

© Коллектив авторов, 2007

Н. П. Мищенко¹, С. А. Федорев¹, В. М. Брюханов², Я. Ф. Зверев²,
В. В. Лампатов², О. В. Азарова², Ю. Н. Шкрыль³, Г. К. Чернодод³

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ АНТРАХИНОНОВ ИЗ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ *RUBIA CORDIFOLIA*

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток;

² Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул;

³ Биолого-почвенный институт ДВО РАН, Владивосток

В данной работе представлены результаты качественного и количественного определения антрахинонов в клеточной культуре марены сердцелистной. На основании данных ПМР-, ЯМР-, УФ-, ИК- и масс-спектров идентифицировано семь антрахинонов, доминирующими из которых являются мунистин и пурпурин. Установлена противовоспалительная активность препарата клеточных культур, проявляющаяся в антиэкссудативном действии в период энергичного развития отека и в антипролиферативном действии. Показано снижение антиоксидантного статуса без существенного подавления ферментативной активности.

Антрахиноны широко распространены в растениях семейства мареновых (*Rubiaceae*), наиболее изученным из которых является марена красильная, корни и корневища которой содержат до 36 производных антрахинонов [1]. Перспективным источником антрахинонов среди растений дальневосточной флоры этого семейства является марена сердцелистная *Rubia cordifolia* L., экстракты корневищ которой способствуют разрыхлению мочевых конкрементов, обладают гепатопротективной активностью [2]. Невысокое содержание биологически активных веществ в *R. cordifolia* стимулировало развитие биотехнологических способов получения биомассы марены сердцелистной, синтезирующей значительные количества вторичных метаболитов. Настоящая работа посвящена изучению качественного и количественного состава антрахинонов клеточной культуры *R. cordifolia* и исследованию фармакологической активности препарата, содержащего эти соединения.

Экспериментальная химическая часть

Объектом исследования являлись препараты из каллусов марены сердцелистной. Клеточная культура *R. cordifolia* (штамм RC-1) получена в Биолого-почвенном институте Дальневосточного отделения РАН из корневищ дикорастущих растений, заготовленных в южной части Приморского края. Культивирование проводили на питательной среде $W_{В/НАА}$, содержащей 0,5 мг/л 6-бензиладенина и 2,0 мг/л α -нафтилукусной кислоты описанным ранее способом [3].

УФ-спектры этанольных растворов снимали на спектрофотометре UVmini-1240 (Shimadzu, Япония), ИК-спектры — на спектрофотометре FT-IR Bruker Vector 22 (Германия), используя в качестве растворителей дейтерохлороформ, дихлорметан. ЯМР-спектры ¹H и ¹³C записывали на ЯМР-спектрометрах Bruker DPX-300 (Германия) с рабочей частотой 300 МГц для ядер ¹H и 75 МГц для ядер ¹³C и DRX-500 с рабочей частотой

500 МГц для ¹H и 125 МГц для ¹³C в ДМСО-d₆ и дейтерохлороформе. Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре высокого разрешения AMD-604S (Германия) методом электронной ионизации с энергией электрона 70 эВ. Температуру плавления (нескорректирована) определяли на столике Кофлера, модель Leica VMTG (Австрия). Антрахиноны в препарате идентифицировали методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent серии 1100, оснащенным детектором с переменной длиной волны VWD G1314A (Agilent Technologies, Германия) и колонкой Hypersil BDS-C18 (США), 5 мкм, 250 × 4,6 мм. Колонку термостатировали при 30 °С. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Растворитель А – 1 % уксусная кислота, растворитель Б – ацетонитрил, содержащий 1 % уксусной кислоты. Линейный градиент по растворителю Б: 10 – 70 % в течение 25 мин. Навеску 100 мг измельченных каллусов или препарата для фармакологических исследований смачивали 0,6 мл 2 н. HCl, добавляли 3,0 мл C₂H₅OH, смесь периодически встряхивали, через 1 ч окрашенный раствор фильтровали через 0,45 мкм нейлоновый фильтр диаметром 13 мм (KURABO, Япония) и аликвоту 10 мкл вводили в колонку хроматографа. Для анализа данных ВЭЖХ использовали программу ChemStation® (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Германия). Суммарное содержание антрахинонов в препарате и каллусах определяли спектрофотометрическим методом [3].

Выделение антрахинонов из каллусных клеток *R. cordifolia*

Высушенные, измельченные каллусы (250 г) смачивали 2М этанольным раствором HCl (250 мл) и оставляли на воздухе на 15 ч. После подсушивания клеточную массу экстрагировали горячими MeOH в течение 8 ч. Экстракт концентрировали под вакуумом до объема 100 мл и перераспределяли между водой (2 л) и хлороформом (2 л). Хлороформный слой отделяли, остаток после удаления растворителя делили многократной колоночной

гель-хроматографией на Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) в системе хлороформ — метанол (10:1). Получили 6 окрашенных фракций, из которых после удаления растворителей и кристаллизации выделили 38 мг муньистина II, 7 мг ализарина III, 3 мг метилового эфира муньистина VI, 18 мг пурпурина V, 5 мг ксантопурпурина IV, 2 мг этилксантопурпурина VII*. Водный слой упарили примерно до 300 мл и делили обратнофазной колоночной хроматографией низкого давления на TSK геле Toyopearl HW-40 (TOSOH, Япония), используя в качестве элюента водный раствор C₂H₅OH, содержащий 0,6 % HCOOH, в градиенте концентраций от 10 до 50 %. Выделили 243 мг руберитриновой кислоты I. Структуры всех выделенных соединений установлены на основании анализа их ПМР- и ЯМР-спектров ¹³C (COSY, HSQC и HMBC эксперименты), подтверждены данными УФ-, ИК- и масс-спектров, а также сравнением с литературными данными для известных соединений [4, 5]. Соединение VII выделено нами впервые.

Этиловый эфир ксантопурпурина VII, лимонно-желтые иглы, т. пл. 186 – 190 °С. УФ-спектр (C₂H₅OH), λ_{max}, нм (lg ε): 231 (4,3), 242 (4,4), 282 (4,3), 413 (3,9). ИК-спектр (CDCl₃), ν_{max}, см⁻¹: 1674, 1633, 1608, 1594. ПМР-спектр (CDCl₃), δ, м. д.: 1,48 (т, 3H, J 7 Гц, CH₃), 4,18 (к, 2H, J 7 Гц, CH₂), 6,69 (д, 1H, J 2,5 Гц, 2-H), 7,28 (д, 1H, J 2,5 Гц, 4-H), 7,79 (м, 2H, 6-H, 7-H), 8,25 – 8,37 (м, 2H, 5-H, 8-H), 12,88 (с, OH). Масс-спектр, m/z (I_{отн}): 268 M⁺ (100), 212 (45), 184 (22).

Для проведения фармакологических исследований готовили препарат, содержащий комплекс антрахинонов. Для этого после тридцатисуточного цикла выращивания высушенные и измельченные каллусные клетки истощающе экстрагировали в аппарате для непрерывной горячей экстракции для удаления растительных восков. После высушивания клеточную массу обрабатывали 2 н. HCl в C₂H₅OH (50 мл на 100 г клеток) и оставляли на ночь. Приготовленные таким образом клетки последовательно экстрагировали горячими хлороформом и этанолом. После удаления растворителя из этанольного экстракта получали сиропообразный остаток, который перераспределяли между водой и этилацетатом. Этилацетатный слой отделяли, промывали водой до нейтральной реакции среды, объединяли с хлороформным экстрактом и упаривали досуха. Растворяли при нагревании 3,0 г полученного продукта в 100 мл этанола и к этому раствору

* Номер соединения присвоили согласно порядку его выхода на ВЭЖХ.

добавляли 50 г лактозы. После удаления этанола смесь высушивали до постоянного веса и получали нанесенный на лактозу очищенный комплекс антрахинонов клеточной культуры марены сердцелистной, именуемый в дальнейшем препаратом марены.

Экспериментальная биологическая часть

Фармакологические исследования проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 200 – 250 г. Животные содержались в индивидуальных клетках в режиме свободного доступа к воде и пище. Опытты проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных.

Противовоспалительная активность препарата марены исследована на известных моделях острого и хронического воспаления в условиях 14-дневного введения препарата внутрь в дозе 100 мг/кг в виде крахмальной взвеси. Контрольным животным на протяжении такого же времени вводили эквивалентные количества крахмальной слизи. Острое воспаление индуцировали субплантарной инъекцией 0,1 мл 1 % раствора каррагинина с плетизмометрическим измерением объема конечности на протяжении 4 ч с момента введения флогистика. В экспериментах с хроническим воспалением определяли сухую и влажную массы гранулемы, образовавшейся в процессе применения препарата, вокруг имплантированного под кожу стерильного хлопчатобумажного тампона массой 20 мг [6].

Для оценки состояния свободно-радикального окисления (СРО) *in vivo* применяли методику воспалительного отека задних конечностей крыс путем субплантарного введения 0,2 мл 3 % формалина, сопровождающегося выработанным окислительным стрессом. Данная модель позволяет оценить стимулированное СРО как диалектическое взаимодействие прооксидантного и антиоксидантного процессов [7]. По окончании курса введения препарата моделировали оксидативный стресс и на пике воспалительной реакции через 2–3 сут после применения флогистика исследовали кровь, сравнивая полученные значения с показателями интактных и контрольных крыс. Общую прооксидантную активность (ОПА), суммарный показатель концентрации всех прооксидантов и свободно-радикальных метаболитов, оценивали по содержанию в плазме крови продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Определяли также концентрацию малонового диальдегида и других тиобарбитуратчувствительных продуктов

Таблица 1
Времена удерживания антрахинонов на колонке Hypersil BDS-C18 и их содержание в препарате и в каллусах марены сердцелистной

Показатель	Антрахиноны							Суммарное содержание антрахинонов, %
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
Время удерживания, мин*	9,60	11,11	15,44	17,18	17,40	19,50	21,22	
Содержание антрахинонов в каллусах, %	7,4	60,3	4,8	1,2	20,2	0,3	0,2	2,14
Содержание антрахинонов в препарате, %	3,5	62,4	5,5	0,8	22,5	0,4	0,3	0,76

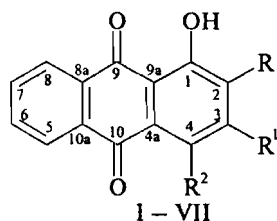
* Условия хроматографирования приведены в экспериментальной части.

(ТБРП), образующихся в ходе реакций ПОЛ. Антиоксидантную активность в гемолизате эритроцитов оценивали по изменению интегративного показателя общей антиоксидантной активности (ОАА) и содержания антиоксидантных ферментов: каталазы КАТ (1.11.1.6.), супероксиддисмутазы СОД (1.15.1.1.) и глутатионпероксидазы ГПО (1.11.1.9.).

Полученные результаты подвергали статистической обработке методом вариационных рядов с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Ранее мы сообщали, что клеточная культура *R. cordifolia* продуцирует муњистин II и пурпурин V в сумме до 90 % от общего числа антрахинонов [3]. В настоящей работе из метанольного экстракта, кроме соединений II и V, были выделены известные для этого растения антрахиноны руберитриновая кислота I, ализарин III, ксантопурпурин IV, метиловый эфир муњистина VI и ранее не описанное этоксильное производное ксантопурпурина VII.



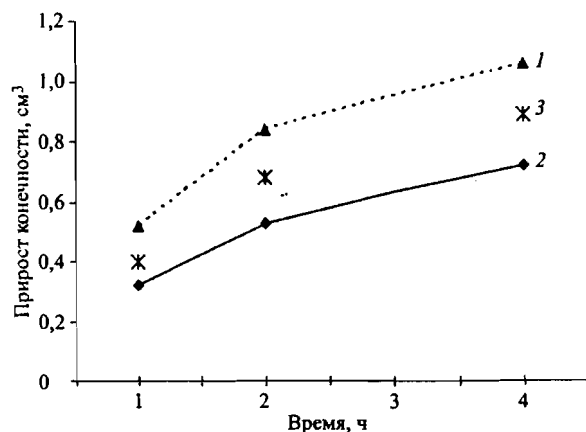
- I: R = O-β-D-Xyl-(1-6)-β-D-Gl, R¹ = R² = H
 II: R = COOH, R¹ = OH, R² = H
 III: R = OH, R¹ = R² = H
 IV: R = H, R¹ = OH, R² = H
 V: R = R² = OH, R¹ = H
 VI: R = COOCH₃, R¹ = OH, R² = H
 VII: R = R² = H, R¹ = OC₂H₅

Выделенные соединения были использованы в качестве стандартов для подбора условий хроматографического метода анализа продуцентов клеточной культуры *R. cordifolia*. В литературе описаны несколько методов обнаружения антрахинонов из *R. tinctorum* L. обратнoфазной высокоэффективной жидкостной хроматографией [8 – 11]. Обычно эти методы основаны на определении агликонов, полученных после гидролиза экстрактов, в результате которого такие гликозиды антрахинонов, как руберитриновая кислота и примерверозид люцидина, образуют ализарин. В настоящей работе метод [10] был модифицирован, что позволило одновременно анализировать как антрахиноны, так и гликозиды.

В табл. 1 приведены времена удерживания идентифицированных антрахинонов и их содержание в препарате и в каллусах *R. cordifolia*.

Впервые выделенное нами этоксильное производное ксантопурпурина VII было обнаружено нами в количестве от 0,1 до 0,5 % от общего содержания антрахинонов как в препарате, так и в различных образцах каллусов *R. cordifolia*, что подтверждает его биосинтетическое происхождение.

Выраженный антифлогистический эффект препарата марены при его длительном введении зарегистрирован на модели острой воспалительной реакции, индуцированной каррагенином (рисунок).



Влияние препарата клеточных культур *R. cordifolia* (100 мг/кг) на развитие каррагенинового отека конечностей крыс. По оси абсцисс — время наблюдения, ч; по оси ординат — прирост конечности, см³. Динамика развития отека в контроле (1); в опыте (2). Звездочками (3) отмечены достоверные изменения по отношению к контрольным животным.

Действие препарата достигало максимума уже через 1 ч после инъекции флогистика и несколько ослабевало к окончанию эксперимента, не утрачивая статистической достоверности. При этом максимальный эффект препарата составил 38,5 %, что позволяет рассматривать его как выраженное противовоспалительное действие. Учитывая эффективность препарата в период энергичного нарастания отека и тот факт, что начальная фаза каррагенинового отека конечности обусловлена влиянием флогистика на высвобождение ряда медиаторов воспаления, можно предположить вмешательство исследуемого препарата в пусковые механизмы воспаления с угнетением высвобождения медиаторов воспаления, возможно, за счет мембраностабилизирующего действия [12].

Изучение антипролиферативных свойств показало, что влажная масса гранулемы, образовавшейся у крыс, длительно получавших препарат, была существенно меньше таковой у группы контроля (табл. 2). Сходным образом под влиянием препарата марены изменилась и сухая масса гранулематозной ткани, достигнув по сравнению с контролем уменьшения массы на 27 % ($p < 0,001$).

Таким образом, исследуемый препарат существенно ослабляет развитие не только острого, но и хронического воспаления.

Субплантарное введение формалина индуцировало резкую активизацию перекисного окисления липидов, что выразилось в увеличении образования тиобарбитуровых продуктов ТБРП в 1,7 раз и общей прооксидантной активности ОПА с 45,1 до 60,1 % ($p < 0,001$). Повышение активности прооксидантной системы сопровождалось последующей активацией ферментов антиоксидантной защиты и интегративного показателя ОАА (табл. 3).

На фоне накопления свободных радикалов в результате окислительного стресса применение препарата марены уменьшало образование малонового диальдегида и других тиобарбитуровых продуктов в 1,2 раза по сравнению с контрольной группой. Показатель ОПА практически не отличался от величины такового в группе контрольных животных, что свидетельствует о незначительном влиянии препарата марены на общую прооксидантную активность и позволяет, по-видимому, исключить его

Таблица 2
Влияние препарата клеточных культур *R. cordifolia* (100 мг/кг) на формирование хлопчатобумажной гранулемы у крыс

Эксперимент	n	Влажная масса, мг	Сухая масса, мг	Разность, мг
Контроль	28	84,6 ± 1,77	14,8 ± 0,47	69,8 ± 2,49
Препарат	32	62,4 ± 3,64*	10,8 ± 1,04*	51,6 ± 4,88

прямое воздействие на нейтрализацию свободно-радикальных продуктов.

Моделирование окислительного стресса у контрольных животных активировало антиоксидантные механизмы, что выразилось в значительном повышении активности ферментов каталазы и супероксиддисмутазы. Это закономерно привело к росту интегративного показателя ОАА более чем на 19 %. Применение исследуемого препарата несколько подавляло (в 1,2 раза) повышенную активность антиоксидантных ферментов ГПО и КАТ у крыс с формалиновым воспалением без существенного влияния на активность СОД. Вместе с тем под влиянием препарата зафиксировано значительное снижение интегрального показателя ОАА по сравнению с группой животных с экспериментальным воспалением и интактных животных на 52,6 и 43,6 % соответственно.

Результаты экспериментов, проведенных в условиях активации свободно-радикального окисления, показали доминирующее влияние препарата на антиоксидантный статус. Его значительное снижение без существенного подавления ферментативной активности позволяет предположить участие неферментных механизмов антиоксидантной защиты, обусловленных наличием в плазме крови водорастворимых соединений (аскорбат железа, глутатион, мочевая кислота и др.), а также рядом жирорастворимых компонентов клеточных мембран (α -токоферол, ретинол и др.), активизирующихся под влиянием исследуемого препарата.

Таким образом, в препарате, полученном из клеточной культуры *R. cordifolia*, идентифицировано 7 антрахинонов, составляющих около 95 % их содержания, и установлены его выраженные противовоспалительные свойства, которые могут быть связаны с угнетением общей антиоксидантной активности.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 06-04-48068 и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология".

CHEMICAL COMPOSITION AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF ANTHRAQUINONE FROM *Rubia Cordifolia* CELL CULTURE

N. P. Mishchenko¹, S. A. Fedoreev¹, V. M. Bryukhanov², Ya. F. Zverev², V. V. Lampatov², O. V. Azarova², Yu. N. Shkryl³, and G. K. Chernodod³

¹ Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-Eastern Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia;

² Altai State Medical University, Barnaul, Altai Territory, 656038 Russia;

³ Institute of Biology and Soil Science, Far-Eastern Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

The results of qualitative and quantitative determination of anthraquinones in *Rubia cordifolia* L. cell culture are presented. According to the ¹H and ¹³C NMR, UV, IR, and mass-spectroscopic data, seven anthraquinones have been identified, in which munjistin and purpurin are predominant. The cell culture preparation exhibits an antiinflammatory activity, which is manifested by an antiexudative effect and antiproliferative action during the rapid development of a model edema. A decrease in the antioxidant state without significant suppression of enzymatic activity is demonstrated.

Таблица 3
Влияние препарата клеточных культур *R. cordifolia* (100 мг/кг) на окислительный статус плазмы крови крыс и состояние антиоксидантной защиты

Показатель	Животные		
	Интактные	Контрольные	Опытные
ТБРП, мкмоль	2,5 ± 0,18	4,2 ± 0,18*	<u>3,4 ± 0,12*</u>
ОПА, %	45,1 ± 1,06	60,1 ± 1,25*	61,4 ± 1,27*
Каталаза, %	12,2 ± 1,27	22,4 ± 1,02*	<u>18,3 ± 0,43*</u>
Супероксиддисмутазы, %	16,9 ± 0,81	28,3 ± 1,05*	27,1 ± 0,82*
Глутатионпероксидаза, Ед/мг Нб	233,0 ± 7,3	243,0 ± 11,2	<u>195,3 ± 5,0*</u>
Общая антиоксидантная активность, %	73,7 ± 0,51	87,8 ± 0,86*	<u>41,6 ± 1,0*</u>

* Достоверные изменения по отношению к интактным крысам. Подчеркнуты достоверные изменения по отношению к контрольным животным.

ЛИТЕРАТУРА

- G. C. H. Derksen and T. A. van Beek, in: *Studies in Natural Product Chemistry*, Rubia tinctorum L., Atta-ur-Rahman (ed.), Elsevier, Amsterdam (2002), p. 629.
- A. H. Gilani and K. H. Janbaz, *Phytother. Res.*, **9**, 372 – 375 (1995).
- N. P. Mischenko, S. A. Fedoreyev, V. P. Glazunov, et al., *Fitoterapia*, **70**, 552 – 557 (1999).
- H. Itokawa, K. Mihara, and K. Takeya, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**(7), 2353 – 2358 (1983).
- R. A. Muzychkina, *Natural anthraquinones. Biological properties and physicochemical characteristics*, G. A. Tolstikov (ed.), PHASIS, Moscow (1998).
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2000).
- В. М. Брюханов, Я. Ф. Зверев, Я. С. Арбузова и др., *Рос. физиол. ж. им. И. М. Сеченова*, **90**(8), 35 – 36 (2004).
- K. Sato, T. Yamazaki, E. Okuyama, et al., *Phytochemistry*, **30**(5), 1507 – 1509 (1991).
- G. C. H. Derksen, T. A. van Beek, A. Groot, and A. Capelle, *J. Chromatogr.*, **816**, 277 – 281 (1998).
- И. Н. Кузовкина, О. В. Мантрова, И. Е. Альтерман и др., *Физиология растений*, **43**(2), 291 – 298 (1996).
- P. Banyai, I. N. Kuzovkina, L. Kursinszki, and E. Szoke, *Chromatographia*, **63**, Supp. 13, S111 – S114 (2006).
- Г. Я. Шварц, Р. Д. Сябаев, *Фармакол. и токсикол.*, **45**(1), 46 – 49 (1982).

Поступила 20.11.06