melongena*, синтезирующих стероидные гликозиды, была найдена специфичная УДФ-глюкозо-зависимая гликозилтрансфераза, эффективно гликозилирующая только свободные спиростанолы [165, 166, 167], а ферментный препарат, полученный из корней *A. plumosus*, активно катализирует гликозирование ямогенина, был не способен гликозировать его фураноаналог у С-3 атома [166]. Авторы предполагают, что спиростанол-3-0-олигозиды могут служить предшественниками бисдесмозидных фураностаноловых гликозидов, при этом образование последних происходит путем гликозирования спиростаноловых гликозидов специфичной УДФ-глюкозо-зависимой гликозилтрансферазой, сопровождающегося открытием F кольца и присоединением в положении С-26 молекулы сапогенина D-глюкозы [168].

Анализируя данные по распространению стероидных гликозидов в растениях рода *Dioscorea L.*, нужно отметить, что наиболее часто в растениях этого рода встречаются стероидные гликозиды диосгенина (известно более 50 гликозидов диосгенина) [154]. Среди них самым распространенным является диосцин. Он найден в растениях *D. tokoro* [135], *D. composita* [100], *D. nipponica* [209], *D. floribunda* [116], *D. septemloba* [134, 151], *D. deltoidea*, *D. caucasica* [50, 51, 58] и других представителях этого рода [154]. Фураноаналог диосцина — протодиосцин был выделен из *D. gracillima* [136], *D. communis* [174], *D. floribunda* [116] и листьев *D. deltoidea* [51, 58].

Последовательное изучение состава стероидных гликозидов растения *D. deltoidea* позволило установить, что стероидные гликозиды корневищ отличаются по химическому составу от стероидных гликозидов листьев этого вида диоскореи. Из корневищ *D. deltoidea* были выделены два триозида диосгенина — спиростаноловый гликозид — дельгонин (XV) (схема 3) (диосгенин-3-0- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-глюкопиранозид) и его фураноаналог дельтозид (XVII) [50, 58]. В качестве основного стероидного гликозида листьев был выделен фураностаноловый гликозид — протодельтофолин (XX), который представлял собой протодиосцин (XIX) (α -L-рамнопирано-

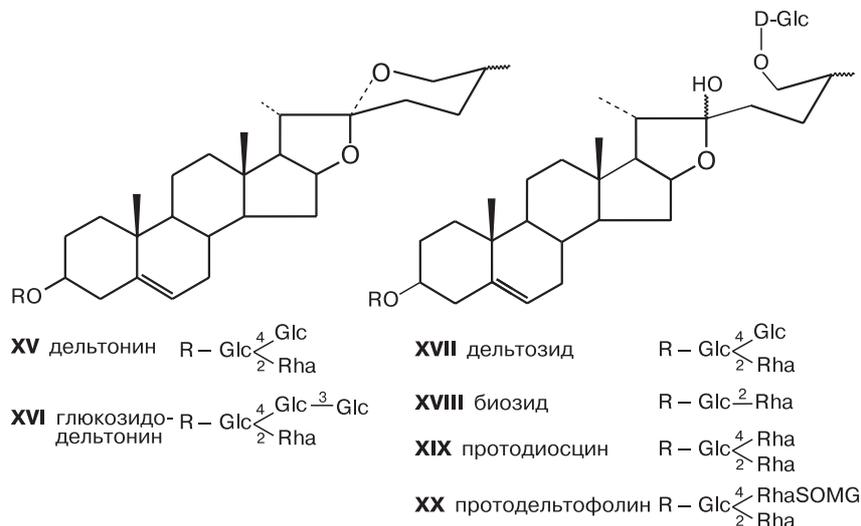


Схема 3. Стероидные гликозиды растений и культуры клеток *D. deltoidea* Wall и *D. caucasica* Lipsky.

зил-(1→2)-α-L-рамнопиранозил-(1→4)-β-глюкопиранозид Δ⁵-фуростен-3,22,26-триола), ацилированный 3-окси-3-метил-глутаровой кислотой (ОМГ) [58]. Минорным гликозидом листьев *D. deltoidea* был протодиосцин. Впоследствии в растениях были найдены другие эфиры стероидных гликозидов [18, 131]. Дельтонин был также найден в корневищах *D. caucasica* [9] и *D. parviflora* [149], кроме этого в листьях *D. caucasica* в качестве главного стероидного гликозида обнаружили тетраозид диосгенина — глюкозиддельтонин (XVI), который отличался от дельтонина присутствием дополнительного остатка глюкозы в положении 3 конечного остатка глюкозы углеводной цепочки [52].

Изучение стероидных гликозидов растений позволило сделать вывод, что диосгенин не является сапогенином, строго специфичным для видов семейства *Dioscoreaceae*, он встречается в растениях и из других семейств: *Liliaceae* (род *Trillium*), *Solanaceae* (род *Solanum*), *Leguminosae* (род *Trigonella* L.), *Costaceae*, *Amaryllidaceae*, *Bromeliaceae*, *Smilacaceae*, *Arecaceae*, *Poaceae*. Благодаря тому, что в растениях рода *Trigonella* L. (сем. *Leguminosae*) [154] и *Costus* (сем. *Costaceae*) [117] содержится значительное количество диосгенина, эти растения рассматриваются как альтернативный источник стероидов. Из семян растения *T. foenum-graecum* выделили семь

фуростаноловых гликозидов. Два из них после кислотного гидролиза давали диосгенин. Углеводная цепочка одного представляла 3-0- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозид, в состав углеводной цепочки второго в качестве четвертого углеводного остатка входила β -D-ксилопираноза [154]. В растениях *Polygonatum officinale* (сем. *Liliaceae*) были обнаружены стероидные гликозиды диосгенина, углеводная часть которых состояла из глюкозы и галактозы (в соотношении 3 : 1), имеющих D-конфигурацию [154]. В Японии впервые обнаружили стероидные гликозиды диосгенина в представителе сем. *Arecaceae* — растении *Trachycarpus fortunei*: из всех частей этого растения были выделены диосцин и его фурананалог [113].

К настоящему времени известно, что стероидные гликозиды, найденные в растениях, могут присутствовать в них в различных формах и могут быть локализованы в различных органах. При этом спироستانоловые гликозиды накапливаются преимущественно в запасующих органах (корневище, семена), в то время как фуростаноловые гликозиды — в надземных ассимилирующих органах (стебель, листья) [37, 56, 206].

В ранних работах, выполненных на культуре клеток *D. deltoidea* [133], а также на корневищах *D. bernouillana* [127] было показано, что сапогенины и стероидные гликозиды локализованы в растительной клетке главным образом в микросомальной и, в меньшей степени, в митохондриальной фракции; локализацию стероидных гликозидов листьев *D. tokoro* [78] связывали с пластидами. Аvenaкозиды А и В, найденные в листьях *Avena sativa*, рассматривали как строительную единицу проламеллярных телец этиопластов листьев [139]. В дальнейшем было показано, что стероидные гликозиды (26-деглюкоавенакозиды), найденные в проламеллярных тельцах этиопластов, являются продуктами трансформации авенакозидов А и В, образующихся при выделении этиопластов из листьев [140]. Способность 26-деглюкоавенакозидов связываться с мембранами органелл клетки значительно затрудняла изучение внутриклеточной локализации стероидных гликозидов. Только получение интактных протопластов позволило обнаружить, что большая часть стероидных гликозидов как в зеленых, так и в этиолированных протопластах локализована в вакуолях эпидермальных клеток мезофилла [140, 141, 142]. Далее было показано, что в клетках мезофилла содержатся в основном стерины и их производные (гликозилстерины, ацилированные стерины), в то время как стероидные гликозиды были обнаружены в основном в эпидермальных клетках листьев *Avena sativa* [142].

К подобным выводам пришли Гуриелидзе с соавт. [22, 23] при исследовании срезов листа *D. deltoidea* гистохимическим методом. После окрашивания срезов листа реактивом Эрлиха, дающего малиновую окраску с фуростаноловыми гликозидами, было отмечено, что стероидные гликозиды в листе диоскореи накапливаются в особых (эпидермальных) клетках, расположенных в верхнем и нижнем эпидермисе. По-видимому эти клетки можно считать идиобластами, или клетками-вместилищами различных вторичных соединений, образующихся в качестве конечных продуктов специализированного обмена растений.

САПОГЕНИНЫ И СТЕРОИДНЫЕ ГЛИКОЗИДЫ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДИОСКОРЕИ

Первые попытки культивирования изолированных клеток растений *in vitro* были сделаны еще в начале века Гамберлендтом. Но только начиная с 30-х годов, благодаря работам, выполненным Ф.Уайтом и Р.Готре, этот метод получает свое настоящее развитие [61]. В настоящее время культура клеток высших растений привлекает к себе внимание как возможный продуцент биологически активных веществ, применяемых в медицине. В культуру клеток введены многие редкие лекарственные растения: *Panax ginseng* (продуцент тритерпеновых гликозидов гинзенозидов), *Lithospermum erythrorhizon* (продуцирует нафтохинон шиконин), *Rauwolfia serpentina* (продуцент алкалоида аймалина), *Coptis japonica* (продуцент алкалоида берберина) и др. [173].

Использование диосгенина как исходного материала для фармацевтической промышленности, стимулировало культивирование продуцирующих его клеток растений. Для получения диосгенина используют корневища многих видов растений рода *Dioscorea L.*, но только незначительное число видов диоскореи (*D. composita*, *D. floribunda*, *D. spiculiflora*, *D. deltoidea*, *D. tokoro*) было введено в культуру клеток [161, 200]. Также, как и в растениях рода *Dioscorea L.* присутствие диосгенина в культуре клеток этих растений является хемотаксономическим признаком [161].

Впервые диосгенин был выделен из каллусной культуры клеток *D. deltoidea* в 1968 году в лаборатории Staba. Было установлено, что в недифференцированной культуре клеток *in vitro* синтезируется значительное количество диосгенина (до 1%), в дифференцированных клетках это соединение находили только в следовых количествах [132], при выращивании каллусной и суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* в присутствии 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и холестерина выход диосгенина увеличивался до 2,5% на сухой вес клеток [133]. В дальнейшем диосгенин

был выделен из культуры клеток *D. composita*, *D. floribunda*, *D. spiculiflora* [81, 161], *D. tokoro* [200]. Но наиболее перспективным источником диосгенина является все же культура клеток *D. deltoidea*. Сравнение содержания диосгенина, синтезирующегося в каллусной и суспензионной культуре клеток *D. composita*, *D. floribunda*, *D. spiculiflora* с культурой клеток *D. deltoidea* показало, что во всех этих видах диосгенин образуется в значительно меньших количествах, чем в *D. deltoidea* [161].

Кроме того диосгенин был найден в культуре клеток растений рода *Solanum*: *S. xanthocarpum* [108] и *S. laciniatum* [211], причем, если в исходном растении основным генином является стероидный алкалоид соласодин (1,0—1,5%), а диосгенин присутствует в незначительных количествах (0,01—0,1%), то в культуре клеток основным продуктом биосинтеза является диосгенин, а соласодин отсутствует [211] или присутствует в следах [120].

Диосгенин был найден и в каллусных культурах клеток *Trigonella foenum-graecum* [119, 143, 213] и *Tribulus terrestris* [99]. Кроме диосгенина из культуры клеток пажитника были выделены тигогенин и гитогенин, однако содержание диосгенина было значительно выше (1,8%), чем гитогенина (1,1%) и тигогенина (1,3%) [143]. В якорцах кроме диосгенина был найден гекогенин [99]. Значительное количество диосгенина продуцирует недифференцированная культура клеток *Costus speciosus*, культивируемая на среде, содержащей 2,4-Д, индолил-3-уксусную (ИУК) и 1-нафтилуксусную кислоты (НУК) [152].

При определении состава стероидных гликозидов в культуре клеток *T. foenum-graecum* при помощи метода ТСХ было показано присутствие в клетках стероидного гликозида, величина R_f которого совпадает с R_f диосцина, но выделен этот гликозид не был [82].

Более тщательно была изучена культура клеток *D. tokoro*. Из этой культуры выделили фураностаноловый гликозид прототокоронин, который после кислотного гидролиза образует токорогенин, глюкозу и арабинозу [202]. Несколько позднее был выделен протонеотокоронин, агликоном которого является (25S)-эпимер токорогенина — неотокорогенин [186, 210].

Изучение стероидных гликозидов культуры клеток *D. deltoidea* было проведено в Институте биохимии им. А.Н.Баха РАН, при этом было показано, что в суспензионной культуре клеток диоскорееи шт. ИФР ДМ-0,5 в условиях *in vitro* в качестве главных гликозидов синтезируются протодиосцин (XIX) (схема 3) и дельтозид (XVII), а в качестве побочного — фураноаналог биозида диосгенина, представляющего собой диосгенин-3-0- α -L-рамнопира-

нозил-(1→2)-β-D-глюкопиранозид (XVIII) [10, 14]. В клетках этого штамма диоскореи присутствуют только гликозиды фураностанолового ряда, что связано с отсутствием в нем олигофураностанозид-специфичной β-гликозидазы [6]. Анализ гликозидов в экстрактах клеток этого штамма методом ВЭЖХ показал, что соотношение протодиосцина и дельтозида обычно составляет 3 : 2 [12].

Изучение состава сапогенинов различных штаммов суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* методами ГЖХ, ИК- и масс-спектрометрии показало, что во всех штаммах (Д-1, ДМ-1, ДМ-8,) стероидные гликозиды представлены гликозидами диосгенина и его 25S-аналога — ямогенина [48]. Кроме того было установлено, что в штаммах Д-1, ДМ-1, ДМ-8 содержание спиростаноловых гликозидов не превышает 1—3% от общего содержания стероидных гликозидов, при этом наблюдалась значительная активность олигофураностанозид-специфичной β-гликозидазы. Авторы объясняют низкое содержание спиростаноловых гликозидов тем, что стероидные гликозиды и расщепляющий их фермент находятся в разных компартментах клетки [6].

Обнаружение в культуре клеток *D. deltoidea* протодиосцина и дельтозида свидетельствует о том, что в условиях *in vitro* в клетках этого вида диоскореи биосинтезируются как гликозид листьев (протодиосцин), так и гликозид корневищ (дельтозид). Таким образом, на примере стероидных гликозидов можно убедиться в тотипотентности растительной клетки в условиях *in vitro*.

При выращивании культуры клеток растений в условиях *in vitro* происходит снижение уровня биосинтеза вторичных соединений по сравнению с интактным растением. Это можно объяснить тем, что в культуре происходит частичная потеря способности к реализации генетической информации, относящейся ко вторичному обмену. Но генетическая информация утрачивается не полностью, часть ее сохраняется. К факторам, способным частично или полностью восстановить генетическую информацию (факторы «запуска»), относятся свет, регуляторы роста (гормональные эффекторы), в некоторых случаях предшественники и элементы питания, химический мутагенез и ионизирующее излучение.

Хорошо известно, что регуляторы роста (гормоноподобные эффекторы) оказывают влияние не только на рост, но и на вторичный метаболизм. Применение регуляторов роста заметно влияет на состав и содержание стероидных и других соединений как в самом растении, так и в культуре клеток. Было показано, что применение 2,4-Д и симазина стимулирует образование диосгенина в культуре клеток *D. deltoidea* [133, 158], а совместное применение 2,4-Д, ИУК

и 3-индолилмасляной кислоты (ИМК) приводят к увеличению выхода диосгенина из культуры клеток *S. xanthocarpum* [109], при этом отмечено ингибирующее действие этих гормонов на синтез соласодина. При химической регуляции ауксинами наблюдали увеличение выхода диосгенина в культуре клеток пажитника [121] и никотина в каллусной культуре табака [101]. Таким образом применение гормональных эффекторов в большинстве случаев позволяет значительно увеличить образование вторичных соединений в культуре клеток, однако в каждом случае необходим поиск оптимальных условий [89].

В некоторых случаях биосинтез вторичных соединений может быть значительно увеличен при введении предшественников в питательную среду. Чаще всего это связано с репрессией образования вторичного метаболита в культуре клеток. Так при добавлении в среду суспензионной культуры клеток *D. deltoidea* мевалоновой кислоты или холестерина наблюдается значительное увеличение выхода диосгенина [90, 133].

В последние годы увеличение выхода вторичных метаболитов достигают при действии химических мутагенов или при помощи облучения различными источниками радиации. Для увеличения биосинтетического потенциала культуры клеток *D. deltoidea* и увеличения выхода диосгенина использовали химический мутаген N-нитрозо-N-метилмочевину (N-НММ). После обработки клеток исходного штамма ДМ-1, содержащего в составе сапогенинов диосгенин и его (25S)-эпимер — ямогенин, разными дозами N-НММ был получен новый штамм ДМ-0,5, в клетках которого образовывался только диосгенин (ямогенин представлен только в следовых количествах). Содержание диосгенина в 4–6 раз превосходило содержание сапогенинов в исходном штамме [36]. Действие ионизирующего излучения на повышение выхода диосгенина было изучено на *D. bulbifera* [171], *D. floribunda* [105], а также на культуре клеток *D. deltoidea* [30]. Действие ионизирующего излучения как стрессового фактора, приводящего к возникновению полезных мутаций, оказалось менее эффективным по сравнению с химическим мутагенезом.

В некоторых работах пути образования диосгенина изучали с помощью гербицидов фенилпиридазоновой группы (метилфлурезон, норфлурезон), которые являются ингибиторами каротиноидного биосинтеза в высших растениях [196]. При воздействии этих соединений на суспензионную культуру клеток *D. deltoidea* было показано ингибирующее действие их на рост клеток и на накопление в них диосгенина.

Таким же ингибирующим действием на рост клеток и биосинтез диосгенина обладали циклогексимид и компактин — конкурентный ингибитор ОМГ—КоА редуктазы, скорость—лимитирующего фермента биосинтеза стероидов [197].

Образование диосгенина в культуре клеток *D. deltoidea* можно регулировать и путем изменения состава среды. Фактором, определяющим накопление биомассы культуры клеток и образование вторичных метаболитов, является источник углерода. Наиболее эффективным источником углерода для культуры клеток чаще всего служит сахароза, которая обычно используется в концентрации 2—3%. При увеличении содержания сахарозы в среде до 4% содержание диосгенина в культуре клеток *D. deltoidea* увеличивается на 20—30% [67]. При изучении действия условий среды на выращивание культуры клеток и образование вторичных соединений было замечено, что тот состав среды, который необходим для максимального роста, отличается от состава, необходимого для образования диосгенина [110, 194]. Было установлено, что вторичные метаболиты (диосгенин) образуются главным образом в неделящихся клетках, после достижения максимального накопления биомассы [110, 132, 193, 194, 195]. Это привело исследователей к применению двухфазного способа культивирования, где в первую очередь создаются оптимальные условия для роста клеток, а затем — для образования вторичных соединений [195]. При изучении действия на культуру клеток *D. deltoidea* фосфата было показано, что увеличение в начале роста концентрации солей фосфора приводит к увеличению выхода диосгенина во второй ростовой фазе до 7,8%. Увеличение концентрации фосфата во второй фазе развития приводит к снижению выхода диосгенина [195]. При двухфазном культивировании культуры клеток диоскореи отмечали, что дополнительное внесение сахарозы во второй стадии развития не приводит к увеличению биомассы культуры клеток и содержания диосгенина в ней, поэтому нет необходимости во внешнем источнике углерода для синтеза диосгенина. Как предполагают авторы, предшественник образуется во время ростовой фазы и превращается в диосгенин во время стационарной (продуцирующей) фазы [195]. Недостаток сахарозы при выращивании культуры клеток, по мнению авторов, должен приводить не к дополнительному синтезу стероидных молекул из ацетата, а скорее к действию на одну из стадий в биосинтетическом пути между мевалоновой кислотой и спироаноловыми гликозидами. Гипотетически это может быть трансформация фураностероидных гликозидов в спироаноловые [198]. Трансформацию стероидных гликозидов в экспоненциальной

фазе роста при сахарном голодании наблюдали Драпо с сотр., при этом предполагалось, что под действием β -глюкозидазы происходит отщепление глюкозы от C—26 фураностанолового гликозида и образование спиростанолового гликозида и глюкозы, необходимой для дыхания [97]. В некоторых работах было показано, что из культуры клеток, выросшей в условиях ограничения сахарозы, получают значительно меньше диосгенина, чем из клеток, собранных через несколько дней после того, как в среду была добавлена сахароза [110, 133, 193], что связано, по-видимому, с ферментативной трансформацией.

Эффект, аналогичный лимитированию, могут оказать неспецифические стрессовые воздействия. Использование таких стрессовых факторов как аноксия, отмывание клеток от питательных веществ приводит к увеличению содержания сапогенинов в культуре клеток диоскореи в 1,5—2,4 раза [5]. Можно предположить, что переход клеток растения к биосинтезу вторичных метаболитов является стереотипным ответом на стресс, независимо от фактора, которым он вызывается.

IV. БИОСИНТЕЗ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Сапогенины (агликоны стероидных гликозидов) биогенетически связаны со стеринами, что позволяет причислить эту группу вторичных метаболитов к классу изопреноидов или терпеноидов [45]. Как известно, все изопреноиды, а число их уже превышает 22 тысячи соединений, построены из разветвленных C_5 -единиц [93]. Стерины и стероиды, молекула которых может содержать от 21 до 29 атомов углерода, формально не попадают в эту категорию [160]. Однако общим промежуточным продуктом в их биосинтезе является ациклический разветвленный тритерпеноид сквален, построенный из 30-и углеродных атомов (см. ссылки в обзоре [56]). Общим специфическим продуктом биосинтеза всех изопреноидов является изопентенилдифосфат (ИПФФ). Он представляет собой ту исходную разветвленную C_5 -единицу, которая участвует в наращивании углеродной цепи изопреноидов. До самого последнего времени считали, что во всех живых организмах — прокариотах и эукариотах ИПФФ образуется единственным путем — при декарбоксилировании и дегидратировании мевалоновой кислоты (МВК). На бесклеточных препаратах из печени крыс и дрожжевых клеток было установлено, что сама МВК или 3,5-дигидрокси-3-метилвалериановая кислота образуется путем последовательной конденсации двух молекул ацетил-КоА (XXI) (схема 4) в ацетоацетил-КоА

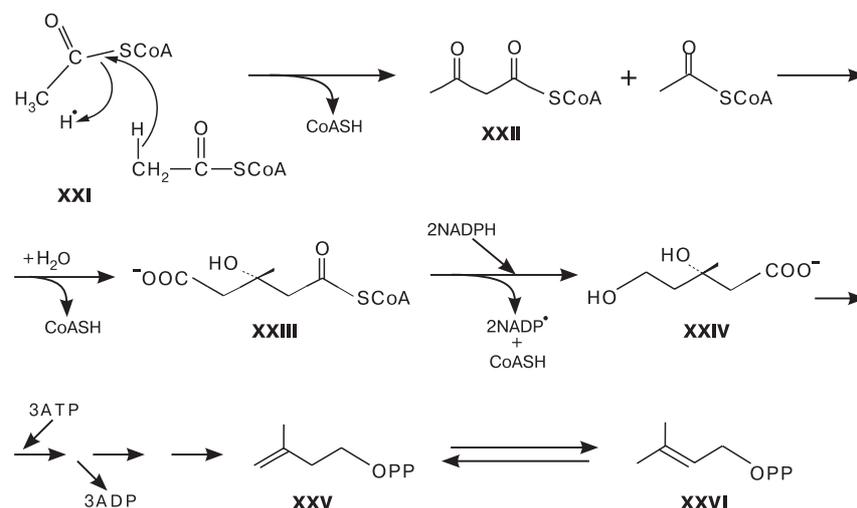


Схема 4. Ацетатно–мевалонатный путь ранних стадий биосинтеза изопреноидов.

XXI — Ацетил–КоА; XXII — ацетоацетил–КоА; XXIII — 3–окси–3– метилглутарил–КоА; XXIV — МВК; XXV — ИПФФ; XXVI — ДМАФФ.

(XXII), из которого после присоединения еще одной молекулы ацетил–КоА образуется ОМГ–КоА (XXIII). Восстановление последнего с участием двух молекул НАДФН приводит к образованию МВК (XXIV). Из МВК после двукратного фосфорилирования у С–5-атома и последующего декарбоксилирования/дегидратирования образуется ИПФФ (XXV). ИПФФ изомеризуется в диметилаллилдифосфат (ДМАФФ) (XXVI), который служит «затравкой» при наращивании изопреноидной углеродной цепи. Этот путь начальных стадий при образовании ИПФФ был назван мевалонатным путем и рассматривался при обсуждении биосинтеза холестерина, каротиноидов и других физиологически важных изопреноидов [20, С. 42–105].

Однако, в последние годы сначала в клетках эубактерий, а затем у зеленых водорослей и в хлоропластах высших растений был открыт альтернативный путь ранних стадий биосинтеза изопреноидов, исключая участие МВК при образовании молекулы ИПФФ. Этот путь был обнаружен в лаборатории Ромера в экспериментах с несколькими видами эубактерий, в том числе *Escherichia coli* [175, 176, 177]. При использовании в качестве предшественников меченных [¹³C] препаратов ацетата, глюкозы и триозофосфатов с

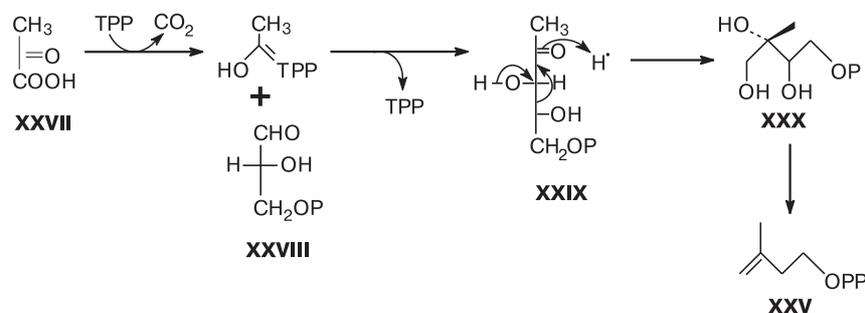


Схема 5. Глицеральдегид–3–фосфат/пируватный путь ранних стадий биосинтеза изопреноидов.

XXVII — пируват; XXVIII — 3–фосфоглицериновый альдегид; XXIX — 1–дезоксиксилулозо–5–фосфат; XXX — 2–С–метил–D–эритритол–4–фосфат; XXV — ИПФФ; TPP — тиаминдифосфат.

последующим изучением распределения метки в изопреноидах методом ^{13}C –ЯМР спектроскопии удалось показать, что ИПФФ в эубактериях образуется путем прямой конденсации C_2 –единицы, образующейся при декарбоксилировании пирувата (XXVII) (схема 5), с C_3 –единицей (глицеральдегид–3–фосфатом) (XXVIII). Продуктом этой конденсации является D–1–дезоксиксилулозо–5–фосфат (XXIX) с неразветвленной углеродной цепью. Наиболее вероятным продуктом перегруппировки D–1–дезоксиксилулозо–5–фосфата с образованием разветвленного углеводородного скелета является 2–С–метил–D–эритритол–4–фосфат (XXX), который далее превращается в ИПФФ (XXV) (см. ссылки в обзоре [59]).

Развитие этих исследований в экспериментах на зеленых водорослях и культурах клеток некоторых видов растений с применением тех же методических подходов расширило круг организмов, у которых ИПФФ может образовываться глицеральдегид–3–фосфат/пируватным путем. В совместных исследованиях Лихтенталера и Ромера с соавт. было доказано, что все изопреноиды, в том числе стерины, образуются в клетках зеленых водорослей *Scenedesmus obliquus* немевалонатным путем [182]. В то же время в клетках растений этот путь действует только в хлоропластах при образовании каротиноидов и пренильных боковых цепей хлорофиллов и пластохинона–9, тогда как фитостерины (ситостерин, стигмастерин) образовывались в цитоплазме мевалонатным путем [148]. Далее в растениях и эубактериях были обнаружены ферменты, отнесенные к транскетолазам, которые катализируют конденсацию

глицеральдегид-3-фосфата с C_2 -единицей, происходящей из пирувата [147, 150]. Одну из подобных транскетолаз охарактеризовали как пластидный фермент и показали, что она экспрессируется в хромопластах перца и участвует в пластидном биосинтезе ИПФФ [88].

Был найден ген фермента редуктоизомеразы, принимающего участие в образовании 2-С-метил-D-эритритол-4-фосфата [98]. Этот ген был экспрессирован в клетках *Escherichia coli*. Было показано, что изомеризация происходит только в присутствии НАДФ•Н и ионов Mn^{+2} или Mg^{+2} [189].

На ранних стадиях биосинтеза стероидных гликозидов образование ИПФФ осуществляется по-видимому по мевалонатному пути, поскольку их непосредственными предшественниками в растениях являются стерины, образующиеся в цитоплазме, а не в хлоропластах [83]. Пути биосинтеза стеринов из тритерпенового спирта сквалена подробно освещены в обзорах [20, С. 42–105; 56; 45].

Изучение биосинтеза стероидных сапогенинов в растениях на примере диосгенина, тигогенина и других генинов, началось в 60-е годы в лабораториях Хефтмана в США и Чеше в Германии (см. ссылки в обзоре [55]). Сходство в структуре холестерина (XXXI) и стероидных сапогенинов, например, диосгенина (XII) позволило предположить, что именно этот C_{27} стерин, присутствующий не только у животных, но и у растений, является прямым предшественником C_{27} сапогенинов. Это было доказано в опытах с $[4-^{14}C]$ -холестерином, включение которого в диосгенин в проростках семян *D. spiculiflora* составило 1,1% [84]. Для того, чтобы холестерин с алифатической боковой цепью из 8-и углеродных атомов, превратился в диосгенин, необходимо предварительно окислить его молекулу в положениях С-16, С-22 и по одной из терминальных метильных групп боковой цепи С-26 или С-27. При испытании окисленных в этих положениях производных $[26-^{14}C]$ -холестерина обнаружили, что 26-оксихолестерин эффективно включился в диосгенин в листьях *D. floribunda*, тогда как 22-окси- или 22-кетохолестерин не использовались в биосинтезе тигогенина в листьях *Digitalis lanata* [204].

Эти данные свидетельствовали о том, что окисление холестерина в процессе образования генинов осуществляется в определенной последовательности, причем на первой стадии окисляется одна из гем-диметильных групп. Включение $[26-^{14}C]$ -(25R)-26-оксихолестерина только в диосгенин — (25R)-эпимер, но не в ямогенин — (25S)-эпимер позволило установить, тот факт что стереохимическое расположение заместителей у С-25 атома спиростаноловых генинов

фиксируется на ранних стадиях биосинтеза — на этапе окисления холестерина по концевой метильной группе, при этом (25R)– и (25S)–эпимеры не могут взаимопревращаться [111]. Это положение было подтверждено на примере биосинтеза неотигогенина (25S)–эпимера из 5 α –холестан–3 β ,27–диола [178, 179]. Стереоспецифическое окисление холестерина, обусловленное присутствием прохирального центра у С–25 атома, также было подтверждено исследованиями с [4–¹⁴С, 25–³Н]–холестерином в качестве предшественника диосгенина, в которых исключалась стадия дегидрирования холестерина в положении $\Delta^{24(25)}$ [124, 212]. Позднее Seo с сотр. в экспериментах с [1,2–¹³С₂]–ацетатом на культуре клеток *D. tokoro* установили, что атомы С–26 и С–27 в (25S)–спиростанолах (ямогенине и неотокорогенине) — происходят из С–2 и С–3' атомов МВК, а в (25R)–спиростанолах (диосгенине и токорогенине) — из С–3' и С–2 атомов МВК соответственно [186]. Эксперименты с некоторыми другими видами растений, биосинтезирующими стероидные сапогенины, подтвердили, что (25S)– и (25R)–спиростанола синтезируются в результате окисления (про–R)– или (про–S)–СН₃–групп боковой цепи холестерина с образованием в качестве промежуточных продуктов двух соответствующих стереоизомеров 26–оксихолестерина [124, 178, 179, 212].

При решении вопроса, в какой последовательности происходит окисление цепочки молекулы холестерина (XXXI) (схема 6) в положении 16, 22 или 26 было показано, что 26–оксихолестерин является первым продуктом в ходе превращения холестерина в

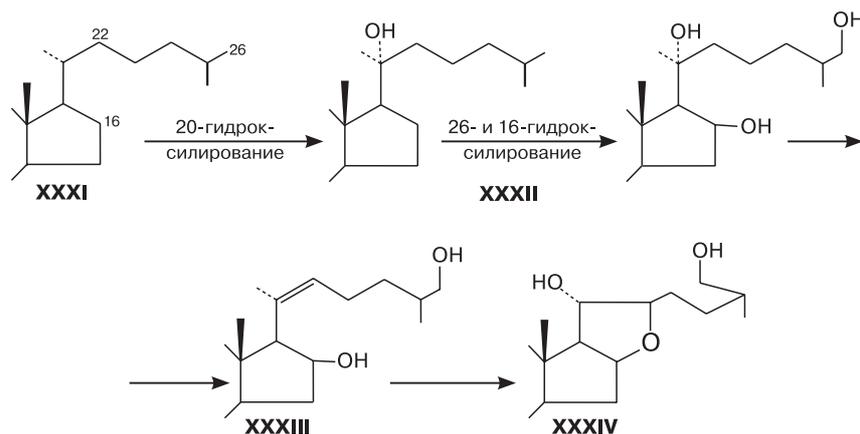
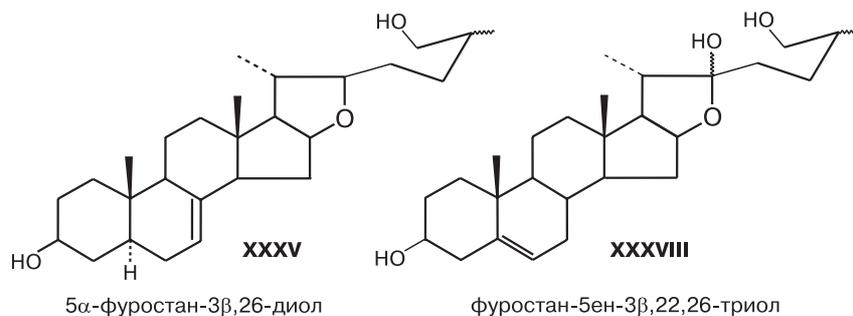


Схема 6. Превращение боковой цепи холестерина в фураностаноловую структуру.

сапогенины [111], а окисление С–22 атома предшественника–стерина происходит только после окисления С–26 (или 27) и С–16 атомов боковой цепи [207]. В то же время было обнаружено, что в биосинтезе тигогенина в листьях наперстянки участвует $[7-^3\text{H}]$ –20–оксихолестерин. Это позволило предположить, что на промежуточном этапе биосинтеза образуется 20–оксихолестерин (XXXII), последовательное гидроксильное окисление которого в С–26 и С–16 положении с последующей дегидратацией приводит к возникновению $\Delta^{20(22)}$ –производного (XXXIII), из которого, в результате циклизации с образованием кольца E, может получиться фураностаноловая структура (XXXIV) [207]. В качестве промежуточного продукта превращения $3\beta, 16\beta, 26$ –триоксихолестерина (XXXVI) в спиростанолы может выступать 5α –фураностан– $3\beta, 26$ –диол (XXXV) [179]. В то же время нельзя исключить возможность образования фураностаноловых аналогов из $3\beta, 16\beta, 22, 26$ –тетраоксихолест–5–ена (XXXVII) путем дегидратации С–22 атома. Действительно, в культуре клеток *D. tokoro* подобный тетраоксихолестерин использовался наряду с циклоартенолом, холестерином и $3\beta, 16\beta, 26$ –триоксихолестерином (XXXVI) для биосинтеза диосгенина (XII), ионогенина и токорогенина [201]. Можно предположить, что при биосинтезе спиростанолов введение 22–оксигруппы в молекулу предшественника типа (XXXIII) происходит путем прямой гидратации $\Delta^{20(22)}$ –связи, что исключает необходимость участия 22–кетохолестерина.



После кислотного гидролиза клеточной массы *D. deltoidea* в гидролизате методами масс–, ^1H – и ^{13}C –ЯМР спектроскопии обнаружили присутствие фураност–5–ен– $3\beta, 22, 26$ –триола (XXXVIII). Данное соединение накапливалось в растущих клетках суспензионной культуры в фазе экспоненциального роста. По мере

старения клеток и перехода в стационарную фазу фуростаноловый аналог превращался в диосгенин [198]. Авторы предположили, что это соединение существует в клетках в гликозидированной форме, в которой и циклизуется с образованием спиростанолового аналога (диосцина), однако соответствующие гликозиды ими выделены не были. Ранее превращение фуроаналога диосцина — протодиосцина в диосцин под действием эндогенной β -глюкозидазы было показано *in vitro* в опытах с гомогенатами листьев диоскореи [123], что может служить подтверждением этого предположения. Однако из работы Тала с соавторами остается неясным, каким образом им удалось избежать при кислотном гидролизе биомассы, содержащей стероидные гликозиды, замыкания структуры (XXXVIII) в спиростаноловую структуру.

Включение $[4-^{14}\text{C}, 22, 23-^3\text{H}_2]$ -ситостерина с соотношением $^3\text{H} : ^{14}\text{C} = 5,0$ в сапогенины в суспензионной культуре клеток *D. deltoidea* сопровождалось существенной потерей трития: в биосинтезированном диосгенине соотношение $^3\text{H} : ^{14}\text{C} = 2,3$ [188]. Потерю радиоактивности по ^3H связали с отщеплением ^3H от С-22 атома боковой цепи в процессе его гидроксирования. Интересно, что ситостерин использовался для биосинтеза спиростанолов только в условиях культуры клеток *in vitro*, в условиях *in vivo* он не включался в стероидные гликозиды.

Обобщая все изложенное, можно представить образование спиростанолов на примере диосгенина так, как это показано на схеме 7.

Разнообразие строения сапогенинов, входящих в состав растительных стероидных гликозидов (см. раздел I), исключает возможность какого-то единого пути биосинтеза, присущего всем видам растений, содержащим стероидные гликозиды. Весьма вероятно, что уже на первых этапах биосинтеза происходит глюкозилирование С-26 (или С-27) атома оксихолестерина. Обнаружение в растениях 26-0-глюкопиранозид-(25R)- Δ^5 -фуростен-3 β ,22,26-триола подтверждает это предположение [116].

На различных стадиях биосинтеза может происходить и гидроксирование стероидного ядра, ведущее к образованию ди-, три- и тетраоксиспиростанолов [190]. Насыщение кольца В при формировании 5 α - и 5 β -спиростаноловых производных может происходить и на более ранних, и на более поздних стадиях биосинтеза [206].

В литературе имеются указания и на взаимопревращения в ряду стероидных сапогенинов. Так, в *D. tokoro* 3 β -оксигенины превращались в 3 α -оксигенины через промежуточную стадию смиллагенина [191, 192]. В гомогенатах корневищ *D. deltoidea* также

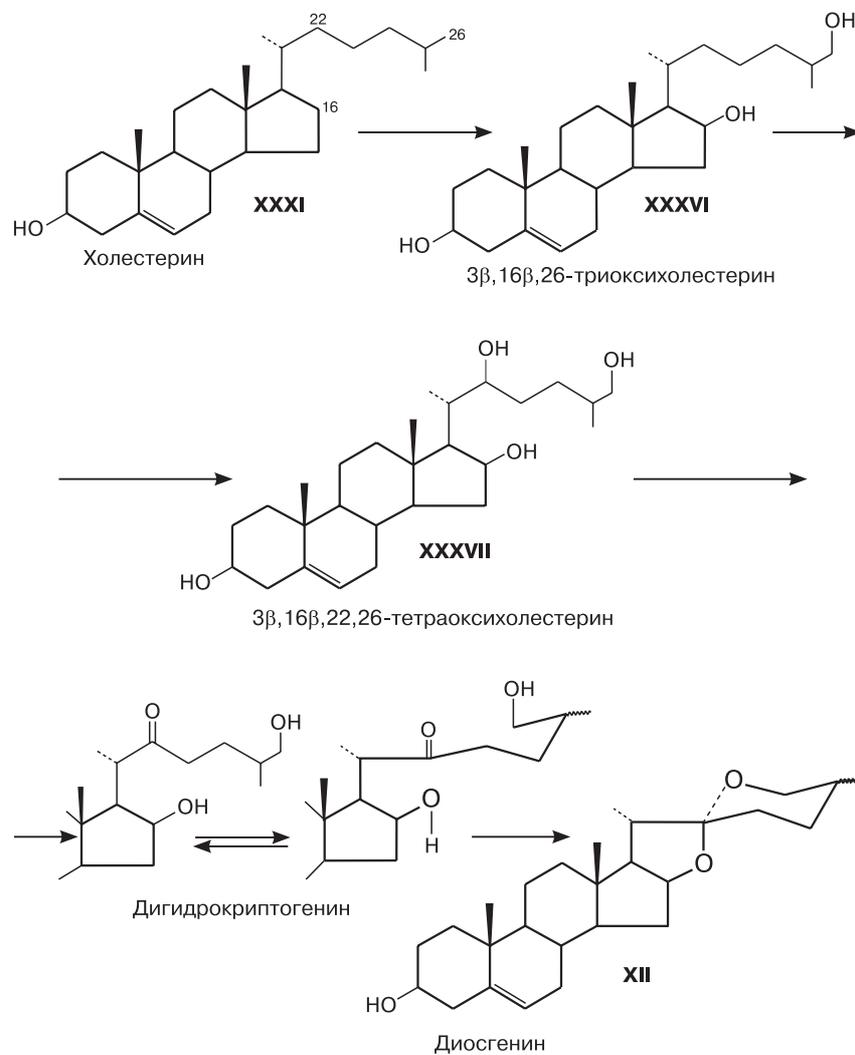


Схема 7. Возможный путь биосинтеза диосгенина из холестерина.

наблюдали превращение диосгенина в смилагенин наряду с дезгликозилированием гликозидов в генины [153]. В связи с этим заслуживает внимания мнение такого ведущего ученого, как Чеше, заложившего экспериментальные основы изучения биосинтеза стероидов. Он считал маловероятным, чтобы менее окислен-

ные спиростанолы служили предшественниками более окисленных, так как процесс дополнительного окисления осуществляется на более ранних стадиях биосинтеза [205].

Во всех обсуждавшихся выше экспериментах после введения меченного предшественника растительный материал подвергался кислотному гидролизу с целью выделения свободных сапогенинов, которые легче получить в индивидуальном виде и очистить до постоянной удельной активности. Очень немного работ, выполненных на целых растениях и культуре клеток, позволили предположить, что в растениях стероидные гликозиды образуются в листьях в виде фуростаноловых производных, а при перетекании в подземные органы могут частично расщепляться до спиростаноловых гликозидов [57, 80].

В последние годы появились сообщения о биосинтезе углеводной цепочки стероидных гликозидов [13, 130, 169, 170]. Так в листьях овса *Avena sativa* L. была найдена гликозилтрансфераза, эффективно катализирующая гликозилирование псевдо-спиростанолового сапогенина нуагигенина в присутствии УДФ-глюкозы, как донора сахара [128, 129, 130]. Впоследствии из *Asparagus officinalis* и *Asparagus plumosus* была получена смесь ферментных препаратов, катализирующих гликозилирование таких сапогенинов, как сарсапогенин или ямогенин [165, 166], а из листьев баклажана *Solanum melongena* L. выделили ферментные препараты, катализирующие гликозилирование диосгенина и некоторых других $\Delta^{5(6)}$ или $(5\alpha\text{H})$ спиростанолов (тигогенина, ямагенина или гекогенина) [167]. Продукты реакции, образующиеся после инкубации ферментов из *S. melongena* с меченой УДФ-глюкозой и диосгенином или тигогенином, были идентифицированы как диосгенин (или тигогенин) 3-0-моноглюкозид, предполагаемый предшественник в синтезе стероидных гликозидов *S. melongena* — мелонгозидов.

Известно, что многочисленные виды растений рода *Solanum* могут параллельно синтезировать стероидные гликозиды и гликоалкалоиды. Сходство структуры их агликонов, т.е. спиростаноловый тип сапогенинов и спиросолановый тип алкалоидов, а так же часто наблюдаемое сходство строения углеводной цепочки позволяет предположить, что образование обоих типов стероидных олигозидов может катализироваться одними и теми же гликозилтрансферазами. В работах Пацковского с соавт. [169, 170] было показано, что в листьях *S. melongena* 3-0-гликозилирование стероидных сапогенинов или агликонов гликоалкалоидов (соласодина) катализируется двумя различными УДФ-глюкозо-зависимыми гликозилтрансферазами. Эти два фермента проявляли общие свойства, но разли-

чались при использовании некоторых энзиматических эффекторов, включающих неионные детергенты, стеринны, фосфолипиды, диосгенин 3-0-β-D-глюкопиранозид. Авторы считают, что по крайней мере, первая реакция в образовании сахарной цепи мелонгозидов и гликоалкалоидов с агликоном соласодином, синтезируемых в баклажане, регулируется независимо друг от друга. В последнее время опубликован целый ряд работ о существовании в растениях многочисленных гликозилтрансферазных изоформ, которые различаются спецификой агликона и действие которых регулируется различными генами (см. ссылки в [170]).

Эксперименты, проведенные на суспензионной культуре клеток *D. deltoidea* штамм ИФР ДМ-0,5, позволили доказать, что углеводная часть присоединяется к сапогенину не в виде готового углеводного фрагмента, а поэтапно. Ранее было показано [10], что в суспензионной культуре клеток диоскореи указанного штамма синтезируются биозид (α-L-рамнозил-(1→2)-β-D-глюкопиранозид 26-0-глюкопиранозид Δ⁵-фуростен-3β,22,26-триола) (XVIII) и триозиды — протодиосцин (XIX) и дельтозид (XVII). В опытах с [2-¹⁴C]-ацетатом сравнивали включение метки в стероидные гликозиды и стеринны культивируемых клеток. Оказалось, что удельная активность биозида была в несколько раз выше удельной активности триозидов. Эта разница наблюдалась на всех стадиях развития культуры клеток, причем в экспоненциальной фазе она была особенно ярко выражена. На основании этих результатов было сделано заключение, что стероидные гликозиды образуются в клетках суспензионной культуры *D. deltoidea* как в экспоненциальной, так и в стационарной фазе. Биосинтез триозидов осуществляется через промежуточную стадию биозида — общего предшественника протодиосцина и дельтозида, биосинтез которых заканчивается присоединением рамнозы или глюкозы к С-4 атому глюкозного остатка биозида соответственно, причем триозиды не могут взаимопревращаться [13]. Существенное превышение удельной активности стериннов над таковой стероидных гликозидов подтвердило их роль «родоначальников» сапогенинов в культуре клеток *D. deltoidea*.

Обнаруженный в листьях *D. deltoidea* стероидный гликозид протодельтофолин (XX) и его спироаналог дельтофолин, ацилированный ОМГ по С-4 атому остатка рамнозы, является интересной моделью для изучения отдельных этапов биосинтеза. В опытах с мечеными [¹⁴C] CO₂, ацетатом, сахарозой и МВК в качестве предшественников дельтофолина в листьях обнаружили заметное включение всех этих соединений в гликозид, однако в отдельных

частях молекулы распределение метки сильно различалось. В опытах с [2-¹⁴C]-МВК наблюдали весьма эффективное включение радиоактивности в сапогениновую часть (за 24 часа оно составило 5,3%), а углеводная и ацильная часть не несли метки. В то же время ¹⁴CO₂, [¹⁴C]-сахароза и [2-¹⁴C]-ацетат за 24 часа включались преимущественно в ацильную часть дельтофолина, которая содержала 78,5–82,4% общей метки [53, 54]. Эти данные указывали, что ОМГ в составе дельтофолина образуется из продуктов фотосинтеза с большей скоростью, не синхронно с образованием диосгенина и диосцина, т.е. независимо от биосинтеза диосцина. Это можно объяснить также тем, что в листьях диоскорееи имеется значительный пул свободного диосцина и нет свободной ОМГ (или ее КоА-эфира).

Различия в распределении метки, наряду с присутствием свободного диосцина в листьях, позволили постулировать, что биосинтез дельтофолина происходит путем этерификации диосцина ОМГ или ее КоА-эфиром, а не путем присоединения ацилированной предварительно рамнозы к диосгенин-3-0-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-β-D-глюкопиранозиду [58].

Результаты экспериментов с листьями и культурой клеток *D. deltoidea* указывают на то, что в процессе биосинтеза стероидных гликозидов происходит «сборка» отдельных фрагментов в молекулу нативного гликозида.

V. МЕТАБОЛИЗМ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Быстрое включение метки из ¹⁴CO₂, [¹⁴C]-сахарозы и [2-¹⁴C]-ацетата в ацильную часть дельтофолина позволило предположить, что связывание ОМГ с диосцином в листьях *D. deltoidea* может быть временным явлением, обусловленным необходимостью ее «детоксикации», поскольку эта кислота в связанном виде тормозит активность 3-окси-3-метилглутарил-КоА редуктазы. Однако существует и вероятность того, что ацилирование, связанное с увеличением полярности молекулы стероидного гликозида, приводит к ускорению транспорта гликозидов по флоэме из листьев, где они синтезируются, в подземные органы, где они накапливаются.

В связи с этим интересны данные по включению радиоактивности из [¹⁴C]-протодельтофолина, содержащего 2/3 радиоактивности в ацильной части, в β-каротин и стерины в листьях *D. deltoidea* [21]. Было показано, что ацилирование стероидных гликозидов ОМГ, происходит только в автотрофных, фотосинтезирующих тканях *D. deltoidea* (листья, стебли). Можно предпо-

ложить, что в хлоропластах этих тканей активно действует альтернативный, немевалонатный путь биосинтеза ИПФФ. Поэтому в цитоплазме может накапливаться избыточная ОМГ, которая и связывается со стероидными гликозидами, биосинтез которых осуществляется в том же компартменте клетки.

Как уже отмечалось выше, превращение фураностаноловых гликозидов в спиростаноловые гликозиды происходит при отщеплении остатка глюкозы от С-26 атома боковой цепи (схема 1). Этот процесс катализирует эндогенная специфичная β -глюкозидаза, обнаруженная в листьях *D. deltoidea* [23, 24]. С помощью субклеточного фракционирования гомогената листьев установили, что этот фермент локализуется в основном в грубой фракции мембран хлоропластов. В то же время в листьях этого вида диоскореи присутствует неспецифичная β -глюкозидаза, расщепляющая синтетический субстрат — *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозид. Активность этого фермента была сосредоточена в основном во фракции водорастворимых белков [22]. Помимо локализации эти ферменты отличались друг от друга по величине рН оптимума (6,6 и 5,5 соответственно). Специфичная β -глюкозидаза отличалась также высокой термостабильностью: нагревание при 65° в течение 15 минут не сказывалось на активности фермента, в то время как неспецифичная β -глюкозидаза в этих условиях инактивировалась почти полностью [24]. Интересен тот факт, что в листьях диоскореи специфичная к фураностаноловым гликозидам β -глюкозидаза проявляла гораздо большее сродство к субстрату, чем неспецифичная арил- β -глюкозидаза. Дельтозид, протодельтофолин и протодиосцин расщеплялись специфичной β -глюкозидазой с одинаковой скоростью, т.е. строение углеводного фрагмента у С-3 атома сапогенина не влияло на скорость отщепления глюкозы от С-26 атома [24].

Специфичная β -глюкозидаза, отщепляющая глюкозу от С-26 атома сапогенина в авенакозидах А и В (формально их нельзя отнести к фураностанолам), была обнаружена в листьях *Avena sativa*, где она была локализована в мембранах тонопласта [104]. Поиск олигофураностанозидспецифичных β -глюкозидаз привел к их обнаружению в ряде других растений, биосинтезирующих стероидные гликозиды. В соцветиях дикого лука *Allium erubescens* нашли β -глюкозидазу, катализирующую превращение дельтозида в дельтонин и эндогенных фураностаноловых гликозидов в спиростаноловые. Эта β -глюкозидаза отличалась высокой термостабильностью, широкой субстратной специфичностью, поскольку расщепляла гликозиды 5- и различных агликонов и арил- β -D-глюкозиды. В отличие от

аналогичного фермента из листьев диоскореи, активность β -глюкозидазы из соцветий дикого лука была локализована во фракции растворимых белков [7, 8].

В корневищах и в проростках *Costus speciosus*, культивируемых *in vitro*, присутствует специфичная β -глюкозидаза, превращающая фуростаноловый гликозид протограциллин в его спироаналог грациллин. Из корневищ этого вида выделили ферментный препарат с рН оптимумом 5,0 и величиной K_m для протограцилина 0,10 мМ. Интересно, что при субклеточном фракционировании активность этой β -глюкозидазы распределялась практически поровну между постмитохондриальной фракцией и фракцией растворимых белков. В этом растении наблюдали строгую взаимосвязь между распределением стероидных гликозидов в отдельных органах растения и присутствием в них специфичной β -глюкозидазы [118].

В листьях юкки славной *Yucca gloriosa* также обнаружили β -глюкозидазы, отличающиеся по специфичности. Активность одной из них, расщепляющей фуростаноловые гликозиды, была локализована в основном (76,5% всей активности) во фракции растворимых белков, однако часть активности (10,3%) была сосредоточена в грубой фракции хлоропластов [25].

В листьях *D. deltoidea* и юкки фуростаноловые гликозиды образуются по-видимому в мезофильной ткани листа, а накапливаются в эпидермисе в особых клетках вместилищах [22, 25]. Различная тканевая и внутриклеточная локализация субстрата и фермента обеспечивает в листьях сохранность фуростаноловой структуры, необходимой для транспорта этих соединений к местам их накопления. Однако при повреждении ткани листьев фермент приходит в соприкосновение с субстратом, что влечет за собой практически полное превращение фуростаноловых гликозидов в спиростаноловые. Последние выступают в листьях в качестве эндогенных факторов защиты от фитопатогенных микроорганизмов, поскольку их фунгицидная и антибактериальная активность превышает таковую фуростаноловых гликозидов [17, 46].

Роль эндогенных олигофуранозидспецифичных β -глюкозидаз, сводится не только к защите растений от фитопатогенных микроорганизмов. При выделении сапогенинов из растительного сырья после кислотного гидролиза уже в течение многих лет применяли предварительную ферментацию путем настаивания размельченного растительного материала (корневища, листья) с водой. Эта процедура обеспечивала повышение выхода сапогенинов на 20—30%, по сравнению с таковым из неферментированного сырья. Оказалось, что при ферментации фуростаноловые гликозиды

под действием эндогенных β -глюкозидаз превращаются в спиростаноловые, кислотный гидролиз которых сопровождается меньшими потерями сапогенинов по сравнению с гидролизом фуростаноловых гликозидов [49]. В том случае, когда эндогенная β -глюкозидаза мало активна, процесс ферментации сапонинсодержащего сырья можно ускорить и повысить его эффективность с помощью экзогенных препаратов грибного происхождения [57].

VI. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СТЕРОИДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Стероидные гликозиды являются высокоактивными соединениями, что связано, по-видимому, с сочетанием в одной молекуле двух частей — стероидной и углеводной. Различие в строении спиростаноловых и фуростаноловых гликозидов обуславливает некоторое различие их биологической активности. Присутствие в молекуле спиростаноловых гликозидов полярной и неполярной частей (монодесмозиды) определяет их ярко выраженные детергентные свойства. Размыкание кольца F с присоединением у C-26 молекулы глюкозы приводит к резкому увеличению полярности и ослаблению детергентных свойств стероидного гликозида. Бидесмозидные фуростаноловые гликозиды легко растворимы в воде и других полярных растворителях [1].

Одним из важных свойств стероидных спиростаноловых гликозидов, определяющих их биологическую активность, является их способность образовывать комплексы со стеринами. Благодаря этому стероидные гликозиды обладают гемолитической, гипохолестеролемической, противоопухолевой, фунгицидной, антимикробной и другими видами биологической активности [206].

Проявление гемолитической активности сапонинов связывают с их способностью образовывать комплексы с холестерином эритроцитарных мембран, что приводит к лизису последних. Это свойство используется для скрининга стероидных гликозидов в растительном сырье. Изучение механизма гемолиза стероидных гликозидов позволило предположить, что при адсорбции полярных концов молекул стероидных гликозидов на поверхности мембран эритроцитов под действием ферментов (β -глюкозидаз) происходит гидролиз по гликозидной связи с образованием генинов, способных образовывать комплексы с холестерином мембран и вызывать их разрушение, что сопровождается гемолизом эритроцитарной клетки [39, 183]. Ингибиторами гемолиза являются альдонолактоны, которые способны снимать активность β -глюкозидаз [184]. Было

показано, что гемолитическая активность зависит от строения и типа гликозида. Полярные группировки (глюкоза) у С-26 агликона уменьшают, тогда как гидрированная боковая цепь агликона увеличивает гемолитическую активность [206]. Значительный гемолиз наблюдали под действием спиростаноловых гликозидов, фуростаноловые гликозиды проявляли активность на порядок меньше [39].

Та же способность образовывать нерастворимые комплексы с холестерином определяет гипохолестеролемические свойства стероидных гликозидов, которые нашли применение в медицине для лечения атеросклероза и сердечно-сосудистой системы. Изучение гипохолестеролемических свойств стероидных гликозидов показало, что спиростаноловые гликозиды более активны, чем фуростаноловые, которые, независимо от количества сахаров, не снижают уровень холестерина. Было показано, что активность стероидных гликозидов зависит от природы агликона, которые по степени увеличения активности приблизительно можно расположить следующим образом: производные гекогенина, рокогенина, сарсапогенина, диосгенина, гитогенина и дигитогенина. Активность спиростаноловых гликозидов возрастает с увеличением количества моносахаров в углеводной цепочке. Наибольшая активность наблюдается у гликозидов с 3–5-ю сахарными остатками [39].

Для снижения содержания холестерина в крови были получены антисклеротические препараты, представляющие собой экстракты из корневищ *Dioscorea caucasica* (диоспонин) и *Dioscorea nipponica* (полиспонин) [44, 62, 63]. Постоянный прием стероидных гликозидов из семян *Trigonella foenum-graecum*, также способствует снижению общего холестерина и его эфиров в плазме крови [180]. Было показано, что при этом около 60% стероидных гликозидов в пищеварительном тракте животных подвергается гидролизу с образованием свободных сапогенинов, которые также участвуют в связывании холестерина, снижении концентрации холестерина печени и увеличении превращения холестерина в желчные кислоты [180, 181].

Еще в 60-х годах, при изучении действия стероидных гликозидов на различные виды грибов и микроорганизмов, была обнаружена их высокая способность ингибировать рост и развитие фитопатогенов [206]. При изучении фунгицидной активности стероидных гликозидов диосгенина, сарсапогенина, гитогенина, неотигогенина, рокогенина, дигитогенина и тигогенина, выделенных из растений функии, дигиталиса, агавы американской, пажитника, семян томатов и перца было показано, что ингибирующим

действием на возбудителей болезней пасленовых *Phytophthora infestans* и *Verticillium alboatrum* обладают только спиростаноловые гликозиды, фуростаноловые гликозиды были неактивны или незначительно тормозили развитие гриба [39]. Авторы отмечали, что важное значение в проявлении фунгитоксичности спиростаноловых гликозидов играет структура агликона, наличие при нем полярных групп, его липофильность, а также длина углеводной цепочки [39, 181]. Механизм действия стероидных гликозидов на грибы объясняли в основном их способностью образовывать комплексы со стеринами, приводящей к нарушению целостности грибных мембран.

При изучении влияния стероидных гликозидов диосгенина, выделенных из корней *D. deltoidea* на конидии *Fusarium solani* и зооспоры *Phytophthora infestans* — фитопатогенных грибов растений — было отмечено, что дельтонин (спиростаноловый гликозид) и дельтозид (его фурананалог) сильно тормозят рост и прорастание зооспор *P. infestans*. В то же время ни эти гликозиды, ни их агликон диосгенин не оказывали заметного фунгитоксического действия на *F. solani*. Эксперименты, направленные на выяснение механизма фунгитоксичности, не позволили выявить прямую взаимосвязь между способностью к комплексообразованию с холестерином и мембранолитической активностью стероидных гликозидов. Так было показано, что фунгитоксичность дельтонина и дельтозида примерно одинакова, а в ряде случаев дельтозид был токсичнее дельтонина. В то же время дельтонин обладает высокой мембранолитической активностью, а дельтозид — не обладает. Авторы делают вывод о том, что механизм фунгитоксичности стероидных гликозидов не определяется только их мембранолитическим действием [17].

При изучении мембранолитического действия различных стероидных гликозидов на мицелий фитопатогенных грибов *Botrytis cinerea* и *Rhizoctonia solani* было показано, что необходимым условием мембранолитического действия стероидных гликозидов является присутствие в мицелии β -гликозидаз, способных расщеплять их с образованием сапогенинов, так как именно сапогенины проявляют наибольшую активность при разрушении грибных мембран [185].

Зависимость биологической активности от химического строения наблюдается при действии стероидных гликозидов на ряд бактерий, дрожжей и дрожжеподобные грибы [43]. Было показано, что спиростаноловые гликозиды с тремя и больше моносахарами в углеводной цепи в концентрации 100 мкг/мл подавляли рост микроорганизмов *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* и дрожжей рода *Candida*, при этом их активность зависела от структуры

агликона — наличия в нем функциональных групп, а также от вида микроорганизма. Фуростаноловые гликозиды и их агликоны проявляли слабую антибактериальную активность, а для спиростаноловых гликозидов отмечали более высокую активность по отношению к дрожжам, чем к бактериальным культурам [43]. Во всех изученных тестах на антимикробную активность спиростаноловые гликозиды подавляли развитие только Грам–положительных бактерий, против Грам–отрицательных бактерий активность их была значительно ниже или вовсе отсутствовала [43, 46, 199]. Изучение антибактериальной активности дельтонина и дельтозида, выделенных из *D. deltoidea*, показало, что в концентрации 200 мкг/мл дельтонин в отличие от дельтозида ингибировал цитохромный участок дыхательной цепи бактериальной клетки *Micrococcus lysodeikticus*. Дельтозид ингибировал дыхательную цепь бактерии в концентрации на два порядка выше, чем дельтонин, а агликон диосгенин вовсе не ингибировал активность оксидаз. Так как мембраны бактериальных клеток не содержат стеринов, по–видимому, механизм действия стероидных гликозидов на мембраны прокариот связан с образованием комплекса с белковой фракцией мембран. Предположили, что стероидные гликозиды, действуя как поверхностно активные соединения, выщепляют цитохромные белки клетки, что приводит к остановке работы всей дыхательной цепи и торможению активности оксидаз [46, 66].

Изучение антибактериального и фунгицидного действия стероидных гликозидов позволяет предположить, что их токсическое действие связано со способностью к комплексообразованию не только со стеринами мембран, но и с другими мембранными компонентами, такими как белки и фосфолипиды. Результатом взаимодействия может быть деструкция клеточной мембраны и увеличение ионной проницаемости [2, 103]. Кроме того, была отмечена способность стероидных гликозидов спиростанолового ряда воздействовать на АТФ–азную активность митохондриальных мембран, вызывая нарушение процессов окислительного фосфорилирования митохондрий [3, 64, 146].

Таким образом, стероидные гликозиды растений можно рассматривать как естественный фактор защиты их от фитопатогенов. Неактивные против грибов и микробов фуростаноловые гликозиды, при внедрении в растительную клетку патогена под действием β –гликозидаз образуют активную спиростаноловую форму стероидных гликозидов, которые ингибируют развитие грибов или других патогенных микроорганизмов [56].

Как показывают исследования последних лет, стероидные гликозиды оказались токсичными не только для грибов и бактерий, но и для моллюсков [159]. В 1982 г. из растущей в Судане пальмы *Balanites aegyptiaca* были выделены стероидные гликозиды ямогенина баланитины, проявляющие моллюскоцидную активность [42]. В дальнейшем моллюскоцидную активность обнаружили у целого ряда стероидных гликозидов, выделенных из различных растений. Спиростаноловые сапонины производные гекогенина – канталасапонины из корневищ *Agave cantala* – были ядовитыми для улитки *Biomphalaria glabrata*, вызывая ее гибель в концентрации 7 м.д. [172]. Установлено, что защита *Allium vineale* против нападения улитки *Biomphalaria pfeifferei* осуществляется также при помощи стероидных гликозидов, выделенных из луковиц этого растения [42]. Из африканского «мыльного дерева» рода *Dracaena* выделили два стероидных гликозида, которые в концентрации 5 м. д. вызывали 100% гибель улиток *Bulinus globosus*, *Bulinus forskalii*, *Biomphalaria pfeifferei* в течение 3 ч [164].

Установлено, что некоторые стероидные гликозиды обладают антифидантной активностью. Спиростаноловые гликозиды ямогенина, выделенные из коры индийского растения *Balanites roxburghii*, проявляют высокую антифидантную активность по отношению к насекомым *Diacresia obliqua* [121].

Изучение антиоксидантной активности стероидных гликозидов показало, что во всех случаях фуростаноловые гликозиды были более активными, чем спиростаноловые [38]. Антиоксидантные свойства спиростаноловых гликозидов и их агликонов, имеющих ОН–группу у С–3 примерно одинаковы. Увеличение числа свободных гидроксильных групп у сапогенинов (рокогенин, гитогенин, дигитогенин) приводит к увеличению антиоксидантной активности. Антиоксидантную активность фуростаноловых гликозидов связывают с наличием подвижного атома водорода гемикетальной гидроксильной группы при С–22 и образованием стабильного промежуточного радикала ингибитора [39].

Антиоксидантные свойства фуростаноловых гликозидов культуры клеток *D. deltoidea*, представленных дельтозидом и протодиосцином, изучали в модельных экспериментах *in vitro* по изменению активности основных ферментов антиоксидантной системы: супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза, каталаза, а также по изменению биомеханических и гидротропных свойств кожи в условиях УФ–излучения. Было отмечено значительное увеличение активности всех ферментов при достаточно низких концентрациях фуростаноловых гликозидов (10^{-4} мг/мл), к тому же наблюдали

увеличение модуля упругости и снижение остаточной деформации, что характерно для препаратов актопротекторного действия [27, 28]. Благодаря этим свойствам фураностаноловые гликозиды могут быть рекомендованы в качестве протектора, способного защищать кожу от вредных атмосферных воздействий, а также предупреждать ее старение.

Антиоксидантные свойства фураностаноловых гликозидов были использованы для криоконсервации спермы сельскохозяйственных животных. Было показано, что гликозиды ряда фураностана снижают перекисное окисление липидов на 9–15% и увеличивают подвижность сперматозоидов после размораживания на 40% [34].

Стероидные гликозиды действуют на репродуктивную систему животных, стимулируя овуляцию и сперматогенез [14, 32, 145]. Испытание фураностаноловых гликозидов культуры клеток *D. deltoidea* на крысах и кроликах показало, что стероидные гликозиды в дозах от 1,0 до 3,0 мг/кг при многократном (6–8 раз) введении стимулировали овуляцию у лабораторных животных [14]. Подобное действие оказывали и фураностаноловые гликозиды из *Tribulus terrestris* [32]. Кроме лабораторных испытаний фураностаноловые гликозиды диоскореи применили в ветеринарии для лечения бесплодия у крупного рогатого скота при гипофункции яичников коров. Однократное введение фураностаноловых гликозидов в дозе 800 мг/корову приводило к увеличению оплодотворяемости в 2–2,5 раза [14].

Было выявлено контрацептивное действие стероидных гликозидов [4, 40, 216]. Так, было показано, что стероидные гликозиды растений из сем. *Liliaceae* оказывают ингибирующее действие на сперматозоиды человека *in vitro*, причем спермицидальную активность стероидных гликозидов связывали со строением их молекулы. Отмечено, что наибольшей активностью обладают спиростаноловые монодесмозиды, которые проявляли большую активность, по сравнению с бисдесмозидными спиростаноловыми и фураностаноловыми гликозидами. Значительно снижает активность наличие в одной структуре карбонильной группы при С–12 и двойной связи $\Delta^{5,6}$ [216].

Высокую противоопухлевую активность обнаружили у большинства испытанных стероидных гликозидов, выделенных из различных семейств растений: *Dioscoreaceae* [58], *Agavaceae*, *Alliaceae*, *Asparagaceae* [39], *Liliaceae* [216], *Solanaceae* [163]. Было замечено, что более активными были стероидные гликозиды спиростанолового ряда. Фураностаноловые гликозиды, также как и свободные сапогенины, в большинстве случаев оказались неактивными. Экспериментально было показано, что углеводная цепочка играет

значительную роль в торможении роста опухоли: большую активность проявляли гликозиды, в олигосахаридной цепи которых содержалось более трех моносахаров [39, 145]. Предположили, что стероидные гликозиды входят в клетку при помощи эндогенных лектинов, которые являются специфическими рецепторами для молекулы сахара [163]. Таким образом, углеводная часть выполняет вспомогательную транспортную роль для стероидной части молекулы. Было также показано, что противоопухолевая активность зависит и от структуры агликона (стероидной части молекулы) — количества гидроксильных и кетогрупп, наличия двойных связей. По степени возрастания противоопухолевого действия стероидные гликозиды располагают в следующий ряд: производные диосгенина, гитогенина, рокогенина, гекогенина, сарсапогенина, тигогенина, неотигогенина [39].

У фураностаноловых гликозидов культуры клеток *D. deltoidea* при действии на разные субпопуляции лимфоцитов обнаружили высокую иммуномодулирующую активность. На культуре изолированных лейкоцитов было показано, что действие фураностаноловых гликозидов зависит от концентрации, вызывая либо стимуляцию, либо супрессию пролиферативного ответа лимфоцитов на митогенный стимул фитогемагглютининов (ФГА). Наибольшее стимулирующее действие гликозиды проявляли в концентрации от 0,01 до 0,1 мкг/мл, а в концентрации от 1,0 до 100 мкг/мл — оказывали ингибирующее действие на пролиферативный ответ лимфоцитов, индуцируемый ФГА [14].

Иммуномодулирующее (регуляторное) действие оказывали стероидные гликозиды на жизнеспособность пыльцы межвидовых гибридов томатов. При этом наблюдали как стимуляцию, так и ингибирование процесса прорастания пыльцы. В большой концентрации стероидные гликозиды являлись сильными ингибиторами прорастания, а при разбавлении — либо не влияли, либо стимулировали ее жизнеспособность [145].

У фураностаноловых гликозидов из культуры клеток *D. deltoidea* и растения *T. terrestris*, представленных гликозидами диосгенина, была обнаружена способность стимулировать синтез белков и активизировать некоторые ферменты (сукцинат—лактатдегидрогеназы и цитохромоксидазы), связанные с обменом энергии [26, 65, 29]. Наиболее сильно анаболическое действие фураностаноловых гликозидов, связанное со значительным приростом массы тела животных, проявилось при дозах сапонина от 5 до 10 мг/кг. Вес животных увеличивался почти в 3,5 раза. При исследовании влияния фураностаноловых гликозидов на синтез биополимеров (белок, РНК, ДНК)

было показано, что при дозе стероидного гликозида 30 мг/кг количественное соотношение биополимеров в ткани сердечной мышцы значительно изменилось: в 4 раза увеличился показатель РНК/белок ($\times 10^3$), возросло соотношение РНК/ДНК (с 0,22 до 1,44). Это свидетельствует о том, что в сердечной мышце происходит активный синтез белка. Подтверждением этому является двукратное увеличение содержания оксипролина в сердечной мышце при той же дозе фураностанолового гликозида (30 мг/кг). Масса сердца при этом остается неизменной [29]. Возможно благодаря своей способности активизировать синтез коллагеновой фракции белков в сердечной мышце фураностаноловые гликозиды найдут широкое применение в кардиологии для ускорения репаративных процессов в сердце при лечении инфаркта миокарда.

Стимуляция роста и фитоиммунитета растений фураностаноловыми гликозидами позволяет рассматривать эти соединения как природные адаптогены. В результате обработки семян растворами фураностаноловых гликозидов значительно повышается их всхожесть, скорость прорастания, адаптация растений к стрессовым условиям окружающей среды, устойчивость к болезням. При замачивании семян томатов в 1×10^{-3} М растворе фураностаноловых гликозидов из культуры клеток *D. deltoidea* их прорастание ускоряется на 2—3 сут. [33]. Обработка семян сахарной свеклы в растворе стероидных гликозидов увеличивает урожайность на 30—40%, всхожесть некондиционных семян повышается на 30% [41]. Растения табака, выращенные после обработки семян стероидными гликозидами из *Nicotiana tabacum* (никотианозидами), практически не поражались вирусом табачной мозаики (ВТМ), вирусом бронзовости томатов, у—вирусом картофеля [187]. При изучении индуцированной стероидными гликозидами устойчивости растений к вирусной инфекции было показано, что стероидные гликозиды индуцируют образование новых белков, а также повышают активность РНК—азы в 2,5 раза. Увеличение активности ключевого фермента клетки РНК—азы, вероятно, направлено на деполимеризацию РНК вируса. Это подтверждается опытами по изучению изменения активности РНК—азы в листьях томатов, зараженных ВТМ, под действием стероидных гликозидов. [39]. Таким образом, стероидные гликозиды способны изменять метаболизм зараженного вирусом растения, активизируя его защитные реакции и индуцируя устойчивость к вирусной инфекции.

Изменение белкового метаболизма является отражением тех сдвигов, которые происходят на ультраструктурном уровне. При заражении вирусом именно в митохондриях иммунных и устой-

чивых сортов синтезируются новые белки (см. ссылки в [39]). Кроме этого вирусная инфекция нарушает структуру хлоропластов неустойчивых сортов растений. Обработка зараженных растений стероидными гликозидами восстанавливает ультраструктурную организацию клетки, нарушенную вирусной инфекцией [187].

Так же было отмечено, что фураностаноловые гликозиды способны воздействовать на состав хлоропластных фотосинтетических пигментов. На растениях томатов, зараженных галловой нематодой (модель биогенного стресса) и обработанных фураностаноловыми гликозидами, наблюдали значительное увеличение содержания пигментов фотосинтеза (на 15,7%), при этом происходило возрастание общего содержания каротиноидов и изменение их соотношения, особенно пигментов виолаксантинового цикла (ВКЦ) — увеличение доли зеаксантина (в 2,7 раза), антраксантина (в 1,3 раза) и виолаксантина (в 3,6 раза) [16]. По существующим представлениям ВКЦ может быть частью регуляторной системы при фотосинтезе, важную роль в которой отводят зеаксантину, способному предохранять фотосинтетический аппарат от фотодеструкции в условиях стресса растения [47, 96]. Инвазия томатов галловой нематодой приводит к стрессу и интенсификации окислительных процессов в тканях растений [15]. Для фотосинтетического аппарата это выражается в возрастании содержания более окисленного ксантофилла виолаксантина, содержание которого увеличивается на 44,3% [16]. По-видимому в присутствии фураностаноловых гликозидов (антиоксидантов) создаются условия, при которых виолаксантин путем дезэпоксидирования через антраксантин превращается в зеаксантин. Наблюдаемое значительное снижение доли β -каротина в сумме каротиноидов и возрастание доли ксантофиллов вероятно можно объяснить тем, что фураностаноловые гликозиды путем сдвига метаболизма каротиноидов в сторону образования пигментов ВКЦ, играющих защитную роль, могут способствовать стабилизации фотосинтетического аппарата, что особенно важно в стрессовых условиях.

Таким образом, повышение устойчивости растений к патогенам под действием стероидных гликозидов связано с изменениями, происходящими в клетке растения на биохимическом уровне. Предварительная обработка семян томатов 0,1%-ным раствором фураностаноловых гликозидов диоскореи повышала устойчивость растений к фитогельминту галловой нематоды *Meloidogyne incognita* [15]. Для выяснения причины действия стероидных гликозидов на патогенность фитогельминтов, опосредованного растением, были изучены некоторые биохимические показатели зараженного расте-

ния, а также морфо—физиологические характеристики галловой нематоды. Было показано, что значительное снижение жизнеспособности паразита сопровождается повышением иммунных характеристик растения. Уже через 3 ч после обработки листьев томатов стероидными гликозидами активность пероксидазы в корнях увеличивается в 2 раза, что свидетельствует о быстрой передаче сигнала, вызванного стероидным гликозидом, из надземных органов растения в корни, где вследствие этого возрастает иммунитет к фитогельминтам [15]. Известно, что галловая нематода — стеринзависимый паразит. Заражение растений томатов этим фитогельминтом сопровождается значительным повышением (в 1,2 раза) содержания стериннов в корнях. У растений, обработанных стероидным гликозидом, инвазия нематодой не вызывает увеличение пула стериннов, их количество остается на таком же уровне, как и в здоровых корнях. Подавление биосинтеза стериннов, по—видимому, сказывается на жизнеспособности галловой нематоды, так как известно, что этот стеринзависимый паразит использует в своем цикле развития экзогенные стеринны [91]. Наблюдаемая перестройка стероидного биосинтеза под влиянием фураностаноловых гликозидов вызывает переключение путей биосинтеза со стериннов на другие изопреноиды, токсичные для фитогельминтов, например сесквитерпеновый фитоалексин ришитин, как это было установлено при заражении нематодой устойчивых сортов томатов [217]. Сигнал, вызванный обработкой семян стероидными гликозидами, приводит к заметному увеличению устойчивости растений к фитогельминтам и сохраняется в клетках продолжительное время. Таким образом, стероидные гликозиды воздействуют как на патоген, так и на растение—хозяина, повышая защитные свойства последнего.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря последним достижениям в технике разделения природных соединений и успехам в установлении их строения, получение новых индивидуальных стероидных гликозидов из ранее не обследованных видов растений очень быстро возрастает. Для испытания их биологической активности применяют самые разные способы биотестирования, что приводит к обнаружению соединений с самыми различными свойствами. Все это открывает новые перспективы в применении стероидных гликозидов в самых разнообразных областях биотехнологии, а также медицины и сельского хозяйства.

Стероидные гликозиды приносят пользу продуцирующим их растениям. Они защищают их от фитопатогенов, способствуют выживаемости растений при неблагоприятных условиях среды. Экологическое значение для растений фуростаноловых гликозидов определяется в первую очередь их горьким вкусом, который обычно препятствует поеданию их животными [69], а антифидантная активность спиростаноловых гликозидов позволяет растению защищаться от поедающих его насекомых [42]. Так стероидный сапонин агинозид, выделенный из цветков лука-порея *Allium porrum*, вызывает задержку в развитии личинок луковой моли *Acrolepiopsis assectella*, паразитирующих на этом растении, причем отмечено, что личинки употребляют только листья лука, избегая питаться его цветками.

Стероидные гликозиды, относящиеся ко вторичным метаболитам растений, наряду с инсектицидной активностью проявляют одновременно антигрибную, антидрожжевую, антибактериальную и противовирусную активности, которые не только защищают сельскохозяйственные растения от фитопатогенов, но и способствуют повышению урожайности этих растений [145]. В последние годы фузариоз — болезнь сельскохозяйственных злаковых культур — вызываемый грибами рода *Fusarium* Link, приводит к большим экономическим потерям, а также к ухудшению пищевой ценности зерна из-за увеличения содержания микотоксинов, опасных для здоровья людей. Привлечение для решения этой проблемы стероидных гликозидов позволяет не только ингибировать рост грибов и их спорообразование, но, благодаря их фитогормональным свойствам, ускорять прорастание и главным образом индуцировать устойчивость растений путем усиления их фитоиммунитета [114, 144]. Сапонины, внесенные в почву, способны изменять ее микрофлору, снижать поражаемость растений корневой гнилью, вызываемой *Phytophthora cinnamoni* [114]. Сапонины, являясь природными ростовыми регуляторами растений, имеют ярко выраженную аллелопатическую активность, что позволяет использовать их в качестве гербицидов, подавляющих прорастание семян сорных растений [215]. Возможно в будущем природные гербициды и инсектициды растительного происхождения вытеснят синтетические препараты, поскольку они не причиняют какого-либо ущерба экологии, не влияют отрицательно на флору и фауну, не накапливаются в почве и в атмосфере. Самое главное их преимущество заключается в высокой биологической активности, что позволяет применять их в очень малых дозах (10^{-6} — 10^{-7} М).

Широкий спектр биологического действия сапонинов позволяет использовать их в различных областях медицины, косметической и пищевой промышленности. Стероидные гликозиды индийской юкки *Yucca shidigera* и «мыльного дерева» *Dracaena* из Восточной Африки используются в качестве антигрибных и антидрожжевых компонентов в косметических средствах для защиты кожи и волос от образования перхоти и дерматомикозов, а также как консерванты, подавляющие развитие пищевых дрожжей и грибов. [164, 199]. Около 75 тритерпеновых и стероидных гликозидов, имеющих сладкий вкус, являются потенциальными заменителями сахара. Некоторые из них, например, стероидный гликозид полиподозид А из корневищ североамериканского папоротника *Polypodium glycyrrhiza*, почти в 600 раз превышает сладкий вкус 6%-ного сахара [138]. Семена пажитника *Trigonella foenum-graecum* используют в качестве пищевой добавки в специи «карри»; в традиционной медицине — как стимулирующее аппетит, тонизирующее и антидиабетическое средство [181]. Сапонины из корней солодки, как поверхностно активные соединения, используют для повышения светочувствительности фотопленок, в шампунях, зубных пастах, в напитках в качестве эмульгатора и пенообразующего консерванта [199].

В кратком обзоре невозможно охватить все сапонины, обладающие биологической активностью, которые представляют собой вещества перспективные для практического использования. Целью данного обзора было привлечь внимание к этому интересному для науки и практики классу природных соединений.

Успехи в биотехнологии, особенно в культивировании растительных клеток и тканей, позволят в будущем получать биологически активные соединения из редких растений. Это приведет к расширению ассортимента природных лекарственных средств и к сохранению истощающихся биоресурсов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 99–04–49173).

ЛИТЕРАТУРА

1. Абубакиров Н.К., Горовиц М.Б., Волернер Ю.С. // Химия спиростанолов. М.: Наука. 1986. С. 5–37.
2. Анисимов М.М., Чирва В.Я. // Успехи современной биологии. 1980. Т. 90. С. 351–364.
3. Белозерская Т.А., Демина В.А., Нуцубидзе Н.Н. // Прикл. биохим. и микробиол. 1994. Т. 30. С. 896–901.
4. Бойкова В.В., Корхов В.В., Пасешниченко В.А. // Растит. ресурсы. 1990. Т. 26. С. 85–87.

5. Бутенко Р.Г. // Культура клеток и биотехнология. М.: Наука. 1986. С. 4—20.
6. Бутенко Р.Г., Воробьев А.С., Носов А.М., Князьков И.Е. // Физиолог. растений. 1992. Т. 38. С. 1146—1149.
7. Вардосанидзе М.Г., Гуриелидзе К.Г., Пруидзе Г.Н., Пасешиченко В.А. // Биохимия. 1991. Т. 56. С. 2025—2031.
8. Вардосанидзе М.Г., Гуриелидзе К.Г., Пруидзе Г.Н., Пасешиченко В.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1992. Т. 28. С. 698—702.
9. Васильева И.С., Пасешиченко В.А., Гусева А.Р. // Химия природ. соединений. 1984. № 4. С. 404—406.
10. Васильева И.С., Пасешиченко В.А. // ДАН СССР. 1987. Т. 285. С. 767—768.
11. Васильева И.С., Воробьев А.С., Горская Н.В., Липский А.Х., Гуриелидзе К.Г., Пасешиченко В.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1987. Т. 23. С. 692—696.
12. Васильева И.С., Пауков В.Н., Карасев Н.Н., Пасешиченко В.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1988. Т. 24. С. 587—591.
13. Васильева И.С., Пасешиченко В.А., Урманцева В.В., Носов А.М., Чхеидзе Э.Г., Беззубов А.А. // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 564—570.
14. Васильева И.С., Пасешиченко В.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1995. Т. 31. С. 238—242.
15. Васильева И.С., Зиновьева С.В., Пасешиченко В.А., Удалова Ж.В. // Прикл. биохим. и микробиол. 1998. Т. 34. С. 560—563.
16. Васильева И.С., Зиновьева С.В., Ершов Ю.В., Пасешиченко В.А. // Докл. РАН. 2000. (в печати).
17. Васюкова Н.И., Пасешиченко В.А., Чаленко Г.И., Давыдова М.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1977. Т. 13. С. 172—176.
18. Воллернер Ю.С., Абдулаев. Н.Д., Горвиц М.Б., Абубакиров Н.К. // Химия природ. соединений. 1983. № 2. С. 197—201.
19. Герасименко И.И. // Растит. ресурсы. 1972. Т. 8. С. 161—175.
20. Гудвин Т., Мерсер Э. // Введение в биохимию растений. М.: Мир. 1986. Т. 2. 312 с.
21. Гуриелидзе К.Г., Пасешиченко В.А., Васильева И.С. // Биохимия. 1985. Т. 50. С. 1493—1498.
22. Гуриелидзе К.Г., Пасешиченко В.А., Васильева И.С. // Физиолог. растений. 1986. Т. 33. С. 1144—1151.
23. Гуриелидзе К.Г., Пасешиченко В.А., Васильева И.С. // ДАН СССР. 1986. Т. 286. С. 754—756.
24. Гуриелидзе К.Г., Пасешиченко В.А., Васильева И.С. // Биохимия. 1987. Т. 52. С. 562—568.
25. Гуриелидзе К.Г., Гиоргадзе Ц.А., Кемертелидзе Э.П., Пруидзе Г.Н. // Физиолог. растений. 1992. Т. 39. С. 300—304.
26. Димова П., Тасков М., Матев Т. // Медико-биологическая информация. 1988. № 1. С. 11—15.
27. Дубинская В.А., Васильева И.С., Минеева М.Ф., Николаева С.С., Пасешиченко В.А., Ребров Л.Б., Носов А.М. // II Международный симпозиум «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования». 1997. Пушино. С. 932—934.
28. Дубинская В.А., Николаева С.С., Ребров Л.Б., Васильева И.С., Пасешиченко В.А. // Труды научно-исслед. и учебно-методич. центра биомедицинских технологий ВИЛАР. 1997. № 8. С. 48—52.
29. Дубинская В.А., Стрелкова Л.Б., Васильева И.С., Николаева С.С., Ребров Л.Б., Пасешиченко В.А. // Бюлл. эксперимент. биол. и медицины. 1998. Т. 126. С. 178—181.

30. Ермолова И.Е., Шамина З.Б., Бутенко Р.Г. // Физиолог. растений. 1983. Т. 30. С. 974—979.
31. Жизнь растений. // М.: Просвещение. 1982. Т. 6. С. 228—241.
32. Заркова С. // Тезисы VI Национальной конференции по фармаколог. и клинике болгарских лекарств. Пловдив. 1984.
33. Зиновьева С.В., Васильева И.С., Удалова Ж.В., Пасешниченко В.А. // Доклады РАН. 1995. Т. 342. С. 131—133.
34. Калистру В.Д., Наук В.А., Кинтя П.К. // Изв. АН Молд. ССР. 1982. № 4. С. 65—66.
35. Камерницкий А.В., Решетова И.Г., Войшвилло Н.Е. // Химия спиро-станолов. М.: Наука. 1986. С. 57—76.
36. Каранова С.Л., Носов А.М., Пауков В.Н., Шамина З.Б. // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука. 1986. С. 83—87.
37. Кинтя П.К., Лазурьевский Г.В. // Стероидные гликозиды ряда спиро-стана. Кишинев: Штиинца. 1979. 146 с.
38. Кинтя П.К., Ковальчук Л.П., Бурцева С.А. // Хим. фарм. журнал. 1982. № 1. С. 95—97.
39. Кинтя П.К., Лазурьевский Г.В., Балашова Н.Н., Балашова И.Т., Суружцу А.И., Лях В.А. // Структурное и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиро-стана и фураностана. Кишинев: Штиинца. 1987. 142 с.
40. Кинтя П.К., Мац М.Н., Швец С.А., Дегтярева Л.П. // Растит. ресурсы. 1988. Т. 24. С. 263—270.
41. Кинтя П.К. // Журнал Всесоюзного химического общества им. Д.И. Менделеева. 1988. Т. 33. С. 584—585.
42. Ковганко Н.В., Ахрем А.А. // Стероиды. Экологические функции. Минск.: Наука і тэхніка. 1990. 224 с.
43. Лазурьевский Г.В., Кинтя П.К., Ковальчук Л.П. // ДАН СССР. 1980. Т. 256. С. 1479—1482.
44. Лесков А.И., Мартынов Р.Г., Соколов С.Я. // Хим. фарм. журнал. 1976. № 1. С. 147—150.
45. Лукнер М. // Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных. М.: Мир. 1979. 548 с.
46. Лукьянова М.А., Пасешниченко В.А., Ермаченко В.А. // ДАН СССР. 1978. Т. 239. С. 736—739.
47. Маслова Т.Г., Попова И.А., Корнюшенко Г.А., Королева О.Я. // Физиолог. растений. 1996. Т. 43. С. 437—449.
48. Носов А.М., Пауков В.Н., Кинтя П.К. // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука. 1986. С. 79—83.
49. Пасешниченко В.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1973. Т. 9. С. 583—587.
50. Пасешниченко В.А., Гусева А.Р. // Прикл. биохим. и микробиол. 1975. Т. 11. С. 94—101.
51. Пасешниченко В.А., Гусева А.Р., Борихина М.Г., Щербухин В.Д., Васильева И.С. // Прикл. биохим. и микробиол. 1980. Т. 16. С. 755—759.
52. Пасешниченко В.А., Гусева А.Р., Васильева И.С. // Прикл. биохим. и микробиол. 1982. Т. 18. С. 171—173.
53. Пасешниченко В.А., Гусева А.Р., Васильева И.С. // Биохимия. 1983. Т. 49. С. 487—491.
54. Пасешниченко В.А., Гуриелидзе К.Г., Васильева И.С., Гусева А.Р. // Биохимия. 1984. Т. 49. С. 75—80.
55. Пасешниченко В.А. // Химия спиро-станолов. М.: Наука. 1986. С. 76—92.
56. Пасешниченко В.А. // Итоги науки и техники. Биологическая химия. М.: ВИНТИ. 1987. 196 с.

57. Пасешниченко В.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1989. Т. 25. С. 435—450.
58. Пасешниченко В.А., Васильева И.С. // Прикл. биохим. и микробиол. 1995. Т. 31. С. 73—79.
59. Пасешниченко В.А. // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 171—182.
60. Пауков В.Н., Васильева И.С., Карасев Н.Н., Пасешниченко В.А. // Химия природ. соединений. 1988. № 4. С. 549—551.
61. Слепян Л.И., Волосович А.Г., Бутенко Р.Г. // Растительн. ресурсы. 1968. Т. 4. С. 457—467.
62. Соколова Л.Н., Киченко В.И., Росточкий Б.К., Губина Г.П. // Мед. пром. СССР. 1961. Т. 7. С. 43—45.
63. Соколова Л.Н., Турова А.Д., Штрейтер А.И. // Растит. ресурсы. 1968. Т. 4. С. 43—45.
64. Софьина З.П., Пухальская Е.Н., Романова И.Н. // Целенаправленный поиск новых противовирусных и противовирусных препаратов. Рига: Зинатне. 1978. С. 79—89.
65. Тасков М., Шейтанов М., Христов Т. // Медико-биологическая информация. 1987. № 2. С. 22—25.
66. Тургенбаева Д.А., Ермаченко В.А., Харатьян Е.Ф., Пасешниченко В.А., Лукоянова М.А. // Прикл. биохим. и микробиол. 1983. Т. 19. С. 788—794.
67. Урманцева В.В., Холодова В.П., Воробьев А.С., Горская Н.В. // Тезисы Международной конференции по биологии культивируемых клеток. Новосибирск. 1988. С. 59.
68. Физер Л., Физер М. // Стероиды. М.: Мир. 1964. 982 с.
69. Харборн Дж. // Введение в экологическую биохимию. М.: Мир. 1985. 312 с.
70. Хоанг Н. // Канд. дисс. М. 1985. 157 с.
71. Хостетман К., Хостетман М. // Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. М.: Мир. 1988. 700 с.
72. Achenbach H., Hübner H., Reiter M. // Adv. in Exp. Med. and Biol. N.Y.—L.: Plenum Press. 1996. Vol. 404. P. 357—370.
73. Agrawal P.K., Jain D.C., Gupta R.K., Thakur R.S. // Phytochemistry. 1985. Vol. 24. P. 2479—2496.
74. Agrawal P.K. // Adv. in Exp. Med. and Biol. N.Y.—L.: Plenum Press. 1996. Vol. 405. P. 299—315.
75. Akahori A. // Phytochemistry. 1965. Vol. 4. P. 97—106.
76. Akahori A., Yasuda F., Okanishi T. // Chem. Pharm. Bull. Japan. 1968. Vol. 16. P. 498—501.
77. Akahori A., Yasuda F., Togami M., Kagawa K., Okanishi T. // Phytochemistry. 1969. Vol. 8. P. 2213—2217.
78. Akahori A., Yasuda F., Kagawa K., Ando M., Togami M. // Phytochemistry. 1970. Vol. 9. P. 1921—1928.
79. Akhila A., Yasuda F., Iwao T. // Chem. Pharm. Bull. 1971. Vol. 19. P. 846—848.
80. Akahori A., Gupta M. // J. Plant. Physiol. 1987. Vol. 130. P. 285—290.
81. Aminuddin P., Chowdhury A.R. // Planta med. 1983. Vol. 48. P. 92—95.
82. Baccou J.C., Sauvare Y., Rival A., Trisonthi P., Jonard R. // C. R. Acad. Sci. 1983. Ser. 3. Vol. 297. P. 449—452.
83. Bennett R., Heftmann E., Preston W., Haun J. // Arch. Biochem. Biophys. 1963. Vol. 103. P. 74—77.
84. Bennett R., Heftmann E. // Phytochemistry. 1965. Vol. 4. P. 577—586.
85. Bennett R., Heftmann E., Joly R. // Phytochemistry. 1970. Vol. 9. P. 349—353.
86. Blunden G., Briggs C., Hardman R. // Phytochemistry. 1968. Vol. 7. P. 453—458.

87. Brain K., Fazil F., Hardman R., Wood A. // *Phytochemistry*. 1968. Vol. 7. P. 1815—1818.
88. Bouvier F., d'Harlingue A., Suire C., Backhaus R., Camara B. // *Plant. Physiol.* 1998. Vol. 117. P. 1423—1431.
89. Chaturvedi H.C., Chowdhury A.R. // *Ind. J. Exp. Biol.* 1980. Vol. 18. P. 913—915.
90. Chowdhury A.R., Chaturvedi H.C. // *Curr. Sci.* 1980. Vol. 49. P. 237—238.
91. Chitwood D.J., William R.L. // *Lipids*. 1991. Vol. 26. P. 619—627.
92. Conchie J., Levy G.A. // *Biochem. J.* 1957. Vol. 65. P. 389—395.
93. Connolly J., Hill R. // *Dictionary of terpenoids*. London: Chapman and Hall. 1991.
94. Cordell G.A., Lin L.—Z., Gil R.R. // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.—London: Plenum Press. 1996. Vol. 405. P. 281—297.
95. Costello C.E. // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.—London: Plenum Press. 1996. Vol. 405. P. 317—337.
96. Demmig-Adams B. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1990. Vol. 1020. P. 1—24.
97. Drapeau D., Sauvaire Y., Blanch H.W., Wilke C.R. // *Planta med.* 1986. Vol. 55. P. 474—478.
98. Duvold T., Bravo J.—M., Pall—Grosdemanche C., Rohmer M. // *Tetrahedron Letters*. 1997. Vol. 38. P. 4769—4772.
99. Erhun W.O., Sofowora A. // *J. Plant. Physiol.* 1986. Vol. 123. P. 181—186.
100. Espejo O., Glavot J., Jung H., Giral F. // *Phytochemistry*. 1982. Vol. 21. P. 413—416.
101. Furuya T., Kojima H., Syono K. // *Phytochemistry*. 1971. Vol. 10. P. 1529—1532.
102. Furmanowa M., Guzewska J. // *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer—Verlag: Berlin, Heidelberg. 1989. Vol. 7. P. 162—184.
103. Gruiz K. // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.—London: Plenum Press. 1996. Vol. 404. P. 527—534.
104. Grønwall S., Kesselmeier J. // *Phytochemistry*. 1985. Vol. 24. P. 1941—1943.
105. Gupta M.N., Lazmi V., Dixit B.S., Srivastava S.N. // *Ind. J. Pharm. Sci.* 1980. Vol. 42. P. 18—19.
106. Hardman R., Brain K.R. // *Planta med.* 1972. Vol. 21. P. 426—430.
107. Harrison I.T., Valasco M., Djerassi K. // *J. Organ. Chem.* 1961. Vol. 26. P. 155—157.
108. Heble M.R. // *Science*. 1968. Vol. 161. P. 1145.
109. Heble M.R., Narayaneswani S., Chadha M.S. // *Phytochemistry*. 1971. Vol. 10. P. 2393—2395.
110. Heble M.R., Staba E.R. // *Planta med. suppl.* 1980. P. 124—128.
111. Heftmann E., Weaves M. // *Phytochemistry*. 1974. Vol. 13. P. 1801—1804.
112. Hiai S., Oura H., Nakajima T. // *Planta med.* 1976. Vol. 29. P. 116—122.
113. Hirai Y., Sanada S., Ida J., Shoji J. // *Chem. Pharm. Bull.* 1984. Vol. 32. P. 295—301.
114. Hoagland R.E., Zablutowicz R.M., Reddy K.N. // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.—London: Plenum Press. 1996. Vol. 405. P. 57—73.
115. Hostettmann K., Marston A., Mailard M., Wolfender J.—L. // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.—London: Plenum Press. 1996. Vol. 404. P. 117—128.
116. Hoyer G.—A., Sucrow W., Winkler D. // *Phytochemistry*. 1975. Vol. 2. P. 539—542.
117. Inoue K., Kobayashi S., Noguchi H., Sankawa U., Ebizuka Y. // *Nat. Med.* 1995. Vol. 49. P. 336—339.
118. Inoue K., Shimomura K., Kobayashi S., Sankawa U., Ebizuka Y. // *Phytochemistry*. 1996. Vol. 41. P. 725—727.

119. Jain S.C., Rosenberg H., Stohs J. // *Planta med.* 1977. Vol. 31. P. 109–111.
120. Jain S.C., Sahoo S. // *Pharmazie.* 1986. Vol. 41. P. 820–821.
121. Jain S.C., Agrawal M. // *Phytochemistry.* 1987. Vol. 26. P. 2203–2205.
122. Jefferies T.M., Hardmann R. // *Planta med.* 1972. Vol. 22. P. 78–87.
123. Joly R., Bonner J., Bennett R., Heftmann E. // *Phytochemistry.* 1969. Vol. 8 P. 1445–1448.
124. Joly R., Bonner J., Bennett R., Heftmann E. // *Phytochemistry.* 1969. Vol. 8. P. 1709–1711.
125. Jones N., Katzenellenbogen E., Dobringel K. // *J. Am. Chem. Soc.* 1953. Vol. 75. P. 158–160.
126. Kadkade P.G., Rolz C., Dwyer H.D. // *J. Natur. Prod.* 1976. Vol. 39. P. 416–419
127. Kadkade P.G., Ramirez M.A., Madrid T.R. // *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 1979. Bd. 174. S. 357–362.
128. Kalinowska M., Wojciechowski Z.A. // *Phytochemistry.* 1986. Vol. 25. P. 2525–2528.
129. Kalinowska M., Wojciechowski Z.A. // *Phytochemistry.* 1987. Vol. 26. P. 353–359.
130. Kalinowska M., Wojciechowski Z.A. // *Plant. Sci.* 1988. Vol. 55. P. 239–243.
131. Kasai R., Miyakoshi M., Nih R.-Z. // *Phytochemistry.* 1988. Vol. 27. P. 1439–1446.
132. Kaul B., Staba E.J. // *Lloydia.* 1968. Vol. 31. P. 171–179.
133. Kaul B., Stohs S.J., Staba E.J. // *Lloydia.* 1969. Vol. 32. P. 347–352.
134. Kawasaki T., Yamauchi T. // *Chem. Pharm. Bull.* 1962. Vol. 10. P. 703–708.
135. Kawasaki T., Yamauchi T. // *Chem. Pharm. Bull.* 1968. Vol. 16. P. 1070–1076.
136. Kawasaki T., Komori, Miyahara K., Nohara T., Hosokawa I., Mihashi K. // *Chem. Pharm. Bull.* 1974. Vol. 22. P. 2164–2175.
137. Kawasaki T. // *Natural Products for Medicinal Use.* Tokyo: Nanzando Co. 1982. 215 p.
138. Kennelly E.J., Suttisri R., Kinghorn A.D. // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.–London: Plenum Press. 1996. Vol. 405. P. 13–24.
139. Kesselmeier J. // *Z. Pflanzenphysiol.* 1979. Bd. 91. S. 333–344.
140. Kesselmeier J. // *Protoplasma.* 1982. Vol. 112. P. 127–132.
141. Kesselmeier J., Urban B. // *Protoplasma.* 1983. Vol. 114. P. 133–140.
142. Kesselmeier J., Eichenberger W., Urban B. // *Physiol. Plantarum.* 1987. Vol. 70. P. 610–616.
143. Khanna P., Jain S.C. // *Lloydia.* 1973. Vol. 36. P. 96–98.
144. Kintia P.K., Lupashku G.A. // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.–London: Plenum Press. 1996. Vol. 405. P. 75–82.
145. Kintia P.K. // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.–London: Plenum Press. 1996. Vol. 404. P. 309–334.
146. Kuroda M., Mimaki Y., Kameyama A., Sashida I., Nuaido T. // *Phytochemistry.* 1995. Vol. 40. P. 1071–1076.
147. Lange B., Wilding M., McCaskill D., Croteau R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 2100–2104.
148. Lichtenthaler H., Schwender J., Disch A., Rohmer M. // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 400. P. 271–274.
149. Liu Cheng-lai, Chen Yan-yong, Ge Shao-bin. // *Acta Botanica Sinica.* 1985. Vol. 27. P. 635–639.
150. Lois L., Campos N., Putra S., Danielsen K., Rohmer M., Boronat A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 2105–2110.
151. Lou W., Chen Y. // *Acta Botanica Sinica.* 1983. Vol. 25. P. 352–355.

152. *Madhu J., Rathore A.K., Khanna P.* // *Agr. and Biol. Chem.* 1984. Vol. 48. B. P. 529.
153. *Mahato S.B., Sahu N.P., Das M.N.* // *J. Chem. Res.* 1980. N 1. P. 64–65.
154. *Mahato S.B., Ganguly A.N., Sahu N.P.* // *Phytochemistry*. 1982. Vol. 21. P. 959–978.
155. *Maillard M., Hostettmann K.* // *J. Chromatogr.* 1993. Vol. 647. P. 137.
156. *Marker R.E., Wagner R.B., Ulshafer P.R., Wittbecker E. U. Goldsmith D.P.Y., Ruolf C.H.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1943. Vol. 65. P. 1199–1209.
157. *Marker R.E., Appelzweig K.E.* // *Chem. Eng. News.* 1949. Vol. 27. P. 3348–3351.
158. *Marshall J.G., Staba E.J.* // *Phytochemistry*. 1976. Vol. 15. P. 53–55.
159. *Marston A., Hostettmann K.* // *Phytochemistry*. 1985. Vol. 24. P. 639–652.
160. *McMorris T.* // *Lipids.* 1997. Vol. 32. P. 1303–1308.
161. *Mehta A.R., Staba E.J.* // *J. Pharm. Sci.* 1970. Vol. 59. P. 864–867.
162. *Miyahara K., Kanezaki e., Kawasaki T.* // *Chem. Pharm. Bull.* 1975. Vol. 23. P. 2550–2555.
163. *Nohara T., Yahara S., Kinjo J.* // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.–London: Plenum Press. 1996. Vol. 404. P. 263–276.
164. *Okunji C.O., Iwu M.M., Jackson J.E., Tally J.D.* // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.–London: Plenum Press. 1996. Vol. 404. P. 415–428.
165. *Paczkowski C., Wojciechowski Z.A.* // *Phytochemistry*. 1988. Vol. 27. P. 2749–2752.
166. *Paczkowski C., Zimowski J., Krawczyk D., Wojciechowski Z.A.* // *Phytochemistry*. 1990. Vol. 26. P. 63–68.
167. *Paczkowski C., Wojciechowski Z.A.* // *Phytochemistry*. 1994. Vol. 35. P. 1429–1435.
168. *Paczkowski C., Wojciechowski Z.A.* // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.–London: Plenum Press. 1996. Vol. 404. P. 37–46.
169. *Paczkowski C., Kalinowska M., Woldanski R., Wojciechowski Z.A.* // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.–London: Plenum Press. 1996. Vol. 404. P. 47–55.
170. *Paczkowski C., Kalinowska M., Wojciechowski Z.A.* // *Phytochemistry*. 1998. Vol. 48. P. 1151–1159.
171. *Pal A., Sharma A.K.* // *Proc. Ind. Nat. Sci. Acad.* 1976. Vol. 42 B. P. 156–161.
172. *Pant G., Sat O.P., Miyahara K., Kawasaki T.* // *Phytochemistry*. 1986. Vol. 25. P. 1481–1494.
173. *Parr A.J.* // *J. of Biotechnology.* 1989. Vol. 10. P. 1–26.
174. *Petricic J., Apostolski R., Bedenko D.* // *Acta Pharm. Jugoslav.* 1973. Vol. 23. P. 45–47.
175. *Rohmer M.* // *Pure and Appl. Chem.* 1993. Vol. 65. P. 1293–1298.
176. *Rohmer M., Khani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H.* // *Biochem. J.* 1993. Vol. 295. P. 517–524.
177. *Rohmer M., Seeman M., Horbach S., Bringer–Meyer S., Sahn H.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. Vol. 118. P. 2564–2566.
178. *Ronchetti F., Russo G.* // *Tetrahedron Let.* 1975. P. 85–88.
179. *Ronchetti F., Russo G., Ferrara G., Vecchio G.* // *Phytochemistry*. 1975. Vol. 14. P. 2423–2427.
180. *Sauvaire Y., Ribes G., Baccou J.C., Loubatieres–Mariani M.M.* // *Lipids.* 1991. Vol. 26. P. 191–197.
181. *Sauvaire Y., Baissac Y., Leconte O., Petit P., Ribes G.* // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.–London: Plenum Press. 1996. Vol. 405. P. 37–46.
182. *Schwender J., Seemann M., Lichenthaler H., Rohmer M.* // *Biochem. J.* 1996. Vol. 316. P. 73–80.

183. Segal R., Shotkovsky P., Milo-Goldzweig S. // Biochem. Pharm. 1974. Vol. 23. P. 973–981.
184. Segal R., Milo-Goldzweig S. // Biochem. Pharm. 1975. Vol. 24. P. 77–81.
185. Segal R., Schlosser E. // Arch. Microbiol. 1975. Vol. 104. P. 147–150.
186. Seo S., Uomori A., Yoshimura Y., Tori K. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1984. N 4. P. 869–874.
187. Shvets S.A., Gutsu O.N., Kintia P.K. // Adv. in Exp. Med. and Biol. N.Y.–London: Plenum Press. 1996. Vol. 405. P. 247–257.
188. Stohs S., Sabatka J., Rosenberg H. // Phytochemistry. 1974. Vol. 13. P. 2145–2148.
189. Takahashi S., Kuzuyama T., Watanabe H., Seto H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 9879–9884.
190. Takeda K., Minato H., Shimaoka A. // Chem. Pharm. Bull. 1968. Vol. 16. P. 275–281.
191. Takeda K. // Progress in Phytochemistry. N.Y.: Intersciences. 1972. Vol. 3. P. 287–334.
192. Takeda K., Minato H., Shimaoka A., Nagasaki T. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. Part I. 1972. N 7. P. 957–962.
193. Tal B., Goldberg I. // Planta Med. 1982. Vol. 44. P. 107–110.
194. Tal B., Gressel L., Goldberg I. // Planta Med. 1982. Vol. 44. P. 111–115.
195. Tal B., Rokem S., Goldberg I. // Plant Cell Reports. 1983. BV. 2. P. 219–222.
196. Tal B., Rokem S., Gressel L., Goldberg I. // Phytochemistry. 1984. Vol. 23. P. 1333–1335.
197. Tal B., Rokem S., Goldberg I. // Planta Med. 1984. Vol. 50. P. 239–241.
198. Tal B., Tamir I., Rokem S., Goldberg I. // Biochem. J. 1984. Vol. 219. P. 619–624.
199. Tanaka O. // Adv. in Exp. Med. and Biol. N.Y.–London: Plenum Press. 1996. Vol. 405. P. 1–11.
200. Tomita Y., Uomori A., Minato H. // Phytochemistry. 1970. Vol. 9. P. 111–114.
201. Tomita Y., Uomori A. // Chem. Commun. 1971. N 7. P. 284–289.
202. Tomita Y., Uomori A. // Phytochemistry. 1974. Vol. 13. P. 729–733.
203. Tomowa M.P., Gjulemetowa R. // Planta Med. 1978. Vol. 34. P. 188–194.
204. Tschesche R., Hulpke H., Fritz R. // Phytochemistry. 1968. Vol. 7. P. 2021–2026.
205. Tschesche R. // Proc. Roy. Soc. London. B. 1972. Vol. 180. P. 187–202.
206. Tschesche R., Wulff G. // Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe. 1973. Vol. 30. P. 461–606.
207. Tschesche R., Piester G. // Phytochemistry. 1975. Vol. 14. P. 435–438.
208. Tsukamoto T., Kawasaki T. // Chem. Pharm. Bull. 1956. Vol. 4. P. 35–41.
209. Tsukamoto T., Kawasaki T. // Chem. Pharm. Bull. 1956. Vol. 4. P. 104–108.
210. Uomori A., Seo S., Tori K., Tomita Y. // Phytochemistry. 1983. Vol. 22. P. 203–207.
211. Vögödjfalvi D., Maryti M., Tütüyi P. // Phytochemistry. 1971. Vol. 10. P. 1389–1390.
212. Varma K.R., Wickramasinghe J.A.F., Caspi E. // J. Biol. Chem. 1969. Vol. 244. P. 3951–3957.
213. Walens H.A., Serota S., Wall M.B. // J. Organ. Chem. 1957. Vol. 22. P. 105–107.

214. *Willuhn G., May S.* // *Planta Med.* 1982. Vol. 46. P. 153–160.
215. *Wyman–Simpson C.L., Waller G.R., Jurzysta M., McPherson J.K., Young C.C.* // *Plant Soil.* 1991. Vol. 135. P. 83–70.
216. *Yang C.–R., Li X.–C.* // *Adv. in Exp. Med. and Biol.* N.Y.–London: Plenum Press. 1996. Vol. 405. P. 1–11.
217. *Zinovieva S.V., Ozeretskoykaya O.L., Iliinskaya L.I., Vasyukova N.I., Udalova Zh.V.* // *Russian J. Nematology.* 1995. Vol. 3. P. 65–67.