

На правах рукописи

ЗИБАРЕВА ЛАРИСА НИКОЛАЕВНА

**ФИТОЭКДИСТЕРОИДЫ РАСТЕНИЙ
СЕМЕЙСТВА *CARYOPHYLLACEAE***

02.00.10 - биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук



Новосибирск – 2003

Работа выполнена в лаборатории фитохимии Сибирского ботанического сада Томского государственного университета, г.Томск

Официальные оппоненты:

профессор, д.х.н., Ткачев Алексей Васильевич
профессор, д.х.н., Юсубов Мехман Сулейманович
д.б.н., Высочина Галина Ивановна

Ведущая организация: Институт химии СО РАН, г. Иркутск

Защита состоится «24» сентября 2003 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при Новосибирском институте биоорганической химии СО РАН по адресу: 630090, г. Новосибирск-90, пр. акад. Лаврентьева 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского института биоорганической химии СО РАН

Автореферат разослан «23» сентября 2003 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор химических наук

 Федорова О.С.

2003-А
14832

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Экдистероиды представляют собой полигидроксированные стерины с характерными особенностями структуры: *цис*-сочленение А/В циклов, наличие 14 α -гидроксид- Δ^7 -6-кетонной группировки и гидроксильных групп как в стероидной части, так и боковой цепи молекулы. Являясь структурными аналогами гормонов линьки и метаморфоза насекомых, эти соединения широко распространены в растительном мире. К настоящему времени выделено более 250 экдистероидов, в том числе 150 растительного происхождения. Наряду со свободными экдистероидами с 19С, 21С, 27С, 28С и 29С из растений выделены и производные, включая гликозиды и сложные эфиры с высшими жирными кислотами.

Исследования последних лет свидетельствуют о существовании двух главных гипотез в отношении значения экдистероидов в онтогенезе растений: защитной и гормональной. Наиболее убедительные доказательства приводятся в пользу детеррентной функции при взаимодействии с неадаптированными беспозвоночными фитофагами, однако получены данные, указывающие на выполнение ими и физиологической роли в онтогенезе растительного организма.

Способность растений синтезировать соединения, нарушающие жизнедеятельность насекомых-фитофагов и нетоксичные для млекопитающих, открывает возможности для разработки новых биологических методов борьбы с вредителями и получения более устойчивых сортов растений. Фитоэкдистероиды являются основой препаратов (экдистен, Cytodyne, Ecdybol, Power Health, Macamor, Z-mass и др.) анаболического, адаптогенного, тонизирующего действия. Растительные объекты по содержанию и разнообразию качественного состава экдистероидов являются предпочтительными источниками для получения чистых соединений, а также различных субстанций, их содержащих.

Известно, что *Caryophyllaceae* является одним из богатых экдистероидсодержащих семейств мировой флоры и характеризуется большим разнообразием химических структур фитоэкдистероидов. Вероятность нахождения новых источников и новых стероидных соединений в нем весьма велика.

Цель работы - поиск доступных и перспективных в химическом отношении экдистероидсодержащих растений семейства *Caryophyllaceae*, способных служить основой для создания препаратов анаболического, радиопротекторного, противоопухолевого, антифунгального и гемореологического действия.

Задачи исследования: - разработать быстрый способ обнаружения и количественного определения фитоэкдистероидов в растительных объектах;

- изучить их распространение в семействе *Caryophyllaceae*;
- выявить наиболее перспективную по содержанию и составу экдистероидов группу растений;
- исследовать химический состав экдистероидов в перспективных видах *Caryophyllaceae*;
- выявить закономерности распределения экдистероидов в процессе развития, влияния интродукции и систематического положения видов родов *Silene*, *Lychnis*;
- определить биологическую активность экстрактов экдистероидсодержащих растений, выделенных фракций и индивидуальных фитоэкдистероидов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанная стратегия скрининга позволяет прогнозировать присутствие/отсутствие фитоэкдистероидов в растениях на основе предварительного хроматографического анализа экстрактов семян.

2. Род *Silene* L. - богатейший экдистероидсодержащий род мировой флоры.

3. Физиологически активные вещества *Lychnis chalconica* L. - основа для создания эффективных препаратов антифунгального, радиопротекторного, противоопухолевого и гемореологического действия.

Научная новизна. Разработана стратегия скрининга флоры на присутствие экдистероидов на основании предварительного хроматографического анализа экстрактов семян, позволяющая сделать заключение о способности растений их синтезировать и провести крупномасштабное изучение распространения экдистероидов в мировой флоре. Проанализировано более 400 видов порядка *Caryophyllales*, включая 266 видов семейства *Caryophyllaceae*, принадлежащих 28 родам. Достоверность результатов по выявлению экдистероидсодержащих видов подтверждена радиоиммунным анализом (РИА), биотестированием на культурах клеток *Drosophila melanogaster* и высокoeffективной жидкостной хроматографией.

Обнаружено 95 новых экдистероидсодержащих видов сем. *Caryophyllaceae*, включая 8 видов рода *Lychnis* L. и 75 видов *Silene* L. Впервые роды *Melandrium* Roehl., *Petrocoptis* A.Braun предложены в качестве источников экдистероидов.

Определен химический состав экдистероидов 14 видов семейства *Caryophyllaceae*: 12 видов рода *Silene* и 2 видов *Lychnis* L. Выделено и

идентифицировано 19 известных и 3 новых фитоэкдистероида: 2-дезоксигидрокси-20,26-дигидроксиэкдизон, 2-дезоксигидроксиэкдизон 22β-D-гликозид и 2-дезоксиполипидин В 3β-D-гликозид, химическое строение которых предложено на основании спектральных (ИК-, УФ-, масс-, ЯМР ¹H и ¹³C) и ВЭЖХ данных.

Выявлены основные закономерности распространения экдистероидов в роде *Silene* и проведено хемотаксономическое изучение секций этого рода.

Впервые выявлены противогрибковая, радиопротекторная, гемореологическая, противоопухолевая активность экстрактов и изолированных из них фракций *Lychnis chalcidonica* и других растений. Установлено, что экдистерон проявляет гемореологическое и радиопротекторное, а полипидин В - антифунгальное действие.

Практическая значимость. Разработан способ обнаружения фитоэкдистероидов, способствующий быстрому скринингу мировой флоры и надежному прогнозированию наличия их в растениях. Среди 95 новых растительных источников экдистероидов обнаружено 26 видов с высоким содержанием экдистероидов.

Изучено распределение 20-гидроксиэкдизона в процессе развития 19 видов, выявлены органы с наибольшим содержанием и вкладом в общее количество экдистероидов, установлены сроки сбора растительного сырья (фенофазы, возраст растений). Показано, что введение экдистероидсодержащих растений в культуру приводит к увеличению уровня экдистероидов в семенах и растениях.

Разработан способ получения эффективного средства противогрибкового действия на основе *Lychnis chalcidonica*, защищенный патентом РФ. Проведен подбор оптимального растворителя и условий экстракции. Выявлены биологически активные вещества, включая и экдистероиды, проявляющие фунгистатическое действие в отношении поверхностных дерматофитов. Показано, что спиртовой экстракт лихниса халцедонского и выделенный из него индивидуальный 20-гидроксиэкдизон обладают противолучевой активностью, заметно увеличивая среднюю продолжительность жизни облученных крыс.

Установлено, что экдистероидсодержащие растения могут являться эффективными корректорами синдрома повышенной вязкости крови на моделях сердечно-сосудистых заболеваний. Этанольный экстракт *Lychnis chalcidonica*, а также выделенные из него бутанольная, этилацетатная фракции, 20-гидроксиэкдизон проявляют гемореологическое действие. Разработаны гемореологические средства и способ их получения, защищенные патентами РФ.

Выявлена неизвестная ранее противоопухолевая активность *Lychnis chalcedonica* и *S. viridiflora*.

В результате проведенных химических и фармакологических исследований открывается возможность создания оригинального комплексного лечебного препарата анаболического, радиопротекторного, противоопухолевого, антифунгального и гемореологического действия на основе *Lychnis chalcedonica*.

Работа выполнена в фитохимической лаборатории Сибирского ботанического сада Томского государственного университета (Сиб БС ТГУ) в период с 1986 по 2002 год. Экспериментальная часть по выделению и идентификации экистероидов проведена в лабораториях фитохимии Сиб БС ТГУ и химии гликозидов Института химии растительных веществ АН Узбекистана (г. Ташкент).

Научные консультации по идентификации и исследованию закономерностей содержания экистероидов рода *Lychnis* осуществлялись член-корреспондентом АН Узбекистана, д.х.н. Абубакировым Н.К., за что автор ему очень признателен.

Радиоиммунный анализ, биотесты на агонистическую и антагонистическую активности, проведены совместно с доктором Лоуренсом Дайне-ном (Эксетерский университет, Великобритания). Установление новых структур экистероидов, а также ВЭЖХ разделение экстрактов растений рода *Silene* осуществлено совместно с профессором Рене Лафоном (Университет Пьера и Мари Кюри, Париж, Франция).

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР Сибирского ботанического сада Томского госуниверситета и комплексными исследованиями по теме гранта РФФИ (1998-2000 гг.), международного проекта INTAS (1998-2000 гг.). Результаты исследований, являясь частью комплексной темы, отмечены премией Правительства РФ за 2000 г.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на 23 конференциях и симпозиумах: 2-х всесоюзных, 10 российских и 11 международных, в том числе на Всесоюзной конференции "Новые лекарственные препараты из растений Сибири и Дальнего Востока" (Томск, 1986, 1989), 8th Danube Symposium on chromatography (Warsaw, 1991), Международной конференции "Фундаментальные и прикладные проблемы охраны окружающей среды" (Томск, 1995), 10th International Symposium "Advances and applications of Chromatography in Industry" (Bratislava, 1996), 5-м Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 1998), Всероссийском симпозиуме по теории хроматографии и электрофореза, посвященного 95-летию открытия хро-

тографии М.С.Цветом (Москва, 1998), 23rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques HPLC, 99 (Granada-Spain, 1999), международной научной конференции "Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств..." (Томск, 2000), XIII - XV International Ecdysone Workshops (Jena, Germany - 1998; Rapperswil, Switzerland - 2000; Kolymbari, Greece - 2002).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 22 статьи, 17 тезисов докладов, получено 4 патента РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы и 5 приложений. Работа изложена на 247 страницах, иллюстрирована 35 рисунками и 35 таблицами. Список цитируемой литературы включает 225 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава I содержит литературный обзор о разнообразии химических структур и распространении фитоэкдистероидов в растениях мировой флоры, семейства *Caryophyllaceae*, значении их для растений. Данные по распространению экдистероидов в порядке *Caryophyllales* сведены в таблицу, включающую известные и собственные экспериментальные данные. Обосновано положение о наибольшей встречаемости экдистероидов в роде *Silene*. В главах II, III, IV, V представлены результаты наших исследований.

Поиск новых экдистероидсодержащих видов семейства *Caryophyllaceae*

Тесная связь многих фундаментальных проблем с выявлением все новых экдистероидсодержащих видов, а также то, что фитоэкдистероиды обладают широким спектром биологической активности, который постоянно пополняется, побуждает исследователей активизировать их поиск.

С целью ускорения поиска продуцентов экдистероидов нами разработан способ быстрого обнаружения этих соединений, защищенный патентом РФ. Новизна его заключается в том, что в качестве объектов анализа используются семена, что обусловлено рядом причин: 1) высокое содержание экдистероидов, вследствие чего возможно использование малых навесок семян; 2) высокая чистота нативного экстракта семян, исключающая необходимость его очистки от сопутствующих ве-

ществ; 3) делектусный обмен семенами между ботаническими садами мира позволяет привлечь семенной материал мировой флоры, что ускоряет и расширяет возможности скрининга; 4) анализ экстрактов семян предваряет и определяет необходимость выращивания из них растений в качестве источников фитоэкдистероидов; 5) предварительный анализ семян способствует сохранению популяций растений в природе; 6) для анализа экстрактов семян применяются экспрессные методы - различные виды хроматографии (ТСХ, ВЭЖХ, ГЖХ). Использование предлагаемого способа позволяет существенно ускорить проведение всех стадий анализа экстрактов и заметно снизить расход экстрагента и раст-ворителей.

В процессе многолетнего эксперимента было установлено, что наблюдается четкая корреляция между присутствием или отсутствием фитоэкдистероидов в семенах и выращенных из них растениях как семейства *Caryophyllaceae* – родов *Lychnis* L., *Silene* L., *Petrocoptis* A.Braun., *Sagina* L., *Saponaria* L., *Melandrium* Roehl., так и *Chenopodiaceae* (*Chenopodium* L.), *Asteraceae* (*Serratula* L., *Rhaponticum* Ludw.) и других. Этот вывод был сделан как на примере однолетних, двулетних, так и многолетних видов растений. Было показано, что по низкому уровню экдистероидов в семенах однолетних видов можно прогнозировать невысокое содержание их в надземной части, тогда как в многолетних видах семена с низким содержанием обуславливают возрастающие концентрации в растениях с возрастом. Применение нового подхода к поиску продуцентов фитоэкдистероидов дает возможность прогнозировать синтез искомых соединений в растениях и сделать заключение о целесообразности введения в культуру их в качестве объектов для выделения стероидных соединений на основании предварительного обнаружения в экстрактах семян. Дальнейшие исследования биотестированием и радиоиммунным методом 58 видов (80 образцов), выращенных из семян, присутствие экдистероидов в которых было предварительно обнаружено хроматоспектрофотометрическим методом, подтвердили правильность предложенной стратегии (табл. 1).

Использование разработанного нами способа позволило проанализировать семена более 400 видов растений, в том числе 152 видов рода *Silene*. Благодаря экспрессности способа удалось выявить 115 экдистероидсодержащих видов семейства *Caryophyllaceae* в том числе 95 новых: *Silene* - 91, из них впервые в 75, *Lychnis* - 12 и 8 (соответственно), *Petrocoptis* и *Saponaria* по 2 новых, *Sagina* - 4 новых и впервые два рода, виды которых способны также синтезировать экдистероиды – *Melandrium*, *Petrocoptis*. В процессе скрининга установлена наибольшая встре-

Таблица 1

Результаты анализа растений семейства *Caryophyllaceae*
на содержание экидистероидов

Вид растений	Фено-фаза	Часть растений	ХСФ анализ	РИА DBL-1	Биотест на агонисты
<i>Lychnis haageana</i>	бут	н.часть	0.2	1080	+++ -
<i>Lychnis kiusiana</i>	цв	н.часть	0.1	686.8	+++ -
<i>Petrocoptis pyrenaica</i>	цв	н.часть	0.2	198.9	C + -
<i>P. glaucifolia</i>	вег	листья	0.1	140.8	++ -
<i>Silene bellidifolia</i>	цв	цветки	0.5	2621	C ++ -
<i>Silene burchellii</i>	цв	цветки	1.4	8830	++++
<i>Silene chlorantha</i>	цв	цветки	1.9	19402	C +++ -
<i>Sagina ciliata</i>	цв	н.часть	0.2	1016	+++ -
<i>Silene damboldtiana</i>	цв	цветки	0.7	5176	++++ -
<i>Silene echinata</i>	цв	цветки	0.4	5972	+++ -
<i>Silene frivaldszkyana</i>	цв	цветки	6.2	27592	++++ -
<i>Silene fruticosa</i>	вег	листья	0.5	6810	C ++ -
<i>Silene gigantea</i>	пл	н.часть	0.8	13279	+++ -
<i>Silene italica</i>	цв	цветки	1.3	12205	++++ -
<i>Silene linicola</i>	цв	н.часть	0.5	2000	++ -
<i>Silene mellifera</i>	цв	н.часть	0.9	5227	++++ -
<i>Silene paradoxa</i>	кв	листья	0.4	2369	+++ (+)
<i>Silene portensis</i>	цв	цветки	1.4	15312	C +++ -
<i>Silene pseudotites</i>	кв	листья	0.6	27188	+++ -
<i>Silene radicata</i>	цв	цветки	1.3	11393	++++ -
<i>Silene roemerii</i>	цв	цветки	1.3	20962	++++ -
<i>Silene scabriflora</i>	цв	цветки	0.6	2713	C ++ -
<i>Silene sendtneri</i>	цв	цветки	1.8	17455	++++ -
<i>Silene squamigera</i>	цв	цветки	1.5	9140	++++
	пл	н.часть	0.4	1424.3	++++ -
	пл	семена	0.6	1608	+ - -

Примечание. Вег – начало вегетации, бут - бутонизация, цв - цветение, пл - плодоношение, кв - конец вегетации, н.часть - надземная часть. ХСФ – хроматоспектрофотометрический метод, в % на сухое сырье. РИА – радиоиммунный анализ, мкг экидизон эквивалент/г. С – цитотоксичный, - = не активен, + = активен-неразбавленный экстракт, (+) = слабо активен, ++, +++, ++++ = активен при 10-, 100-, 1000-кратном разбавлении.

чаемость экидистероидов в родах *Lychnis* и *Silene* (67 и 59 % от произвольно выбранных для анализа видов).

Установление химического состава экистероидов перспективных видов

Выбор объектов для настоящего исследования обусловлен как богатым качественным составом и количественным содержанием экистероидов, так и достаточной сырьевой базой интродуцируемых нами растений.

Фитоэкистероиды рода *Silene*. Изучен химический состав экистероидов 12 видов рода *Silene*: *S.antirrhina*, *S.chlorifolia*, *S.cretica*, *S.disticha*, *S.echinata*, *S.italica*, *S.linicola*, *S.portensis*, *S.pseudotites*, *S.radicosa*, *S.regia*, *S.viridiflora*. Экистероиды в этих видах обнаружены впервые. Растения выращены из семян, полученных из зарубежных ботанических садов, интродуцированы в Сиб БС ТГУ (исследовали семена *S.regia*). Предварительный анализ хроматоспектрофотометрическим методом, а также ферментативный гидролиз порций каждого метанольного экстракта смесью гидролазы из *Helix pomatia* с последующим радиоиммунным анализом показал, что большинство исследуемых видов богаты свободными экистероидами и содержат лишь низкие уровни экистероидных конъюгатов. Экистероиды в видах *S. antirrhina*, *S.chlorifolia*, *S.cretica*, *S.disticha*, *S.echinata*, *S.italica*, *S.portensis* идентифицировали с помощью ВЭЖХ. Очищенные водно-метанольные экстракты разделены на аналитической колонке с C_{18} , индивидуальные соединения сконцентрированы на полупрепаративной C_{18} и разделены на колонках с C_6 и Арех П. Пики экистероидов на хроматограммах (рис.1) идентифицированы по УФ - спектрам, а также совместным введением эталонов экистероидов. Мажорными компонентами в каждом виде *Silene* является 20-гидроксиэкидизон (20Е) и полиподин В (P_B) (табл. 2), содержание 20Е колеблется в пределах 0,12-1,2 % на сухой вес. Кроме того, в большинстве видов встречаются 2-дезоксидизон и экидизон (Е), концентрации которых варьируются. Наибольшее содержание экистероидов определено в *Silene pseudotites*, более 2 %, причем, уровни 2-дезоксидизона и 2-дезоксидизона были такими высокими, что общая сумма их приблизилась к таковой 20-гидроксиэкидизона. Разделение близких по химической структуре и хроматографическому поведению 20Е, Е и P_B достигнуто в системах 2, 4 и 5 (табл. 3).

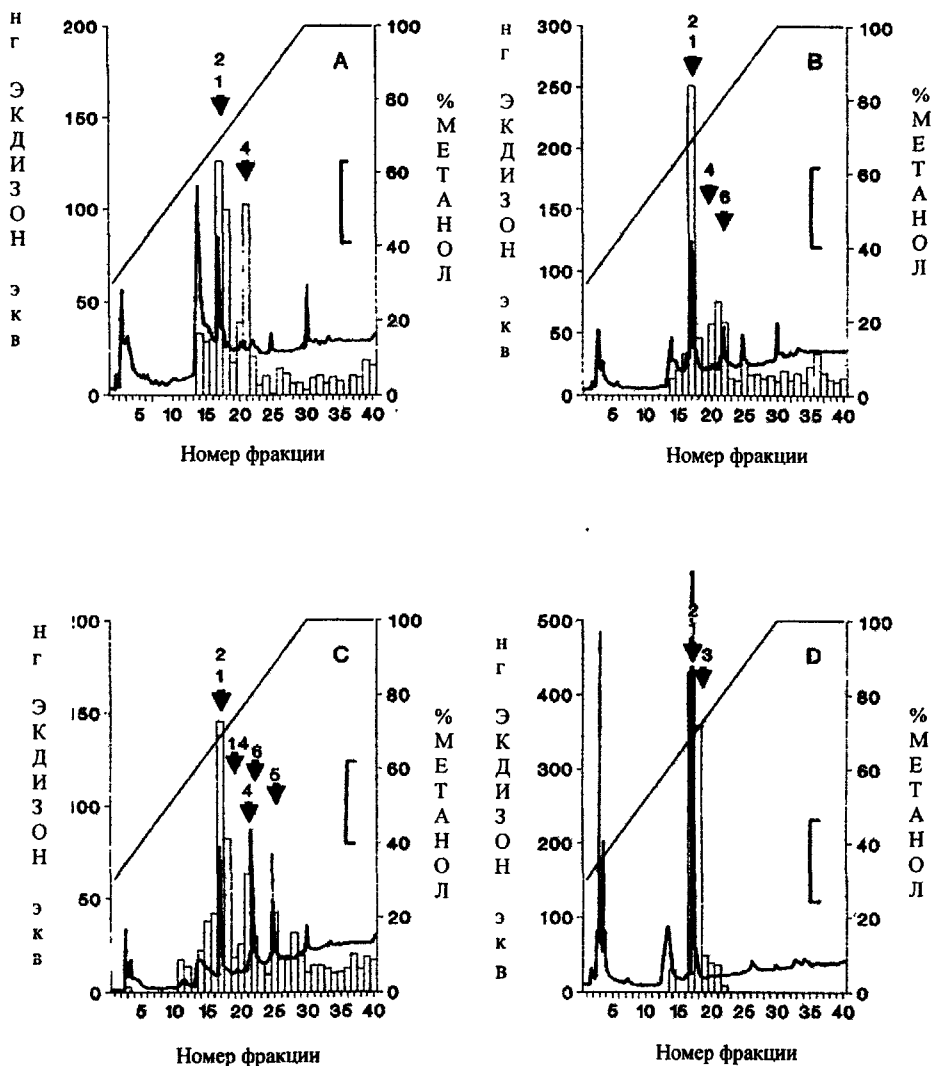


Рис. 1. ВЭЖХ-РИА экстрактов *Silene echinata* (A), *S.italica* (B), *S.pseudotites* (C), *S. regia* (D). 1 - 20Е, 2 - полиподин В, 3 - инокостерон, 4 - экдизон, 5 - 2-дезоксизекдизон, 6 - 2-дезоксиз-20Е, 14 - 2-дезоксиз-21-гидроксиизекдизон.

Таблица 2

Фитоэкдистероиды, выделенные из родов *Silene L.* и *Lychnis L.*

Экдистероид	Формула	Выход, %	Вид расте- ний
20-Гидроксиэкдизон (1)	$C_{27}H_{44}O_7$	0.071 [#] 0.367 0.042 0.302 0.350 0.045 0.097	<i>S.pseudotites</i> <i>S.linicola</i> <i>S.radicosa</i> <i>S.regia</i> <i>S.viridiflora</i> <i>L.chalcedonica</i> <i>L.wilfordii</i>
Полипидин В (2)	$C_{27}H_{44}O_8$	0.006 [#] 0.073 0.007 0.021 0.250 0.006 0.010	<i>S.pseudotites</i> <i>S.linicola</i> <i>S.radicosa</i> <i>S.regia</i> <i>S.viridiflora</i> <i>L.chalcedonica</i> <i>L.wilfordii</i>
25S-Инокостерон (3)	$C_{27}H_{44}O_7$	сл. 0.012	<i>S.pseudotites</i> <i>S.regia</i>
Экдизон (4)	$C_{27}H_{44}O_6$	0.002 0.001 0.001	<i>S.pseudotites</i> <i>S.linicola</i> <i>L.chalcedonica</i>
2-Дезоксиэкдизон (5)	$C_{27}H_{44}O_5$	0.165	<i>S.pseudotites</i>
2-Дезокси-20-гидроксиэкдизон (6)	$C_{27}H_{44}O_6$	0.106 0.017 0.200	<i>S.pseudotites</i> <i>S.linicola</i> <i>S.viridiflora</i>
2-Дезокси-20,26-дигидрокси- экдизон (7)*	$C_{27}H_{44}O_7$	0.003	<i>S.pseudotites</i>
Понастерон А (8)	$C_{27}H_{44}O_6$	сл.	**
Сидистерон (9)	$C_{24}H_{32}O_6$	0.001	<i>S.pseudotites</i>
2-Дезоксиэкдизон 22β-D-гликозид (10)*	$C_{33}H_{54}O_{10}$	0.003	<i>S.pseudotites</i>
2-Дезоксиполипидин В 3β-D- гликозид (11)*	$C_{33}H_{54}O_{12}$	0.003	<i>S.pseudotites</i>
2-Дезоксиинтегристерон А (12)	$C_{27}H_{44}O_7$	0.001	<i>S.pseudotites</i>
(5α- ² H) -2-Дезоксиинтегристерон А (13)	$C_{27}H_{44}O_7$	0.001	<i>S.pseudotites</i>
2-Дезокси-21-гидроксиэкдизон	$C_{27}H_{44}O_6$	0.013	<i>S.pseudotites</i>

Экдистероид	Формула	Выход, %	Вид расте- ний
(14)			
Стахистерон Д (15)	$C_{27}H_{42}O_6$	0.001	<i>L.chalcedonica</i>
Витикостерон Е (16)	$C_{29}H_{46}O_8$	0.001	<i>S. linicola</i>
		0.0001	<i>L.chalcedonica</i>
24(28)-Дегидромакистерон А (17)	$C_{28}H_{44}O_7$	0.0003	<i>L.chalcedonica</i>
Туркестерон (18)	$C_{27}H_{44}O_8$	0.001	<i>S. linicola</i>
Интегристерон А (19)	$C_{27}H_{44}O_8$	0.002	<i>S. linicola</i>
		0.200	<i>S. viridiflora</i>
		0.0002	<i>L.chalcedonica</i>
Силенеозид А (20)	$C_{33}H_{54}O_{12}$	0.080	<i>S. viridiflora</i>
Силенеозид D (21)	$C_{33}H_{54}O_{12}$	0.100	<i>S. viridiflora</i>
26-гидроксиполипидин В (22)	$C_{27}H_{44}O_9$	0.035	<i>S. viridiflora</i>

Примечание: # - данные по 60 % фракции, * - впервые выделенные экдистероиды,
 ** - обнаружен в большинстве видов, сл. – следовые количества.

Таблица 3

Времена удерживания экдистероидов (ВЭЖХ),
 выделенных из видов *Silene* (мин)

Экдистероид	Система				
	1	2	3	4	5
20-Гидроксиэкдизон (1)	10.3	18.0		9.4	18.5
Полипидин В (2)	10.3	15.4		7.0	13.5
(25R)-Инокостерон (3)	10.3	20.7		10.8	18.0
(25S)-Инокостерон (3)	10.3	22.0		11.3	18.0
Экдизон (4)	13.3		13.4	7.9	13.5
2-Дезоксиэкдизон (5)	17.5				8.3
2-Дезокси-20-гидроксиэкдизон (6)	14.6		14.5		10.5
2-Дезокси-20,26-дигидроксиэкдизон (7)					23.7
Понастерон А (8)	16.8		16.8	4.2	5.5
Сидистерон (9)					8.0
2-Дезоксиэкдизон 22β-D-гликозид (10)					23.5
2-Дезокси-полипидин В 3 β-D-гликозид (11)					38.0
2-Дезоксиинтегристерон А (12)					14.0
(5α- ² H)-2-Дезоксиинтегристерон А (13)					22.5
2-Дезокси-21-гидроксиэкдизон (14)					12.5

Примечание: Система 1 - аналитическая колонка C₁₈ с Spherisorb, линейный градиент от 30 до 100 % CH₃OH, система 2 - аналитическая колонка с Spherisorb C₆, 28 % CH₃OH/H₂O; система 3 - аналитическая колонка с Spherisorb C₆, 45 % CH₃OH/H₂O; система 4 - аналитическая колонка с APEX II (диол), линейный градиент от 4 до 20 % CH₃OH в CH₂Cl₂; система 5 - полупрепаративная колонка с Zorbax-Sil, дихлорметан/изопропанол/вода в соотношении 125/40/3.

Идентификация экистероидов, выделенных из *Silene pseudotites*, *S. radicata* и *S. regia*

Выделение и разделение экистероидов из видов *Silene pseudotites*, *S. radicata* и *S. regia* осуществлено по схеме, представленной на рис. 2. Наибольший выход при выделении экистероидов из *S. pseudotites*, получен для 2-дезоксизекдизона, 2-дезоксиз-20-гидроксиэкидизона и 20-гидроксиэкидизона (табл. 2). Из надземной части *S. radicata* удалось выделить мажорные компоненты - 20Е и П_В, а из семян *S. regia* 20Е, П_В и следовые количества 25S-инокостерона.

Из надземной части *S. pseudotites* было изолировано 12 стероидных соединений, а выявлено 14, два из которых в следовых количествах - 25S-инокостерон и понастерон А. Структуры изображены на рис. 3. Идентификация мажорных экистероидов: 20-гидроксиэкидизон (1), полиподин В (2), экидизон (4), 2-дезоксизекдизон (5), 2-дезоксиз-20-гидроксиэкидизон (6) проведена на основе УФ-, масс-, ЯМР ¹Н спектров. Физико-химические и спектральные характеристики исследуемых экистероидов совпадают с соответствующими литературными данными.

2-Дезокси-20,26-дигидроксиэкидизон (7). В масс-спектре (ХИ, NH₃) проявились следующие пики: с m/z 498, отвечающий иону [M+H+NH₃]⁺, 481 [M+H]⁺, а также с m/z 480, соответствующий молекулярному иону [M]⁺, 463 [M+H-H₂O]⁺ и 445 [M+H-2H₂O]⁺. В ЯМР ¹Н спектре (D₂O) присутствуют типичные особенности как 2-дезоксиз-, так и 20,26-дигидрокси- экистероидов. На основании химических сдвигов сигналов аугулярных 18- и 19-метильных групп, а также метильных групп боковой цепи сделан вывод о структуре циклической части стероида с двумя ОН-группами. Сигнал δ 0.863 м.д. отвечает CH₃-18 группе, а δ 0.976 м.д. соответствует CH₃-19 и свидетельствует о том, что структура стероидного ядра подобна таковым 2-дезоксиз-20Е, 2-дезоксизекдизона. При сравнении ЯМР ¹Н спектров 2-дезоксиз-20,26-дигидроксиэкидизона (7) и 20,26-дигидроксиэкидизона наблюдается хорошее совпадение положения большинства протонов, однако в соединении 7 отсутствует сигнал Н-2 при 3.99 м.д. (табл. 4), и наблюдается уширение сигнала Н-3 (w_{1/2} = 20

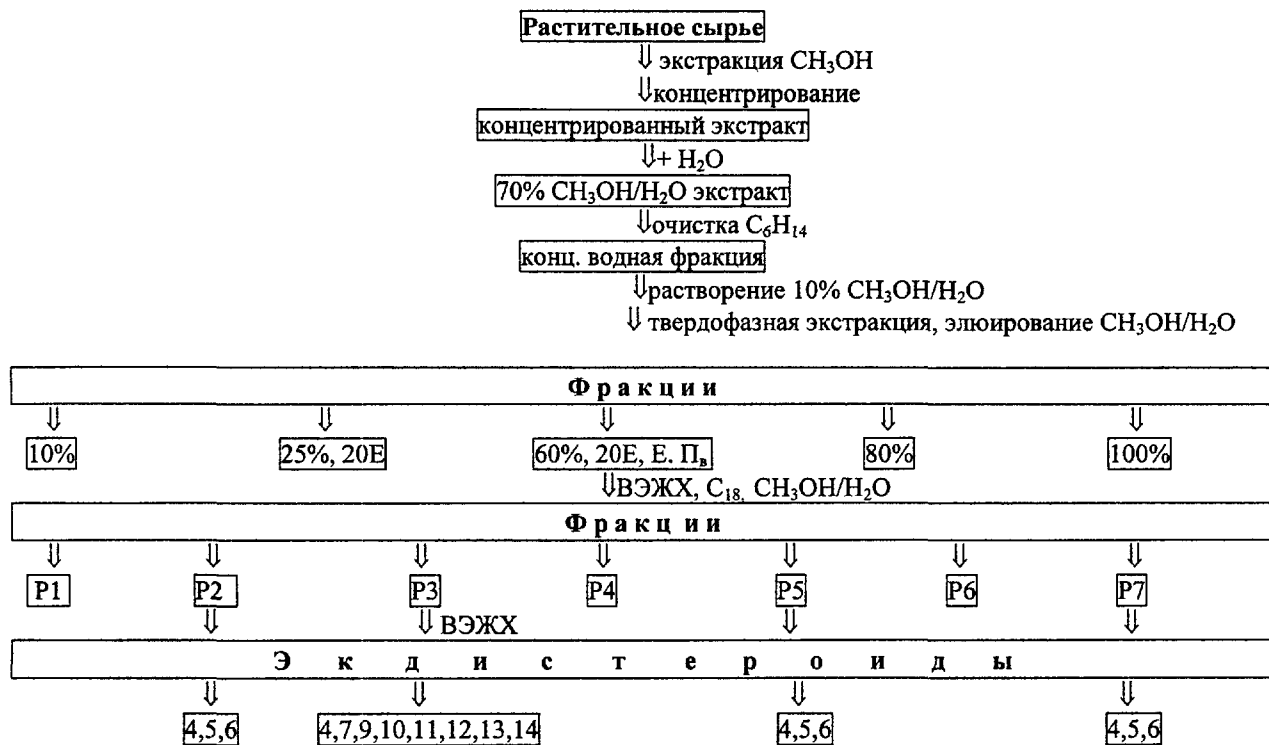


Рис. 2. Схема выделения экдистероидов из видов рода *Silene*

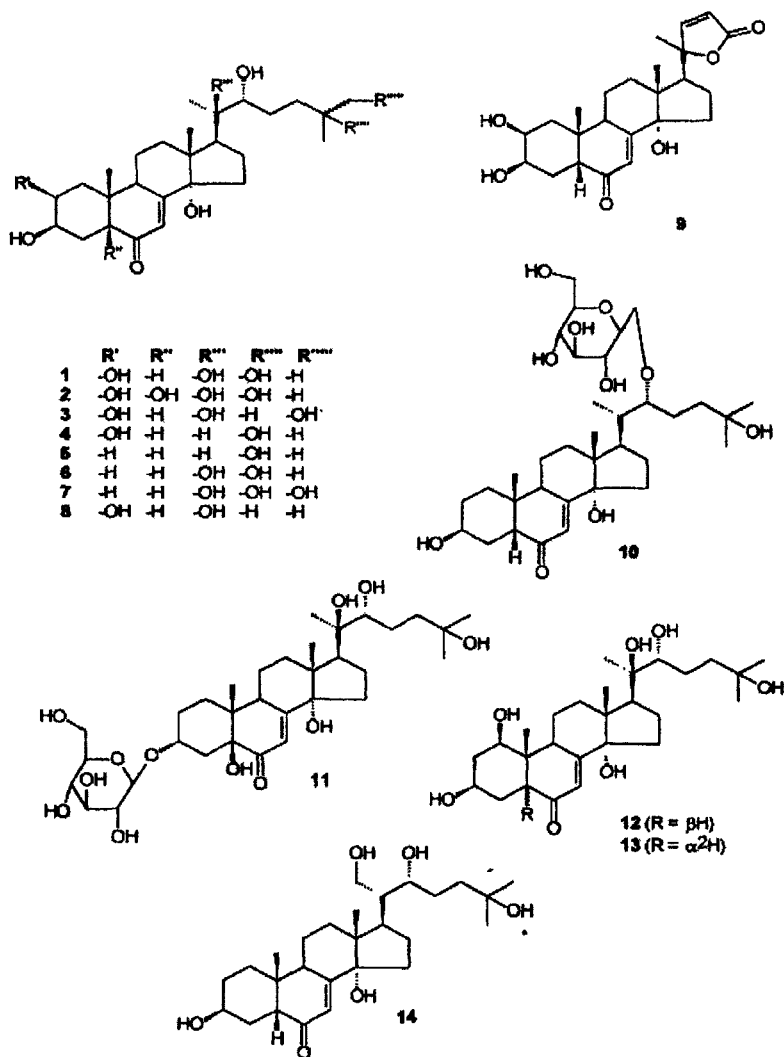


Рис. 3. Структуры экистероидов, выделенных из *Silene pseudotites*

Гц), что является следствием отсутствия гидроксильной группы при С-2. Появление $-\text{CH}_2-\text{OH}$ сигнала в виде синглета при $\delta = 3,45$ м.д., характерного для 26-гидроксизекдистероидов, подтвердило предположение о структуре соединения 7.

Таким образом, для соединения 7 предложена структура 2-дезоксиз-20,26-дигидроксизекдизона, выделенного впервые.

Сидистерон (9). В ИК-спектре проявились полосы ν_{max} (cm^{-1}): 1749 (γ -лактон), 1643 (Δ^7 -6-кетогруппировка). УФ (λ_{max} ($\log \epsilon$): 240 нм (4,12). Совместное хроматографирование исследуемого образца с эталоном методом ВЭЖХ косвенно указывает на их идентичность.

В масс спектрах (ХИ, NH_3) проявились пики с m/z 434, соответствующие фрагменту $[\text{M}+\text{H}+\text{NH}_3]^+$, 417 $[\text{M}+\text{H}]^+$, молекулярному иону 416 $[\text{M}]^+$ и дегидратационному иону 399 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$.

Сравнение ЯМР ^1H и ^{13}C спектров исследуемого соединения 9 и 20Е показало, что химические сдвиги CH_3 -19 (δ 0.98 м.д.), Н-2, Н-3 и Н-7 хорошо совпадают. Однако сдвиг сигналов CH_3 -18 (δ 0.74 м.д.) в сильное поле, протонов при Н-12, Н-17 (δ 2.19 и 2.70 м.д. соответственно) и CH_3 -21 (1.57 м.д.) в слабое поле и отсутствие сигналов CH_3 -26/27 групп свидетельствуют об идентичности стероидных частей молекул и укороченной боковой цепи соединения 9. Совокупность спектральных данных, а также совместное хроматографирование с предполагаемым эталоном позволили идентифицировать соединение 9 как сидистерон, выделенный ранее из растений *Silene dioica*, *S. otites* (*Caryophyllaceae*), *Briza maxima* (*Gramineae*).

2-Дезоксизекдизон 22 β -D-гликозид (10). Весьма характерным для рода *Silene* является частая встречаемость гликозидов. Наличие в растениях гликозидных соединений экидистероидов является свидетельством их активной роли в метаболических процессах.

В масс-спектре соединения 10 проявляются пики с m/z 628 $[\text{M}+\text{H}+\text{NH}_3]^+$, 611 $[\text{M}+\text{H}]^+$, пик молекулярного иона 610 $[\text{M}]^+$, 593 при отщеплении одной молекулы воды $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$. В ЯМР ^1H спектре (D_2O) (табл. 4) представлены характерные особенности для производных 2-дезоксизекдизона: отсутствие сигнала карбинильного протона при С-2, сдвиг в слабое поле, уширение сигнала протона при С-3 ($w_{1/2} \approx 23$ Гц) и сдвиг сигнала Н-9 в сильное поле относительно экидизона или 20-гидроксизекдизона. Идентичность сахара β -D-глюкопиранозе была установлена на основе характеристичного сигнала для аномерного протона в виде дублета при δ 4,53 м.д. с большой константой ($J=8$ Гц) и $^1\text{H}-^1\text{H}$ расщепления, аналогично как и в ЯМР ^1H спектре экидизон 22 β -D- глико-

Таблица 4

Химические сдвиги протонов новых и редких экистероидов,
выделенных из растений *Silene pseudotites* (δ, м.д., глицерин)

Протон	С о е д и н е н и е (растворитель)						
	7 (D ₂ O)	9 (CD ₃ OD)	10 (D ₂ O)	11 (D ₂ O)	12 (D ₂ O)	13 (D ₂ O)	14 (D ₂ O)
2-Н	-	3.82	-	-	-	-	-
3-Н	4.10	3.94	4.10	4.31	3.70	3.74	4.10
5-Н	2.39	2.38	2.41	-	2.76	2.54	2.40
7-Н	5.96	5.78	5.97	5.99	5.94	5.99	5.97
9-Н	3.15	3.14	3.14	3.24	3.23	2.95	3.14
17-Н	2.33	2.77		2.32	2.36	2.31	2.07
22-Н	3.44	7.76	3.73	3.44	3.43	3.43	3,78
18-Me	0.86	0.76	0.74	0.88	0.85	0.86	0.77
19-Me	0.98	0.95	0.99	0.91	1.10	0.84	0.98
21-Me	1.24	1.52	0.96	1.23	1.22	1.22	3.90 3.76
26-Me	3.45 CH ₂ ОН	-	1.24	1.22	1.23	1.22	1.24
27-Me	1.16	-	1.24	1.23	1.24	1.23	1.24
1'-Н			4.53, J=8Гц	4.56, J=8Гц			
2'-Н			3.29	3.30			
3'-Н			3.48	3.51			
4'-Н			3.38	3.39			
5'-Н			3.45	3.45			
6'-Н			3.70	3.71			
6''-Н			3.89	3.90			

зида. Место присоединения сахара определено на основании химического сдвига C-1 в ЯМР ¹³C спектре и дальних констант ¹H-¹³C между аномерным протоном (1'-Н) и C-22 в 2D НМВС эксперименте. Такое присоединение подтверждено наблюдаемым эффектом Оверхаузера между (1'-Н)⇌22-Н. Сравнение ЯМР спектров соединений 2-дезоксизекдизона и 2-дезоксизекдизон-22β-D-гликозида (**10**) показало, что отличие наблюдается лишь в химических сдвигах протонов при C-22 и CH₃-21: в соединении **10** они сдвинуты в слабое поле, что также свидетельствует в пользу присоединения сахарного остатка при C-22. Таким образом, для соединения **10** предложена структура 2-дезоксизекдизон 22β-D-гликозид.

2-Дезоксиполиподин В 3 β -D-гликозид (11). В масс-спектре (десорбция/XI, NH₃) проявился ряд фрагментов: с m/z 480, отвечающий молекулярному иону при отщеплении сахарного остатка [M – сахар]⁺, дегидратационные ионы при последовательном отщеплении 4-х молекул воды 463 [M + H – сахар – H₂O]⁺ и 445 [M + H – сахар – 2H₂O]⁺, 427 [M + H – сахар – 3H₂O]⁺, 409 [M + H – сахар – 4H₂O]⁺ и 180, соответствующий сахарному остатку. Данные ЯМР ¹H спектра свидетельствуют о присутствии типичных особенностей 2-дезоксиде- и 5,20-дигидроксиэкидестероидов. Из сравнения химических сдвигов протонов в спектрах экидестероида 11 и полиподина В следует, что наиболее отличаются величины сигналов протонов при C-3, C-7 и CH₃-19. Смещение сигнала протона C-3 в слабое поле (δ , 4.31 м.д.), сигнала CH₃-19 в сильное поле по сравнению с полиподином В позволяет предположить, что сахарный остаток присоединен к оксигруппе при C-3. Исчезновение характерного сигнала протонов при C-2 указывает на отсутствие оксигруппы в положении 2. Сигнал аномерного протона соединения 11 (д, δ 4.56 м.д.) и большая константа (J=8 Гц), указывает на присутствие β -D-глюкопиранозы, как и в случае известного экидестероида - полиподин В 3 β -D-гликозида, а заключение о месте присоединения сделано на основании ядерного эффекта Оверхаузера и наблюдаемой корреляции в НМВС эксперименте между 1'-H сахара и C-3.

Таким образом, для соединения 11 предложена структура 2-дезоксиполиподин В 3 β -D-гликозида, выделенного впервые.

(5 α -²H) -2-Дезоксиинтегристерон А (13). В ЯМР ¹H спектре представлены типичные особенности 2-дезоксиде-1 β ,20-дигидрокси-5 α -экидестероидов. 5 α -Конфигурация подтверждена проявляемым эффектом Оверхаузера между 9-H и 5-H. Присутствие преимущественно (91 %) дейтерия при C-5 было продемонстрировано понижением насыщения 5-H сигнала в ЯМР ¹H спектре. Возможно, что (5 α -²H)-2-деоксиинтегристерон А является артефактом, зафиксированным в процессе получения ЯМР спектра в дейтерированном растворителе, так как известно, что (5 β -H) 2-дезоксидеэкидестероиды быстро подвергаются эпимеризации при C-5 в 5 α -эпимер.

2-Дезокси-21-гидроксиэкидизон (14). Молекулярная масса определена из масс-спектра высокого разрешения и равна 464. В масс-спектре выявлены пики с m/z: 482, соответствующий фрагменту [M+H+NH₃]⁺, 465 [M+H]⁺, 452, 447 [M+H-H₂O]⁺ - основной пик, 435, 429 [M+H-2H₂O]⁺, 417, 411 [M+H-3H₂O]⁺, 399, 393 [M+H-4H₂O]⁺, 366, 349, 331, 313, 116.

Анализ ЯМР ^1H спектра показал, что это соединение принадлежит к 2-дезоксид 5 β -экидистероидам, т.к. в области $>\text{CHON}$ (3.7 - 4.0 м.д.) отсутствует сигнал карбинильного протона при С-2 и наблюдается уширение 3-Н сигнала. В насыщенной области присутствует только четыре метильных сигнала: CH_3 -18 (0.77 м.д.), CH_3 -19 (0.98 м.д.), CH_3 -26 (1.236 м.д.) и CH_3 -27 (1.243 м.д.). Сигналы при 3.90 и 3.76 м.д. соответствуют диастереомерным протонам при гидроксильированном С-21. В ЯМР ^{13}C спектре 2-дезоксид-20-гидроксидэкдизона сигнал атома углерода С-21 проявляется при 20.6 (CH_3), в то время как в исследуемом соединении при 62.2 м.д.

Хорошее совпадение экспериментальных данных УФ-, ЯМР ^1H и ^{13}C спектров с литературными, а также совместное хроматографирование ВЭЖХ с предполагаемым образцом позволило идентифицировать соединение 14 как 2-дезоксид-21-гидроксидэкдизон, впервые выделенный из близкородственного вида *Silene otites*.

Фитозкдистероиды *Silene linicola*. Из надземной части *S. linicola* выделено 7 экидстероидов. Структуры приведены на рис. 4. Экидстероидный профиль *Silene linicola* представлен в основном часто встречаемыми экидстероидами (табл. 2).

Туркестерон (18) не обнаружен ранее в растениях этого рода. Из масс- спектра экидстероида 18 следует, что стероидная часть молекулы содержит 4 ОН-группы: m/z : 460 ($\text{M}^+ - 2\text{H}_2\text{O}$), 442, 424, 406, а фрагменты боковой цепи идентичны 20Е (m/z 143, 126, 125, 99, 81, 69). Положение дополнительной оксигруппы при С-11 установлено на основании смещения в слабое поле CH_3 -18 и CH_3 -19 групп по сравнению с 20Е. Полученные данные позволили идентифицировать экидстероид 18 с туркестероном, ранее выделенным из растений *Ajuga turkestanica*.

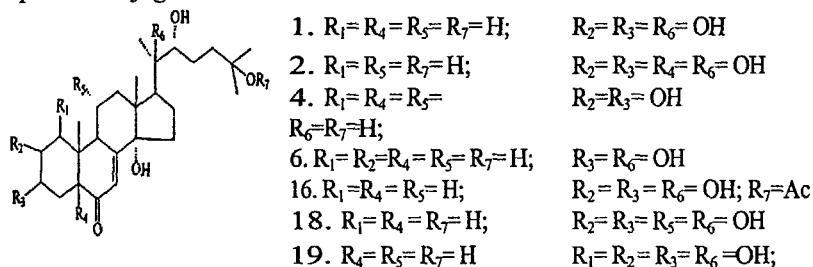
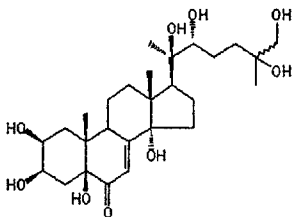


Рис. 4. Структуры экидстероидов, выделенных из *Silene linicola*

Сравнение ЯМР ^{13}C спектров соединения 18 и 20-гидроксидэкдизона показало, что наблюдается значительные различия значений химических

сдвигов углеродных атомов в 9, 10, 11, 12 положениях. В туркестероне сигналы этих атомов смещены в слабое поле: С-9 δ 42.82 и 34.67 м.д., С-10 δ 39.57 и 38.80, С-11 δ 68.44 и 21.29, С-12 δ 44.21 и 32.19 м.д. соответственно. Наряду с полученными экспериментальными данными это свидетельствует о наличии дополнительной оксигруппы при С-11 по сравнению с 20-гидроксиэкдизоном и подтверждает факт обнаружения туркестерона в роде *Silene*. Наблюдалось хорошее совпадение спектральных, физико-химических характеристик выделенных соединений с литературными данными.

Фитозкдистероиды *Silene viridiflora*. Выделение экдистероидов из *S. viridiflora* осуществлялось по схеме, изображенной на рис. 2. Постепенное увеличение полярности системы растворителей позволило последовательно выделить экдистероиды разного строения: 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон (6); полиподин В (2) и 20-гидроксиэкдизон (1); 26-гидроксиполиподин В (22), интегристерон А (19) и силенеозиды D (21) и А (20). Физико-химические константы ($t_{пл}$, $[\alpha]_D$), а также спектральные данные позволили отождествить их с предполагаемыми достоверными образцами. Экдистероиды 1, 2, 6, 19, 20 и 21 были выделены ранее из одноименного вида, собранного в ботаническом саду (г. Ташкент). В растениях же, интродуцированных в Западную Сибирь, синтезируется наряду с перечисленными дополнительно 26-гидроксиполиподин В.



26-Гидроксиполиподин В (22). В ИК-спектре наблюдается широкая полоса поглощения при $3443\text{--}3368\text{ см}^{-1}$, соответствующая валентным колебаниям ОН-групп. Полоса при 1687 см^{-1} обусловлена поглощением кетогруппы, сопряженной с двойной связью при наличии дополнительной оксигруппы в 5-положении. В масс-спектре имеется пик молекулярного иона с m/z 512. Сопоставление масс молекулярных ионов экдистероида 22 (M^+ 512) и полиподина В (2) (M^+ 496) свидетельствует о различии их в 16 единиц, что предполагает наличие в соединении 22 дополнительной гидроксильной группы. Из сравнения спектров ЯМР ^1H экдистероида 22 и полиподина В следует, что в соединении 22 отсутствует шестипротонный сигнал $\text{CH}_3\text{-}26$ и $\text{CH}_3\text{-}27$ при 1.36 м.д., а вместо него появились два сигнала: трехпротонный при 1.21 м.д., обусловленный CH_3 -группой при С-27, и двухпротонный при 3.35 м.д., который, вероятно принадлежит CH_2 -группе, связанной с гидроксилом. При отсутствии в ЯМР ^1H спектре сигнала $\text{CH}_3\text{-}26$ можно предположить, что дополнительная оксигруппа локализуется у С-26. Кроме того, на это

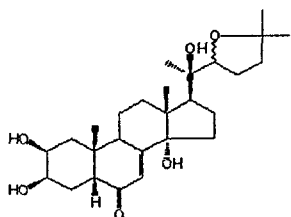
указывает сдвиг сигнала С-27 метильной группы экдистероида **22** в сильное поле по сравнению с таковым полиподина В.

Совокупность приведенных данных позволяет идентифицировать экдистероид **22** как 26-гидроксиполиподин В или 5,20,26-тригидроксиэкдизон, ранее выделенный из *Silene nutans* L..

Таким образом, во всех исследуемых видах *Silene* идентифицированы 20-Е, полиподин В. Кроме того, установлено присутствие экдизона *S.disticha*, *S.echinata*, *S.italica*, *S.linicola*, *S.portensis*, *S.cretica*, *S.pseudotites*, *S.radicosa*. Во всех видах, за исключением *S.echinata*, *S.radicosa* и *S.regia* обнаружен 2-дезоксид-20-гидроксиэкдизон.

Фитоэкдистероиды рода *Lychnis*. Из *Lychnis chalconica* выделено 7 экдистероидов (табл. 2), структуры которых идентифицированы на основе данных ИК-, УФ-, ЯМР-, масс-спектров, а также в сравнении с эталонами.

Стахистерон Д (15). Анализ масс-спектра показал, что боковая цепь имеет два атома кислорода, при этом пики с m/z 99 и 81 указывают на



цикличность боковой цепи, что подтверждается наличием оксониевого иона с m/z 405, при разрыве $C_{23}-C_{24}$ связи, характерного для стахистерона Д и выделенного ранее из *Stachyurus praecox*. Цикличность боковой цепи следует и из ЯМР 1H спектра. Наблюдается смещение метинового протона при

С-22 в слабое поле (3.92 м.д.), а сигнала близко расположенной CH_3 -21 в сильное поле (1.28 м.д.) по сравнению с 20-гидроксиэкдистероидами. Совокупность полученных экспериментальных данных позволяет отождествить соединение **15** с редким соединением стахистероном Д, имеющим оригинальную структуру - его боковая цепь содержит тетрагидрофурановый цикл.

Таким образом, из наземной части *Lychnis chalconica* изолированы соединения, принадлежащие к 27С, 28С и 29С- экдистероидам.

Из *L.wilfordii* выделены 20Е, П_В и идентифицированы сравнением с эталонами 24(28)-дегидромакистерон А, интегристерон А и экдизон.

Хемотаксономическое значение экдистероидов рода *Silene*

Род *Silene* является удобной моделью для изучения хемотаксономического значения экдистероидов вследствие многочисленности (700 видов), большой встречаемости видов, синтезирующих эти соединения,

сложной и, по всей вероятности, еще не сформировавшейся системы рода. Информация о наличии или отсутствии экистероидов может способствовать уточнению систематического статуса вида.

На примере 105 изученных видов установлено, что более половины секций рода *Silene* включают только экистероидсодержащие виды растений: *Siphonomorpha*, *Otites*, *Brachypodae*, *Fruticulosae*, *Silene*, *Dipterosperma*, *Holopetalae*, *Graminifoliae*, *Lasiocalycinae*, либо только экистероид-отрицательные: *Odontopetalae*, *Inflatae*, *Auriculatae*, *Heliospermae*, *Elisanthe*, *Conomorpha* и др. В этих секциях со значительной степенью вероятности можно прогнозировать присутствие/отсутствие экистероидов в еще не исследованных видах. Другие секции содержат как экистероид-положительные, так и отрицательные виды.

Соотнесение полученных нами данных о присутствии/отсутствии экистероидов в родах *Silene*, *Lychnis*, *Petrocoptis* с положением видов в филогенетическом дереве, основанном на анализе ДНК-последовательностей (Oxelman, Liden, 1995) позволило сделать весьма интересные наблюдения и подтвердить правильность наших результатов исследований: спорные виды *S.armeria*, *S.coeli-rosa*, *S.zawadskii*, в которых нами не обнаружены экистероиды отнесены также к отрицательнымкладам. В данном случае геносистематика дополняет и объясняет некоторые моменты хемотаксономии.

Сравнение результатов наших исследований с литературными данными свидетельствует о наличии общих закономерностей в составе экистероидов видов *Silene*: присутствие в больших количествах 20Е, которое сопровождается в большинстве видов наличием 2-дезоксигидрокси-20Е, 2-дезоксигидрокси-20Е и полипидина В. Замечено, что наборы характерных экистероидов для видов секций *Siphonomorpha*, *Silene* и *Otites* различны: для первой – 20-гидроксиэкидизон и полипидин В, для второй – 20-гидроксиэкидизон, полипидин В, интегристерон А, экидизон и 2-дезоксигидроксиэкидизон, для третьей – 20-гидроксиэкидизон, 2-дезоксигидроксиэкидизон, экидизон, 2-дезоксигидроксиэкидизон, 2-дезоксигидроксиэкидизон, 2-дезоксигидроксиэкидизон, сидистерон.

Богатый набор и разнообразие экистероидов, присутствующих в многочисленных видах *Silene* (более чем в 100 видах) дают возможность предположить, что экистероиды в этом роде имеют хемотаксономическое значение. Однако это требует дальнейшего подтверждения, возможно, оно более отчетливо проявится при изучении химического состава экистероидов, включая минорные компоненты у еще большего количества видов этого обширного рода.

Распределение экистероидов в процессе развития видов *Caryophyllaceae*

Изучена динамика содержания экистероидов следующих однолетних видов: *Silene bellidifolia*, *S. cretica*, *S. disticha*, *S. linicola*, *S. portensis*, *S. squamigera*, *S. thessalonica* и многолетних: *S. altaica*, *S. catholica*, *S. ciliata*, *S. damboldtiana*, *S. frivaldszkyana*, *S. italica*, *S. paradoxa*, *S. pseudotites*, *S. sendtneri*, *S. tatarica*, *S. viridiflora*, *Lychnis chalconica*. Замечено, что наибольшее содержание для надземной части всех видов наблюдается в периоды интенсивного роста и развития растений: для многолетних видов в следующие фазы - начало вегетации, бутонизации и цветения, тогда как для однолетних - только в фазы бутонизации и цветения. В фазе максимального накопления экистероидов в надземной части наблюдается наибольшее содержание и во всех ее компонентах.

Установлена зависимость характера динамики содержания 20-гидроксизекдизона в надземной части многолетних видов *Silene* в генеративный период от направленности изменения в листьях розеток в первый год. Увеличение к концу вегетации в первый год жизни приводит к максимуму в начале вегетации генеративного периода, в другом случае максимум наблюдался в фазу бутонизации или цветения. Таким образом, определив направленность изменений в листьях в первый вегетационный период, можно прогнозировать динамику содержания экистероидов в генеративный период развития и фазу максимального накопления, что важно в случае использования растений в качестве сырьевого источника фитоэкистероидов.

С целью оценки вклада каждого органа в биомассу растений и суммарное количество 20Е исследованы однолетние виды *S. bellidifolia*, *S. squamigera* и многолетний *S. viridiflora* (рис. 5, 6). Изучение распределения экистероидов в органах в процессе развития показало, что максимальное содержание их характерно для репродуктивных органов независимо от биоморфы видов, наименьшее в стеблях. Однако несмотря на самую высокую концентрацию (%) в бутонах и цветках, количество (мг/1 растение) аккумулируемого ими 20Е меньше, чем в плодах. Это является следствием значительного увеличения массы репродуктивных органов в процессе развития растений. Многолетний вид *S. viridiflora* в отличие от однолетних накапливает к концу каждого вегетационного периода максимальное количество в зимующих листьях и практически равные доли в запасующих органах (плодах и корнях). Максимальный вклад (более 50 %) в биомассу изучаемых однолетних растений вносят стебли с низким содержанием 20Е, однако доля их в

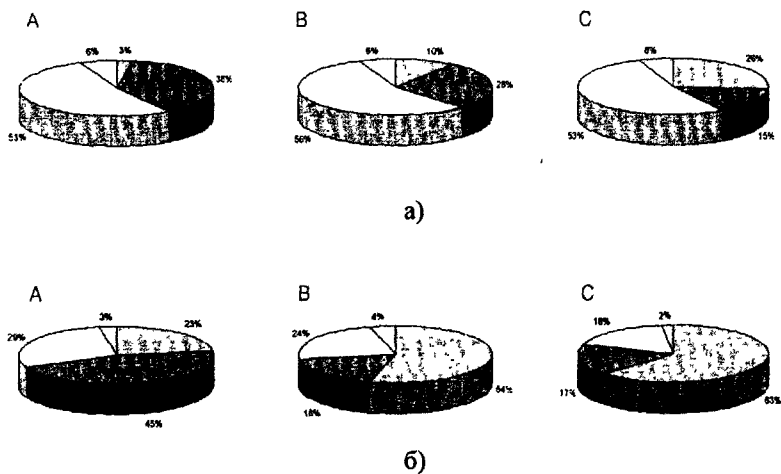


Рис.5. Вклад (%) органов в биомассу (а) и общее количество 20Е (б) однолетних растений *Silene bellidifolia*. А-бутионизация, В-цветение, С-плодоношение.

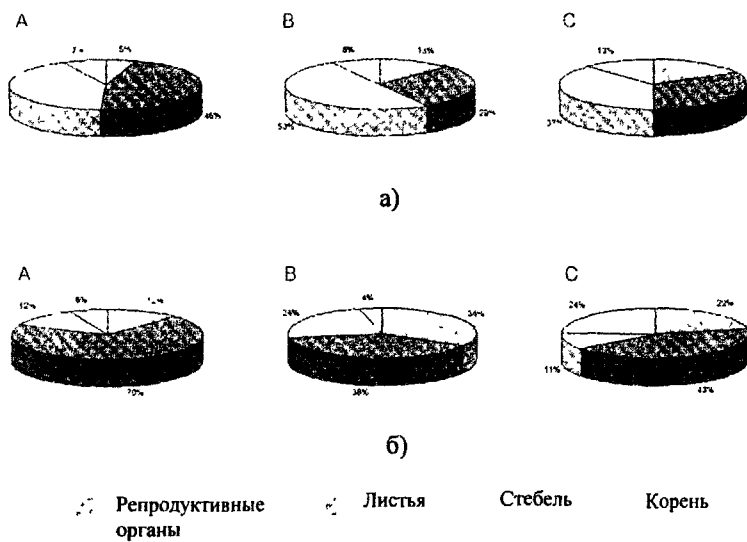


Рис. 6. Вклад органов в биомассу (а) и общее количество 20Е (б) многолетних растений *Silene viridiflora*

суммарном количестве 20Е в фазах цветения и плодоношения выше, чем в листьях, в то время как, доля плодов в суммарном количестве 20Е была преобладающей. В соответствии с биологией однолетних видов весовая доля корней, а также их вклад в общее количество 20Е (мг на 1 растение в сухом виде) наименьшие.

Физиологический смысл такой динамики лежит, видимо, в области функций, выполняемых соединениями: высокие концентрации экидистероидов защищают нежные репродуктивные органы от поедания насекомыми с целью сохранения органов размножения (семян), а возможно, значительные количества в последних необходимы для передачи информации новому поколению растений.

С учетом представленного распределения экидистероидов в видах *Silene*, в том числе и по метамерам, а также биологии развития можно предположить, что листья являются органами, синтезирующими эти соединения, а плоды накопителями. Однако вопрос о физиологической роли экидистероидов в растениях пока остается открытым, равно как и вопрос - для чего растения аккумулируют значительные количества экидистероидов в семенах.

Биологическая активность суммарных комплексов некоторых видов *Caryophyllaceae* и индивидуальных экидистероидов

Установлено, что комплекс биологически активных соединений *Lychnis chalconica*, в число которых входит и 20-гидроксиэкизон проявляет радиозащитные свойства: при пероральном введении в организм экстракта и изолированного из него 20Е средняя продолжительность жизни белых крыс, тотально облученных на рентгеновской установке дозой 8 Гр (ЛД 100/30), увеличивается на 6-9 суток (Акт об испытаниях - приложение 1).

Показано, что экстракты лихниса халцедонского и его биологически активные вещества: флавоноиды, полисахариды и экидистероид - полипептид В, обладают противогрибковой активностью. Следует отметить, что фунгистатическая активность водного экстракта лихниса халцедонского значительно выше эталонов: гризеофульвина, нистатина, нитрофунгина и других лекарственных препаратов растительного происхождения (Акт об испытаниях - приложение 2). Разработанный способ получения средства, обладающего противогрибковым действием защищен патентом РФ.

Установлено, что экистероидсодержащие растения *L.chalcedonica*, *S.dioica*, *S.tatarica* могут являться эффективными корректорами синдрома повышенной вязкости крови на моделях сердечно-сосудистых заболеваний, благодаря воздействию как на клеточные, так и на плазменные гемореологические факторы. Они эффективно в сравнении с пентоксифиллином снижают вязкость крови и агрегацию эритроцитов. Кроме того, впервые установлено, что 20Е, выделенный из лихниса халцедонского, оказывает существенное влияние на реологические свойства крови, выражающееся в снижении остроты проявления синдрома повышенной вязкости крови при ишемии мозга у крыс вплоть до полной нормализации основных гемореологических параметров. Исходя из наших данных об отчетливых реологических свойствах 20Е, можно предположить, что гемореологическая активность исследованных экстрактов обусловлена наличием в их составе экистероидов. Получено два новых гемореологических средства на основе индивидуального 20Е и *L.chalcedonica*, защищенные патентами РФ. По сравнению с эталоном пентоксифиллином 20Е применяется в значительно меньшей концентрации (10^{-5} и 10^{-7} г/мл соответственно). При этом 20Е уменьшал вязкость крови на 9.4 % по отношению к контрольным значениям, в то время как пентоксифиллин на 7.3 %. Полупериод агрегации эритроцитов у 20Е был на 20.7 % больше, чем в контроле, а у эталона сравнения на 17.9 %.

Таким образом, 20-гидроксиэкидзон проявляет выраженный гемореологический эффект, ограничивая повышение вязкости крови и спонтанной агрегации эритроцитов. Экстракты *Lychnis chalcedonica*, *Silene tatarica* и *S.dioica* могут быть основой для создания группы новых гемореологических средств. (Акт об испытаниях - приложение 3).

Экстракты *Silene viridiflora* и *Lychnis chalcedonica* проявили противоопухолевое действие. Первый достоверно повышал в 1.9 раза количество лейкоцитов в периферической крови у мышей, получавших комбинированное лечение и усиливал антиметастическое действие циклофосфана - количество метастазов на одну мышь снизилось в 2.4 раза. Экстракт лихниса халцедонского проявил свойство снижать токсическое действие циклофосфана и увеличивать его антиметастатическую активность.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения препаратов из растений семейства Гвоздичных в качестве средств, позволяющих улучшить традиционное химиотерапевтическое лечение злокачественных новообразований.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработан способ быстрого обнаружения фитостероидов, основанный на предварительном хроматографическом анализе экстрактов семян.

2. Методами радиоиммунного анализа, биотестирования и хромато-спектрофотометрии осуществлен скрининг семян 400 видов растений различных семейств, включая 266 видов, принадлежащих 28 родам *Caryophyllaceae*, в том числе 152 вида рода *Silene* L.

Впервые обнаружены экистероиды в 95 видах: 75 – р.*Silene*, 8 – *Lychnis*, 2 – *Petrocoptis*, 4 – *Sagina*, 2 – *Saponaria*, 3 – *Melandrium*, 1 – *Dianthus*. Установлена наибольшая встречаемость экистероидов в родах *Lychnis* и *Silene*. Выявлено 2 новых экистероидсодержащих рода: *Melandrium Roehl.*, *Petrocoptis A.Braun* (*Caryophyllaceae*).

3. Выделено 22 экистероида, в том числе новые неизвестные ранее экистероиды: 2-дезоксизэкизон 22 β -D-гликозид, 2-дезоксиполипидин В 3 β -D-гликозид и 2-дезоксиз-20,26-дигидроксиэкизон.

Установлен состав экистероидов 12 видов *Silene*. Наиболее богатыми источниками в качественном и количественном отношении оказались *Silene pseudotites*, *S.linicola*, *S.viridiflora*, из которых изолировано 14, 7 и 7 экистероидов соответственно.

4. Выделено и идентифицировано 7 индивидуальных экистероидов из *Lychnis chalcidonica* и *L.wilfordii*: 20-гидроксиэкизон, экизон, полипидин В, 24(28) - дегидромакистерон А, интегристерон А, стахистерон Д и витикостерон Е.

Показано, что для представителей родов *Silene* и *Lychnis* свойственен биосинтез характерных соединений: 20-гидроксиэкизон, полипидин В, экизон, понастерон А, 2-дезоксиз-20-гидроксиэкизон, а также таких редких экистероидов, как сидистерон, стахистерон Д, туркестерон, 24(28)-дегидромакистерон А и витикостерон Е.

Строение выделенных соединений установлено на основе совокупности физико-химических констант и спектральных данных.

5. В результате проведенного хемотаксономического анализа распространения экистероидов в роде *Silene* (на примере 105 видов) показано, что более половины секций включают либо только положительные, либо только отрицательные виды. В этих секциях можно с определенной вероятностью прогнозировать присутствие (отсутствие) экистероидов. Наличие экистероидов является дополнительным и необходимым кри-

терием для систематики рода *Silene* и поиска их продуцентов среди родственных видов.

6. Показано, что фазами максимального накопления экдистероидов для надземной части однолетних видов является период развития генеративных органов - бутонизация, цветение. В многолетних видах максимальное содержание наблюдается в следующих фенофазах - начало вегетации, бутонизация и цветение. В отдельных органах однолетних и многолетних видов отмечается разный характер динамики: максимальные значения как содержания (%), так и количества (мг/1 растение) экдистероидов в однолетних отмечается в репродуктивных органах, тогда как в органах многолетних видов наибольшая концентрация - в репродуктивных органах, а количество в листьях. По видимому, общей стратегией как в однолетних, так и многолетних видах *Caryophyllaceae* является синтез экдистероидов в листьях, а аккумуляирование - в плодах.

Установлено, что наибольшее накопление экдистероидов происходит на 2-4 годах жизни растений.

7. Выявлена гемореологическая активность экстрактов *Lychnis chalconica*, *Silene tatarica*, *Silene dioica*, *Silene linicola*, *Silene cretica*, *Silene viridiflora*. Наиболее эффективно в сравнении с пентоксифилином снижают вязкость крови и агрегацию эритроцитов *Lychnis chalconica*, *Silene tatarica*, *Silene dioica* и не уступают танакану. 20-Гидроксизкдизон, выделенный из *Lychnis chalconica*, оказывает существенное влияние на реологические свойства крови при ишемии мозга и инфаркте миокарда.

8. Установлено, что экстракты *Lychnis chalconica* и *Silene viridiflora* проявили противоопухолевое и антимагистатическое действие.

9. Биологически активные вещества и экдистероиды *Lychnis chalconica* являются основой для комплексного препарата анаболического, противогрибкового, радиопротекторного, гемореологического и противоопухолевого действий.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Зибарева Л.Н., Балтаев У.А., Свиридова Т.П., Саатов З., Абубакиров Н.К. Виды рода *Lychnis* L. - перспективные источники экдистероидов // Раст. ресурсы. - 1995. - Т. 31, вып. 4. - С. 1 - 9.

2. Зибарева Л.Н., Еремина В.И. Динамика содержания экдистерона в *Silene linicola*, *S. cretica* // Природокомплекс Томской области. Биологические и водные ресурсы. - 1995. - Т. II. - С. 75 - 79.
3. Зибарева Л.Н., Еремина В.И. Динамика содержания экдистероидов в видах *Silene* // Раст. ресурсы. - 1996. - Т. 32, вып. 1 - 2. - С. 106 - 110.
4. Зибарева Л.Н. Прогнозирование наличия экдистероидов в видах *Silene L.* и *Chenopodium L.* по их содержанию в семенах // Раст. ресурсы. - 1997. - Т. 33, вып. 1. - С. 89 - 92.
5. Зибарева Л.Н., Еремина В.И., Иванова Н.А. Новые экдистероидоносные виды рода *Silene L.* и динамика содержания в них экдистерона // Раст. ресурсы. - 1997. - Т. 33, вып. 3. - С. 73 - 76.
6. Плотников М.Б., Зибарева Л.Н., Колтунов А.А., Алиев О.И., Якимова Т.В., Маслов М.Ю. Гемореологические свойства экстрактов из некоторых растений, содержащих экдистероиды // Раст. ресурсы. - 1998. - Т. 34, вып. 1. - С. 91 - 97.
7. Зибарева Л.Н. Распространение экдистероидов в роде *Silene L.* и динамика их содержания // Раст. ресурсы. - 1999. - Т. 35, вып. 1. - С. 79 - 87.
8. Плотников М.Б., Алиев О.И., Васильев А.С., Маслов М.Ю., Чернышова Г.А., Краснов Е.А., Зибарева Л.Н. Гемореологическая активность экстрактов из надземной части *Lychnis chalconica L.* и *Rhaponiticum carthamoides (Willd.) Iljin* при экспериментальном инфаркте миокарда // Раст. ресурсы. - 1999. - Т. 35, вып. 1. - С. 103 - 107.
9. Плотников М.Б., Алиев О.И., Васильев А.С., Маслов М.Ю., Зибарева Л.Н., Дмитрук С.Е., Калинин Г.И. Гемореологические эффекты экстрактов *Lychnis chalconica L.* // Экспер. и клин. фармакол. - 2000. - Т. 63. - № 2. - С. 54 - 56.
10. Zibareva L. Distribution and levels of phytoecdysteroids in plants of genus *Silene* during development // Archives of insect biochemistry and physiology. - 2000. - V. 43. - P. 1 - 8.
11. Плотников М.Б., Зибарева Л.Н., Васильев А.С., Алиев О.И., Маслов М.Ю., Дмитрук С.Е. Гемореологическая активность экдистерона и различных фракций экстракта из надземной части *Lychnis chalconica L. in vitro* // Раст. ресурсы. - 2000. - Т. 36, вып. 3. - С. 91 - 94.
12. Meng J., Whiting P., Zibareva L., Bertho G., Girault J.-P., Lafont R., Dinan L. Identification and quantitative analysis of the phytoecdysteroids in *Silene* species (*Caryophyllaceae*) by high performance liquid chromatography. Novel ecdysteroids from *Silene pseudotites* // J. Chromatography. - 2001. - V. 935. - P. 309 - 319.

13. Зибарева Л.Н., Еремина В.И. Распределение 20-гидроксиэкдизона в различных частях *Silene bellidifolia* Juss. ex Jacq. и *S.squamigera* Boiss., выращиваемых в Сибирском ботаническом саду (Томск) // Раст. ресурсы. - 2002. - Т. 38, вып. 2. - С. 81 - 85.

14. Мамадалиева Н.З., Зибарева Л.Н., Саатов З. Фитоэкдистероиды растений *Silene linicola* // Химия природ. соедин. - 2002. - № 3. - С. 225 - 227.

15. Мамадалиева Н.З., Зибарева Л.Н., Lafont R., Саатов З. Исследование фитоэкдистероидов *Silene viridiflora* // Химия природ. соедин. - 2003. - № 2. - С. 150 - 153.

16. Зибарева Л.Н., Еремина В.И., Иванова Н.А., Лазьков Г.А. // Распределение фитоэкдистероидов в трибе *Sileneae* Dumort. (*Caryophyllaceae* Juss.) // Раст. ресурсы. - 2003. - Т. 39, вып. 3. - С. 45 - 53.

17. Zibareva L., Volodin V., Saatov Z., Savchenko T., Whiting P., Lafont R., Dinan L. Distribution of phytoecdysteroids in the *Caryophyllaceae* // <http://www.elsevier.com/inca/publications/store/2/7/3/index.htm> (Phytochemistry. - 2004. - V. 64. - N. 2 - P. 499 - 517.)

18. Пат. 1755440, МКИ А 61 К 35/78. Способ получения средства, обладающего противогрибковым действием / Л.Н. Зибарева, С.Е. Дмитрук, Е.Н. Сальникова. - №. 4838137/14; Заявлено 07.05.90; Оpubл. 1.03.93, Бюл. № 35. Приоритет 07.05.90.

19. Пат. 2082168, МКИ 6 G 01 N 33/50, 30/02, 30/90. Способ обнаружения и количественного определения экдистероидов в растительных объектах. / Л.Н.Зибарева., В.И.Еремина П.В.Зибарев (Россия). № 94002629/13; Заявлено 26.01.1994; Оpubл. 20.06.97, Бюл. №. 17. Приоритет от 26.01.1994.

20. Пат. 2138284, МКИ А 61 К 35/78. Гемореологическое средство и способ его получения / М.Б.Плотников, О.И.Алиев, А.С.Васильев, М.Ю.Маслов, Л.Н.Зибарева. - №. 98114435/14; Заявлено 14.07.98; Оpubл. 27.09.99, Бюл. №. 27. Приоритет 14.07.98.

21. Пат. 2160592, МКИ А 61 К 31/575, А 61 Р 7/00, 7/02. Гемореологическое средство / Л.Н.Зибарева, О.И.Алиев, А.А.Колтунов, М.Б.Плотников - №. 96118150/14; Заявлено 11.09.1996; Оpubл. 20.12.2000, Бюл. №. 35. Приоритет 11.09.1996.

Отпечатано на участке оперативной полиграфии
Редакционно-издательского отдела ТГУ
Лицензия ПД № 00208 от 20 декабря 1999 г.

Заказ № 110 “20” 08 2003 г. Тираж 100 экз.

2003-A
14832

14832