

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
“ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ”**

УДК 547.92.057

**Антончик Андрей Петрович**

**Синтез дейтерированных 24 $\alpha$ -метилбрасиностероидов.  
Исследование биосинтеза брасинолида**

02.00.10 – Биоорганическая химия

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

МИНСК 2005

Работа выполнена в Лаборатории химии стероидов  
ГНУ “Институт биоорганической химии” НАН Беларуси, г. Минск  
и в Лаборатории ЯМР/Биосинтез  
Институт химической экологии имени М. Планка, г. Йена

Научные руководители: член-корреспондент НАН Беларуси,  
доктор химических наук, профессор  
**ХРИПАЧ Владимир Александрович**  
ГНУ “Институт биоорганической химии”  
НАН Беларуси, Лаборатория химии стероидов

доктор **ШНАЙДЕР Бернд**  
Институт химической экологии имени М. Планка

Официальные оппоненты: член-корреспондент НАН Беларуси,  
доктор химических наук  
**ПОТКИН Владимир Иванович**  
ГНУ “Институт физико-органической химии”  
НАН Беларуси

доктор химических наук,  
**КИСЕЛЬ Михаил Александрович**  
ГНУ “Институт биоорганической химии”  
НАН Беларуси, Лаборатория химии липидов

Оппонирующая организация: ГНУ “Институт химии новых материалов”  
НАН Беларуси

Защита диссертации состоится 15 марта 2005 г. в 10:00 часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.21.01 при Институте биоорганической химии НАН Беларуси по адресу: 220141, Минск, ул. академика В.Ф.Купревича, 5/2 в зале заседаний Ученого Совета. Телефон Ученого секретаря Совета 263-72-73.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке институте биоорганической химии НАН Беларуси.

Автореферат разослан “ \_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 2005 г.

Ученый секретарь Совета  
по защите диссертаций Д 01.21.01,  
доктор медицинских наук, профессор

Н.В.Пивень

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы диссертации.** С открытием стероидных гормонов растений начался новый этап развития химии стероидов. Исследования brassinosterоидов приобретают большое значение ввиду перспективности соединений данного класса. Препараты, действующими веществами которых являются природные brassinosterоиды и их аналоги, находят все более широкое применение в сельском хозяйстве. Например, препарат ЭПИН, разработанный в Лаборатории химии стероидов Института биоорганической химии НАН Беларуси, является препаратом нового поколения, предназначенным для повышения урожайности и качества сельскохозяйственной продукции и повышения устойчивости культур к неблагоприятным факторам внешней среды. Действующим веществом препарата является фитогормон 24-эпибрасинолид. В течение короткого времени ЭПИН получил применение на многих сельскохозяйственных культурах и в настоящее время широко известен в странах СНГ. Отличительной особенностью препарата являются то, что благодаря низким нормам расхода действующего вещества (5-50 мг/га) потребность в нем будет составлять при самом широком применении в масштабе РБ лишь десятки килограммов, в отличие от многотоннажного потребления традиционных средств защиты и повышения урожайности растений. Следующим этапом развития данного направления является использование брасинолида, наиболее биологически активного brassinosterоида, в качестве действующего вещества.

Однако определенным недостатком brassinosterоидов является их сравнительно короткий срок действия - растения имеют достаточно эффективный механизм дезактивации экзогенных гормонов. Поэтому изучение особенностей биотрансформаций brassinosterоидов у важнейших сельскохозяйственных культур имеет принципиальное значение для повышения эффективности применения brassinosterоидов в сельском хозяйстве. Кроме того, данные о биосинтетических превращениях brassinosterоидов могут быть использованы для создания препаратов с желаемым спектром действия.

**Связь работы с крупными научными программами, темами.** Работа является частью плановых исследований Лаборатории химии стероидов ИБОХ НАН Беларуси, выполненных в соответствии с заданиями Государственных программ фундаментальных исследований “Биооргсинтез” по теме “Разработка методов синтеза и структурной модификации природных стероидов, их аналогов и других биоактивных веществ с целью получения новых соединений с комплексом ценных свойств для сельского хозяйства и медицины” (1996-2000) и “Биооргсинтез-2” по теме “Разработка рациональных подходов к целенаправленному синтезу стероидов и родственных биорегуляторов с целью получения новых эффективных препаратов для сельского хозяйства и медицины” (2001-2005), Государственной программы прикладных научных исследований “Биоанализ и диагностика” по теме “Разработать высокочувствительную систему иммуно-ферментного анализа фитогормонов” (2003-

2005), научных грантов Фонда фундаментальных исследований Республики Беларусь по теме “С-Функционализация природных brassinosterоидов: подход к синтезу новых типов биоактивных соединений, гаптенoв и конъюгатов” (1998-2000), “Синтез и биосинтез brassinosterоидов” (2002-2004), и проекта ИНТАС “Total and semi synthesis of bioactive terpenoids and steroids” (1996-2000).

**Цель и задачи исследования.** Задачей настоящей работы являлась разработка масштабируемых методов получения труднодоступных природных brassinosterоидов и их биопредшественников на основе доступного стероидного сырья; разработка методов синтеза новых изотопномеченных brassinosterоидов; разработка методов выделения и анализа brassinosterоидсoдержащих фракций растительного материала; исследование биотрансформаций brassinosterоидов в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*.

**Объект и предмет исследования.** Объектами химической части настоящего исследования являлись brassinosterоиды и их биосинтетические предшественники, а также их дейтерированные аналоги, для которых характерен C-28 скелет, содержащий 24 $\alpha$ -метильную группу. Предметом изучения являлась разработка методов синтеза указанных соединений. Объектом для изучения биосинтеза brassinosterоидов являлись растения: *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*. Разработка методов выделения и анализа brassinosterоидсoдержащих фракций растительного материала являлась предметом исследования.

**Гипотеза.** Различие в brassinosterоидном составе различных видов и даже сортов растений и в их физиологической реакции на экзогенные brassinosterоиды указывает на существование структурной видоспецифичности биорегуляторного действия brassinosterоидов, для понимания сущности которого необходимо знание особенностей биосинтеза brassinosterоидов у различных растительных видов.

**Методология и методы проведенного исследования.** Методологическую основу исследования составляла совокупность методов современной органической химии и физико-химических методов анализа. При исследовании биосинтеза brassinosterоидов были использованы стандартные и оригинальные методы выращивания и обработки растительных культур, экстракционного и хроматографического выделения brassinosterоидсoдержащих фракций растительного материала и их последующего анализа.

#### **Научная новизна полученных результатов:**

- Разработаны новые методы синтеза стероидных C<sup>22</sup>-альдегидов с использованием в качестве исходных соединений производных 23,24-биснорхоленовой кислоты, что позволило получить ключевые продукты химического синтеза brassinолита и его аналогов без применения малотехнологичной стадии озонлиза  $\Delta^{22}$ -стероидов.
- Осуществлен синтез 15 дейтерированных аналогов brassinosterоидов. Отличительной особенностью метода является построение боковой цепи путем конденсации низкомолекулярного фрагмента, содержащего шесть атомов

дейтерия и сформированный асимметрический атом углерода, с должным образом функционализированными C<sup>22</sup>-альдегидами.

- Разработан новый эффективный метод выделения brassиностероидсодержащей фракции растительного материала и новый эффективный метод (ВЭЖХ-МС) анализа brassиностероидов, который на два порядка чувствительнее любого из известных ранее методов анализа.
- Впервые изучен биосинтез 3-эпибрассинолида и исследована обратимая конверсия между 3 $\alpha$ - и 3 $\beta$ -brассиностероидами в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*.
- Впервые в растительных источниках (*Secale cereale*) обнаружены два новых brassиностероида – 2,3-диэписекастерон и секастерол.
- Обнаружен новый путь биосинтеза brassинолида через эпоксибрассиностероиды, который реализуется в *Secale cereale*.

#### **Практическая и экономическая значимость полученных результатов.**

Разработанные методы масштабируемого синтеза brassиностероидов, а в частности наиболее биологически активного из них – brassинолида, могут являться основой при создании препаратов нового поколения для сельского хозяйства. Полученные знания о путях биосинтеза brassиностероидов в растениях могут быть использованы при разработке новых препаратов избирательного действия.

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

- Метод синтеза C<sup>22</sup>-альдегидов из производных 23,24-биснорхолоеновой кислоты, позволяющий отказаться от трудоемкой и трудномасштабируемой стадии озонлиза  $\Delta^{22}$ -олефинов, которая являлась одним из препятствий на пути разработки препаративного синтеза brassинолида.
- Усовершенствованный метод получения хирального синтона боковой цепи 24 $\alpha$ -метилbrассиностероидов – (2S)-2,3-диметилбутилфенил сульфона, из (2R)-3-гидрокси-2-метилпропионата.
- Синтез 15 дейтерированных аналогов brassиностероидов, содержащих три или шесть атомов дейтерия в положениях не подверженных изотопному обмену. Полученные соединения являются ценным инструментом для изучения тонких особенностей биосинтеза brassиностероидов в растениях.
- Разработка нового эффективного метода выделения brassиностероидсодержащей фракции растительного материала и нового эффективного метода (ВЭЖХ-МС) анализа brassиностероидов, который на два порядка чувствительнее любого из ранее известных методов анализа.
- Данные по биосинтезу 3-эпибрассинолида в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale* и обнаружение обратимой конверсии между 3 $\alpha$ - и 3 $\beta$ -brассиностероидами в этих культурах.

- Обнаружение двух новых brassinостероидов – 2,3-диэписекастерона и секастерола в *Secale cereale*, а также открытие нового пути биосинтеза brassинолида в данном растении.

**Личный вклад соискателя** состоит в проведении экспериментальной работы, в осуществлении поиска путей достижения цели, в интерпретации результатов. Постановка задач, решение методологических проблем, подготовка материалов для научных публикаций осуществлялись совместно с чл.-корр. НАН Беларуси, проф., д.х.н. В.А. Хрипачом, д.х.н. В.Н. Жабинским и доктором Б. Шнайдером. Работа по исследованию биосинтеза brassinостероидов выполнялась под руководством доктора Б. Шнайдера в Институте химической экологии имени М. Планка (г. Йена, Германия).

**Апробация основных результатов работы.** Основные результаты диссертации представлены на XIX и XX конференциях по изопреноидам (Гданьск – Юрата, 2001; Либерец 2003), Молодежной научной школе-конференции “Актуальные проблемы органической химии” (Новосибирск, 2001), 9-ой конференции Международного изотопного общества (Бад-Соден, 2001), Симпозиуме молодых ученых (Гаргьяно, 2002), 4-ом Всероссийском симпозиуме по органической химии (Москва – Углич, 2003), Международной конференции “Химия, структура и функции биомолекул” (Минск, 2004).

Отдельные этапы данного исследования вошли составной частью в цикл работ “Исследование биосинтеза brassinостероидов”, отмеченной премией для молодых ученых НАН Беларуси (2003 г.)

**Опубликованность результатов.** Изложенные в диссертации результаты составили предмет 7 статей в международных научных изданиях и 9 тезисов докладов, всего 66 стр.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения; обзора литературы по теме диссертации; обсуждения результатов исследований, экспериментальной части, заключения и списка использованных литературных источников (294 источника). Работа изложена на 25 стр., содержит 13 таблиц, 49 схем и 21 рисунок.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Единственным средством удовлетворения потребности в brassinостероидах как для научных, так и для прикладных целей является их химический синтез. Существенно, что только этим путем возможно получение модифицированных brassinостероидов (в том числе изотопномеченых), которые являются необходимым инструментом для проведения аналитических и биосинтетических исследований.

Имея конечной целью выяснение особенностей биосинтеза brassинолида на примере трех растительных видов (*Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*), настоящее исследование включало два основных раздела:

- химический синтез brassinостероидов, их аналогов, биопредшественников и меченых производных,

- разработку методов выделения и анализа брассиностероидсодержащих фракций растительного материала и проведение биосинтетических экспериментов.

## 1. СИНТЕЗ C<sup>22</sup>-АЛЬДЕГИДОВ [7, 11, 16]

Настоящая часть диссертационной работы посвящена разработке методов синтеза различных защищенных C<sup>22</sup>-альдегидов на основе коммерчески доступной 3 $\beta$ -гидрокси-23,24-биснорхол-5-еновой кислоты **1**.

### 1.1. Синтез (20S)-6 $\beta$ -метокси-20-формил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -прегнана

Большинство природных стероидов содержат гидроксигруппу в 3 $\beta$ -положении и  $\Delta^5$  связь, как и в исходной кислоте **1**, выбранной для синтеза. Однако в целевом альдегиде данный фрагмент должен быть защищенным, так как предполагается в дальнейшем использовать его для формирования боковой цепи. Наиболее удобным вариантом защиты является использование изо-стероидной перегруппировки для предварительно полученного мезилата или тозилата.

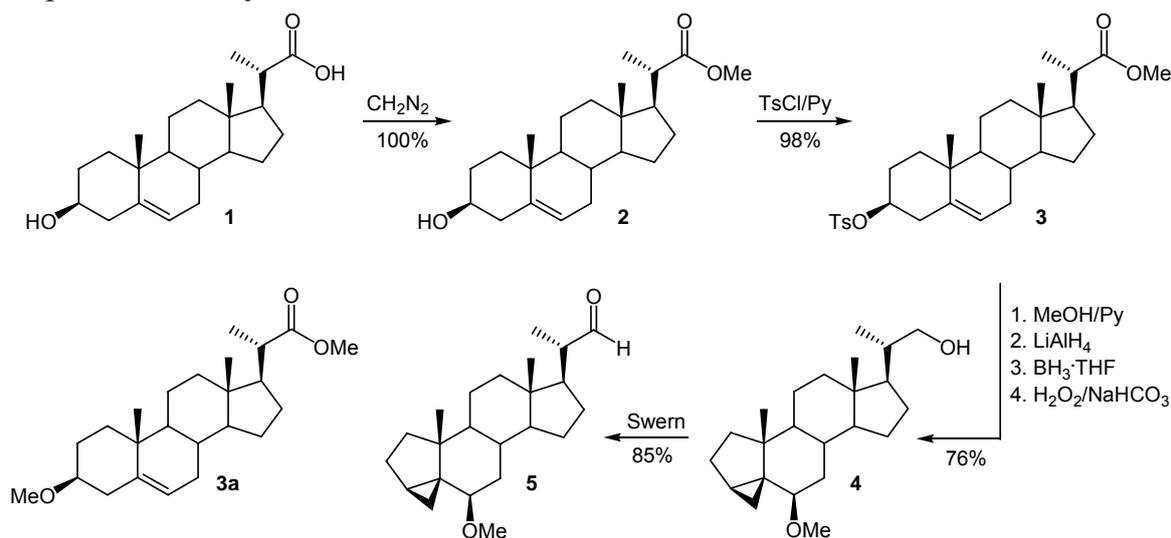


Схема 1.1

Тозилат **3** (Схема 1.1), полученный последовательной обработкой кислоты **1** диазометаном и тозилхлоридом, использовали для изо-стероидной перегруппировки в метаноле. Продукт реакции представлял неразделимую смесь целевого 3 $\alpha$ ,5-циклопроизводного и олефина **3a**. Последующее восстановление полученного продукта с помощью LiAlH<sub>4</sub> также привело к неразделимой смеси спиртов. Для выделения целевого спирта **4** продукт восстановления олефина **3a** трансформировали в полярный продукт последовательной обработкой BH<sub>3</sub>·THF и раствором H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В результате спирт **4** был выделен с помощью колоночной хроматографии на силикагеле. Окисление полученного спирта **4** по Сверну привело к желаемому альдегиду **5** с выходом 63% в расчете на кислоту **1**.

## 1.2. Синтез (20S)-6-(1,3-диоксолан-2-ил)-20-формил-3 $\alpha$ ,5-цикло-5 $\alpha$ -прегнана

Альдегиды, содержащие защищенную 6-кетогруппу, являются ключевыми интермедиатами в синтезе brassinosteroidов и экидистероидов. Удобный метод трансформации 3 $\beta$ -гидрокси- $\Delta^5$ -стероидов в 6-кетосоединения, включает использование изо-стероидной перегруппировки в присутствии ацетатов щелочных металлов и воды с последующим окислением образовавшегося спирта до кетона.

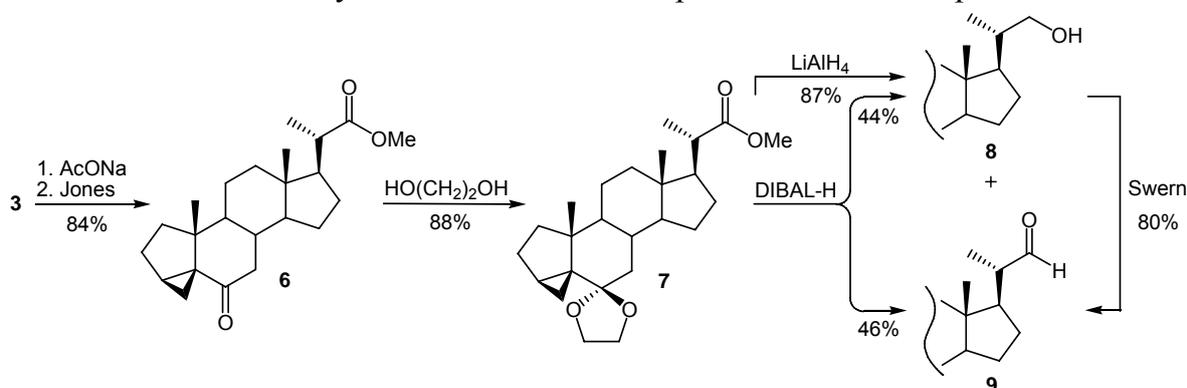


Схема 1.2

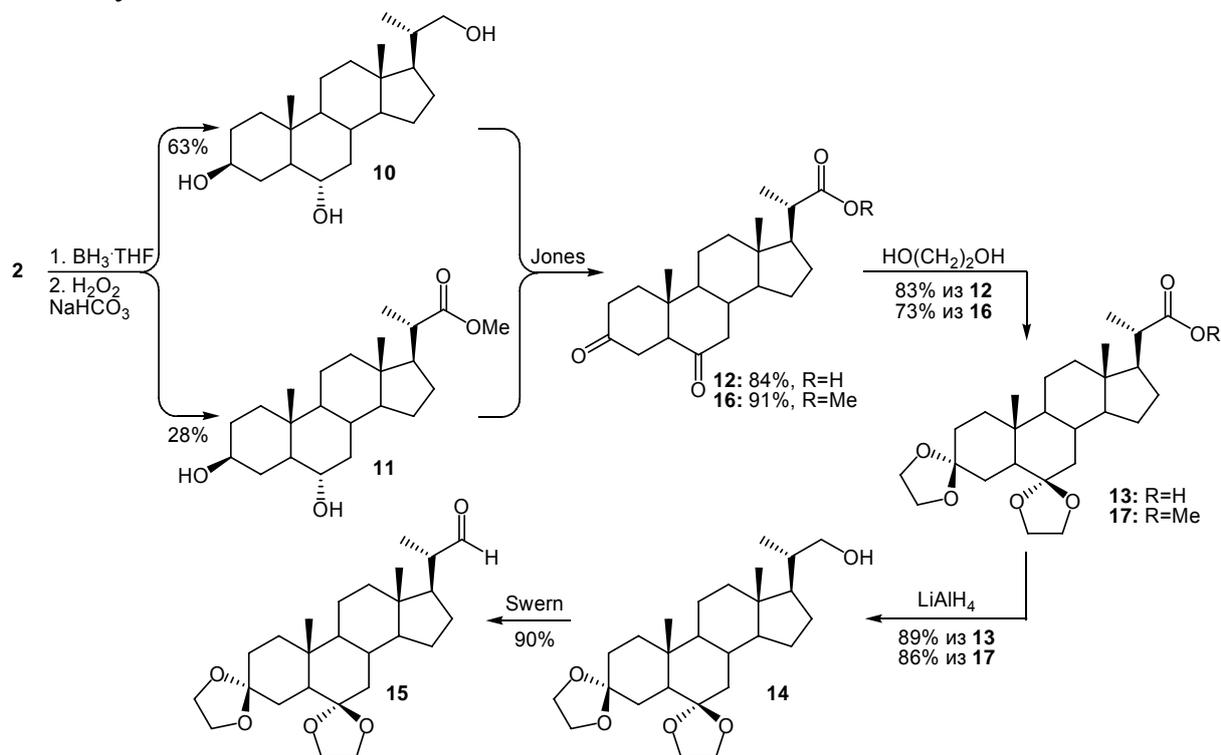
Изо-стероидная перегруппировка тозилата **3** (Схема 1.2) и окисление по Джонсу привели к кетозфиру **6**. В результате последующей защиты кетогруппы обработкой этиленгликолем в хлористом метиле в присутствии триэтилортомуравьиного эфира и толуолсульфокислоты был получен эфир **7**. Восстановление эфира **7** диизобутилалюминийгидридом привело к смеси спирта **8** и альдегида **9**. Даже в случае неполной конверсии эфира **7** наблюдается одновременное образование обоих продуктов, что говорит о большей легкости восстановления альдегида **9** в спирт **8**, чем эфира **7** в альдегид **9**. Наиболее удобным оказалось исчерпывающее восстановление эфира **7** в спирт **8** с последующим окислением по Сверну. Альдегид **9** синтезирован с выходом 50% в расчете на кислоту **1**.

## 1.3. Синтез (20S)-3,6-ди(1,3-диоксолан-2-ил)-20-формил-5 $\alpha$ -прегнана

Значительное количество интересных природных стероидов содержат 3- и 6-кетогруппы и в то же время они являются удобными интермедиатами для синтеза других полифункционализированных соединений. В связи с планируемым получением 3,6-дикетостероидов с различными боковыми цепями для нас был интересен синтез защищенного 3,6-дикето- $C^{22}$ -альдегида. Введение кетогрупп в циклическую часть основывалось на окислительном гидроборировании  $\Delta^5$ -связи, приводящем к образованию 3 $\beta$ ,6 $\alpha$ -дигидроксисоединения, и последующем окислении полученного диола.

Окислительное гидроборирование эфира **2** привело к смеси триола **10** и дигидроксиэфира **11** (Схема 1.3). Защитой кетогрупп, следующей за окислением триола **10** по Джонсу до дикетокислоты **12**, и последующим восстановлением карбоксильной группы получен спирт **14**. Окислением спирта **14** по Сверну получен альдегид **15**. Аналогичная последовательность реакций использовалась для синтеза

альдегида **15** из второго продукта окислительного гидроборирования – дигидроксиэфира **11**. Использование этой же последовательности реакций позволяет синтезировать альдегид **15** без разделения продуктов **10** и **11** с выходом 64% в расчете на кислоту **1**.



**Схема 1.3**

Таким образом, нами были разработаны новые методы синтеза стероидных C<sup>22</sup>-альдегидов из 3β-гидрокси-23,24-биснорхол-5-еновой кислоты **1** без использования дорогостоящих реагентов и специфического оборудования. Разработанные синтетические схемы могут использоваться для крупномасштабного синтеза стероидов, содержащих боковую цепь. Ключевые интермедиаты в синтезе труднодоступных природных стероидов – C<sup>22</sup>-альдегиды – получены с выходом 50 – 64% в 7 стадий.

## 2. СИНТЕЗ СТЕРОИДОВ РАСТЕНИЙ [2, 3, 8, 10, 12, 14]

Стероиды растений имеют в своей структуре различной степени функционализированную циклическую часть и боковую цепь. Как правило, синтез соединений данного класса заключается в использовании циклической части легкодоступных стероидов, последующей ее модификации и введении боковой цепи. Основной задачей данного этапа работы было разработка легко масштабируемых методов синтеза природных брассиностероидов, их производных и стериновых предшественников

## 2.1. Синтез кампестерина

Выбранный нами метод заключался в синтезе аллильных спиртов, из предварительно полученного альдегида **5** и последующем стереоконтролируемом формировании оптического центра при  $C^{24}$ , используя перегруппировку Кляйзена. Присоединение метилацетилена к альдегиду **5** привело к смеси пропаргиловых спиртов **18** и **19** в соотношении 1:2, соответственно (Схема 2.1).

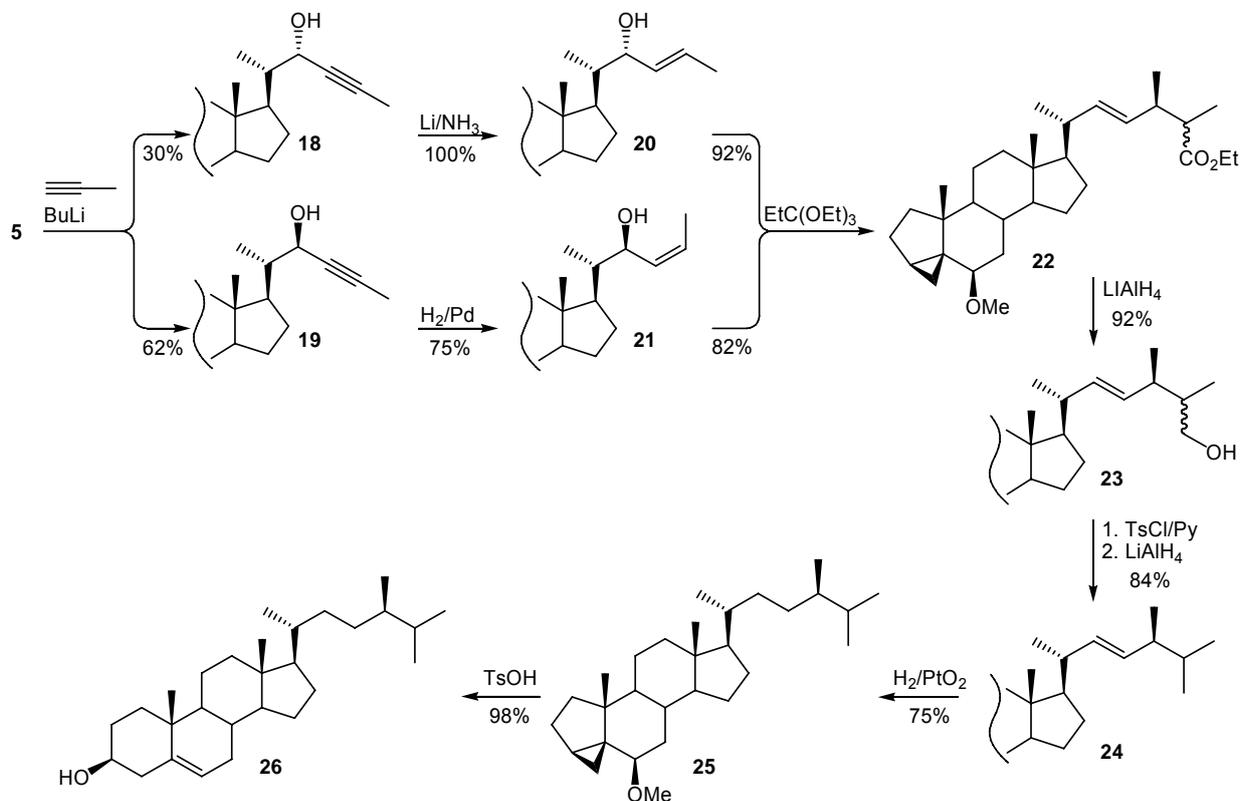


Схема 2.1

С целью последующего стереоселективного формирования центра  $C^{24}$  спирты **18** и **19** были трансформированы в аллильные спирты транс-**20** и цис-**21** восстановлением литием в жидком аммиаке и гидрированием над палладием, соответственно. Последующее присоединение триэтилортопропионата к аллиловым спиртам в условиях перегруппировки Кляйзена привело к смеси диастереомерных эфиров **22**, содержащих  $24\alpha$ -метильную группу и транс- $\Delta^{22}$ -связь. Трансформация сложноэфирной группы в метильную осуществлена последовательностью реакций восстановления, тозилрования и восстановления тозилата. Олефин **24**, полученный в результате трансформаций, использовали для дальнейшего построения боковой цепи кампестерина, которое заключалось в гидрировании над оксидом платины (IV) до соединения **25**. Обработкой TsOH соединения **25** получен кампестерин **26** с выходом 37% в расчете на альдегид **5**.

## 2.2. Синтез брассинолида

Удобным интермедиатом в синтезе брассинолида является олефин **24**, содержащий  $24\alpha$ -метильную группу и двойную связь в боковой цепи, необходимую

для введения диольной группы. Обработкой толуолсульфокислотой олефина **24** получен криностерин **27** (Схема 2.2). Дальнейший синтез заключается в последовательном тозилровании, изо-стероидной перегруппировке полученного тозилата и окислении циклоспирта в енон **28** для введения кетогруппы в шестое положение. Кипячением енона **28** в диметилформамиде с пиридиный бромидом получен диенон **29**. В результате применения предложенного нами катализатора (DHQD)<sub>2</sub>AQN при гидроксильровании диенона **29** получен целевой *R,R*-диол (кастастерон) **30** с выходом до 56%. Окисление по Байеру-Виллигеру кастастерона **30** привело к брассинолиду **31**, который был дополнительно подвергнут очистке в виде неполярного диацетонида и затем обратно трансформирован в брассинолид **31** с выходом 18% в расчете на олефин **24**.

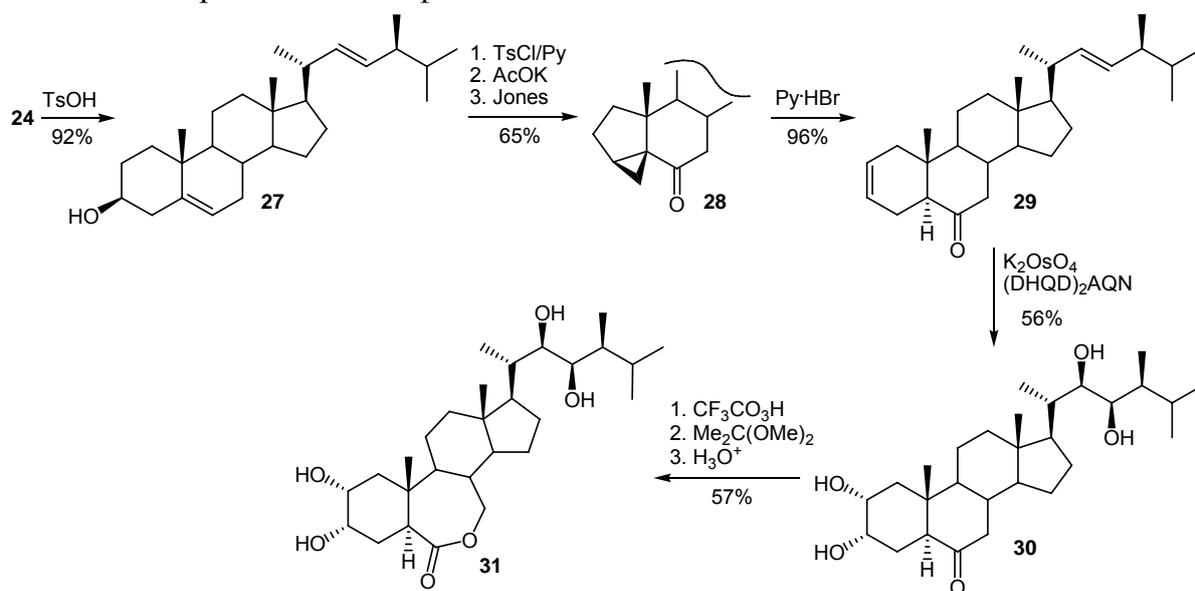


Схема 2.2

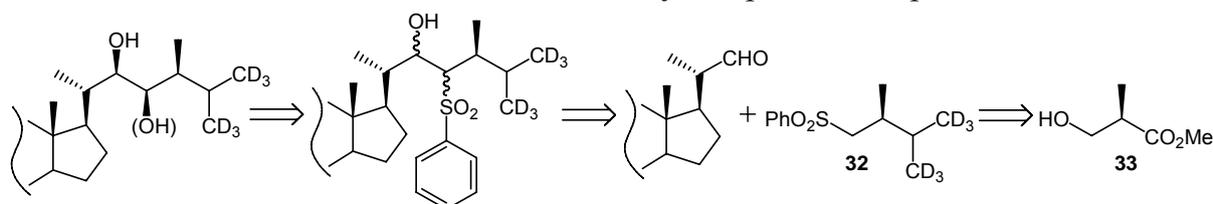
Таким образом, нами были изучены новые аспекты гидрирования и гидроксильрования по Шарплесу 24-метил- $\Delta^{22}$ -стероидов, ключевых стадий синтеза стероидов и их метаболитов – брассиностероидов. Разработаны методы масштабируемого синтеза труднодоступных соединений. Осуществлен синтез природных стероидов: кампестерина, криностерина, кастастерона, брассинолида.

### 3. СИНТЕЗ ДЕЙТЕРИРОВАННЫХ СТЕРОИДОВ [4, 7, 9, 11, 16]

Изучение их биосинтеза и метаболизма является важнейшей задачей наряду с поиском новых соединений этого ряда, химическим синтезом, изучением свойств и аспектов практического применения. Предпочтительная возможность изучения биосинтеза брассиностероидов связана с использованием предварительно синтезированных изотопномеченных соединений. Один из наиболее удобных вариантов метки представляет изотоп водорода – дейтерий. Атомы дейтерия должны содержаться в положениях молекулы, исключаящих дейтерообмен в условиях функционирования биосистемы, и в количестве, позволяющем дифференцировать

меченые соединения от сопутствующих природных спутников, т.е. синтезированные соединения должны содержать три или более атомов дейтерия.

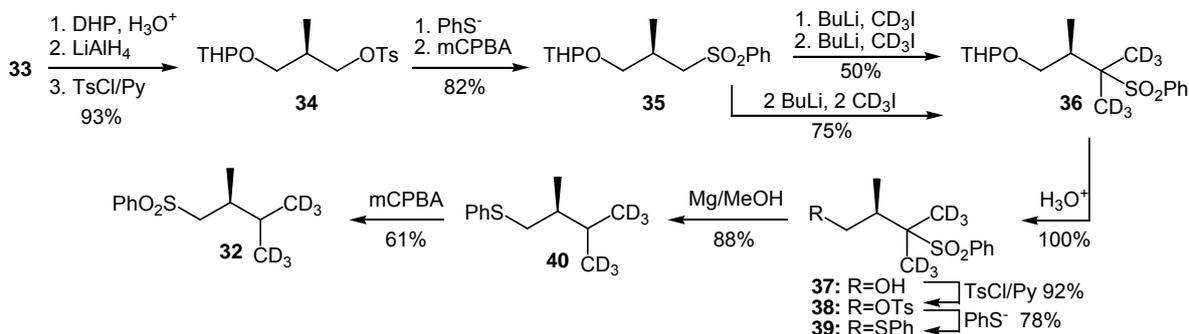
Мы полагали, что наиболее подходящим синтоном боковой цепи для получения дейтерированных brassinosteroidов может служить сульфон **32** (Рисунок 3.1), который может быть синтезирован из коммерчески доступного оптически активного гидроксиэфира **33**. Присоединение сульфона **32** к различным C<sup>22</sup>-альдегидам позволит с минимальным количеством стадий получить требуемую функциональность в циклической части молекулы brassinosteroidов.



**Рисунок 3.1. Ретросинтетическая схема построения боковой цепи дейтерированных стероидов.**

### 3.1. Формирование боковой цепи дейтерированных стероидов

Синтез боковой цепи включает введение дейтерия в интермедиат, полученный из оптически активного гидроксиэфира **33**, и последующую трансформацию дейтерированного продукта в сульфон **32**.



**Схема 3.1**

Тозилат **34** получен последовательностью реакций защиты гидроксильной группы гидроксиэфира **33**, восстановления эфирной группы до спирта и тозилрования полученного продукта (Схема 3.1). Нуклеофильное замещение тиофенолятом натрия и последующее исчерпывающее окисление *m*-хлорнадбензойной кислотой привело к сульфону **35**.

В результате последующего диалкилирования был получен продукт **36**. Гидролизом продукта **36** получен спирт **37**. Последовательные реакции тозилрования и нуклеофильного замещения тиофенолятом натрия полученного тозилата **38** привели к соединению **39**. Селективным восстановлением в мягких условиях из соединения **39** получен сульфид **40**. Окислением *m*-хлорнадбензойной кислотой сульфида **40** получен дейтерированный сульфенон **32**. Таким образом, в результате последовательности 11 реакций получен интермедиат для конвергентного

синтеза дейтерированных 24 $\alpha$ -метилстероидов, сульфен **32**, с выходом 22% в расчете на гидроксиэфир **33**.

### 3.2. Синтез дейтерированных 23-дезоксистероидов

В соответствии с предложенной ретросинтетической схемой (Рисунок 3.1), синтез целевых соединений заключался в присоединении дейтерированного сульфена **32** к C<sup>22</sup>-альдегидам и последующей модификации полученных гидроксисульфенов. Присоединение сульфена **32** к альдегиду **9** привело к смеси гидроксисульфенов **41** (Схема 3.2). Последующим окислением по Сверну получены кетосульфены **42**. Наиболее удобным вариантом синтеза кетосульфенов **42** могло оказаться присоединение сульфена **32** к стероидному C<sup>22</sup>-эфиру **7**. Попытки осуществить этот подход в нашем случае оказались неудачными.

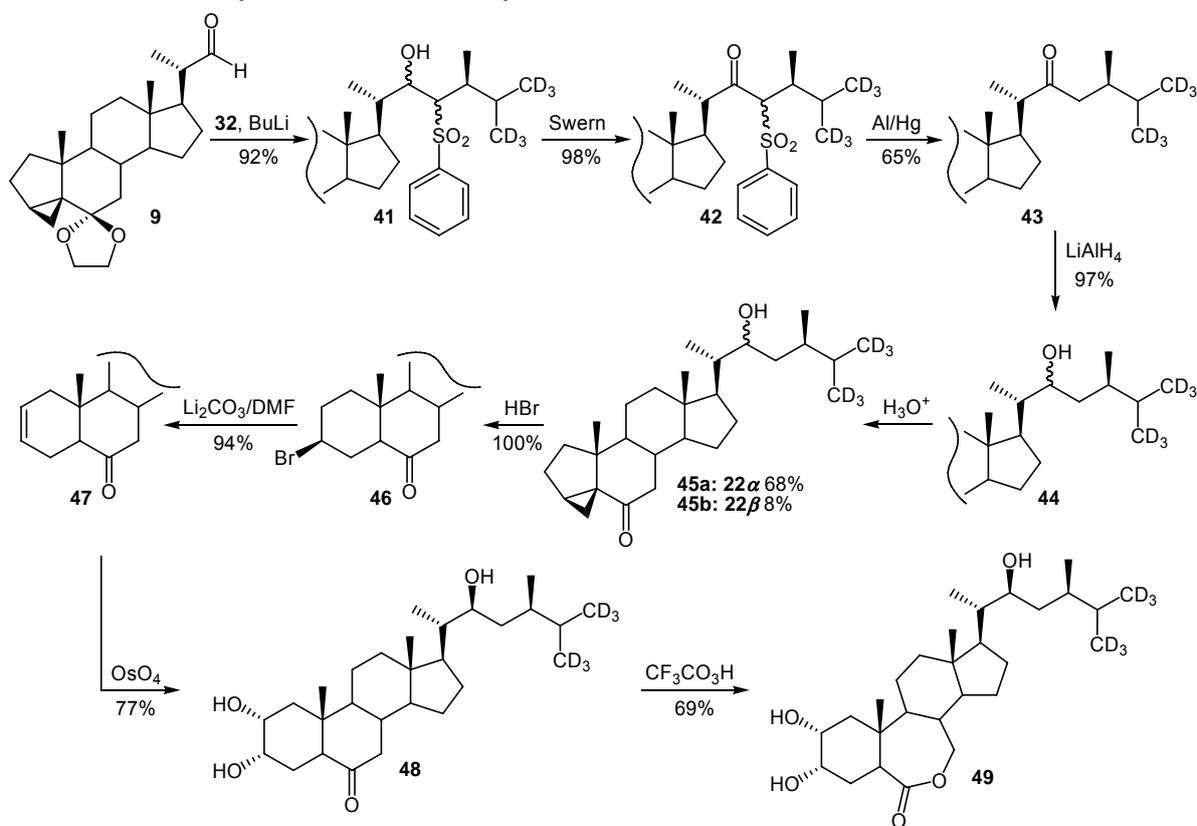


Схема 3.2

Дальнейшие превращения заключались в последовательности реакций десульфирования, восстановления полученного кетона и снятия защитной группы. Гидридное восстановление 22-кетостероидов приводит к предпочтительному образованию 22 $\alpha$ -гидроксистероида типа **45a**. Полученный спирт **45a** содержит сформированную боковую цепь 23-дезоксистероидов, и дальнейшие усилия были направлены на функционализацию циклической части. Обработкой спирта **45a** бромоводородом получен кетобромид **46**. Кипячение кетобромиды **46** в диметилформамиде в присутствии карбоната лития привело к енону **47**. Последующим гидроксированием тетраоксидом осмия получен [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]23-дезоксикастастерон **48** с выходом 28% в расчете на сульфен **32**. Окислением по

Байеру-Виллигеру 23-дезоксикастастерона **48** получен [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]23-дезоксибрассинолид **49** с выходом 19% в расчете на сульфон **32**.

Синтез других представителей 23-дезоксибрассиностероидов основывался на трансформации полученного спирта **45a**. Взаимодействием уксусного ангидрида со спиртом **45a** получен ацетат **50** (Схема 3.3). Последующее раскрытие циклопропанового цикла уксусной кислотой привело к диацетату **51**. Омылением диацетата **51** получен [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]катастерон **53** с выходом 20% в расчете на сульфон **32**.

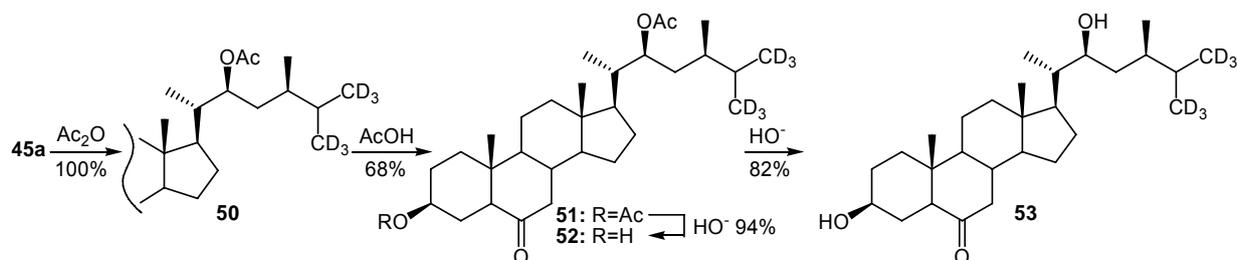


Схема 3.3

Последующий синтез 3-дегидрокатастерона **58** основывался на использовании  $\text{C}^{22}$ -альдегида **15**, содержащего защищенную 3,6-дикетофункцию (Схема 3.4). По схеме, использованной при синтезе спиртов **44** из альдегида **9** получили спирт **57**. Последующим снятием диоксолановой защиты получен целевой дейтерированный 3-дегидрокатастерон **58** с выходом 33% в расчете на сульфон **32**.

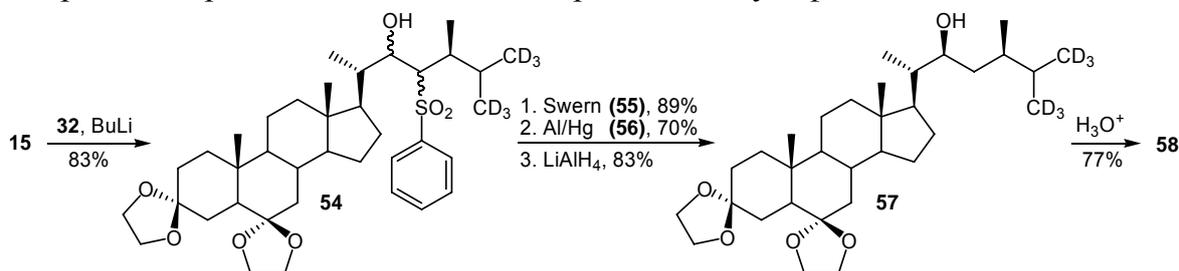


Схема 3.4

### 3.3. Синтез дейтерированных оксистеринов

Недавно открытый альтернативный путь биосинтеза brassinosterоидов из кампестерина – “раннее”  $\text{C}^{22}$ -окисление, заключающееся в первоначальном введении  $22\alpha$ -гидроксигруппы и последующем формировании циклической части молекулы. Установление взаимосвязи между альтернативными путями важно для понимания и регулирования биосинтеза brassinosterоидов. Как один из этапов решения этой задачи нами был осуществлен синтез меченных оксистеринов – предполагаемых участников гипотетической схемы биосинтеза brassinosterоидов.

Удобным интермедиатом для синтеза целевых соединений является  $\text{C}^{22}$ -альдегид **5**, содержащий защищенную циклическую функциональность стероидов. С использованием последовательности реакций, аналогичной вышеописанному превращению альдегида **9** в спирты **44**, получены спирты **62** и **63** (Схема 3.5).

Раскрытием циклопропанового цикла спирта **62** получен аналог природного стероида – [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22*R*-гидроксикампестерин **64**. Защитой гидроксильной группы спирта **63** и последующей трансформацией циклической части получен гидроксиацетат **66**. Омылением гидроксиацетата **66** получен [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22*S*-гидроксикампестерин **67** с выходом 30% в расчете на сульфон **32**.

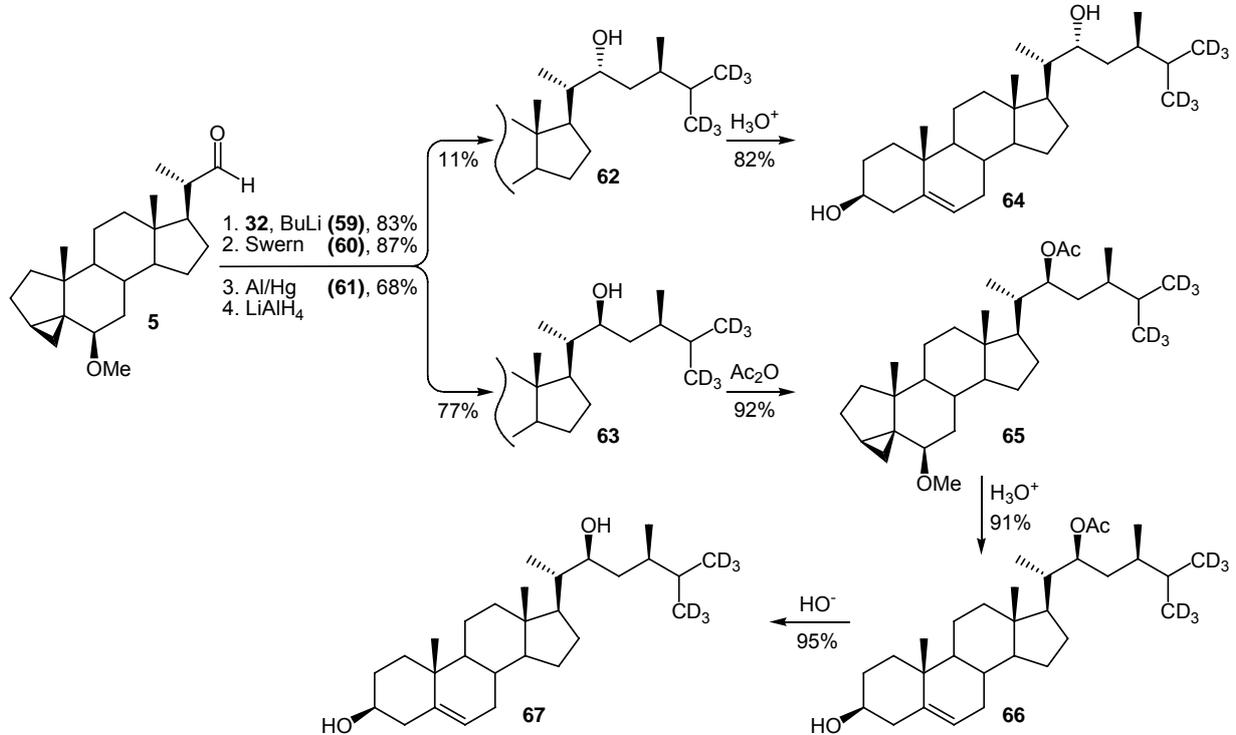


Схема 3.5

Гидроксиацетат **66** был также использован нами для синтеза других дейтерированных аналогов природных 22 $\alpha$ -гидроксистероинов (Схема 3.6). Окислением по Джонсу, обработкой кислотой и последующим омылением ацетатной защиты получен гидроксион **68**, с выходом 8% в расчете на сульфон **32**.

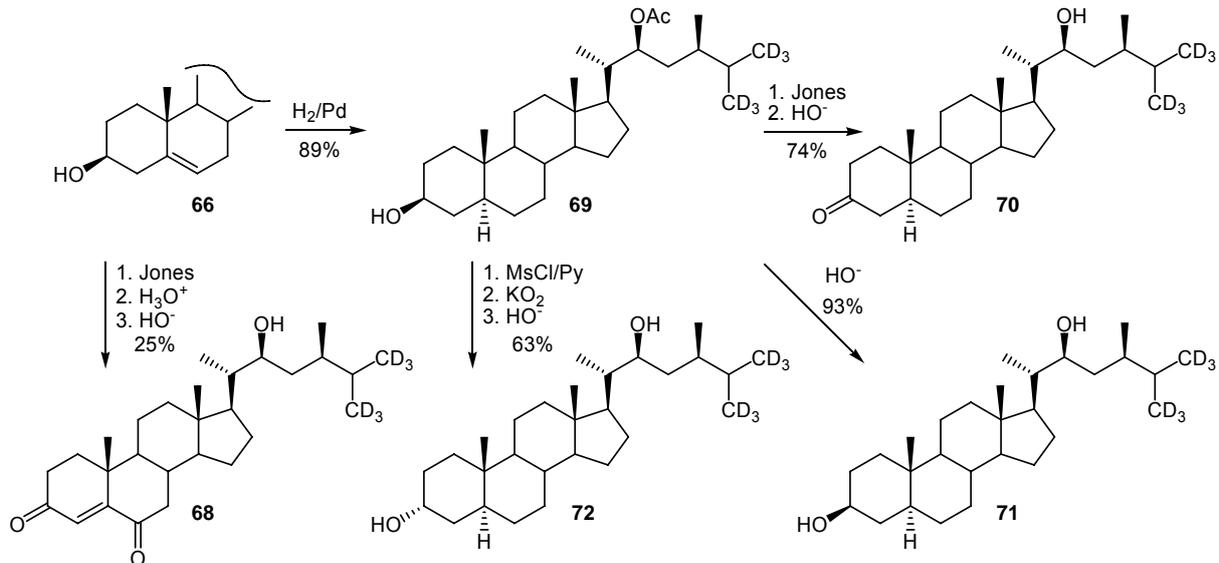


Схема 3.6

Гидрированием гидроксиацетата **66** над палладием получено соединение **69**, образование  $5\beta$ -изомера не отмечено. Последующее окисление реактивом Джонса гидроксильной группы и гидролиз ацетатной группы привели к дейтерированному аналогу **70** природного гидроксикетона с выходом 21% в расчете на сульфон **32**. Омылением соединения **69** получен  $[26,27\text{-}^2\text{H}_6]3\beta,22S$ -гидроксикампестанол **71** с выходом 26% в расчете на сульфон **32**. Мезилированием соединения **69**, последующей реакцией нуклеофильного замещения мезильной группы и снятием ацетатной защиты получен дейтероаналог другого природного соединения  $[26,27\text{-}^2\text{H}_6]3\alpha,22S$ -гидроксикампестанол **72** с выходом 18% в расчете на сульфон **32**.

### 3.4. Синтез (22*R*,23*R*)-диоксипроизводных

Описанные выше продукты присоединения сульфона **32** к альдегидам – гидроксисульфоны – содержат сформированный углеродный скелет и могут быть превращены в  $\Delta^{22}$ -стероиды – ключевые интермедиаты синтеза 22,23-диолов, в том числе принадлежащих известным структурным типам brassinosteroidов, а также гипотетических участников процесса биосинтеза.

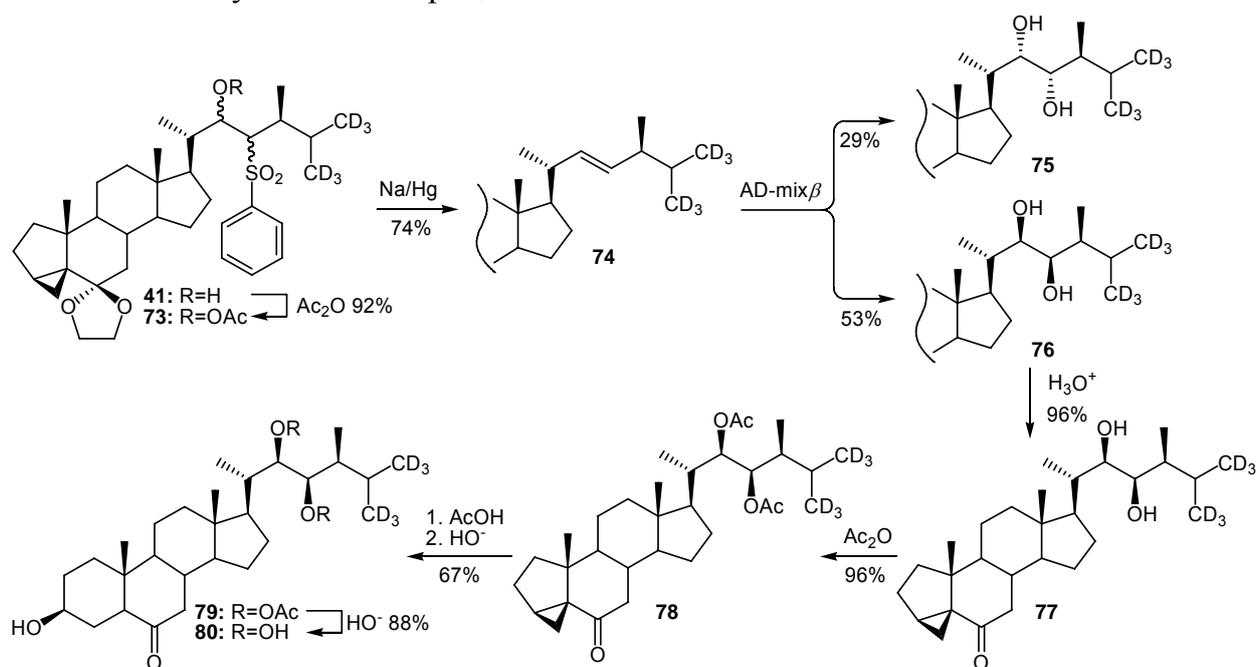


Схема 3.7

Восстановлением амальгамой натрия ацетоксисульфата **73**, полученного из гидроксисульфата **41**, синтезирован олефин **74** (Схема 3.7). Гидроксилирование олефина **74** смесью AD-mix  $\beta$  привело к образованию диолов **75** и **76**. Снятием диоксолановой защиты соединения **76** получен кетодиол **77**, который содержит полностью сформированную боковую цепь. Защитой гидроксильных групп получен диацетат **78**, который затем был трансформирован в  $[26,27\text{-}^2\text{H}_6]$ теастерон **80** в результате реакций раскрытия циклопропанового цикла и снятия ацетатных защитных групп. Выход  $[26,27\text{-}^2\text{H}_6]$ теастерона **80** составил 20% в расчете на гидроксисульфат **41**.

Биосинтетический путь “позднее С-6 окисление” осуществляется через brassinостероиды, для которых характерно отсутствие 6-кетогруппы. Для синтеза данного типа brassinостероидов удобным интермедиатом является гидроксисульфон **59**, описанный ранее (Схема 3.8). Полученный из него  $\beta$ -ацетоксисульфон был восстановлен амальгамой магния, генерируемой *in situ*. Гидроксилирование образовавшегося транс-олефина **81** привело к смеси диолов **82** и **83**. Снятием защиты с диола **83** получили энтриол **84**. Гидрирование двойной связи энтриола **84** на палладиевом катализаторе привело к образованию 6-дезокситеастерона **85** с выходом 21% в расчете на гидроксисульфон **59**, при этом образование  $5\beta$ -изомера не было отмечено.

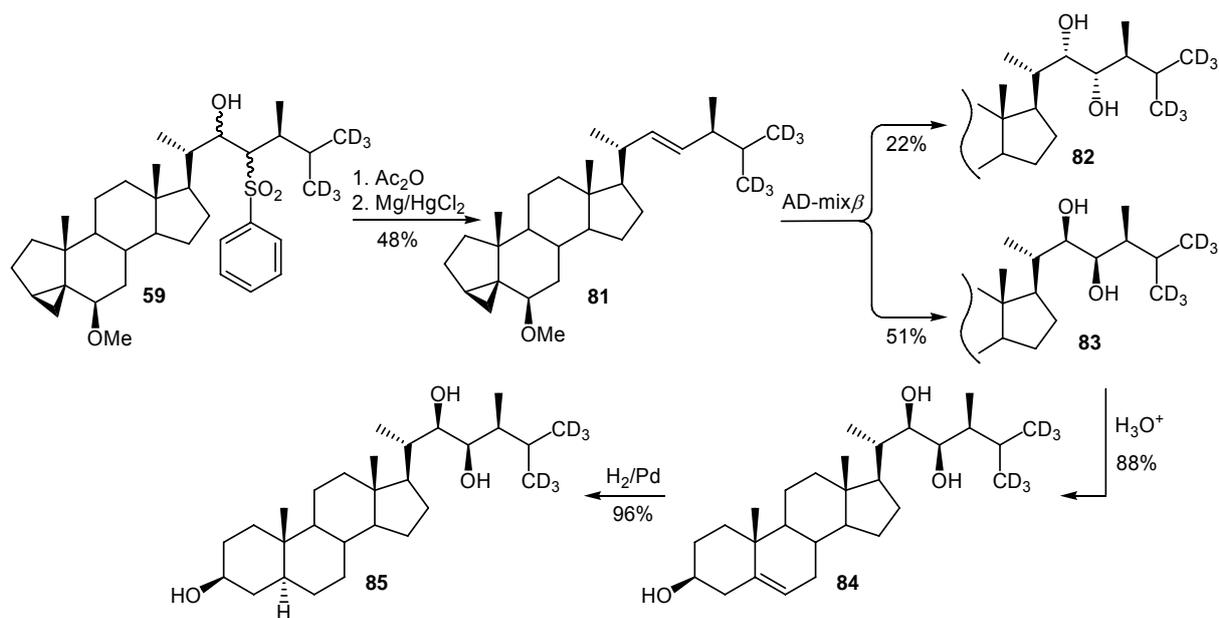


Схема 3.8

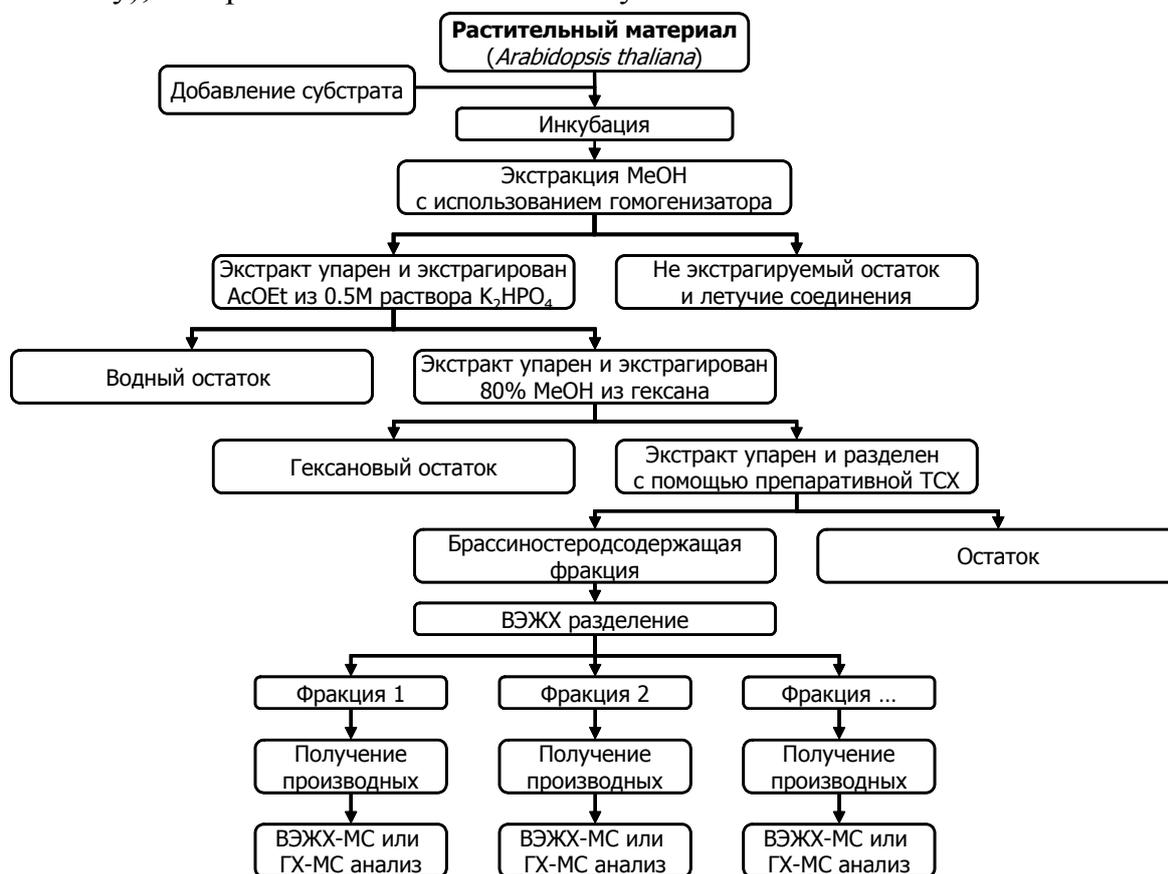
Таким образом, нами в результате проведенных исследований разработаны новые эффективные методы конвергентного синтеза дейтерированных brassinостероидов и их предшественников. Осуществлен синтез в общей сложности 15 дейтерированных соединений данного ряда, которые являются ценным инструментом при изучении особенностей биосинтеза brassinостероидов в растениях.

## 4. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСИНТЕЗА БРАССИНОСТЕРОИДОВ [1, 5, 6, 13, 15]

### 4.1. Выделение фракции растительного материала, содержащей brassinостероиды

В качестве объектов исследования были использованы: пророщенный *Arabidopsis thaliana* C24 (резуховидка Таля или резушка Таля), клеточная суспензия *Lycopersicon esculentum* сорта Тамина (томаты) и проростки *Secale cereale* (рожь) сортов Sorom и Petka. Приготовленный биоматериал делили на две части, первую часть оставляли без изменений, а ко второй добавляли изучаемый меченный субстрат

и инкубировали обе части при условиях выращивания в течение 48÷72 часов. В случае проведения анализа эндогенных brassinosterоидов инкубация исключалась. По истечении времени инкубации растительный материал был использован для выделения brassinosterоидсодержащей фракции. Разработанный способ включал два основных этапа: экстракционный и хроматографический (Рисунок 4.1). Первый этап основывался на использовании последовательной экстракции из различных систем. Второй этап заключался в использовании последовательных хроматографических методов выделения. Основываясь на индексах удерживания стандартов brassinosterоидов, выделялись фракции с предполагаемыми метаболитами. Выделенные фракции использовали для идентификации brassinosterоидов. Эффективность выделения brassinosterоидсодержащей фракции из *Arabidopsis thaliana*, выполненной с использованием описанного подхода, включавшего 6 шагов концентрирования, впервые в практике анализа brassinosterоидов характеризуется высокой степенью извлечения вещества (% recovery), которая составляла в нашем случае 60 ÷ 80%.



**Рисунок 4.1. Выделение brassinosterоидсодержащей фракции.**

#### 4.2. ГХ-МС анализ brassinosterоидов

В результате проведенных усовершенствований ГХ-МС метода анализа нами предложено использование бороксина вместо обычно используемой МВА, в качестве модифицирующего агента для анализа brassinosterоидсодержащих фракций растительного материала. В комбинации с периодической регенерацией

оборудования смесью метанол – этиленгликоль – триэтиламин, он позволил оптимизировать процесс и существенно улучшить эксплуатационные возможности оборудования.

Качественный анализ основывался на одновременном сканировании трех выбранных характеристичных ионов и времени удерживания соединений. Количественный анализ базировался на отношении площадей пиков молекулярных ионов для бората эндогенного к дейтерированному с известной концентрацией (метод внутреннего стандарта). Разработанный метод анализа характеризуется воспроизводимостью 98% и пределом детектирования  $3 \cdot 10^{-11}$  г (сигнал/шум = 3).

#### 4.3. ВЭЖХ-МС анализ brassinosterоидов

Нами был разработан новый ВЭЖХ-МС метод анализа заключающийся в предварительном получении бис-дансилборатов brassinosterоидов и последующим элюированием в присутствии слабой кислоты. При этих условиях бис-бораты гидролизуются до моно-22,23-производных (Схема 4.1). В результате удалось достичь впечатляющего предела детектирования равного  $5 \cdot 10^{-14}$  г. Т.е. разработанный метод оказался на два порядка чувствительнее использовавшихся ранее методов анализа brassinosterоидов.

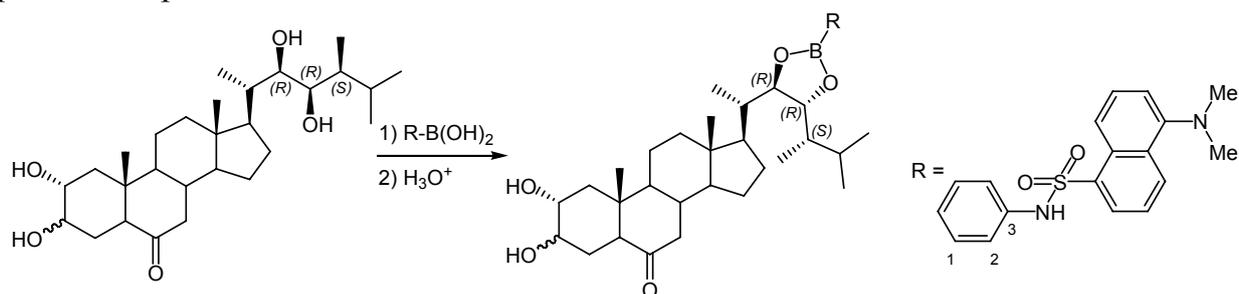


Схема 4.1

Качественный ВЭЖХ-МС анализ базировался на мониторинге выбранных характеристичных ионов, кластерных ионов и времени удерживания соединений. Количественный ВЭЖХ-МС анализ базировался на отношении площадей пиков  $[M+H]^+$  ионов 22,23-бората эндогенного стероида к дейтерированному стандарту (метод внутреннего стандарта). Описанный метод анализа характеризуется воспроизводимостью 96% и пределом детектирования  $5 \cdot 10^{-14}$  г (сигнал/шум = 5).

#### 4.4. Исследование биосинтеза brassinosterоидов в *Arabidopsis thaliana* и *Lycopersicum esculentum*

Для исследований использовали пророщенный *Arabidopsis thaliana* возрастом 20 ÷ 30 дней и суспендированный клеточный материал *Lycopersicum esculentum* возрастом 14 дней. При проведении экспериментов с *Arabidopsis thaliana* использовали  $[26,28-^2H_6]$ кастастерон,  $[26-^2H_3]$ 3-эпикастастерон,  $[26,28-^2H_6]$ брасинолид,  $[26-^2H_3]$ 3-эпибрасинолид, а для *Lycopersicum esculentum* –  $[26,28-^2H_6]$ кастастерон,  $[26,28-^2H_6]$ брасинолид и  $[26-^2H_3]$ 3-эпибрасинолид. В результате

серии параллельных экспериментов с каждым меченым brassinosterоидом были изучены превращения с их участием в *Arabidopsis thaliana* и *Lycopersicum esculentum*.

Полученные результаты биотрансформаций для каждого субстрата были объединены. В результате анализа полученных данных были сделаны заключения о путях биосинтеза brassinosterоидов в исследованных растениях. В *Arabidopsis thaliana* (Схема 4.2 А) и *Lycopersicum esculentum* (Схема 4.2 В) кастастерон является биопредшественником 3-эпикастастерона и brassинолида, метаболитом которого являлся 3-эпибрасинолид. Также, показана обратная конверсия 3-эпибрасинолида в brassинолид. Кроме того, в *Arabidopsis thaliana* показана обратная конверсия 3-эпикастастерона в кастастерон.

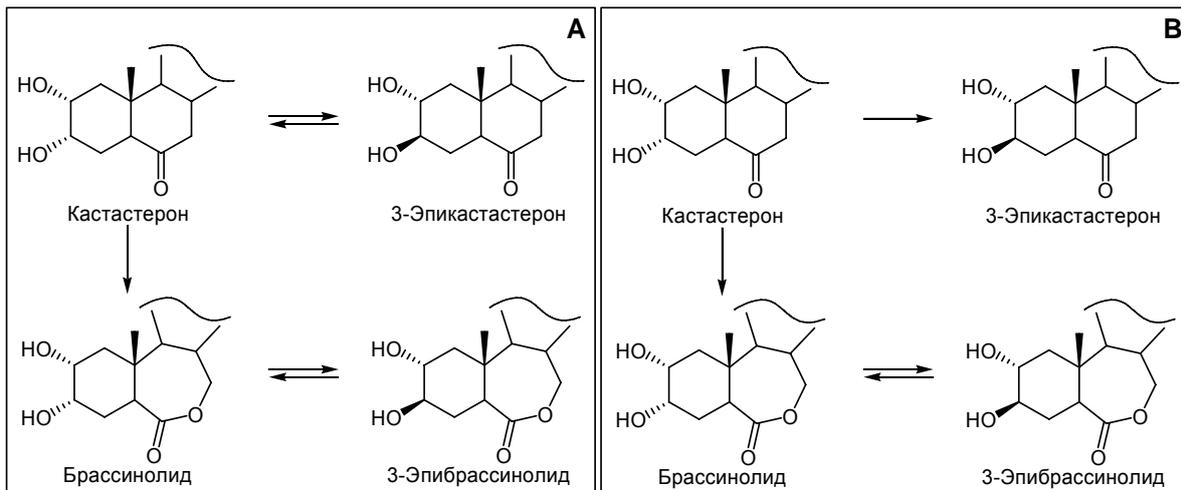


Схема 4.2

#### 4.5. Исследование биосинтеза brassinosterоидов в *Secale cereale*

С целью выбора оптимального растительного материала мы использовали *Secale cereale* сортов “Petka” и “Sorom”. В результате изучено содержание секастерона в сорте “Sorom”, как в корневой части растения, так и в зеленой части. Кроме того, впервые идентифицирован 2,3-диэписекастерон как природный brassinosterоид в обоих сортах *Secale cereale*. С целью получения более полной информации о биотрансформациях эпоксибрасинosterоидов, в качестве объекта для исследований был выбран сорт “Sorom”, содержащий секастерон и 2,3-диэписекастерон.

С целью проверки гипотезы о возможном участии 3-гидроксибрасинosterоидов в биосинтезе эпоксипроизводных нами был предпринят анализ теастерона и тифастерина, обнаруженных в *Secale cereale* наряду с секастероном, как биосинтетических предшественников. В результате экспериментов было показано превращение обоих предшественников в эпоксибрасинosterоиды.

В результате анализа литературных данных о биосинтезе эпоксисоединений мы предложили (22*R*,23*R*,24*S*)-22,23-дигидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-2-ен-6-он как возможный метаболит 3-гидроксибрасинosterоидов и предшественник секастерона и 2,3-диэписекастерона. В результате нами впервые был идентифицирован

(22*R*,23*R*,24*S*)-22,23-дигидрокси-24-метил-5 $\alpha$ -холест-2-ен-6-он как природный brassinosteroid и назван секастеролом. Секастерол – первый brassinosteroid, не содержащий гетерофункционализации в цикле А. Также было показано, что секастерол является метаболитом теастерона и тифастерина, окисляемым эпоксидазой в растениях до эпокси brassinosteroidов.

С использованием меченого секастерона и 2,3-диэписекастерона, был изучен метаболизм эпокси brassinosteroidов. Показано, что 2,3-диэписекастерон – предшественник 2-эпикастастерона, а продуктами биотрансформаций секастерона оказались кастастерон, 2-эпикастастерон и 3-эпикастастерон. 2-эпикастастерон и 3-эпикастастерон трансформируются в кастастерон в проростках *Secale cereale*. Обнаружены обратимые реакции аналогичные описанным при исследовании *Arabidopsis thaliana* для кастастерона и 3-эпикастастерона, brassinolida и 3-эпи brassinolida (Схема 4.2 А). Также показано, что 2-эпикастастерон и 3-эпикастастерон являются биосинтетическими предшественниками brassinolida и 3-эпи brassinolida, в то время как кастастерон – служит биопредшественником brassinolida.

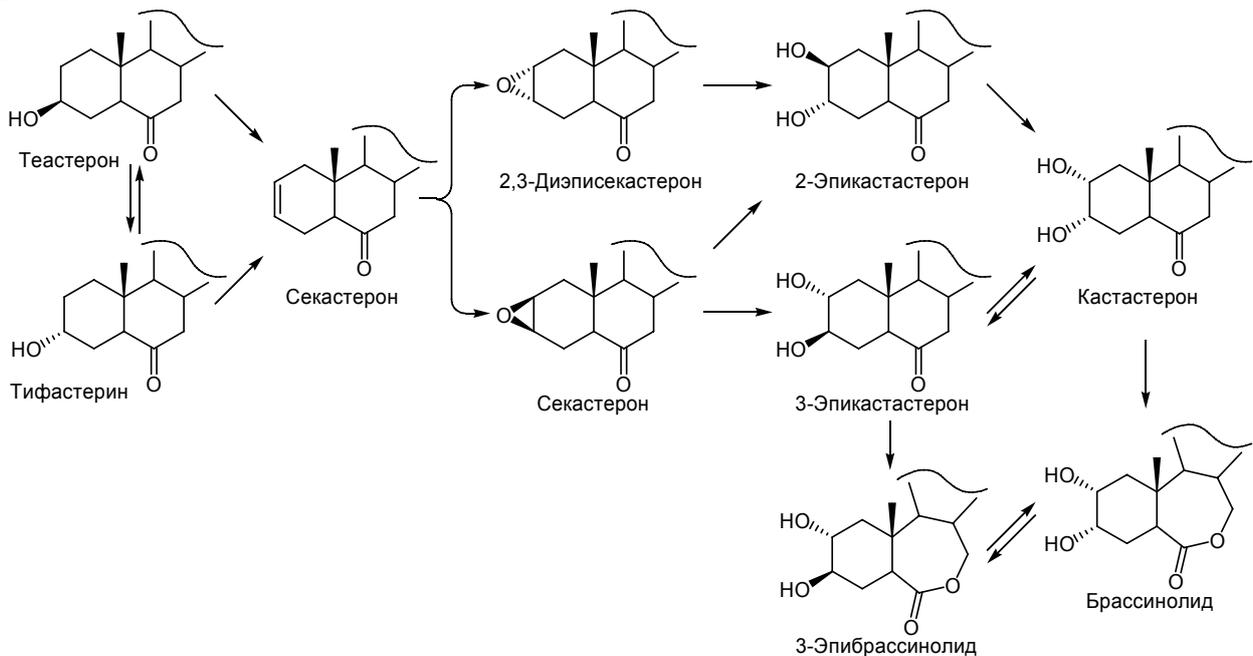


Схема 4.3

Полученные результаты биотрансформаций для каждого субстракта были объединены. В результате анализа полученных данных были сделаны заключения о путях биосинтеза brassinosteroidов в *Secale cereale* (Схема 4.3). Впервые 2,3-диэписекастерон и секастерол идентифицированы, как природные соединения. Теастерон и тифастерин являются предшественниками секастерола. Секастерол нестереоселективно окисляется эпоксидазой в смесь секастерона и 2,3-диэписекастерона. Раскрытие эпоксидного цикла 2,3-диэписекастерона в *Secale cereale* приводит к образованию 2-эпикастастерона. Продуктами трансформации секастерона являются 2-эпикастастерон и 3-эпикастастерон. 2-эпикастастерон и 3-

эпикастастерон в *Secale cereale* трансформируется в кастастерон. Возможны обратимые реакции для кастастерона и 3-эпикастастерона, brassinоида и 3-эпибрассиоида, аналогичные описанным превращениям для *Arabidopsis thaliana*. Кастастерон и 3-эпикастастерон соответственно являются предшественниками brassinоида и 3-эпибрассиоида в *Secale cereale*. Обнаружен новый путь трансформации теастерона и тифастерина в кастастерон через эпоксибрассиостероиды, альтернативный трансформациям, наблюдаемым при биосинтезе brassinоида через С-6 “позднее” окисление.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан новый эффективный метод выделения брассиостероидсодержащей фракции растительного материала. Разработанные модификации ГХ-МС метода анализа брассиостероидов позволяют более эффективно использовать оборудование и получать надежные результаты. Разработан новый эффективный ВЭЖХ-МС метод анализа брассиостероидсодержащих фракций, который на два порядка чувствительнее известных ранее методов анализа. Изучен биосинтез 3-эпибрассиоида в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*. Впервые показана возможность обратимой конверсии между 3 $\alpha$ - и 3 $\beta$ -брассиостероидами в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*. Обнаружены два новых брассиостероида 2,3-диэписекастерон и секастерол. Секастерол – первый брассиостероид, не содержащий гетерофункционализацию в цикле А. Исследован биосинтез и метаболизм эпоксибрассиостероидов в *Secale cereale*. Отрыт новый путь биосинтеза brassinоида в *Secale cereale* через эпоксибрассиостероиды.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Разработаны новые методы синтеза стероидных С<sup>22</sup>-альдегидов, которые могут быть использованы для получения ряда труднодоступных природных соединений и их аналогов, содержащих боковую цепь. Применение разработанных методов позволило осуществить синтез природных стероидов: кампестерина, криностерина, кастастерона, brassinоида.
- Разработаны новые эффективные методы конвергентного синтеза дейтерированных брассиостероидов. Осуществлен синтез 15 соединений данного класса, использованных в качестве инструмента для изучения особенностей биосинтеза брассиостероидов в растениях.
- Разработан новый эффективный метод выделения брассиостероидсодержащей фракции растительного материала и новый эффективный метод (ВЭЖХ-МС) анализа брассиостероидов, который на два порядка чувствительнее любого из известных ранее методов анализа.
- Впервые изучен биосинтез 3-эпибрассиоида и исследована обратимая конверсия между 3 $\alpha$ - и 3 $\beta$ -брассиостероидами в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*.

- Обнаружены два новых brassinостероида 2,3-диэписекастерон и секастерол в *Secale cereale*.
- Открыт новый путь биосинтеза brassинолида, через эпоксиbrassinостероиды в *Secale cereale*.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

#### Статьи:

1. Analysis of underivatized brassinosteroids by HPLC/APCI-MS. Occurrence of 3-epibrassinolide in *Arabidopsis thaliana* / O.V.Konstantinova, A.P.Antonchick, N.J.Oldham, V.N.Zhabinskii, V.A.Khripach, B.Schneider // Collect. Czech. Chem. Commun. - 2001. - Vol. 66, № 12. - P. 1729-1734.
2. Synthesis of [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]brassinosteroids / V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, O.V.Konstantinova, A.P.Antonchick, B.Schneider // Steroids. - 2002. - Vol. 67, № 7. - P. 587-595.
3. [3,3]-Claisen rearrangements in 24 $\alpha$ -methyl steroid synthesis. Application to campesterol, crinosterol, and  $\Delta^{25}$ -crinosterol side chain construction / V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, O.V.Konstantinova, N.B.Khripach, A.P.Antonchick, B.Schneider // Steroids. - 2002. - Vol. 67, № 7. - P. 597-603.
4. Synthesis of hexadeuterated 23-dehydroxybrassinosteroids / V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, A.P.Antonchick, O.V.Konstantinova, B.Schneider // Steroids. - 2002. - Vol. 67, № 13-14. - P. 1101-1108.
5. Biosynthesis of 2,3-epoxybrassinosteroids in seedlings of *Secale cereale* / A.P.Antonchick, B.Schneider, V.N.Zhabinskii, O.V.Konstantinova, V.A.Khripach // Phytochemistry. - 2003. - Vol. 63, № 7. - P. 771-776.
6. Svatos A., Antonchick A., Schneider B. Determination of brassinosteroids in the sub-femtomolar range using dansyl-3-aminophenylboronate derivatization and electrospray mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. - 2004. - Vol. 18, № 7. - P. 818-823.
7. Synthesis of [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]brassinosteroids from 23,24-bisnorcholenic acid methyl ester / A.P.Antonchick, B.Schneider, V.N.Zhabinskii, V.A.Khripach // Steroids. - 2004. - Vol. 69, № 10. - P. 617-628.

#### Тезисы:

8. Перегруппировка Кляйзена в синтезе 24 $\alpha$ -метил стероидов / О.В.Константинова, А.П.Антончик, В.Н.Жабинский, В.А.Хрипач // Актуальные проблемы органической химии: Тез. докл. науч. конф. - Новосибирск, 2001. - С. 20.
9. Synthesis of [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]22 $\alpha$ ,23 $\alpha$ -dihydroxy- and [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]22 $\alpha$ -hydroxy brassinosteroids / V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, O.V.Konstantinova, N.B.Khripach, A.P.Antonchick, B.Schneider // 19th Conf. on Isoprenoids: Book of Abstracts. - Gdansk-Jurata, 2001. - P. 97.

10. Synthesis of [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]brassinosteroids / O.V.Konstantinova, V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, A.P.Antonchick, B.Schneider // International Isotope Society, 9th conference: Book of Abstracts. - Bad Soden. - J. Labelled Cpd. Radiopharm. 2001. - Vol. 44 - P. 958.
11. Occurrence and synthesis of labeled brassinosteroids / A.P.Antonchick, O.V.Konstantinova, V.N.Zhabinskii, V.A.Khripach, B.Schneider // Young scientist symposium "Future trends in phytochemistry": Book of Abstracts.- Gargano, 2002. - P. P1.
12. Синтез кампестерина / А.В.Антончик, В.А.Хрипач, В.Н.Жабинский, О.В.Константинова, А.П.Антончик, Н.Б.Хрипач // Органическая химия - упадок или возрождение?: Тез. докл. науч. конф. - Москва - Углич, 2003. - С. 5.
13. Biosynthesis of 2,3-epoxybrassinosteroids in rye seedlings / A.P. Antonchick, B.Schneider, O.V.Konstantinova, V.N.Zhabinskii, V.A.Khripach // 20th Conf. on Isoprenoids: Book of Abstracts. - Liberec. - Chem Listy. - 2003. - Vol. 97 - P. s279-280.
14. Comparative study on campesterol synthesis / O.V.Konstantinova, V.A.Khripach, V.N.Zhabinskii, A.V.Antonchick, A.P.Antonchick, N.B.Khripach // 20th Conf. on Isoprenoids: Book of Abstracts. - Liberec. - Chem Listy. - 2003. - Vol. 97 - P. s301-302.
15. Исследование биосинтеза эпоксибрасиностероидов / А.П.Антончик, Б.Шнайдер, В.Н.Жабинский, О.В.Константинова, В.А.Хрипач // Химия, структура и функции биомолекул: Тез. докл. науч. конф.- Минск. - Весці НАН Беларусі - 2004. - № 2. - С. 23.
16. Синтез [26-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]- и [26,27-<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-брасиностероидов / В.Н.Жабинский, В.А.Хрипач, О.В.Константинова, А.П.Антончик, Б.Шнайдер // Химия, структура и функции биомолекул: Тез. докл. науч. конф. - Минск. - Весці НАН Беларусі - 2004. - № 2 С. 51-52.

## РЕЗЮМЕ

Антончик Андрей Петрович

Синтез дейтерированных 24 $\alpha$ -метилбрасиностероидов. Исследование биосинтеза брасинолида.

Ключевые слова: стероиды, стерины, брасиностероиды, брасинолид, гормоны роста растений, изотопномеченый, дейтерированный, стереоселективный синтез, *Arabidopsis thaliana*, *Secale cereale*, *Lycopersicum esculentum*, биосинтез, метаболизм.

Целью настоящей работы являлось изучение биосинтеза брасинолида из кампестерина на примере растительных культур *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*. Основное внимание уделено биохимическим трансформациям в цикле А.

В результате проведенных исследований осуществлен синтез стероидных C<sup>22</sup>-альдегидов и природных стероидов: кампестерина, криностерина, кастастерона, brassinolida. Осуществлен синтез ряда дейтерированных 24 $\alpha$ -метилбрасиностероидов. Разработан новый эффективный метод выделения brassinosteroidсодержащей фракции растительного материала и новый эффективный метод (ВЭЖХ-МС) анализа brassinosteroidов. Впервые изучен биосинтез 3-эпибрасинолида. Исследована обратимая конверсия между 3 $\alpha$ - и 3 $\beta$ -брасиностероидами в *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* и *Secale cereale*. Обнаружены два новых брасиностероида 2,3-диэписекастерон и секастерол в *Secale cereale*. Открыт новый путь биосинтеза brassinolida через эпоксибрасиностероиды в *Secale cereale*.

## РЭЗЮМЭ

Антончык Андрэй Пятровіч

Сінтэз дейтэраваных 24 $\alpha$ -метылбрасінастэроідаў. Даследаванне біясінтэзу брасіналіду.

Ключавыя словы: стэроіды, стэрыны, брасінастэроіды, брасіналід, гармоны росту раслін, ізатопнамечаныя, дэйтэраваныя, стэрэаселектыўны сінтэз, *Arabidopsis thaliana*, *Secale cereale*, *Lycopersicum esculentum*, біясінтэз, метабалізм.

Мэтай дадзенай працы з'яўлялася вывучэнне біясінтэзу брасіналіду з кампестэрыну з выкарыстаннем у якасці біялагічных аб'ектаў *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* і *Secale cereale*. Найбольшы інтарэс прадстаўлялі біяхімічныя трансфармацыі ў цыкле А.

У выніку праведзеных даследаванняў ажыццяўлен сінтэз стэроідных C<sup>22</sup>-альдэгідаў і прыродных стэроідаў: кампестэрыну, крынастэрыну, кастастэрону, брасіналіду. Ажыццяўлен сінтэз шэрагу дэйтэраваных 24 $\alpha$ -метылбрасінастэроідаў. Распрацаваны новы эфектыўны метады вылучэння брасінастэроідутрымальных фракцый расліннага матэрыялу і новы эфектыўны метады (ВЭЖХ-МС) аналізу брасінастэроідаў. Упершыню вывучаны біясінтэз 3-эпібрасіналіду. Даследавана зваротная канверсія паміж 3 $\alpha$ - і 3 $\beta$ -брасінастэроідамі ў *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* і *Secale cereale*. Упершыню знойдзены два новых брасінастэроіды 2,3-дыэпісэкастэрон і сэкастэрол у *Secale cereale*. Знойдзены новы шлях біясінтэзу брасіналіду праз эпоксибрасінастэроіды ў *Secale cereale*.

## SUMMARY

Antonchick Andrey Petrovich

Synthesis of deuterated 24 $\alpha$ -methylbrassinosteroids. Study on the biosynthesis of brassinolide.

Key words: steroids, sterols, brassinosteroids, brassinolide, plant growth hormone, isotope labelled, deuteration, stereoselective synthesis, *Arabidopsis thaliana*, *Secale cereale*, *Lycopersicum esculentum*, biosynthesis, metabolism.

The purpose of the present work was the study of biosynthesis of brassinolide from campesterol with *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* and *Secale cereale* as biological objects. The main attention was paid to the transformations in the cycle A.

As a result, new syntheses of steroidal C<sup>22</sup>-aldehydes and a number of natural steroids (campesterol, crinosterol, castasterone, brassinolide) have been elaborated. About 15 new deuterated 24 $\alpha$ -methylbrassinosteroids have been prepared for biochemical research. A new effective method for isolation of brassinosteroid-containing fraction from plant material and a new sensitive method of their analysis have been developed. Biosynthesis of 3-epibrassinolide has been investigated for the first time. The reversible transformations between 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -brassinosteroids in *Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicum esculentum* and *Secale cereale* have been investigated. Two new brassinosteroids, 2,3-diepisecasterone and secasterol, have been found in *Secale cereale*. An alternative pathway of biosynthesis of brassinolide through epoxybrassinosteroids in *Secale cereale* has been investigated.

\* \* \* \* \*

Автор выражает глубокую благодарность научным руководителям член-корреспонденту НАН Беларуси, д.х.н., профессору В.А. Хрипачу, доктору Б. Шнайдеру (Институт химической экологии имени М. Планка, г. Йена, Германия) и д.х.н., гл.н.с. ЛХС В.Н. Жабинскому за постоянное внимание к проделанной работе и практическую помощь. Благодарю О.В. Константинову, Н.Б. Хрипач, А.В. Антончика, Н.Д. Олдхама, А. Сватоса, принявших участие в проведении совместных исследований и позволивших провести данную работу на необходимом уровне. Выражаю признательность сотрудникам Лаборатории химии стероидов (Институт биоорганической химии НАН Беларуси) и Лаборатории ЯМР (Институт химической экологии имени М. Планка, г. Йена, Германия), в которых была выполнена данная работа, за оказанное содействие и дружескую атмосферу. Выражаю глубокую признательность моим преподавателям.