

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ»

УДК 547.914.4-035.2:[543.4/.5+542.913]+577-047.42

СТАСЕВИЧ ОЛЬГА ВИКТОРОВНА

**ПОЛУЧЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИГНАНА  
СЕКОИЗОЛАРИЦИРЕЗИНОЛА ДИГЛЮКОЗИДА И ЕГО  
ПРОИЗВОДНЫХ**

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук**

**по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия**

Минск, 2010

Работа выполнена в Белорусском государственном технологическом университете и Белорусском государственном университете

Научные руководители: **Михаленок Сергей Георгиевич**, кандидат химических наук, доцент кафедры органической химии Белорусского государственного технологического университета

**Курченко Владимир Петрович**, кандидат биологических наук, заведующий НИЛ прикладных проблем биохимии Белорусского государственного университета

Официальные оппоненты: **Кисель Михаил Александрович**, доктор химических наук, заведующий лабораторией химии липидов Института биоорганической химии НАН Беларуси

**Спиридович Елена Владимировна**, кандидат биологических наук, и.о. заведующего лабораторией прикладной биохимии Центрального ботанического сада НАН Беларуси

Оппонирующая организация: Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова

Защита состоится « 2 » ноября 2010 г. в 10<sup>00</sup> часов на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 при Институте биоорганической химии НАН Беларуси по адресу: 220141, г. Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 5/2, e-mail: [babitskaya@iboch.bas-net.by](mailto:babitskaya@iboch.bas-net.by), тел. (017) 267-85-53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «1» октября 2010 г.

Ученый секретарь  
Совета по защите диссертаций Д 01.21.01,  
кандидат химических наук

С.В. Бабицкая

## **ВВЕДЕНИЕ**

В связи с ростом общей заболеваемости населения Республики Беларусь в последние десятилетия ведется целенаправленный поиск биологически активных соединений, изучается их структура и действие на биологические системы. Наиболее перспективным источником таких соединений является растительное сырье. Семена льна масличного – растения, культивируемого на территории Республики Беларусь, – богаты лигнаном секоизоларицирезинола диглюкозидом (СДГ). Это уникальное соединение обладает широким спектром биологической активности: является мощным антиоксидантом, фитоэстрогеном, обладает противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами, повышает общий иммунитет. Получение лигнановых экстрактов льна, а также СДГ в чистом виде представляется важным в Республике Беларусь. Эти субстанции могут служить основой для создания лекарственных препаратов и биологически активных добавок. Исследование СДГ и его модифицированных производных *in vitro* помогут проследить взаимосвязь между изменением структуры природного лигнана и его антиоксидантной и цитотоксической активностями, что значительно расширит возможности исследований по направленному синтезу биологически активных соединений с заданными свойствами.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

**Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами**

Диссертационная работа выполнена в рамках Государственной программы развития сырьевой базы и переработки лекарственных и пряно-ароматических растений на 2005–2010 гг. «Разработать технологию получения фитопрепарата на основе лигнанов, обладающего антиаллергенной и антиоксидантной активностью» (номер государственной регистрации 20065302), а также в рамках гранта Министерства образования Республики Беларусь на 2008 г. «Выделение лигнана диглюкозида секоизоларицирезинола из семян льна масличного» (номер государственной регистрации 20080857).

Тема исследования входит в Перечень приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 годы, утвержденный постановлением Совета Министров Республики Беларусь 17.05.2005 № 512, и соответствует пункту 4.1: «Биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты, направленный синтез биомолекул и субстанций медицинского назначения».

## **Цель и задачи исследования**

*Цель исследования:* разработать эффективный способ получения секоизоларицирезинола диглюкозида и его производных и исследовать их антиоксидантные и цитотоксические свойства.

*Задачи исследования:*

1. Разработать эффективный способ выделения и очистки природного лигнана СДГ из семян льна масличного.
2. Осуществить подбор оптимальных условий для качественной идентификации и количественной оценки СДГ методом ТСХ и ВЭЖХ соответственно.
3. Синтезировать деглюкозилированные и ацелированные производные лигнана СДГ.
4. Оценить антиоксидантные и цитотоксические свойства полученных соединений *in vitro*.

*Объект исследования:* лигнан секоизоларицирезинола диглюкозид из семян льна масличного и его деглюкозилированные и ацелированные производные.

*Предмет исследования:* аспекты выделения лигнана СДГ и синтеза его производных, физико-химические и биологические свойства полученных соединений.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. Новый эффективный способ выделения природного лигнана секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного, включающий в себя стадии совмещенных процессов гидролиза и экстракции обезжиренного льняного семени водным этанолом в присутствии щелочи при кратковременном воздействии микроволнового излучения, позволяющий получать экстракт с высоким содержанием СДГ.

2. Методика идентификации лигнанов с помощью ТСХ и ВЭЖХ, позволяющая качественно и количественно определять СДГ.

3. Новый способ очистки СДГ, основанный на предварительном двукратном разделении лигнансодержащего экстракта на ионообменном сорбенте Diaion HP-20 с окончательной очисткой на обращенно-фазном силикагеле С18, обеспечивающий высокую чистоту целевого продукта.

4. Синтез ранее неизвестного секоизоларицирезинол-4',4''-диацетата путем селективного ацелирования фенольных гидроксильных групп секоизоларицирезинола.

5. Антиоксидантная активность СДГ и его производных, возрастающая при увеличении числа свободных спиртовых и фенольных гидроксил в агликоне. Антипролиферативный эффект производных без глюкозидной части,

повышающийся в зависимости от ацетилирования фенольных гидроксиллов, обусловленный индукцией апоптоза опухолевых клеток.

### **Личный вклад соискателя**

Постановка цели и задач исследования, а также выбор методов и анализ результатов осуществлялись автором совместно с научными руководителями. Экспериментальные данные, представленные в диссертационной работе, получены лично автором. Цитостатические и цитофлуориметрические исследования проводились автором при участии к.б.н. Т.В. Шман в Республиканском научно-практическом центре детской онкологии и гематологии.

### **Апробация результатов диссертации**

Результаты исследований были представлены на международной студенческой конференции «Научный потенциал студенчества – будущему России» (Ставрополь, 2008 г.), на XX, XXII зимних международных молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2008 г, 2010 г.), на VIII Украинской конференции по аналитической химии (Одесса, 2008 г.), на V Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» (Уфа, 2008 г.), на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008 г.), на III Международной научной конференции «Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений» (Минск, 2008 г.), на III Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 2008 г.), на XII Пущинской международной школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2008 г.), на XI молодежной конференции по органической химии (Екатеринбург, 2008 г.), на международной научно-практической конференции «Биологически активные соединения природного происхождения: фитотерапия, фармацевтический маркетинг, фармацевтическая технология, фармакология, ботаника» (Белгород, 2008 г.), на IX всероссийской научно-практической конференции студентов и аспирантов «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2008 г.), на международной конференции молодых химиков «Baltchem-2009» (Варшава, 2009 г.), на XVI–XVII международных конференциях студентов, аспирантов, молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2009, 2010 гг.), на международной научной конференции молодых ученых «Молодежь в науке-2009» (Минск, 2009 г.), на 71–73 научно-технических конференциях БГТУ (Минск, 2007–2009 гг.), на международном VII симпозиуме по фенольным соединениям (Москва, 2009 г.).

### **Опубликованность результатов диссертации**

По материалам диссертационной работы опубликовано 27 печатных работ, в том числе: 8 статей в рецензируемых научных журналах, 1 статья в сборнике научных трудов, тезисы 17 докладов в материалах научных конференций и съездов научных сообществ, 1 патент. Общий объем опубликованных материалов составляет 4.67 авторских листа, из них на статьи, соответствующие пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, приходится 2.66 авторских листа.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация содержит введение, общую характеристику работы, 6 глав, заключение, библиографический список, включающий 186 источников. Работа изложена на 132 страницах, содержит 70 иллюстраций на 25 страницах и 13 таблиц на 7 страницах.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ**

В *первой главе* диссертационной работы приводится обзор литературных данных о лигнанах: нахождение в природе, их биосинтез и метаболизм, сведения об их биологической активности, в частности, антиоксидантной и противоопухолевой. Приводится сравнительный анализ антиоксидантной активности лигнанов и ранее известных антиоксидантов. Рассмотрены современные методы определения антиоксидантной активности с учетом механизмов протекающих реакций, преимуществ и недостатков отдельных методов. В разделе 1.4 обобщены литературные данные по проблемам выделения лигнанов из растительного сырья.

В *экспериментальной части* описаны использованные в диссертационной работе материалы и методы исследования. Для выделения лигнана СДГ из семян льна масличного был выбран метод экстракции с последующей очисткой полученного лигнансодержащего экстракта с помощью гель-, ионообменной и обращенно-фазной препаративных хроматографий. Для качественной и количественной идентификации СДГ и его синтезированных производных использовали метод ТСХ и ВЭЖХ соответственно, а для установления их структуры служили методы масс-спектрометрии, ЯМР-, ИК- и УФ-спектроскопии.

Для анализа антиоксидантной активности лигнанов были выбраны две модельные системы, где в качестве объекта повреждения служила ДНК, а инициаторами повреждения являлись свободные радикалы различной природы (гидроксильные радикалы, образующиеся под действием модифицированного реагента Фентона (Fe(III)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/аскорбиновая кислота), и продукты пероксидазного окисления бензидина). По ДНК-протекторной активности,

учитывая, что лигнаны предотвращали повреждение ДНК за счет связывания соответствующих свободных радикалов, оценивали антиоксидантную и антирадикальную активности исследуемых соединений.

Цитотоксическое действие полученных соединений на лейкозные клетки определяли в тесте с 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромидом (МТТ), позволяющим проводить сравнительную оценку метаболической активности митохондрий, степень которой коррелирует с жизнеспособностью клетки. Определение цитотоксической активности по индукции апоптоза проводили с помощью проточной цитофлуориметрии на приборе FACScan (Becton Dickinson, США).

### Выделение СДГ из семян льна масличного

Для выделения секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного был разработан эффективный способ получения лигнансодержащего экстракта и его последующей очистки при помощи препаративной хроматографии. На основе анализа приведенных в литературе данных были предложены и апробированы три способа получения СДГ-содержащего экстракта (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание СДГ в экстрактах из семян льна масличного в зависимости от условий проведения экстракции

Способ экстракции	Соотношение количеств сырья и экстрагента, г/мл	Условия проведения процесса				Выход экстрактивных веществ на обезжиренное сырье, %	Содержание СДГ в экстракте в расчете на обезжиренное сырье, мг/г
		экстракция		гидролиз			
		время проведения опыта, мощность микроволнового излучения	экстрагирующий агент	гидролизирующий агент	время проведения опыта, мощность микроволнового излучения		
1	1 : 20	2 мин троекратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт	50 % водный этанол	Водный NaOH, pH = 10	2 мин троекратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт	20.6±0.2	9.7±0.1
Экстракция совместно с гидролизом							
2	1 : 20	Водный NaOH, 50 % водный этанол, pH = 10, 2 мин шестикратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт				23.2±0.2	14.2±0.1
3	1 : 20	Водный NaOH, pH = 10, 2 мин шестикратно с перерывом в 1 мин, 150 Вт				18.8±0.3	7.9±0.2

Все три способа включали в себя стадию измельчения семян, их обезжиривание, экстракцию водным этанолом и гидролиз обезжиренной массы, нейтрализацию и концентрирование полученного экстракта.

Было установлено, что выход экстракта с наибольшим содержанием в нем СДГ достигался при совмещении процессов гидролиза и экстракции водно-этанольной смесью, то есть по второму способу. При проведении экстракции водным этанолом с последующим гидролизом по первому способу также получен экстракт с удовлетворительным содержанием СДГ. В случае экстракции водной щелочью по третьему способу получен экстракт с наименьшим содержанием СДГ, который отличался гелеобразной структурой из-за наличия большого числа других, перешедших в раствор соединений, что значительно затрудняло процесс внесения пробы на стадии его хроматографического разделения.

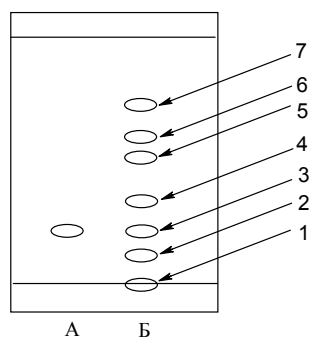
Для анализа экстракта, полученного при совмещении процессов гидролиза и экстракции водно-этанольной смесью, была разработана методика идентификации СДГ с помощью ТСХ (таблица 2) и подобраны оптимальные условия для проведения ВЭЖХ.

Таблица 2 – Величина  $R_f$  СДГ в различных элюирующих условиях

Сис-тема	Состав подвижной фазы	Соотношение компонентов (об.)	$R_f$ СДГ	Окраска пятна СДГ при УФ облучении
I	Этилацетат – этанол – муравьиная кислота – вода	77 : 13 : 5 : 10	0.12±0.04	Фиолетовая без флуоресценции
II	Хлороформ – ацетон – уксусная кислота	75 : 16.5 : 8.5	0.04±0.03	Фиолетовая без флуоресценции
III	Хлороформ – этанол – вода	6 : 7 : 0.5	0.23±0.03	Фиолетовая без флуоресценции
IV	Вода – пропанол-2 – 25% водный раствор аммиака	1 : 8 : 1	0.24±0.03	Бриллиантово-синяя с флуоресценцией

При использовании элюирующей системы IV для проведения ТСХ фиксировали специфическую бриллиантово-синюю флуоресценцию только пятна, принадлежащего именно СДГ, что дало возможность четко идентифицировать данный лигнан в смеси. После разделения лигнансодержащего экстракта в тонком слое сорбента (рисунок 1) и его анализа с помощью ВЭЖХ (рисунок 2) было установлено, что исследуемый экстракт состоит из 7-ми основных компонентов.

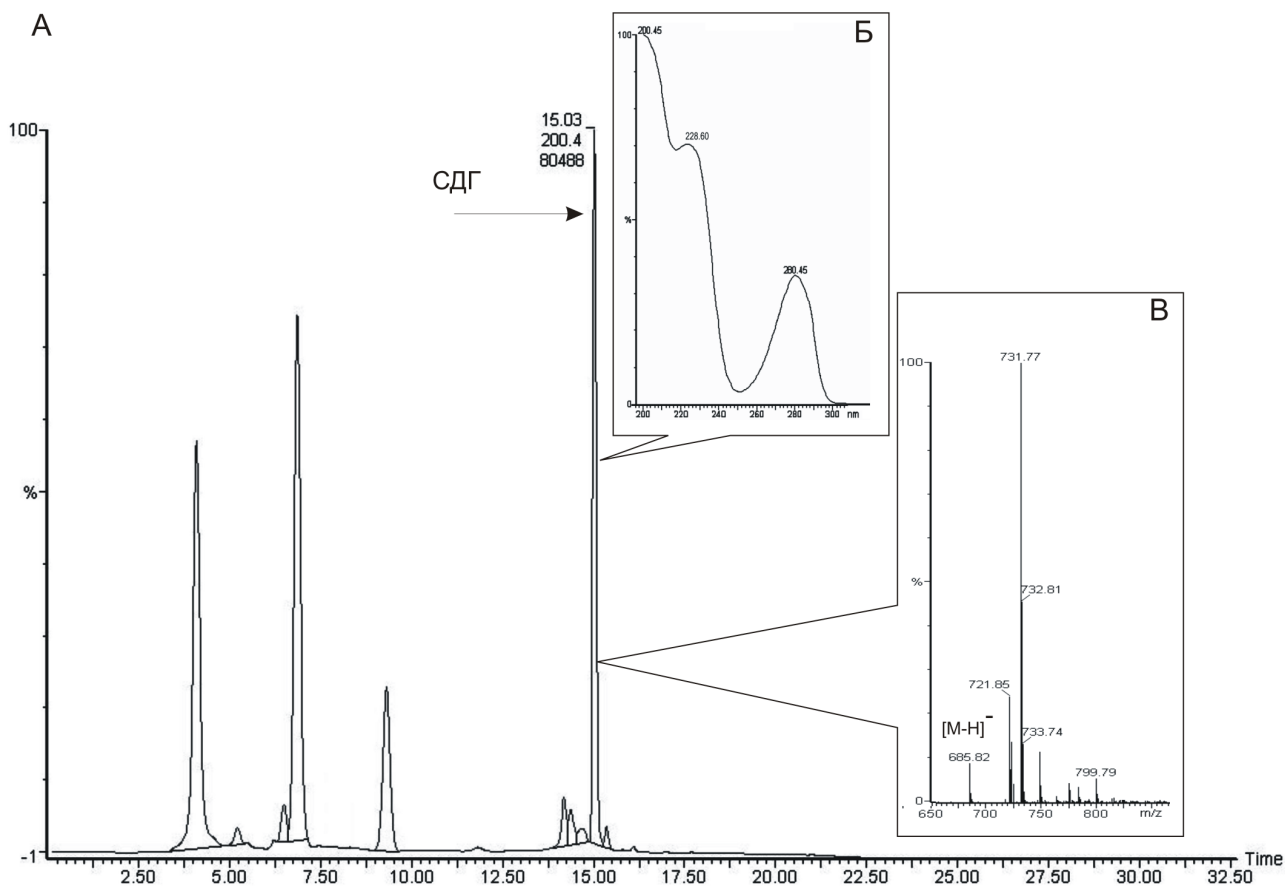




А – стандартный раствор СДГ; Б – СДГ-содержащий экстракт; 1–7 – основные компоненты экстракта

**Рисунок 1 – Типичная тонкослойная хроматограмма СДГ и экстракта при использовании различных подвижных фаз**

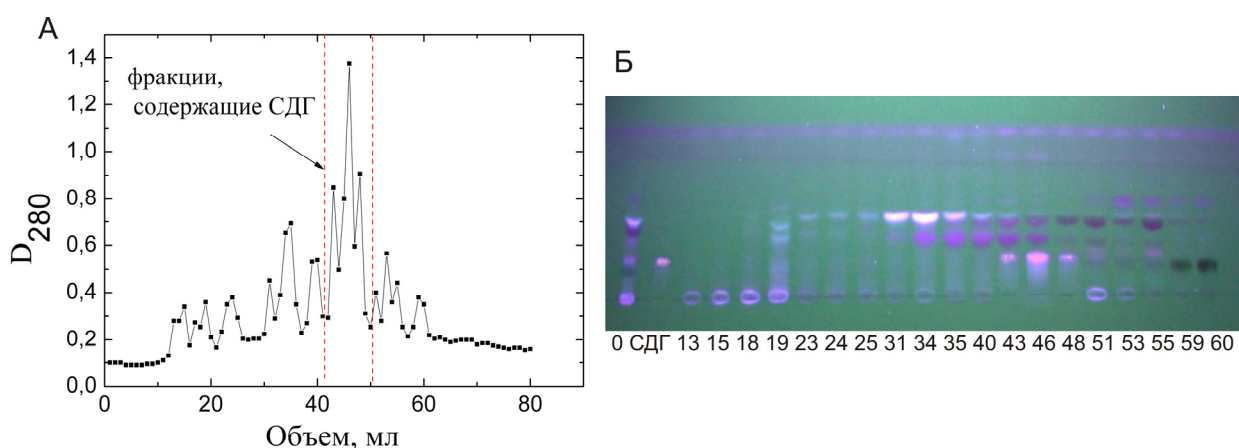
В условиях, подобранных для ВЭЖХ анализа (элюирующая система, состоявшая из ацетонитрила и воды с 0.1% содержанием муравьиной кислоты), СДГ в экстракте идентифицировали по веществу со временем удерживания 15.03 мин (рисунок 2А), которое совпадало со временем удерживания коммерческого препарата СДГ.



**Рисунок 2 – ВЭЖХ анализ экстракта (А) и УФ - (Б), масс - (В) спектры СДГ**

УФ-спектр (рисунок 2Б) этого соединения включает три максимума поглощения: интенсивную полосу в коротковолновой части спектра (200.45 нм), полосу средней интенсивности (228.60 нм) и полосу в длинноволновой части спектра (280.45 нм). Максимумы поглощения для этого вещества обуславливаются наличием в его структуре метокси- и гидроксизамещенного бензольного кольца. При проведении ВЭЖХ анализа использовали диодно-матричный детектор и масс-детектор с электроспреей ионизацией. В масс-спектре отрицательных ионов (рисунок 2В) наблюдается сигнал с  $m/z$  685.82, соответствующий иону  $[M-H]^-$  для соединения с молекулярной формулой  $C_{32}H_{46}O_{16}$ , то есть СДГ.

Для очистки полученного лигнансодержащего экстракта использовали гель-хроматографию. При использовании сорбента Toyopearl HW-40F и 50% водного пропанола-2 в качестве элюирующей системы наблюдалось недостаточное качество разделения – 41% с выходом 0.03% по отношению к введенному экстракту (рисунок 3).

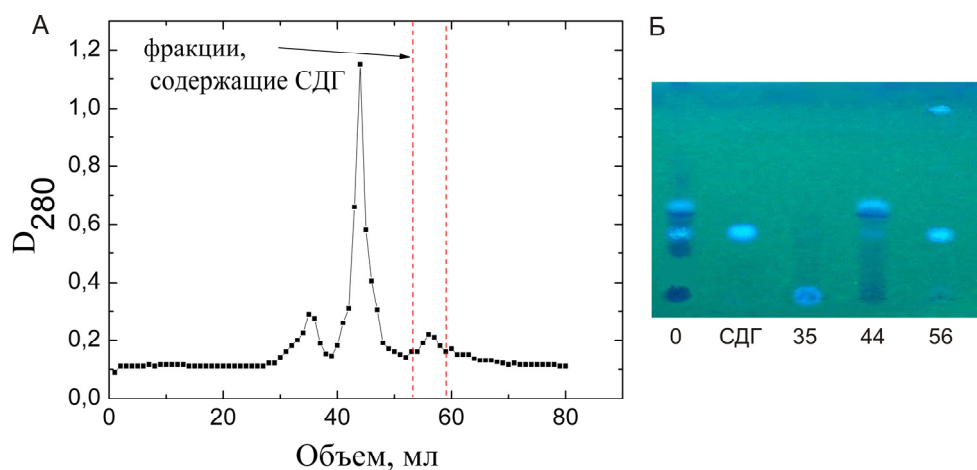


0 – СДГ-содержащий экстракт; СДГ – коммерческий препарат СДГ; 13, 15, 18, 19, 23, 24, 25, 31, 34, 35, 40, 43, 46, 48, 51, 53, 55, 59, 60 – объем элюента, мл

**Рисунок 3 – Профиль элюции (А) и ТСХ анализ (Б) разделения экстракта на геле Toyopearl HW-40F**

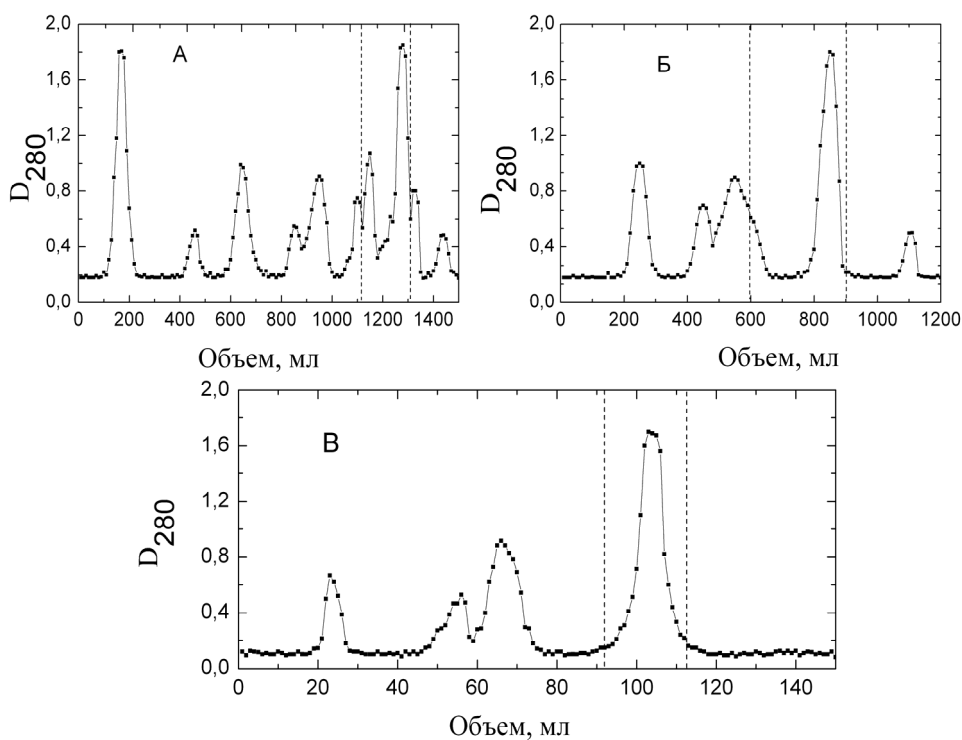
При разделении экстракта на геле Sephadex LH-20 и воды в качестве подвижной фазы получали СДГ-содержащую фракцию с чистотой 56% и 0.1% выходом по отношению к введенному экстракту (рисунок 4).

Метод гель-хроматографии оказался недостаточным для выделения препаративных количеств СДГ, поэтому был разработан способ разделения лигнансодержащего экстракта, включающий в себя двукратную очистку на ионообменном сорбенте Diaion HP-20 с использованием в качестве подвижной фазы 10–40% растворов этанола в воде, и окончательное разделение с применением обращенно-фазного силикагеля C18 (рисунок 5).



0 – СДГ-содержащий экстракт; СДГ – коммерческий препарат СДГ; 35, 44, 56 – объем элюента, мл

**Рисунок 4 – Профиль элюции (А) и ТСХ анализ (Б) разделения экстракта на геле Sephadex LH-20**



Пунктирными линиями обозначены зоны, соответствующие СДГ-содержащим фракциям

**Рисунок 5 – Профили элюции разделения лигнано содержащего экстракта на сорбенте Diaion HP-20 (А, Б) и силикагеле C18 (В)**

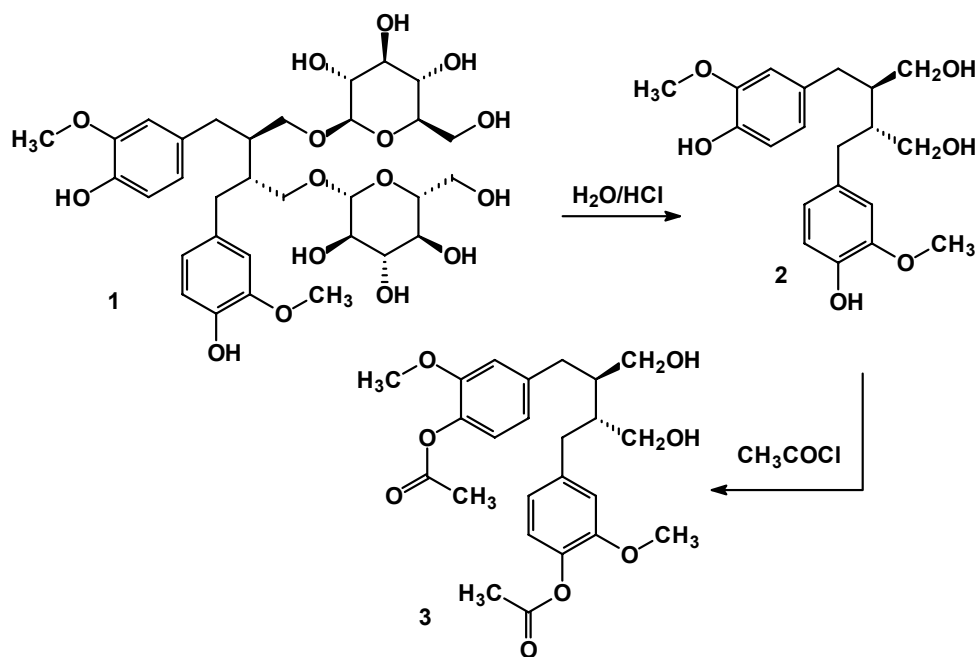
Данные по выходам и чистоте на каждом этапе выделения СДГ из лигнано содержащего экстракта последовательно на ионообменном и обращенно-фазном сорбентах приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Этапы и результаты выделения СДГ из лигнансодержащего экстракта семян льна масличного

Стадии очистки СДГ-содержащего экстракта	Масса образца, г	Выход образца по отношению к экстракту, %	Чистота образца, %
СДГ-содержащий экстракт	23.2	100	6.2
СДГ-содержащая фракция после очистки на Diaion HP-20	4	17.2	31.0
СДГ-содержащая фракция после двукратной очистки на Diaion HP-20	0.8	3.4	65.0
СДГ-содержащая фракция после очистки на обращенно-фазном силикагеле С18	0.24	1.03	95.3

### Синтез производных лиганана СДГ

Для осуществления структурно-функционального анализа лигнанов были синтезированы производные СДГ **1**: секоизоларицирезинол **2** и секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат **3** (рисунок 6).



1 – СДГ; 2 – секоизоларицирезинол; 3 – секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат

Рисунок 6 – Схема синтеза производных СДГ

Синтез секоизоларицирезинола осуществляли путем кислотного гидролиза СДГ. Диацетильное производное секоизоларицирезинола получали реакцией с ацетилхлоридом. Так как в литературных данных синтез такого рода ацильных производных секоизоларицирезинола не описан, нами был проведен анализ и

подбор условий селективного ацилирования соединений, содержащих одновременно фенольные и спиртовые гидроксилы. Структуры полученных веществ **1–3** были подтверждены на основании данных ИК-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Образование нового продукта ацилирования секоизоларицирезинола по фенольным гидроксилам **3** однозначно подтверждено данными его  $^1\text{H}$  ЯМР-спектра (рисунок 7).

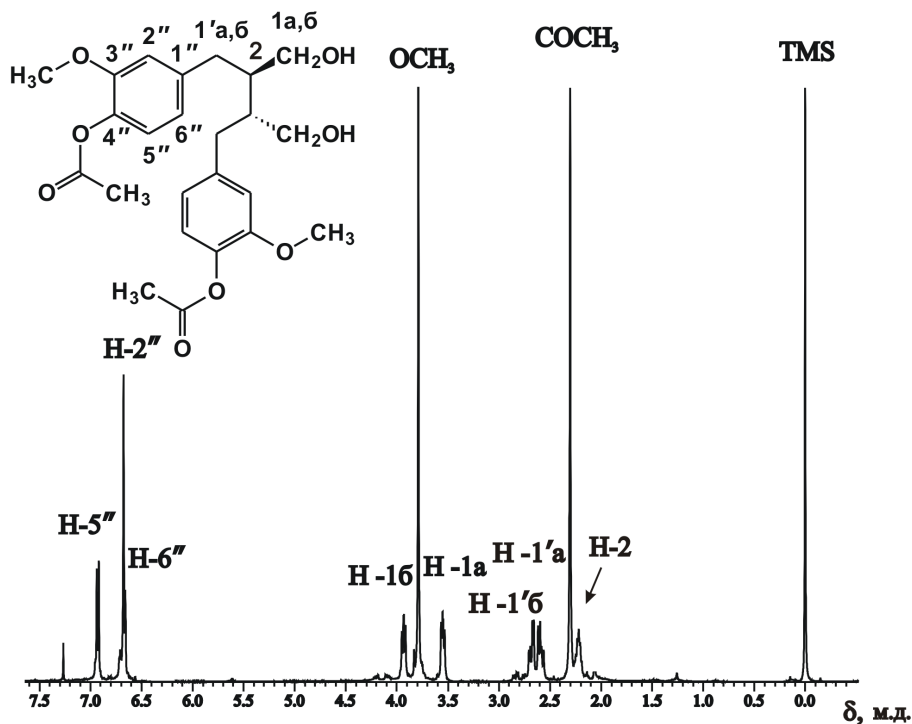


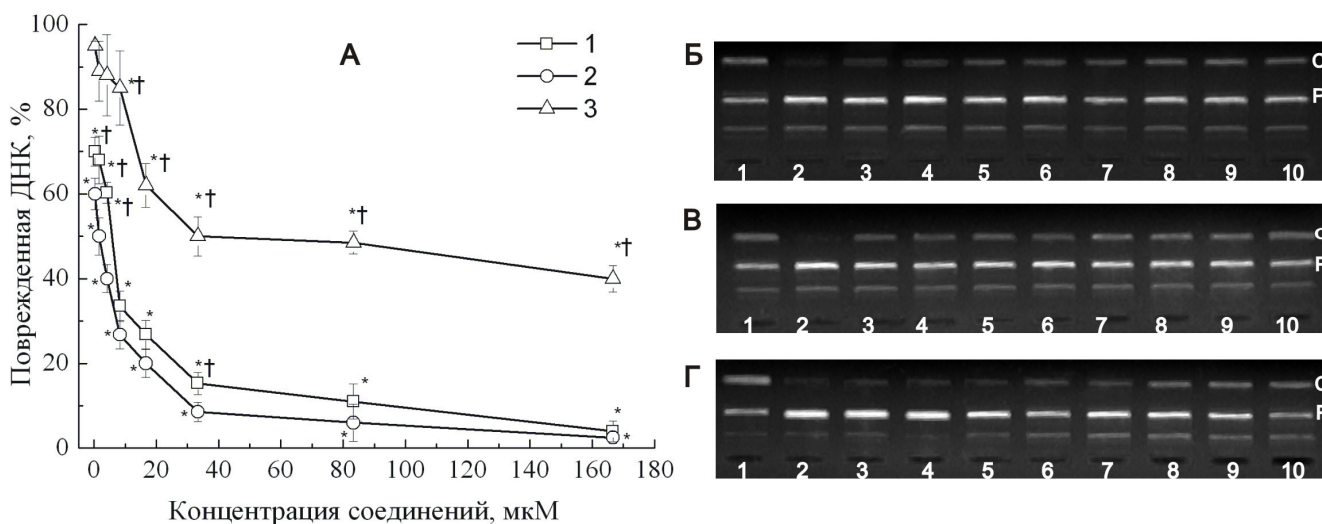
Рисунок 7 –  $^1\text{H}$  ЯМР-спектр секоизоларицирезинол-4',4''-диацетата

Значение химического сдвига протонов ацетильной группы (2.30 м.д.) свидетельствует о наличии в молекуле фрагмента  $\text{Ar-O-COCH}_3$  и, соответственно, протекании реакции ацетилирования секоизоларицирезинола по фенольным гидроксилам.

### Антиоксидантная активность СДГ и его производных

Антиоксидантную активность полученных лигнанов исследовали в модельной системе свободнорадикального повреждения плазмидной ДНК pBR322, которая состояла из 30% суперспирализованной формы I (С) и 60% формы II (суперспирализованная ДНК с однонитевым разрывом (Р)). Под действием образовавшегося в результате реакции Фентона гидроксильного радикала в суперспирализованной форме I появлялись однонитевые разрывы, и она переходила в менее компактную форму II, при этом уменьшалась ее электрофоретическая подвижность. При добавлении в реакционную систему лигнанов в возрастающих концентрациях наблюдали ингибирование процесса

однонитевого разрыва плазмидной ДНК. По интенсивности пятен, соответствующих форме I ДНК, были построены кривые зависимости количества поврежденной суперспирализованной ДНК от концентрации соединений (рисунок 8).



А: График зависимости количества поврежденной ДНК pBR322 от концентрации лигнанов. 1 – СДГ, 2 – секоизоларицирезинол, 3 – секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат; \* – статистически достоверные различия по отношению к данным для контроля II ( $p < 0.05$ ), † – статистически достоверные различия по отношению к данным для секоизоларицирезинола ( $p < 0.05$ ).

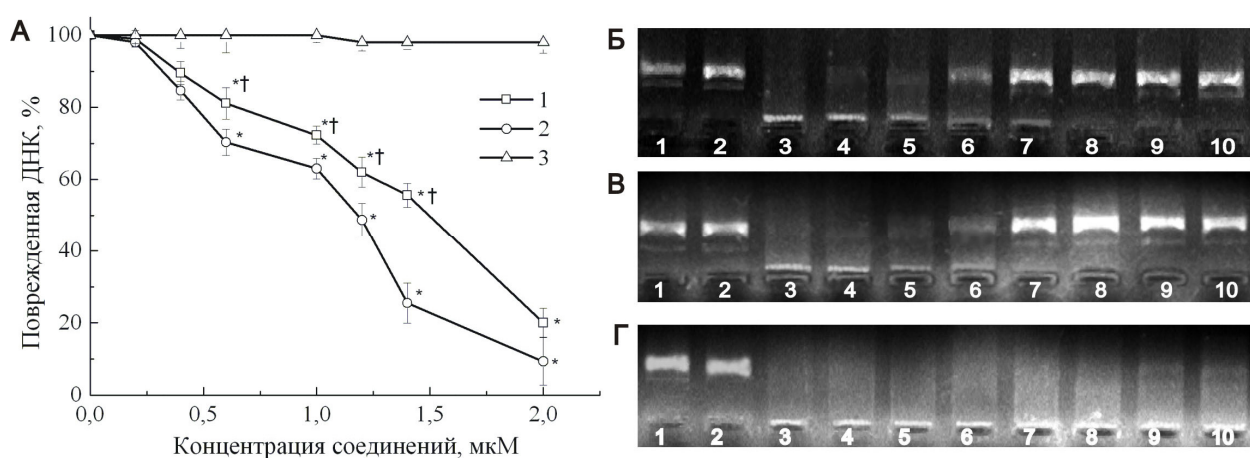
Б, В, Г: Электрофореграммы ДНК. Дор. 1 – буфер+ДНК+0.57%  $\text{CH}_3\text{OH}$  (контроль I); дор. 2 – буфер+ДНК+0.57%  $\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}_2\text{O}_2+\text{аскорбиновая кислота}+\text{FeCl}_3$  (контроль II); дор. 3–10 – компоненты дор. 2 без 0.57%  $\text{CH}_3\text{OH}+\text{СДГ}$  (Б), секоизоларицирезинол (В), секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат (Г) в концентрациях 0.33, 1.66, 4.16, 8.33, 16.66, 33.33, 83.33, 166.66 мкМ соответственно

### Рисунок 8 – Определение ДНК-протекторной активности лигнанов в отношении гидроксильных радикалов

Для сравнения антиоксидантной активности лигнанов между собой по графику определяли концентрации лигнанов, предотвращающие 50% повреждение ДНК ( $\text{IC}_{50}$ ). Как видно из рисунка 8, СДГ ( $\text{IC}_{50}=4.16\pm 0.40$  мкМ) и секоизоларицирезинол ( $\text{IC}_{50}=1.6\pm 0.1$  мкМ) проявляли себя как сильные антиоксиданты, в то время как ингибирующая активность секоизоларицирезинол-4',4''-диацетата была значительно ниже ( $\text{IC}_{50}=33.3\pm 1.5$  мкМ) ( $p < 0.05$ ).

Антирадикальную активность лигнанов оценивали в модельной системе повреждения ДНК продуктами пероксидазного окисления бензидина, являющегося канцерогеном непрямого действия. В качестве повреждаемого

объекта использовали фазмидную ДНК, содержащую клонированный фрагмент хромосомальной ДНК человека (получена из фазмидного клона W12-1799L7, являющегося частью человеческой фазмидной библиотеки клонов WIBR-2). В данной модельной системе бензидин под действием  $H_2O_2$  в присутствии пероксидазы хрена образует продукт окисления, который взаимодействует с пуринами ДНК и в конечном итоге приводит к образованию перекрестных сшивок в биомолекуле, при этом теряется ее электрофоретическая подвижность. После добавления в реакционную смесь возрастающей концентрации лигнанов СДГ и секоизоларицирезинола наблюдался процесс ингибирования повреждения ДНК (рисунок 9).



А: График зависимости количества поврежденной ДНК от концентрации лигнанов. 1 – СДГ, 2 – секоизоларицирезинол, 3 – секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат;

\* – статистически достоверные различия по отношению к данным для контроля III ( $p < 0.05$ ), † – статистически достоверные различия по отношению к данным для секоизоларицирезинола ( $p < 0.05$ ).

Б, В, Г: Электрофореграммы ДНК. Дор. 1 – буфер+ДНК+0.68%  $CH_3OH$  (контроль I); дор. 2 – буфер+ДНК+0.68%  $CH_3OH$ +пероксидаза хрена+ $H_2O_2$  (контроль II); дор. 3 – ДНК+0.68%  $CH_3OH$ +пероксидаза хрена+бензидин+ $H_2O_2$  (контроль III); дор. 4–10 – компоненты дор. 3 без 0.68%  $CH_3OH$ +СДГ (Б), секоизоларицирезинол (В), секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат (Г) в концентрациях 0.2, 0.4, 0.6, 1.0, 1.2, 1.4, 2.0 мкМ соответственно

### Рисунок 9 – Определение ДНК-протекторной активности лигнанов в отношении продуктов пероксидазного окисления бензидина

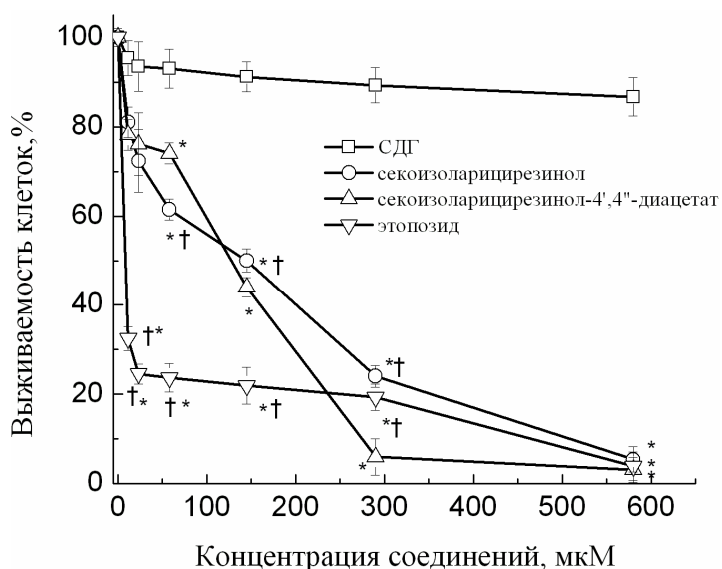
В модельной системе повреждения ДНК продуктами пероксидазного окисления бензидина СДГ ( $IC_{50}=1.54\pm 0.10$  мкМ) и секоизоларицирезинол ( $IC_{50}=1.17\pm 0.10$  мкМ) показали более высокую антирадикальную активность по сравнению с предыдущей моделью ( $p < 0.05$ ). Это объясняется тем, что в модельной системе в присутствии модифицированного реагента Фентона



лигнаны действовали в основном не как доноры протона, а как комплексообразователи. Секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат не проявлял антирадикальной активности в данном диапазоне концентраций. Выявлено, что секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат начинал предотвращать повреждения ДНК в диапазоне концентраций от 20 до 200 мкМ ( $IC_{50}=108.0\pm 3.2$  мкМ), что связано с наличием в его структуре ацетильных остатков у фенольных гидроксиллов. В обеих модельных системах антиоксидантная активность СДГ была ниже, чем у секоизоларицирезинола ( $p<0.05$ ).

### Цитотоксическая активность СДГ и его производных

Цитотоксическое действие природного СДГ и его производных определяли относительно опухолевой В-лимфобластоидной клеточной линии Raji (ACC 319, DSMZ-коллекция) с применением МТТ теста. В качестве стандартного цитотоксического средства использовали противоопухолевый препарат этопозид. Клетки инкубировали в присутствии лигнанов и этопозида в концентрациях 11.6, 23.3, 58, 145, 290, 580 мкМ, а после добавляли МТТ. Лейкозные клетки, сохранившие жизнеспособность после инкубации с тестируемыми веществами, метаболизировали МТТ с образованием формазана, по количеству которого определяли выживаемость клеток. После обработки данных получали графики зависимости процента выживаемости лейкозных клеток от концентрации соответствующего соединения (рисунок 10).



\* – статистически достоверные различия по отношению к данным для контроля без соединений ( $p<0.05$ ), † – статистически достоверные различия по отношению к данным для секоизоларицирезинол-4',4''-диацетата ( $p<0.05$ )

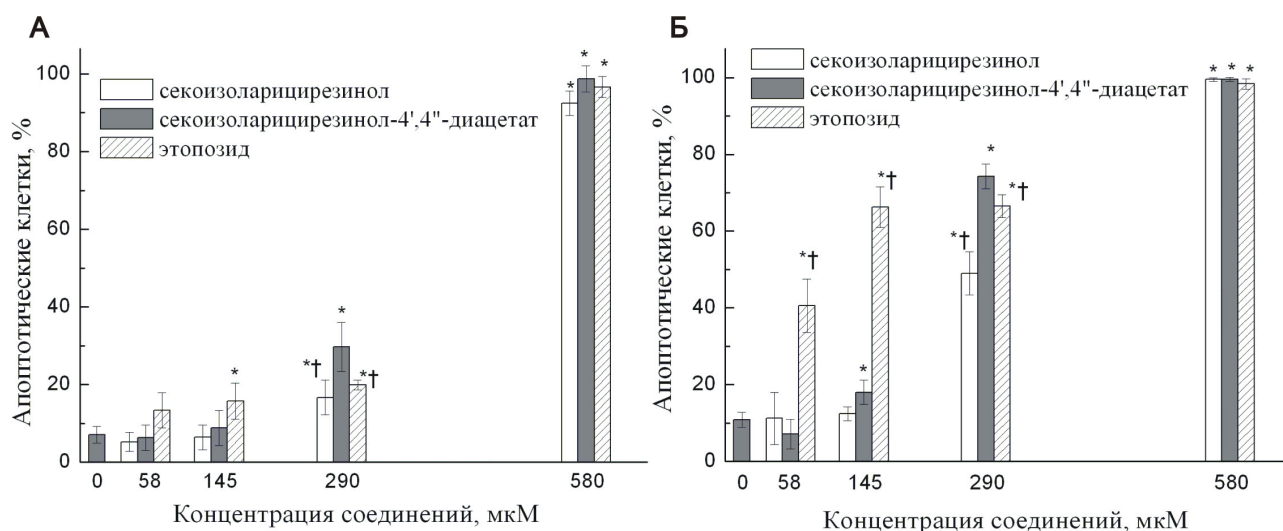
**Рисунок 10 – Зависимость цитотоксического действия СДГ, его производных и этопозида по отношению к клеточной линии Raji от концентрации соединений**



Для сравнения цитотоксической активности лигнанов между собой и стандартным цитостатиком по графикам определяли концентрации лигнанов, приводящие к гибели 50% клеток.

В результате было установлено, что секоизоларицирезинола диглюкозид не проявляет цитотоксического действия *in vitro* по отношению к клеточной линии Raji при концентрации менее 580 мкМ. Из рисунка 10 следует, что производные СДГ, не содержащие в своей структуре глюкозидной части, обладают значительным цитотоксическим действием *in vitro*. Цитотоксический эффект повышается в зависимости от ацетилирования фенольных гидроксильных агликона, действие секоизоларицирезинол-4',4''-диацетата ( $IC_{50} = 135.0 \pm 2.4$  мкМ) статистически различалось от эффекта секоизоларицирезинола ( $IC_{50} = 143.0 \pm 3.5$  мкМ) при уровне значимости  $p < 0.05$ .

Цитотоксическую активность по индукции апоптоза для производных СДГ и этопозида относительно той же клеточной линии Raji также оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Регистрацию количества апоптотических клеток производили путем сканирования лазером с длиной волны 448 нм после инкубации с соединениями в концентрациях 58, 145, 290, 580 мкМ в течение 24 ч и 48 ч. В результате строили диаграммы зависимости количества апоптотических клеток от концентрации соединений (рисунок 11).

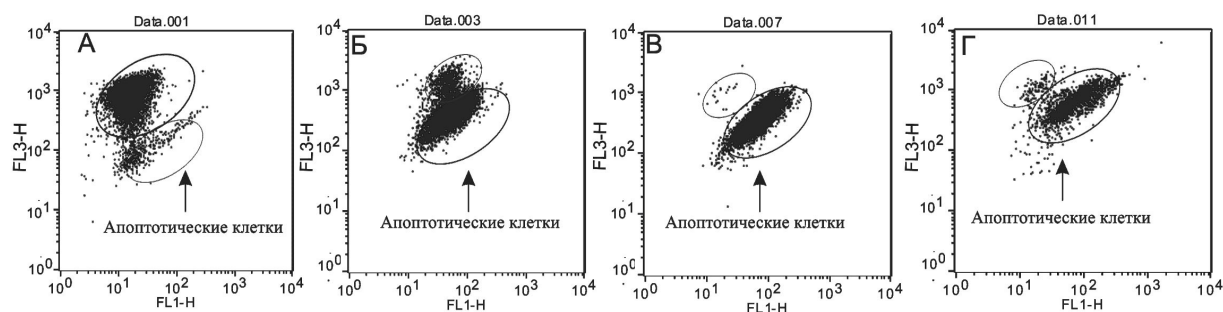


\* – статистически достоверные различия по отношению к данным для контроля без соединений ( $p < 0.05$ ), † – статистически достоверные различия по отношению к данным для секоизоларицирезинол-4',4''-диацетата ( $p < 0.05$ )

**Рисунок 11 – Диаграммы апоптоза клеток Raji после 24 ч (А) и 48 ч (Б) инкубации с производными СДГ и этопозидом**

Уровень индукции апоптоза определяли по морфологическим изменениям клеток (уменьшением их в размере, повышением их грануляции по

сравнению с контрольными клетками), а также снижению трансмембранного потенциала митохондрий (детектировался по уровню флуоресценции зонда CMXRos) (рисунок 12).



А – контрольные клетки. Б, В, Г – клетки после 24 ч инкубации с 580 мкМ секоизоларицирезинола, секоизоларицирезинол-4',4''-диацетата и этопозида соответственно

**Рисунок 12 – Цитограммы распределения клеток Raji по флуоресценции зонда CMXRos**

Из рисунков 11, 12 видно, что производные секоизоларицирезинол и секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат, как и этопозид, обуславливают апоптоз клеток. Для удобства сравнения степени индукции апоптоза соединениями полученные результаты были выражены в  $IC_{50}$  и представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Уровень индукции апоптоза опухолевых клеток Raji, вызаемый производными СДГ и этопозидом

Соединение	$IC_{50}$ , мкМ	
	24 ч	48 ч
Секоизоларицирезинол	415.9±3.5	294.4±2.4
Секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат	382.4±3.8	227.5±2.8
Этопозид	409.6±2.5	93.3±1.5

Из таблицы 4 видно, что уровень индукции апоптоза, вызванный секоизоларицирезинол-4',4''-диацетатом, выше уровня, вызванного секоизоларицирезинолом ( $p < 0.05$ ).

Таким образом, показано, что деглюкозилированные производные секоизоларицирезинол и секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат проявляют значительную цитотоксическую активность *in vitro* по сравнению с исходным лигнаном. Антипролиферативный эффект повышается в зависимости от ацетилирования фенольных гидроксильных агликона, в то время как антиоксидантная активность существенно снижается. Антиоксидантная

активность производного без углеводной части несколько выше, чем активность исходного СДГ, что объясняется дополнительным участием гидроксиллов бутандиольного фрагмента в связывании свободных радикалов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Разработан новый эффективный способ выделения диглюкозида секоизоларицирезинола из семян льна масличного, при котором проводят обезжиривание измельченного льняного семени, экстракцию 50% водным раствором этанола, совмещенную со щелочным гидролизом при воздействии микроволнового излучения мощностью 150 Вт в течение 2 минут шестикратно с перерывом в 1 минуту. При этом используются низкотоксичные растворители и обеспечивается снижение временных затрат, высокий выход экстрактивных веществ – 23.2% с высоким содержанием в них СДГ – 14.2 мг/г в расчете на обезжиренное сырье [1, 3, 11, 14, 15, 27].

2. Предложена методика идентификации СДГ на основе ТСХ при использовании элюирующей системы вода – пропанол-2 – 25% водный раствор аммиака (1:8:1), позволяющая быстро и качественно детектировать СДГ с  $R_f=0.24$  по его специфической бриллиантово-синей флуоресценции. Предложены оптимальные условия ВЭЖХ анализа (элюирующая система, состоящая из ацетонитрила и воды с 0.1% содержанием муравьиной кислоты), позволяющие с высокой степенью точности оценить количественно СДГ [1, 5, 17, 18].

3. Разработан новый способ очистки СДГ, включающий в себя предварительное двукратное разделение лигнансодержащего экстракта на ионообменном сорбенте Diaion HP-20 с использованием в качестве подвижной фазы 10–40% растворов этанола в воде, а на втором этапе очистки с применением обращенно-фазного сорбента силикагеля С18. При этом используются низкотоксичные растворители, обеспечивается удовлетворительный выход СДГ по отношению к экстракту (1.03%), увеличивается чистота полученного препарата (95.3%) [2, 4, 9, 10, 12, 13, 16, 27].

4. Осуществлен синтез ранее неизвестного секоизоларицирезинол-4',4''-диацетата путем селективного ацетилирования фенольных гидроксильных групп секоизоларицирезинола [6, 19, 21–23].

5. Определена антиоксидантная активность у СДГ и его производных, возрастающая при увеличении числа свободных спиртовых и фенольных гидроксиллов в агликоне. Впервые обнаружен антипролиферативный эффект дегликозилированных производных СДГ, повышающийся при ацетилировании фенольных гидроксиллов, обусловленный индукцией апоптоза опухолевых клеток [7, 8, 20, 22, 24–26].

## **Рекомендации к практическому использованию результатов**

Предложенный способ выделения СДГ, защищенный патентом Республики Беларусь, может быть использован для разработки биологически активных добавок с высоким содержанием лигнана. Полученные результаты послужат научно-методической базой для создания отечественных биологически активных добавок на основе лигнанов из семян льна.

Разработанная методика идентификации СДГ с помощью ТСХ может быть использована для проведения качественного экспресс-анализа фитопрепаратов на основе лигнанов с целью выявления фальсификатов.

Результаты исследования внедрены в лабораторный практикум по дисциплинам «Хроматография и электрофорез для контроля качества пищевой продукции» и «Хроматография и электрофорез для контроля качества промышленной продукции» для студентов специальности 1-54 01 03 «Физико-химические методы и приборы контроля качества продукции» Белорусского государственного технологического университета.

## **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

### **Статьи в научных журналах**

1. Стасевич, О.В. ВЭЖХ анализ лигнансодержащих экстрактов из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – № 6. – С. 903–909.

2. Выделение и очистка секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко, И.М. Жарский // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2008. – Т. 3, ч. 1. – С. 195–201.

3. Стасевич, О.В. Эффективный способ получения лигнансодержащего экстракта из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Вестн. БГУ. Сер. 2. – 2009. – № 2. – С. 26–29.

4. Стасевич, О.В. Выделение секоизоларицирезинола диглюкозида из лигнансодержащего экстракта *Linum usitatissimum* / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Химия природных соединений. – 2009. – № 1. – С. 21–23.

5. Стасевич, О.В. Выбор оптимальных условий разделения лигнансодержащего экстракта из семян льна масличного в тонком слое сорбента / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – Т. 43, № 7. – С. 41–43.

6. Стасевич, О.В. Получение и химическое модифицирование лигнана секоизоларицирезинола диглюкозида / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 2009. – № 3. – С. 84–87.

7. Стасевич, О.В. Антиоксидантные свойства секоизоларицирезинола диглюкозида и его производных / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Труды Белорусского государственного университета. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – Т. 4, ч. 1. – С. 154–160.

8. Стасевич, О.В. Генопротекторная активность секоизоларицирезинола диглюкозида из семян *Linum usitatissimum* / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Приложение к журналу Весці НАН Беларусі Сер. біял. навук – 2009. – С. 246–249.

#### **Статьи в сборниках научных трудов**

9. Стасевич, О.В. Применение гель-хроматографии для получения обогащенных фракций лигнана диглюкозида секоизоларицирезинола / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок // Труды БГТУ. Сер. IV. Химия и технология орган. в-в. – 2008. – Вып. XV. – С. 34–37.

#### **Тезисы докладов в материалах конференций и съездов научных сообществ**

10. Стасевич, О.В. Получение обогащенных фракций лигнана секоизоларицирезинола диглюкозида на гидроксипропилированном декстрановом геле / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Тезисы докладов и стендовых сообщений XX зимней международной молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 11–15 февраля 2008 г. – Москва, 2008. – С. 103.

11. Стасевич, О.В. Эффективность получения лигнанообогащенной фракции с использованием нетоксичных растворителей / О.В. Стасевич, В.Б. Климашевич, С.Г. Михаленок // Сборник материалов международной студенческой конференции «Научный потенциал студенчества – будущему России», Ставрополь, 18–19 апреля 2008 г. – Ставрополь, 2008. – С. 71.

12. Стасевич, О.В. Выделение антиоксиданта диглюкозида секоизоларицирезинола из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Сборник материалов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 11–15 мая 2008 г. – Новосибирск, 2008. – С. 404.

13. Стасевич, О.В. Фитоэстроген диглюкозид секоизоларицирезинола и его выделение из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок // Сборник научных трудов III Международной научной конференции

«Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений», Минск, 14–16 мая 2008 г. – Минск, 2008. – С. 508–511.

14. Стасевич, О.В. Использование микроволновой энергии для повышения эффективности экстракции лигнанового компонента из семян льна масличного / О.В. Стасевич, В.Б. Климашевич // Материалы IX всероссийской научно-практической конференции студентов и аспирантов «Химия и химическая технология в XXI веке», Томск, 14–16 мая 2008 г. – Томск, 2008. – С. 130.

15. Стасевич, О.В. Экстракционный способ выделения лигнансодержащих композиций из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок // Тезисы докладов V Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ», Уфа, 8–12 июня 2008 г. – Уфа, 2008. – С. 263.

16. Стасевич, О.В. Биологически активный лигнан диглюкозид секоизоларицирезинола и его выделение из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок // Материалы международной научно-практической конференции «Биологически активные соединения природного происхождения: фитотерапия, фармацевтический маркетинг, фармацевтическая технология, фармакология, ботаника», Белгород, 30 июня–3 июля 2008 г. – Белгород, 2008. – С. 25–28.

17. Стасевич, О.В. Анализ лигнанообогащенных фракций после проведения колоночной хроматографии на различных сорбентах / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок // Тезисы докладов VIII Украинской конференции по аналитической химии, Одесса, 8–12 сентября 2008 г. – Одесса, 2008. – С. 201.

18. Стасевич, О.В. Обращенно-фазная ВЭЖХ в анализе лигнансодержащих экстрактов, полученных из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок, В.П. Курченко // Тезисы докладов VIII Украинской конференции по аналитической химии, Одесса, 8–12 сентября 2008 г. – Одесса, 2008. – С. 143.

19. Стасевич, О.В. Получение лигнана секоизоларицирезинола и его диглюкозида из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок // Материалы III Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул», Минск, 1–3 октября 2008 г. – Минск, 2008. – С. 245.

20. Стасевич, О.В. ДНК-протекторное действие секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного в модельной системе окисления бензидина с участием пероксидазы хрена / О.В. Стасевич, В.П. Курченко, С.Г. Михаленок // Сборник тезисов 12-ой Пущинской международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 10–14 ноября 2008 г. – Пущино, 2008. – С. 107.

21. Стасевич, О.В. Получение диглюкозида секоизоларицирезинола и его агликона из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок // Материалы XI молодежной конференции по органической химии, Екатеринбург, 23–29 ноября 2008 г. – Екатеринбург, 2008.– С. 518–520.

22. Stasevich, O.V. Secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed and its chemical modification / O.V. Stasevich, S.G. Mikhalyonok // Proceedings of International young chemists' conference «Baltchem-2009», Warsaw, 2–5 April, 2009. – Warsaw, 2009. – P. 29.

23. Стасевич, О.В. Выделение и химическое превращение природного лигнана из семян льна масличного / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок // Материалы докладов XVI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, 14–18 апреля 2009 г. [Электронный ресурс] - 2009. - Режим доступа: [http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov\\_2009/28\\_9.pdf](http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2009/28_9.pdf). – Дата доступа : 01.04.2010.

24. Стасевич, О.В. Антиоксидантная активность природного лигнана и его модифицированных производных / О.В. Стасевич, В.П. Курченко, С.Г. Михаленок // Материалы международного VII симпозиума по фенольным соединениям, Москва, 19–23 октября 2009 г. – Москва, 2009. – С. 249–250.

25. Стасевич, О.В. Биологическая активность лигнана секоизоларицирезинола диглюкозида и его производных / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок // Тезисы докладов и стендовых сообщений XXII зимней международной молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 8–11 февраля 2010 г. – Москва, 2010. – С. 64.

26. Стасевич, О.В. Цитотоксическое действие производных секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного / О.В. Стасевич // Материалы докладов XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, 12–16 апреля 2010 г. [Электронный ресурс] - 2010. - Режим доступа: [http://lomonosov-msu.ru/uploaded/200/33\\_749\\_3177.pdf](http://lomonosov-msu.ru/uploaded/200/33_749_3177.pdf). – Дата доступа : 01.04.2010.

### **Патент**

27. Способ выделения диглюкозида секоизоларицирезинола из семян льна масличного : пат. 12697 Респ. Беларусь, МПК С 07 Н 1/00 / О.В. Стасевич, С.Г. Михаленок; заявитель УО «Белорусский государственный технологический университет». – № а 20080739 ; заявл. 05.06.08 ; опубл. 30.12.09 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2009. – № 6. – С. 91.

## РЭЗІЮМЭ

Стасевіч Вольга Віктараўна

Атрыманне і біялагічная актыўнасць лігнана секаізаларыцырэзінола дыглюказіда і яго вытворных

Ключавыя словы: лігнаны, лён алейны, секаізаларыцырэзінола дыглюказід (СДГ), антыаксідантная актыўнасць, цытатаксічнасць.

Мэта даследвання: распрацаваць эфектыўны спосаб атрымання секаізаларыцырэзінола дыглюказіда і яго вытворных для структурна-функцыянальнага аналізу.

Метады даследвання: метады селектыўнай экстракцыі, розныя віды храматаграфіі, электрафарэз, мас-спектраметрыя, ядзерны магнітны рэзананс, аптычная спектраскапія.

Распрацаваны эфектыўны спосаб вылучэння прыроднага лігнана секаізаларыцырэзінола дыглюказіда з насення льну алейнага і прапанаваны спосаб ачысткі СДГ з лігнанзмяшчальнага экстракту. На аснове ВЭВХ і ТСХ распрацаваны метады экспрэс-дэтэкцыі лігнана СДГ у даследуемых прыкладах. Здзейснены сінтэз вытворных СДГ і праведзена параўнальнае даследванне антыаксідантнай і цытатаксічнай актыўнасцей атрыманых злучэнняў ва ўзаемасувязі з іх структурай у розных мадэльных сістэмах.

Паказана, што секаізаларыцырэзінол і секаізаларыцырэзінол-4',4''-дыацэтат, якія не змяшчаюць у сваёй структуры глюказіднай часткі, праяўляюць значную цытатаксічную актыўнасць *in vitro* у параўнанні з зыходным лігнанам.

Антыпраліфератыўны эфект павялічваецца ў залежнасці ад ацэтыліравання фенольных гідраксілаў аглікона, у той час як антыаксідантная актыўнасць значна змяншаецца. Антыаксідантная актыўнасць вытворнага без вугляводнай часткі некалькі вышэй зыходнага СДГ, што тлумачыцца дадатковым удзелам гідраксілаў бутандыёльнага фрагменту ў звязванні свабодных радыкалаў.

Прапанаваны спосаб вылучэння СДГ можа быць выкарыстаны для атрымання біялагічна актыўных дабавак з высокім утрыманнем лігнана. Распрацаваная метадыка ідэнтыфікацыі СДГ з дапамогай ТСХ можа быць выкарыстана для правядзення якаснага экспрэс-аналізу фітапрэпаратаў на аснове лігнанаў з мэтай выяўлення фальсіфікатаў.

Вобласць выкарыстання: хімія прыродных рэчываў, біяарганічная хімія, біяхімія, біятэхналогія, фармакалогія.



## РЕЗЮМЕ

Стасевич Ольга Викторовна

Получение и биологическая активность лигнана секоизоларицирезинола диглюкозида и его производных

Ключевые слова: лигнаны, лен масличный, секоизоларицирезинола диглюкозид (СДГ), антиоксидантная активность, цитотоксичность.

Цель работы: разработать эффективный способ получения секоизоларицирезинола диглюкозида и его производных для структурно-функционального анализа.

Методы исследования: методы селективной экстракции, различные виды хроматографии, электрофорез, масс-спектрометрия, ядерный магнитный резонанс, оптическая спектроскопия.

Разработан новый эффективный способ выделения природного лигнана секоизоларицирезинола диглюкозида из семян льна масличного и предложен способ очистки СДГ из лигнансодержащего экстракта. На основе ВЭЖХ и ТСХ разработан метод экспресс-детекции лигнана СДГ в исследуемых образцах. Осуществлен синтез производных СДГ и проведено сравнительное исследование антиоксидантной и цитотоксической активностей полученных соединений во взаимосвязи с их структурой в различных модельных системах. Показано, что секоизоларицирезинол и секоизоларицирезинол-4',4''-диацетат, не содержащие в своей структуре глюкозидной части, проявляют значительную цитотоксическую активность *in vitro* по сравнению с исходным лигнаном. Антипролиферативный эффект повышается в зависимости от ацетилирования фенольных гидроксиллов агликона, в то время как антиоксидантная активность значительно падает. Антиоксидантная активность производного без углеводной части несколько выше исходного СДГ, что объясняется дополнительным участием гидроксиллов бутандиольного фрагмента в связывании свободных радикалов.

Предложенный способ выделения СДГ может быть использован для получения биологически активных добавок с высоким содержанием лигнана. Разработанная методика идентификации СДГ с помощью ТСХ может быть реализована при проведении качественного экспресс-анализа фитопрепаратов на основе лигнанов с целью выявления фальсификатов.

Область применения: химия природных соединений, биоорганическая химия, биохимия, биотехнология, фармакология.

## SUMMARY

Stasevich Olga Victorovna

Receiving and biological activity of lignan secoisolariciresinol diglucoside and its derivatives

Keywords: lignans, flaxseed, secoisolariciresinol diglucoside (SDG), antioxidant activity, cytotoxicity.

Aim of study: to work out the effective mode of receiving of secoisolariciresinol diglucoside and its derivatives for structure-functional analysis.

Methods: selective extraction, different kinds of chromatography, electrophoresis, mass-spectrometry, nuclear magnetic resonance, optical spectroscopy.

The effective new mode of isolation of natural lignan secoisolariciresinol diglucoside from flaxseed and purification mode of SDG from lignan-containing extract was worked out. Using HPLC and TLC it has been worked out the method of express-detection of SDG in different samples. Synthesis of the derivatives of SDG has been carried out. The study of antioxidant and cytotoxic activities of received compounds against their structure has been held using different model systems.

It has been found out that the structures without glycoside moieties (secoisolariciresinol and secoisolariciresinol-4',4''-diacetate) display significant cytotoxic activity *in vitro* compared to initial lignan. Antiproliferative effect increased depending on the presence of acetyl groups at phenolic hydroxyls of aglicon, whereas antioxidant activity decreased. Antioxidant activity of the derivative without carbohydrate moiety was higher than the activity of initial SDG, this fact can be explained by the additional contribution of primary alcoholic groups in radical scavenging activity.

The performed mode of isolation of SDG can be used for receiving of biological active additions with high content of the lignan. The developed method of identification of SDG using TLC can be used for realization of qualitative express-detection of phytopreparations based on lignans with the aim of showing up of falsifications.

The area of application: chemistry of natural compounds, bioorganic chemistry, biochemistry, biotechnology, pharmacology.