

УДК 581.207:547.918

## ПРОТИВОГРИБКОВАЯ И ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КАЛОПАНАКСА СЕМИЛОПАСТНОГО

Панов Д.А., Гришкoveц В.И., Курсанова М.А., Криворутченко Ю.Л.

Хорошо известно, что лечение и профилактика грибковых инфекций – одна из наиболее острых проблем в современной медицине. Всемирная Организация Здравоохранения рассматривает ее как одну из наиболее приоритетных [1]. Однако, несмотря на возросшие возможности современной противогрибковой терапии, при лечении микозов возникают определенные проблемы, связанные с резистентностью штаммов патогенных грибов и наличием ряда побочных эффектов у активных синтетических препаратов при длительном лечении. В этой связи не ослабевает интерес и к природным соединениям с фунгицидной активностью.

Тритерпеновые гликозиды уже давно известны в качестве таких веществ природного происхождения. В частности, работы Леви и др. [2] по изучению противогрибковой активности гликозидов показали, что она присуща довольно широкому ряду как тритерпеновых, так и стероидных гликозидов, и что хорошо прослеживается корреляция между противогрибковой и гемолитической активностями. Этими же авторами было обнаружено, что тритерпеновые гликозиды обладают высокой активностью как в отношении растительных патогенных грибов (*Fusarium*, *Trichoderma*, *Sclerotium*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Phytophthora* spp. и т. д.), так и в отношении грибов, являющихся патогенными для человека (виды *Trichophyton*, *Microsporma*, *Microsporum*, *Candida* и т. д.).

Кандидомикозы, вызываемые чаще всего видами *Candida albicans*, *C. tropicalis* и *C. krusei*, по мнению Петри [3] являются наиболее распространенными грибковыми патологиями у людей. Тритерпеновые гликозиды, активные в отношении различных патогенных видов рода *Candida*, к настоящему времени обнаружены в растениях *Solidago virgaurea* (Asteraceae) [4], *Primula acaulis* (Primulaceae) [5], *Hedera helix* (Araliaceae) [6] и в морских животных организмах – различных видах рода *Holothuria* [7].

Задачей данной работы является изучение биологического действия (противогрибковой и гемолитической активности) монодесмозидных тритерпеновых гликозидов, выделенных из разновидностей калопанакса семилопастного – *Kalopanax septemlobum* (Thunb.) Koidz. var. *maximowiczii* (Van Houtte) Nara [8, 9] и *K. septemlobum* var. *typicum* (Nakai) Pojark [10, 11].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Противогрибковая активность оценивалась на музейном штамме *Candida albicans* (ССМ 885). Противогрибковую активность гликозидов определяли методом серийных разбавлений на жидкой питательной среде Сабуро, содержащей в 1 л раствора 10,0 г мясного пептона и 40,0 г глюкозы (рН 7,5) и тритерпеновые гликозиды в концентрации от 20 до 2000 мкг/мл. Исходные растворы гликозидов также готовились на среде Сабуро. Монодесмозидные гликозиды предварительно переводились в натриевые соли действием примерно 100% избытка 2%-ного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  при нагревании с последующим разбавлением средой Сабуро. Все среды и растворы гликозидов стерилизовались в автоклаве. Для определения антимикробного действия в подготовленные растворы гликозидов добавлялась культуральная жидкость до достижения концентрации около 100 млн. клеток/мл и растворы выдерживались в термостате при 28°C в течение 48 ч., после чего по мутности оценивалась интенсивность развития микроорганизмов.

Изучение гемолитической активности тритерпеновых гликозидов *in vitro* проводили по методике [12] с использованием 2%-ной суспензии эритроцитов крови свиньи, промытых физиологическим раствором (0,89%-ный раствор  $\text{NaCl}$ ), в изотоническом фосфатном буфере со значением рН 7,6. Гликозиды растворяли в том же фосфатном буфере. В эксперименте смешивали одинаковые объемы раствора гликозида и суспензии эритроцитов. Смесь выдерживали 30 минут при комнатной температуре. Негемолизированные эритроциты удаляли из смеси центрифугированием при 3000 об/мин. Концентрацию гемоглобина в супернатанте определяли фотометрически при  $\lambda_{\text{max}}$  577 нм и оптической толщине слоя в 1 см. Определялись молярные концентрации гликозидов, вызывающие 50% гемолиз эритроцитов ( $\text{HC}_{50}$ ). Полному гемолизу, достигавшемуся высокими концентрациями препарата "Saponin" соответствовало значение оптической плотности  $D=0,90$  (в максимуме полосы поглощения), а 50% гемолизу – 0,45.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментов по определению минимальных ингибирующих рост грибов концентраций (МИГ) и гемолитической активности тритерпеновых гликозидов представлены в табл. 1.

Высокую активность в отношении музейного штамма *C. albicans* проявили гликозиды 1–7. Но наиболее перспективными для дальнейших более углубленных исследований являются гликозиды 1–3, для которых значение МИГ составило 0,10–0,14 мкмоль/л (50–75 мкг/мл). Это существенно меньше, чем действующие концентрации таких часто употребляемых антисептиков как хлоргексидин (100 мкг/мл), мирамистин (100 мкг/мл), резорцин (2000 мкг/мл), иодоформ (1000 мкг/мл) [13]. Однако в экспериментах *in vitro* ряд монодесмозидных гликозидов, содержащих один или два сахарных остатка (8 – 10), не обнаруживали какой-либо активности в диапазоне исследованных концентраций до 2 мкмоль/л, хотя они и проявляли невысокую гемолитическую активность. В целом в исследованном ряду

монодесмозидных гликозидов прослеживается корреляция между антифунгальной и гемолитической активностью.

Таблица 1.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК, мкмоль/л) тритерпеновых гликозидов из *Kalopanax septemlobum* в отношении музейного штамма *Candida albicans* и концентрации, вызывающие 50%-ный гемолиз (НС<sub>50</sub>) эритроцитов

Соединение	Структура гликозида	МИК, мкмоль/л	НС <sub>50</sub> , мкмоль/л
1	Rha→2Ara→3OleanA	0,14	3
2	Rha→2Ara→3EchinA	0,13	5
3	Rha→2Ara→3Hed	0,10	6
4	Xyl→3Rha→2Ara→3OleanA	0,17	9
5	Xyl→3Rha→2Ara→3Hed	0,17	10
6	Glc→4Xyl→3Rha→2Ara→3OleanA	0,19	8
7	Glc→4Xyl→3Rha→2Ara→3Hed	0,17	10
8	Glc→2Ara→3Hed	–	20
9	Glc→3OleanA	–	8
10	Glc→2Glc→3OleanA	–	10

Примечание: Rha – α-L-Rha<sub>p</sub>; Ara – α-L-Ara<sub>p</sub>; Xyl – β-D-Xyl<sub>p</sub>; Glc – β-D-Glc<sub>p</sub>;  
OleanA – олеаноловая кислота;  
EchinA – эхиноцистовая кислота;  
Hed – хедерагенин.

## ВЫВОДЫ

1. У ряда монодесмозидных гликозидов из *Kalopanax septemlobum* выявлена фунгицидная активность в отношении патогенных для человека грибов *Candida albicans*.

2. Определены минимальные ингибирующие концентрации для исследованных гликозидов.

3. Выявлены наиболее активные гликозиды – 3-O-α-L-рамнопиранозил-(1→2)-O-α-L-арабинопиранозиды хедерагенина, олеаноловой и эхиноцистовой кислот, перспективные для дальнейшего углубленного исследования.

## Список литературы

1. Микозы в Европе // Отчет о совещании ВОЗ. – Гамбург (Германия). – 1983.
2. Levy M., Zehavi U., Naim M., Polachek I. An improved procedure for the isolation of medicagenic acid 3-O-β-D-glucuronopyranoside from alfalfa roots and its antifungal activities on plant pathogens // J. Agric. Food Chem. – 1986. – Vol.34. – P. 960-963.

#### ПРОТИВОГРИБКОВАЯ И ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

3. Petri M.G., Konig J., Moecke H.P. Epidemiology of invasive mycosis in ICU patients // *Intensive Care Med.* – 1997. – Vol.23. – P. 317-325.
4. Hiller K., Bader G., Schulten H.-R. Virgaurea Saponin I, ein neues bisdesmosidisches Triterpene Saponin aus *Solidago virgaurea* L. // *Pharmazie.* – 1987. – B.42. – S. 541-543.
5. Margineau C., Cucu V., Grecu L., Parvu C. Anticandida action of a saponin from *Primula* // *Planta Medica.* – 1976. – Vol.30. – P. 35-38.
6. Timon-David P., Julien J., Gasquet M., Balansard G., Bernard P. Recherche d'une activite antifongique de plusieurs principes actifs. Extraits du lierre grim pant: *Hedera helix* L. // *Ann. Pharmac. Fr.* – 1980. – Vol. 38. – P. 545-552.
7. Kitagawa I., Kobayashi M., Hori M., Kyogoku Y. Marine natural products. XVIII. Four lanostane-type triterpene oligoglycosides, bivittosides A, B, C and D, from Okinawan sea cucumber *Bohadschia bivittata* MITSUKURI // *Chem. Pharm. Bull.* – 1989. – Vol. 37, № 1. – P. 61-67.
8. Гришковец В.И., Панов Д.А., Качала В.В., Шапков А.С. Тритерпеновые гликозиды *Kalopanax septemlobum* I. Гликозиды А, В, С, F, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>, Н и J из листьев *Kalopanax septemlobum* var. *maximowiczii*, интродуцированного в Крыму // *Химия природ. соедин.* – 2005. – № 2. – С. 156-159. – ISSN-0023-1150.
9. Панов Д.А., Гришковец В.И., Качала В.В., Шапков А.С. Тритерпеновые гликозиды *Kalopanax septemlobum* II. Гликозиды Е, К, и L из листьев *Kalopanax septemlobum* var. *maximowiczii*, интродуцированного в Крыму // *Химия природ. соедин.* – 2005. – № 3. – С. 260-262. – ISSN-0023-1150.
10. Панов Д.А., Гришковец В.И. Тритерпеновые гликозиды *Kalopanax septemlobum* IV. Гликозидный состав плодов растения, интродуцированного в Крыму // *Химия природ. соедин.* – 2005. – № 4. – С. 388-389. – ISSN-0023-1150.
11. Панов Д.А., Гришковец В.И., Качала В.В., Шапков А.С. Тритерпеновые гликозиды *Kalopanax septemlobum* VI. Гликозиды из листьев *Kalopanax septemlobum* var. *typicum*, интродуцированного в Крыму // *Химия природ. соедин.* – 2006, № 1. – С. 40-43. – ISSN-0023-1150.
12. Namba T., Yoshizaki M., Tomimori T., Kobashi K., Mitsui K., Hase J. Fundamental studies on the evaluation of the crude drugs (I). Hemolytic and its protective activity of Ginseng saponins // *Planta Medica.* – 1974. – Vol. 25. – P. 28-38.
13. Красильников А.И. Справочник по антисептике. – Минск: Высшая школа, 1995. – 367 с.

Поступила в редакцию 01.03.2006 г.