

© Коллектив авторов, 2006

Т. И. Ширшова<sup>1</sup>, Н. К. Политова<sup>1</sup>, С. А. Бурцева<sup>2</sup>,  
И. В. Бешлей<sup>1</sup>, В. В. Володин<sup>1</sup>

## АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НАТИВНЫХ ЭКДИСТЕРОИДОВ РАСТЕНИЯ *Serratula coronata* L. И НЕКОТОРЫХ ИХ АЦИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

<sup>1</sup> Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения  
Российской академии наук, Сыктывкар;

<sup>2</sup> Институт микробиологии АН РМ, Кишинев

Установлено, что нативные экдистероиды растения *Serratula coronata* L. – 20-гидрокси-экдизон, 25-S-инокостерон и экдизон не проявляли антибиотической активности по отношению к большинству тест-культур микроорганизмов. Введение ацильных групп в молекулу 20E значительно повышает антибиотическую активность по отношению к микроорганизмам, являющимся возбудителями воспалительных процессов и гнойных заболеваний, что позволяет предложить ацильные производные 20-гидроксиэкдизона для использования в ранозаживляющих препаратах.

Экдистероиды — группа природных соединений с широким спектром биологической активности. Впервые обнаруженные как гормоны линьки и метаморфоза насекомых, они широко представлены и в растениях [1, 2]. Показана перспектива использования экдистероидов в составе лекарственных препаратов адаптогенного, кардиоотропного, антиатеросклеротического, противовоспалительного и ранозаживляющего действия [2 – 9]. В работе [10] приведены сведения об отсутствии у экдистероидов антибактериальной и антифунгальной активности.

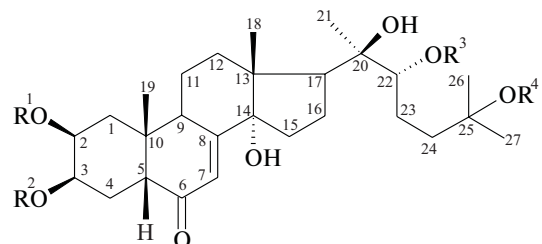
Помимо свободных экдистероидов в природных объектах как растительного, так и животного происхождения обнаружены их конъюгаты, самыми распространенным среди которых являются моноэфирные экдизона и 20-гидроксиэкдизона, а именно: 2-, 3- и 25-ацетаты или 22-эфиры высших карбоновых кислот [11 – 14]. Физиологические функции данного класса экдистероидных конъюгатов до настоящего времени детально не выяснены. У беспозвоночных их рассматривают как неактивную форму гормона. Показано, что образование ацильных производных обратимо, и в процессе эмбриогенеза под действием внутриклеточных эстераз происходит высвобождение активной формы гормона [2].

Целью настоящего исследования является изучение антимикробной активности нативных экдистероидов растения *Serratula coronata* L. и некоторых их ацильных производных.

### Экспериментальная химическая часть

<sup>1</sup>H ЯМР-спектры записаны на спектрометре Bruker (500 МГц) в дейтерированном хлороформе, внутренний стандарт — тетраметилсилан. Химические сдвиги ( $\delta$ ) даны в м.д., константы спин-спинового взаимодействия ( $K_{cc}$ ) и ширина сигналов на полувысоте ( $W/2$ ) — в Гц. Данные <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии приведены в тексте, где м — мультиплет, дд — дублет-дублет, д — дублет, с — синглет, уш.т — уширенный триплет, уш.с — уширенный синглет. Температуру плавления определяли на приборе фирмы Reichert (Австрия). Тонкослойную хромато-

рафию (ТСХ) проводили на пластинках Sorbfil (ПТСХ-П-А-УФ, Россия) в системе дихлорметан – метанол (9:1, v/v). Хроматографические подвижности ( $R_f$ ) веществ приведены в тексте. Колоночную хроматографию осуществляли на силикагеле L 100/250 мкм (Чехословакия). Системы растворителей и параметры колонок приведены в тексте. Препаративную нормально-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (НФ-ВЭЖХ) выполняли на хроматографическом оборудовании фирмы БиоХимМак (Россия) в изократическом режиме на колонке 250 × 25 мм, сорбент — Диасорб 130 (10 мкм), элюент — гексан – изопропанол – вода (100:40:3, v/v/v); скорость элюирования — 10 мл/мин. Детектирование осуществляли при помощи рефрактометра RIDK-101 (Чехословакия). Аналитическую НФ-ВЭЖХ осуществляли на оборудовании фирмы Esom Spol, S. R. O. (Чехословакия) в изократическом режиме на колонке 150 × 4,6 мм, сорбент — Separon SGX (5 мкм), элюент — гексан – изопропанол – вода (100:40:3, v/v/v); скорость элюирования — 1 мл/мин. Детектирование осуществляли с помощью УФ-детектора UV-VIS LCD 2536 (Чехословакия) при длине волны 254 нм. Время удерживания ( $t_R$ ) веществ приведено в тексте.



- I:  $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$   
 II:  $R^1 = Ac, R^2 = R^3 = R^4 = H$   
 III:  $R^1 = R^2 = R^3 = Ac, R^4 = H$   
 IV:  $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = Ac$

Экдизон (E), 25-S-инокостерон (In) и 20-гидроксиэкдизон (20E) были выделены из сухой биомассы растения *Serratula coronata* L. в лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии Коми НЦ УрО РАН. Методика выделения и характеристики экдистероидов приведены в монографии [15]. 20-Гидроксиэкдизон (I), представляющий собой полигидроксильированный стерин, содержит в своей структуре шесть гидроксигрупп: три вторичных (при C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> и C<sub>22</sub>) и три менее реакционноспособных — третичных (при C<sub>14</sub>, C<sub>20</sub> и C<sub>25</sub>)

Характеристики **20E (I)**: т.пл. = 241 – 242 °С; *t<sub>R</sub>* — 20'10; *R<sub>f</sub>* = 0,08. <sup>1</sup>H ЯМР-спектр, δ, (κ<sub>сс</sub>) W/2: 3,87 м, 22,3 (2-На); 4,02 уш.с, 9 (3-Не); 2,43 дд, (13,1; 4,2) (5-Н); 5,86 д, (2,5) (7-Н); 2,89 уш.т, 22,0 (9-На); 2,34 уш.т, (8,8) (17-Н); 3,45 м (22-Н); 0,86 с (18-Ме); 0,98 с (19-Ме); 1,21 с (21-Ме); 1,24 с (26-Ме); 1,25с (27-Ме) [15].

Известно, что реакционная способность гидроксильных групп 20E уменьшается в следующем ряду: C<sub>2</sub>, C<sub>22</sub>, C<sub>3</sub> > C<sub>25</sub> > C<sub>20</sub> >> C<sub>14</sub> [16]. Поэтому при прямой этерификации 20E большим избытком ангидрида карбоновой кислоты (Ac<sub>2</sub>O) достаточно легко могут быть получены три- и тетраэфираты. При эквимольном соотношении 20E и Ac<sub>2</sub>O была получена смесь моно-, ди-, три- и тетраацетатов. Из этой смеси методом препаративной НФ-ВЭЖХ нами был выделен 2-ацетат 20E. Подтверждение структур ацильных производных было проведено методом <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии.

**2-Ацетат 20E (II)**. Синтез осуществляли по методике, описанной в [17]. Для этого 0,5 г (1,04 ммоль) 20E растворили в 5 мл абсолютного пиридина, добавили 1 мл

(1,06 ммоль) уксусного ангидрида, смесь выдерживали при постоянном перемешивании в течение 5 ч при температуре 40 °С. После упаривания реакционной смеси в вакууме при 40 °С твердый остаток растворили в элюенте и хроматографировали методом препаративной НФ-ВЭЖХ. Для анализа фракций использовали метод аналитической НФ-ВЭЖХ. В качестве основного продукта реакции получен 2-ацетат 20E массой 0,087 г (выход 15 %). Т.пл. 218 – 220 °С; *t<sub>R</sub>* — 12'40; *R<sub>f</sub>* = 0,21. <sup>1</sup>H ЯМР-спектр, δ, (κ<sub>сс</sub>) W/2: 5,02 уш.т, 22,1 (2-На); 4,12 уш.с, 8,1 (3-Не); 2,52 дд, (13,4; 3,8) (5-Н); 5,85 д, (2,0) (7-Н); 3,08 уш.т, 22,4 (9-На); 2,34 уш.т, (8,3) (17-Н); 3,45 м (22-Н); 0,87 с (18-Ме); 0,98 с (19-Ме); 1,18 с (21-Ме); 1,22 с (26-Ме); 1,23 с (27-Ме); 2,07 с (CH<sub>3</sub>COO).

**2,3,22-Триацетат (III) и 2,3,22,25-тетраацетат 20E (IV)**. Синтез проводили согласно методике, описанной в [11]. 1 г (2,08 ммоль) 20E растворили в 37 мл абсолютно-го пиридина, добавили 28 мл (29 ммоль) уксусного ангидрида, смесь выдерживали в течение суток при температуре 40 °С. После упаривания реакционной смеси в вакууме при 40 °С твердый остаток растворили в минимальном количестве хлороформа и хроматографировали на колонке (50 г SiO<sub>2</sub> в хлороформе, 200 × 40 мм), элюент — хлороформ. Выделено 0,847 г (выход 63 %) 2,3,22,25-тетраацетата 20E. При дальнейшем элюировании 5 % раствором этанола в хлороформе получено 0,385 г (выход 31 %) 2,3,22-триацетата 20E. Характеристики 2,3,22-триацетата 20E: т.пл. = 195 – 198 °С; *t<sub>R</sub>* — 5'40; *R<sub>f</sub>* = 0,50. <sup>1</sup>H ЯМР-спектр, δ, (κ<sub>сс</sub>) W/2: 5,05 уш.т, 21,0 (2-На); 5,35 уш.с, 7,8 (3-Не); 2,39 м (5-Н); 5,85 д,

#### Антибиотическая активность экдизона, инокостерона, 20-гидроксиэкдизона и его ацетатов

Вещество	Концентрация, мкг/мл	Зоны подавления роста тест-культур микроорганизмов, мм																
		<i>St. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Micr. luteus</i>	<i>Pr. vulgaris</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. utilis</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. rugosa</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>Rh. gracilis</i>	<i>Erw. carotovora</i>	<i>A. alternata</i>	<i>Fusarium solani</i>
E	1000	0	0	0	0	–	–	0	–	0	–	0	0	–	–	–	–	0
	100	0	0	0	0	–	–	0	–	0	–	0	0	–	–	–	–	0
	10	0	0	0	0	–	–	0	–	0	–	0	0	–	–	–	–	0
	1	0	0	0	0	–	–	0	–	0	–	0	0	–	–	–	–	0
In	1000	0	20ст	0	0	–	–	0	–	0	–	0	0	–	–	–	–	0
	100	0	16ст	0	0	–	–	16 ст	–	0	–	0	0	–	–	–	–	0
	10	0	0	0	0	–	–	14 ст	–	0	–	0	0	–	–	–	–	0
	1	0	0	0	0	–	–	0	–	0	–	0	0	–	–	–	–	0
I	1000	14	11	пп.	0	14	16	0	12	0	0	0	0	0	пп.	пп.	пп.	0
	100	11	0	пп.	0	11	14	0	0	0	0	0	0	0	пп.	пп.	пп.	0
	10	0	0	пп.	0	0	9	0	0	0	0	0	13	0	0	пп.	пп.	0
	1	0	0	пп.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	1000	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.	0	пп.	пп.	пп.	пп.	0	0	пп.	пп.	пп.	пп.
	100	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.	0	пп.	пп.	пп.	пп.	0	0	пп.	пп.	пп.	пп.
	10	пп.	пп.	15	пп.	пп.	28	0	пп.	пп.	пп.	пп.	0	0	пп.	пп.	пп.	пп.
	1	14	пп.	10	пп.	пп.	0	0	пп.	0	пп.	пп.	0	0	0	0	0	0
III	1000	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.	0	0	пп.	пп.	пп.	пп.	0	0	пп.	пп.	пп.	пп.
	100	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.	0	0	пп.	пп.	пп.	пп.	0	0	пп.	пп.	пп.	пп.
	10	пп.	пп.	18	пп.	пп.	0	0	пп.	пп.	пп.	пп.	0	0	пп.	пп.	пп.	пп.
	1	14	пп.	0	пп.	пп.	0	0	пп.	0	пп.	0	0	0	0	0	0	0
IV	1000	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.	0	пп.	пп.	пп.	пп.	0	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.
	100	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.	0	пп.	пп.	пп.	пп.	0	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.
	10	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.	16	0	пп.	пп.	пп.	пп.	0	пп.	пп.	пп.	пп.	пп.
	1	14	пп.	пп.	пп.	пп.	0	0	пп.	пп.	пп.	0	0	0	0	0	0	0

**Примечание.** Оценка активности: пп — полное подавление роста тест-культуры; цифры — диаметр зоны подавления роста (мм); ст. — стимуляция роста; 0 — отсутствие влияния на рост тест-культуры; прочерк означает — тестирование не проводилось.

(2,0) (7-H); 3,10 уш.т, 22,7 (9-Ha); 2,38 уш.т, (8.8) (17-H); 4,85 дд (10,4; 2,0) (22-H); 0,83 с (18-Me); 1,01 с (19-Me); 1,26 с (21-Me); 1,20 с (26-Me); 1,22 с (27-Me); 1,98 с, 2,09 с, 2,10 с (CH<sub>3</sub>COO). 2,3,22,25-тетраацетат 20E: т.пл. = 199 – 201 °С; *t<sub>R</sub>* — 3'50; *R<sub>f</sub>* = 0,68. <sup>1</sup>H ЯМР-спектр, δ, (κ<sub>сс</sub>) W/2: 5,05 уш.т, 22,1 (2-Ha); 5,35 уш.с, 8,3 (3-He); 2,35 дд, (12,6; 3,8) (5-H); 5,85 д, (2,5) (7-H); 3,10 уш.т, 22,7 (9-Ha); 2,33 уш.т, (8,3) (17-H); 4,82 дд (10,3; 2,0) (22-H); 0,83 с (18-Me); 1,01 с (19-Me); 1,21 с (21-Me); 1,35 с (26-Me); 1,40 с (27-Me); 1,98 с, 2,00 с, 2,10 с, 2,12 с (CH<sub>3</sub>COO).

### Экспериментальная биологическая часть

В качестве тест-культур микроорганизмов были выбраны грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus*; грамотрицательные *Escherichia coli*, *Proteus rettgeri*, *Pr. morgani*, *Pr. vulgaris*; спорообразующие гнилостные *Bacillus cereus*, *B. subtilis*; кокковые *Micrococcus luteus*, условно-патогенные *Pseudomonas aeruginosa*; дрожжеподобные грибы рода *Candida* — *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. pelliculosa*, *C. albicans*, *C. rugosa*; дрожжи бесpigментные *Saccharomyces cerevisiae*; каротинообразующие дрожжи *Rhodotorula gracilis*; фитопатогенные бактерии *Erwinia caratovora*; нитчатые грибы *Alternaria alternata* и *Fusarium solani*, а также *Aspergillus niger* и *Penicillium expansum*. Для изучения антимикробной активности (АМА) соединений (в концентрациях 1000, 100, 10 и 1 мкг/мл) использовали метод диффузии в агар [18]. Культивирование микроорганизмов осуществляли на следующих питательных средах: условно-патогенные и гнилостные спорообразующие — на мясопептонном агаре и пептонном агаре, дрожжи — на суслоагаре 5 блг, дрожжеподобные грибы рода *Candida* — на среде Сабуро, фитопатогенные бактерии — на картофельном агаре, нитчатые грибы — на суслоагаре 3,5 блг. Для этого в чашки Петри заливали агаризованные среды, в которых были засеяны определенные культуры микроорганизмов. На поверхность агара в лунки заливали по 0,2 мл растворов тестируемых экидистероидов. Чашки помещали в термостат на 24 – 48 ч при температуре 27 – 37 °С (в зависимости от природы теста). После окончания опыта измеряли зоны роста или подавления роста тест-культур.

Из приведенных в таблице результатов видно, что нативные экидистероиды растения *S. coronata* — экидизон (E) и инокостерон (In) не проявляют АМА по отношению ко всем тестируемым микроорганизмам. Инокостерон даже слабо стимулирует рост кишечной палочки *E. coli* и спорообразующих гнилостных бактерий *B. subtilis*. 20E неактивен по отношению к большинству тест-культур микроорганизмов, хотя он полностью подавляет рост *Micrococcus luteus*, фитопатогенных бактерий *Erwinia caratovora* и нитчатых грибов *Alternaria alternata*. Введе-

ние ацетильной группы во второе положение 20E (II) приводило к существенному увеличению АМА, которая сохраняется и у триацетата (III) и тетраацетата 20E (IV). 20E и его ацетаты не влияют на рост грамотрицательных бактерий *Pr. rettgeri*, *Pr. morgani*, споровых *B. subtilis* и *C. rugosa*. Наибольшее различие в действии исследуемых ацетатов наблюдается по отношению к спорообразующим гнилостным бактериям *Bacillus cereus*: сам 20E стимулирует, моноацетат и тетраацетат полностью подавляют и триацетат 20E оказывает слабое действие на рост этой культуры. Моноацетат и триацетат 20E проявляют слабое угнетающее действие на рост бесpigментных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, в то время как тетраацетат полностью подавляет их рост, начиная с концентрации 10 мкг/мл.

### ЛИТЕРАТУРА

1. A. Butenandt and P. Karlson, *Z. Naturforschung*, **9B**(6), 389 – 391 (1954).
2. J. Koolman, *Zool. Science*, № 7, 563 – 580 (1990).
3. Е. А. Краснов, А. С. Саратиков, Г. Д. Якунина, *Химия природ. соедин.*, № 4, 550 (1976).
4. В. Н. Сыров, А. Г. Курмуков, *Фармакол. и токсикол.*, № 5, 690 – 693 (1976).
5. Ю. Д. Холодова, *Украинский биохим. журн.*, **51**(5), 560 – 575 (1979).
6. А. А. Ахрем, И. С. Левина, Ю. А. Титов, *Экидизоны — стероидные гормоны насекомых*, Наука и техника, Минск (1973).
7. R. Bergamasco and D. H. S. Horn, *Developments in endocrinology, 7. Progress in ecdysone research*, J. A. Hoffman (ed.), Amsterdam (1980), pp. 299 – 324.
8. K. Slama and R. Lafont, *Eur. J. Entomol.*, **92**(1), 355 – 377 (1995).
9. M. Detmar, M. Dumas, F. Bonte, et al., *Eur. J. Dermatol.*, **4**, 558 – 562 (1994).
10. В. М. Ratnayake Bandara, L. Jayasinghe, V. Karunaratne, et al., *Phytochemistry*, **28**, 1073 – 1075 (1989).
11. И. Л. Зацны, М. Б. Горовиц, Н. К. Абубакиров, *Химия природ. соедин.*, № 2, 175 – 178 (1973).
12. M. P. Calcagno, I. Camps, J. Coll and E. Mele, *Eur. J. Entomol.*, **92**, 287 – 294 (1995).
13. P. A. Dichi, J.-L. Connat, J. P. Girault, and R. Lafont, *Int. J. Invert. Reprod. Devel.*, № 8, 1 – 13 (1985).
14. K. H. Hoffman, D. Bulcnda, E. Thiry, et al., *Life Science*, **37**(2), 185 – 192 (1985).
15. В. В. Володин (ред.), *Фитоэкидистероиды*, Наука, Санкт-Петербург (2003), сс. 117 – 120.
16. L. Dinan, *J. Steroid. Biochem.*, **31**(2), 237 – 245 (1988).
17. Н. К. Политова, Л. А. Ковлер, В. В. Володин и др., *Химия растит. сырья*, № 2, 69 – 81 (2001).
18. Н. С. Егоров, *Руководство к практическим занятиям по микробиологии*, Высшая школа, Москва (1985), сс. 3 – 10.

Поступила 19.08.04

## ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NATURAL ECDYSTEROIDS FROM *Serratula coronata* AND THEIR ACYL DERIVATIVES

T. I. Shirshova<sup>1</sup>, N. K. Politova<sup>1</sup>, S. A. Nurtseva<sup>2</sup>, I. V. Beshlei<sup>1</sup>, and V. V. Volodin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Division, Russian Academy of Medical Sciences, Syktyvkar, Russia

<sup>2</sup> Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Republic of Moldova, Chisinau, Moldova

Natural ecdysteroids isolated from *Serratula coronata* L., including 20-hydroxyecdysone (20E), 25-S-inokosterone, and ecdysone, did not exhibit antimicrobial activity with respect to most standard test cultures of microorganisms. The introduction of acetyl group into 20E molecule increased the antibacterial activity with respect to microbes inducing inflammatory and purulent processes. Acyl derivatives of 20-hydroxyecdysone can be suggested for use in wound-healing compositions