

БИОХИМИЯ РА СТЕНИИ**БИОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ОСНОВНОГО СТЕРОЇДНОГО ГЛІКОЗИДУ ІЗ
*ALLIUM PANICULATUM***

Н.В. ТОЛКАЧОВА, кандидат хімічних наук;

В.М. ЄЖОВ, доктор технічних наук;

Нікитський ботанічний сад – Національний науковий центр

О.З. КОМАРОВСЬКА-ПОРОХНЯВЕЦЬ, кандидат хімічних наук;

В.П. НОВІКОВ, доктор хімічних наук

Національний університет “Львівська політехніка”

Вступ

Стероїдні глікозиди є обширним класом природних сполук з групи сапонінів, які останнім часом привертають додалі більше уваги дослідників завдяки їх широкому спектру біологічної активності та екологічній безпеці [8].

Відомо, що екстракти різних рослин, які належать до родин Amaryllidaceae, Dioscoreaceae, Alliaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, що містять стероїдні глікозиди, використовуються в традиційній медицині як протипухлинні, фунгіцидні, контрацептивні, антивірусні і цитотоксичні засоби [1, 9, 12]. Стероїдні глікозиди та їхні похідні використовуються для синтезу гормональних препаратів [8]. Також дані сполуки знижують рівень холестерину в крові [13] та виявляють антиоксидантну дію [3]. Крім того, стимуляція росту і фітоімунітету рослин стероїдними глікозидами [7, 10] дозволяє розглядати ці речовини як природні адаптогени.

Активність стероїдних глікозидів залежить від природи аглікона і кількості вуглеводних залишків в молекулі. Так, спіростанолові глікозиди виявляють велику фунгіцидну і антимікробну активності [1, 5], тоді як фуростанолові є стимуляторами росту і фітоімунітету рослин [2, 11].

Перспективними в плані пошуку сапоніноносних видів є рослини роду *Allium*, які виростають в Криму, тим більше що в літературі дані про стероїдні глікозиди більшості кримських цибуль відсутні. Саме тому вивчення хімічної структури і біологічної активності стероїдних глікозидів представників родини *Alliaceae* є актуальним.

Об'єкти та методи дослідження

За об'єкт дослідження взято основний стероїдний глікозид, виділений з листя цибулі волотистої *Allium paniculatum* L., зібраної у смт Нікіта в 2009 р.

Метод А

Антимікробну активність речовини вивчали методом дифузії речовини в агар та методом серійних розведень досліджуваної сполуки за стандартними методиками [4].

В агаризованих пластинках твердого поживного середовища (МПА – м'ясо-пептонний агар – для бактерій, СА – сусло-агар – для грибів) робили лунки, в які вносили відповідну кількість досліджуваної речовини. Мікробне навантаження 10^9 клітин (спор) на 1 см^3 . Тривалість інкубації бактерій 24 год. при температурі 35°C , грибів – 48-72 год. при $28-30^\circ\text{C}$. В контрольні чашки вносили еквівалентну кількість ДМСО.

У дослідах використано тест-культури: бактерії *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium luteum* та гриби *Candida tenuis*, *Aspergillus niger*.

Ступінь активності досліджуваних сполук оцінювали за величиною зон пригнічення росту тест-культур мікроорганізмів. Повторюваність досліду трикратна.

Метод Б

Визначення мінімальних бактерицидної (МБцК), бактеристатичної (МБсК), фунгіцидної (МФцК) та фунгістатичної концентрацій (МФсК) сполук здійснювали методом серійних розведень. При цьому досліджувану речовину розчиняли у ДМСО, досягаючи необхідної концентрації.

Визначення МБсК (МФсК). Певний об'єм розчину речовини вносили у поживне середовище (МПБ – м'ясо-пептонний бульйон – для бактерій; неохмелене пивне сушло – для грибів), до якого інокулювали посівний матеріал бактерій або грибів. В контрольні чашки вносили еквівалентну кількість розчинника. Засіяні пробірки витримували у термостаті при відповідній температурі (37°C – для бактерій; 30°C – для грибів) протягом 24-72 годин. Результати оцінювали за наявністю чи відсутністю росту мікроорганізмів (за ступенем мікробної мутності поживного середовища).

Визначення МБцК (МФцК). Розчини середовища, які виявились візуально прозорими, висівали на стерильне МПА (для бактерій) або СА (для грибів) та інкубували в термостаті при оптимальних температурних режимах для росту мікроорганізмів. Оцінювання результатів здійснювали для тест-бактерій через 24 год., для тест-грибів – 4872 год. За відсутністю росту колоній мікроорганізмів на інкубованих чашках Петрі визначали МБцК чи МФцК досліджуваної речовини. Повторюваність досліду трикратна.

Дослідження рістрегулюючої активності

Рістрегулюючу активність досліджуваної речовини вивчали за стандартною методикою в модифікації Т.А. Сергєєвої [6] на агаризованому середовищі такого складу (г/дм³): MgSO₄ • 7H₂O – 1; K₂HPO₄ – 1; FeSO₄ • 7H₂O – 0,02; агар-агар – 8, до якого додавали певну кількість розчину препарату і розливали в чашки Петрі. В контрольні чашки вносили еквівалентну кількість ДМСО.

В досліді використовували насіння односім'ядольних рослин (овес) та двосім'ядольних (крес-салат), яке пророщували на агаризованому середовищі 3 доби в термостаті за температури 22°C з подальшим дорощуванням проростків протягом 4 діб у витяжній шафі із штучним освітленням при 19-20°C.

В кінці досліду визначали схожість насіння і лінійні розміри частин рослин. Результати подані у відсотках порівняно з контролем. При показнику, що перевищує 100%, оцінювалася стимуляція росту, а при показнику менше 100% - пригнічення росту. Повторюваність дослідів трикратна.

Результати та обговорення

Досліджуючи стероїдні глікозиди рослини *A. paniculatum* L., з листя виділили основний новий сапонін: 3-*O*-β-*D*-глюкопіранозил-(1→2)-*O*-β-*D*-глюкопіранозид-(25*R*)-5β-фуростан-3β,22α,26-триол-[26-*O*-β-*D*-глюкопіранозид] – глікозид А.

З метою первинного оцінювання антимікробної активності досліджуваної сполуки нами проведено тестування цієї речовини методом дифузії речовини в агар, використовуючи різні концентрації (0,1; 0,5; 1,0 і 2,5%). Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що у досліджуваних концентраціях глікозиду А зон пригнічення росту мікроорганізмів не спостерігалось.

Метод серійних розведень речовин дозволяє встановити кількісні показники мінімальної інгібуючої (статичної) концентрації та мінімальної біоцидної концентрації щодо тест-культур бактерій і грибів. В результаті експериментів встановлено, що високі концентрації глікозиду А виявляють вибіркову дію на бактерії - інгібують ріст грам- позитивних тест-бактерій. А саме, МБсК щодо *St. aureus* і *Myc. luteum*, відповідно, становила 1400 мкг/см³ і 2000 мкг/см³. При цьому грам-негативна культура бактерії *E. coli* виявилася нечутливою до дії глікозиду А в досліджуваних

концентраціях (табл. 1 і 4).

Таблиця 1

Показники мінімальної бактерицидної концентрації (МБцК) і мінімальної бактериостатичної концентрації (МБсК) сполук методом серійних розведень (метод Б)

Код сполуки	Культури бактерій					
	<i>E. coli</i>		<i>St. aureus</i>		<i>Muc. luteum</i>	
	МБсК, мкг/см ³	МБцК, мкг/см ³	МБсК, мкг/см ³	МБцК, мкг/см ³	МБсК мкг/см ³	МБцК мкг/см ³
глікозид А	+	+	1400	>2000	2000	>2000

Таблиця 2

Показники мінімальної фунгіцидної концентрації (МФцК) і мінімальної фунгістатичної концентрації (МФсК) сполук методом серійних розведень (метод Б)

Код сполуки	Культури грибів			
	<i>Candida tenuis</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
	МФсК, мкг/см ³	МФцК, мкг/см ³	МФсК, мкг/см ³	МФцК, мкг/см ³
глікозид А	+	+	2000	>2000

В таблицях 2 і 5 представлені результати вивчення фунгіцидних властивостей досліджуваної сполуки. На основі отриманих даних встановлено, що глікозид А в концентрації 2000 мкг/см³ має фунгістатичні властивості щодо тест-культури цвільового гриба *A. niger*, а дріжджова культура *C. tenuis* виявилася резистентною до дії досліджуваної сполуки у вивчених концентраціях, про що свідчить активний ріст цього гриба в присутності глікозиду А на рівні контрольного зразка.

Наступним етапом наших досліджень було вивчення потенційної ристрегулюючої активності сапоніну на тест-рослинах в умовах лабораторних випробувань за вищезгаданою методикою. Результати досліджень, які наведені у таблиці 3, характеризують глікозид А як сполуку з добре вираженими ристстимулюючими ефектами в концентрації 10 мг/дм та ристінгібуючими властивостями в концентрації 100 мг/дм.

Таблица 4

Встановлення мінімальної бактерицидної концентрації (МБцК) і мінімальної бактериостатичної концентрації (МБсК) сполук методом серійних розведень (метод Б)

Код сполуки	Культури бактерій	Концентрація речовини, мкг/см ³																		
		2000	1800	1600	1400	1200	1000	800	600	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9	0 (К)
глікози д А	<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>St. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Muc. luteum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Таблица 5

Встановлення мінімальної фунгіцидної концентрації (МФцК) і мінімальної фунгістатичної концентрації (МФсК) сполук методом серійних розведень (метод Б)

Код сполуки	Культурні грибів	Концентрація речовини, мкг/см ³																		
		2000	1800	1600	1400	1200	1000	800	600	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9	0 (К)
глікози д А	<i>S. tenuis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>A. niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Позначення: + ріст культури мікроорганізму
 ± пригнічення росту мікроорганізму
 – відсутність росту мікроорганізму

Таким чином, отримані результати говорять про те, що глікозид А виявляє слабку бактерицидну і фунгіцидну активність; водночас він характеризується високою рїстрегулюючою активністю, що цілком узгоджується з літературними даними.

Таблиця 3

Кількісні показники рїстрегулюючої активності досліджуваної сполуки

Код сполуки	Концентрація сполук, мг/дм ³	Лінійні розміри частин рослини і схожість, % до контролю					
		овес			крес-салат		
		корінь	стебло	схожість	корінь	стебло	схожість
глікози	100	72	92	100	31	53	100
д А	10	172	109	100	126	79	106
	1	90	92	89	88	94	84

Висновки

1. При використанні методу дифузії речовини в агар у досліджуваних концентраціях глікозиду А зон пригнічення росту мікроорганізмів не спостерігалось.
2. За допомогою методу серійних розведень встановлено мінімальну бактериостатичну концентрацію глікозиду А щодо грам-позитивних бактерій *St. aureus* (1400 мкг/см³) і *Muc. luteum* (2000 мкг/см³). Грам-негативна культура бактерій *E. coli* виявилася резистентною щодо даної сполуки в досліджуваних концентраціях.
3. Встановлено мінімальну фунгістатичну концентрацію глікозиду А щодо культури гриба *Aspergillus niger*, яка становить 2000 мкг/см³. Нечутливою до досліджуваної речовини у вивчених концентраціях виявилася культура *Candida tenuis*.
4. Досліджувана сполука у концентрації 10 мг/дм³ на 72% (порівняно з контролем) стимулює ріст кореня вівса і на 26% - ріст кореня крес-салату.
5. Суттєвий пригнічувальний ефект на ріст частин тест-рослин спостерігається при концентрації глікозиду А 100 мг/дм³.

Список літератури

1. Васильева И.С., Пасешниченко В.А. Состав и биологическая активность стероидных гликозидов из суспензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* Wall. // Прикл. биохим. и микробиол. – 1995. – Т. 31. – С. 238-242.
2. Кинтя П.К. Природные биорегуляторы стероидного типа в сельском хозяйстве // Регуляторы роста и развития растений: Тез. докл. II конф., 29 июня – 1 июля 1993 г., г. Москва. – М., 1993. – Ч. 1. – С. 97.
3. Кинтя П.К., Ковальчук Л.П., Бурцева С.А. Поиск антиоксидантов в ряду стероидных гликозидов // Хим. фарм. журнал. – 1982. – № 1. – С. 95-97.
4. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований – М.: Медицина, 1972. – С. 91-93.
5. Лазурьевский Г.В., Кинтя П.К., Ковальчук Л.П. Антимикробная активность стероидных гликозидов в связи с их химическим строением // ДАН СССР. – 1980. – Т. – С. 1479-1482.
6. Сергеева Т.А. Методика лабораторных испытаний гербицидов // Защита растений. – 1963. – №2. – С. 42-44.
7. Стероидные фураностаноловые гликозиды – новый класс природных адаптогенов / Васильева И.С., Удалова Ж.В., Зиновьева С.В., Пасешниченко В.А. // Прикладная биохимия и микробиология – 2009. – Т. 45, № 5. – С. 517-526.
8. Строение и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фураностана / Кинтя П.К., Лазурьевский Г.В., Балашова Н.Н. и др. – Кишинев: Штиинца, 1987. – 142 с.

9. Multiple functions of sterols in yeast endocytosis / Heese-Peck A., Pichler H., Zanolari B., Watanabe R., Daum G., Riezman H. // Mol. Biol. Cell. – 2002. – Vol. 13. – P. 2664-2680.

10. Hoagland R.E., Zablutowicz R.M., Reddy K.N. [Studies of the phytotoxicity of saponins on weed and crop plants](#) // Adv. in Exp. Med. and Biol. – N.Y.-London: Plenum Press. – 1996. – Vol. 405. – P. 57-73.

11. Nohara T., Yahara S., Kinjo J. Bioactive saponins from solanaceous and leguminous plants // Adv. in Exp. Med. and Biol. – N.Y.- London: Plenum Press. – 1996. – Vol. 404. – P. 263-276.

12. Oleszek W., Marston A. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants // Phytochemical Society of Europe. – 2000. – Vol. 45. – P. 241-254.

13. Steroid saponins from fenugreek and some of their biological properties /Sauvaire Y., Baissac Y., Leconte O., Petit P., Ribes G. // Adv. in Exp. Med. and Biol. N.Y. – London: Plenum Press. – 1996. – Vol. 405. – P. 37-46.

Рекомендовано до друку д.б.н. Митрофановою І.В.