
СТРАНИЧКА МОЛОДОГО УЧЕНОГО

УДК 581.19

Вещество с цитостатической и апоптозиндуцирующей активностью из корней лопуха

Р. С. БОЕВ

Институт химии нефти Сибирского отделения РАН,
проспект Академический, 3, Томск 634055 (Россия)

E-mail: BRS-0@yandex.ru

(Поступила 06.09.04; после доработки 16.11.04)

Аннотация

Впервые из корней лопуха выделен и идентифицирован β -аспарагин. Установлено, что β -аспарагин, выделенный из корней, обладает цитостатической и апоптозиндуцирующей активностью. Синтетический L-аспарагин (производства Японии) не проявляет ни цитостатической, ни апоптозиндуцирующей активности.

ВВЕДЕНИЕ

Корни лопуха включены в отечественную фармакопею, широко применяются в народной медицине. Извлечения из корней применяют в основном как мочегонное, потогонное и кровоочистительное средства [1, 2], в качестве противоязвенного и адаптогенного средств [3, 4]. В работе [5] доказано противоопухолевое действие спиртового и дихлорметанового экстрактов корней лопуха при экспериментальных злокачественных опухолях у животных. Как противоопухолевое средство корни лопуха рекомендованы для профилактики злокачественных новообразований [6].

Нами установлено, что концентрированный сок корней обладает не только цитостатической (останавливает рост и деление опухолевых клеток), но и апоптозиндуцирующей (генетически программируемая гибель клеток) активностью [7].

На территории России распространены два вида лопуха: лопух большой (*Arctium lappa* L.)

и лопух войлочный (*Arctium tomentosum* Mil.). Корни лопуха содержат полисахарид инулин (до 45 %), эфирное бардановое масло (до 0.18 %), протеин (около 12 %), витамины А, В-комплекс, С, Е и Р, минеральные и дубильные вещества, флавоноиды, полиацетиленовые углеводороды, ситостерин, стигмастерин, алкалоиды, 18 аминокислот, 26 жирных кислот [1, 2, 8]. Ни одно из этих соединений не обладает апоптозиндуцирующей или цитостатической активностью.

Цель работы – выделить из корней лопуха вещество, обладающее цитостатической и апоптозиндуцирующей активностью и установить его структуру.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования использовали свежие весенние корни лопуха второго года вегетации, разделение по видам не проводили. Из 10 кг свежих корней, измельченных в бытовом комбайне, отжимали сок и отфильтровывали элементы клетчатки. Получено 5630 мл сока,

представляющего собой коричневую жидкость со сладковатым специфичным вкусом и запахом. Из-за высокого содержания углеводов уже в течение часа начинается активный процесс брожения, поэтому сок не подлежит хранению. Для увеличения длительности хранения и концентрации биологически активных веществ сок упаривали при пониженном давлении и температуре не выше 50 °С до содержания в нем экстрактивных веществ около 70 %. При упаривании получено 784 г концентрированного сока.

Обнаружено, что в течение 10–20 сут в концентрированном соке выпадает значительное количество кристаллов. Для выделения кристаллов из 30 г концентрированного сока вязкую массу промывали холодной водой (0–5 °С), твердый осадок отфильтровывали. После двукратной перекристаллизации из воды получили 3 г (10 %) бесцветных ромбических кристаллов. Найдено, %: С 35.20; Н 6.48; N 22.60, C₄H₈N₂O₃ (элементный СНН-анализатор НР-185). Вычислено, %: С 36.36; Н 6.06; N 21.21.

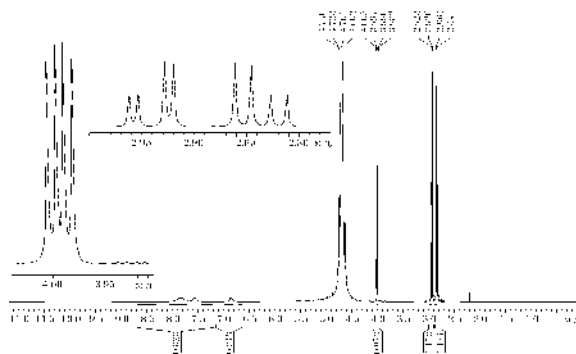
ИК-спектры сняты в таблетках с КВг на спектрометре Bruker (Германия) Vector 22. ЯМР-спектры записаны на спектромере Bruker DRX 500, рабочая частота прибора 500 МГц, внешний стандарт ГМДС, растворитель – дейтерированная вода.

Тестирование антибластического (противоопухолевого) действия проведено на суспензионных культурах опухолевых клеток карциномы Эрлиха (2.5 · 10⁵ клеток/мл) по включению ³Н-тимидина с последующим анализом на бета-счетчике Mark-III, а также в реакции бластной трансформации лимфоцитов человека, стимулированных фитогемагглютинином (ФГА) после воздействия β-аспарагина в диапазоне концентраций (0.04–75) · 10⁻³ М. Оценка влияния β-аспарагина на пролиферативную активность лимфоцитов в индуцированном ФГА-тесте проведена в соответствии с методическими рекомендациями фармкомитета Минздрава РФ [9]. Параллельно с β-аспарагином, выделенным из корней лопуха, проведено исследование биологической активности синтетического L-аспарагина (Япония, партия 20010626).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

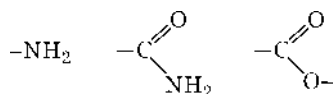
Выделенное из концентрированного сока корней лопуха кристаллическое соединение не растворяется в органических растворителях (углеводороды, спирты, ацетон, диметилсульфоксид) и растворимо в воде, растворах кислот и щелочей.

Вещество плавится при температуре выше 200 °С с разложением, точную температуру плавления установить не удалось. Выявленные физические свойства характерны для аминокислот и их производных [10]. Нингидриновая реакция на аминокислоту дала положительный результат. При нагревании водного раствора кристаллов со щелочью выделяется аммиак, что характерно для амидов. Молекулярная формула, рассчитанная по данным элементного анализа, соответствует формуле аспарагина – моноамида аспарагиновой кислоты (1). В зависимости от положения аминогрупп по отношению к амидной различают α- и β-аспарагин (2, 3) [11].



Поскольку α-аспарагин получают синтетическим путем, а в животных и растительных тканях содержится β-аспарагин преимущественно в L-форме, можно предположить, что из сока корней лопуха выделен β-аспарагин. Доказательство его структуры проведено с помощью спектральных методов.

В ИК-спектре наблюдаются полосы поглощения, подтверждающие наличие в структуре исследуемого соединения функциональных групп



В области валентных колебаний N–H в первичных аминах наблюдаются полосы 3455

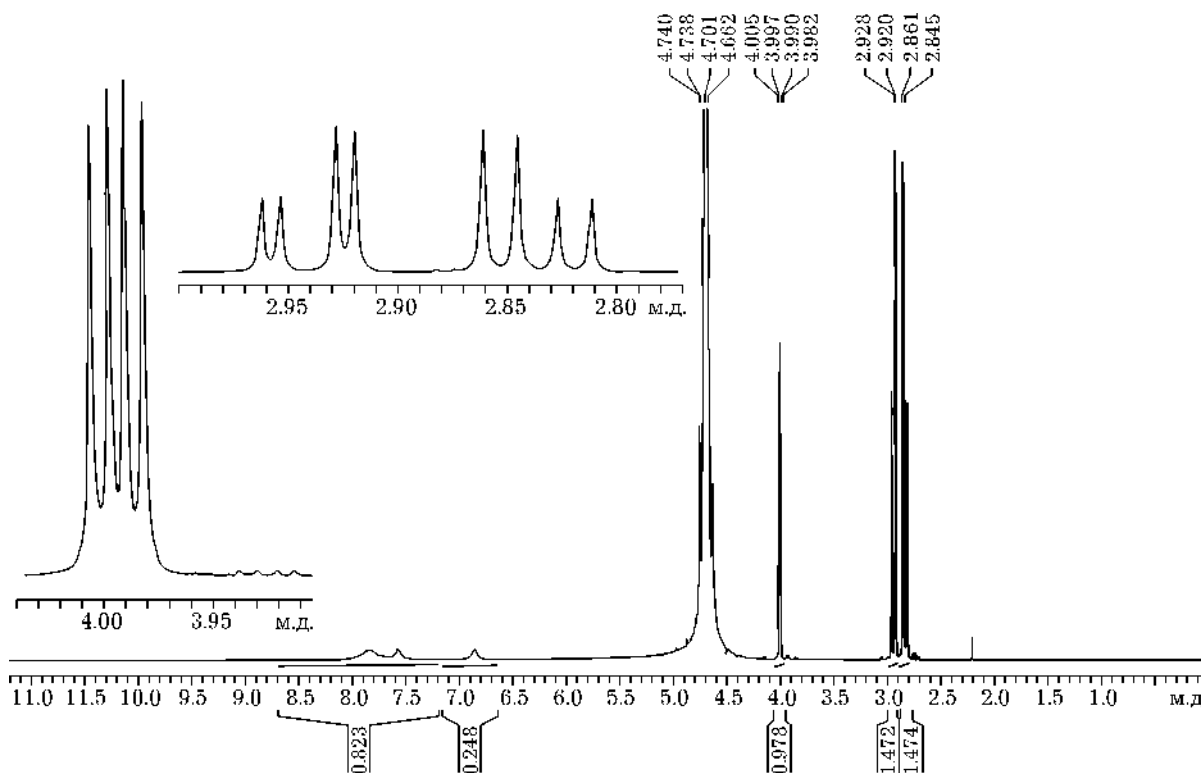


Рис. 1. ПМР-спектр β-аспарагина, выделенного из сока корней лопуха.

и 3382 см^{-1} . Амидная группа проявляется в спектре полосой валентных колебаний N–H при 3111 см^{-1} и деформационных колебаний N–H при 1644 см^{-1} (полоса Амид II), характерных для первичных амидов. Вторая область проявления этих колебаний находится в области меньших частот: при 1429 см^{-1} (полоса Амид III). Валентные колебания карбонильной группы (C=O) амидов обнаружены при 1682 см^{-1} (полоса Амид I). Область $1500\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ содержит ряд интенсивных полос, отнесенных, как указано выше, к полосам Амид I, II, III; полоса 1578 см^{-1} соответствует валентным колебаниям C=O в ионизированном карбоксиле аминокислоты, что указывает на цвиттер-ионную структуру аспарагина. Полоса деформационных колебаний N–H в $^+\text{NH}_3$ -группе при 1528 см^{-1} также подтверждает цвиттер-ионную структуру. Расширенная полоса поглощения при 669 см^{-1} соответствует деформационным колебаниям N–H в аминах.

ИК-спектр хлоргидрата аспарагина свидетельствует об исчезновении цвиттер-ионной структуры, в спектре имеются полосы валентных колебаний C=O в неионизированном карбоксиле аминокислот при 1730 см^{-1} [12].

В ПМР-спектре соединения (рис. 1) проявляются резонансные сигналы протонов аминогруппы при 7.85 м.д., протонов амидной группы при 7.60 и 6.86 м.д. Дублет дублетов с химическим сдвигом 4.0 м.д. ($J_1 = 4\text{ Гц}$, $J_2 = 8\text{ Гц}$) относится к метиновому протону. Его мультиплетность свидетельствует о неэквивалентности соседних метиленовых протонов. Расчет части спектра, относящейся к метиленовым протонам, дал следующие параметры: сигнал одного из метиленовых протонов

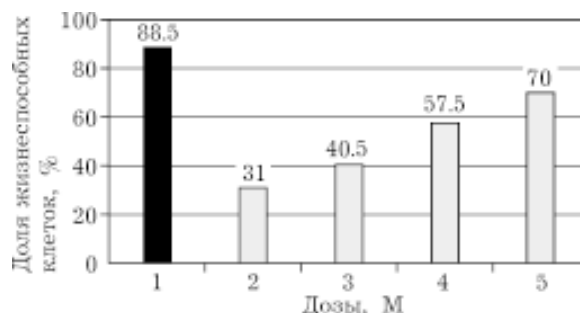


Рис. 2. Влияние β-аспарагина из корней лопуха на ФГА-индуцированную пролиферацию лимфоцитов доноров (цитостатический эффект): 1 – контроль (клетки + ФГА), 2–5 – β-аспарагин (2 – $75 \cdot 10^{-3}\text{ М}$, 3 – $7.5 \cdot 10^{-3}\text{ М}$, 4 – $0.75 \cdot 10^{-3}\text{ М}$, 5 – $0.075 \cdot 10^{-3}\text{ М}$).

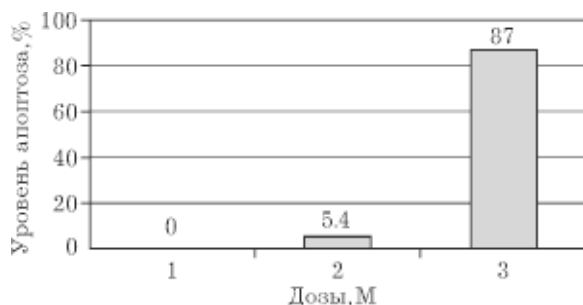


Рис. 3. Апоптозиндуцирующее действие β -аспарагина из корней лопуха на опухолевые клетки карциномы Эрлиха: 1 – контроль (клетки без препарата), 2, 3 – β -аспарагин (2 – $0.4 \cdot 10^{-3}$ М, 3 – $4 \cdot 10^{-3}$ М β -аспарагин).

имеет химический сдвиг 2.94 м.д. ($J_1 = 4$ Гц), второго – 2.84 м.д. ($J_2 = 8$ Гц), абсолютное значение константы спин-спиновой взаимодействия между метиленовыми протонами составляет 17 Гц.

Результаты исследований антибластического действия показали, что выделенные из корней лопуха кристаллы β -аспарагина оказывают угнетающее влияние на индуцированную ФГА пролиферативную активность лимфоцитов (рис. 2). Установлено, что синтетический препарат не проявил цитостатической активности. При этом ИК- и ПМР-спектры L -аспарагина (Япония) практически идентичны спектрам аспарагина из корней лопуха.

Тестирование апоптозиндуцирующего действия заявляемого препарата проведено на опухолевых клетках карциномы Эрлиха по методу [13].

Полученные данные свидетельствуют о том, что β -аспарагин, выделенный из корней лопуха, обладает дозозависимым апоптоз-индуцирующим влиянием на опухолевые клетки, наиболее выраженным при концентрации порядка $4 \cdot 10^{-3}$ М (индукция апоптоза до 87 %) от контроля (опухолевые клетки без воздействия), при концентрации $0.4 \cdot 10^{-3}$ М

индукция апоптоза составляет 5.4 % (рис. 3). У синтетического L -аспарагина апоптоз-индуцирующая активность не обнаружена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые выделен и идентифицирован β -аспарагин из корней лопуха, доказана его апоптоз-индуцирующая и цитостатическая активность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Г. В. Крылов, Травы жизни и их искатели, Зап.-Сиб. кн. изд-во, Новосибирск, 1972.
- 2 В. Г. Минаева, Лекарственные растения Сибири, Наука, Новосибирск, 1991.
- 3 Т. А. Канакина, Противоязвенная активность извлечений из лопуха войлочного: Автореф. дис. ... канд. биол. наук, изд. НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск, 1997, 22 с.
- 4 В. Н. Жданов, Влияние извлечений из лопуха войлочного на токсические эффекты этанола и гипоксию: Автореф. дис. ... канд. биол. наук, изд. НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск, 1999, с. 20.
- 5 S. Foldeak, G. A. Dombradi, *Acta Phys. Chem.*, 10(1964) 93.
- 6 Su-Mi Kim and Jong-Sang Kim, *FASEB J.*, 3 (1997) 369.
- 7 Р. С. Боев, В. М. Плотников, Апоптоз-индуцирующая и цитостатическая активность концентрированного сока корня лопуха: Материалы конф «Актуальные вопросы разработки и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов», Томск, 2004, с. 276.
- 8 Д. А. Шматов, Использование физико-химических методов анализа для изучения химического состава, оценки качества и стандартизации корней лопуха: Дис. ... канд. фармацевт. наук, Москва, 2000, с. 122.
- 9 *Ведомости фармакологического комитета*, 1 (1999) 31.
- 10 П. Каррер, Курс органической химии, Изд-во хим. лит., Ленинград, 1962.
- 11 Химическая энциклопедия, т. I, Изд-во СЭ, 1988.
- 12 К. Наканиси, Инфракрасные спектры и строение органических соединений, Мир, Москва, 1967.
- 13 S. N. Orlov, T. V. Dam, J. Trembly, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 221 (1996) 708.