Чага

А. В. Ивойлов
профессор Мордовского университета, д.с-х.н.

Почти в любом лесу можно встретить трутовые грибы, или трутовики, растущие друг над другом, этажами, и напоминающие копыта, полочки, раковины. Их плодовые тела чаще всего многолетние, поэтому трутовики можно увидеть в лесу в любое время года, но легче всего — в предзимье или ранней весной.

Чёрный берёзовый гриб **чага** — один из самых известных трутовых грибов не только в Мордовии, но и на всей территории России, где произрастает берёза. Правда, встречается этот гриб не так уж и часто. Это бесплодная форма **трутовика скошенного** — *Inonotus obliquus*, типичного представителя грибов-паразитов, произрастающих на древесине и питающихся её органическими веществами. Поселяется чага, как правило, на стволах живой берёзы, реже ольхи и рябины, чаще в местах отпавших сучьев или там, где есть повреждения коры (трещины, раны, морозобоины). Дерево, поражённое чагой, заболевает, начинает хиреть и, в конце концов, погибает, так как гриб разрушает древесину, вызывая её гниение.

Неровная, часто глубоко растрескавшаяся поверхность чёрного цвета позволяет легко отличить чагу от других трутовиков и капов-наростов, образованных самим деревом. Взрослое плодовое тело имеет неправильную желвакообразную форму. Гриб достаточно крупный, иногда достигает 40—50 см в диаметре и весит около 5—6 кг, но чаще встречаются более мелкие экземпляры. Мякоть внутри плодового тела плотная, жёлто-бурого цвета, с беловатыми прожилками. В свежем состоянии она пробковидная мягкокожистая, позже — волокнистая, в сухом состоянии твёрдая и ломкая.

Иногда после гибели дерева на другой стороне ствола на одном уровне с чагой под корой начинает формироваться спороносящее плодовое тело трутовика скошенного, которое состоит из трубочек, наклоненных к поверхности субстрата под углом 20—30° (за что гриб и назван скошенным, так как латинское слово obliquus означает косой или скошенный). Ткань под спороносным слоем плодового тела (гименофором) почти отсутствует или очень тонкая. Мякоть жёсткая, деревянистая. Поры обычно растянуты, угловато-округлые, сразу же после освобождения из-под коры беловато-древесинного оттенка. Потом их цвет серовато-сизый, у старых экземпляров чёрно-бурый. На наростах самой чаги трубочки со спорами никогда не образуются.

Лечебные свойства чаги издавна известны людям. Она пользуется широкой популярностью как испытанное средство народной медицины. Например, в Китае и Японии чагу применяют для лечения диареи, язвы желудка, гепатита, нефрита и отложения солей в костной ткани. В отечественной народной медицине настой и отвар её используют при лечении заболеваний органов пищеварения и злокачественных опухолей. Здоровые люди могут пить настой чаги в профилактических целях.

Широкая известность чаги привлекла к ней внимание учёных разных стран. Гриб исследовали как с ботанической, так и с медицинской точек зрения. Было выяснено, что по химическому составу чага резко отличается от других трутовиков. В ней обнаружены водорастворимые пигменты, некоторые органические кислоты, полисахариды, флавоны, стероидные вещества, богатый набор минеральных соединений, микроэлементов и др. Естественный комплекс этих веществ и обусловливает лекарственные свойства чаги.

Исследованиями установлено, что чага обладает заметным противоопухолевым, противовоспалительным и иммуностимулирующим действием. Доказано, что препараты из чаги способствуют снижению сахара в крови и могут эффективно ис-

пользоваться для профилактики различных форм диабета. Это единственный гриб среди грибов-макромицетов, из которого фармацевтическая промышленность в нашей стране производит лекарственный препарат бефунгин.

Чагу обычно собирают ранней весной и поздней осенью — летом её просто не видно среди листвы, а зимой сборам мешает снег. Наросты чаги срубают со ствола, очищают от коры и остатков древесины, рубят на небольшие куски и сушат при температуре 40—50 °С.

Для приготовления настоя чаги в домашних условиях куски сухого гриба измельчают (предварительно слегка размачивают и пропускают через мясорубку). Настой готовят из расчёта один стакан измельчённого гриба на пять стаканов тёплой кипячёной воды при температуре 45—50 °С. Настаивают двое суток, процеживают через два-три слоя марли. Принимают настой чаги за час до еды по полстакана 5—6 раз в день. Настой, при хранении его в холодильнике, годен в течение 3—4 дней.

https://doi.org/10.29296/25419218-2022-02-06

© Коллектив авторов, 2022

Оценка качества и биологической активности экстракта березового гриба чага «БиоЧага»

О.Н. Усольцева[1], Д.Н. Оленников[2], Т.В. Потупчик[3]

[1]Общество с ограниченной ответственностью «СибПрибор», Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, д. 87;

[2]ФГБУН, Бурятский научный центр, Сибирского отделения Российской академии наук, Российская Федерация, 670047, Улан-Удэ, ул. Сасьяновой, 8;

[3]ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Российская Федерация, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, д. 1

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Усольцева Ольга Николаевна – координатор научных исследований, общество с ограниченной ответственностью «СибПрибор» торговая марка «Байкальская Легенда», кандидат медицинских наук. Тел.: +7 (902) 511-61-56. E-mail: usolceva@baikal-legend.ru. *ORCID: 0000-0002-6947-0057*

Оленников Даниил Николаевич – ведущий научный сотрудник, ФГБУН, Бурятский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук, Институт общей и экспериментальной биологии, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (902) 160-06-27. E-mail: olennikovdn@mail.ru. *ORCID: 0000-0001-8194-1061*

Потупчик Татьяна Витальевна – доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии с курсом ПО, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, кандидат медицинских наук. Тел.: +7 (923) 294-72-04. E-mail: potupchik_tatyana@mail.ru. *ORCID: 0000-0003-1133-4447*

РЕЗЮМЕ

Введение. «БиоЧага» – природный экстракт березового гриба чага, произведенный по авторской технологии иркутской компанией ООО «СибПрибор» под торговой маркой «Байкальская Легенда». Высокое качество экстракта «БиоЧага» обусловлено объединением экологически чистого богатого биологически активными веществами лекарственного растительного сырья чаги Прибайкалья и уникальной авторской технологией его переработки. В результате получен быстрорастворимый порошок с низкой плотностью «БиоЧага», обладающий высокой биологической активностью и биодоступностью.

Цель исследования: комплексное изучение состава и содержания биологически активного вещества (БАВ), биологической активности экстракта березового гриба чага «БиоЧага» в связи с особенностями технологии его производства.

Материал и методы. Для определения физико-химических свойств экстракта березового гриба чага «БиоЧага» использовали методы экстракции/гравиметрии, спектрофотометрии. Качественный состав изучали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для определения биологической активности экстракта березового гриба чага «БиоЧага» определяли антирадикальную активность экстракта к органическим и неорганическим радикалам естественного и искусственного происхождения методом спектрометрии и кулонометрии. Антиоксидантный потенциал оценивался с помощью спектрофотомерии и флуориметрии с определением общего антиоксидантного потенциала и способность поглощения кислородных радикалов. Железовосстановительный и железохелатирующий потенциал экстракта березового гриба чага «БиоЧага» определяли методом спектрофотометрии.

Результаты. Физико-химические характеристики состава экстракта березового гриба чага «БиоЧага» имели высокий уровень характерных для чаги соединений – низкомолекулярных фенольных соединений – 57,00±1,48 мг/кг, высокомолекулярных фенольных соединений (меланиновый комплекс) – 24,9±1,2%. Характер распределения фрагментов меланинового комплекса показывает преимущественное содержание о-диоксибензоильных фрагментов, что предполагает высокую биологическую активность экстракта «БиоЧага». Показано, что «БиоЧага» обладает антиоксидантной, антирадикальной и железовосстановительной активностью. Кроме того, экстракт показал себя как хороший инактиватор молекул оксида азота, что указывает на его противовоспалительные свойства.

Заключение. «БиоЧага» является высокоактивным природным комплексным средством, характеризуется как эффективный антиоксидант, созданный по уникальной авторской технологии. Его высокая биологическая активность указывает на эффективность экстракта и позволяет рекомендовать как средство профилактики и защиты от оксидативного стресса.

Ключевые слова: «БиоЧага», березовый гриб чага, *Inonotus obliquus*, технология производства, биологически активное вещество, биологически активная добавка.

Для цитирования: Усольцева О.Н., Оленников Д.Н., Потупчик Т.В. Оценка качества и биологической активности экстракта березового гриба чага «БиоЧага». Фармация, 2022; 71 (2): 33–40. ***https://doi.org/10/29296/25419218-2022-02-06***

EVALUATION OF THE QUALITY AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE «BIOCHAGA» BIRCH FUNGUS EXTRACT

O.N. Usoltseva[1], D.N. Olennikov[2], T.V. Potupchik[3]

[1]Limited Liability Company «Sibpribor», St. Trilissera, 87, Irkutsk, 664047, Russian Federation;

[2]Federal state budgetary institution of science of the Buryat scientific center, Siberian branch of the Russian Academy of Sciences, street Casanovas, 8, Ulan-Ude, 670047, Russian Federation;

[3]Federal state budgetary educational institution of higher education «Krasnoyarsk state medical University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetsky» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Partizan Zheleznyak str., 1, Krasnoyarsk, 660022, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga Nikolaevna Usoltseva – Coordinator of Scientific research, SibPribor Limited Liability Company, Baikal Legend trademark, Candidate of Medical Sciences. Tel.: +7 (902) 511-61-56. E-mail: usolceva@baikal-legend.ru. ***ORCID: 0000-0002-6947-0057***

Olennikov Daniil Nikolaevich – Leading Researcher, Federal State Budgetary Institution of Science, Buryat Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institute of General and Experimental Biology, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (902) 160-06-27. E-mail: olennikovdn@mail.ru. ***ORCID: 0000-0001-8194-1061***

Potupchik Tatiana Vitalievna – Associate Professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology with a course in, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Candidate of Medical Sciences. Tel.: +7 (923) 294-72-04. E-mail: potupchik_tatyana@mail.ru. ***ORCID: 0000-0003-1133-4447***

SUMMARY

Introduction. «BioChaga» is a natural extract of the birch mushroom chaga, produced according to the author's technology of the Irkutsk company SibPribor LLC under the trademark «Baikal Legend». The high quality of «BioChaga» is due to the combination of environmentally friendly chaga medicinal plant raw materials rich in biologically active substances of the Baikal region and the unique author's technology of its processing. The result is a fast-soluble «BioChaga» powder with low density, high biological activity and bioavailability.

The purpose of the study: a comprehensive study of the composition and content of BAS, biological activity of the «BioChaga» extract in connection with the peculiarities of its production technology.

Material and methods. To determine the physicochemical properties of «BioChaga» extract we used the following methods: extraction / gravimetry, spectrophotometry, the qualitative composition was studied using high-performance liquid chromatography. To determine the biological activity of «BioChaga», the antiradical activity of the extract to organic and inorganic radicals of natural and artificial origin was determined by spectrometry and coulometry. The antioxidant potential was evaluated using spectrophotometry and fluorimetry to determine the total antioxidant potential and the ability to absorb oxygen radicals. The iron-reducing and iron-chelating potential of «BioChaga» was determined by spectrophotometry.

Results. The physico-chemical characteristics of the «BioChaga» composition had a high level of compounds characteristic of the chaga: low molecular weight phenolic compounds – 57,00±1,48 mg/kg, high molecular weight phenolic compounds (melanin complex) – 24,9±1,2%. The nature of the distribution of fragments of the melanin complex shows a predominant content of o-dioxybenzoyl fragments, which suggests the presence of high biological activity in the «BioChaga». It has been shown that the «BioChaga» has antioxidant, antiradical and iron-reducing activity. In addition, the extract has proven to be a good inactivator of nitric oxide molecules, which indicates its anti-inflammatory properties.

Conclusion. «BioChaga» is a highly active natural complex agent characterized as an effective antioxidant created using a unique author's technology. Its high biological activity indicates the effectiveness of the extract and allows it to be recommended as a means of prevention and protection against oxidative stress.

Key words: «BioChaga», birch mushroom chaga, ***Inonotus obliquus***, production technology, biologically active substance, biologically active additive.

For reference: Usoltseva O.N., Olennikov D.N., Potupchik T.V. Evaluation of the quality and biological activity of the «BioChaga» birch fungus extract. Farmatsiya, 2022; 71 (2): 33–40. ***https://doi.org/10/29296/25419218-2022-02-06***

Введение

Терапевтическая ценность лекарственного растительного сырья (ЛРС) определяется входящими в них биологически активными веществами (БАВ) [1, 2]. БАВ, входящие в его состав, оказывают множественное воздействие на различные органы и системы организма человека [3, 4]. БАВ, выделяемые из ЛРС, используются для производства лекарств и биологически активных добавок (БАД) [2, 5–7]. Технологии получения этих веществ различны, что существенно влияет на их состав и фармакологическую активность [1, 8]. Качественный состав и содержание БАВ может зависеть от многих факторов, в том числе климатических условий его произрастания. Установлено, что ЛРС, заготавливаемое в Сибири, отличаются высоким уровнем содержания некоторых БАВ (витаминов, свободных ами-

нокислот, полифенолов, макроэлементов и пр.). Помимо природно-климатических факторов, на химический состав растений оказывают влияние и экологические факторы антропогенного характера [1]. Таким образом, качество конечного продукта на растительной основе зависит от исходного качества ЛРС и технологии его переработки [1, 8]. Выделение и очистка БАВ из ЛРС в настоящее время остается сложной, трудоемкой и энергоемкой стадией промышленного производства. При экстрагировании ЛРС водой или водно-спиртовыми растворами, кроме действующих веществ, извлекаются нестабильные при хранении балластные вещества, которые снижают качество БАВ и требуют энергетических затрат на их очистку [2]. Кроме того, показано, что при различных способах экстракции формируется индивидуальная водополимерная система, в которой полифенольные комплексы существенно различаются параметрами [8].

Сегодня очень популярна тема здорового образа жизни и высока потребность в получении эффективных и безопасных БАД из ЛРС с высоким содержанием БАВ. Наибольшее применение в промышленности получили экстракционные (новогаленовые) лекарственные препараты и БАД.

Регулярное потребление полифенолов в рационе связано со снижением риска ряда хронических заболеваний, включая онкологические, сердечно-сосудистые заболевания и нейродегенеративные расстройства [9]. Полифенолы являются одним из основных значимых БАВ в чаге. На сегодняшний день на рынке существуют различные виды экстрактов чаги, полученные по разным методикам с применением разных экстрагентов. Эти экстракты неоднородны по физико-химическому составу и обладают разной биологической активностью [8, 10, 11].

В настоящее время на российском рынке присутствуют различные препараты на основе чаги – Чага (березовый гриб) в виде лекарственной формы чага измельченная и гриба березового экстракт + кобальта хлорид (Бефунгин) в виде раствора или концентрата для приема внутрь. Действие препарата Бефунгин определяется эффектом входящих в состав БАВ (полисахариды, гуминоподобная чаговая кислота, органические кислоты, микроэлементы, в т.ч. марганец и кобальт, стероидные и другие соединения). Препарат регулирует метаболические процессы, повышает защитные силы организма, действует как общеукрепляющее средство [12].

Иркутская компания ООО «СибПрибор» занимается вопросами лечебно-профилактической медицины с использованием ЛРС. Авторская технология водного экстрагирования березового гриба чага разрабатывалась группой ученых около 10 лет. Сегодня под торговой маркой «Байкальская Легенда» компания производит БАД «БиоЧага» в виде порошка для приема внутрь, содержащий сублимированный экстракт чаги. Технологические особенности производства позволяют получить экстракт фармакопейного качества с высоким содержанием БАВ в их активной форме и с моментальным растворением в обычной питьевой воде, что указывает на его потенциально высокую биодоступность.

Экстракт «БиоЧага» получают при помощи водной экстракции. Одной из особенностей технологии является низкотемпературное экстрагирование, что позволяет максимально сохранить БАВ исходного сырья. Для экстракции используются только экологически чистое сырье чаги, собранной в Прибайкалье, и специально подготовленная вода с последующей сублимационной сушкой. В результате получается экстракт «БиоЧага» с низкой плотностью, который полностью растворяется в холодной воде и на 100% состоит из активной действующей субстанции.

Целью исследования было комплексное изучение состава и содержания БАВ и биологической активности экстракта «БиоЧага» в связи с особенностями технологии его производства.

Материал и методы

Для изучения физико-химических свойств и биологической активности сублимированного экстракта березового гриба чага «БиоЧага» на базе Бурятского научного центра сибирского отделения Российской академии наук (БНЦ СО РАН) института общей и экспериментальной биологии проведен комплекс лабораторных исследований, в результате которых были изучены физико-химические показатели экстракта и его биологическая активность.

Определение физико-химических показателей экстракта березового гриба чага «БиоЧага»

1. Содержание экстрактивных веществ (водорастворимых компонентов экстракта экстракта «БиоЧага») проводили согласно методике, описанной в Государственной Фармакопее РФ [13]. В качестве оборудования использовались весы электронные лабораторные HTR-220CE.

2. Определение зольности экстракта «БиоЧага» проводилось на весах электронных лабораторных HTR-220CE (Япония) [13].

3. Содержание водорастворимых полисахаридов (ВРПС) методом спектрофотометрии определялось при помощи прибора Спектрофотометр ПЭ-5400УФ (ЭКРОС, СПб);

4. Определение содержания низкомолекулярных фенольных соединений (НФС) в экстракте «БиоЧага» исследовали методом спектрофотометрии. Для исследования применяли спектрофотометр ПЭ-5400УФ по методике модифицированного метода Фолин-Дениса.

5. Содержание высокомолекулярных фенольных соединений (ВФС), хромогенный комплекс, меланин) определялось при помощи прибора «Весы электронные лабораторные HTR-220CE» (Shinko Denshi, Япония) [13].

6. Молекулярные фрагменты меланина определялись методом высокоэффективный жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) при помощи прибора «Хроматограф микроколоночный милихром А-02» («Эконова», Новосибирск). Методика заключалась в следующем: навеску меланина (20 мг) нагревали при 250°С со 100 мг тонкоизмельченного КОН в течение 4 мин. После охлаждения смесь растворяли в 5 мл воды, раствор нейтрализовали раствором 80% серной кислоты до pH 4–5 и подвергали полученную смесь жидкофазной экстракции этилацетатом (3-кратно по 2 мл). Экстракты объединяли, концентрировали в вакууме досуха, сухой остаток растворяли в 100 мкл метанола и анализировали методом ВЭЖХ. Условия ВЭЖХ: колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2×75 мм, 5 мкм; Metrohm AG); подвижная фаза: 0,2 М $LiClO_4$ в 0,006 М $HClO_4$ (A), MeCN (B); градиентный режим (% B): 0–6 мин 5–15%, 6–10 мин 15%, 10–16 мин 15–25%, 16–20 мин 25–90%; ν 150 мкл/мин; температура колонки 35°С; УФ-детекция при длине волны 270 нм.

Определение биологической активности экстракта «БиоЧага»

1. Антиоксидантный потенциал экстракта «БиоЧага» исследован 2 способами: определение общего антиоксидантного потенциала (ОАП) и определение Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) – способности поглощения кислородных радикалов. Показатель ОАП представляет собой аддитивный потенциал препарата к проявлению антиоксидантных свойств и выражается в эквивалентах какого-либо антиоксиданта, в данном случае – галловой кислоты (мг экв. галл. кислоты/г). Определяли методом спектрофотометрии при помощи прибора спектрофотометр ПЭ-5400 УФ (ЭКРОС, СПб) [14]. ORAC определяли методом флуориметрии при помощи прибора флуориметр КВАНТ-9 (ОАО «Барнаульское ОКБА») по методике BioTek Instruments, Inc, Applicat ion Note, Performing Oxygen Radical Absorbance Capacit y Assays with Synergy™HT. Антирадикальная активность к органическим радикалам искусственного и естественного происхождения измерялась методом спектрофотометрии на спектрофотометре ПЭ-5400УФ (ЭКРОС, СПб) [15].

2. Антирадикальная активность против неорганических радикалов (радикал Br• и Cl•) проводили методом кулонометрии при помощи прибора Кулонометр Эксперт 006 (Эконикс Эксперт, Россия) [16].

3. Железовосстановительная и железохелатирующая способность экстракта «БиоЧага» определялась методом спектрофотометрии на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ (ЭКРОС, СПб) [16,17].

4. Связывание экстракта «БиоЧага» оксида азота (NO) определяли методом спектрофотометрии при помощи прибора Спектрофотометр ПЭ-5400 УФ [18].

5. Исследование защиты органического субстрата от окислительного стресса, вызванного липопероксидами, проводилось методом спектрометрии при помощи прибора Спектрофотометр ПЭ-5400 УФ [17]. Данная модель позволяет изучить способность данного средства к защите органического субстрата, аналогом в живом организме является клеточная стенка. В качестве источника повреждения служит целый каскад перекисных компонентов, образующихся в результате реакции пероксида водорода, диметилсульфоксида и арахидоновой кислоты. Если показатель IC50 <50 мкг/мл, то средство можно считать потенциально протекторным для защиты клеточной мембраны.

Результаты и обсуждение

В результате изучения физико-химического состава экстракта «БиоЧага» показано, что он указывает на экстрактивный препарат из трутовика скошенного (*Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pil.).

Содержание экстрактивных веществ (водорастворимых) в образцах «БиоЧага» составило 92,2±2,3% (табл. 1). Данный показатель характеризует содержание соединений, обладающих потенциальной биодоступностью ввиду их хорошей растворимости в воде. Показатель зольности для экстракта «БиоЧага» составил 7,85±0,31%, что соответствует ГФ XIV (см. табл. 1). Показатель ВРПС

составил 2,54±0,06%, он указывает на то, что препарат нативный и не подвергался дополнительной очистке (см. табл. 1).

Показатель НФС «БиоЧага» составляет 57,00±1,48 мг/кг, что является основным химическим показателем содержания антиоксидантов в продукте (см. табл. 1).

Показатель ВФС составил 24,9±1,2% (см. табл. 1), что свидетельствует о присутствии в образце так называемого меланоуглеводного/хромогенного комплекса (меланина) (см. табл. 1).

Для определения биологической активности класса ВФС методом ВЭЖХ проведено исследование по выделению молекулярных фрагментов меланина, которые отличаются по своим свойствам. В продуктах щелочной деструкции экстракта «БиоЧага» обнаружено 5 молекулярных фрагментов меланина – 4-дигидроксибензойная кислота (2%), 3,4-дигидроксибензойная кислота (82%), 4-метилбензойная кислота (3%), 3,4-диметилоксибензойная кислота (8%), 3,5-диметокси-4-гидроксибензойная кислота (5%).

Характер щелочного расщепления свидетельствует о том, что меланин экстракта «БиоЧага» содержал в составе преимущественно фрагменты пирокатехинового и пирогаллового типов, распадающихся до 3,4-дизамещенных кислот. Высокое содержание 3,4-дигидрокси-фрагментов предполагает наличие у меланина выраженных антиоксидантных свойств.

Содержание ВРПС составило 2,54±0,06% (см. табл. 1), данная группа соединений является сопутствующей для меланинсодержащих препаратов и свидетельствует о том, что экстракт не подвергался дополнительным процедурам очистки.

Таким образом, по физико-химическому составу «БиоЧага» является нативным экстрактом, не подвергавшийся дополнительной химической очистке, который представлен в форме порошка с низкой плотностью с высоким содержанием антиоксидантов в биологически активной форме.

Для подтверждения биологической активности экстракта «БиоЧага» проведены исследования, показывающие ее антиоксидантное, антирадикальное, железовосстановительное и железохелатирующее действие (табл. 1–6). Так же экстракт «БиоЧага» исследовался на эффективность в отношении ингибирования NO и как средство защиты органического субстрата от окислительного стресса, вызванного липопероксидами.

ОАП экстракта «БиоЧага» составил 73,1±2,9 мг экв. галл. кислоты/г, что подтверждает его высокие антиоксидантные свойства (см. табл. 2). Это свойство коррелирует с высоким содержанием НФС (см. табл. 1) и доминирующим распределением 3,4-дигидрокси-фрагментов в меланине экстракта «БиоЧага».

Таблица 1

Физико-химические показатели экстракта «БиоЧага»

Table 1

Physical and chemical parameters of «BioChaga»

Содержание	Метод	X±SD, %
Водорастворимых компонентов	Экстракция/гравиметрия (Фармокопея XIII изд., т. 1)	92,2±2,3
Зола	Озоление/гравиметрия	7,85±0,31
НФС	Метод спектрофотометрии (модифицированный метод Фолин-Дениса)	57,00±1,48
ВФС	Экстракция/гравиметрия (методика Фармокопея XIII изд., т.1)	24,9±1,2
ВРПС	Спектрометрия Модифицированный метод Дрейвуда (2006)	2,54±0,06

Таблица 2

Показатели антиоксидантной активности экстракта «БиоЧага»

Table 2

Indicators of antioxidant activity of the «BioChaga» extract

Свойство	Метод	Показатель
Антиоксидантное	ORAC, флуориметрия, мкМТЕ/г	1859±42
Антиоксидантное	TAC ОАП, спектрометрия, мг экв. галл. кислоты/г	73,1±2,9

Таблица 3

Сравнительные значения ORAC экстракта «БиоЧага» и других антиоксидантов

Table 3

Comparative ORAC values of «BioChaga» and other antioxidants

Препарат	ORAC, мкМ ТЕ/г
«БиоЧага»	1859±42
Катехин	27042±703
Аскорбиновая кислота	2185±56
Витамин Е	1247±31

Примечание. ТЕ – эквиваленты тролокса (ORAC тролокса – 4000 мкМ ТЕ/г)
Note. TE = trolox equivalents (trolox ORAC = 4000 μM TE/g)

Антиоксидантная активность экстракта «БиоЧага» по методу ORAC составила 1859 мкМ TE/г), что превышает таковую у витамина Е (1247 мкМ TE/г) и была близка к эффективности аскорбиновой кислоты (2185 мкМ TE/г) (табл. 3).

Антирадикальное действие экстракта «БиоЧага» показано в отношении органических и неорганических искусственных и естественных свободных радикалов (см. табл. 4, 5).

Исследование антирадикальной активности против нейтрального радикала DPPH (искусственный радикал) показало, что препарат «БиоЧага» является активным с показателем 50% связывания радикалов 55,8 мкг/мл, против катион-радикала ABTS (искусственный радикал). Показана высокая активность с показателем 50% связывания радикалов 37,4 мкг/мл. Кроме того, «БиоЧага» показала хорошие значения в отношении N-центрированного радикала DMPD (искусственный радикал) с показателем 50% связывания радикалов 82,1 мкг/мл.

Исследование антирадикальной активности против естественных радикалов, супероксидного и гидроксильного радикалов показало, что препарат «БиоЧага» является активным средством с хорошим показателем (50%) связывания радикалов 51,7 и 82,3 мкг/мл соответственно.

Исследование антирадикальной активности против радикала брома (неорганический искусственный радикал) и радикала хлора (неорганический естественный радикал) показало, что «БиоЧага» обладает хорошей способностью связывать данные радикалы с показателями 285,75±7,14 и 252,16±6,5 мг экв./г соответственно. Антирадикальные свойства экстракта «БиоЧага» могут быть оценены как перспективные средства в борьбе с органическими и неорганическими оксидантами эндогенного и экзогенного характера для детоксикации организма.

Железовосстановительная (показатель, характеризующий потенциальную способность средства к восстановлению свободных радикалов) и железохелатирущая способности экстракта «БиоЧага» показана в табл. 6. Показатели в диапазоне 2–5 мМ Fe^{2+}/г свидетельствует об очень высокой активности средства. Ионы Fe^{2+} являются активными участниками процесса дестабилизации антиоксидантного равновесия в живом организме, образуя в присутствии пероксида водорода так называемый реактив Фентона – естественный катализатор процессов пероксидации. Меланины как естественные фенольные сетки со свободными карбокисльными и гидроксильными группами обладают способностью к связыванию (хелатированию) данных ионов. Препарат «БиоЧага» ввиду высокого содержания меланина обладает хорошей способностью к связыванию ионов Fe^{2+} (16,7 мг Fe^{2+}/г) и характеризуется как сильный восстановитель, близкий по активности к аскорбиновой кислоте и ионолу.

Оксид азота (NO) является плейотропным медиатором ряда патологических процессов в живом организме, включая воспаление, окисли-

Таблица 4

Показатели антирадикальной активности экстракта «БиоЧага» к органическим радикалам искусственной и естественной природы радикалов неорганической природы

Table 4

Antiradical activity indicators of «BioChaga» to artificial and natural organic radicals

Показатель	Показатель IC, мкг/мл
DPPH нейтральный искусственный радикал	55,8±1,4
ABTS Катион-радикал искусственной природы	37,4±1,0
DMPD N-центрированный радикал	82,1±3,2
O_2 супероксид радикал	51,7±1,5
OH гидроксильный радикал	82,3±4,1

Таблица 5

Антирадикальная активность

Table 5

Antiradical activity against radicals of inorganic nature

Показатель	Эквиваленты галловой кислоты, мг экв./г
Радикал Br- (искусственный)	285,75±7,14
Радикал Cl- (естественный)	252,16±6,50

Таблица 6

Железовосстановительная и железохелатирущая способность экстракта «БиоЧага», мМ Fe^{2+}/г

Table 6

Iron-reducing and iron-chelating ability of «BioChaga», мМ Fe^{2+}/г

Показатель	Значение
Железовосстановительная способность	3,75±0,11
Железохелатирующая активность	16,7±0,6

тельный стресс и другие. Способность средства к инактивации NO демонстрирует его потенциальные антиоксидантные и противовоспалительные свойства. Показатель активности <500 мкг/мл указывает на активность продукта в отношении связывания NO. У экстракта «БиоЧага» этот показатель составил ~300 IC50 мкг/мл, что демонстрирует его противовоспалительный потенциал.

Изучены также протективные свойства экстракта «БиоЧага» в экспериментальной модели повреждения органического субстрата (имитация клеточной стенки) от окислительных повреждений, вызванных липопероксидными соединениями. Показано, что «БиоЧага» хорошо защищает гидрофильные компоненты клеточной мембраны (IC50 мкг/мл – 32,2±1,1). Однако протекторные свойства к липофильным компонентам показали средние значения (IC50 мкг/мл – 76,7±3,0).

Данные исследования подтверждают протекторное действие экстракта «БиоЧага» на компоненты клетки, в том числе генетический аппарат, которые были выявлены в экспериментальном исследовании антигенотоксического действия экстракта «БиоЧага» [9].

Научная новизна состоит в изучения физико-химических особенностей экстракта «БиоЧага» ввиду особенностей технологии его производства. Кроме того, в исследовании применен широкий спектр методик, определяющих биологическую активность экстракта.

Очевидно, что высокие показатели НФС и ВФС с особым распределением молекулярных фрагментов меланина (о-диоксибензоильных фрагментов) объясняется особенностями технологии производства данного экстракта. Это обеспечивает его высокие антиоксидантные, антирадикальные и железовосстановительные свойства. Также в исследованиях «БиоЧага» отмечен выраженный противовоспалительный эффект (инактивирует молекулы NO) и оказывает сильное защитное действие вызванного липопероксидами на гидрофильные компоненты клеточной мембраны.

Таким образом, данное исследование определяет клинический потенциал экстракта «БиоЧага» и показывает основные направления его использования. Основываясь на этих данных, экстракт березового гриба чага «БиоЧага» можно рекомендовать как профилактическое средство защиты клеток организма и генетического материала от избыточного воздействия оксидантов с целью снижения риска ряда хронических заболеваний, включая рак, сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет и нейродегенеративные расстройства, что также подтверждено в ряде исследований [4, 6, 9, 19].

Заключение

Созданный по уникальной авторской технологии новый высококачественный экстракт березового гриба чага «БиоЧага» является высокоактивным природным комплексным средством, характеризуемым выраженной антиоксидантной активностью. Его высокая биологическая активность указывает на эффективность экстракта и позволяет рекомендовать его в качестве средства профилактики и защиты от оксидативного стресса.

Конфликт интересов
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest

Литература/References

1. Струпан Е.А., Колодязная В.С., Струпан О.А Технология получения экстрактов из дикорастущего растительного сырья, широко применяемого в пищевой промышленности и фитотерапии. Вестник КрасГАУ. 2012; 8: 199–205. [Strupan E.A., Kolodyaznaya V.S., Strupan O.A. Technology for obtaining extracts from wild plant raw materials widely used in the food industry and phytotherapy. Bulletin of KrasGAU. 2012; 8: 199–205 (in Russian)].

2. Хасанов В.В., Слижов Ю.Г., Чумаков А.А., Бажина С.В «Анализ состава и свойств сырья березового гриба чаги *Inonotus obliquus* (PERS.) PILAT, собранного в пермской области. Химия растительного сырья. 2015; 2: 43–8. [Khasanov V.V., Slizhov Yu.G., Chumakov A.A., Bazhina S.V. Analysis of the composition and properties of raw materials of the birch fungus chaga *Inonotus obliquus* (PERS.) PILAT collected in the Perm region. Chemistry of plant raw materials. 2015; 2: 43–8 (in Russian)]. DOI: 10.14258/jcprm.201502533

3. Салова Т.Ю., Громова Н.Ю. Теоретические аспекты получения биологически активных веществ из растительного и животного сырья. Успехи современного естествознания. 2016; 3: 39–43. [Salova T.Yu., Gromova N.Yu. Theoretical aspects of obtaining biologically active substances from plant and animal raw materials. The successes of modern natural science. 2016; 3: 39–43 (in Russian)].

4. Баландайкин М.Э. К вопросу об изучении химической структуры и лечебных свойств *Inonotus obliquus* (PERS.) Pil. Химия растительного сырья. 2013; 2: 15–22. [Balandaykin M.E. On the study of the chemical structure and medicinal properties of *Inonotus obliquus* (PERS.) Chemistry of plant raw materials. 2013; 2: 15–22. (in Russian)]. DOI: 10.14258/jcprm.1302015

5. Переведенцева Л. Использование дикорастущих грибов в лечебных целях в Пермском крае, Россия. Экология и инженерия. 2013; 2: 236–42. [Perevedentseva L. The use of wild mushrooms for medicinal purposes in the Perm Region, Russia. Ecology and engineering. 2013; 2: 236–42 (in Russian)].

6. Змитрович И.В., Денисова Н.П., Баландайкин М.Э. и др. Чага и ее биоактивные комплексы: история и перспективы. Формулы фармации. 2020; 2 (2): 84–93. [Zmitrovich I.V., Denisova N.P., Balandaykin M.E. et al. Chaga and its bioactive complexes: history and prospects. Pharmacy formulas. 2020; 2 (2): 84–93 (in Russian)]. DOI: 10.17816/phf34803

7. Ma L., Cen H., Dong P., Lu H. et al. Anti-inflammatory and antitumor activity of extracts and compounds from the fungus ***Inonotus obliquus***. Food Chem. 2013; 139 (1–4): 503–8. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.01.030

8. Семенова Е.В., Тюменцева В.Р., Козубенко А.А. и др. Биологически активные соединения грибов – источник инноваций в медицине. Современные проблемы науки и образования. 2020; 1. Доступно на: https://science-education.ru/ru/article/view?id=29455. [Semenova E.V., Tyumentseva V.R., Kozubenko A.A. et al. Biologically active compounds of fungi are a source of innovation in medicine. Modern problems of science and education. 2020; 1. Available at: https://science-education.ru/ru/article/view?id=29455 (in Russian)].

9. Сысоева М.А, Хабибрахманова В.Р., Гамаюрова В.С. и др. Исследование золя водных извлечений чаги. XII. Осаждение дисперстной фазы водного извлечения чаги при изменении pH среды. Химия растительного сырья. 2009; 1: 131–5. [Sysoeva M.A., Khabibrakhmanova V.R., Gamayurova V.S. et al. Investigation of sol of aqueous extracts of chaga. XII. Precipitation of the dispersed phase of aqueous extraction of chaga with a change in the pH of the medium. Chemistry of plant raw materials. 2009; 1: 131–5 (in Russian)].

10. Živković L., Bajić V., Topalović D. et al. Antigenotoxic Effects of Biochaga and Dihydroquercetin (Taxifolin) on H2O2-Induced DNA Damage in Human Whole Blood Cells. Oxid Med Cell Longev. 2019; 2019: 5039372. DOI: 10.1155/2019/5039372.

11. Olennikov D., Tankhaeva L.M., Rokhin A.V. et al. Physicochemical properties and antioxidant activity of melanin fractions from Inonotus obliquus sclerotia. Chemistry of Natural Compounds. 2012; 48 (3). DOI:10.1007/s10600-012-0260-y

12. Государственный реестр лекарственных средств. ***https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx*** [State Register of Medicines. ***https://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx*** (in Russian)].

13. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Москва, 2018. [The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition Moscow, 2018. (in Russian)].

14. Prieto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Anal Biochem. 1999; 269 (2): 337–41. DOI: 10.1006/abio.1999.4019.

15. Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Flavonoids. Phytochemistry, 2006; 67: 2058–70. ***http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.002***

16. Yen G.-C., Su H.-J., Yeh C.-T., Wu C.-H., Duh P.-D. scavenging effects of lotus seed extracts on reactive nitrogen species. 2006; 94 (4): 596–602 DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.11.052

17. Potapovich M.V., Metelitza D.I., Shadyro O.I., Kurchenko V.P. Antioxidant activity of oxygen-containing aromatic compounds. Appl. Biochem. Microbiol. 2011; 47 (4): 346–55. DOI: 10.1134/S0003683811040144

18. Zhou B., Guo Z., Xing J., Huang B. Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in Stylosanthes guianensis. Journal of Experimental Botany. 2005; 56: 3223–8.

19. Song F.Q., Liu Y., Kong X.S. et al. Progress on understanding the anticancer mechanisms of medicinal mushroom: Inonotus obliquus. Asian Pac J. Cancer Prev. 2013; 14 (3): 1571–8. DOI: 10.7314/apjcp.2013.14.3.1571

Поступила *10 февраля 2022 г.*
Received *10 February 2022*

Принята к публикации *24 февраля 2022 г.*
Accepted *24 February 2022*

УДК 615.322/.454.1:582.284]:615.07 doi: 10.31549/2542-1174-2022-6-1-93-105

Экспериментальная оценка лечебных свойств мази на основе меланинов из природного сырья и глубинной культуры чаги

Е.А. Ставский[1], Т.В. Теплякова[2], И.С. Андреева[2], Е.С. Давыдова[1], А.А. Ставская[1], А.Л. Потешкина[2]

[1]*ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия*

[2]*ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, пос. Кольцово, Россия*

АННОТАЦИЯ

Введение. В связи с приобретением устойчивости к антибиотикам гноеродной микробиоты обострилась проблема местного (медикаментозного) лечения ран.

Цель. Экспериментальная оценка антибиотических свойств меланина из природного сырья и глубинной культуры чаги (*Inonotus obliquus*) *in vitro* и лечебных свойств мазей, приготовленных на основе указанных меланинов, *in vivo*.

Материалы и методы. Меланины получали методом щелочного гидролиза. Антибиотическую активность меланинов определяли при совместном культивировании в жидкой среде исследуемых образцов с шестью культурами тест-штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий и двух дрожжевых грибов. Мази на основе меланина из природного сырья и глубинной культуры чаги штамма *Inonotus obliquus* F-1244 получали с использованием двух составов мазевых основ. Ранозаживляющую эффективность мазей оценивали на трех группах мышей. Контрольными являлись группы мышей, ничем не леченных и леченных мазью сравнения Левомикон-ТФФ. Лечение мышей продолжали до момента заживления у них резаных кожных ран. Ежедневно у мышей во всех группах оценивали площади ран, двигательную активность, аппетит, динамику и характер заживления ран, а также через каждые трое суток изменение у них массы тела.

Результаты. Меланины из природного сырья и глубинной культуры чаги полностью подавляли размножение грамположительной спорообразующей бактерии *Bacillus cereus* в совместной культуре. Меланин из природного сырья чаги в среднем на порядок подавлял рост золотистого стафилококка штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Меланин из глубинной культуры чаги полностью подавлял рост клинического изолята высокопатогенного штамма *Candida sp.* Ft-5 от умершего больного с генерализованной кандидозной инфекцией и в среднем на два порядка активнее ингибировал рост коллекционного штамма дрожжей *Candida albicans* 620.

Было установлено, что мази на основе меланина из природного сырья и глубинной культуры чаги, а также мазь, содержащая пятикратно увеличенную концентрацию меланина из природной чаги, не обладают токсичностью для экспериментальных животных. Мази, содержащие по 0.4 мг меланина из природного сырья и глубинной культуры чаги на 0.2 г одноразовой дозы мази, обладали одинаковой ранозаживляющей эффективностью, при этом не только не уступали по этому показателю комбинированному противомикробному препарату сравнения Левомикон-ТФФ, но и продемонстрировали тенденцию более ускоренного заживления ран (на 15–18-е сутки наблюдения) по сравнению с процессом регенерации ран у группы животных, леченных препаратом сравнения. Был продемонстрирован более ускоренный эффект заживления ран у экспериментальных животных (уже на 12-е сутки наблюдения), леченных с пятикратно увеличенным содержанием меланина из природного сырья чаги, по сравнению с мышами, леченными препаратом сравнения.

Заключение. Мази, содержащие меланин чаги (*Inonotus obliquus*), обладают противовоспалительными, регенеративными свойствами и могут рассматриваться в качестве перспективных для местного лечения ран.

Ключевые слова: высшие базидиомицеты, гриб чага (*Inonotus obliquus*), мазь, мазевая основа, состав, пропись, поверхностная кожная рана.

Образец цитирования: Ставский Е.А., Теплякова Т.В., Андреева И.С., Давыдова Е.С., Ставская А.А., Потешкина А.Л. Экспериментальная оценка лечебных свойств мази на основе меланинов из природного сырья и глубинной культуры чаги // Journal of Siberian Medical Sciences. 2022;6(1):93–105. doi: 10.31549/2542-1174-2022-6-1-93-105

Поступила в редакцию 16.06.2021
Прошла рецензирование 27.09.2021
Принята к публикации 15.10.2021

Автор, ответственный за переписку
Ставский Евгений Александрович: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: stavskiyngmu@mail.ru

Received 16.06.2021
Revised 27.09.2021
Accepted 15.10.2021

Corresponding author
Evgeniy A. Stavsky: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: stavskiyngmu@mail.ru

Experimental evaluation of therapeutic properties of ointment based on melanins from natural raw material and a submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus*)

E.A. Stavsky[1], T.V. Teplyakova[2], I.S. Andreeva[2], E.S. Davydova[1], A.A. Stavskaya[1], A.L. Poteshkina[2]

[1]*Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*

[2]*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo village, Russia*

ABSTRACT

Introduction. Due to the acquisition of antibiotic resistance by pyogenic microbiota, the problem of topical (drug) treatment of wounds has worsened.

Aim. Experimental evaluation of the antibiotic properties of melanin from natural raw material and a submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus*) *in vitro* and the therapeutic properties of ointments prepared on the basis of these melanins *in vivo*.

Materials and Methods. Melanins were obtained by alkaline hydrolysis. The antibiotic activity of melanins was determined by co-cultivation in a liquid medium of the studied samples with six cultures of test strains of gram-negative and gram-positive bacteria and two of yeast fungi. Ointments based on melanin from natural raw material and the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) were obtained using two compositions of ointment base. The wound-healing efficacy of ointments was evaluated on three groups of mice. The control groups were mice untreated and treated with a comparison drug (Levomikon-TFF). The treatment of mice was continued until their incised skin wounds healed. Wound areas, motor activity, appetite, dynamics and character of wound healing were assessed daily in mice of all groups, as well as changes in their body weight every three days.

Results. Melanins from natural raw materials and the submerged culture of chaga completely suppressed the growth of gram-positive spore-forming *Bacillus cereus* bacterium in a co-culture. Melanin from natural raw material of chaga on average suppressed the growth of the *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 strain by an order of magnitude. Melanin from the submerged chaga culture completely suppressed the growth of a clinical isolate of the highly pathogenic *Candida sp*. Ft-5 strain from a deceased patient with generalized candida infection and, on average, inhibited the growth of the collection strain of yeast *Candida albicans* 620 by two orders of magnitude more intensively.

It was found that ointments based on melanin from natural raw materials and the submerged culture of chaga, as well as ointment containing a fivefold increased concentration of melanin from natural chaga, do not have toxicity to experimental animals. Ointments containing 0.4 mg of melanin from natural raw material and the submerged chaga culture per 0.2 g of a single dose of ointment had the same wound healing efficacy, while not only were not inferior in this indicator to the combined antimicrobial comparison drug Levomikon-TFF, but also showed a tendency to more accelerated wound healing (on the 15–18th day of observation) compared with the process of wound regeneration in the group of animals treated with the drug of comparison. A more accelerated wound healing effect was demonstrated in experimental animals (already on the 12th day of observation) treated with a fivefold increased content of melanin from natural raw material of chaga, compared with mice treated with the comparison drug.

Conclusion. Ointments containing melanin of chaga (*Inonotus obliquus*) have anti-inflammatory, regenerative properties and can be considered promising for topical treatment of wounds.

Keywords: higher basidiomycetes, chaga mushroom (*Inonotus obliquus*), ointment, ointment base, formulation, prescription, superficial wound.

Citation example: Stavsky E.A., Teplyakova T.V., Andreeva I.S., Davydova E.S., Stavskaya A.A., Poteshkina A.L. Experimental evaluation of therapeutic properties of ointment based on melanins from natural raw material and a submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus*). *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2022;6(1):93–105. doi: 10.31549/2542-1174-2022-6-1-93-105

ВВЕДЕНИЕ

Исследования показали, что высшие базидиомицеты способны синтезировать широкий комплекс биологически активных веществ, таких как полисахариды, гликопротеины, терпены, стеролы, пигменты и др. [1–5], которые могут проявлять антибактериальные [1, 6], противовирус-

INTRODUCTION

Studies have shown that higher basidiomycetes are able to synthesize a wide range of biologically active substances, such as polysaccharides, glycoproteins, terpenes, sterols, pigments, etc. [1–5], which can exhibit antibacterial [1, 6], antiviral [1, 7–12], antitumor, antiparasitic, and immunomodulatory

ные [1, 7–12], противоопухолевые, антипаразитарные и иммуномодулирующие свойства [1–3]. При этом указанные комплексы из базидиомицетов, как правило, не являются токсичными или малотоксичны для человека или животных [1–7]. В связи с нарастающей бактериальной устойчивостью к применяющимся антибиотикам, большим количеством нежелательных побочных последствий антибиотиков для организма человека и животных, измененной реактивностью организма, прежде всего человека, обусловившими актуальность проблемы как общей антибиотикотерапии, так и местного (медикаментозного) лечения ран из-за растущей резистентности гноеродной микробиоты, возник заметный интерес к созданию на основе высших базидиомицетов и представителей других систематических групп грибов [1] новых антибиотиков. Известно большое количество различных лекарственных препаратов для лечения гнойных ран. По характеру своего действия эти препараты могут быть объединены в следующие основные группы: препараты отсасывающего действия, включающие солевые растворы, сорбенты и др.; раневые бактериофаги, микробные ассоциации и др.; препараты некролитического действия, включающие протеолитические ферменты, кислоты, антисептики; препараты антимикробного действия, в состав которых входят антибиотики и др. [13–16]. Учитывая тот факт, что высшие базидиальные грибы продуцируют широкий спектр биологически активных веществ, представляется актуальным оценить, в частности, перспективность использования и практическую значимость меланинов указанных грибов [4–5], а также возможность создания на их основе мазей для местного лечения ран.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная оценка антибиотических свойств меланина из природного сырья и глубинной культуры чаги *in vitro* и лечебных свойств мазей, приготовленных на основе указанных меланинов, *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С целью оценки биологических свойств меланинов чаги определяли их антибактериальную и антигрибковую активности при совместном культивировании в жидкой среде исследуемых образцов с культурами тест-штаммов грамотрицательных и грамположительных бактерий и дрожжевых грибов, являющихся, наряду с другими микробами, наиболее частой причиной развития

properties [1–3]. At the same time, these complexes from basidiomycetes, as a rule, are not toxic or low-toxic to humans or animals [1–7]. Due to the increasing bacterial resistance to the antibiotics used, a large number of adverse effects of antibiotics for the human and animal body, the altered reactivity of the body, primarily human, which caused the urgency of the problem of both general antibiotic therapy and topical (drug) treatment of wounds due to the growing resistance of the pyogenic microbiota, there was a noticeable interest in the creation of new antibiotics based on higher basidiomycetes and representatives of other systematic groups of fungi [1]. A large number of different medications for the treatment of purulent wounds are known. By the nature of their action, these medicines can be combined into the following main groups: sump action preparations, including saline solutions, sorbents, etc.; wound bacteriophages, microbial associations, etc.; necrolytic drugs, including proteolytic enzymes, acids, antiseptics; antimicrobial drugs, which include antibiotics, etc. [13–16]. Considering the fact that higher basidiomycetes fungi produce a wide range of biologically active substances, it seems relevant to assess, in particular, the prospects for the use and practical significance of melanins of these fungi [4–5], as well as the possibility of creating ointments based on them for topical wound treatment.

AIM OF THE RESEARCH

Experimental evaluation of the antibiotic properties of melanin from natural raw material and a submerged culture of chaga *in vitro,* and the therapeutic properties of ointments prepared on the basis of these melanins *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

In order to assess the biological properties of the melanins of chaga, their antibacterial and antifungal activity was determined when the studied samples were co-cultured in a liquid medium with cultures of test strains of gram-negative and gram-positive bacteria and yeast fungi, which, along with other microbes, are the most common cause of wound infection. These strains of microorganisms are deposited in the museum collection of the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” (Vector Research Center) and belong to the 3–4th group of pathogenicity for humans [17]. The studied 0.5 ml chaga samples were introduced into test tubes with 4.5 ml of LB medium (Difco, USA), and 0.1 ml of 24 hour culture of the test strain of the microorganism suspended in saline solution was added to gain optical density of 10^{5-6} cell/ml. Fur-

раневой инфекции. Указанные штаммы микроорганизмов депонированы в музейной коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (научный центр «Вектор») и относятся к 3–4-й группе патогенности для человека [17]. Исследуемые образцы чаги по 0.5 мл вносили в пробирки с 4.5 мл среды LB (Difco, USA) и добавляли 0.1 мл суточной культуры тест-штамма микроорганизма, суспендированной в физиологическом растворе, до оптической плотности 10^{5-6} кл/мл. Далее пробирки с культурами и образцами выдерживали в аэрируемых условиях на термостатируемой качалке при температуре 37 °С в течение 18–24 ч. Полученные культуральные жидкости (КЖ) и их десятикратные разведения (до 10^{-7}) высевали методом микротитрования по 10 мкл, в 3 повторах на агаризованную среду LB. Инкубировали высевы в термостате при температуре 37 °С в течение 18–24 ч, после чего подсчитывали количество выросших колоний для определения КОЕ/мл в неразведенной («исходной») суспензии. В качестве контроля определяли титр клеток в суспензии тест-штаммов, инкубированных в аналогичных условиях, без добавления исследуемых образцов.

Для оценки лечебных свойств меланина *in vivo* получали мази на основе меланина из природного сырья чаги (*Inonotus obliquus*) и мази на основе меланина из глубинной культуры оригинального штамма чаги *Inonotus obliquus* F-1244, полученного в научном центре «Вектор» и депонированного в его музейной коллекции. Из измельченного природного сырья березового гриба (чаги) меланин получали методом щелочного гидролиза [8], а из глубинной культуры *Inonotus obliquus* F-1244 – согласно [10] и лабораторному регламенту на получение меланина на основе штамма *Inonotus obliquus* F-1244 (ЛР 056640012-037-16), разработанному в лаборатории микологии научного центра «Вектор». Полученные пигменты идентифицировали при помощи качественных реакций [5, 8, 10]. Свойства обоих видов указанных меланинов соответствовали предъявляемым требованиям на субстанцию «Меланин чаги» (ЛР 056640012-037-16): внешний вид – порошок темно-коричневого цвета; массовая доля влаги – не более 9.0 ± 1.0 %; водородный показатель 0.001 % раствора pH – 7.5 ± 0.5; оптическая плотность 0.001% раствора при длине волны 465 нм – не менее 0.04 ед. оптической плотности.

Для получения 25.0 г меланинсодержащей мази использовали по 50 мг обоих видов меланина, растворенных в 12 мл изотонического рас-

ther, the tubes with cultures and samples were kept in aerated conditions on a shaking bath at a temperature of 37°C for 18–24 h. The obtained culture fluids and their tenfold dilutions (up to 10^{-7}) were plated by microtitering by 10 μl, in 3 repetitions on LB agar medium. The inoculations were incubated in a thermostat at 37°C for 18–24 h, after which the number of grown colonies was calculated to determine CFU/ml in an undiluted (initial) suspension. As a control, the cell titer was determined in a suspension of test strains incubated under similar conditions without adding the test samples.

To assess the health benefits of melanin *in vivo*, ointments based on melanin from natural raw material of chaga (*Inonotus obliquus*) and ointments based on melanin from a submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 original strain), obtained at the Vector Research Center and deposited in its museum collection, were obtained. Melanin was obtained from crushed natural raw material of chaga mushroom by alkaline hydrolysis [8], and from the submerged culture of *Inonotus obliquus* F-1244 according to [10] and laboratory regulations for the production of melanin based on the *Inonotus obliquus* F-1244 strain (LR 056640012-037-16), developed in the Laboratory of Mycology of the Vector Research Center. The obtained pigments were identified using qualitative reactions [5, 8, 10]. The properties of both types of these melanins corresponded the requirements for the substance “Chaga Melanin” (LR 056640012-037-16): appearance – dark brown powder; mass fraction of moisture – no more than 9.0 ± 1.0%; 0.001% solution pH – 7.5 ± 0.5; optical density 0.001% solution at a wavelength of 465 nm – at least 0.04 units of optical density.

To obtain 25.0 g of melanin-containing ointment, 50 mg of both types of melanin dissolved in 12 ml of isotonic solution were used. Whereas two formulations of ointment bases were used.

According to the first formulation [18], the ointment bases were obtained at 50–60°C and with thorough mixing 7.0 g of vaseline oil and 3.0 g of T-2 and Twin-60 emulsifiers. The obtained bases were cooled to a temperature of 30–35°C, and solutions of natural and submerged melanins (formulations 1 and 2 respectively) were introduced into them with stirring. The obtained ointments were mixed to a state of homogeneity and packaged. The second formulation of the ointment base also included vaseline, but lanolin was used as an emulsifier. To obtain 25.0 g of ointment, 0.15 g melanin from natural raw material was ground to the impalpable powder in a porcelain mortar, then dissolved in 2.5 ml of saline solution,

твора. При этом мазевые основы использовали двух составов.

Согласно первому составу [18] мазевые основы получали при 50–60 °С и тщательном перемешивании 7.0 г вазелинового масла и по 3.0 г эмульгаторов Т-2 и Твин-60. Полученные основы охлаждали до температуры 30–35 °С и вносили в них при перемешивании растворы природного и «глубинного» меланинов (прописи мазей 1 и 2 соответственно). Полученные мази перемешивали до состояния гомогенности и расфасовывали. Второй состав мазевой основы включал также вазелин, но в качестве эмульгатора использовали ланолин. Для получения 25.0 г мази 0.15 г меланина из природного сырья чаги растирали до мельчайшего порошка в фарфоровой ступке, затем растворяли в 2.5 мл физиологического раствора, добавляли в качестве эмульгатора 2.5 г ланолина, затем 20.0 г вазелина, продолжая при этом растирание смеси в ступке при 50–60 °С до получения гомогенной мази, а затем расфасовывали (пропись мази 3). Полученные меланиновые мази указанных выше трех прописей представляли собой гомогенные темно-коричневого цвета смеси, аналогичные по своей консистенции мазевым лекарственным формам.

В качестве препарата сравнения применяли мазь Левомикон-ТФФ – серия 140718 (ООО «Тульская фармацевтическая фабрика», Россия, срок годности – до 01.2022). Препарат представляет собой однородный желеобразный продукт, используется в качестве комбинированного средства для местного применения. Действующим началом мази являются метилурацил – 4.00 г и хлорамфеникол – 0.75 г. Вспомогательные компоненты: макрогол-1500 – 19.05 г, макрогол-400 – 76.20 г. Мазь оказывает антимикробное действие, прежде всего за счет антибиотика широкого спектра действия хлорамфеникола. Метилурацил обладает анаболической активностью. Оказывает противовоспалительное, иммуностимулирующее, гемопоэтическое, лейкопоэтическое действие. Нормализуя нуклеиновый обмен, стимулирует процессы регенерации в ранах, рост, грануляционное созревание ткани и эпителизацию [19].

В опыте использовали здоровых неинбредных мышей массой тела 17–19 г колонии ICR обоего пола из питомника научного центра «Вектор». Животных распределяли по следующим группам (по 20 мышей в каждой):

• группа 1 – контрольная: мыши, ничем не леченные;

2.5 g of lanolin was added as an emulsifier, then 20.0 g of vaseline, while continuing to paste the mixture in the mortar at 50–60°C until a homogeneous ointment is obtained, and then packaged (ointment formulation 3). The resulting melanin ointments of the above three prescriptions were homogeneous dark brown mixtures similar in consistency to ointment dosage forms.

Levomikon-TFF ointment (batch 140718) was used as a comparison drug (Tula Pharmaceutical Factory, LLC, Russia, shelf life: up to 01.2022). The preparation is a homogeneous jelly-like product, used as a combined agent for topical application. The active ingredients of the ointment are methyluracil – 4.00 g and chloramphenicol – 0.75 g. Auxiliary components: macrogol-1500 – 19.05 g, macrogol-400 – 76.20 g. The ointment has an antimicrobial effect, primarily due to the broad-spectrum antibiotic agent chloramphenicol. Methyluracil has anabolic activity. It has an anti-inflammatory, immunostimulating, hematopoietic, leukopoietic effect. Normalizing nucleic metabolism, it stimulates regenerative processes in wounds, growth, maturation of granulation tissue and epithelization [19].

In the experiment, healthy non-inbred mice weighing 17–19 g of an ICR colony of both sexes from the nursery of the Vector Research Center were used. The animals were divided into the following groups (20 mice each):

• group 1 – control: untreated mice;

• group 2 – control: mice treated with the comparison drug;

• group 3 – experimental: animals treated with ointment containing melanin from natural raw material of chaga (*Inonotus obliquus*);

• group 4 – experimental: animals treated with ointment with melanin obtained on the basis of the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain);

• group 5 – experimental: animals treated with ointment with a 5-fold increased concentration of melanin from natural raw material of *Inonotus obliquus* compared with ointments for animals of groups 3–4.

After premedication of white mice with chloroform, on the back of the animals a flat incised wound was applied with non-sterile scissors without observing the rules of asepsis. Experimental animals of groups 2–4 were treated daily by applying 0.2 g of Levomikon-TFF ointment to wounds with a spatula (group 2) and 0.2 g of melanin ointment containing 0.4 mg of melanin (groups 3 and 4), for group 5 0.2 g of ointment with 2.0 mg of melanin was used. The treatment of mice was continued until their incised

• группа 2 – контрольная: мыши, леченные препаратом сравнения;

• группа 3 – опытная: животные, леченные мазью с меланином из природного сырья чаги (*Inonotus obliquus*);

• группа 4 – опытная: животные, леченные мазью с меланином, полученным на основе глубинной культуры штамма чаги *Inonotus obliquus* F-1244;

• группа 5 – опытная: животные, леченные мазью с увеличенной в 5 раз концентрацией меланина из природного сырья чаги по сравнению с мазями для животных групп 3–4.

После премедикации белых мышей хлороформом животным на спине наносили нестерильными ножницами без соблюдения правил асептики плоскую резаную рану. Экспериментальных животных групп 2–4 лечили ежедневно путем нанесения на раны шпателем 0.2 г мази Левомикон-ТФФ (группа 2) и по 0.2 г мази с меланином с содержанием в ней 0.4 мг меланина (группы 3 и 4), для группы 5 – 0.2 г мази с 2.0 мг меланина. Лечение мышей продолжали до момента заживления у них резаных ран. Ежедневно у мышей во всех группах оценивали площади ран по методу Л.Н. Поповой [20], двигательную активность, аппетит, динамику и характер заживления ран, а также через каждые трое суток – изменение у них массы тела.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментальной оценки антибиотических свойств меланина из природного сырья и глубинной культуры чаги *in vitro* представлены в табл. 1.

В ходе эксперимента было установлено, что водный экстракт чаги, меланины из природного сырья чаги и ее глубинной культуры штамма *Inonotus obliquus* F-1244 проявили высокую антибиотическую активность в отношении штамма грамположительной спорообразующей бактерии *Bacillus cereus*, полностью подавив ее размножение в совместной культуре. Меланин из природного сырья чаги в среднем на порядок с достоверностью 95 % подавлял рост золотистого стафилококка, штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Водный экстракт из природного сырья чаги и меланин из глубинной культуры штамма чаги *Inonotus obliquus* F-1244 проявили антагонистическую активность в отношении штаммов дрожжей – как коллекционного штамма *Candida albicans* 620, так и клинического изолята штамма *Candida sp*. Ft-5 от умершего больного с генерализованной кандидозной

wounds healed. The wound areas were evaluated daily in mice of all groups using the L.N. Popova method [20], then motor activity, appetite, dynamics and character of wound healing, as well as changes in their body weight were evaluated every three days.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the experimental evaluation of the antibiotic properties of melanin from natural raw material and the submerged culture of chaga *in vitro* are presented in Table 1.

During the experiment, it was found that the aqueous extract of chaga, melanins from natural raw material of chaga and its submerged culture (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) showed high antibiotic activity against the strain of the gram-positive spore-forming bacterium *Bacillus cereus*, completely suppressing its growth in a co-culture. Melanin from natural chaga raw material with 95% confidence suppressed the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 strain more activeley, on average, by an order of magnitude. An aqueous extract from natural chaga raw material and melanin from the submerged culture of the *Inonotus obliquus* F-1244 strain showed antagonistic activity against yeast strains, both the collection *Candida albicans* 620 strain and the clinical isolate of the *Candida sp*. Ft-5 strain from a deceased patient with generalized candida infection. In particular, the first sample reduced the number of viable cells of the *Candida albicans* 620 strain, compared to the control suspension, by an order of magnitude, on average; the second sample – by two orders of magnitude with 95% confidence. It should be particularly noted that the same chaga samples in the conditions of the experiment completely suppressed the growth of the highly pathogenic *Candida sp*. Ft-5 strain. However, samples of melanins isolated both from natural raw material and from the submerged culture of *Inonotus obliquus* F-1244, were expected to be inferior in their antibiotic effect on the studied cultures of test strains than the effect of the antibiotic chloramphenicol, since it has a pronounced bacteriostatic effect on at least 16 types of gram-positive and gram-negative bacteria [19]. Nevertheless, taking into account the experimental data obtained on the antibiotic activity of chaga melanins *in vitro*, as well as literature data on the presence and manifestation *in vivo* of a wide range of useful and positive properties by biologically active substances from higher basidiomycetes, it is possible and promising to include melanins in the composition of experimental ointments.

The results of an *in vivo* experimental evaluation of the therapeutic properties and toxicity of oint-

Таблица 1. Антибиотическая активность меланинов, выделенных из природного сырья чаги и ее глубинной культуры чаги штамма *Inonotus obliquus* F-1244
Table 1. Antibiotic activity of melanins isolated from natural raw material and the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain)

Тест-штаммы микроорганизмов Test strains of microorganisms	Группа патогенности Pathogenicity group	Окраска по Граму Gram staining	Водный экстракт из природного сырья чаги Aqueous extract from natural raw material of chaga	Меланин из природного сырья чаги Melanin from natural raw material of chaga	Меланин из глубинной культуры чаги F-1244 Melanin from the submerged culture of chaga F-1244	Хлорамфеникол Chloramphenicol	Контроль культуры тест-штамма Control of test strain culture
Бактерии / Bacteria							
Salmonella typhimurium 2606	3	–	$(1.4 \pm 0.4) \cdot 10^9$	$(1.6 \pm 0.3) \cdot 10^9$	$(1.3 \pm 0.3) \cdot 10^9$	Нет роста No growth	$(1.8 \pm 0.5) \cdot 10^9$
Staphylococcus aureus ATCC 6538	4	+	$(3.7 \pm 1.1) \cdot 10^6$	**$(1.3 \pm 0.4) \cdot 10^5$**	$(5.9 \pm 1.8) \cdot 10^6$	Нет роста No growth	$(4.0 \pm 1.2) \cdot 10^6$
Pseudomonas aeruginosa	4	–	$(2.6 \pm 0.8) \cdot 10^9$	$(2.2 \pm 0.7) \cdot 10^9$	$(1.6 \pm 0.5) \cdot 10^9$	$(1.9 \pm 0.6) \cdot 10^9$	$(2.9 \pm 0.8) \cdot 10^9$
Bacillus cereus	4	+	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	Нет роста No growth	$4.0 \cdot 10^5$
Proteus mirabilis 160205	4	–	$(3.1 \pm 0.9) \cdot 10^9$	$(3.0 \pm 0.8) \cdot 10^9$	$(2.9 \pm 0.8) \cdot 10^9$	Нет роста No growth	$(3.1 \pm 0.9) \cdot 10^9$
Klebsiella pneumoniae 378	4	–	$(2.1 \pm 0.6) \cdot 10^9$	$(2.1 \pm 0.7) \cdot 10^9$	$(1.5 \pm 0.4) \cdot 10^9$	Нет роста No growth	$(1.4 \pm 0.5) \cdot 10^9$
Дрожжи / Yeast							
Candida albicans 620	4	*	**$(1.7 \pm 0.5) \cdot 10^6$**	$(1.8 \pm 0.5) \cdot 10^7$	**$(2.8 \pm 0.8) \cdot 10^5$**	$(2.2 \pm 0.5) \cdot 10^7$	$(3.0 \pm 0.9) \cdot 10^7$
Candida sp. Ft-5 (клинический образец) (clinical sample)	4	*	Нет роста No growth	$(2.4 \pm 0.7) \cdot 10^7$	Нет роста No growth	$(1.0 \pm 0.8) \cdot 10^7$	$(1.6 \pm 0.5) \cdot 10^7$

Примечания: Жирным шрифтом выделены показатели подавления с достоверностью 95 % меланинами чаги роста культур тест-штаммов микроорганизмов в сравнении с их значениями для контрольных культур.

* Элементы грибов *Candida* хорошо окрашиваются при использовании широко распространенных методов окраски – по Граму, Романовскому – Гимзе, Цилю – Нильсену, раствором Люголя, метиленовым синим и др., но признаки качественного окрашивания в этом случае не являются основными дифференциально-диагностическими показателями для идентификации этих дрожжей.

Notes. The indicators of suppression with 95% confidence of the growth of test strains' cultures of microorganisms in comparison with their values for control cultures by melanins are highlighted in bold.

* Elements of *Candida* fungi are well stained with widely used methods: Gram, Romanovsky-Giemsa, Ziehl-Nielsen, Lugol's solution, methylene blue, etc., but signs of high-quality staining in this case are not the main differential diagnostic indicators for the identification of these yeasts.

инфекцией. В частности, первый образец снизил численность жизнеспособных клеток штамма *Candida albicans* 620 по сравнению с контрольной суспензией в среднем на порядок, второй образец – на два порядка с достоверностью 95 %. Следует особо отметить, что эти же образцы чаги в условиях проведенного опыта полностью подавляли рост высокопатогенного штамма *Candida sp*. Ft-5. Однако образцы меланинов, выделенных как из природного сырья, так и из глубинной культуры чаги *Inonotus obliquus* F-1244, ожидаемо уступали по своему антибиотическому действию на исследованные культуры тест-штаммов воздействию антибиотика хлорамфеникола, поскольку он обладает выраженным бактериостатическим действием в отношении не менее 16 видов грамположительных и грамотрицательных бактерий [19]. Тем не менее с учетом полученных экспериментальных данных по антибиотической активности меланинов чаги *in vitro*, а также данных литературы о наличии и проявлении *in vivo* широкого спектра практически полезных и положительных свойств биологически активными веществами из высших базидиомицетов делают возможным и перспективным включение меланинов в состав опытных мазей.

Результаты экспериментальной оценки *in vivo* лечебных свойств, а также токсичности мазей, содержащих меланины из природного сырья березового гриба (чаги) и глубинной культуры гриба чаги *Inonotus obliquus* F-1244, представлены в табл. 2, 3.

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что динамика изменения показателей прироста массы тела у мышей как в экспериментальных группах, так и в контрольных группах животных была положительной. При этом значения этих показателей были очень близкими и не различались с достоверностью 95 % между группами. Имеющиеся различия в абсолютных показателях прироста массы тела у животных, в частности, на третьи сутки и при дальнейшем наблюдении были обусловлены различиями исходных масс тела у мышей, поскольку формирование опытных групп для возможного максимального нивелирования значимости этого показателя в последующем осуществлялось случайным образом без учета массы тела животных. В ходе эксперимента подопытные животные в группах 1 и 2 в течение первых пяти дней выглядели менее активными по сравнению с мышами групп 3–5. Последние охотнее поедали свой корм, более того, после нанесения мази мыши частично съедали мела-

ments containing melanins from natural raw material of chaga mushroom and the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) are presented in Tables 2, 3.

From the data presented in Table 2, it follows that the dynamics of changes in body weight gain in mice in both experimental and control groups of animals was positive. At the same time, the values of these indicators were very close and did not differ with 95% confidence between the groups. The differences in absolute values of body weight gain in animals, in particular, on the third day and further observation were due to differences in the initial body weights in mice, since the formation of experimental groups for the possible maximum leveling of the significance of this indicator was subsequently carried out randomly without taking into account the body weight of animals. During the study, the experimental animals in groups 1 and 2 looked less active during the first five days compared to mice in groups 3–5. The latter were more willing to eat their food, moreover, after applying the ointment, the mice partially ate melanin preparation from each other's wounds. On the 18th day of observation, the body weight gain in mice reached comparable values that did not differ between groups with 95% confidence. Thus, the data obtained indicated the absence of a negative effect of melanin ointments of different formulation on the body of mice.

Dynamics of wound healing in the experimental groups of animals (see Table 3) differed from that in the control groups. Visually, in mice of experimental group 5 treated by ointment with a fivefold increased concentration of melanin from natural chaga, the crusts on the wounds fell of on the 12th day, the wounds scarred; on the surface of scars covered along periphery with growing hair, only traces of crusts of 0.01–0.02 cm^2 remained. At the same time, in mice of control groups 1 and 2, as well as experimental groups 3 and 4, a similar result of wound healing was obtained only on the 21st day. It should also be noted that from the moment of wounding and for the first few days, the surface of the wounds in animals of all groups was plastered with a significant amount of fine wood chips of bedding. However, this circumstance did not negatively affect the wound healing process in experimental mice. On the 21st day of observation, visually at the site of former wounds in animals of groups 1–4, only traces of crusts ranging in size from 0.01 to 0.03 cm^2 were noted together with pink scars of regenerated skin, covered along the periphery with growing hair. In addition, it should be noted that in groups 3–4 there was a tendency for faster wound healing (from the

Таблица 2. Динамика показателей прироста массы тела у мышей (г)
Table 2. Dynamics of body weight gain in mice (g)

Группа Group	Сроки наблюдения, сутки / Observation time, days						Общий прирост массы тела мышей от исходной The total increase in body weight of mice as compared with baseline
	3-и / 3rd	6-е / 6th	9-е / 9th	12-е / 12th	15-е / 15th	18-е / 18th	
1 (контрольная / control) (n = 20)	1.7 ± 0.5	2.1 ± 0.6	2.2 ± 0.7	3.3 ± 1.05	2.1 ± 1.3	1.0 ± 1.7	12.4 ± 5.85
2 (контрольная / control) (n = 20)	2.6 ± 0.5	2.7 ± 0.9	0.6 ± 0.9	1.4 ± 1.03	1.3 ± 1.2	1.5 ± 1.7	10.1 ± 6.23
3 (опытная / experimental) (n = 20)	1.2 ± 0.4	3.2 ± 0.6	3.3 ± 0.6	3.3 ± 0.7	1.1 ± 0.5	0.9 ± 1.1	13.0 ± 7.32
4 (опытная / experimental) (n = 20)	1.3 ± 0.6	2.6 ± 0.5	2.7 ± 1.1	3.4 ± 1.1	1.0 ± 0.8	1.1 ± 0.8	12.1 ± 6.12
5 (опытная / experimental) (n = 20)	2.4 ± 0.5	0.7 ± 0.5	2.1 ± 0.7	2.0 ± 0.8	1.4 ± 0.9	2.1 ± 1.0	10.7 ± 4.4

Примечание. Представлены средние показатели прироста массы тела у мышей с их доверительными интервалами для вероятности 95 % ($\overline{X} \pm p_{0.05}$, где $\overline{X}$ – среднее арифметическое; $p_{0.05}$ – доверительный интервал для вероятности 95 %).

Note. Average indicators of body weight gain in mice are shown with their confidence intervals for a 95% probability ($\overline{X} \pm p_{0.05}$, where $\overline{X}$ – the arithmetic mean; $p_{0.05}$ – a confidence interval for a 95% probability).

Таблица 3. Динамика изменения площади ран у мышей (см²)
Table 3. Dynamics of changes in the wound area in mice (cm²)

Группа Group	Сроки наблюдения, сутки / Observation time, days							
	0	3-и / 3rd	6-е / 6th	9-е / 9th	12-е / 12th	15-е / 15th	18-е / 18th	21-е / 21st
1 (контрольная / control) (n = 20)	1.61 ± 0.27	1.15 ± 0.25	0.75 ± 0.22	0.25 ± 0.08	0.25 ± 0.07	0.14 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.02 ± 0.01
2 (контрольная / control) (n = 20)	1.43 ± 0.19	1.32 ± 0.17	1.22 ± 0.2	0.94 ± 0.12	0.23 ± 0.05	0.23 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.03 ± 0.01
3 (опытная / experimental) (n = 20)	1.57 ± 0.23	1.49 ± 0.18	1.46 ± 0.27	0.64 ± 0.21	0.19 ± 0.08	0.19 ± 0.08	0.04 ± 0.04	0.01 ± 0.01
4 (опытная / experimental) (n = 20)	1.66 ± 0.18	1.95 ± 0.23	1.13 ± 0.21	0.97 ± 0.37	0.30 ± 0.14	0.30 ± 0.17	0.09 ± 0.09	0.03 ± 0.03
5 (опытная / experimental) (n = 20)	1.28 ± 0.16	0.80 ± 0.15	0.46 ± 0.15	0.17 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0	0

Примечание. Представлены средние показатели площадей ран у мышей с их доверительными интервалами для вероятности 95 % ($\overline{X} \pm p_{0.05}$, где $\overline{X}$ – среднее арифметическое; $p_{0.05}$ – доверительный интервал для вероятности 95 %).

Note. Average indicators of the wound area in mice are shown with their confidence intervals for a 95% probability ($\overline{X} \pm p_{0.05}$, where $\overline{X}$ – is the arithmetic mean; $p_{0.05}$ – is a confidence interval for a 95% probability).

ниновую мазь с ран друг у друга. На 18-е сутки наблюдения прирост массы тела по группам у мышей достиг сопоставимых величин, не различавшихся между группами с достоверностью 95 %. Полученные данные, таким образом, свидетельствовали об отсутствии негативного влияния меланиновых мазей разных прописей на организм мышей.

Динамика заживления ран в опытных группах животных (см. табл. 3) по сравнению с контрольными группами различалась. Визуально у мышей опытной группы 5, леченных мазью с пятикратно увеличенной концентрацией меланина из природной чаги, корочки на ранах уже на 12-е сутки отпали, раны зарубцевались, на поверхности рубцов, покрытых по периферии отрастающей шерстью, остались только следы от корочек размерами 0.01–0.02 см². В то же время у мышей контрольных групп 1 и 2, а также опытных групп 3 и 4 аналогичный результат заживления ран был получен только на 21-е сутки. Следует также отметить, что с момента нанесения ран и на протяжении нескольких первых дней поверхность ран у животных всех групп была облеплена значительным количеством мелкой древесной стружки подстилки. Однако это обстоятельство не повлияло отрицательно на процесс заживления ран у подопытных мышей. На 21-е сутки наблюдения визуально на месте бывших ран у животных групп 1–4 отмечались только следы от корочек размерами от 0.01–0.03 см² на фоне розовых рубцов регенерировавшей кожи, покрытые по периферии отрастающей шерстью. Кроме этого, необходимо отметить, что в группах 3–4 была выявлена тенденция более быстрого заживления ран (начиная с 15-х суток наблюдения в группе 3, а в группе 4 – с 18-х суток) по сравнению с животными контрольной группы 2, леченных мазью Левомикон-ТФФ.

Установленная в ходе настоящей работы более высокая эффективность ранозаживления у мышей экспериментальными мазями в сравнении с Левомиконом-ТФФ продемонстрировала как противовоспалительные, так и регенеративные свойства меланина (особенно в прописи мази с пятикратным содержанием меланина), не уступающие таковым у хлорамфеникола и метилурацила, которые являются основой мази сравнения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное экспериментальное исследование позволяет сделать следующие выводы:

1. Меланины из природного сырья и глубинной культуры чаги штамма *Inonotus obliquus*

15th day of observation in group 3, and from the 18th day in group 4) compared with animals of control group 2 treated with Levomikon-TFF ointment.

The higher efficiency of wound healing in mice with experimental ointments, in comparison with Levomikon-TFF, established in the course of this work, demonstrated both anti-inflammatory and regenerative properties of melanin (especially in the ointment formulation with a fivefold melanin content), not inferior to those of chloramphenicol and methyluracil, which are the basis of the comparison preparation.

CONCLUSION

The conducted experimental study allows us to draw the following conclusions:

1. Melanins from natural raw material and the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) completely suppressed the growth of gram-positive spore-forming *Bacillus cereus* bacterium in a co-culture. Melanin from natural chaga raw material, on average, suppressed the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 strain by an order of magnitude more actively. Melanin from the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) completely suppressed the growth of the clinical isolate of the highly pathogenic *Candida sp.* Ft-5 strain from a deceased patient with generalized candida infection, and inhibited the growth of the collection *Candida albicans* 620 yeast strain, on average, by two orders of magnitude more intensively.

2. The components of the ointment bases of the two tested formulations (melanin from natural chaga raw material and melanin obtained on the basis of the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain), as well as an ointment containing a fivefold increased concentration of melanin from natural chaga, have no toxicity to experimental animals.

3. Ointments containing 0.4 mg of melanin from natural raw material and the submerged culture of chaga (*Inonotus obliquus* F-1244 strain) in 0.2 g of a single dose of ointment had the same wound healing efficacy, while not only were not inferior in wound healing efficacy to the combined antimicrobial comparison drug Levomikon-TFF, but showed a tendency to more accelerated wound healing (on the 15th–18th day of observation) compared with the process of wound regeneration in a group of animals treated with the comparison drug.

4. A more accelerated wound healing effect was demonstrated in experimental animals (already on the 12th day of observation) treated with a fivefold

F-1244 полностью подавляли размножение грамположительной спорообразующей бактерии *Bacillus cereus* в совместной культуре. Меланин из природного сырья чаги в среднем на порядок подавлял рост золотистого стафилококка штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Меланин из глубинной культуры штамма чаги *Inonotus obliquus* F-1244 полностью подавлял рост клинического изолята высокопатогенного штамма *Candida sp.* Ft-5 от умершего больного с генерализованной кандидозной инфекцией и в среднем на два порядка ингибировал рост коллекционного штамма дрожжей *Candida albicans* 620.

2. Компоненты мазевых основ двух прописей испытанных мазей (меланин из природного сырья чаги и меланин, полученный на основе глубинной культуры штамма чаги *Inonotus obliquus* F-1244), а также мазь, содержащая пятикратно увеличенную концентрацию меланина из природной чаги, не обладают токсичностью для экспериментальных животных.

3. Мази, содержащие по 0.4 мг меланина из природного сырья чаги и ее глубинной культуры штамма *Inonotus obliquus* F-1244 в 0.2 г одноразовой дозы мази, обладали одинаковой ранозаживляющей эффективностью, при этом не только не уступали по ранозаживляющей эффективности комбинированному противомикробному препарату сравнения Левомикон-ТФФ, но продемонстрировали тенденцию более ускоренного заживления ран (на 15–18-е сутки наблюдения) по сравнению с процессом регенерации ран у группы животных, леченных указанным препаратом сравнения.

4. Продемонстрирован более ускоренный эффект заживления ран у экспериментальных животных (уже на 12-е сутки наблюдения), леченных с пятикратно увеличенным содержанием меланина из природного сырья чаги в прописи мази, по сравнению с мышами, леченными препаратом сравнения.

Таким образом, мази, содержащие меланин чаги, обладают противовоспалительными, регенеративными свойствами и могут рассматриваться в качестве перспективных препаратов для местного лечения ран.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

increased content of melanin from natural raw material of *Inonotus obliquus* in the ointment formulation, compared with mice treated with the drug of comparison.

Thus, ointments containing melanin of the chaga *Inonotus obliquus* have anti-inflammatory, regenerative properties, and can be considered as promising drugs for topical treatment of wounds.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Теплякова Т.В., Косогова Т.А. Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. Новосибирск, 2014. 298 с.
2. Сакович В.В., Жерносеков Д.Д. Базидиомицеты как источники биологически активных веществ // Вестн. Полесск. гос. ун-та. 2018;1:3–13.
3. Саерова К.В., Мухтарова А.Р. Извлечение биологически активных компонентов из водного экстракта чаги // Молодежь и наука: шаг к успеху: сб. статей 2-й Всерос. науч. конф. перспективных разработок молодых ученых: в 3 т. Курск, 2018. С. 254–257.
4. Сушинская Н.В., Курченко В.П., Горовой Л.Ф., Сенюк О.Ф. Получение и использование в медицине меланинов из трутовых грибов // Успехи медицинской микологии. 2005;6:255–259.
5. Кукулянская Т.А., Курченко Н.В., Курченко В.П., Бабицкая В.Г. Физико-химические свойства меланинов, образуемых чагой в природных условиях и при культивировании // Прикладная биохимия и микробиология. 2002;38(1):68–72.
6. Цветкова В.А., Пугач О.А., Андреева И.С., Ставский Е.А., Теплякова Т.В. Определение антибио-

REFERENCES

1. Teplyakova T.V., Kosogova T.A. (2014). *Higher fungi of Western Siberia are Promising Objects for the Biotechnology of Drugs*. Novosibirsk. 298 p. (In Russ.)
2. Sakovich V.V., Zhernossekov D.D. Basidiomycetes as sources of biologically active substances. *Bull. of the Polessky State University*. 2018;1:3–13. (In Russ.)
3. Saerova K.V., Mukhtarova A.R. (2018). Extraction of biologically active components from an aqueous extract of chaga. In *Youth and Science: a Step Towards Success:* collection of articles of the 2nd All-Russia scientific conf. promising developments of young scientists: in 3 vol. (pp. 254–257). Kursk. (In Russ.)
4. Sushinskaya N.V., Kurchenko V.P., Gorovoy L.F., Senyuk O.F. Obtaining and using melanins from polypore fungi in medicine. *Advances in Medical Mycology*. 2005;6:255–259. (In Russ.)
5. Kukulyanskaya T.A., Kurchenko N.V., Kurchenko V.P., Babitskaya V.G. Physicochemical properties of melanins produced by the sterile form of *Innotus obliquus* (“Chagi”) in natural and cultivated fingus. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2002;38(1):68–72. doi: 10.1023/A:1013204706055.

тической активности грибов из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора // Совр. проблемы фитотерапии и травничества: материалы 5-го междунар. съезда фитотерапевтов и травников (Москва, 19–20 января 2019 г.). М.: Русские, 2019. С. 390–394.

7. Teplyakova T.V., Ilyicheva T.N., Andreeva I., Solovyanova N. The activity of components of true tinder mushroom, chaga Inonotus obliquus (Fr.) Pil. against viruses, bacteria and fungi // 10th International Medicinal Mushroom Conference: abstract (September 19–22, 2019, Nantong, China). P. 11.
8. Противовирусное средство на основе меланина: Патент RU 2 480 227 C2 / Т.В. Теплякова, Л.И. Пучкова, Т.А. Косогова и др.; ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Опубл. 27.04.2013. Бюл. № 12. 11 с.
9. Ильичева Т.Н., Ананько Г.Г., Косогова Т.А. и др. Противовирусная активность меланина из чаги (*Inonotus obliquus*), полученного на основе культивирования штамма F-1244, выделенного в чистую культуру // Химия растительного сырья. 2020;2:283–289. doi: 10.14258/jcprm.2020025167.
10. Штамм базидиального гриба Inonotus obliquus – продуцент пигмента меланина, обладающего противовирусной и противоопухолевой активностью. Патент RU 2 716 590 C1 / Т.В. Теплякова, Т.А. Косогова, Т.Н. Ильичева и др.; ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотрбнадзора. Опубл. 12.03.2020. Бюл. № 8. 13 с.
11. Teplyakova T.V., Ilyicheva T.N., Kosogova T.A., Wasser S.P. Medicinal mushrooms against influenza viruses // Int. J. Med. Mushrooms. 2021;23(2):1–11. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2020037460.
12. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе водного экстракта гриба Inonotus obliquus: Патент RU 2 741 714 C1 / Т.В. Теплякова, О.В. Пьянков, М.О. Скарнович и др.; ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Опубл. 28.01.2021. Бюл. № 4. 12 с.
13. Радаева И.Ф., Костина Г.А. Гиалуроновая кислота: очистка, свойства, применение // Биотехнология. 1996;5:44–47.
14. Гончар А.М., Коган А.С., Салганик Р.И. Раневой процесс и иммобилизованные протеолитические ферменты. Новосибирск, 1986. 118 с.
15. Сандахчиев Л.С., Ставский Е.А., Зиновьев В.В. и др. Оценка воздействия мази, содержащей коллагеназу камчатского краба, на инфицированную рану в эксперименте // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. 1997;124(10):421–424.
16. Сандахчиев Л.С., Ставский Е.А., Зиновьев В.В. и др. Экспериментальное изучение лечебных свойств и токсичности мази, содержащей коллагеназу камчатского краба // Вестн. РАМН. 1998;4:50–55.
17. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): Санитарные правила. СП 1.3.3118-13. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2013. 145 с.
18. Вязовая Е.А., Ананько Г.Г., Теплякова Т.В. Оценка солнцезащитного потенциала грибного меланина, полученного из чаги (*Inonotus obliquus*) // Успехи медицинской микологии. 2018;19:265–272.

6. Tsvetkova V.A., Pugach O.A., Andreeva I.S., Stavsky E.A., Teplyakova T.V. (2019). Determination of antibiotic activity of fungi from the collection of the Vector Research Center. In *Modern Problems of Phytotherapy and Herbalism*: materials of the 5th Int. Congress of Phytotherapists and Herbalists (Moscow, January 19–20, 2019) (pp. 390–394). Moscow. (In Russ.)
7. Teplyakova T.V., Ilyicheva T.N., Andreeva I., Solovyanova N. (2019). The activity of components of true tinder mushroom, chaga Inonotus obliquus (Fr.) Pil. against viruses, bacteria and fungi. In 10th International Medicinal Mushroom Conference: abstract (September 19–22, 2019, Nantong, China (p. 11)).
8. Teplyakova T.V., Puchkova L.I., Kosogov T.A. et al. Melanin-based antiviral agent: Patent RU 2 480 227 C2. State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector.” Publ. 04/27/2013. Bull. No. 12. 11 p.
9. Ilyicheva T.N., Ananko G.G., Kosogova T.A. et al. Antiviral activity of the melanin from birch fungus (*Inonotus obliquus*), obtained by cultivating F-1244 strain, isolating to pure culture. *Chemistry of Plant Raw Materials*. 2020;2:283–289. doi: 10.14258/jcprm.2020025167. (In Russ.)
10. Teplyakova T.V., Kosogova T.A., Ilyichev T.N. et al. The strain of the basidiomycete Inonotus obliquus is a producer of the melanin pigment, which has antiviral and antitumor activity. Patent RU 2 716 590 C1. State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector.” Publ. 03/12/2020. Bull. No. 8. 13 p.
11. Teplyakova T.V., Ilyicheva T.N., Kosogova T.A., Wasser S.P. Medicinal mushrooms against influenza viruses. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2021;23(2):1–11. doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.2020037460.
12. Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Skarnovich M.O. et al. SARS-CoV-2 coronavirus replication inhibitor based on an aqueous extract of fungus Inonotus obliquus: Patent RU 2 741 714 C1. State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector.” Publ. 01/28/2021. Bull. No. 4. 12 p.
13. Radaeva I.F., Kostina G.A. Hyaluronic acid: purification, properties, application. *Biotechnology*. 1996;5:44–47. (In Russ.)
14. Gonchar A.M., Kogan A.S., Salganik R.I. (1986). *Wound Process and Immobilized Proteolytic Enzymes*. Novosibirsk. 118 p.
15. Sandakhchiev L.S., Stavsky E.A., Zinoviev V.V. Evaluation of the impact of an ointment containing red king crab collagenase on an infected wound in the experiment. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1997;124(10):421–424. (In Russ.)
16. Sandakhchiev L.S., Stavsky E.A., Zinoviev V.V. Experimental study of therapeutic properties and toxicity of an ointment containing red king crab collagenase. *Annals of Russ. Academy of Medical Sciences*. 1998;4:50–55. (In Russ.)
17. *Safety of Work with Microorganisms of I–II Groups of Pathogenicity (Danger): Sanitary Rules. SP 1.3.3118-13* (2013). Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation. 145 p. (In Russ.)
18. Vyazovaya E.A., Ananko G.G., Teplyakova T.V. Evaluation of the sun protection potential of fungal melanin obtained from chaga (*Inonotus obliquus*). *Advances in Medical Mycology*. 2018;19:265–272. (In Russ.)

19. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России. М.: Видаль Рус, 2019, 1200 с.
20. Савченко Ю.П., Федосова С.Р. Методы определения размеров раневой поверхности // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. 2007;166(1):102–105.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ставский Евгений Александрович – д-р мед. наук, доцент, заведующий кафедрой нормальной физиологии и основ безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

Теплякова Тамара Владимировна – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией микологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, пос. Кольцово, Россия.

Андреева Ирина Сергеевна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, пос. Кольцово, Россия.

Давыдова Екатерина Сергеевна – студентка 6-го курса ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

Ставская Анастасия Александровна – студентка 4-го курса ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия.

Потешкина Алевтина Леонидовна – старший лаборант лаборатории микологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, пос. Кольцово, Россия.

19. *The Vidal Handbook. Medicines in Russia* (2019). Moscow: Vidal Rus. 1200 p. (In Russ.)
20. Savchenko Yu.P., Fedosova S.R. Methods for determination of sizes of the wound surface. *Grekov's Bulletin of Surgery*. 2007;166(1):102–105. (In Russ.)

ABOUT THE AUTHORS

Evgeniy A. Stavsky – Dr. Sci. (Med.), Associate Professor, Head, Department of Normal Physiology and Fundamentals of Life Safety, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

Tamara V. Teplyakova – Dr. Sci. (Biol.), Professor, Head, Laboratory of Mycology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo village, Russia.

Irina S. Andreeva – Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Department of Biophysics and Ecological Research, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo village, Russia.

Ekaterina S. Davydova – 6th-year Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

Anastasia A. Stavskaya – 4th-year Student, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia.

Alevtina L. Poteshkina – Senior Laboratory Assistant, Laboratory of Mycology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Novosibirsk Region, Koltsovo village, Russia.

УДК 619:616.2-084:636.21 DOI: 10.37102/0869-7698_2021_217_03_20

С.С. ДИКУНИНА, Н.Н. ШУЛЬГА ,
Е.П. КОТЕЛЬНИКОВА, Т.В. МИЛЛЕР

Сравнительная антибактериальная эффективность настойки чаги березовой и препарата Бефунгин

Изучали сравнительную антибактериальную эффективность настойки чаги березовой и препарата Бефунгин. В экспериментах использовали указанный препарат, настойку чаги и полевые культуры микроорганизмов кишечной группы, изолированных от больных диареей телят (Citrobacter diversus, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa). В результате установили, что препарат Бефунгин и настойка чаги задерживают рост тест-культур полевых вирулентных штаммов возбудителей Citrobacter diversus, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa на искусственной питательной среде МПА.

Ключевые слова: чага, Бефунгин, тест-культуры, задержка роста, антибактериальная активность.

Comparative antibacterial efficiency of the birch fungus tincture and the Befungin drug. S.S. DIKUNINA, N.N. SHULGA , E.P. KOTELNIKOVA, T.V. MILLER (Far East Zone Research Veterinary Institute, Blagoveshchensk).

We studied the comparative antibacterial efficacy of the birch fungus tincture and the Befungin drug. In the experiments, the official drug Befungin, birch fungus tincture and 6 field cultures of microorganisms of the intestinal group of calves isolated from patients with diarrhea (Citrobacter diversus, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa) were used. As a result, it was found that the Befungin drug and the birch fungus tincture retard the growth of testing cultures of the field virulent strains of pathogens: Citrobacter diversus, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa on artificial nutrient medium of the beef-extract agar.

Key words: birch fungi, Befungin, testing cultures, growth retardation, antibacterial activity.

Чага, или березовый гриб (*Fungus betulinus*), в народной медицине известная под названиями «черный березовый гриб» или «березовая губа», – старинное излюбленное средство народов северных и средних районов России для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний. По преданию, русский князь Владимир Мономах избавился от рака губы благодаря березовому грибу [3]. Чагой в сочетании с другими растениями лечили язву желудка и двенадцатиперстной кишки. Чагу использовали также при болезнях печени и желчных протоков, заболеваниях мочевыделительной системы и женской половой сферы, нервных расстройствах и сердечно-сосудистых заболеваниях. В полевых условиях, в лесу пьют чай из чаги при расстройствах желудка, тяжести и болях в кишечнике. Популярен чай из чаги у охотников и лесников. Он утоляет голод, снимает усталость, бодрит и улучшает общее самочувствие и повышает работоспособность. Чагу

*ДИКУНИНА Светлана Сергеевна – научный сотрудник, ШУЛЬГА Николай Николаевич – доктор ветеринарных наук, КОТЕЛЬНИКОВА Елена Петровна – младший научный сотрудник, МИЛЛЕР Татьяна Викторовна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник (Дальневосточный зональный научно-исследовательский ветеринарный институт, Благовещенск). *E-mail: dalznivilabvirus@mail.ru

используют как общеукрепляющее средство, для повышения общего тонуса организма. Настоями чаги лечат пародонтоз, экзему, дерматит, псориаз. Ссадины, порезы присыпают порошком чаги, чтобы прекратить нагноение раны[1] [2].

Бефунгин – лекарственная форма, раствор, предназначенный для приема внутрь, содержащий чагу 1000 г; кобальт хлористый гексагидрат 1,76 г; этанол (спирт этиловый) 101,55 г; воду очищенную до получения 1 л препарата. Регистрационный номер ЛСР-004202/08. Фармакологическая группа: общеукрепляющее средство растительного происхождения; код АТХ [A13A].

Фармакологические свойства. Действие препарата определяется эффектом входящих в его состав биологически активных веществ (полисахаридов, гуминоподобной чаговой кислоты, органических кислот, микроэлементов, в том числе марганца и кобальта, стероидных и других соединений). Препарат регулирует метаболические процессы, способствует повышению общей резистентности организма, уменьшает потоотделение, нормализует функцию кишечника, устраняет диспепсические явления, оказывает общетонизирующее действие.

Показания к применению. Применяют в комплексной терапии при хронических гастритах, дискинезиях желудочно-кишечного тракта с явлениями атонии, при язвенной болезни желудка вне обострения, а также в качестве симптоматического средства, улучшающего общее состояние онкологических больных[2] [1].

В связи с тем что в доступной литературе не удалось обнаружить данных относительно антибактериальной активности чаги, цель работы – изучить антибактериальную эффективность настойки чаги и препарата Бефунгин в сравнительном аспекте.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали официальный препарат Бефунгин, произведенный ОАО «Татхимфармпрепараты» (Россия) и 10%-ю настойку чаги, полученную следующим образом: измельченную до порошка массу чаги березовой в количестве 10 г заливали водно-спиртовой смесью (1 : 1) в количестве 100 мл; смесь настаивали в течение 3 недель, затем фильтровали, фильтрат использовали в опытах.

Также для эксперимента брали 6 полевых культур микроорганизмов кишечной группы, изолированных от больных диареей телят (Citrobacter diversus, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomon asaeruginosa) [4, 5].

Суточные культуры, выращенные на питательном агаре, смывали стерильным физиологическим раствором. Бактериальный смыв доводили до плотности соответствующей 0,5 по стандарту мутности МакФарланда (соответствует примерно 1,5 × 108 КОЕ/мл). Бактериальную суспензию засевали газоном на поверхность чашки Петри с мясопептонным агаром (МПА) в объеме 1–2 мл, равномерно распределяли по поверхности чашки путем покачивания, избыток культуры удаляли пипеткой. После этого чашки Петри подсушивали при комнатной температуре в течение 15 мин, затем накладывали бумажные диски диаметром 6 мм, предварительно смоченные настойкой чаги и препаратом Бефунгин (раздельно). Инкубацию посевов проводили при t = 370 °С в течение 24 ч. По окончании инкубации оценивали задержку роста микроорганизмов, определяли среднее арифметическое значение экспериментальных данных и отклонение от него (среднюю ошибку), вычисляли достоверность различия результатов и фотографировали результаты посевов. Эксперименты проводили в трех повторностях.

---

[1] Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. // Исследования чаги. Целебные свойства чаги / ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва. – https://biochaga.ru/issledovaniya-chagi (дата обращения: 22.07.2020).

[2] Саакян К.Р., Ващенко К.Ф., Дармрграй Р.С. Чага (черный березовый гриб) / Львовский государственный медицинский университет им. Д. Галицкого. – https:// provisor.com.ua/archive/2004/N16 (дата обращения: 10.02.2020).

Результаты исследования

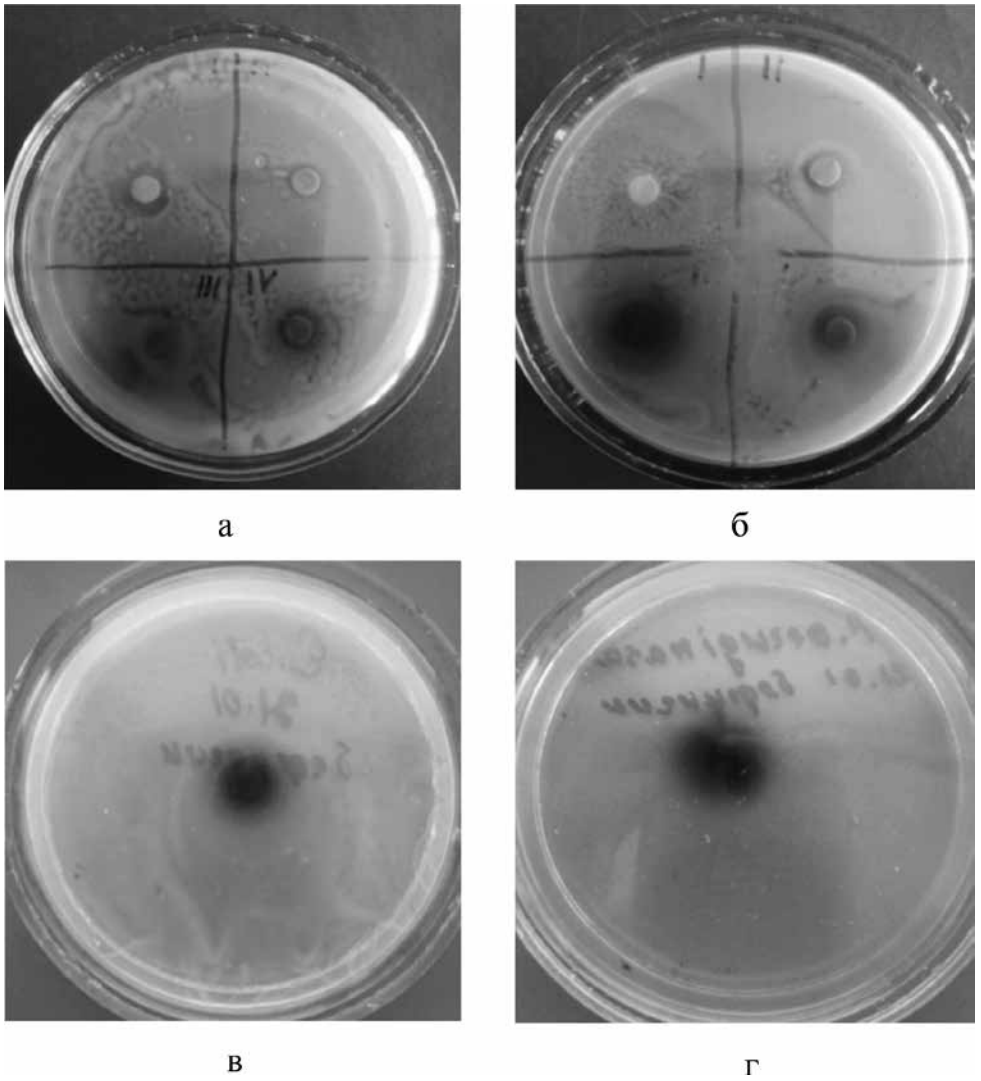
В результате экспериментов установлено, что настойка чаги и препарат Бефунгин задерживают рост МПА полевых вирулентных штаммов возбудителей Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa на искусственной питательной среде (см. рисунок, таблицу).

Задержка роста тест-культуры Escherichia coli при использовании настойки чаги составила 8 мм в диаметре, тест-культуры Pseudomon

Задержка роста тест-культур микроорганизмов с помощью настойки чаги и препарата Бефунгин

Тест-культуры	Задержка роста, мм	
	Настойка чаги	Бефунгин
Escherichia coli	8	9
Pseudomonas aeruginosa	11	8
Citrobacter diversus	11	9
Enterobacter cloacae	12	10
Proteus mirabilis	11	9
Proteus vulgaris	12	9
M ± m	10,8 ± 0,5	9,0 ± 0,2

Примечание. P < 0,01.



Задержка роста тест-культуры Escherichia coli (*а*) и тест-культуры Pseudomonasae ruginosa (*б*) настойкой чаги (IV), тест-культуры Escherichia coli (*в*) и тест-культуры Pseudomonasae ruginosa (*г*) – препаратом Бефунгин

asaeruginosa – 11 мм в диаметре (см. рисунок, *а, б*). Задержка роста тест культуры Escherichia coli с помощью препарата Бефунгин составила 9 мм в диаметре, тест-культуры Pseudomon asaeruginosa – 8 мм в диаметре (см. рисунок, *в*, *г*).

В соответствии с данными таблицы, настойка чаги более эффективно задерживала рост тест-культур Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Citrobacter diversus, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris. В среднем задержка роста тест-культур в диаметре составила 10,8 ± 0,5 мм. Препарат Бефунгин показал более высокую задержку роста, чем настойка чаги, только в опыте с Escherichia coli. В среднем диаметр задержки роста составил 9,0 ± 0,2 мм. Дальнейшие расчеты показали полную достоверность различия полученных данных ($p < 0,01$). Антибактериальная активность настойки чаги достоверно выше, чем препарата Бефунгин.

Заключение

Проведенные эксперименты наглядно показали возможность применения настойки чаги и препарата Бефунгин в качестве лечебных препаратов при кишечных заболеваниях, в патогенезе которых принимают участие патогенные микроорганизмы Citrobacter diversus, Enterobacter cloacae, Escherichia coli, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Pseudomon asaeruginosa. При этом настойка чаги предпочтительнее.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жукович Е.Н., Семенова М.Ю., Шарикова Л.А., Прибыткова Т.Ф. К вопросу о стандартизации препаратов «Чаги настойка» и «Бефунгин» // Хим.-фармацевт. журн. 2010. Т. 44, № 3. С. 35–37.

2. Кароматов И.Дж., Муродова М.М. Чага, березовый гриб // Биология и интегративная медицина. 2017. № 2. С. 164–179.

3. Миронов В.А. Грибы против грибов // Спортивная жизнь России. 1997. № 12. 15 с.

4. Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. / Дж. Хоулд, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стелми, С.М. Уилльямс. М.: Мир, 1997. 432 с.

5. Сидоров М.А., Скородумов Д.И., Федотов В.Б. Определитель зоопатогенных микроорганизмов: справочник / ред. М.А. Сидоров. М.: Колос, 1995. 318 с.

УДК 664:579

М. А. Бурмасова, А. К. Милюхина, Г. Ш. Мубаракшина,
А. А. Утебаева, М. А. Сысоева

РОСТ ЛАКТОБАКТЕРИЙ НА СРЕДЕ С МЕЛАНИНАМИ ЧАГИ

Ключевые слова: лактобактерии, меланины гриба чаги, антиоксидантная активность.

Исследовано влияние меланинов гриба чаги на рост молочнокислых бактерий с целью получения пробиотических препаратов с природными антиоксидантами. Показано стимулирующее действие меланинов в концентрации 10^{-10} и 10^{-5} г/см^3 на рост лактобактерий.

Keywords: lactobacillus, chaga melanin, antioxidant activity.

The study of chaga melanins influence on the growth of lactobacillus was conducted for futher probiotics production. It was shown that the melanin of chaga in concentration of 10^{-10} and 10^{-5} g / sm^3 stimulates the growth of lactobacillus.

Введение

Промышленность выпускает широкий спектр лекарственных препаратов, содержащих пробиотические микроорганизмы: «Лактобактерин», «Бифиформ», «Бактистатин» и другие. Лактобактерии являются одним из перспективных пробиотиков для получения биологически активных добавок и функциональных продуктов питания. В организме они способны образовывать такие вещества, как молочная кислота, лизоцим, бактериоцины (лактоцины B, F, J, M, лактобревин, плантарицин), которые обладают выраженным антибактериальным эффектом и угнетают рост гнилостных и условно-патогенных микроорганизмов в кишечнике. Лактобактерии активируют клеточный иммунитет и участвуют в процессах пищеварения, превращая протеин в легкоусвояемые компоненты, а также принимают участие в метаболизме лактозы, вырабатывая ферменты (β-галактозидазы, гликолазы, дегидрогеназы) и др. [1]. Кроме того, лактобактерии (*L. plantarum, L. acidophilus* и др.) устойчивы к воздействию желудочного сока, желчных кислот и панкреатических ферментов.

В последнее время внимание исследователей привлекают природные объекты как источники биологически активных веществ (БАВ), которые могут быть использованы в качестве активаторов роста пробиотиков. Особенно интересны в этом отношении меланины гриба чаги. Они обладают радиопротекторной, антиканцерогенной активностью, что обусловлено их химическим составом. Меланины проявляют антиоксидантную активность (от 10 до 50 кКл на 100 г меланина), т.е. способны связывать свободные радикалы и препятствовать процессам окисления [2]. Это их свойство может способствовать адаптации и стимуляции роста лактобактерий.

Обычно антиоксиданты, например, аскорбиновую кислоту вводят в среды для культивирования микроорганизмов в концентрации 1 % и более [3]. Однако известно, что, например, флавоноиды, наиболее ярко проявляют эти свойства в концентрациях 10^{-13} и 10^{-17} М [4]. В некоторых случаях эта зависимость бимодальная, то есть по мере снижения концентрации исследуемого вещества эффект его воздействия спонтанно меняется со стимулирующего на ингибирующий. Авторы считают, что граница малых концентраций определяется числом молекул биологически активного вещества, действующего на клетку. В другой работе С.В. Зайцева и соавторов предлагается адаптационный механизм, согласно которому действия малых доз объясняются эффектом хемотаксиса – изменение ответа биообъекта определяется не самой концентрацией БАВ, а градиентом концентраций в пространстве и во времени [5].

Цель работы - изучение влияния низких концентраций меланинов гриба чаги на рост лактобактерий.

Экспериментальная часть

В исследовании применяли меланины, полученные из гриба чага СВЧ-экстракцией по методу [6], в концентрациях 10^{-10} и 10^{-5} г/см^3. Культивирование лактобактерий осуществляли в течение 72 часов в термостате при температуре 37±1°С на стандартной среде МРС. Количественный учет выросших микроорганизмов проводили, используя метод разведений [7]. Статистическую обработку проводили с доверительной вероятностью Р=0,90.

Результаты и их обсуждение

Известно, что бактерии рода *Lactobacillus* относятся к микроорганизмам, имеющим сложные питательные потребности. Рост лактобактерий в питательной среде могут стимулировать вещества различной природы. В качестве таковых могут быть пребиотики. Свойства пребиотиков наиболее выражены у фруктозоолигосахаридов (ФОС), инулина, галактоолигосахаридов (ГОС), лактитола [8]. Так же в литературе описано использование для стимуляции лактобактерий БАВ растительного и природного происхождения, например, суспензия, полученная из зерен сои [9], мука грецкого ореха [10], биомасса мицелия *Laetiporus sulphureus Ls 1-06*, полученная жидкофазным культивированием в стационарной фазе [11] и т.д. Можно предположить, что в них содержатся факторы роста, стимулирующие лактобактерии, или, возможно, стимуляция их роста связана с увеличением адгезивной и метаболической активности лактобактерий [12].

Меланины, используемые в работе, для проведения активации роста лактобактерий, получены с применением СВЧ обработки, которая отличается простой технологией получения. Они имеют низкую

токсичность 2705 г/кг веса, высокую АОА = 48,2±0,9 кКл/100 г [13].

Результаты, проведенных экспериментов представлены на рисунке 1, таблице 1.

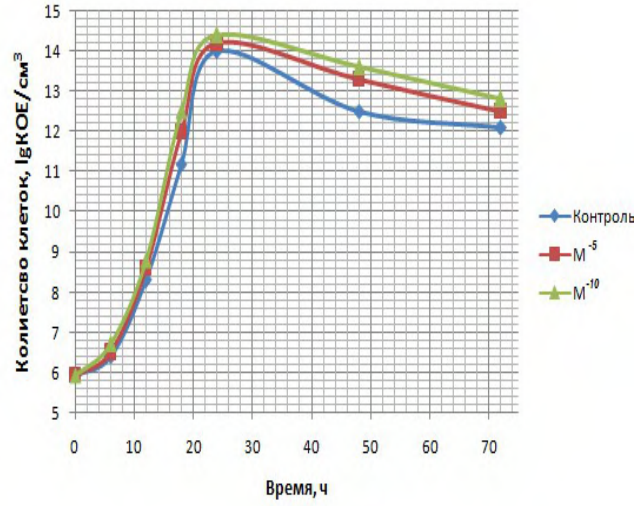


Рис. 1 – Культивирование лактобактерий

По приведенным в таблице 1 данным построены кривые роста (рис. 1), рассчитаны средние и удельная скорости роста лактобактерий (табл.2).

Таблица 2 - Динамика средней скорости роста лактобактерий в образцах

Концентрация М, г/см^3	Средняя скорость роста V, КОЕ/ч					Удельная скорость роста μ, ч$^{-1}$
	Время t, ч					
		7	12	18	21	-
Контроль (0)	0,02	0,2	0,38	0,54	0,63	0,045
10^{-10}	0,04	0,2	0,36	0,55	0,90	0,042
10^{-5}	0,04	0,13	0,36	0,57	0,88	0,043

Как видно из представленных в таблице 1 данных, меланины не оказывают влияния на длительность лаг-фазы, она, как и в контроле, продолжается в течение 5 часов. Действие меланинов проявляется в экспоненциальной фазе. Скорость роста в конце экспоненциальной фазы в среде с меланинами в концентрации 10^{-10} г/см^3 увеличивается в 1,5 раза по сравнению с контролем (табл.2). Через 24 часа численность микроорганизмов в образцах с меланинами также незначительно увеличивается по сравнению с контролем (табл.1). Рост их продолжается до 48 часов культивирования. Меланины в концентрациях 10^{-10} г/см^3 и 10^{-5} г/см^3 способствуют образованию большего количества лактобактерий на 48 часах (на 8 %) по сравнению с контролем. Следует отметить, что меланины в обеих концентрациях стимулируют рост лактобактерий, что подтверждается и данными по нарастанию кислотности в процессе культивирования (рис.2).

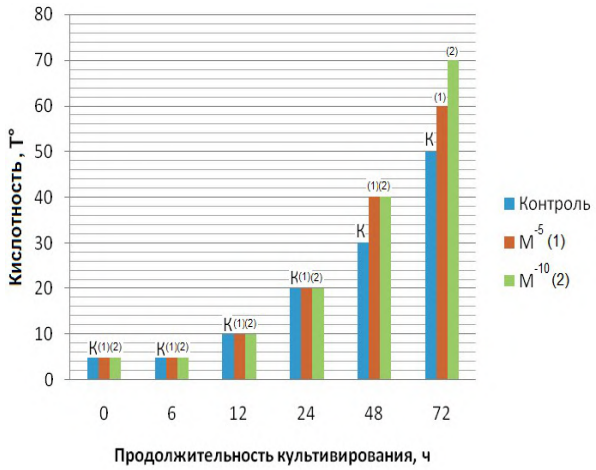


Рис. 2 – Динамика кислотности при культивировании

Таким образом, введение меланинов в среду способствует сохранению титра лактобактерий после 24 часов на стабильном уровне.

Заключение

На основании проведенных исследований установлено стимулирующее действие меланинов чаги на лактобактерии в концентрациях 10^{-10} г/см^3 и 10^{-5} г/см^3.

Таблица 1 – Изменение lg КОЕ в процессе культивирования

Концентрация М, г/см^3	Количество лактобактерий, lg КОЕ/см^3					
	Продолжительность культивирования, ч					
	0ч	6ч	12ч	24ч	48ч	72ч
Контроль (0)	5,95±0,35 ε=1,12%	6,20± 0,35 ε=2,62%	8,33± 0,193 ε=2,32%	14,48± 0,25 ε=1,70%	12,35±0,40 ε=2,30%	12,31± 0,05 ε=0,41%
10^{-10}	5,93±0,07 ε=0,64%	6,32± 0,11 ε=2,19%	8,35± 0,03 ε=1,98%	14,70± 0,30 ε=1,87%	13,35± 0,05 ε=2,01%	12,38± 0,05 ε=0,47%
10^{-5}	5,94±0,16 ε=2,01%	6,28± 0,16 ε=2,31%	8,30± 0,40 ε=2,01%	14,63± 0,27 ε=1,90%	13,30± 0,04 ε=2,73%	12,37± 0,08 ε=0,53%

Литература

1. Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин *Бактерии рода Lactobacillus: общая характеристика и методы работы с ними*. КФУ, Казань, 2014. 51 с.
2. М.А. Сысоева, *Высокодисперсные коллоидные системы и меланины чаги: монография*. Изд-во КНИТУ, Казань, 2013. 228 с.
3. Пат. РФ 2080376 (1995).
4. Е.Б. Бурлакова, А.А. Конрадова, Е.Л. Мальцева, *Химическая физика.* Т.22, 2, 390-424 (2003).
5. S.V. Zaitsev, L.A. Sazanov, A.L.Koshkin *FEBS letters*. **8**, 1, 291-293 (2001).
6. Пат. РФ 2406514 (2010).
7. ГОСТ 10444.11 - 2010.
8. ГОСТ Р 52349 - 2005.
9. А.В. Смагина, М.В. Сытова, В сб. *Научные труды Дальрыбвтуза*. 2011. С.174-179.
10. Н.А. Шавыркина, Ю.С. Абрамова, Научно-практическая конференция (Киров), 2009. Т. 7. С. 453-457.
11. И.Е. Иванова, *Молочная промышленность*. 12, 54 -55 (2011).
12. Н.Р. Назырова, Р.Х. Тимербаева, М.М. Туйгунов, И.Ф. Шаяхметов, *Вестник Башкирск. ун-та*. 2, 59-62 (2006).
13. Е.В. Сысоева. Автореф. дисс. канд. хим. наук, КНИТУ, Казань, 2011. 18 с.

© **М. А. Бурмасова**, доцент, кафедра «Пищевая биотехнология», ФГБОУ ВО КНИТУ, m-burmasowa@mail.ru; **А. К. Милюхина**, студент, кафедра «Пищевая биотехнология» ФГБОУ ВО КНИТУ, uchiha-forever@mail.ru; **Г. Ш. Мубаракшина**, магистр, кафедра «Пищевая биотехнология» ФГБОУ ВО КНИТУ, gulchachak24@mail.ru; **А. А. Утебаева**, аспирант, кафедра «Пищевая биотехнология» ФГБОУ ВО КНИТУ, aidanka_90.kz@mail.ru; **М. А. Сысоева**, профессор, заведующий кафедрой, кафедра «Пищевая биотехнология», ФГБОУ ВО КНИТУ, oxygen1130@mail.ru.

© **M. A. Burmasova**, docent, department of food biotechnology of the KNRTU, m-burmasowa@mail.ru; **A. K. Milyuhina**, student, department of food biotechnology of the KNRTU, uchiha-forever@mail.ru; **G. Sh. Mubarakshina**, magister, department of food biotechnology of the KNRTU, gulchachak24@mail.ru; **A. A. Utebayeva**, post graduate student, department of food biotechnology of the KNRTU, aidanka_90.kz@mail.ru; **M. A. Sysoyeva**, professor, head of the department, department of food biotechnology of the KNRTU, oxygen1130@mail.ru.

УДК 582.284:542.61:576.858.3

Т.В.Теплякова, Л.Е.Булычев, Т.А.Косогова, Ж.Б.Ибрагимова, И.А.Юрганова, А.С.Кабанов, Л.И.Пучкова, Н.И.Бормотов, А.В.Бардашева

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В ОТНОШЕНИИ ОРТОПОКСВИРУСОВ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

Проведена оценка водных экстрактов из базидиальных грибов в клеточной культуре Vero на вирусах натуральной оспы и осповакцины. Вируснейтрализующий эффект проявили *Inonotus obliquus* (чага), *Ganoderma applanatum* (плоский трутовик), *Fomitopsis officinalis* (лиственничный трутовик).

Ключевые слова: базидиальные грибы, водные экстракты, вирусы натуральной оспы и осповакцины, вируснейтрализующий эффект.

T.V.Teplyakova, L.E.Bulychev, T.A.Kosogova, Zh.B.Ibragimova, I.A.Yurganova, A.S.Kabanov, L.I.Puchkova, N.I.Bormotov, A.V.Bardasheva

Antiviral Activity of Extracts from Basidiomycetes for Orthopoxviruses

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo

Carried out was evaluation of the effect of water extracts from basidiomycetes in Vero cell culture on variola virus, and vaccinia virus. Antiviral effect demonstrated *Inonotus obliquus* (Chaga), befungin and melanin from chaga, *Ganoderma applanatum* (Artist's Bracket), *Fomitopsis officinalis* (Larch Fungus).

Key words: variola virus and vaccinia virus, the aqueous extracts of basidiomycetes, befungin, melanin, antiviral effect.

Семейство *Poxviridae* включает в себя большую группу вирусов, в том числе патогенных для человека: натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, эктромелии и др. Поиск противовирусных препаратов против вируса натуральной оспы и других ортопоксвирусов является актуальной задачей.

Базидиальные грибы, многие из которых являются съедобными, содержат широкий спектр различных биологически активных соединений (БАВ), проявляющих противоопухолевую, антибластическую активность, цитостатическое действие и противовирусный эффект.

Судя по литературным данным, проведены немногочисленные исследования по изучению противовирусных свойств базидиальных грибов в отношении поксвирусов. В США несколько штаммов лиственничного трутовика *Fomitopsis officinalis* были выделены в культуру, и был оценен ингибирующий эффект экстрактов из биомассы гриба на поксвирусах в культуре клеток. Один из штаммов *F. officinalis* I показал высокий антивирусный эффект против вируса коров (*cowpox virus*), а другой – *F. officinalis* IV против вируса осповакцины (*vaccinia virus*) [7]. Композиции из грибов родов *Fomitopsis, Piptoporus, Ganoderma,* как отмечает автор патента [8], могут быть использованы в профилактике и лечении против разных вирусов, включая поксвирусы.

Задачей настоящего исследования была оценка противовирусной активности водных экстрактов и некоторых препаратов из базидиальных грибов на вирусах осповакцины и натуральной оспы. В качестве основных объектов исследований были определены следующие виды грибов: *Fomitopsis officinalis, Inonotus obliquus, Ganoderma applanatum.*

Для изучения противовирусной активности в отношении вируса осповакцины были использованы 2 вида лекарственных грибов, широко применяемых в народной и официальной медицине: лиственничный трутовик *Fomitopsis officinalis* и березовый гриб – чага *Inonotus obliquus*.

Образцы из плодового тела лиственничного трутовика (09-19) и измельченного склероция чаги (08-39) были приготовлены путем выдерживания водных суспензий при 50 °С в термостате в течение 2–3 сут соответственно. Использовали также 5 % водный раствор аптечного препарата из чаги Бефунгин (09-33). Из чаги был получен меланин (08-48) по методике О.В.Королевой и соавт. [3] путем щелочного гидролиза при 0,5 атм. в течение 1 ч с последующим осаждением концентрированной HCl.

Для оценки противовирусной активности грибов в отношении вируса натуральной оспы было приготовлено 7 образцов из трех видов грибов. Образец из чаги (*I. obliquus*) 09-26/1 получен по методике, использованной для образца 08-39. Образец из Бефунгина 09-33/1 готовили по той же методике, что и для вируса осповакцины 09-33.

Из плодового тела гриба *Ganoderma applanatum* (трутовик плоский) приготовлены 2 образца, которые различались способом приготовления. Один получали в виде водного экстракта путем нагревания на водяной бане (09-11/4), другой – смешиванием водного экстракта с этанолом (96 %) и выдерживанием в холодильнике с целью получения суммарных полисахаридов (09-11/4 – полисахарид).

Из гриба *F. officinalis* получено 2 образца: 10-

06/1 – водный экстракт, а 09-19/3 – полисахарид. Образец 09-96 представлял собой готовый препарат гумитон (5 % раствор), содержащий 3,45 % гуминовых кислот. Этот препарат был взят в связи с тем, что чага в своем составе содержит гуминовые кислоты.

Вирусы осповакцины (ВОВ) штамм Л-ИВП и натуральной оспы (ВНО) штамм Индия-3а были получены из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и наработаны на культуре клеток Vero с титром $5 \cdot 10^5$ и 10^5 БОЕ/мл соответственно.

Эксперименты по противовирусной активности проводили в соответствии с принятыми методиками по профилактической и лечебной схемам. В ходе работы определяли ингибирующую 50 % концентрацию образца (IC_{50}), при которой 50 % клеточного монослоя остается защищенным от действия вируса, а также токсическую 50 % концентрацию (TC_{50}), при которой 50 % клеточного монослоя повреждается за счет токсического действия самого препарата. TC_{50} и IC_{50} были вычислены как средние величины из трех значений, полученных при проведении эксперимента на одном планшете. Индекс селективности (SI) вычислен как отношение TC_{50} к IC_{50} [6]. Образцы с SI>10 считали высокоактивными, а образцы с SI<2 не активными, образцы с SI между 2 и 10 – среднеактивными.

По данным проведенного исследования, можно сделать заключение, что наибольшую противовирусную активность против вируса осповакцины оказывает образец 08-48 (меланин), полученный из *Inonotus obliquus* (индекс селективности SI=12,5). Определенным противовирусным потенциалом обладает препарат 09-33 (Бефунгин) из *Inonotus obliquus* (SI=2) и образец 09-19 (экстракт) из *Fomitopsis officinalis* (SI=2).

Наибольшей противовирусной активностью в отношении вируса натуральной оспы обладают образцы, полученные из *I. obliquus* 09-26/1 (SI>9), 09-33/1 (SI=7,4) и из *F. officinalis* 10-06/1 (SI=4). Эффективность образцов возрастает при применении их по схеме профилактики – образец начинает воздействовать на клетки Vero за сутки до внесения вируса. В этом случае индекс селективности в сравнении со случаем, когда вирус и препарат вносили одновременно, увеличивается: для препарата 09-33/1 – с 7,4 до 29,8. Суммарные полисахариды из грибов *F. officinalis* и *G. applanatum* дали более низкие показатели по сравнению с водными экстрактами тех же грибов. Это свидетельствует о том, что вируснейтрализующий эффект в отношении данного вируса оказывает более сложный комплекс веществ, включающий и полисахариды.

Поскольку гуминовые кислоты входят в сложный состав компонентов чаги, противовирусный эффект препарата 09-96 (гумитон), полученный нами, не вызывает удивления и указывает на необходимость его дальнейшего изучения. Бефунгин, представляющий готовый аптечный препарат из чаги, проявил противовирусный эффект в отношении обоих тестируемых вирусов. Индекс селективности по противовирусной схеме для вируса осповакцины составил 2, для вируса натуральной оспы – 7.

На основании полученных данных можно предположить, что образцы из грибов *I. obliquus* и *F. officinalis,* показавшие противовирусные свойства в отношении двух резко отличающихся по патогенности вирусов из семейства *Poxviridae*: вируса натуральной оспы и вируса осповакцины, возможно, будут эффективны и против других ортопоксвирусов: вируса оспы обезьян, эктромелии, вируса оспы коров и других.

Особый интерес для дальнейших исследований представляет гриб *I. obliquus,* чага, который содержит широкий спектр различных БАВ, основным компонентом является хромоген-полифенолоксикарбоновый комплекс (ПФК), близкий по физико-химическим характеристикам к гуминовым кислотам (ГК). В наших исследованиях экстракты из чаги и меланин, полученный из этого гриба, проявляют высокий противовирусный эффект в отношении таких социально значимых вирусов, как вирус простого герпеса 2-го типа, Западного Нила, гриппа, ВИЧ-1 [1, 2, 4, 5].

Полученные данные также подтверждают имеющиеся сведения о том, что препараты из лиственничного трутовика проявляют ингибирующий эффект на вирус осповакцины [7]. Это свидетельствует о потенциальной генетической способности грибов вида *F. officinalis* воздействовать на поксвирусы, и делает возможным осуществлять поиск эффективных штаммов против вирусов натуральной оспы в природных местообитаниях Сибири. В более детальном изучении нуждается, по нашему мнению, плоский трутовик *G. applanatum*, у которого все-таки обнаруживается небольшая эффективность. Штаммы этого вида в наших исследованиях проявляют вируснейтрализующий эффект в отношении разных вирусов. Возможно, при приготовлении экстрактов необходима более длительная термическая обработка биомассы из плодового тела гриба. Таким образом, базидиальные грибы *Inonotus obliquus* (чага)*, Fomitopsis officinalis* (лиственничный трутовик), *Ganoderma applanatum* (плоский трутовик) являются перспективными продуцентами для дальнейшего изучения с целью разработки на их основе лекарственных препаратов против заболеваний, вызываемых вирусами осповакцины и натуральной оспы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гашникова Н.М., Теплякова Т.В., Проняева Т.Р., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Сергеев А.Н.* Результаты исследований по выявлению анти-ВИЧ активности экстрактов из высших базидиальных грибов. Иммунопатол., аллергол., инфектол. 2009; 2:170–1.

2. *Кабанов А.С., Косогова Т.А., Шишкина Л.Н., Теплякова Т.В., Скарнович М.О. Мазуркова Н.А.* и др. Изучение противовирусной эффективности экстрактов, выделенных из базидиальных грибов, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в отношении штаммов вируса гриппа разных субтипов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 1:40–3.

3. *Королева О.В., Куликова Н.А., Алексеева Т.Н., Степанова Е.В., Давидчик В.Н., Беляева Е.Ю.* и др. Получение меланина из

грибов. Прикладная биохим. и микробиол. 2007; 43(1):69–76.

4. *Разумов И.А., Косогова Т.А., Казачинская Е.И., Пучкова Л.И., Щербакова Н.С., Горбунова И.А.* и др. Противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов. Антибиотики и химиотерапия. 2010; 55:9–10.

5. *Теплякова Т.В., Гашникова Н.М., Пучкова Л.И., Проняева Т.Р., Косогова Т.А*. Ингибитор репродукции вируса иммунодефицита человека 1 типа. Патент РФ 2375073С1, опубл. 10.12.2009. Бюл. № 34.

6. *Duraffour S., Snoeck R., de Vos R., van Den Oord J.J., Crance J.M., Garin D. et* al. Activity of the anti-orthopoxvirus compound ST-246 against vaccinia, cowpox and camelpox viruses in cell monolayers and organotypic raft cultures. Antivir. Ther. 2007; 12(8):1205–16.

7. *Stamets Paul E*. Antipox Properties of *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bondartsev et Singer (Agarikon) from the Pacific Northwest of North America. Int. J. Med. Mush. 2005; 7:495–506.

8. *Stamets Paul*. Antiviral activity from medicinal mushrooms. Patent Number: US2006171958 A1 20060803.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. *Gashnikova N.M., Teplyakova T.V., Pronyaeva T.R., Puchkova L.I., Kosogova T.A., Sergeev A.N*. [The results of investigation of anti-HIV activity of extracts from higher basidiomycetes]. Immunopatol. Allergol. Infektol. 2009; 2:170–1.

2. *Kabanov A.S., Kosogova T.A., Shishkina L.N., Teplyakova T.V., Skarnovich M.O., Mazurkova N.A. et al*. [Study of antiviral activity of extracts obtained from basidial fungi against influenza viruses of different subtypes in experiments *in vitro* and *in vivo*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2011; 1:40-43.

3. *Koroleva O.V., Kulikova N.A., Alekseeva T.N., Stepanova E.V., Davidchik V.N., Belyaeva E.Yu., Tsvetkova E.A*. [A comparative characterization of fungal melanin and the humin-like substances synthesized by Cerrena maxima 0275]. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 2007; 43(1):69–76.

4. *Razumov I.A., Kosogova T.A., Kazachinskaya E.I., Puchkova L.I., Shcherbakova N.S., Gorbunova I.A., Mikhailovskaya I.N., Loktev V.B., Teplyakova T.V*. [Antiviral activity of aqueous extracts and polysaccharide fractions from mycelium and fruit bodies of higher fungi]. Antibiot. Khimioter. 2010; 55:9–10.

5. *Teplyakova T.V., Gashnikova N.M., Puchkova L.I., Pronyaeva T.R., Kosogova T.A*. [Inhibitor of reproduction of human immunodeficiency virus of the I-st type]. RF Patent 2375073C1.

Authors:

Teplyakova T.V., Bulychev L.E., Kosogova T.A., Ibragimova Zh.B., Yurganova I.A., Kabanov A.S., Puchkova L.I., Bormotov N.I., Bardasheva A.V. State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol’tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимова Ж.Б., Юрганова И.А., Кабанов А.С., Пучкова Л.И., Бормотов Н.И., Бардашева А.В. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 12.09.11.

ХИМИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ. 2020. №2. С. 283–289.
DOI: 10.14258/jcprm.2020025167

УДК 615.322; 615.281.8

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕЛАНИНА ИЗ ЧАГИ (*INONOTUS OBLIQUUS*), ПОЛУЧЕННОГО НА ОСНОВЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА F-1244, ВЫДЕЛЕННОГО В ЧИСТУЮ КУЛЬТУРУ

© ***Т.Н. Ильичева**, *Г.Г. Ананько, Т.А. Косогова, С.Е. Олькин, В.В. Омигов, О.С. Таранов, Т.В. Теплякова***

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», р.п. Кольцово, 630559 (Россия), e-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru

Целью данной работы явилось сравнительное исследование противовирусной активности меланинов, выделенных из глубинной культуры базидиального гриба чага *Inonotus obliquus* F-1244, и меланинов, полученных из природной чаги. Показано, что по своим ИК-спектрам и антивирусным свойствам меланины, полученные из культивированной чаги, близки к меланинам из природной чаги. В то же время активность образцов зависела не только от источника меланинов, но и от способа их выделения и очистки: токсическая доза (CC_{50}) образцов варьировала от 300 до 2500 мкг/мл, эффективная противовирусная доза в отношении вируса гриппа A/H1N1pdm09 (ED_{50}) – от 10 до 47 мкг/мл. Наибольший терапевтический индекс, равный 160, показан для меланинов культивированной чаги, очищенных диализом, что в 2.5 раза выше, чем для меланинов из природной чаги.

Меланины из культивируемой чаги являются перспективными веществами для разработки лекарственных препаратов природного происхождения.

Ключевые слова: *Inonotus obliquus*, лекарственное растительное сырье, биологическая активность, противовирусная активность.

Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания 2/17 (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Введение

Спектр медицинских препаратов для лечения вирусных заболеваний крайне ограничен. Поскольку вирусы являются строгими внутриклеточными паразитами и используют клеточные структуры для своей репродукции, сложно найти мишени для направленного синтеза соединений, которые нейтрализовали бы вирус и были бы безвредны для эукариотической клетки и организма человека. Поэтому практическое здравоохранение имеет весьма скудный набор противовирусных препаратов широкого спектра действия. Это, в первую очередь, интерфероны, ламивудин, рибавирин, инозин. Проблема усугубляется тем, что многие РНК-содержащие вирусы, например, вирусы гриппа, отличаются высокой генетической изменчивостью, что приводит к появлению мутантов, устойчивых к широко используемым противовирусным препаратам.

В связи с этим исследование новых подходов к созданию лекарственных средств с противовирусной активностью является весьма важной и востребованной областью современной биомедицинской науки.

Ильичева Татьяна Николаевна – доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией, e-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru
Ананько Григорий Григорьевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: ananko_gg@vector.nsc.ru
Косогова Татьяна Алексеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, e-mail: kosogova@vector.nsc.ru
Олькин Сергей Евгеньевич – кандидат химических наук, заведующий лабораторией, e-mail: olkin@vector.nsc.ru
Омигов Владимир Вилорьевич – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией, e-mail: omigov_vv@vector.nsc.ru
Таранов Олег Святославович – заведующий отделом, e-mail: taranov@vector.nsc.ru
Теплякова Тамара Владимировна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией, e-mail: teplyakova@vector.nsc.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

Меланины – собирательное название для группы высокомолекулярных черных и коричневых полимерных соединений, образующихся при окислительной полимеризации фенолов, главным образом пирокатехина и тирозина [1]. Меланины встречаются у животных, растений, бактерий и грибов, придавая им темную окраску. Они участвуют в репарации ДНК, процессах функционирования дыхательной цепи как акцептор электронов, являются модулятором таких важных систем клеточного метаболизма, как фото- и радиопротекция, нейтрализуют продукты перекисного окисления липидов и участвуют в нейромедиаторных процессах при многочисленных патологических нарушениях функциональных структур нейронов [2].

Трутовик скошенный (*Inonotus obliquus*) – вид грибов рода *Inonotus*, семейства *Hymenochaetaceae,* класса *Basidiomycetes*. Стерильная (бесплодная) форма гриба имеет название чага, или черный березовый гриб. Он обитает как паразит на стволах березы, реже поражает некоторые другие живые деревья – ольху, рябину, бук, клен, встречается в Азии, Европе и Северной Америке.

Установлено, что меланины из природной чаги обладают активностью против разных вирусов [3–8]. Для задач биотехнологии особый интерес представляют исследования по оценке биологической активности меланинов чаги, полученных из биомассы штамма, культивируемого в глубинных условиях. Ранее мы показали противовирусную активность культуральных меланинов против вируса простого герпеса II типа [9].

Цель настоящей работы – исследование противовирусной активности меланинов из глубинной культуры базидиального гриба чага *Inonotus obliquus,* штамм F-1244, депонированного в Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора [10] против пандемического вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09).

Экспериментальная часть

Получение меланинов из природной чаги. Для получения меланинов использовалось сухое измельченное сырье чаги из аптеки, которое соответствует требованиям [11].

Гриб, измельченный до размера частиц не более 0.5 мм, заливали раствором 0.1 М NaOH из расчета 1 : 10 и инкубировали при 50 °С в течение 5 ч. Полученный экстракт отделяли от твердого остатка центрифугированием и затем меланины осаждали добавлением соляной кислоты. Очистку меланинов от примесей осуществляли посредством 6-кратного переосаждения по следующей схеме: меланины, выпавшие в осадок, ресуспендировали в растворе 0.1 М NaOH в объемном соотношении 1 : 10 и снова осаждали путем закисления среды соляной кислотой до pH<2.0 с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об./мин. Раствор очищенных меланинов нейтрализовали до значения pH=7 и высушивали при температуре 50 °С.

Культивирование штамма Inonotus obliquus F-1244. Культивирование проводили в глюкозо-триптонной среде (ГТС) следующего состава, г/л: глюкоза – 30; триптон – 2.5; дрожжевой экстракт – 1.25; KH_2PO_4 – 1.1; K_2HPO_4 – 4.4; г/л $MgSO_4$ – 0.25; pH 7.0–8.0. Культивирование осуществлялось в 0.75 л колбах на качалке при 200 об./мин, 26 °С в течение 12 суток, до максимального накопления меланинов.

Контроль накопления меланинов. Для контроля динамики накопления меланинов в глубинной культуре использовали спектрофотометрический метод. Для этого делали разведения культуральной жидкости в 0.1 М NaOH так, чтобы при длине волны 465 нм значение оптической плотности раствора находилось в диапазоне от 0.1 до 0.4 единиц. Поглощение УФ и видимого света водными растворами меланинов регистрировали на спектрофотометре (PD-303UV, APEL).

ИК-спектрометрия образцов меланинов. ИК-спектры меланинов регистрировали на спектрометре Varian «Scimitar 1000 FT-IR». Пробоподготовку осуществляли прессованием таблеток с бромидом калия, как рекомендует Центр коллективного пользования (НОЦ) РУДН.

Выделение меланинов из культивированной чаги, штамм F-1244. Для полного выделения меланинов из глубинной культуры использовали следующие методики: выделение меланинов из культуральной жидкости (КЖ) и выделение меланинов из мицелия, с последующей очисткой от примесей переосаждением и диализом и ферментативной модификацией меланина.

Выделение меланинов из КЖ: культуральную жидкость отделяли от мицелия посредством фильтрования глубинной культуры на бумажном фильтре; меланины осаждали путем закисления среды соляной кислотой до pH<2.0 с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об./мин.

Выделение меланинов из мицелия: мицелий, отделенный от КЖ фильтрованием, заливали раствором 2% NaOH (1 : 10) и прогревали на водяной бане в течение 2 ч; экстракт отделяли от мицелия фильтрованием и осаждали меланины путем закисления среды соляной кислотой до pH<2.0 с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об./мин. Очистку меланинов от примесей осуществляли посредством 6-ти кратного переосаждения по схеме, описанной выше.

Ферментативная обработка меланинов. Меланины, очищенные переосаждением, подвергали ферментативной обработке трипсином: 1 мг/мл трипсина кристаллического (ООО Самсон-Мед, Россия), pH раствора 7.5, экспозиция 6 ч при 37 °С. Реакцию останавливали закислением раствора; затем нейтрализовали до значения pH=7 и высушивали.

Очистка диализом. Раствор меланина, очищенного переосаждением, диализовали через мембрану с размером пор 6–8 кДа против дистиллированной воды в течение 2 суток.

Исследование противовирусного действия меланинов. Для анализа противовирусной активности in vitro использовали метод измерения поглощения клетками прижизненного красителя – нейтрального красного. Для этого засевали лунки 96-луночного планшета культурой клеток MDCK (клетки почки собаки) в среде DMEM (Invitrogen) с добавлением 5% сыворотки плодов коровы (Gibco) и антибиотиков. Посевная доза – 2×10^4 клеток на лунку. После формирования 90% монослоя (20 ч инкубации при 37 °С в атмосфере 5% CO_2) клетки отмывали бессывороточной средой и вносили вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09) в дозе 100 $ТЦИД_{50}$ на лунку. Через 30 мин после заражения в лунки вносили разведения меланинов в концентрации 1–5000 мкг/мл в среде MEM (Invitrogen) с добавлением антибиотиков (Anti-Anti, Gibco) и 2 мкг/мл TPCK-трипсина (Sigma). Клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 в течение 72 ч. Затем в каждую лунку планшета был добавлен нейтральный красный (конечная концентрация 0.34%), через 1.5 ч клетки отмыты, добавлен раствор для экстракции красителя (0.1 М $NH_4H_2PO_4$ и 96% этанол в равных объемах) и определена оптическая плотность высвободившегося красителя на микропланшетном ридере BioRad 680 при длине волны 490 нм с использованием программы Земфира 2.0.

Эффективную дозу противовирусной активности меланинов, EC_{50}, рассчитывали как дозу (концентрацию) экспериментального препарата, которая на 50% ингибирует вирусную репродукцию.

Для анализа токсичности меланинов засевали лунки 96-луночного планшета культурой клеток MDCK, с посевной дозой 2×10^4 клеток на лунку. Через 20 ч инкубации при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 ростовую среду удаляли и вносили меланины, растворенные в среде MEM (Gibco), содержащей 5% сыворотки плодов коровы (Gibco) в концентрации 50–5000 мкг/мл. После 3 дней инкубации оценивали процент ингибирования пролиферации клеток с использованием нейтрального красного, как описано выше. Токсичность рассчитывали как дозу (концентрацию) меланинов, при которой погибает 50% клеток, или CC_{50}.

Индекс селективности, или терапевтический индекс IS, рассчитывали как отношение токсической дозы к эффективной: CC_{50}/EC_{50}. Обработку данных проводили с помощью Microsoft Office Excel 2003. В таблице приведены средние статистически достоверные данные при 95% вероятности.

Электронно-микроскопические исследования. Для изучения механизма действия меланина чаги на вирус гриппа проводились электронно-микроскопические исследования. Клетки MDCK, зараженные и незараженные вирусом гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09), были отделены с помощью резинового шпателя и зафиксированы в равном объеме 8% раствора параформальдегида в течение суток. После центрифугирования (1500 об./мин, 10 мин) и трехкратной промывки, осадок дополнительно фиксировали 1% раствором четырехокиси осмия. Обезвоживание, пропитывание и заливку в смеси эпон-аралдит проводили по общепринятой методике. Ультратонкие срезы готовили на микротоме Райхерт-Янг (Австрия), окрашивали уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония). Фотосъемку и анализ изображения проводили с помощью цифровой камеры бокового вывода Veleta (SIS, Германия) и программного пакета iTEM (SIS, Германия).

Обсуждение результатов

Характеризация полученных образцов меланинов из культивированной и природной чаги выполнена методом ИК-спектроскопии на спектрометре Varian «Scimitar 1000 FT-IR». Спектры поглощения в ИК-области часто применяются для подтверждения наличия в пробах меланиновых пигментов Они не несут в себе прямых сведений о структуре меланинов, но информируют о наличии в молекуле определенных связей и характерных функциональных групп. Так, характерными для меланинов являются полосы поглощения в области 1690–1590 $см^{-1}$, свидетельствующие о наличии в их структуре сопряженных, в том числе и ароматических связей, а широкая полоса в области 3430–3100 $см^{-1}$ обусловлена наличием OH-групп, в том числе и полифенольных [12]. Результаты анализа ИК-спектров образцов меланина из природной и культивированной чаги представлены на рисунках 1–2.

Выполненное исследование проб показало, что ИК-Фурье спектры меланинов содержат различные полосы поглощения с разными интенсивностями, что связано, по-видимому, с различной природой соединений, которым они соответствуют. Наряду с этим каждый спектр исследуемых проб содержит полосы поглощения, характерные для полифенольных соединений: 3100–3430 см$^{-1}$ (структуры, содержащие гидроксильные группы); 1580–1690, 1400–1420 см$^{-1}$ (сопряженные и ароматические структуры); 1300–1400 см$^{-1}$ (структуры с полосами С-ОН групп фенолов и С-О групп эфиров); 1000–1100 см$^{-1}$ (структуры с полосами С-ОН спиртовых групп полисахаридов). Вид ИК-спектров исследованных нами образцов достаточно хорошо соответствует виду ИК-спектров, полученных для очищенных различными способами меланинов чаги [13]. Все изложенное доказывает, что исследованные пробы содержат меланины.

Нами была проведена сравнительная оценка противовирусной активности меланинов (табл.), четыре образца были получены из культивированной чаги (14-34, 14-37, 13-61, 16-42) и один образец – из природной чаги (16-43).

Как следует из таблицы, все меланины проявляли высокую противогриппозную активность при низкой токсичности. Что касается меланинов из штамма чаги, культивируемого в глюкозо-триптонной среде, то данные таблицы свидетельствуют, что меланины, полученные в культуре, проявляют выраженную активность против вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09). Было показано, что очистка меланинов многократным переосаждением позволяет избавиться от части примесей, однако при этом повышается токсичность образцов. Для дополнительной очистки образцов культурального меланина использовали два разных способа. Хорошие результаты были достигнуты с помощью диализа через полупроницаемую мембрану с размером пор 6–8 кДа. Снижения токсичности образцов можно добиться также посредством ферментативной обработки. Так, обработка протеазой (трипсином) позволила снизить токсичность образца в 8 раз, это дает основания предположить, что основной причиной токсичности для клеток являются примеси белков. Высокий терапевтический индекс (IS=160), показанный для меланинов, полученных в глубинной культуре, позволяет характеризовать его как перспективный экспериментальный препарат.

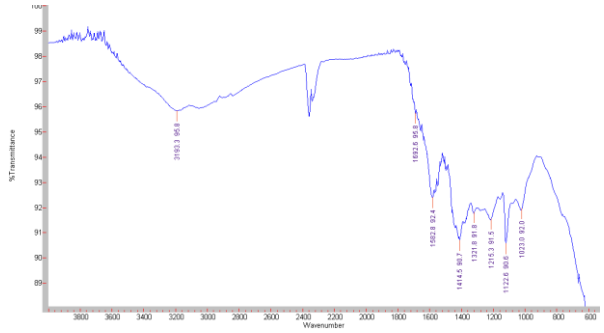


Рис. 1. ИК-Фурье спектр меланинов из КЖ, полученных из глубинной культуры штамма чаги F-1244

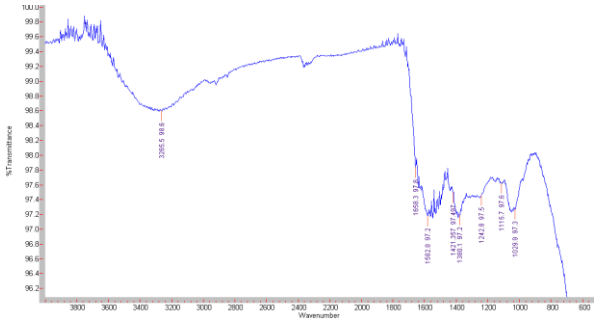


Рис. 2. ИК-Фурье спектр меланина из природного сырья чаги

Сравнительная оценка противовирусной активности меланинов разного происхождения в отношении вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09)

№ образца	Происхождение меланинов	Способ очистки меланинов	CC_{50}, мкг/мл	EC_{50}, мкг/мл	IS
14-34	Культура *I. obliquus* F-1244 (КЖ)	–	2363±266	47±12	50±15
14-37	Культура *I. obliquus* F-1244 (мицелий)	переосаждение	313±58	9.8±1.6	32±7
13-61	Культура *I. obliquus* F-1244 (мицелий)	диализ	2000±188	12.5±2.0	160±30
16-42	Культура *I. obliquus* F-1244 (мицелий)	ферментативная обработка (трипсином)	2500±240	40±4.4	62.5±21
16-43	Контроль – меланины из природного сырья чаги	переосаждение	2500±240	40±4.4	62.5±21

Электронно-микроскопическими исследованиями, проведенными нами ранее, было установлено, что при обработке клеток *Vero* экстрактом чаги, в который входили меланины, отсутствовали признаки размножения вируса простого герпеса 2-го типа в ядре, в то время как в контроле наблюдались многочисленные нуклеокапсиды вируса герпеса в ядре клеток и нарушение структуры ядра [14].

Для проведения аналогичного исследования на вирусе гриппа использовали меланины, полученные на основе глубинной культуры чаги. Клетки MDCK выращивали в культуральных флаконах, противовирусный эффект оценивали в отношении вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09). Результаты, полученные на серии срезов, свидетельствовали о влиянии меланинов на морфогенез вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09) в культуре клеток MDCK. Репродукция вируса при воздействии меланинов была снижена. В опытном образце, в присутствии меланинов, наблюдались преимущественно шаровидные мелкие вирусные частицы в межклеточном пространстве (рис. 3). В контрольных клетках (без меланина) преобладали нитевидные формы вируса на поверхности клетки (рис. 4), что коррелирует с более высоким цитопатическим действием вируса гриппа. Наиболее вероятным механизмом противовирусной активности представляется непосредственное взаимодействие меланинов с вирионами в межклеточном пространстве.

Природные ресурсы чаги быстро истощаются. Наши данные свидетельствуют о возможности получения качественных и биологически эффективных меланинов на основе биотехнологии. Повышение активности меланинов из глубинной культуры чаги может происходить за счет отбора более эффективных штаммов-продуцентов меланинов, подбора сред и условий культивирования, оптимальных методов очистки.

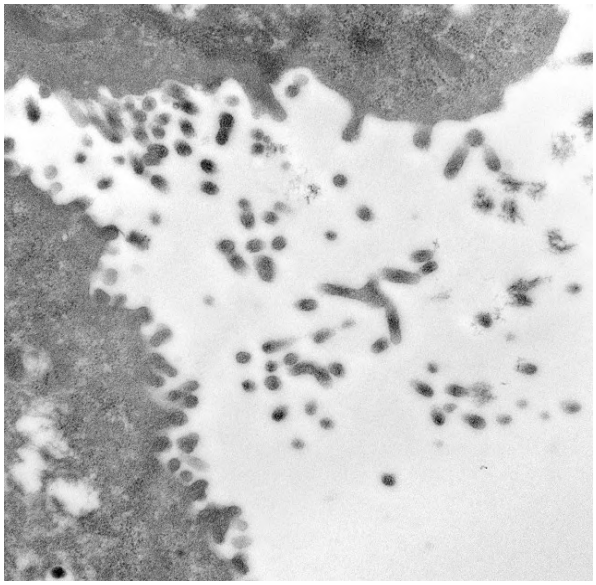


Рис. 3. Воздействие меланинов на вирус гриппа

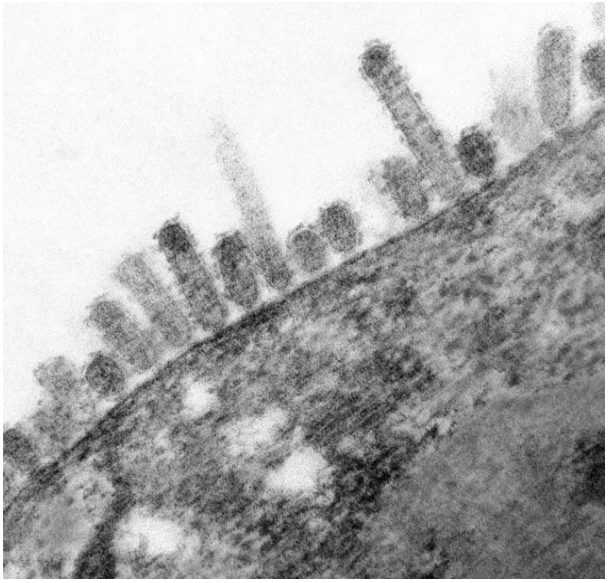


Рис. 4. Вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09). Контроль

Заключение

Результаты работы показывают, что меланины, полученные в глубинной культуре *Inonotus obliquus,* штамм F-1244, близки к природным меланинам (полученным из чаги) по своим ИК-спектрам и антивирусным свойствам. Показано, что культуральные меланины проявляют выраженную противовирусную активность в отношении вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1 pdm09) в культуре клеток MDCK. В то же время работа демонстрирует, что активность образцов зависит не только от источника меланинов, но и от способа их выделения и очистки. Так, токсическая доза (CC_{50}) образцов варьировала от 300 до 2500 мкг/мл, эффективная доза (EC_{50}) – от 10 до 47 мкг/мл, наибольший терапевтический индекс был равен 160.

Список литературы

1. Лях С.П. Микробный меланиногенез и его функции. М., 1981. 274 с.
2. Борщевская М.И., Васильева С.М. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов // Вопросы медицинской химии. 1999. №4. С. 54–66.

3. Патент №2480227 (РФ). Противовирусное средство на основе меланина / Т.В. Теплякова, Л.И. Пучкова, Т.А. Косогова. 2013.
4. Гашникова Н.М., Балахнин С.М., Теплякова Т.В., Ананько Г.Г., Косогова Т.А., Сухих А.С. Антиретровирусная активность меланинов из природной и культивируемой чаги (*Inonotus obliquus*) // Успехи медицинской микологии. 2014, №12. С. 299–301.
5. Теплякова Т.В., Косогова Т.В. Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. Новосибирск, 2014. 298 с.
6. Teplyakova T., Kosogova T. Fungal Bioactive Compounds with Antiviral Effect // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2015. Vol. 3, N8. Pp. 357–371. DOI: 10.17265/2328-2150/2015.08.001.
7. Tian J., Hu X., Liu D., Wu H., Qu L. Identification of Inonotus obliquus polysaccharide with broad-spectrum antiviral activity against multi-feline viruses // Int J Biol Macromol. 2017. Vol. 95. Pp. 160–167. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.054.
8. Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. Противовирусное действие водных экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* на вирус иммунодефицита человека // Вопросы вирусологии. 2015. Т. 60, №2. С. 35–38.
9. Ананько Г.Г., Теплякова Т.В., Бардашева А.В., Ильичева Т.Н. Меланины из глубинной культуры Inonotus obliquus и их противовирусная активность в отношении вируса простого герпеса 2 типа // Успехи медицинской микологии. 2015. Т. 14. С. 384–388.
10. Косогова Т.А. Штаммы базидиальных грибов юга Западной Сибири – перспективные продуценты биологически активных препаратов: дисс. … канд. биол. наук. Кольцово, 2013. 172 с.
11. Государственная фармакопея СССР. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 1-е изд. М.: Медицина, 1990. Т. 2, вып. 2. С. 187–209.
12. Paim S., Linhares F., Mangrich A.S., Martin J.P. Characterization of fungal melanins and soil humic acids by chemical analysis and IR spectroscopy // Biol. Fertil. Soils. 1990. N10. Pp. 72–76. DOI: 10.1007/BF00336128.
13. Грачева Н.В. Химическая модификация природных полимеров меланинов гриба *Inonotus obliquus* (чага) с целью получения высокоактивных антиоксидантов: автореф. дисс. … канд. техн. наук. Волгоград, 2014. 24 с.
14. Теплякова Т.В., Казачинская Е.И., Рябчикова Е.И., Косогова Т.А., Таранов О.С., Омигов В.В., Локтев В.Б. Противовирусная активность водных экстрактов и некоторых препаратов из гриба чага (*Inonotus obliquus)* в отношении вируса простого герпеса 2 типа // Современная микология в России: материалы 3-го Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2012. Т. 3. С. 418–419.

Поступила в редакцию 13 февраля 2019 г.

После переработки 19 декабря 2019 г.

Принята к публикации 28 января 2020 г.

Для цитирования: Ильичева Т.Н., Ананько Г.Г., Косогова Т.А., Олькин С.Е., Омигов В.В., Таранов О.С., Теплякова Т.В. Противовирусная активность меланина из чаги (*Inonotus obliquus*), полученного на основе культивирования штамма F-1244, выделенного в чистую культуру // Химия растительного сырья. 2020. №2. С. 283–289. DOI: 10.14258/jcprm.2020025167.

Ilyicheva T.N.[*], *Anan'ko G.G., Kosogova T.A., Olkin S.E., Omigov V.V., Taranov O.S., Teplyakova T.V.* ANTIVIRAL ACTIVITY OF THE MELANIN FROM BIRCH FUNGUS (*INONOTUS OBLIQUUS*) OBTAINED BY CULTIVATING F-1244 STRAIN ISOLATING TO PURE CULTURE

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, 630559 (Russia),
e-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru

The aim of the work was a comparative study of the antiviral activity of the melanin isolated from submerged culture of basidiomycete birch fungus *Inonotus obliquus* F-1244 and melanin obtained from natural birch fungus. We showed that the melanin isolated from cultivated birch fungus is similar to the melanin from natural birch fungus in respect of its physicochemical and antiviral properties. Although, the sample`s activity depended not only on the source of melanin, but also on the method of isolating and purification. The toxic dose (CD_{50}) varied from 300 to 2500 µg/ml. The effective antiviral dose in the case of A/H1N1pdm09 (ID50) was one from 10 to 47 µg/ml. The highest therapeutic index was for the melanin of the cultivated birch fungus, purified by dialysis. The index made 160; it is higher in 2, 5 times in comparison with natural birch fungus.

The melanin from cultivated birch fungus is a promising substance for the developing of naturally occurring medication.

Keywords: *Inonotus obliquus*, herbal drug, bioactivity, antiviral activity.

References

1. Lyakh S.P. *Mikrobnyy melaninogenez i yego funktsii*. [Microbial melaninogenesis and its functions]. Moscow, 1981, 274 p. (in Russ.).
2. Borshchevskaya M.I., Vasil'yeva S.M. *Voprosy meditsinskoy khimii*, 1999, no. 4, pp. 54–66. (in Russ.).
3. Patent 2480227 (RU). 2013. (in Russ.).
4. Gashnikova N.M., Balakhnin S.M., Teplyakova T.V., Anan'ko G.G., Kosogova T.A., Sukhikh A.S. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*, 2014, no. 12, pp. 299–301. (in Russ.).
5. Teplyakova T.V., Kosogova T.V. *Vysshiye griby Zapadnoy Sibiri – perspektivnyye ob"yekty dlya biotekhnologii lekarstvennykh preparatov*. [Higher mushrooms of Western Siberia – promising objects for biotechnology of drugs]. Novosibirsk, 2014, 298 p. (in Russ.).
6. Teplyakova T., Kosogova T. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2015, vol. 3, no. 8, pp. 357–371. DOI: 10.17265/2328-2150/2015.08.001.
7. Tian J., Hu X., Liu D., Wu H., Qu L. *Int J Biol Macromol*., 2017, vol. 95, pp. 160–167. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.054.
8. Shibnev V.A., Garayev T.M., Finogenova M.P., Kalnina L.B., Nosik D.N. *Voprosy virusologii*, 2015, vol. 60, no. 2, pp. 35–38. (in Russ.).
9. Anan'ko G.G., Teplyakova T.V., Bardasheva A.V., Il'icheva T.N. *Uspekhi meditsinskoy mikologii*, 2015, vol. 14, pp. 384–388. (in Russ.).
10. Kosogova T.A. *Shtammy bazidial'nykh gribov yuga Zapadnoy Sibiri – perspektivnyye produtsenty biologicheski aktivnykh preparatov: diss. … kand. biol. nauk*. [Strains of basidiomycetes of the south of Western Siberia – promising producers of biologically active drugs: Diss. ... cand. biol. of sciences]. Kol'tsovo, 2013, 172 p. (in Russ.).
11. *Gosudarstvennaya farmakopeya SSSR. Obshchiye metody analiza. Lekarstvennoye rastitel'noye syr'ye. 11 izd.* [The State Pharmacopoeia of the USSR. General methods of analysis. Medicinal plant material. 11th ed.]. Moscow, 1990, vol. 2, no. 2, pp. 187–209. (in Russ.).
12. Paim S., Linhares F., Mangrich A.S., Martin J.P. *Biol. Fertil. Soils*, 1990, no. 10, pp. 72–76. DOI: 10.1007/BF00336128.
13. Gracheva N.V. *Khimicheskaya modifikatsiya prirodnykh polimerov melaninov griba Inonotus obliquus (chaga) s tsel'yu polucheniya vysokoaktivnykh antioksidantov: avtoref. diss. … kand. tekhn. nauk*. [Chemical modification of natural polymers of melanins of the fungus *Inonotus obliquus* (chaga) in order to obtain highly active antioxidants: author. diss. ... cand. tech. sciences]. Volgograd, 2014, 24 p. (in Russ.).
14. Teplyakova T.V., Kazachinskaya Ye.I., Ryabchikova Ye.I., Kosogova T.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Loktev V.B. *Sovremennaya mikologiya v Rossii. Materialy 3-go S"yezda mikologov Rossii.* [Modern mycology in Russia. Materials of the 3rd Congress of Mycologists of Russia]. Moscow, 2012, vol. 3, pp. 418–419. (in Russ.).

Received February 13, 2019

Revised December 19, 2019

Accepted January 28, 2020

For citing: Ilyicheva T.N., Anan'ko G.G., Kosogova T.A., Olkin S.E., Omigov V.V., Taranov O.S., Teplyakova T.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 2, pp. 283–289. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020025167.

[*] Corresponding author.

Протективная активность водных экстрактов из высших грибов при экспериментальной герпесвирусной инфекции у белых мышей

И. А. РАЗУМОВ[1,2], Е. И. КАЗАЧИНСКАЯ[2], Л. И. ПУЧКОВА[2],
Т. А. КОСОГОВА[2], И. А. ГОРБУНОВА[3], В. Б. ЛОКТЕВ[2], Т. В. ТЕПЛЯКОВА[2]

[1] Институт цитологии и генетики, СО РАН, *Новосибирск*
[2] Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», *Кольцово, Новосибирская область*
[3] Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, *Новосибирск*

Protective Activity of Aqueous Extracts from Higher Mushrooms Against *Herpes sipmlex* Virus Type-2 on Albino Mice Model

I. A. RAZUMOV, E. I. KAZACHINSKAYA, L. I. PUCHKOVA,
T. A. KOSOGOVA, I. A. GORBUNOVA, V. B. LOKTEV, T. V. TEPLYAKOVA

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, *Novosibirsk*
State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, *Novosibirsk Region, Koltsovo*
Central Siberian Botanical Gardens, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, *Novosibirsk*

Проведено изучение токсичности и противовирусной активности водных экстрактов, приготовленных из высших грибов, базидиомицетов: *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) — шиитаке, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. — вешенка устричная, *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát — чага, *Hydnellum compactum* (Pers.) P. Karst. — ежовик плотный. Экстракты не обладали острой токсичностью для мышей в дозах от 0,8 до 4 мг на животное при пероральном и внутрибрюшинном введении. При повышении дозы сухого вещества экстракта чаги до 20 мг на мышь наблюдалась гибель половины животных. При внутрибрюшинном введении водных экстрактов грибов 0,4—2 мг сухого вещества на мышь за сутки до заражения животных одной ЛД$_{50}$ вируса простого герпеса 2 типа была выявлена 100% выживаемость животных, получивших экстракты грибов *Lentinula edodes* и *Pleurotus ostreatus*, и 90% выживаемость при использовании экстрактов *Inonotus obliquus* и *Hydnellum compactum*.

Ключевые слова: базидиальные грибы, Lentinula edodes, Pleurotus ostreatus, Inonotus obliquus, Hydnellum compactum, водные экстракты, противовирусная активность in vivo, вирус простого герпеса 2 типа.

Toxicity and antiviral activity of aqueous extracts from higher mushrooms such as *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (shiitake), *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (oyster), *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát (chaga), *Hydnellum compactum* (Pers.) P. Karst. (compact tooth) were studied. In doses of 0.8 to 4.0 mg (dry weight) per mouse administered orally or intraperitoneally the extracts showed no acute toxicity. When the dose of the chaga extract was increased to 20 mg per mouse, a half of the animals died. Intraperitoneal administration of the aqueous extracts in a dose of 0.4—2 mg per mouse prior to the contamination by a single LD$_{50}$ of *Herpes simplex* type 2 provided 100-percent survival of the animals exposed to the *Lentinula edodes* or *Pleurotus ostreatus* extracts and 90-percent survival of the animals exposed to the *Inonotus obliquus* or *Hydnellum compactum* extracts.

Key words: basidiomycetes, Lentinula edodes, Pleurotus ostreatus, Inonotus obliquus, Hydnellum compactum, aqueous extracts, in vivo antiviral activity, Herpes simplex type 2.

Введение

Вирус простого герпеса 2 типа (ВПГ-2) является членом подсемейства *Alphaherpesvirinae* семейства *Herpesviridae* [1]. Геном представлен двухцепочечной ДНК размером более 154 тысяч нуклеотидов, которая кодирует 77 полипептидов (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/10301). ВПГ-2 наиболее часто вызывает генитальную герпетическую инфекцию [2, 3]. Заболевание генитальным герпесом в разных странах достигает уровня в 80—200 случаев на 100 тыс. населения [4]. Для пациентов с иммунодефицитными состояниями ВПГ-2 представляет особую опасность, вызывая генерализованную герпетическую инфекцию с обширными поражениями внутренних органов, нередко с летальным исходом.

Для лечения герпесвирусных инфекций используется целый ряд противовирусных препаратов. Наиболее часто применяется препарат ацикловир (зовиракс, виролекс), являющийся синтетическим аналогом дезоксигуанидина. После фосфорилирования он способен блокировать

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции:
E-mail: earumov@bionet.nsc.ru

Таблица 1. **Характеристики экстрактов из грибов базидиомицетов**

Вид, штамм гриба	Происхождение биомассы для экстрактов	Способ приготовления образца	Масса сухого вещества, мг/мл
Lentinula edodes 3760 (шиитаке)	Мицелий, выращенный на зерне в течение 1 мес	Навеску гриба с сырым зерном суспендировали в стерильной дистиллированной воде 1:4 по массе, прогревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, фильтровали через несколько слоев марли, а затем центрифугировали 20 мин при 10000 об/мин.	4,0
Inonotus obliquus (чага)	Чага сухая из аптеки (поставщик ООО «Лека-Трест», г. Барнаул)	5 г измельчённой на кофемолке чаги залили 100 мл кипящей воды, выдерживали 1 ч на качалке при комнатной температуре, затем 3 суток в термостате при температуре 50°С, отфильтровали через марлю, затем центрифугировали 20 мин при 10000 об/мин.	20,0
Hydnellum compactum KL-9 (ежовик плотный)	Плодовые тела (собраны в Караканском бору, Новосибирской обл.)	10 г высушенных, измельчённых на кофемолке плодовых тел залили 200 мл кипящей дистиллированной воды, встряхивали на качалке при температуре 28—30°С в течение 1 ч при 120 об/мин, затем выдерживали 2 суто к в термостате при 50°С, профильтровали через 8 слоев марли, центрифугировали 20 мин при 10000 об/мин.	5,5
Pleurotus ostreatus HK-35 (вешенка устричная)	Мицелий, выращенный на зерне в течение 1 мес	Навеску гриба с сырым зерном суспендировали в стерильной дистиллированной воде 1:4 по массе, прогревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, затем выдерживали 48 ч при 50°С в термостате, центрифугировали 20 мин при 10000 об/мин.	4,0

вирусную ДНК полимеразу и синтез вирусной ДНК [5]. Клеточные синтезы при этом блокируются незначительно. Его широкое использование привело к возникновению лекарственно-устойчивых штаммов вируса герпеса. Токсичность ацикловира также накладывает ограничения к его применению у пациентов с нарушениями функции почек. В медицинской практике для лечения герпесвирусных инфекций также используются идоксуридин, фоскарнет, тромантадин, интерфероны и их индукторы, а также препараты растительного происхождения, например, панавир [6]. Однако существующие лекарственные средства на основе ацикловира, а также другие антивирусные препараты химического и растительного происхождения, не позволяют эффективно контролировать герпесвирусные инфекции [4]. Это ставит перед исследователями задачу поиска и разработки новых антивирусных препаратов как химического, так и растительного происхождения.

Нами ранее была показана антивирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов, для культур клеток инфицированных ВПГ-2 [7]. Было обнаружено, что ряд препаратов, полученных из грибов, относящихся к родам *Ganoderma, Lentinula* и *Pleurotus*, полностью подавляли инфекционную активность ВПГ-2 на культуре клеток Vero. Антивирусная активность этих препаратов была связана, по-видимому, с наличием в их составе полисахаридов.

Целью данной работы явилось получение экстрактов из высших грибов базидиомицетов: *Lentinula edodes, Pleurotus ostreatus, Inonotus obliquus, Hydnellum compactum* и изучение токсичности и протективной активности этих экстрактов для белых мышей, инфицированных ВПГ-2.

Материал и методы

Объекты исследования и их культивирование и приготовление. В работе были использованы экстракты из базидиальных грибов: *Lentinula edodes (*Berk.) Pegler (= *Lentinus edodes* (Berk.) Singer) — шиитаке, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. — вешенка устричная, *Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pilát — чага, *Hydnellum compactum* (Pers.) P. Karst. — ежовик плотный, имеющиеся в лаборатории микологии Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ГНЦ ВБ «Вектор»). Для подготовки экстрактов или образцов использовали биомассу грибов, полученную путём выращивания их на стерильном зерне [8], некоторые из образцов были представлены плодовыми телами. Более полные данные по образцам представлены в табл. 1.

Вирусы. Штамм MS вируса простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2) был получен из Американской коллекции клеточных культур (ATCC). В ГНЦ ВБ «Вектор» вирусный штамм прошёл 1 пассаж на культуре клеток Vero. До начала работ исходную суспензию, содержащую вирус, хранили в жидком азоте.

Культура клеток. Перевиваемую культуру клеток Vero (почки африканской зелёной мартышки) поддерживали на питательной среде DMEM (ГНЦ ВБ «Вектор»), содержащей 5% сыворотки плода коровы («BioClot», Германия).

Мыши. Опыты по определению токсичности и протективной активности образцов проводили на белых беспородных мышах 3—4-недельного возраста, полученных из вивария ГНЦ ВБ «Вектор».

Определение токсичности проб. Для выявления токсичности образцы объёмом 100 и 500 мкл/мышь вводили внутрибрюшинно или перорально (*per os*) дважды с интервалом в трое суток. Срок наблюдения за животными составил 2 недели.

Таблица 2. **Протективная активность водных экстрактов грибов у белых мышей, инфицированных вирусом простого герпеса 2 типа**

Экстракт гриба	Количество сухого вещества, введённого в животное, мг	Число инфицированных мышей	Число выживших мышей, %
Lentinula edodes (шиитаке)	0,4	10	10 (100)
Inonotus obliquus (чага)	2	10	9 (90)
Hydnellum compactum (ежовик плотный)	0,55	10	9 (90)
Pleurotus ostreatus (вешенка устричная)	0,4	10	10 (100)
Физиологический раствор	0	10	5 (50)

Примечание. Мышей инфицировали одной $ЛД_{50}$ ВПГ-2. ТГ-2. За животными наблюдали в течение 26 сут после инфицирования. Объём препарата на мышь — 100 мкл.

Определение протективной активности образцов. Защитное действие экспериментальных препаратов изучали при их введении по 100 мкл/мышь внутрибрюшинно за сутки до инфицирования мышей ВПГ-2 в дозе, вызывающей 50% гибель инфицированных животных. Срок наблюдения составил 26 дней. Изучение антивирусной активности грибных проб проводили, руководствуясь методами, представленными в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [9] и Государственной Фармакопеи [10].

Результаты и обсуждение

Определение токсичности образцов на животных. Определение токсичности водных экстрактов грибов *Lentinula edodes, Inonotus obliquus, Hydnellum compactum, Pleurotus ostreatus* проводилось с использованием белых беспородных мышей при пероральном и внутрибрюшинном введении экстрактов. В диапазоне доз от 0,8 до 5,5 мг (из расчёта на суммарное сухое вещество экстракта) острой токсичности водных экстрактов четырёх видов грибов выявлено не было. При использовании экстракта гриба чаги была предпринята попытка определить нижнюю границу токсичности подобных препаратов. В результате было обнаружено, что острая токсичность проявляется при парентеральном введении 20 мг разведённого сухого вещества этого препарата на каждое животное. В результате инокуляции такой дозы погибла половина животных.

Определение протективной активности образцов. Протективную активность водных экстрактов грибов определяли в соответствии с рекомендациями [11] при использовании внутрибрюшинного способа введения водных экстрактов за 24 ч до инфицирования животных ВПГ-2 (табл. 2). При введении водных экстрактов грибов видов *Lentinula edodes* и *Pleurotus ostreatus* в дозе 0,4 мг сухого вещества на мышь за сутки до заражения животных одной $ЛД_{50}$ (летальная доза вируса, вызывающая гибель 50% животных при введении) вируса простого герпеса 2 типа (ВПГ-2) была выявлена 100 % выживаемость животных и 90% у обработанных экстрактами грибов видов *Inonotus obliquus* и *Hydnellum compactun* в дозе 2 и 0,55 мг сухого вещества на мышь соответственно.

Итак, установлено, что введение препаратов для защиты от экспериментальной герпесвирусной инфекции обеспечивает 100% выживаемость белых мышей, обработанных водными экстрактами грибов *Lentinula edodes* и *Pleurotus ostreatus.*

Препараты водных экстрактов *Inonotus obliquus* и *Hydnellum compactum* показали несколько меньшую, но весьма существенную протективную активность.

Антивирусная активность экстрактов базидиальных грибов описана в отношении вируса гепатита В [12], вируса простого герпеса первого типа (ВПГ-1) и вируса гриппа А [13, 14], вируса иммунодефицита человека, ортопоксвирусов [15, 16], а также некоторых других вирусов [17—19]. Так, рядом авторов было показано, что препараты, приготовленные из гриба *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst, достоверно ингибировали цитопатический эффект вируса простого герпеса и вируса везикулярного стоматита на культуре клеток [20, 21]. Основными компонентами этих препаратов являются различные полисахариды (40,6%) и белки (7,8%). Из культуры гриба *Macrocystidia cucumis* (Pers.) Joss, был выделен пуриновый нуклеозид, который обладал антивирусной активностью против ВПГ-1 на культуре клеток в концентрациях 300—440 мкг/мл с индексом селективности более 22 [22]. Был обнаружен синергический эффект при совместном использовании этого препарата с ацикловиром и видарабином. Из водного экстракта гриба *Rozites caperatus* (Pers.: Fr) P. Karst были выделены новые антивирусные препараты RC28 и RC183 белковой природы, препятствующее процессу репликации ВПГ 1 и 2 типов, цитомегаловирусов, респираторно-синцитиального вируса и вируса гриппа типа А [23]. Другими авторами был обнаружен протеин, обладающий антивирусной активностью в отношении вирусов герпеса и гепатита [24, 25]. Гликопротеин, выделенный из мицелия *G.lucidum* также был эффективен против ВПГ 1 и 2 типа [26]. Из экстракта плодового тела гриба *Grifola frondosa* (Dicks.) Gray было выделено соединение белковой природы, ингибирующее репликацию ВПГ-1. В результате анализа химического состава соединения антивирусного белка с помощью метода

масс-спектрометрии было найдено, что это пептид, состоящий из 11 аминокислот [24, 25]. Большую группу биологически активных соединений грибов составляют изопреноиды. При анализе антивирусной активности экстракта *Ganoderma pfeifferi* Bres. против вируса гриппа типа А и вируса простого герпеса 1 типа было установлено, что основным антивирусным компонентом экстракта были тритерпеноиды: ганодермадиол, луцидодиол, апланоксиновая кислота G [27]. Недавно было выявлено, что антивирусной активностью в отношении вирусов герпеса обладают полисахариды гриба *Agaricus brasiliensis* Fr. и гликаны из *Pleurotus tuber-regium* (*Lentinus tuber-regium* (Fr.) Fr.) [28, 29]. Полученные результаты указывают, что препараты на основе базидиальных грибов, как правило, проявляют активность при низких концентрациях активного вещества и обладают низкой токсичностью. Кроме того, по-видимому, антивирусное действие *in vitro* веществ в составе грибных препаратов связано с неспецифическим реагированием их со свободными вирионами. Эти вещества или субстанции после инкубации *in vitro* с вирусом и последующим заражении клеток взаимодействуют с мембранами клеток и конкурируют с вирусами за рецепторы или полисахариды на поверхности клеток, с помощью которых происходит прикрепление и проникновение вируса внутрь клетки-хозяина. А при обработке клеток до инфицирования вирусом эти субстанции блокируют клеточные рецепторы для проникновения вируса, а после инфицирования не позволяют вирусному потомству выходить из заражённых клеток и далее инфицировать соседние здоровые клетки.

Нами ранее была показана антивирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из грибов, относящихся к родам *Ganoderma, Lentinus* и *Pleurotus*, для клеток культуры Vero, инфицированных ВПГ-2 [7]. Нами было высказано предположение, что антивирусная активность этих препаратов была связана с непосредственным взаимодействием полисахаридов с вирусными частицами.

Возможность защиты животных от вирусной инфекции подобными препаратами далеко не очевидна. Поэтому были предприняты эксперименты по оценке возможной острой токсичности водных экстрактов, приготовленных из грибов родов *Lentinula, Pleurotus, Inonotus* и *Hydnellum,* для беспородных белых мышей при двух способах введения препаратов. Все исследованные препараты не проявляли острой токсичности при пероральном и парентеральном введении в дозах от 0,8 до 5,5 мг на животное. Попытка достичь порога токсичности была предпринята только для препарата из гриба чаги при внутрибрюшинном введении. Оказалось, что острая токсичность проявляется при концентрациях порядка 20 мг/мл сухого вещества. Вполне понятно, что это весьма высокие концентрации сухого вещества для простых водных экстрактов и на практике они весьма труднодостижимы без использования специальных способов экстракции.

Невысокая токсичность позволила нам провести оценку способности водных экстрактов, приготовленных из грибов базидиомицетов, защищать от гибели белых мышей от летальной инфекции, вызванной введением ВПГ-2. Полученные результаты подтвердили выявленную на клетках Vero противовирусную активность грибных экстрактов. Протективная или защитная активность водных экстрактов из базидиомицетов *Lentinula edodes* (шиитаке), *Pleurotus ostreatus* (вешенка устричная), *Inonotus obliquus* (чага), *Hydnellum compactum* (ежовик плотный) при экспериментальной герпесвирусной инфекции у мышей не была показана ранее. Наличие выраженного антивирусного эффекта в экспериментах *in vitro* и *in vivo* указывает на перспективность использования водных экстрактов для создания относительно простых антивирусных препаратов. Важно отметить, что противовирусная активность водных экстрактов грибов против вируса простого герпеса может позволить сконструировать технологически простые препараты для лечения поверхностных герпетических поражений. Другая возможность связана с поиском и выделением антивирусных веществ или соединений из водных экстрактов высших грибов. Перспективность этого направления несомненна, и она обосновывается выраженной протективной активностью исследованных экстрактов и их низкой токсичностью. Это может позволить не только проводить поиск препаратов для лечения вирусных заболеваний, но и разрабатывать лекарственные средства для комплексной терапии, что особенно важно при вирусных заболеваниях, так как они зачастую осложняются сочетанными инфекциями.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ, интеграционным проектом СО РАН № 52, грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-65387.2010.4 и НШ-2996.2012.4, договором Минобрнауки № 11.G34.31.0034.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. et al.* Fields virology. Publisher: Philadelphia :Wolters Kluwer Health/Lippincott Villiams & Wilkins, 2007.
2. *Weiss H.* Epidemiology of *Herpes simplex* virus type 2 infection in the developing world. Herpes 2004; 11: Supp 1: 1: 24A—35A.
3. *Malkin J.E.* Epidemiology of genital *Herpes simplex* virus infection in developed countries. Herpes 2004; 11:Supp 1: 1: 2A—23A.
4. *Джонс Ш., Каннинхэмг А.* Вакцинопрофилактика генитального и неонатального герпеса, вызванного вирусом простого герпеса. Инфекц перед пол пут 2004; 1: 46-49.
5. *Faulds D., Heel R.C.* Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. Drugs 1990; 39: 597-638.
6. *Кузовкова Т.В., Герасимова Н.М., Кунгуров Н.В.* Опыт применения препарата панавир при лечении больных генитальной герпесвирусной инфекцией. Вестн последиплом мед обр 2002; 3—4: 14—16.
7. *Разумов И.А., Косогова Т.А., Казачинская Е.И., Пучкова Л.И., Щербакова Н.С., Горбунова И.А., Михайловская И.Н., Локтев В.Б., Теплякова Т.В.* Противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов. Антибиотики и химиотер 2010; 55: 9—10: 14—18.
8. *Бухало А.С.* Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев: 1988; 144.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: 2000; 1—398.
10. Государственная фармакопея СССР. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. М.: 1990; 11: 2: 2: 187—209.
11. *Бурова Л.Г, Евстропов А.Н., Грек О.Р., Захарова Л.Н. Волхонская Т.А.* Применение полифенольного комплекса экстрагированного из пятилистника кустарникового {*Penthaphylloides fruticosa* (L.) O.Schwarz) для профилактики Коксаки-вирусной инфекции. Бюлл сибир мед 2002; 4: 27—31.
12. *Gao Y., Zhou Sh., Huang M., Xu A.* Antibacterial and antiviral value of the genus *Ganoderma* P. Karst. Species (*Aphyllophoromycetideae*): a review. Int J Med Mushrooms 2003; 5: 235—246.
13. *Niedermeyer T.H., Lindequist U., Mentel R., Gördes D., Schmidt E., Thurow K., Falk M.* Antiviral Terpenoid Constituents of *Ganoderma pfeifferi*. J Nat Prod. 2005; 68: 12: 1728—1731.
14. *Teplyakova T.V., Psurtseva N.V., Kosogova T.A., Mazurkova N.A., Khanin V.A., Vlasenko V.A.* Antiviral activity of polyporoid mushrooms (higher Basidiomycetes) from Altai mountains (Russia). Intern J Med Mush 2012; 14: 1: 37—45.
15. *Гашникова Н.М., Теплякова Т.В., Проняева Т.Р., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Сергеев А.Н.* Результаты исследований по выявлению анти-ВИЧ активности экстрактов из высших базидиальных грибов. Иммунопатол аллергол инфектол 2009; 2: 170—171.
16. *Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимова Ж.Б., Юрганова И.А., Кабанов А.С., Пучкова Л.И., Бормотов Н.И., Бардашева А.В.* Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов. Проблем особо опас инфекц 2012; 3: 113: 99—101.
17. *Wasser S. P.* Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. Appl Microbiol Biotechnol 2011; 89: 5: 1323—1332.
18. *Stamets P.* MycoMedicinals. An informational treatise on mushrooms. Olympia, WA: Myco Media Productions 2002; 96.
19. *Brandt C.R., Pirano F.* Mushroom antiviral. Recent Res Dev Antimicrob Agent Chemother 2000; 4: 11—26.
20. *Eo S.-K., Kim Y.-S., Lee C.-K., Han S.-S.* Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. J Ethnopharmacol 1999; 68: 1: 1—3: 175—181.
21. *Eo S.-K., Kim Y.-S., Lee C.-K., Han S.-S.* Antiviral activities of various water and methanol soluble substances isolated from *Ganoderma lucidum* II. J Ethnopharmacol 1999; 68: 1: 1—3: 129—136.
22. *Oh K.-W., Lee C.-K., Kim Y.-S., Eo S.-K., Han S.-S.* Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with acyclovir and vidarabine. J Ethnopharmacol 2000; 72: 1: 1—2: 221—227.
23. *Pirano F. F.* The Development of the Antiviral Drug RC 28 from *Rozites caperatus* (Pers.: Fr.) P. Karst. (*Agaricomycetideae*). International Journal of Medicinal Mushrooms 2005; 7: 356.
24. *Gu C., Li J., Chao F., Jin M., Wang X., Shen Z.* Isolation, identification and function of a novel anti-HSV-1 protein from *Grifola frondosa*. Antivir Res 2007; 75: 250—257.
25. *Gu C., Li J., Chao F.* Inhibition of hepatitis B virus by D-fraction from *Grifola frondosa*: Synergistic effect of combination with interferon-α in HepG2 2.2.15. Antivir Res 2006; 72: 162—165.
26. *Eo S.-K., Kim Y.-S., Lee C.-K., Han S.-S.* Antiherpetic activities of various protein bound polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. J Ethnopharmacol 1999; 68: 1—3: 175—181.
27. *Mothana R.A.A., Awadh Ali N.A., Jansen R., Wegner U., Mentel R., Lindequist U.* Antiviral lanostanoid triterpenes from the fungus *Ganoderma preifferi*. Fitoterapia 2003; 74: 177-180.
28. *Cardozo F.T., Camelini C.M., Mascarello A., Rossi M.J., Nunes R.J., Barardi C.R., de Mendonça M.M., Simões C.M.* Antiherpetic activity of a sulfated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* mycelia. Antivir Res 2011; 92: 1: 108—114.
29. *Zhang M., Cheung P. C., Ooi V. E., Zhang L.* Evaluation of sulfated fungal beta-glucans from the sclerotium of *Pleurotus tuber-regium* as a potential water-soluble anti-viral agent. Carbohydr Res 2004; 339: 13: 2297—3001.

Биомедицинская химия, 2016 том 62, вып. 4, с. 369-375.

УДК 615.322
©Коллектив авторов

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИТЕРПЕНОВЫХ И СТЕРОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЧАГИ

С.А. Никитина*, В.Р. Хабибрахманова, М.А. Сысоева

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
420015, Казань, ул. К. Маркса, 68; тел.: (843) 231-41-73; эл. почта: semicvetik-86@bk.ru

Систематизированы данные по химическому составу веществ тритерпеновой и стероидной природы, выделенных из чаги, как выращенной в условиях искусственной культуры, так и произрастающей в природе. Приведены сведения по биологической активности экстрактов из чаги и этих соединений в отношении различных линий клеток рака *in vitro* и *in vivo*. Проведённый анализ позволил выявить определенные закономерности в эффективности подавления роста различных линий клеток. Установлено, что наибольшей активностью обладают тритерпеновые соединения, содержащие ОН-группу при С-22 и ненасыщенную связь в боковой цепи.

Ключевые слова: чага, тритерпеновые соединения, стероидные соединения, биологическая активность, *in vivo*, *in vitro*

DOI 10.18097/PBMC20166204369

ВВЕДЕНИЕ

Исследованию тритерпеновых и стероидных соединений чаги посвящено много работ, в которых описано выделение новых соединений непосредственно из гриба, установление структуры и определение их фармакологической активности [1-38]. Авторы ряда исследований рассматривают возможные механизмы действия этих соединений, но обобщения экспериментального материала по данной тематике до сих пор нет.

Первые тритерпеновые соединения в чаге были обнаружены польскими учёными Ludwiczak и Wrecino [2]. Они выделили ланостерол – 3β-гидроксиланоста-8,24-диен (**А**) и его производное 3β,22-дигидроксиланоста-8,24-диен или инотодиол (**А1**) (рисунок).

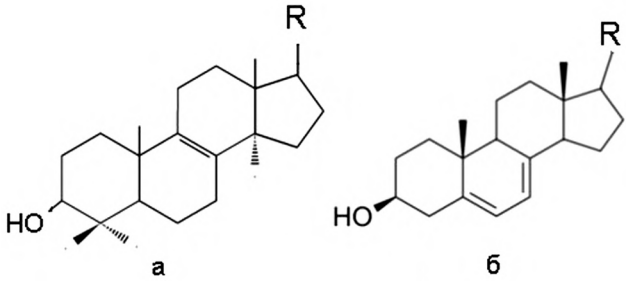


Рисунок. Общая структурная формула тритерпенов ланостанового ряда (а) и стероидных соединений (б).

На сегодняшний день из чаги выделены около 40 тритерпеновых соединений ланостанового ряда:

- кислоты – траметеноловая (3β-гидроксиланоста-8,24-диен-21-овая кислота, **А2**) и обликвиновая (3β-гидроксиланоста-8-ен-21-овая кислота, **А3**), 3β-гидрокси-25,26,27-тринорланоста-8,22*E*-диен-24-овая кислота (**А4**);

- альдегиды – 3β-гидроксиланоста-8,24-диен-21-аль (**А5**), 3β-гидрокси-25,26,27-тринорланоста-8,22*E*-диен-24-аль (**А6**);

- кетоны – 3β,22*R*-дигидроксиланоста-8,24-диен-11-он (**А7**), 3,7-дигидрокси-7(8→9)-абео-ланост-24-ен-8-он (**А8**), 3β,22-дигидроксиланоста-8,24-диен-7-он (**А9**), 21,24-циклопента-3,11,15,21,25-пентагидроксиланоста-8-ен-7-он (**А10**, **А11**), 21,24-циклопента-3,11,21,25-тетра-гидроксиланоста-8-ен-7-он (**А12**), 3β,22-дигидроксиланоста-8,25-диен-24-он (**А13**);

- лактоны – 3β-гидроксиланоста-8,24-диен-21,23-лактон (**А14**), 24-метил-3β-гидрокси-ланоста-8,24-диен-21,23-лактон (**А15**);

- пероксиды – 3β,22α-дигидроксиланоста-8,23E-диен-25-пероксид (**А16**), 3β,22α-дигидроксиланоста-8,24-диен-25-пероксид (**А17**);

- с несколькими двойными связями – 3β,11β-дигидроксиланоста-8,24-диен (**А18**), 3β,22-дигидроксиланоста-7,9(11),24-триен (**А19**), 3β,22,25-тригидроксиланоста-8-ен (**А20**), 3β,22α,25-тригидроксиланоста-8,23-диен (**А21**), 3β,22,24-тригидроксиланоста-8,25-диен (**А22**), 3β,21-дигидроксиланоста-8,24-диен (**А23**), 3β,22α,25-тригидроксиланоста-8,24-диен (**А24**), 3β,22*R*,25-тригидроксиланоста-8,23*E*-диен (**А25**), 3β,22*R*,25-тригидроксиланоста-7,9(11),23*E*-триен (**А26**);

- с пятичленным циклом – 21,24-циклопенталаноста-3β,21,25-триол-8-ен (**А27**), 25-метокси-21,22-циклоланоста-8-ен-3β,21α-диол (**А28**), (20*R*,24*S*-циклопенталаноста-8-ен-3β,21*R*,25-триол (**А29**), 20*R*,24*R*-циклопенталаноста-8-ен-3β,21*R*,25-триол (**А30**), 20*R*,24*S*-циклопенталаноста-7:9(11)-диен-3β,21*R*,25-триол (**А31**), стереоизомер 21,24-циклопента-1α,3β,21α,25,28-пентагидрокси-5α-ланоста-7,9(11)-диен (**А32, А33**);

* - адресат для переписки

- эпоксиды – 22*R*,25-эпоксиланоста-8-ен-3β,24*S*-диол (**А34**, **А35**);

- с кислородсодержащим пятичленным гетероциклом – 3β,25-дигидроксиланоста-8-ен-20*R*,24*S*-олид (**А36**, **А37**), 3β,25-дигидроксиланоста-7,9(11)-диен-20*R*,24*S*-олид (**А38**) [1-27].

В следовых количествах в природной чаге обнаружены пентациклические тритерпены лупанового ряда: бетулин (**Б**), лупеол (**В**), лупенон (**Г**), содержание которых на порядок ниже, чем тетрациклических тритерпенов – производных ланостерола [8, 38]

В природной чаге обнаружены также стероидные соединения. Содержание эргостерола (**Д**) примерно в 10 раз меньше по сравнению с тритерпеновыми соединениями. Значительно уже и спектр производных эргостерола; в следовых количествах обнаружены 3β-гидроксиэргоста-7,22-диен (**Д1**) и 3β-гидроксиэргоста-7-ен (фунгистерол **Д2**). Также в следовых количествах показано наличие типичных растительных стероидных соединений: ситостерола (**Е**), стигмастерола (**Ж**), ситостанола (**З**) и холестерола (**И**), характерного для животных и человека [8,38].

Таким образом, в природной чаге преимущественно накапливаются тритерпеновые соединения ланостанового типа, в небольших количествах встречаются и стероидные соединения, в основном **Д**. Спектр производных ланостерола достаточно широк; наиболее часто обнаруживаются соединения с несколькими двойными связями в боковой цепи, а также содержащие кетогруппу или пятичленный цикл. Эти многочисленные окисленные производные ланостерола характерны для грибов, вызывающих белую гниль, к числу которых и относится чага.

Сырьё чаги является достаточно трудновоспроизводимым источником тритерпеновых и стероидных соединений, поэтому многие исследователи проводили попытки выращивания чаги на различных средах (на солоде, твёрдой минеральной и жидкой средах, с добавками хитозана и цистеина, с берёзовыми опилками, с $AgNO_3$) для увеличения выхода этих соединений [8, 38-40].

Чага в условиях искусственной культуры, также как и природная, продуцирует больше тритерпеновых соединений, чем стероидных. При этом качественный состав тетрациклических тритерпенов практически неизменен. Если в природной чаге превалируют **А** и **А1**, то в условиях искусственной культуры содержание и состав соединений зависит от состава среды. Подобраны условия культивирования чаги, при использовании которых в ней накапливаются тритерпеновые соединения в несколько меньшем количестве, но в том же составе, что и в природной чаге [8]. В культуре чаги по сравнению с природной накапливается немного больше **Д** и расширяется спектр его производных: появляются эргостерол-пероксид (**Д3**), 3β-гидроксиэргоста-5,7-диен (**Д4**), 3β-гидроксиэргоста-5,22-диен (**Д5**), чаще и в несколько больших количествах встречаются **Б**, **Е**, **Ж**, **З**, **И** [8, 39]. Состав стероидных соединений в искусственной культуре чаги также зависит от условий культивирования, таких как температура, pH, УФ-облучение и т.д. [8, 38, 40].

В народной медицине чага и её водные экстракты с давних времен применялись для лечения рака и заболеваний желудочно-кишечного тракта [41, 42]. Наличие тритерпеновых и стероидных соединений показано в водных экстрактах чаги и в шроте, остающемся после их получения, а также незначительное количество в фильтрате, полученном после осаждения и отделения меланина [43-46].

В настоящее время препараты на основе водных экстрактов чаги применяют в тех случаях, когда нежелательны хирургическое вмешательство и химиотерапия. В отношении онкологических заболеваний наиболее часто в литературе встречаются исследования действия водных экстрактов на различных видах животных и людях.

При длительном (6-9 месяцев) применении препаратов, полученных на основе водных экстрактов из чаги, значительно улучшается самочувствие и состояние здоровья у больных раком III-IV стадии заболевания независимо от локализации опухоли. У большинства больных через 3-4 недели использования препаратов чаги уменьшаются боли, а через некоторое время и вовсе прекращаются. По мнению исследователей, чага, не обладая специфическим действием на опухоль, оказывает тонизирующее влияние на центральную нервную систему, а при длительном лечении, нормализует нарушенные обменные процессы в организме и тем самым оказывает тормозящее действие на рост опухоли [47-52].

Более поздние исследования показали, что применение водного экстракта чаги уменьшает размер опухолей саркомы МОП и S180, карциномы лёгких Льюиса и карциномы Эрлиха, меланомы B16-F10, глиобластомы U-87 MG [33, 34, 53-56], а также оказывает антиметастатическое действие *in vivo*: на клетки саркомы, аденокарциномы шейки матки HeLa, карциномы Эрлиха, и *in vitro* на клетки гепатомы, рака толстой кишки, саркомы 180 [15, 30, 41, 53].

Биологическая активность различных органических экстрактов чаги (этанольных, метанольных, петролейных, этилацетатных, хлороформных) была исследована *in vitro*.

Этанольный экстракт чаги оказывает антипролиферативное действие на клетки меланомы B16F1, на 60% ингибирует рост клеток рака лёгких NCI-H460, клеток рака желудка HT-29 [56, 57]. Хлороформный экстракт чаги снижает пролиферацию клеток лейкемии P388 в концентрации 20-40 мкг/мл, при этом его активность гораздо выше аналогичной активности водного экстракта чаги против клеток гепатомы и рака шейки матки [32]. Это косвенно указывает на то, что стероидные соединения чаги в хлороформном экстракте более активны, чем меланин в водном экстракте чаги.

Петролейный и этилацетатный экстракты, полученные при дальнейшем разделении этанольного экстракта с использованием петролейного эфира

и этилацетата, *in vitro* снижали развитие клеток карциномы простаты PC3 и карциномы молочной железы MDA-MB-231. Активные концентрации этих экстрактов составляли в отношении клеток карциномы простаты PC3 29,57±12,18 мкг/мл и 19,22±0,46 мкг/мл, соответственно, а в отношении карциномы молочной железы MDA-MB-231 57,39±14,46 мкг/мл и 46,49±13,21 мкг/мл [36]. Активность петролейного экстракта в отношении обеих линий раковых клеток и активность этилацетатного экстракта против клеток MDA-MB-231 находятся на уровне известного цитостатика – доксорубицина, а против клеток PC3 – в 3 раза ниже по сравнению с доксорубицином [36]. Наиболее высокая активность петролейного экстракта, вероятно, связана с содержанием в нём преимущественно тритерпеновых и стероидных соединений.

В работах [3, 4] впервые показана противоопухолевая активность тритерпеновых соединений чаги в опытах *in vitro* против асцитного рака Эрлиха и саркомы Крокера. Заметным действием на клетки опухоли обладало соединение **А1**, очень слабое действие (первичное изменение в клетках) показало соединение А.

В таблице приведены данные исследований индивидуальных тритерпеновых и стероидных соединений в отношении различных линий раковых клеток *in vitro*.

Наиболее активными соединениями, которые действуют на широкий спектр раковых клеток, являются **А**, **А1**, **А2**, **А5**, **А7**, **Д3** (таблица). При этом наблюдается специфичность действия отдельных соединений. В отношении карцином наиболее активны соединения **Д**, **Д3**, **А7**, **А5**; ингибирующая концентрация вещества **Д** против клеток карциномы простаты в 5 раз меньше по сравнению с остальными, что свидетельствует о его высокой активности. Соединения **А и А1** наиболее активны против аденокарцином, против аденокарциномы молочной железы MCF-7 оба этих вещества действовали в минимальных концентрациях – 1 мкг/мл. В отношении лейкемии более эффективными оказались соединения **А1**, **А7 и А5**, а против клеток лейкемии P388 – более эффективен **А1**, действовавший в концентрации 6 мкг/мл, что на порядок ниже концентрации остальных соединений. Таким образом, в отношении карцином наиболее эффективно использование стероидных соединений, нежели тритерпеновых. В отношении клеток аденокарцином и лейкемии более эффективен был тритерпен **А1**; вероятно, наличие OH-группы у атома C-22 играет важную роль в проявлении антипролиферативного эффекта [32]. Высокая активность соединения **А7**, возможно, также обусловлена наличием OH-группы у этого атома углерода. Следует отметить, что все соединения, для которых показана противоопухолевая активность, содержат ненасыщенную связь в боковой цепи, что, по-видимому, также вносит свой вклад в проявляемые свойства.

Результаты, полученные *in vitro*, подтверждены исследованиями этих соединений *in vivo*. Так, соединения **А1** и **А5** вызывали гибель клеток папилломы у мышей при поверхностном нанесении [62], а также снижали рост саркомы S-180 соответственно на 18 и 34%, соединение **А** уменьшало размер опухоли S-180 на 23% [60].

При внутрибрюшинном введении **А1** мышам CDF1 с привитой лейкемией P388 значительно увеличивалась продолжительность жизни мышей без видимых побочных эффектов (таких как потеря массы тела или диарея) – на 20,8% для мышей, получавших 10 мг/кг этого соединения [32].

Помимо противоопухолевой некоторые соединения обладают и другими видами активности. Например, **А**, **А2**, **А7**, **А15** оказали *in vitro* выраженный гепатопротекторный эффект: 74,8, 81,2, 75,0 и 71,9% соответственно по отношению к контролю – гепатопротектору бициклолу [26]. **А1** и **А5** проявляют гипогликемические свойства *in vitro* [55, 59], **А2**, **А5** и **А24** – противогрибковые свойства *in vitro*, **А1**, **А2**,**А5**, **Б**, **Б3** – противовоспалительные свойства *in vitro* [35], **А1**, **А5**, **А23** – антиоксидантные свойства [36]. **А1** и **А5** обладают антимутагенным действием, снижают уровень мутагенов MNNG, 4NQO, в *Salmonella typhimurium* TA98 и TA100 [63]. Практически все производные ланостерола могут регулировать биосинтез холестерола [63], а производные бетулина, выделенные из коры берёзы и других природных источников, проявляют *in vitro* противоопухолевые свойства в отношении клеток меланомы и карциномы лёгких, нейробластомы, медуллобластомы, глиобластомы и саркомы Эвинга, аденокарциномы простаты PC3, лейкемии K562 и аденокарциномы шейки матки HeLa [65, 66].

Наличие тритерпеновых соединений – ланостерола и инотодиола показано в меланине чаги [67]. Это обуславливает проявление им противоопухолевых свойств: умеренных на первичный опухолевый очаг и сильно выраженных – на метастазы [68].

В настоящее время противоопухолевые свойства ланостановых соединений объясняют изменением биохимических механизмов: подавление пролиферации раковых клеток, индукция остановки клеточного цикла на различных стадиях, усиление апоптоза и регулирование путей передачи сигнала, которые связаны с нарушением экспрессии ключевых ферментов (каспаз) и белков (p53, bax, Bcl-2) [27, 29, 32].

Действие тритерпеновых соединений чаги в основном связывают со снижением пролиферации раковых клеток в исследованиях *in vitro*. Водный экстракт чаги *in vitro* в большей степени индуцирует остановку клеточного цикла, усиливает апоптоз, а *in vivo* активирует клетки иммунной системы и снижает количество метастаз [15, 57].

Выраженной активностью в отношении раковых клеток обладают и полисахариды чаги, однако механизмы их действия сильно отличаются. Полисахариды оказывают влияние на иммунную систему через стимуляцию лимфоцитов и клеток-киллеров [24, 64].

Таблица. Противоопухолевая активность тритерпеновых и стероидных соединений чаги

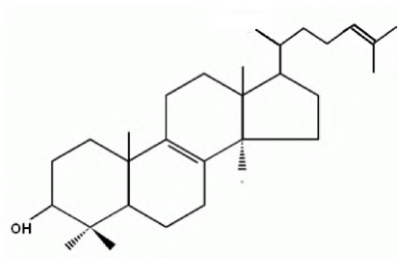
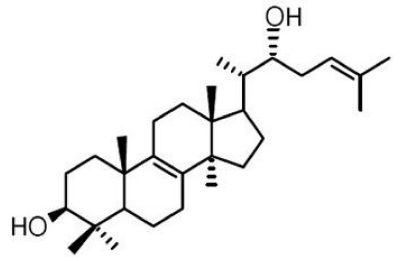
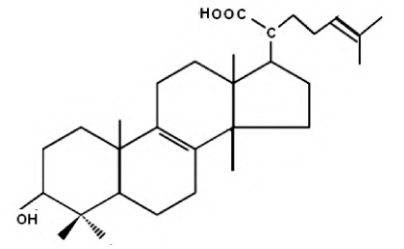
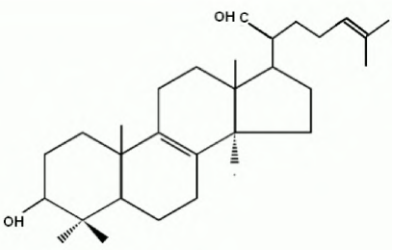
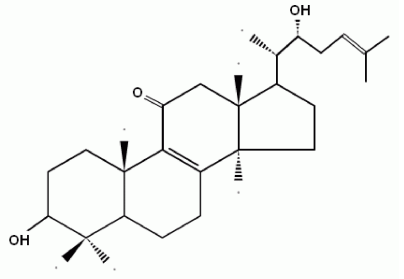
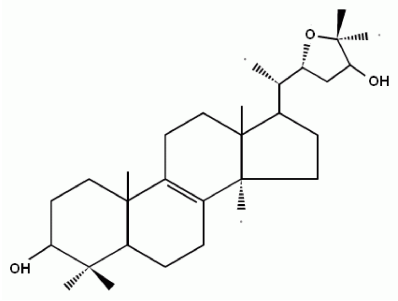
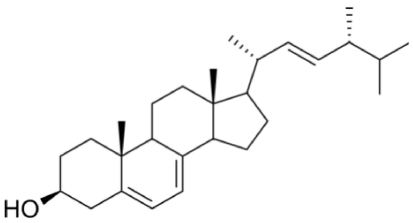
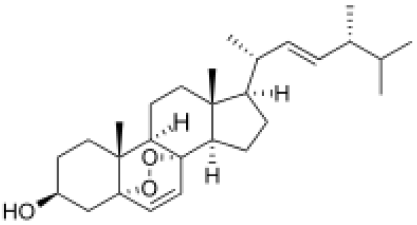
Вещество	Клеточные линии	Ингибирующая концентрация
 **A**	аденокарциномы молочной железы MCF-7	1 мкг/мл; 250 мкг/мл [7, 9, 24]
	лейкемии P388	более 100 мкг/мл [23]
	аденокарциномы шейки матки HeLa	250 мкг/мл [31]
	карциномы лёгких A-549	250 мкг/мл [23]
	аденокарциномы желудка AGS	250 мкг/мл [31]
	карциномы молочной железы MDA-MB-231	более 40 мкг/мл [35]
	карциномы простаты PC3	более 40 мкг/мл [35]
	лейкемии L1210	более 80 мкг/мл [23]
	аденокарциномы желудка COLO205	более 40 мкг/мл [23, 25]
 **A1**	аденокарциномы молочной железы MCF-7	1 мкг/мл; 250 мкг/мл [7, 9, 24]
	карциносаркомы Уолкера 256	10 мкг/мл [9]
	лейкемии P388	6 мкг/мл; более 40 мкг/мл [20, 24]
	лейкемии L1210	49 мкг/мл [23]
	аденокарциномы желудка COLO205	75 мкг/мл [23]
	карциномы молочной железы MDA-MB-231	более 40 мкг/мл [35]
	карциномы простаты PC3	более 40 мкг/мл [35]
	аденокарциномы шейки матки HeLa	250 мкг/мл [31]
	карциномы лёгких A-549	250 мкг/мл [23, 24]
	аденокарциномы желудка AGS	250 мкг/мл [31]
 **A2**	аденокарциномы молочной железы MCF-7	5 и 10 мкг/мл [7, 9]
	лейкемии P388	12 мг/мл [20]
	лейкемии L1210	16 мкг/мл [23]
	карциномы молочной железы MDA-MB-231	25 мкг/мл[35]
	карциномы простаты PC3	29 мкг/мл [35]
	аденокарциномы желудка COLO205	более 90 мкг/мл [23, 24]
	карциномы лёгких A-549	более 90 мкг/мл [23, 24]
 **A5**	аденокарциномы молочной железы MCF-7	250 мкг/мл [7, 9]
	аденокарциномы шейки матки HeLa	250 мкг/мл [31]
	лейкемии P388	9 мг/мл [20]
	карциномы молочной железы MDA-MB-231	16 мкг/мл [35]
	лейкемии L1210	28 мкг/мл [23]
	карциномы простаты PC3	33 мкг/мл [35]
	аденокарциномы желудка COLO205	более 80 мкг/мл [23]
	аденокарциномы желудка AGS	250 мкг/мл [31]
	карциномы лёгких A-549	250 мкг/мл [23]
 **A7**	рака носоглотки KB[1]	4,5 мкг/мл [25]
	лейкемии HL-60	6,2 мг/мл [25]
	лейкемии P388	6,4 мг/мл [25]
	лейкемии L1210	9 мг/мл [25]
	карциномы лёгких A-549	более 4 мкг/мл [35]
	гепатомы Bel-7402	более 4 мкг/мл [35]

Таблица. Противоопухолевая активность тритерпеновых и стероидных соединений чаги (продолжение)

 **А34**	лейкемии P388	13 мг/мл [20]
 **Д**	карциномы простаты PC3	3,8 мкг/мл [35]
	карциномы молочной железы MDA-B-231	более 40 мкг/мл [35]
 **Д3**	карциносаркомы Уолкера 256	5 мкг/мл [38]
	карциномы молочной железы MDA-MB-231	13 мкг/мл [35]
	карциномы простаты PC3	16,3 мкг/мл [35]
	аденокарциномы желудка COLO205	более 80 мкг/мл [23]
	карциномы лёгких A-549	более 80 мкг/мл [23]
	лейкемии L1210	более 80 мкг/мл [23]
	аденокарциномы молочной железы MCF-7	более 80 мкг/мл; 10 мкг/мл [23, 38]

Таким образом, из обнаруженных в настоящее время 40 тритерпеновых и стероидных соединений чаги наибольшей противоопухолевой активностью обладают 6 соединений: ланостерол, инотодиол, траметеноловая кислота, 3β-гидроксиланоста-8,24-диен-21-аль, 3β,22*R*-дигидроксиланоста-8,24-диен-11-он, 22*S*,25-эпоксиланост-8-ен-3β,24*S*-диол.

В отношении линий раковых клеток индивидуальные тритерпеновые и стероидные соединения более активны, чем экстракты. Концентрация, при которой индивидуальные соединения начинают оказывать эффект на опухолевые клетки, составляет 1 мкг/мл. При этом соединения оказывают незначительное воздействие на соматические клетки. Ингибирующий эффект на клетки почек составляет не более 20%, в то время как известные природные цитостатики оказывают на эти клетки сильное токсическое действие (например, винбластин, винкристин, этопозид) [69].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тритерпеновые и стероидные соединения чаги представлены около 50 соединениями, причём преобладают производные ланостерола с несколькими двойными связями в боковой цепи, содержащие кетонную группу и пятичленный цикл.

Исследования *in vitro и in vivo* показали, что в отличие от экстрактов чаги использование в терапии рака индивидуальных тритерпеновых и стероидных соединений более эффективно. При этом наибольшей активностью обладают тритерпеновые соединения, содержащие ОН-группу при С-22 и ненасыщенную связь в боковой цепи. В частности, инотодиол – в отношении раковых клеток карциносарком, аденокарценом и лейкемии, в отношении клеток карцином – 3β-гидроксиланоста-8,24-диен-21-аль. Среди стероидных соединений, выделенных из искусственной культуры чаги, выраженной противоопухолевой активностью обладает эргостерол в отношении карциномы простаты и умеренной активностью – эргостерол-пероксид.

Тритерпеновые и стероидные соединения чаги проявляют гепатопротекторные, гипогликемические, противогрибковые, антиоксидантные и противовоспалительные свойства и могут регулировать биосинтез холестерола.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kier L.B.* (1961) J. Pharmac. Sci., **50**, 471-474.
2. *Ludwiczak R.-S., Wrecino U.* (1962) Rocz. Chem., **36**, 497-502.
3. *Ловягина Е.В., Шиврина А.Н.* (1962) Биохимия, **27**(5), 794-800.
4. *Ловягина Е.В., Шиврина А.Н.* (1965) в кн.: Кормовые белки и физиологически активные вещества для животноводства, М.-Л., с. 59–64.
5. *Kahlos K., Hiltunen R., Schantz M.V.* (1984) Planta Medica, **50**, 197-198.
6. *Kahlos K., Hiltunen R.* (1986) Planta Medica, **52**, 495-496.
7. *Kahlos K., Kangas L., Hiltunen R.* (1986) Planta Medica, **52**, 554.
8. *Kahlos K.* (1994) Biotechnology in Agriculture and Forestry, **26**, 179-198.
9. *Shin Y., Tamai Y., Terazawa M.* (2000) Euras. J. Forest Res., **1**, 43-50.
10. *Shin Y., Tamai Y., Terazawa M.* (2000) Int. J. Med. Mushrooms, **2**, 201-207.
11. *Shin Y., Tamai Y., Terazawa M.* (2001) J. Wood Sci., **47**(4), 313-316.
12. *Shin Y., Tamai Y., Terazawa M.* (2001) Int. J. Med. Mushrooms, **3**, 250.
13. *He J., Feng X.Z., Lu Y., Zhao B.* (2000) Chinese Chemical Letters,**11**(1), 45-58.
14. *He J., Feng X.Z., Lu Y., Zhao B.* (2001) J. Asian Nat. Prod. Res., **3**, 55-61.
15. *Kim E.J., Lee Y.J., Shin H.K., Park J.H.* (2006) J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., **35**(5), 516-523.
16. *Nakata T., Taji S., Yamada T.* (2007) Bioorg. Med. Chem., **15**(1), 257-264.
17. *Tajia S., Yamada T., In Y., Wada S., Usami Y., Sakuma K., Tanaka R.* (2007) Helvetica Chimica Acta, **90**, 2047-2057.
18. *Tajia S., Yamada T., Tanaka R.*. (2008) Helvetica Chimica Acta, **91**, 1513-1524.
19. *Taji S., Yamada T., Wada S., Tokuda H., Sakuma K.* (2008) Eur. J. Med. Chem., **43**, 2373-2379.
20. *Nakata T., Taji S., Yamada T.* (2009) Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences, **3**, 53-64.
21. *Zhong X., Ren K., Lu S., Yang S., Sun D.* (2009) Chin. J. Integr. Med., **15**, 156-160.
22. *Handa N., Yamada T., Tanaka R.* (2010) Phytochemistry, **71**, 1774-1779.
23. *Kim Y.J., Park J., Min B.S., Shin S.H.* (2011) J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., **54**(2), P.287-294.
24. *Zheng W., Miao K., Liu Y., Zhao Y., Zhang M., Pan S., Dai S.* (2010) Appl. Microbiol. Biotechnol., **87**, 1237-1254.
25. *Handa N., Yamada T., Tanaka R.* (2012) Phytochem. Lett., **5**, 480-485.
26. *Liu C., Zhao C., Pan H.-H., Kang J., Yu X.* (2014) J. Nat. Prod., **77**, 35-41.
27. *Song F.Q., Liu Y., Kong X.S., Chang W., Song G.* (2013) Asian Pac. J. Cancer Prev., **14**, 1571-1578.
28. *Zhao F., Mai Q., Ma J., Xu M., Wang X., Cui T., Qui F., Han G* (2015) Fitoterapia, **101**, 34-40.
29. *Ríos J.L., Andujar I., Recio M.K., Giner R.M.* (2012) J. Nat. Prod., **75**, 2016-2044.
30. *Chen C., Zheng W., Gao X., Xiang X.* (2007) Am. J. Pharmacol. Toxicol., **2**, 10-17.
31. *Illana-Esteban C.* (2011) Bol. Soc. Micol, **35**, 175-185.
32. *Nomura M., Takahashi T., Uesugi A., Tanaka R., Kobayashi S.* (2008) Anticancer Res., **28**, 2691-2696.
33. *Youn M., Kim J., Park S., Kim Y., Park C.* (2009) J. Ethnopharmacol., **121**, 221-228.
34. *Mazurkiewicz W., Rydel K., Pogocki D., Lemieszek M.K., Langner E., Rzeski W.* (2010) Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, **67**(4), 397-406.
35. *Mazurkiewicz W.* (2006) Acta Poloniae Pharmaceutica, **63**, 497-501.
36. *Ma L., Chen H., Dong P., Lu X.* (2013) Food Chemistry, **139**, 503-508.
37. *Zheng W., Zhang M., Zhao Y., Miao K., Pan S., Caoa F., Daic Y.* (2011) Phytochem. Anal., **22**, 95-102.
38. *Gao Y., Xu H., Lu Z., Xu Z.* (2009) Chin. J. Chromatogr., **29**, 745-749.
39. *Shin Y., Tamai Y., Terazawa M.* (2001) Euras. J. Forest Res., **2**, 27-30.
40. *Низковская О.П., Милова Н.М., Шиврина А.Н., Ловягина Е.В., Платонова Е.Г.* (1959) Труды института микробиологии АН СССР, **6**, 277-285.
41. *Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В., Горяйнова Л.К.* (2008) Чага, чаговит, чагалюкс в лечебной и профилактической практике, Холдинг ЭДАС, М., 64 с.
42. *Сысоева М.А.* (2013) Высокодисперсные коллоидные системы и меланины чаги, Казань, 226 с.
43. *Сысоева М.А., Хабибрахманова В.Р., Гамаюрова В.С., Тазеева А.Х.* (2008) Химия растительного сырья, **3**, 119-122.
44. *Сысоева М.А., Никитина С.А., Хабибрахманова В.Р.* (2012) Вестник Казанского технологического университета, **15**(18), 217-219.
45. *Юмаева Л.Р.* (2009) Состав и свойства экстрактов из шрота чаги. Автореф. дис. канд. хим. наук, КГТУ, Казань.
46. *Сысоева М.А., Хабибрахманова В.Р., Гамаюрова В.С.* (2009) Химия растительного сырья, **3**, 151-156.
47. *Березина М.П.* (1959) в кн.: Чага и её лечебное применение при раке IV стадии., Медгиз, Л., с. 143-159.
48. *Булатов П.К.* (1959) в кн.: Чага и её лечебное применение при раке IV стадии, Медгиз, Л.,. с. 261-270.
49. *Мартынова Е.Я.* (1959) в кн.: Чага и её лечебное применение при раке IV стадии, Медгиз, Л., с. 271-278.
50. *Булатов П.К., Мартынова Е.Я.* (1961) в кн.: Комплексное изучение физиологически активных веществ низших растений, Наука, М.-Л., с. 247-253.
51. *Пясковский* С., *Рихтер С.* (1961) в кн.: Комплексное изучение физиологически активных веществ низших растений, Наука, М.-Л., с. 258-263.
52. *Мартынова Е.Я.* (1959) в кн.: Чага и её лечебное применение при раке IV стадии, Медгиз, Л., с. 279-293.
53. *Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В.* (2005) Российский биотерапевтический журнал, **4**(4), 59-72.
54. *Shin S.H., Kim Y.J., Park J.* (2013) J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., **42**, 1022-1028.
55. *Youn M.J., Kim J.K., Park S.Y., Kim Y.* (2008) World J. Gastroenterol., **14**(4), 511-517.
56. *Lu X., Chen H., Dong P., Fu L.,Zhang X.* (2010) J. Sci. Food Agric., **90**, 276-280.
57. *Park E., Jeon K., Byun B.H.* (2005) Cancer Prevention Research, **10**, 54-59.
58. *Lee H.S., Kim E.J., Kim S.H.* (2015) Nutr. Res. Pract., **9**(2), 111-116.
59. *Song K.C., Choi B.L., Shin J.W.* (2007) Korean J. Orient. Med., **28**(4), 27-41.
60. *Zhang Y., Zhao Y., Cui H., Cao C., Guo J., Liu S.* (2011) Biol. Trace Elem. Res., **144**, 1351-1357.
61. *Chung M.J., Chung C.K., Jeong Y., Ham S.S.* (2010) Nutr. Res. Pract., **4**, 177-182.
62. *Koyama T., Gu Y., Taka A.* (2008) Asian Biomedicine, **2**, 459-469.

63. *Sun Y., Yin T., Chen X.H., Zhang G.* (2011) Int. J. Med. Mushrooms, **13**, 121-130.
64. *Ham S.S., Kim S.H., Moon S.Y., Chung M.J.* (2009) Mutation Research, **672**, 55-59.
65. *Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э.* (2005) Химия в интересах устойчивого развития, **13**, 1-30.
66. *Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Толстиков Г.А., Толстиков А.Г., Флехтер О.Б.* (2006) Биоорган. химия, **32**, 42-55.
67. *Бурмасова М.А.* (2013) Фенольные и сопутствующие им соединения водного извлечения гриба чаги. Автореф. дис. канд. хим. наук, КНИТУ, Казань.
68. *Рыжова Г.Л., Кравцова С.С., Матасова С.А., Грибель Н.В., Пашинский В.Г., Дычко К.А.* (1997) Хим.-фарм. журн., №10, 44-47.
69. *Машковский М.Д.* (2012) Лекарственные средства, Новая волна, М., 1216 с.

Поступила: 07. 10. 2014.
Принята к печати: 15. 03. 2015.

COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF TRITERPENES AND STEROIDS FROM INONOTUS OBLIQUUS (CHAGA)

S.A. Nikitina, V.R. Khabibrakhmanova, M.A. Sysoeva

Kazan National Research Technological University,
68 K. Marx str., Kazan, 420015 Russia; tel.: (843) 231-41-73; e-mail: semicvetik-86@bk.ru

Data on the chemical composition of triterpenic and steroid compounds, isolated from the chaga mushroom grown in natural environment or in a synthetic culture have been summarized. Special attention has been paid to the biological activity of chaga mushroom extracts and these particular compounds against various cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. This analysis has demonstrated some common features in inhibition of growth of various cell lines by chaga mushroom components. In this context, the most active are triterpene compounds containing OH group at C-22 and a side chain unsaturated bond.

Key words: chaga mushroom, triterpenes, steroids, biological activity, *in vivo*, *in vitro*

Системный анализ направлений разработок в области промышленного использования недревесных ресурсов леса: березовый гриб чага

И.Р. Шегельман, П.В. Будник, А.С. Васильев

Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск

Аннотация: В ходе системного анализа научно-технической информации, в том числе патентов, установлено, что в настоящее время в лесной отрасли активно ведется патентование технических и технологических решений для базовых операций, но при этом недостаточно внимания уделяется формированию баз знаний в области технологий и оборудования для недревесных ресурсов леса. Формирование баз данных в этой области вызвано выявленной тенденций к разработке продукции из различных видов природного сырья для фармацевтической, пищевой, косметической промышленности и других сфер социальной сферы и экономики. В числе видов природного сырья важное место занимает сырье с широким спектром биологического действия, в том числе березовый гриб чага. Развитие базы знаний в области вовлечения чаги в различные сферы социальной сферы и экономики выполнено на базе системного анализа и патентного поиска.
Ключевые слова: база знаний, березовый гриб, интеллектуальная собственность, лесной комплекс, недревесные ресурсы леса, патент, результаты интеллектуальной деятельности, чага.

В последние годы ведется активное патентование результатов интеллектуальной деятельности, включающих технологические и технические решения в отношении базовых операций лесного комплекса. Разработка новых объектов интеллектуальной собственности необходимая в этой сфере ведется на основании баз знаний о состоянии и тенденциях развития совершенствующих (создаваемых) объектов интеллектуальной собственности. Авторы, формирующие базы знаний в различных сферах [1 - 2], полагают, что при формировании баз знаний для различных производств лесного комплекса недостаточно внимания уделяется формированию баз знаний в области технологий и оборудования для недревесных ресурсов леса.

Необходимость формирования баз данных в области вовлечения в промышленную сферу недревесных ресурсов леса вызвана выявленной тенденций к разработке для фармацевтической, пищевой, косметической промышленности и других сфер социальной сферы и экономики продукции из различных видов природного сырья. В числе природного сырья с широким

© Электронный научный журнал «Инженерный вестник Дона», 2007–2019

спектром биологического действия важное место занимает березовый гриб чага (Inonotus obliquus) [3-5]. Прикладные разработки по использованию чаги показаны в работе Л. Ю. Кузнецовой [6]. Ценность березового гриба чага отражена в работах [7 – 8]. Он обладает противовоспалительными, противоопухолевыми, иммуностимулирующими, гипогликемическими, гепатопротективными, противовирусными, радиопротективными свойствами [9 - 11].

Специалисты отмечают как обширность ареала распространения этого гриба, так и то, что возобновление этого вида сырья в природных условиях длительный процесс (5-7 лет), а также то, что привлечение биотехнологических приемов способно изменять состав экстрактов чаги по сравнению с природным сырьем.

В связи с этим серьезное внимание использованию и трансформации чаги уделяют как отечественные [12 – 14], так и зарубежные [15 – 16] и др. ученые.

Для формирования базы знаний авторами выполнен системный анализ отобранных в ходе патентно-информационного поиска документов в области заготовки и промышленного использования березового гриба чага.

В ходе анализа определены основные направления патентования отечественных разработок в области заготовки и использования чаги в 2014-2019 годах:

Методы исследование сырья чаги или препарата чаги в фармацевтической промышленности (патент РФ № 2566067 «Способ количественного определения тетрациклических тритерпенов в сырье чаги или препарате чаги».

Методы получения мелатонинов из чаги для химико-фармацевтической и медицинской промышленности: (патент РФ № 2523414 «Способ получения

© Электронный научный журнал «Инженерный вестник Дона», 2007–2019

меланина из чаги»; патент РФ № 2582972 «Способ получения меланина из чаги», патент РФ № 2618398 «Способ получения меланинов из чаги».

Методы получения мелатонина и сухого экстракта биологически активных веществ чаги для химико-фармацевтической промышленности (патент РФ № 2597160 «Способ получения меланина и сухого экстракта биологически активных веществ чаги».

Методы получения фенольных веществ из чаги для фармацевтической промышленности (патент РФ № 2530637 «Способ получения фракции фенольных веществ из чаги»).

Методы получения биологически активных липофильных веществ из чаги для фармацевтической промышленности (патенты РФ № 2530636 «Способ получения фракции липофильных веществ из чаги»; патент РФ № 2522952 «Способ получения фракции липофильных веществ из чаги»).

Методы получения осажденного препарата (диффузионного сока) из чаги (шрота чаги) для фармацевтической, пищевой и косметической промышленности (патент РФ № 2509567 «Способ получения экстракта из шрота чаги»; патент РФ № 2392952 «Способ получения осажденного полифенольного комплекса из чаги»; патент РФ № 2465911 «Способ получения осажденного полифенольного комплекса чаги»; патент РФ № 2425686 «Способ получения осажденного препарата из березового гриба чага»; патент РФ № 2392953 «Способ получения осажденного препарата чаги».

Методы получения экстрактов гриба чаги для фармацевтической, пищевой и косметической промышленности (патент РФ № 2438658 «Способ получения экстракта из березового гриба чага»; патент РФ № 2464032 «Способ получения экстрактов гриба чаги»; патент РФ № 2406514 «Способ получения водных экстрактов чаги»; патент РФ № 2463064 «Способ получения экстракта чаги»; патент РФ № 2448721 «Способ получения

© Электронный научный журнал «Инженерный вестник Дона», 2007–2019

экстракта чаги»; патент РФ № 2563616 «Способ увеличения степени извлечения экдистероидов и флавоноидов из растительных объектов».

Методы получения хромогенного комплекса чаги для фармацевтической, пищевой и косметической промышленности (патент РФ № 2442596 «Способ получения хромогенного комплекса чаги»; патент РФ № 2502516 «Способ получения хромогенного комплекса чаги»; патент РФ № 2450817 «Способ получения хромогенного комплекса чаги»).

Методы и рецептуры получения новых препаратов для фармацевтической промышленности, медицины и патофизиологии (патент РФ № 2480227 «Противовирусное средство на основе меланина»; патент РФ № 2548767 «Способ получения препарата Бефунгин из березового гриба чага»); патент РФ № 2445108 «Препарат, обладающий бактерицидной и антиметастатической активностью»); патент РФ № 2637128 «Березовый экстракт с отварами лекарственных растений»; патент РФ № 2639916 «Способ получения березового экстракта и дегтярной воды с использованием березового экстракта»; патент РФ № 2391994 «Средство для лечения дисменореи», патент РФ № 2391995 «Средство для лечения злокачественных и доброкачественных новообразований различной локализации»; патент РФ № 2408383 «Композиция с противоопухолевой и адаптогенной активностью (варианты) и лекарственный препарат на ее основе (варианты)»; патент РФ № 2429001 «Средство "Таблетки для ума"»).

Методы и рецептуры для оздоровления организма, восстановления и повышения работоспособности спортсменов (патент РФ № 2422561 «Способ восстановления и повышения физической работоспособности спортсменов»; патент РФ № 2391995 «Способ оздоровления организма»).

Методы и рецептуры для производства кормовых добавок для животных, птиц и рыб, для ветеринарии (патент РФ № 2473328 «Препарат

© Электронный научный журнал «Инженерный вестник Дона», 2007–2019

для лечения гнойных ран у животных»; патент РФ № 2529706 «Биологически активная кормовая добавка для животных, птиц и рыб»).

Методы и рецептуры получения новых препаратов для косметических производств (патент РФ № 2568890 «Гель для ухода за кожей лица (варианты)»; патент РФ № 2625738 «Способ получения интимного пантового крема для женщин».

Методы получения сухого экстракта (активированного порошка) чаги для фармацевтической промышленности (патент РФ № 2569751 «Способ получения активированного порошка чаги»; патент РФ № 2406515 «Способ получения сухого экстракта чаги».

Методы использования чаги для получения напитков: оздоровительных, безалкогольных, заменителей кофе, водно-спиртовых (патент РФ № 2608652 «Заменитель кофе и способ его производства»); патент РФ № 2609662 «Бальзам»; патент РФ № 2673042 «Сухой оздоровительный напиток»); патент РФ № 2673741 «Безалкогольный напиток "Кусун"»); патент РФ № 2664459 «Фиточай из 77 трав»).

Методы использования чаги для получения пищевых продуктов (патент РФ № 2670515 «Состав теста для производства хлеба пшеничного с грибами»); патент РФ № 2663140 «Способ получения функционального кисломолочного продукта»); патент РФ № 2608652 «Заменитель кофе и способ его производства»): патент РФ № 2533040 «Состав для приготовления фитоджема (варианты)»); патент РФ № 2621256 «Биологически активная добавка к пище, обладающая антипаразитарной активностью»).

Анализ позволил сформулировать следующие выводы.

Необходимость формирования баз данных в области объектов технологий и техники для вовлечения в промышленную сферу недревесных ресурсов леса вызвана выявленной тенденций к разработке для фармацевтической, пищевой, косметической промышленности и других сфер

© Электронный научный журнал «Инженерный вестник Дона», 2007–2019

социальной сферы и экономики продукции из различных видов природного сырья с широким спектром биологического действия. Среди них значимое место занимает березовый гриб чага.

Анализ показал, что патентование в этой области активную ведут университеты, научные организации. В числе университетов: Алтайский технический университет им. И.И. Ползунова (патент РФ № 2670515); Волгоградский технический университет (патенты РФ № №2406515, 597160, 2618397, 2618398); Казанский национальный исследовательский технологический университет (патенты РФ №№ 2392952, 2392953, 2406514, 2425686, 2438658, 2442596, 2448721, 2463064, 2464032, 2465911, 2450817, 2502516, 2509567, 2522952, 2523414, 2530637, 2566067, 2582972; 2568890, 2663140); Кубанский технологический университет (патент РФ № 2608652); Томский университет (патент РФ №№ 2563616, 2608652); Ульяновская сельскохозяйственная академия (патент РФ № 2473328); Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Безусловным лидером патентования в изучаемой области является Казанский национальный исследовательский технологический университет (20 патентов).

В числе предприятий реального сектора экономики, патентующих свои разработки в названной сфере, отмечены ООО «Алтайский бальзам» (патент РФ № 2609662); ООО «Алтайский букет» (патент РФ № 2533040); ООО «Карым» (патент РФ № 2625738); ООО «Татхимфарпрепараты» (патент РФ № 2548767).

Отмечен рост количества патентов в анализируемой области, полученных в последние годы на частных лиц. В их числе Е. И. Верещагин (патент РФ № 2621256; Ю. А. Захаров (патент РФ № 2408383); И. А. Ивлиев, А. П. Полетаев, А. П. Грибанов, А. В. Быков и Е. Г. Овчинникова (патент РФ № 2445108); Корсун В. Ф., Корсун Е. В., Самсонов Д. Н. и Авхукова М. А.

© Электронный научный журнал «Инженерный вестник Дона», 2007–2019

(патент РФ № 2429001); Е. С. Кох, А. С. Гаврилов и Л. П. Ларионов (патент РФ № 2569751); А. П. Полетаев (патент РФ № 2637128 и 2639916); Потапов Н. А. (патент РФ № 2664459); Е. К. Сиротин (патент РФ № 2673741); В. С. Столяров (патент РФ № 2422561 и 2441638); О. А. Субботина и М. А. Субботина (патенты РФ № 2391994 и 2391995); Т. В. Теплякова (патент РФ № 2673042).

Анализ показал, что патентование в анализируемой области направлено на расширение использования чаги и/или препарата чаги в фармацевтической, пищевой, химико-фармацевтической и медицинской промышленности, а также в восстановлении организма, повышения его работоспособности и в косметологи.

Полученные данные пополняют базу знаний о перспективных технологических и технических решениях для заготовки и промышленного использования чаги и могут быть использованы при синтезе новых патентоспособных решений в этой области.

Работа выполнена в рамках реализации гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых по проекту «Разработка среды конструкторского проектирования оптимальных параметров технологического оборудования лесных многооперационных машин» (МК-5321.2018.8).

Литература

1. Шегельман И.Р., Васильев А.С. Системный анализ объектов технологий и техники для лесосечных работ с целью синтеза новых патентоспособных решений // Инженерный вестник Дона. 2019. №1. URL: ivdon.ru/ru/magazine/archive/n1y2019/5680.

2. Шегельман И.Р., Васильев А.С. Формирование базы знаний путем системного анализа технологий и техники для обращения с отработавшим

© Электронный научный журнал «Инженерный вестник Дона», 2007–2019

ядерным топливом для синтеза новых патентоспособных решений // Инженерный вестник Дона. 2019. №2. URL: ivdon.ru/ru/magazine/archive/n2y2019/5762.

3. Букреев Ю.М., Должикова Ю.И., Власенкова Н.К., Сергеев А.В., Соколов Н.Ю., Шубина И.Ж. Антиканцерогенная и антитоксическая активность препаратов на основе чаги и каротиноидов // Российский биотерапевтический журнал. 2018. Т. 17. С. 12-13.

4. Полковникова М.В., Носик Н.Н., Гараев Т.М., Кондрашина Н.Г., Финогенова М.П., Шибнев В.А. Изучение противогерпетических свойств экстрактов из березового гриба Inonotus obliquus // Вопросы вирусологии. 2014. Т. 59. № 2. С. 45-48.

5. Якимов П.А. Методы переработки чаги в лекарственные формы // Комплексное изучение физиологически активных веществ низших растений. 1961. С. 129–138.

6. Кузнецова О.Ю. Обзор современных препаратов с биологически активными композициями березового гриба чага // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. № 1 (14). С. 128-141.

7. Sysoeva M.A., Yumaeva L.R., Kuznetsova O.Yu., Ziyatdinova G.K., Budnikov G.K., Mel'nikova N.B. Study of the composition of biologically active compounds in chaga meal. perspectives of application of chaga meal in pharmaceutical industry // Russian Journal of General Chemistry. 2012. V. 82. № 3. pp. 586-594.

8. Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Чага в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. 2005. Т. 4. № 4. С. 59-72.

9. Kyyamova G.I., Khabibrakhmanova V.R., Sysoeva M.A Hydrophobic constituents extracted from chaga by ethylacetate // Pharmaceutical Chemistry Journal. 2018. V. 51. № 12. pp. 1085-1087.

© Электронный научный журнал «Инженерный вестник Дона», 2007–2019

10. Грачева Н.В., Желтобрюхов В.Ф., Голованчиков А.Б. Химическая модификация природных полимеров меланинов гриба Inonotus obliquus (чага) // Известия Волгоградского государственного технического университета. 2014. № 7 (134). С. 93-97.

11. Вялых Е.В., Челнакова Н.Г., Позняковский В.М. Характеристика гриба чага и его использование в производстве экстрактов для лечебного и профилактического питания // АПК России. 2017. Т. 24. № 3. С. 699-705.

12. Кох Е.С., Гаврилов А.С., Тумашов А.А., Ларионов Л.П. Разработка способа получения активированного порошка чаги и анализ его сорбционной активности // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2015. № 4 (201). С. 160-166.

13. Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Химические и медико-биологические свойства чаги (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2006. Т. 40. № 10. С. 37-44.

14. Никитина С.А., Хабибрахманова В.Р., Сысоева М.А., Носова Ф.Ф. Исследование меланина чаги и состав фракции углеводородов // Химико-фармацевтический журнал. 2015. Т. 49. № 8. С. 29-31.

15. Mazurkiewicz W., Rydel K., Pogocki D., Lemieszek M.K., Langner E., Rzeski W. Separation of an aqueous extract Inonotus obliquus (chaga) // Acta poloniae pharmaceutica. 2010. Vol. 67. N 4. Pp. 397–406.

16. Lee S.H., Hwang H.S., Yun J.W. Antitumor activity of water extract of a mushroom, Inonotus obliquus, against HT-29 human colon cancer cells // Phytother research. 2009. Vol. 23. Pp. 1784–1789.

References

1. Shegelman I. R., Vasilyev A. S. Inženernyj vestnik Dona (Rus). 2019. №1. URL: ivdon.ru/ru/magazine/archive/n1y2019/5680.

© Электронный научный журнал «Инженерный вестник Дона», 2007–2019

2. Shegel'man I.R., Vasil'ev A.S. Inženernyj vestnik Dona (Rus). 2019. №2. URL: ivdon.ru/ru/magazine/archive/n2y2019/5762.

3. Bukreev Yu.M., Dolzhikova Yu.I., Vlasenkova N.K., Sergeev A.V., Sokolov N.Yu, Shubina I.Zh. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 2018. Vol. 17. Pp. 12-13.

4. Polkovnikova M.V., Nosik N.N., Garaev T.M., Kondrashina N.G., Finogenova M.P., Shibnev V.A. Voprosy virusologii. 2014. Vol. 59. № 2. Pp. 45-48.

5. Yakimov P.A. Kompleksnoe izuchenie fiziologicheski aktivnykh veshchestv nizshikh rasteniy. 1961. Pp. 129–138.

6. Kuznetsova O.Yu. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2016. № 1 (14). Pp. 128-141.

7. Sysoeva M.A., Yumaeva L.R., Kuznetsova O.Yu., Ziyatdinova G.K., Budnikov G.K., Mel'nikova N.B. Russian Journal of General Chemistry. 2012. Vol. 82. № 3. Pp. 586-594.

8. Shashkina M.Ya., Shashkin P.H., Sergeev A.V. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 2005. Vol. 4. № 4. Pp. 59-72.

9. Kyyamova G.I., Khabibrakhmanova V.R., Sysoeva M.A. Pharmaceutical Chemistry Journal. 2018. Vol. 51. № 12. Pp. 1085-1087.

10. Gracheva N.V., Zheltobryukhov V.F., Golovanchikov A.B. Izvestiya Volgogradskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta. 2014. № 7 (134). Pp. 93-97.

11. Vyalykh E.V., Chelnakova N.G., Poznyakovskiy V.M. APK Rossii. 2017. Vol. 24. № 3. Pp. 699-705.

12. Kokh E.S., Gavrilov A.S., Tumashov A.A., Larionov L.P. Nauchnye vedomosti Belgorodskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Meditsina. Farmatsiya. 2015. № 4 (201). Pp. 160-166.

© Электронный научный журнал «Инженерный вестник Дона», 2007–2019

13. Shashkina M.Ya., Shashkin P.N., Sergeev A.V. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal. 2006. Vol. 40. № 10. Pp. 37-44.

14. Nikitina S.A., Khabibrakhmanova V.R., Sysoeva M.A., Nosova F.F. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal. 2015. Vol. 49. № 8. Pp. 29-31.

15. Mazurkiewicz W., Rydel K., Pogocki D., Lemieszek M.K., Langner E., Rzeski W. Acta roloniae rharmaceutica. 2010. Vol. 67. N 4. Pp. 397–406.

16. Lee S.H., Hwang H.S., Yun J.W. Phytother research. 2009. Vol. 23. Pp. 1784–1789.

© Электронный научный журнал «Инженерный вестник Дона», 2007–2019

УДК 615.322:582.287.237

Л. Р. Юмаева, М. А. Сысоева, В. С. Гамаюрова

ИССЛЕДОВАНИЕ ШРОТА ОСТАВЩЕГОСЯ ПОСЛЕ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДНОГО ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЧАГИ. I. ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ СПИРТОВЫХ ЭКСТРАКТОВ

Ключевые слова: чага, водная вытяжка, спиртовый экстракт, математическое моделирование, полнофакторный эксперимент. chaga, water extraction, alcohol extract, mathematical modeling, full factor experiment.

Проведен поиск оптимальных условий экстракции шрота чаги для более полного извлечения из него биологически активных соединений. Для этого использовали трехфакторный симметричный дробный план на основе латинского параллелепипеда первого порядка Показано, что оптимальным является спиртовый экстракт из шрота чаги полученный с помощью 50% спирта при температуре 85°С, в течении 2 часов. It was organized the searching of the optimum conditions of the extraction chaga residue for more full extraction from it biologically active compounds. Three-factor symmetrical fractional plan was used for this purpose. On the base of the latin first-order parallelepiped it was shown that optimum for alcohol extraction from chaga residue was received by means of 50% alcohol at the temperature 85c, in current 2 hours.

Водные извлечения березового гриба чаги - Inonotus obliguus с древних времен широко используются в народной медицине. На их основе фармацевтическая промышленность выпускает ряд препаратов: Бефунгин, Бинг-Чага, Чаговит-Л, спиртовые настойки чаги, которые используются для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, рака, кожных заболеваний [1].

После экстракции чаги водой остается отход производства - шрот. Как углеводы, так и фенольные вещества могут оставаться в шроте чаги после получения водного извлечения [2, 3]. По этой причине наиболее полное извлечения биологически активных соединений из сырья чаги является перспективной задачей.

Из природного сырья спиртом различной концентрации извлекается сумма действующих веществ, причем 70% этиловый спирт лучше экстрагирует фенольные вещества, а 40% этиловый спирт - углеводы и гликозидные соединения [4, 5].

Углеводы в водных извлечениях чаги представлены в основном полисахаридами, причем теми которые синтезирует сам гриб чага. Было показано, что они проявляют противораковую и гипоглекимическую активность [6, 7].

Фенольные соединения широко представлены в чаге, особенно флавоноиды: госсипетин, робинетин, мирицитин, робинин, нарингенин, кверцитрин. Они обладают кардиотоническими, гипоадемическими, противовоспалительными, ранозаживляющими, противоязвеными свойствами, так же способны воздействовать на состав крови [8].

Целью данной работы является поиск оптимальных условий для более полного извлечения биологически активных соединений из сырья чаги с применением математического моделирования. Для этого проведено планироване эксперимента с использованием метода латинских параллелепипедов первого порядка. В качестве факторов для оптимизации выбраны суммарное количество фенольных соединений и углеводов, количество сухого остатка и зольных элементов извлекаемых из шрота.

Результаты и обсуждение

С целью выбора научно-обоснованной концентрации экстрагента (этилового спирта), и оптимизации процесса экстрагирования (время и температура), уменьшения ко-

личества экспериментов и ошибок был использован метод математического планирования эксперимента — латинские параллелепипеды. Метод латинских параллелепипедов очень перспективно использовать в фармацевтических исследованиях, так как он позволяет изменять факторы на разном числе уровней. Для сокращения количества опытов использован трехфакторный симметричный дробный план на основе латинского параллелепипеда первого порядка [14]. При этом были выбраны следующие факторы, влияющие на процесс экстракции: *A* - концентрация экстрагента, %; *B* -время экстракции (1-1 ч,2-2 ч,3-3 ч); C – температура (1-30°С, 2-60°С, 3- 85°С). Критериями оптимизации были выбраны содержание: y_1 - сухих веществ, г; y_2 - фенольных веществ, мг/мл; y_3 - суммы углеводов, мг/мл.

Экспериментально проанализированы три спиртовых экстракта по вышепредложенным параметрам. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Содержание экстрактивных активных веществ в спиртовых экстрактах шрота чаги

Концентрация спиртового экстракта	Содержание сухих веществ, г*	Содержание зольных веществ, г*	Суммарное содержание углеводов, мг/мл	Суммарное содержание фенольных веществ, мг/мл
30%	0,03110	0,00210	0,12492	0,350
50%	0,03646	0,00140	0,10800	0,600
70%	0,03232	0,00150	0,12240	0,223

Примечание *по отношению к сухому весу гриба

Для более полного анализа возможных результатов, в пакете планирование эксперимента программы Statistica 6.0 были смоделированы значения экстрактов с содержанием спирта от 10% до 90% включительно (табл. 2).

Таблица 2 - Трехфакторный симметричный дробный план на основании латинского параллелепипеда первого порядка

Концентрация спирта	A	B	C	Номер испытания			
				$У_1$	$У_2$	$У_3$	L
10%	1	1	1	0,03207	0,1266	0,5133	1
20%	1	2	2	0,03267	0,1249	0,4833	2
30%	1	3	3	0,03110	0,1249	0,3500	2
40%	2	1	2	0,03296	0,1214	0,4233	3
50%	2	2	3	0,03646	0,1280	0,6000	4
60%	2	3	1	0,03356	0,1179	0,3633	3
70%	3	1	3	0,03232	0,1224	0,2230	2
80%	3	2	1	0,03417	0,1144	0,3033	2
90%	3	3	2	0,03447	0,11266	0,2733	2

Для оптимизации процесса получения спиртового экстракта шрота чаги были составлены матрица планирования эксперимента и таблица предпочтения (табл. 2) для выявления лидера (L). Согласно этой характеристике (L) наилучшие результаты показал образец с пользованием 50% спирта. С помощью математического моделирования нами было выявлено, что 40 и 60% экстракты, хотя и близки по содержанию сухих веществ ($У_1$), не являются оптимальными по содержанию фенольных соединений и углеводов ($У_2$ и $У_3$).

На рисунках 1 и 2 полученные данные представлены в графическом виде, где наиболее наглядно демонстрируется изменение параметров от концентрации спирта в экстрагенте и показывают преимущества применения 50% спиртового раствора. Результаты расчетов удовлетворительно согласуются с данными экспериментальных исследований, приведенных в табл. 1.

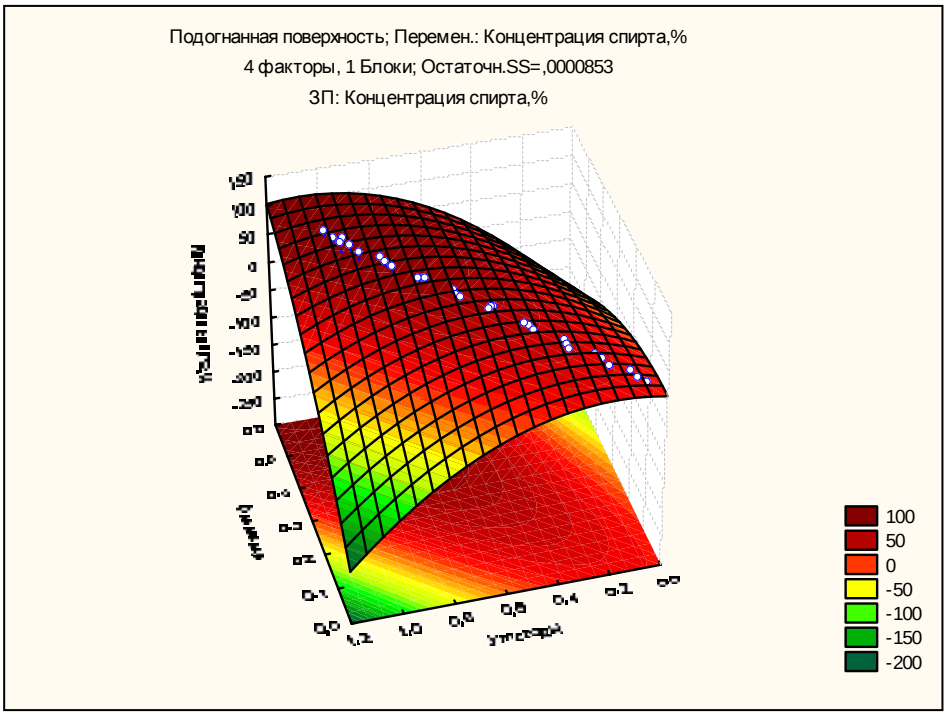


Рис. 1 - Зависимость выхода фенольных веществ и углеводов в спиртовых экстрактах от концентрации спирта

Проанализировано влияние температуры и времени экстракции на выбранные параметры.

Как показано на рисунках 3 и 4 температура и время проведения процесса не существенно влияют на содержание в экстрактах сухого остатка и зольности.

Полученные данные подвергались дисперсионному анализу, результаты которого приведены в таблице 3. Однородность дисперсии проверяли с помощью критерия Фишера [15]. При сравнении полученных дисперсионных отношений, приведенных в таблице 3 с табличными значениями критерия Фишера выявлено, что $F_{экс} > F_{табл}$ На полноту процесса извлечения биологически активных веществ из шрота чаги, не существенного влияют время и температура поведения экстракции.

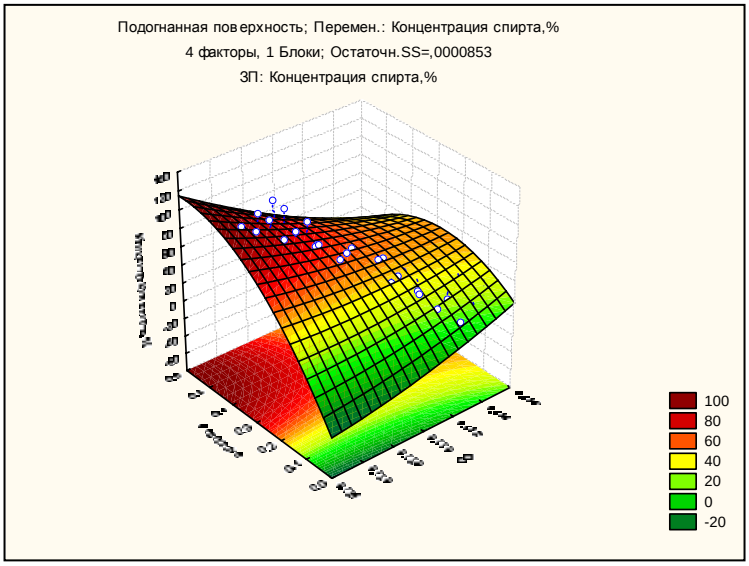


Рис. 2 - Зависимость выхода экстрактивных веществ в спиртовых экстрактах от концентрации спирта

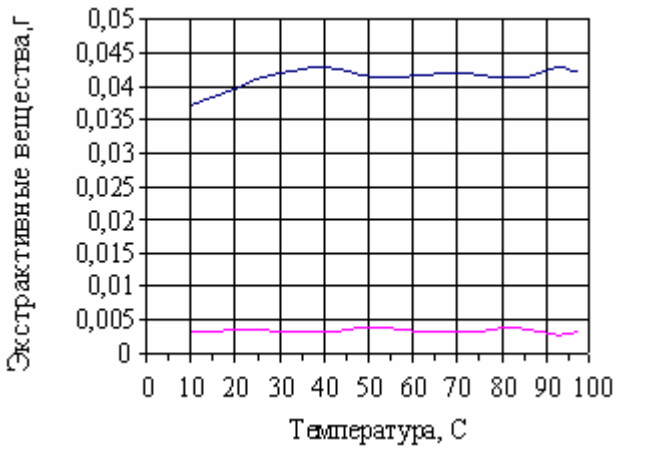


Рис. 3 - Зависимость выхода экстрактивных веществ в спиртовых экстрактах от температуры процесса

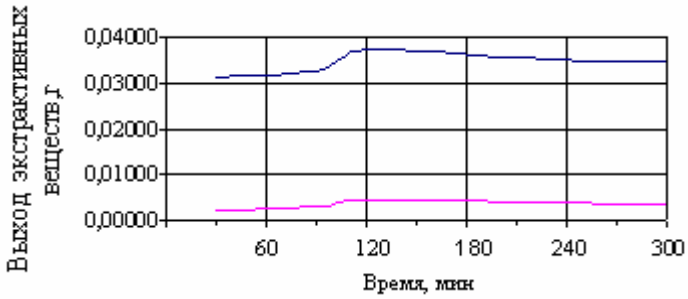


Рис 4 -Зависимость выхода экстрактивных веществ в спиртовых экстрактах от времени проведения процесса

Таблица 3 - Дисперсионный анализ экспериментальных данных по получению спиртового экстракта шрота чаги

Качественные показатели	Источник дисперсии	Число степеней свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат	$F_{экс}$	$F_{табл}$
Содержание сухих веществ	Фактор А	2	0,06414	0,03207	0,2229	19,3
	Фактор В	2	0,06690	0,03345	0,2222	19,3
	Фактор С	2	0,06316	0,03158	0,2226	19,3
	Остаток	2	2,90624	1,45312	-	19,3
	Общая сумма	6	0,0011	-	-	19,3
Содержание суммы углеводов	Фактор А	2	0,25334	0,12667	0,7179	19,3
	Фактор В	2	0,26916	0,13458	0,1536	19,3
	Фактор С	2	0,25174	0,12587	0,1578	19,3
	Остаток	2	2,2737	1,13685	-	19,3
	Общая сумма	6	0,0008	-	-	19,3
Содержание фенольных веществ	Фактор А	2	1,0266	0,5133	0,1606	19,3
	Фактор В	2	1,2000	0,6000	0,1532	19,3
	Фактор С	2	0,4600	0,2230	0,1533	19,3
	Остаток	2	4,9308	2,4654	-	19,3
	Общая сумма	6	0,0019	-	-	19,3

Использование математического планирования эксперимента позволило подобрать оптимальный режим получения спиртового экстракта шрота чаги, что хорошо согласуется с экспериментально полученными данными. Выбранная нами математическая модель позволила исследовать влияние каждого фактора (время, температура, концентрация экстрагента) или влияние нескольких параметров на изучаемые параметры (выход сухих веществ, фенольных веществ и углеводов). Применение математической модели позволяет избежать ошибок измерений при непосредственном эксперименте, сэкономить время и затраты на проведение эксперимента.

Экспериментальная часть

Спиртовые экстракты шрота получали методом ремацерации [9]. Значения сухого остатка и количества зольных элементов определяли согласно[10,11], содержание фенольных соединений определяли с помощью 4-аминоантипирина [12], количества сахаров с помощью [13]. Для проведения полнофакторного эксперимента и минимизации среднеквадратических ошибок была использована программа Statistica 6.0.

Выводы

1. На полноту процесса извлечения биологически активных веществ из шрота чаги, не существенного влияют время и температура поведения экстракции.

2. Подобран оптимальный способ получения спиртового экстракта шрота чаги полученный с помощью 50% спирта при температуре 85ºС, в течении 2 часов.

Литература

1. *Якимов, П.А.* Общая биологическая и химическая характеристика чаги как исходного сырья для получения лечебных препаратов / П.А. Якимов // Чага и ее лечебное применение при раке IV стадии. - Л., 1959. - С. 36-48.
2. Патент 233688.Способы получения спиртового экстракта чаги / Сысоева М.А, Юмаева Л.Р., Гамаюрова В.С., Хабибрахманова В.Р.; заявитель и патентообладатель Казанский государственный технологический университет.- № 2007115936/15 ; заявл. 20.04.07 ; опубл. 27.10.08
3. Патент 2341277.Способы получения спиртового экстракта чаги / Сысоева М.А, Юмаева Л.Р., Гамаюрова В.С., Хабибрахманова В.Р., Будников Г.К., Зиятдинова Г.К.; заявитель и патентообладатель Казанский государственный технологический университет.- № 2007126575/15; заявл. 12.07.07 ; опубл. 20.12.08
4. *Муравьева, Д.А.* Фармакогнозия / Д.А. Муравьева. - М., 1981. - С.625-627.
5. *Гринкевич В.Н.* Химический анализ лекарственных растений / В. Н. Гринкевич, Л. Н. Сафронич. - М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.
6. Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the Sclerotia and Mycelia of Inonotus obliquus (Pers: Fe.) PII. (Aphyllophoromycetideae) Int J Med Mushrooms, 1 pp.301-316, 1999
7. *Платонова, Е.Г.* Характеристика водорастворимых углеводных комплексов чаги и некоторых других трутовиков / Е. Г. Платонова // Комплексное изучение физиологически активных веществ низших растений: сб. науч. ст. / Наука. – М. – Л., 1961. – С. 63 – 69.
8. *Саакян, К.Р.* Чага (черный березовый гриб) FUNGUS BETULINUS. Аналитический обзор / К. Р. Саакян, К.Ф. Ващенко, Р. Э. Дармрграй // Провизор. – 1999. - № 2. - С. 14- 16.
9. *Сысоева, М.А.* Исследование золя водных извлечений чаги. II. Изменение изучаемой системы при проведении экстракции различными способами / М.А. Сысоева [и др.] // Вестник Казан. технол. ун-та. - 2003. - №2. - С.172-179.
10. Государственная фармакопея СССР: Вып.1. Общие методы анализа. 11-е изд., доп. - М., 1987. - 336 с.
11. Государственная фармакопея СССР: Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. 11-е изд., доп. - М., 1989. - 400с.
12. *Гринкевич, В.Н.* Химический анализ лекарственных растений / В.Н. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. - М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.
13. *Краснов, Е.А.* Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Е.А. Краснов, Т.П. Березовская. – Томск: Красное знамя, 1987. – 185 с.
14. *Тенцова, А.И.* Оптимизация фармацевтической технологии методами планирования эксперимента/ А.И. Тенцова [и др.]. – Запорожье: Высшая школа, 1981. - С. 127-132.
15. *Тенцова, А.И.* Методические указания к обработке результатов эксперимента по технологии лекарств / А.И. Тенцова [и др.]. – Ташкент: Медицина, 1980. – 69 с.

© **Л. Р. Юмаева –** асп. каф. промышленной биотехнологии КГТУ **М. А. Сысоева -** канд. техн. наук, доц. каф. промышленной биотехнологии КГТУ; **В. С. Гамаюрова –** д-р хим. наук, проф., зав. каф. промышленной биотехнологии КГТУ. E-mail: tkim1@kstu.ru