

АУКСИНОПОДОБНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕЛАНИНОВ ГРИБА

Inonotus obliquus (Pers.) Pil.

Ключевые слова: ауксиноподобная активность, экстракты, меланины, гриб *Inonotus obliquus (Pers.) Pil.*

Предложен новый способ оценки биологической активности меланинов гриба *Inonotus obliquus (Pers.) Pil.* – определение ауксиноподобной активности. Получены данные по ауксиноподобной активности меланинов гриба *Inonotus obliquus (Pers.) Pil.*, полученных разными способами. Проведено их сравнение со значениями антиоксидантной активности этих меланинов.

Keywords: auxin-like activity, extracts, melanin, mushroom *Inonotus obliquus (Pers.) Pil.*

A new method for assessing the biological activity of melanin mushroom *Inonotus obliquus (Pers.) Pil.* - definition auxin-like activity. The data on the activity of melanin auxin-like mushroom *Inonotus obliquus (Pers.) Pil.*, obtained by different methods. And compared with the values of the antioxidant activity of melanin.

Введение

Разработка новых лекарственных препаратов на основе природных объектов, обладающих разными биологическими и терапевтическими свойствами является актуальным направлением биофармацевтики. Перспективным сырьем для подобных препаратов является трутовый гриб *Inonotus obliquus (Pers.) Pil.* или чага.

Экстракты березового гриба чаги широко применяются в официальной и народной медицине в качестве противоракового, тонизирующего, болеутоляющего лекарственного средства, также их часто назначают при хроническом гастрите, язве и других заболеваниях желудочно-кишечного тракта [1-2].

Основным действующим веществом экстрактов чаги, обеспечивающим терапевтический эффект, являются меланины (или полифенолы) чаги [1-6]. Это наноразмерные частицы, имеющие сложную структурную организацию, которая характеризуется изменчивостью в зависимости от способа их получения [6, 7]. Меланины имеют широкий спектр биологической активности: обладают иммуномодулирующим, противовоспалительным, выраженным антиоксидантным, фотопротекторным и антимуtagenным действием [1-7].

В более ранних наших работах [3-6, 8] была установлена высокая антиоксидантная активность, как экстрактов, так и меланинов чаги, полученных и выделенных по разным методикам.

В данной работе предложено рассмотреть другой вид биологической активности – ауксиноподобную активность меланинов чаги [9].

Ауксин – это растительный гормон, вырабатывающийся преимущественно в растущих частях растений. Ауксины способствуют ускорению роста, стимулируя деление клеток и увеличение их размеров, а также взаимодействуя с другими гормонами. Под воздействием ауксинов происходит удлинение клеток (за счет того, что возрастает эластичность стенок клетки, и она может удерживать больше воды). Ауксин по химической природе является индолилуксусной кислотой. Он содержится в верхушке coleoptilia проростка семян и способствует его изгибу к свету, а также его росту. Ауксиноподобным действи-

ем обладают и другие вещества, выделенные из растений, но почти всегда их активность можно объяснить превращением в индолилуксусную кислоту [12].

Поиск новых способов оценки биологической активности препаратов чаги связан с отсутствием быстро характеризующихся и достаточно выраженных тестов для ее определения. В 50-х годах XX века Якимовым П.А. [1] была предложена методика определения биологической активности препарата чаги, основанная на его воздействии на рост семян пшеницы, предварительно протравленных медным купоросом. При обработке протравленных семян пшеницы препаратом чаги наблюдалось ослабление токсического действия некоторых отравляющих веществ на дрожжи и семена высших растений, что подтверждало наличие биологической активности препарата чаги. В работе [10] была сопоставлена ауксиноподобная активность грибного меланина из *A. Niger* и гуминоподобных веществ, синтезируемых базидиальным грибом *S. Maxima 0275* возбудителя «белой гнили». Для этого был проведен биотест по определению ауксиноподобной активности на проростках пшеницы согласно общепринятой методике [11]. Было показано, что гуминоподобные вещества и грибной меланин характеризуются сходной ауксиноподобной активностью.

В нашей стране в 60-70 гг. XX века Симбирцевым Н.Л. [15] был изобретен препарат «Дифеноксол» на основе ауксинов корней сосны, обладающий противоопухолевой и иммуностимулирующей активностью. Действие препарата объяснялось тем, что он оказывает влияние на иммунную систему, и сама иммунная система находит раковые клетки, микроорганизмы или вирусную инфекцию и уничтожает их.

Согласно зарубежным источникам [13, 14], ауксин селективно действует на раковые клетки человека, вызывая их апоптоз.

Анализ отечественных и зарубежных работ посвященных изучению ауксиноподобной активности грибных меланинов и близких к ним по строению гуминовых кислот и гуминоподобных веществ [9-16], приводит к следующим выводам: биотест по определению ауксиноподобной активности биологически активных веществ позволяет опреде-

лить их способность стимулировать рост растений [10, 16], а также косвенно свидетельствует о противоопухолевой и иммуномодулирующей активности исследуемых препаратов [13, 15].

Целью данной работы является определение ауксиноподобной активности меланинов чаги, полученных разными способами.

Экспериментальная часть

В работе использовалось сырье чаги, закупаемое в аптечной сети, поставщик ИП Гордеев М. В., Россия, РБ, Уфимский район, с. Русский Юрмаш партия 09.03.11.

Меланины чаги выделялись согласно общепринятой методике [17, 18], осаждением хлористоводородной кислотой из экстрактов чаги.

Экстракты чаги серии Фунги Б12 получались по способу, описанному в [19]. Отличия экстрактов серии Фунги Б12 достигались за счет использования различных экстрагентов в процессе экстракции: 1) Фунги Б12 – водный экстракт чаги; 2) Фунги Б12/В – экстракт чаги, полученный с применением водного раствора диметилсульфоксида; 3) Фунги Б12/Г – экстракт чаги, полученный с применением растворителя смешанного типа (водного раствора, содержащего диметилсульфоксид и гидроокись натрия). Характеристики экстрактов приведены в табл. 1 и 2.

Таблица 1 – Физико-химические характеристики экстрактов чаги

Экстракт	Сухой остаток, г/100мл	Содержание меланина, г/100мл	Вязкость, λ, мПа*s	pH
Фунги Б12	2,83±0,31	1,79±0,21	1,34	5,17
Фунги Б12/В	3,78±0,28	3,10±0,33	1,52	5,34
Фунги Б12/Г	11,15±0,22	10,63±0,28	2,58	9,31

Таблица 2 – Антиоксидантные характеристики экстрактов и меланинов чаги

Экстракт	АОА экстрактов, Кл/мл	АОА меланина, кКл/100г
Фунги Б12	6,1±0,1	48,2±1,0
Фунги Б12/В	8,8±0,1	64,9±0,8
Фунги Б12/Г	21,0±0,3	80,0±1,0

Определение сухого остатка, вязкости, pH экстрактов проводилось по [18]. Антиоксидантная активность экстрактов и меланинов чаги определялась кулонометрическим способом [20, 21].

Определение ауксиноподобной активности проводили согласно общепринятой методике [11] на проростках пшеницы мягкого сорта (*Triticum aestivum* L.). Методика биотеста следующая. У проростков пшеницы приблизительно одинакового размера, выращенных в темноте в течение 3 суток, отделялись

колеоптили и отрезался лезвием сегмент длиной около 5 мм, отступая от верхушки 4 мм, чтобы избежать влияния эндогенных ауксинов. Из отрезка колеоптиля капилляром удалялся первичный лист и подготовленный таким образом отрезок помещался в чашку Петри с водой. Отрезки нанизывались на стеклянный капилляр по 3 штуки и измерялась их общая длина. Затем стеклянные капилляры с колеоптилями помещались в чашку Петри с испытуемыми растворами меланинов (в количестве по 3 капилляра на чашку) (рис. 1а). Затем чашки Петри помещались в термостат при температуре 25±2°C. Повторное измерение длины колеоптилей проводилось через 72 ч (рис. 1б).



а



б

Рис. 1 – Опыт по определению ауксиноподобной активности: а - начало опыта (0 день); б - окончание опыта (3 день)

Об ауксиноподобной активности исследуемых меланинов судили на основании относительного прироста колеоптилей, рассчитываемого как [10, 11]:

$$((L_k - L_n) \cdot 100 \%) / L_n,$$

где L_k - общая длина 3 колеоптилей в конце эксперимента, мм; L_n - общая длина 3 колеоптилей в начале эксперимента, мм.

Структурные особенности пространственной структуры меланинов в экстрактах чаги определялись при помощи видеомикроскопа марки MC 100 (LCD PC) Operation manual Micros Austria.

Результаты проведенных экспериментов обобщались с помощью компьютерной программы «Статистика 6» при $P=0,95$, $n=3$ (рис. 2).

Результаты и их обсуждение

Для исследования выбраны меланины чаги, полученные по одному способу [19], но отличающиеся различным типом экстрагента. Все выбранные экс-

тракты для получения меланинов характеризуются высоким выходом экстрактивных веществ с долей меланинов в них 60-95%. При этом как сами экстракты, так и выделяемые из них меланины, обладают высокой антиоксидантной активностью 6-21 Кл/мл и 48-80 кКл/100г соответственно.

Поэтому данные экстракты и меланины являются перспективными источниками для создания на их основе лекарственных препаратов и биологически активных добавок на основе чаги. Основной задачей данной работы было показать, что выбранные меланины обладают широким спектром биологической активности, т.е. кроме антиоксидантной активности, обладают еще и ауксиноподобной активностью, по наличию которой можно также косвенно судить о наличии иммуномоделирующей активности меланина чаги.

Результаты сравнительной оценки ауксиноподобной активности меланинов чаги приведены на рис. 2.

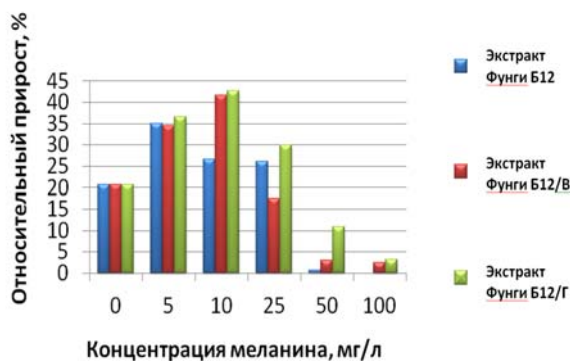


Рис. 2 – Зависимость приращения длины coleoptилей от концентрации различных меланинов

Установлено, что меланин, выделенный из водного экстракта Фунги B12, обладает максимальной ауксиноподобной активностью в концентрации 5 мг/л, при этом относительный прирост составляет 35 %. Это в 1,5 раза выше, чем прирост coleoptилей без введения меланина. Так же прирост coleoptилей на 26 % наблюдается при концентрациях 10 и 25 мг/л. При высоких концентрациях меланина 50 и 100 мг/л наблюдается угнетающее его действие на рост coleoptилей.

Меланины, выделенные из экстрактов Фунги B12/B и Фунги B12/G, также обладают ауксиноподобной активностью в концентрации 5-25 мг/л. Наиболее высокое значение прироста coleoptилей 42-43 % достигается при концентрации меланина 10 мг/л. При высоких концентрациях меланинов 50 и 100 мг/л также характерно ингибирование роста coleoptилей, что свидетельствует об одинаковой природе исследуемых меланинов.

Полученные значения хорошо согласуются с литературными данными [10, 16], по определению ауксиноподобной активности грибных меланинов, гуминовых и гуминоподобных веществ, максимум ауксиноподобной активности которых также находится в диапазоне от 5 до 10 мг/л. Это еще раз подтверждает сходство меланинов чаги с гуминовыми кислотами и меланинами, выделенными из других

грибов. Ранее в литературных источниках [1, 22] и наших работах [3, 5] подробно рассматривались особенности строения меланинов (полифенолоксикарбонового комплекса, ПФК) чаги. Было установлено, что меланины занимают промежуточное положение между молекулой лигнина и гуминовыми кислотами и, как следствие, обладают похожими свойствами и способностью проявлять сходную биологическую активность.

Все исследованные меланины в той или иной степени вызывают прирост coleoptилей в низких концентрациях (5-25 мг/л), что связано с присутствием в меланине индолуксусной кислоты; при высоких же концентрациях меланинов, наоборот наблюдается ингибирование роста coleoptилей, обусловленное избыточным накоплением ауксина (индолуксусной кислоты), которое приводит к гербицидному действию. Надо отметить, что такой механизм действия характерен для природных и синтетических ауксинов.

Сравнивая изменение ауксиноподобной и антиоксидантной активности в ряду Фунги B12 → Фунги B12/B → Фунги B12/G можно отметить их возрастание примерно в 1,5 раза. Меланины, выделенные из экстрактов Фунги B12/B и Фунги B12/G, обладают более высокими значениями, как ауксиноподобной, так и антиоксидантной активности. Это связано с иной структурной организацией этих меланинов, которые согласно данным оптической микроскопии обладают более упорядоченным строением и характеризуются увеличением размеров глобул меланинов, представленных мицеллами, состоящим из субмицелл. Большая внешняя поверхность меланина, соответственно позволяет иметь большее количество функциональных группировок, отвечающих за связывание свободных радикалов, и, как следствие, это приводит к увеличению антиоксидантной активности. Подобное строение меланинов делает их более реакционноспособными и расширяет возможные виды активности, в частности, приводит к увеличению ауксиноподобной активности.

Выводы

Установлено, что меланины чаги вызывают увеличение ауксиноподобной активности в низких концентрациях, и ее снижение в высоких.

Показано, что меланины чаги по значениям ауксиноподобной активности сходны со значениями ауксиноподобной активности гуминовых кислот и других природных меланинов.

Результаты данной работы позволяют дать дополнительную оценку биологической активности препаратов на основе чаги, в частности меланинов, что приводит к расширению спектра их действия, а также дает возможность введения дополнительных методик для их характеристики и стандартизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания Министерства образования и науки РФ в 2012 году и плановом периоде 2013 и 2014 годов (ПНИЛ 4.5285.2011 (внутр. 95.12) от

Литература

1. Чага и ее лечебное применение при раке VI стадии. – Медгиз, Ленинград, 1959. – 334с.
2. Шашкина М.Я. Чага, чаговит, чаголюкс как средство профилактики и лечения больных. – Эдас, Москва, 2008. – 80 с.
3. О.Ю. Кузнецова, Дисс. канд. хим. наук. – Казань, 2004. 158 с.
4. М.А. Сысоева, *Вестник Казан. технол. ун-та*, 2, 172-176 (2003).
5. М.А. Сысоева, *Вестник Казан. технол. ун-та*, 1, 244-250 (2005).
6. М.А. Сысоева, Дисс. докт. хим. наук. – Казань, 2009. – 294 с.
7. О.Ю. Кузнецова, *Вестник Казан. технол. ун-та*, 2013. – Т.16. – №3. – С. 156-163.
8. О.Ю. Кузнецова, *Химия растительного сырья*, –2005.– №1.–С.41-47.
9. О.Ю. Кузнецова, *Всероссийская молодежная научная школа «Биоматериалы и нанобиоматериалы: Актуальные проблемы и вопросы безопасности»* (Казань, 18-22 июня 2012). Тезисы докладов. Казань, 2012. С. 31 (94 с.).
10. О.В. Королева, *Прикладная биохимия и микробиология*. 2007. – Т.43. – №1. – С.69–76.
11. А.Т. Мокроносова *Малый практикум по физиологии растений*. – М.: изд. МГУ, 1994. – 183 с.
12. Интересные факты из истории. Верхушка колеоптиля – кладезь ауксинов. (http://interesnoe.info/2010/09/verhushka_koleoptilya_kladez_auksinov).
13. S.Y. Kim, *Arch Dermatol Res*, 2009. – V.301. – N.4. – P.319–322.
14. О. Koroleva-Skorobogat'ko, *J. Biotechnol. Appl. Biochem.* 1998. V. 28. №. 1. P. 47–54.
15. Эффективный противораковый препарат «Дифеноксол» – очередная история забвения (<http://www.antirak-center.ru/index.php?catid=32>).
16. А.Д. Дашицыренова, *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. – 2003. – № 7., – С. 47-48.
17. Муравьева Д.А. *Фармакогнозия*. Медицина, Москва, 1981. 714 с.
18. *Государственная фармакопея СССР*. 11-е изд., доп. М., 1987. – 389 с.
19. Патент на изобретение РФ № 2450817 (2012).
20. Абдуллин И.Ф., *Заводская лаборатория*. 2002. Т. 68. №9. С. 12-15.
21. Абдуллин И.Ф., *Журнал аналитической химии*. 2002. Т.57. №6. С. 666-670.
22. Н.В. Сушинская, *Вестник Белорусского государственного университета*. – 2004. – №3. – С. 33 –36.