

УДК 619:615

ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТА VIDENS TRIPARTITA ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ ПРАКТИКИ

А.А. Галаджиева – к. б. н., Д.Г. Дерябин – д. м. н., проф., Г.К. Дускаев – д.б.н.,
ФГБНУ ФНЦ ВСТ РАН

Ключевые слова: экстр акт , *Bidens tripartita*, анти-QS активность, ветеринарная медицина. **Key words:** extract, *Bidens tripartita*, anti-QS activity, veterinary medicine.



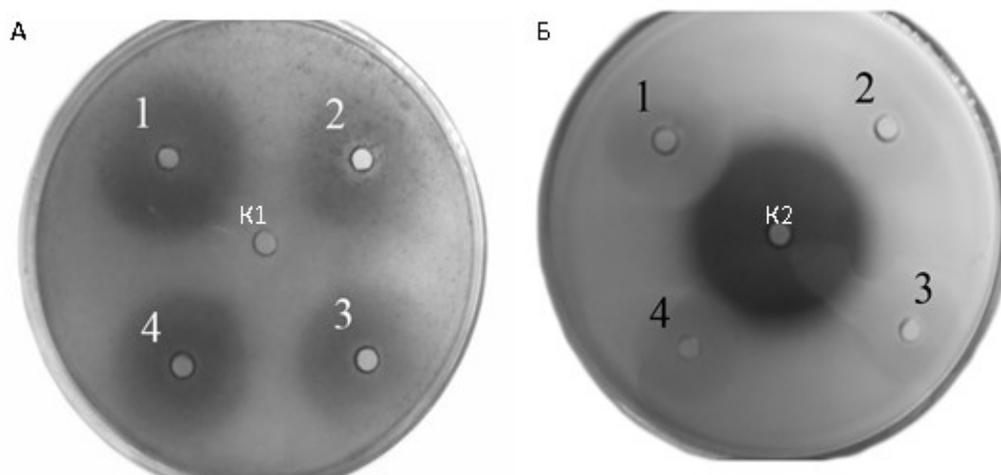
РЕФЕРАТ

Известно, что экстракт травы череды (*Bidens tripartita*) обладает противовоспалительным и ранозаживляющим свойствами и используется для лечения болезней животных. Традиционное применение данного лекарственного растения может быть связано с его уникальными особенностями влиять на процессы Quorum Sensing (QS) бактериальных сообществ. Целью данного исследования было комплексное изучение химического профиля и биологических свойств экстрактов, полученных из *B. tripartite* для дальнейшего практического использования в ветеринарии. Исследование анти-QS активности в тестах ингибирования биосинтеза виолацеина проводилось методом диффузии в агар, анализ компонентного состава травы череды проводился методом хромато-масс-спектрометрии. Исследование анти-QS активности в тестах ингибирования биосинтеза виолацеина, подтвердил увеличение пигментообразования для дикого штамма *S. violaceum* и стимуляцию пигментообразования *S. violaceum* CV026 без добавления С6-АГЛ. Существенной разницы в размерах и качестве зон пигментообразования выявлено не было, во всех случаях наблюдались идентичные результаты. Анализируя результаты хромато-масс-спектрометрии активных веществ экстракта травы череды установлено, что большую их часть составляют остатки сложных сахаров, которые частично разложились в результате приготовления экстракта и воздействия метанола, а также производные нуклеиновых кислот. Изучены особенности химического строения и известные данные о вариантах биологической активности выявленных химических соединений, что поможет определить их функционирование в качестве возможных ингибиторов или активаторов системы QS, были составлены библиотеки соединений с предполагаемыми влияющими на систему QS свойствами. Трава череды обладает уникальной особенностью влиять на систему Quorum sensing бактериальных сообществ ввиду выявления эффекта стимуляции кворум-зависимого пигментообразования, в то же время необходимо дальнейшее изучение биологической активности выявленных химических соединений с целью использования в ветеринарии.

ВВЕДЕНИЕ

Из медицинских и ветеринарных справочников известно, что настой травы череды (*Bidens tripartita*) обладает противовоспалительным и ранозаживляющим свойствами и используется в качестве мочегонного и потогонного средства; применяется для лечения болезней печени, бронхита, при расстройстве желудка,

простуде. Недавние исследования биохимических свойств данного растения подтверждают это, в том числе в части наличия биологически активных веществ, вероятно способствующих проявлению данных эффектов [1,2]. Традиционное применение данного лекарственного растения может быть связано с его уникальными особенностями влиять на процессы Quor-



1- серия 1; 2 –серия 2; 3 – серия 3; 4 – серия 4; К1 – вода, К2 – С6-АГЛ.

Рисунок 1 – Пример тестирования экстрактов травы череды разных марок в тесте индукции пигмента виолацеина *C. violaceum* ATCC 31532 (А) и *C. violaceum* CV026 без добавлением С₆-АГЛ (Б)

um Sensing (QS) бактериальных сообществ. Целью данного исследования было комплексное изучение химического профиля и биологических свойств экстрактов, полученных из *V. Tripartita* для дальнейшего практического использования и разработки препаратов для ветеринарии. Предполагается, что результаты настоящего исследования сделают вклад в выявление целебных свойств *V. Tripartita* интересных для ветеринарной практики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые фитоэкстракты готовили на основе сухого растительного сырья, экстрагированного водой (6 г каждого образца к 50 мл стерильной дистиллированной воды, кипячение на водяной бане в течение 15 мин, охлаждение при комнатной температуре в течение 45 мин, фильтрование, высушивание при +60 °С и хранение при +4 °С).

Исследование анти-QS активности в тестах ингибирования биосинтеза виолацеина проводилось методом диффузии в агар с использованием штамма *Chromobacterium violaceum* (*C. Violaceum*) ATCC 31532. Антибактериальный эффект регистрировали по формированию прозрач-

ных зон с полным отсутствием роста культуры, а анти-QS эффект – по бесцветным (без пигмента виолацеина), но жизнеспособным ореолам вокруг лунок.

Анализ компонентного состава травы череды проводился методом хромато-масс-спектрометрии (ХМС) с использованием аналитической колонки HP-5MS хроматографа, снабженного масс-селективным детектором GQCMS 2010 Plus с чувствительностью 10-6-10-9 г (Shimadzu, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее [3] было установлено, что многие фитоэкстракты стимулировали продукцию виолацеина диким типом *C. violaceum* ATCC 31532. Были приготовлены и протестированы экстракты трёх трав череды. Эксперимент, проведенный в тех же условиях, что и предыдущий, подтвердил увеличение пигментообразования для дикого штамма *C. violaceum* ATCC 31532 (А) и стимуляцию пигментообразования *C. violaceum* CV026 без добавления С₆-АГЛ (Б), контролем для последнего служил раствор АГЛ (рис. 1).

Существенной разницы в размерах и качестве зон пигментообразования выяв-

Таблица 1

Малые молекулы, идентифицированные в составе экстракта травы череды
(*Bidens tripartita*)

№	Время удержания	Площадь пика в %	Высота пика	Название компонента по IUPAC (тривиальное название)
1	4,264	4,68	704255	2,3 –дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пуран-4-он
2	4,608	1,21	38714	1,2-бензинтриол
3	4,850	0,67	55404	2,3 – дигидро-бензофуран
4	5,945	0,81	19353	1,3,3-Trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane
5	6,313	1,88	199008	дигидрофуран-2(3H)-он, оксолан-2-он
6	7,201	1,80	95409	5,5-Dimethyl-1,5-oxasilonan-9-one
7	7,529	4,26	179528	3-Deoxy-d-mannonic lactone
8	7,743	11,90	595762	т(3R,4S,5R)-3,4,5-Тригидроксициклогекс-1-ен-1-карбоновая кислота (шикимовая)
9	8,570	5,24	96312	2-(propan-2-yloxy)phenyl 5-bromopentanoate (5-bromopentanoic acid, 2-isopropoxyphenyl ester)
10	11,058	0,48	46484	[3,4,5-тригидрокси-6- (гидроксиметил) оксан-2-ил] бензоат

лено не было, эксперимент проводился в трех повторностях, во всех случаях наблюдались идентичные результаты с небольшими колебаниями в размерах зон.

Анализируя результаты хромато-масс-спектрометрии активных веществ экстракта травы череды установлено, что большую их часть составляют остатки сложных сахаров, которые частично разложились в результате приготовления экстракта и воздействия метанола ([3,4,5-тригидрокси-6- (гидроксиметил) оксан-2-ил] бензоат, аллогексоза и др), а также производные нуклеиновых кислот (1-метилюридин, гуанозин, инозитол и др.).

Учитывая физико-химические характеристики, позволяющие предполагать наличие биологических свойств у этих веществ; время удерживания на колонке экстракта травы череды и относительное содержание веществ в анализируемом экстракте, оцениваемое по площади пика на хроматограмме были составлены библио-

ографии соединений с предполагаемыми влияющими на систему QS свойствами (табл.1).

Данные малые молекулы планируется в последующем использовать для оценки антибактериальной (МИК) и анти-QS (EC50) активности, разработки ветеринарных препаратов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рассуждая о причине выявленных эффектов индукции пигмента виолацеина растительными экстрактами на Quorum sensing систему *S. violaceum*, предполагаем что, во-первых, частично он может быть обусловлен присутствием в экстрактах Quorum sensing сигнальных молекул, в том числе первого типа (АГЛ – ацилированный гомосерин лактон), продуцируемых аборигенными микроорганизмами, обитающими в растениях как в виде свободно живущих форм, так и в составе биопленочных сообществ, а также в органах растений (*Rhizobium*) [4]. А во-вторых, эффект стимулирования пиг-

ментации *C. violaceum* ATCC 31532 может быть связан с неспецифическим действием трофических факторов (углеводов, нуклеиновых кислот и пр.), содержащихся в растительных экстрактах и способствующих более быстрому достижению критической плотности бактериальной биомассы. К тому же, первое не исключает второе: так усиление образования виолацеина экстрактами череды можно было бы объяснить синергическим эффектом содержащихся в нем АГЛ бактериального происхождения и присутствием в экстракте дополнительных питательных компонентов, при этом более быстро диффундирующая в агаре низкомолекулярная фракция, дающая ореол, могла бы содержать присутствующий в экстракте АГЛ.

Помимо выдвинутого предположения об участии в процессе активации Quorum sensing системы трофическими субстратами и гипотезы о присутствии в составе растительных экстрактов АГЛ бактериального происхождения, еще одна возможность определяется существованием АГЛ-подобных молекул растительного происхождения, вовлеченных в «молекулярный диалог» между растениями и бактериальными симбионтами, сведения о которых появляются в современной научной литературе [5]. Из литературных источников [6] известно, что из череды разными методами хроматографии выделены флавоноиды и кумарины. В нашем случае они не идентифицированы, вероятно, это связано с особенностями используемых растворителей или незначительном количестве. В то же время известно, что такое вещество как Цинеол, являющийся моноциклическим терпеном, проявляет кворум ингибирующие свойства в составе веществ эфирных масел пищевых и лекарственных растений [7,8]. В свою очередь шикимовая кислота обладает антибактериальными свойствами [9]. Перспективность исследований подтверждается положительными результатами при использовании растений данного семейства на кокцидиоз и эймериоз птицы. Отмечено благотворное влияние на пока-

затели роста и простейшую инфекцию у кур, возможно, посредством модуляции кишечных бактерий [10], снижение заболеваемости / смертности, уменьшение ооцист на грамм фекалий, кишечной патологии и увеличение антикокцидного индекса [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Трава череды обладает уникальной особенностью влиять на систему Quorum sensing бактериальных сообществ ввиду выявления эффекта стимуляции кворум-зависимого пигментобразования. Необходимо дальнейшее изучение биологической активности выявленных химических соединений с целью использования в ветеринарной практике.

Исследование проведено по проекту №0761-2018-0003

RESEARCH OF NEW PROPERTIES OF *BIDENS TRIPARTITA* EXTRACT FOR VETERINARY PRACTICE.

Galadzhieva A. A., researcher of the animal feeding department, Deryabin D. G., researcher of the animal feeding department, Duskaev G. K., head of of the animal feeding department, Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Russia

ABSTRACT

It is known that bur-marigold extract (*Bidens tripartita*) has anti-inflammatory and wound-healing properties and is used to treat diseases animals. The traditional use of this medicinal plant may be due to its unique characteristics to influence the processes of Quorum Sensing (QS) of bacterial communities. The purpose of this study was a comprehensive study of the chemical profile and biological properties of extracts obtained from *B. tripartita*, for further practical use in veterinary medicine. The study of anti-QS activity in in biosynthesisinhibition tests of violacein was carried out by agar diffusion method, chromatography–mass spectrometry was used to analyze the component composition of the herb. The study of anti-QS activity in biosynthesis inhibition tests of violacein confirmed the increase in pigmentation of the wild *C. violaceum* strain and the stimulation of the pigmentation of *C. violaceum*

CV026 without the addition of C6-AHL. There was no significant difference in the size and quality of pigmentation, identical results were observed in all cases. Analyzing the results of chromatography–mass spectrometry of active substances of the herb extract, it has been established that most of them are residues of complex sugars, which partially decompose as a result of the preparation of extract and the effect of methanol and nucleic acid derivatives. The chemical structure and known data on biological activity of the identified chemical compounds have been studied; it will help to determine their functioning as possible inhibitors or activators of the QS system. The bur-marigold has a unique feature to influence the Quorum sensing system of bacterial communities due to the effect of quorum-dependent pigmentation stimulation, while further study of biological activity of the identified chemical compounds is necessary.

ЛИТЕРАТУРА

1. Uysal S., Ugurlu A., Zengin G., Baloglu M.C., Altunoglu Y.C., Mollica A., Custodio L., Neng N.R., Nogueira J.M.F., Mahomoodally M.F. Novel in vitro and in silico insights of the multi-biological activities and chemical composition of *Bidens tripartita* L. *Food Chem Toxicol.* 2018 Jan;111:525-536. doi: 10.1016/j.fct.2017.11.058.
2. Orhan N., Gökçen Ü., Levent İ. Altun, and M. Aslan. Anti-hyperglycaemic and antioxidant effects of *Bidens tripartita* and quantitative analysis on its active principles. *Iran J Basic Med Sci.* 2016 Oct; 19 (10): 1114–1124.
3. Deryabin D.G., Tolmacheva A.A., Antibacterial and anti-quorum sensing molecular composition derived from *Quercus cortex* (Oak bark) extract. // *Molecules.* – 2015. – №.9 (20). – P. 17093-17108
4. Schikora A., Schenk S.T., Hartmann A. Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the N-acyl homoserine lactone group. *Plant Mol Biol* (2016) 90: 605. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0457-8>
5. Patel H.K., Suarez-Moreno Z.R., Degrassi G., Subramoni S., Gonzalez J.F., Venturi V. Bacterial LuxR solos have evolved to respond to different molecules including signals from plants. *Front Plant Sci* – 2013. – V. 4. – P. 447.
6. Лесиовская Е.Е., Пастушенков Л.В. «Фармакотерапия с основами фитотерапии»: Учебное пособие. - 2-е изд. -М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. - 592 с.
7. Abdullah, Asghar A., Butt M.S., Shahid M., Huang Q. Evaluating the antimicrobial potential of green cardamom essential oil focusing on quorum sensing inhibition of *Chromobacterium violaceum*. *J Food Sci Technol.* 2017 Jul;54(8):2306-2315. doi: 10.1007/s13197-017-2668-7.
8. Sharifi A, Ahmadi A, Mohammadzadeh A. *Streptococcus pneumoniae* quorum sensing and biofilm formation are affected by *Thymus daenensis*, *Satureja hortensis*, and *Origanum vulgare* essential oils. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2018 Feb 23:1-15. doi: 10.1556/030.65.2018.013.
9. Bai J., Wu Y., Liu X., Zhong K., Huang Y., Gao H. Antibacterial Activity of Shikimic Acid from Pine Needles of *Cedrus deodara* against *Staphylococcus aureus* through Damage to Cell Membrane. *Int J Mol Sci.* 2015 Nov; 16(11): 27145–27155. doi: 10.3390/ijms161126015.
10. Cicero L. T. Chang, Chih-Yao Chung, Chih-Horng Kuo, Tien-Fen Kuo, Chu-Wen Yang, and Wen-Chin Yang. Beneficial Effect of *Bidens pilosa* on Body Weight Gain, Food Conversion Ratio, Gut Bacteria and Coccidiosis in Chickens. *PLoS One.* 2016; 11(1): e0146141. doi: 10.1371/journal.pone.0146141
11. Chang C.L., Yang C.Y., Muthamilselvan T, Yang W.C. Field trial of medicinal plant, *Bidens pilosa*, against eimeriosis in broilers. *Sci Rep.* 2016 Apr 21;6:24692. doi: 10.1038/srep24692.