

УДК 547.918

ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ СЕМЕЙСТВА АРАЛИЕВЫХ

Гришковец В.И.¹, Довгий И.И.², Яковишин Л.А.²

¹Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь, Украина

²Севастопольский национальный университет ядерной энергии и промышленности,
Севастополь, Украина

E-mail: chemsevntu@rambler.ru

Изучена гемолитическая активность тритерпеновых гликозидов семейства аралиевых. Выявлены структурные факторы, влияющие на уровень активности, связанные с природой агликона и углеводной цепи.

Ключевые слова. тритерпеновые гликозиды, гемолитическая активность, семейство аралиевых.

ВВЕДЕНИЕ

Способность сапонинов вызывать разрушение эритроцитов крови, или гемолиз, в эксперименте *in vitro* впервые была обнаружена еще в конце XIX века [1]. Очевидно, что высокая токсичность сапонинов для хладнокровных организмов (например, рыб) и для теплокровных животных и человека при попадании непосредственно в кровь были известны еще раньше. С тех пор это биологическое свойство гликозидов постоянно привлекало внимание исследователей как с точки зрения выяснения механизма гемолитического действия, так и выяснения структурных факторов, ответственных за его проявление. Было предпринято много усилий для выяснения связи гемолитической активности со структурой. Однако и к настоящему времени этот вопрос далек от своего полного решения. Подавляющая часть исследований проводилась с тритерпеновыми гликозидами β -амиринового ряда, кроме того, высокая гемолитическая активность обнаружена у тритерпеновых гликозидов ланостанового ряда из голотурий [2], однако тритерпеновые гликозиды даммаранового ряда, присутствующие главным образом в видах рода *Panax*, оказались гемолитически неактивны [3], а гемолитическая активность тритерпеновых гликозидов других рядов к настоящему времени практически не изучалась.

В отношении структурных факторов в агликонах β -амиринового ряда было высказано предположение, что для проявления гемолитической активности важно наличие полярных заместителей в кольце А и умеренно полярных групп в кольцах D и E [5], хотя наличие большого числа свободных гидроксильных групп в кольцах D и E ведет к снижению гемолитической активности. В отношении углеводной части гликозидов также было отмечено, что общее увеличение полярности ведет к снижению гемолитической активности, так что монозиды более активны чем биозиды, и удлинение линейной углеводной цепи ведет к снижению активности,

однако разветвление углеводной цепи вызывает повышение гемолитической активности, хотя здесь имеются и исключения [6].

Механизм гемолитического действия тритерпеновых гликозидов является предметом постоянного внимания исследователей, хотя основные черты его уже достаточно однозначно установлены [7]. Его основные этапы включают адсорбцию гликозидов на мембранах эритроцитов [8], образование комплексов со стеринами (холестерином) мембран [9, 10], приводящее к реорганизации структуры мембран [11] с образованием в начале неселективных пор (каналов), вызывающих выход ионов K^+ , а затем при большей концентрации гликозидов и пор (каналов) большого размера, позволяющих выход из эритроцитов УФ-поглощающих веществ [12]. Следствием этих процессов является полное разрушение эритроцитов и выход гемоглобина и других клеточных компонентов в окружающую среду.

Несмотря на значительную изученность вопроса о гемолитическом действии сапонинов мы провели определение этого вида активности у значительного числа выделенных из видов аралиевых тритерпеновых гликозидов. Это объясняется с одной стороны тем, что определение данного вида активности выполняется наиболее просто и наиболее точно, поскольку эксперименты проводятся на отдельных клетках, а продукт гемолиза – гемоглобин легко и точно определяется спектрофотометрически. С другой стороны, данный вид активности хорошо коррелирует с большинством других видов биологической активности, в основе которых лежит действие гликозидов на клеточные мембраны и как результат на организм в целом – цитостатической, цитотоксической, аллелопатической, нейротропной, спермицидной, антибактериальной, антифунгальной, антигельминтной и рядом других.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение гемолитической активности тритерпеновых гликозидов *in vitro* проводили по методике [4], используя 1% суспензию эритроцитов крови свиньи в изотоническом фосфатном буфере (смесь 300 мл 0,1 М раствора NaH_2PO_4 и 200 мл 0,1 М раствора Na_2HPO_4) при значении pH 7,0. 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 λ_{max} 577 нм и оптической толщине слоя в 1 см. Определялись молярные концентрации гликозидов, вызывающие 50% гемолиз эритроцитов (HC_{50}). Полному гемолизу, достигавшемуся высокими концентрациями препарата "Saponin" (не приводящими к дальнейшему возрастанию оптической плотности) соответствовало значение $D=0,82$ (в максимуме полосы поглощения), а 50% гемолизу – 0,41.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение гемолитической активности гликозидов проводили на изолированных эритроцитах свиной крови, отмытых от белков плазмы. Все эксперименты по определению гемолитической активности выполнялись с использованием суспензии эритроцитов и растворов гликозидов в изотоническом фосфатном буфере при рН 7,4 (рН плазмы крови и многих биологических жидкостей), поскольку выяснилось, что гемолитическая активность гликозидов очень сильно зависит от рН среды. В качестве меры гемолитической активности определялась концентрация гликозида (HC_{50}), вызывающая 50%-ный гемолиз в течение 15-20 минут.

Отметим, что, как и следовало ожидать, все исследованные бисдесмозидные гликозиды не проявили какой-либо гемолитической активности в концентрациях вплоть до 10⁻¹ моль/л. В Табл. 1 приведены результаты определения гемолитической активности выделенных или полученных щелочным гидролизом мондесмозидных тритерпеновых гликозидов с углеводной цепью по гидроксильной группе у С-3 атома агликона.

Прежде всего рассмотрим зависимость гемолитической активности от структуры агликонной части гликозида. В ходе работы были выделены и протестированы гликозиды лупанового, α -амиринового (урсанового) и β -амиринового (олеананового) рядов. К сожалению, все выделенные нами гликозиды лупанового ряда не имеют углеводной цепи по С-3 атому агликона, так что определение гемолитической активности их прогенинов (агликонов) в эксперименте *in vitro* не представляется возможным ввиду низкой растворимости. Однако для оценки гемолитической активности производных лупанового ряда мы синтезировали достаточно хорошо растворимый 3-сульфат бетулиновой кислоты, встречающийся в видах рода *Schefflera*, путем сульфатирования бетулиновой кислоты комплексом SO_3 -Py в пиридине предложенным нами методом. Полученный продукт был гемолитически неактивным, что свидетельствует об отсутствии гемолитической активности у гликозидов всего лупанового ряда, поскольку наличие заместителей в агликонной части обычно лишь ослабляет гемолитическую активность.

Выделенный 3-О-арабинопиранозид 27-гидроксиурсоловой кислоты не проявил даже слабой гемолитической активности. Аналогично, оказался неактивным и синтезированный 3-сульфат урсоловой кислоты. Изомерные смеси эквимольных по данным ЯМР количеств 3-О-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О-арабинопиранозидов олеаноловой и урсоловой кислот (**15** и **13**) показали активность примерно вдвое меньшую, чем соответствующий чистый гликозид олеаноловой кислоты. Таким образом очевидно, что производные α -амиринового ряда также, как и лупанового ряда, гемолитически не активны. Из литературных данных следует, что и гликозиды даммаранового ряда не проявляют гемолитической активности [4].

Подавляющее число протестированных гликозидов β -амиринового ряда, в отличие от гликозидов вышеперечисленных рядов, в той или иной степени проявляют гемолитическую активность. Это сразу позволило сделать вывод, что одним из необходимых условий для проявления гемолитической активности является наличие шестичленного пятого кольца E (в отличие от пятичленного в агликонах лупанового

ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ...

ряда или его отсутствия в агликонах даммаранового ряда) и присутствие в нем у атома С-20 гем-диметильной группировки (в отличие от виц-диметильной группировки у атомов С-19 и С-20 в агликонах α -амиринового ряда). Интересно отметить, что отсутствие одной из гем-диметильных групп в гликозидах 30-нортритерпеноидов (30-норолеаноловой кислоты и 30-норхедагенина), формально также относящихся к β -амириновому ряду, приводит к полной потере гемолитической активности.

Таблица 1
Концентрации тритерпеновых гликозидов, вызывающие 50%-ный гемолиз (НС₅₀) и их относительная гемолитическая активность

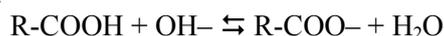
Соединение	Структура	(НС ₅₀), мкмоль/л	Относительная активность, %
1	Ara→ ³ UrsA	-	0
2	Ara→ ³ OleanA	4,0	150
3	Ara→ ³ EchinA	4,0	150
4	Ara→ ³ Hed	4,9	120
5	Glc→ ³ Eryt	-	0
6	Glc→ ³ OleanA	8	75
7	Glc→ ³ Hed	15	40
8	GlcUA→ ³ OleanA	16	37
9	GlcUA→ ³ Hed	28	21
10	-O ₃ S→ ³ OleanA	20	30
11	-O ₃ S→ ³ EchinA	46	13
12	-O ₃ S→ ³ BetA	-	0
13	Rha→ ² Ara→ ³ UrsA	-	0
14	Rha→ ² Xyl→ ³ OleanA	6,0	100
15	Rha→ ² Ara→ ³ OleanA	3,0	200
16	Rha→ ² Ara→ ³ EchinA	5,0	120
17	Rha→ ² Ara→ ³ Hed	6,0	100
18	Rha→ ² Ara→ ³ Caul	30	20
19	Rha→ ² Ara→ ³ nor-Hed	-	0
20	Glc→ ² Ara→ ³ OleanA	10	60
21	Glc→ ² Ara→ ³ Hed	20	30
22	Glc→ ³ Ara→ ³ OleanA	30	20
23	Glc→ ³ Ara→ ³ nor-OleanA	-	0
24	Glc→ ² Glc→ ³ Eryt	-	0
25	Glc→ ² Glc→ ³ OleanA	10	60
26	Glc→ ² Glc→ ³ Hyps	40	15

Продолжение Таблицы 1

Соединение	Структура	(НС50), мкмоль/л	Относительная активность, %
27	Glc→ ² Glc→ ³ Hed	60	10
28	Rha→ ² Glc→ ³ Hed	8	75
29	Gal→ ² GlcUA→ ³ Hed	50	12
30	Xyl→ ³ Rha→ ² Ara→ ³ Hed	10	60
31	Glc→ ² Gal→ ² GlcUA→ ³ Hed	60	10
32	Glc→ ⁴ Xyl→ ³ Rha→ ² Ara→ ³ Hed	10	60
33	[Glc→ ⁴]-[Rha→ ²]-Ara→ ³ OleanA	1,0	600
34	[Glc→ ⁴]-[Rha→ ²]-Ara→ ³ Hed	4,0	150
35	[Glc→ ³]-[Gal→ ²]-Ara→ ³ OleanA	18	33
36	[Rha→ ⁴ Glc→ ⁴]-[Rha→ ²]-Ara ³ OleanA	4,0	150

Примечание. В данной таблице использованы условные обозначения: UrsA – урсоловая кислота; OleanA – олеаноловая кислота; EchinA – эхиноцистовая кислота; BetA – бетулиновая кислота; Hups – гипсогенин; Hed – хедерагенин; Caul – каулофиллогенин; Eryt – эритродиол; nor-OleanA – 30-норолеаноловая кислота; nor-Hed – 30-норхедагенин.

Еще одним принципиальным фактором для проявления гемолитической активности в гликозидах β-амиринового ряда является наличие карбоксильной группы у С-17, поскольку гликозиды эритродиола с первичноспиртовой группой у С-17 оказались гемолитически неактивными. Однако карбоксильная группа не должна участвовать в образовании ацилгликозидной связи (что осуществляется в бисдесмозидных гликозидах), поскольку в этом случае даже при наличии одного моносахаридного остатка гемолитическая активность полностью исчезает. Более того, гемолитическую активность гликозидам придает именно недиссоциированная форма карбоксильной группы у С17, так как было обнаружено, что при увеличении рН тест-системы гемолитическая активность закономерно уменьшалась, что, несомненно, связано с уменьшением доли недиссоциированной формы вследствие сдвига равновесия вправо:



Из других структурных факторов в агликонах β-амиринового ряда в серии изученных гликозидов следует отметить влияние модификаций гем-диметильной группировки у С-4 (метильные группы С-23 и С-24) в кольце А. Так, сопоставление гемолитической активности гликозидов олеаноловой кислоты, гипсогенина и хедерагенина с одинаковыми углеводными частями по С-3 атому агликона приводит к выводу что гемолитическая активность не исчезает, но закономерно убывает при изменении характера группы С-23 в ряду: -CH₃, -CHO, -CH₂OH. Очевидно, здесь имеет значение не степень окисленности атома С-23, а увеличение полярности этой группы. К снижению гемолитической активности приводит и введение гидроксильной группы в кольцо D. Так, гликозиды эхиноцистовой кислоты с 16-α-ОН группой

гемолитически менее активны соответствующих гликозидов олеаноловой кислоты, но несколько более активны, чем соответствующие гликозиды хедерагенина. Очевидно, здесь также имеет значение полярность дополнительной группы, поскольку вторичноспиртовая 16- α -ОН группа менее полярна, чем первичноспиртовая 23-ОН группа. Та же закономерность прослеживается и при наличии в агликоне двух гидроксильных групп у С-23 и С-16 в гликозидах каулофиллогенина, которые оказались еще менее активны, чем соответствующие гликозиды хедерагенина.

К сожалению, в агликонах выделенных нами гликозидов нет гидроксильных или иных групп в кольцах В, С и Е, но с учетом полученных и вышеприведенных литературных данных можно утверждать, что наличие полярных групп в агликонной части закономерно приводит к уменьшению гемолитической активности и предположить, что их локализация не имеет принципиального значения. Можно также предположить, что, несмотря на определенное снижение гемолитической активности, при введении полярных групп заметно повышается растворимость гликозидов, что может иметь не менее важное значение в биологических системах.

Таким образом, из сравнительного анализа полученных результатов можно заключить, что для проявления гемолитической активности в тритерпеновых гликозидах необходимо наличие в агликонной части пятого шестичленного кольца Е с гем-диметильной группой у С-20 и наличие свободной карбоксильной группы у С-17. Введение дополнительных группировок в различные положения агликонной части не устраняет гемолитическую активность, но ведет к ее ослаблению с увеличением общей полярности введенных групп.

Рассмотрим влияние моносахаридного состава и структуры углеводной цепи по С-3 атому агликона на проявление гемолитической активности. Прежде всего, отметим, что наиболее активными оказались гликозиды с одним моносахаридным остатком, а при увеличении их до четырех в линейной (неразветвленной) цепи активность закономерно снижалась. Это наблюдение, сделанное нами для гликозидов олеаноловой кислоты и хедерагенина, несколько противоречит данным авторов [13], которые пришли к выводу, что в тритерпеновых гликозидах голотурий наиболее гемолитичны гликозиды с линейным тетрасахаридным фрагментом по С-3 атому агликона. Не исключено, что причина этого – существенно иной тип агликонных частей (циклоланостановые) и природа входящих моносахаридных остатков.

Поскольку исследованные гликозиды с одним моносахаридным остатком по С-3 агликона наиболее активны, а удлинение цепи лишь ослабляет активность, то понятно, что природа моносахаридного остатка, непосредственно связанного с агликоном оказывает наиболее сильное влияние на активность как монозидов, так и гликозидов с более сложной по строению углеводной цепью. Так в случае наличия у С-3 одного моносахаридного остатка или остатка серной кислоты гемолитическая активность возрастает в ряду 3-сульфаты < глюкоуроноиды < глюкозиды < арабинозиды (\approx ксилозиды). При этом четко прослеживается зависимость активности прежде всего от полярности остатка, а не от его химической природы или стереохимических особенностей. Для производных хедерагенина в выше приведенном ряду активность возрастает примерно на порядок. К сожалению, не удалось определить гемолитическую активность для арабинозида олеаноловой

кислоты и его еще менее полярных 2-, 3- и 4-О-ацетилпроизводных в виду их недостаточной растворимости. Однако из вышеприведенных наблюдений она должна быть очень высокой, и не исключено, что для проявления активности этих соединений *in vivo* растворимость в воде не имеет столь принципиального значения.

Дисахаридные фрагменты по С-3 атому агликонов наиболее часто встречаются в выделенных гликозидах. При этом вторым (концевым) моносахаридным остатком обычно является рамноза или глюкоза (реже галактоза) обычно с 1→2-типом связи. Как было отмечено выше, добавление второго моносахаридного остатка всегда уменьшает активность, однако в случае концевой менее полярной остатка 6-дезоксигексозы (рамнозы) это падение активности незначительно, а в случае концевой остатка более полярной гексозы (глюкозы или галактозы) – существенно больше. Качественно такая же закономерность прослеживается и по влиянию третьего (линейного) моносахаридного остатка, когда концевой остаток рамнозы лишь незначительно уменьшает активность, заметнее влияние концевой более полярной остатка пентозы (ксилозы) и еще несколько больше влияние третьего остатка гексозы (глюкозы). Однако в общем эффект от введения третьего линейного моносахаридного остатка заметно слабее, чем от второго. Добавление же четвертого линейного моносахаридного остатка (глюкозы в гликозиде **32**) практически не влияет на гемолитическую активность гликозида. Отметим также, что, несмотря на определенное уменьшение активности при увеличении длины углеводной цепи, существенно повышается растворимость гликозидов, что, возможно, имеет в биологических системах не менее важную роль (с точки зрения транспорта действующих веществ) или же компенсирует падение активности за счет возможного увеличения действующей концентрации.

Интересно отметить, что разветвление углеводной цепи у первого моносахаридного остатка арабинозы путем добавления остатка глюкозы с 1→4-типом гликозидной связи (при наличии остатка 1→2-связанной рамнозы) приводит к очень существенному увеличению гемолитической активности как в гликозидах олеаноловой кислоты, так и хедерагенина. Этот факт не может быть объяснен с точки зрения суммарной полярности имеющихся заместителей. Возможно, что в данном случае существенно меняется способность гликозида к адсорбции на поверхности мембран эритроцитов в связи с принципиальным изменением структуры углеводной цепи в непосредственной близости к агликонной части. Однако наличие дополнительного остатка глюкозы с 1→3 типом связи (и остатка 1→2-связанной галактозы) в разветвленном трисахаридном фрагменте гликозидов олеаноловой и эхиноцистовой кислот приводит, как и ожидалось, к существенному снижению активности.

ВЫВОД

В итоге можно заключить, что из структурных факторов углеводной цепи на гемолитическую активность оказывают влияние прежде всего полярность непосредственно связанного с агликоном моносахаридного остатка, а также полярность и число наиболее близких дополнительных углеводных остатков, так

что за исключением случая 1→2, 1→4-разветвленных углеводных цепей увеличение суммарной полярности ведет к снижению гемолитической активности.

Список литературы

1. Kobert R. Ueber Quillajasaur. Ein Beitrag zur Kenntnis der Saponin-gruppe / R. Kobert // Arch. Exper. Pathol. Pharmacol. – 1887. – Vol. 23. – P. 233–272.
2. Еляков Г.Б. Терпеноиды морских организмов / Г.Б. Еляков, В.А. Стоник. – М.: Наука, 1986. – 272 с.
3. Fundamental studies on the evaluation of the crude drugs (I). Hemolytic and its protective activity of Ginseng saponins / T. Namba, M. Yoshizaki, T. Tomimori [et al] // Planta Medica. – 1974. – Vol. 25. – P. 28–38.
4. Triterpenoid glycosides from the roots of *Tetrapanax papyrifera* K. Koch. Part 2. Structure of new glycosides / S. Takabe, T. Takeda, Y. Ogihara [et al] // J. Chem. Res. (S). – 1981, № 1. – P. 16.
5. Schlosser E. Über die Strukturspezifität der Saponin-hamolyse I. Triterpensaponine und aglykone / E. Schlosser, G. Wulff // Z. Naturforsch. – 1969. – B. 24b. – S. 1284–1290.
6. Romussi G. Hemolytic action and surface activity of triterpene saponins from *Anchusa officinalis* L. Part 2: on the constituents of Boraginaceae / G. Romussi, S. Cafaggi, G. Bignardi // Pharmazie. – 1980. – Vol. 35. – P. 498–499.
7. Anisimov M.M. Die biologische Bewertung von Triterpenglykoside / M.M. Anisimov, V.Ya. Chirva // Pharmazie. – 1980. – B. 35. – S. 731–738.
8. Nose M. Effects of saikosaponin metabolites on the hemolysis of red blood cells and their adsorbability on the cell membrane / M. Nose, S. Amagaya, Y. Ogihara // Chem. Pharm. Bull. – 1989. – Vol. 37. – P. 3306–3310.
9. Образование комплекса тритерпенового гликозида голотурина А с холестерином в липосомальных мембранах / Г.Н. Лихацкая, Т.П. Яровая, В.С. Руднев [и др.] // Биофизика. – 1985. – Т. 30. – С. 358–359.
10. Роль стероидов в мембранотропной активности тритерпеновых гликозидов / А.М. Попов, Н.И. Калиновская, Т.А. Кузнецова [и др.] // Антибиотики. – 1983. – Т. 28. – С. 65–69.
11. Влияние тритерпеновых гликозидов на стабильность бислойных липидных мембран, содержащих различные стероиды / А.М. Попов, Ю.Г. Ровин, М.М. Анисимов [и др.] // Биофизика. – 1982. – Т. 27. – С. 827–831.
12. Особенности мембранной активности некоторых тритерпеновых гликозидов / А.М. Попов, М.М. Анисимов, А.С. Иванов [и др.] // Антибиотики. – 1982. – Т. 26. – С. 276–280.
13. Калинин В.И. Химическая морфология: тритерпеновые гликозиды голотурий / Калинин В.И., Левин В.С., Стоник В.А. – Владивосток: Дальнаука, 1994. – 284 с.

Гришковець В.І. Гемолітична активність тритерпенових глікозидів родини аралієвих / **В.І. Гришковець, І.І. Довгий, Л.О. Яковішин** // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2010. – Т. 23 (62), № 4. – С. 268-275.

Вивчено гемолітичну активність тритерпенових глікозидів родини аралієвих. Виявлено структурні чинники (природа аглікона і вуглеводного ланцюгу) що впливають на рівень активності.

Ключові слова. тритерпенові глікозиди, гемолітична активність, родина аралієвих.

Grishkovets V.I. Haemolytic activity of triterpene glycosides of *Araliaceae* family./ **V.I. Grishkovets I.I. Dovgyu, L.A. Yakovishin** // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2010. – Vol. 23 (62), No. 4. – P. 268-275.

Haemolytic activity of triterpene glycosides of *Araliaceae* family was studied. The features of structure (aglycon and carbohydrate chain) what have an impact on the level of activity were determined.

Keywords. triterpene glycosides, haemolytic activity, *Araliaceae* family.

Поступила в редакцию 20.09.2010 г.