

УДК 615.281.9

НИЗКОДОЗОВЫЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ БИОПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ЛИШАЙНИКОВ РОДА CLADONIA

¹Аньшакова В.В., ^{2,1}Кершенгольц Б.М., ³Корякина В.В., ^{3,1}Иванова И.К.

¹Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова,
Якутск, e-mail: anshakova_v@mail.ru;

²Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск;

³Институт проблем нефти и газа СО РАН, Якутск

Разработана механохимическая технология получения высокоэффективных твердофазных биоконплексов без участия растворителей в одну технологическую стадию на основе «универсального активного наполнителя» – полимерной матрицы лишайниковых b-олигосахаридов с различными видами фармаконов (известными фармацевтическими препаратами, физиологически активными веществами лекарственных растений). Ударно-истирающее воздействие с добавками твердофазных химических реагентов (например, солей), сопровождается, наряду с разрушением клеточных стенок, изменением химического состава компонентов растительного сырья в результате разрыва ряда химических связей (даже таких прочных, как β-гликозидных) и протекания химических реакций, вплоть до образования некоторых очень важных ФАВ именно в процессе механохимической обработки сырья. Использование «free solvent» процессов на основе природных олигосахаридов приводит к пролонгации действия активного вещества (фармакона), повышению его биологического эффекта в несколько раз, при этом снижая дозу и токсичность.

Ключевые слова: механохимия, биологически активные вещества, лишайники, антибактериальная активность

LOWDOSE ANTIBACTERIAL BIOLOGICAL PRODUCTS ON THE BASIS OF LICHENS OF SORT CLADONIA

¹Anshakova V.V., ^{2,1}Kershengoltc B.M., ³Koryakina V.V., ^{3,1}Ivanova I.K.

¹North-Eastern Federal University named after M.K. Ammosov, Yakutsk, e-mail: anshakova_v@mail.ru;

²Institute of biological problems of permafrost SB RAS, Yakutsk;

³Institute of Oil and Gas Problems, SB RAS, Yakutsk

The mechanochemical technology for producing of high-performance solid-state biocomplexes processing without solvent in one technological stage based on «universal active filler» which is a polymer lichen b-oligosaccharide matrix with different kind of API (known pharmaceuticals, physiologically active substances of herbs) is developed. Impact-abrasive effect with additives of solid-state chemical reagents (eg. Salts), followed by changes in the chemical composition of the components of plant material along with the destruction of cell walls. It is a result of breaking a number of chemical bonds (even such strong as β-glycoside), and of chemical reactions, including to the formation of some very important API just (namely) in the process of mechanochemical processing of raw materials. The application of «solvent-free» processes based on natural oligosaccharides prolongs of the operation of API and increases of its biological effect in a few times, while reducing the dose and toxicity.

Keywords: mechanochemistry, biologically active substances, lichens, antibacterial activity

В настоящее время для расширения сырьевой базы лекарственного и пищевого растительного сырья используются крайне малоисследованные объекты, к которым относятся лишайники, видовое разнообразие которых на территории Якутии насчитывает свыше пятисот видов [4]. Среди огромного разнообразия известных видов лишайников особый интерес представляет изучение такого семейства, как Кладониевые (*Cladoniaceae*), по двум причинам: первая – это один из наиболее сложных в химическом отношении представителей лишайников [2]. Вторая причина заключается в том, что основную биомассу ягеля (75–85%) на Северо-Востоке России образуют представители широко известного рода Кладония (*Cladonia*) – *Cladonia rangiferina*, *C. Stellaris*, *C. arbuscula*, *C. Mitis*, т.к. лишайники рода *Cladonia* считаются надёжными индикаторами бедных сухих почв.

Нами предложена механохимическая активация лишайникового сырья с микродобавками твердофазного неорганического щелочного реагента с целью увеличения эффективности применения как самостоятельного ягелевого препарата так и в комплексе с известными фармпрепаратами [1]. Преимуществом предлагаемой механохимической обработки лишайников рода *Cladonia* является тот факт, что в ней нет ни экстракционных, ни гидролизных стадий обработки биосырья, процесс проходит без участия растворителей в одну технологическую стадию, что обеспечивает сокращение ресурсо- и энергоёмкости технологического процесса.

Целью настоящей работы является изучение влияния эффекта механохимического комплексообразования фармакона (действующего вещества) лишайниковыми β-олигосахаридами на базовые свойства лекарственного препарата.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись слоевища лишайников рода *Cladonia* (ягель) механоактивированные и грубоизмельченные, также твердофазные биоконплексы на основе лишайниковых β -олигосахаридов, используемых в качестве универсальной матрицы, до 90–95% по массе, с цефазолином.

Механохимическую активацию проводили в воздушной среде в мельнице-активаторе проточного типа ЦЭМ 7-80.

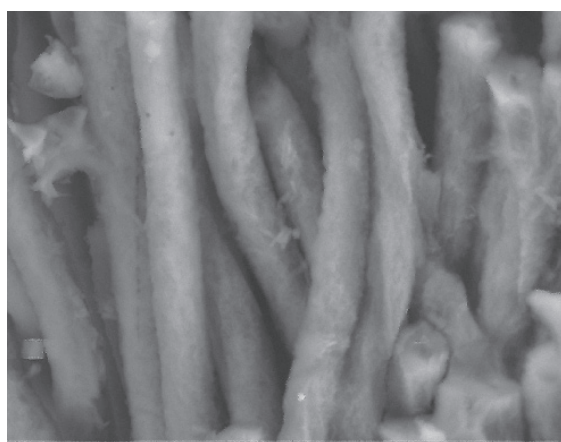
Сравнительный анализ физико-химических свойств ягеля и биоконплексов на его основе проведен как для грубо измельченного биоматериала, так и для механоактивированных образцов. В качестве физико-химических методов исследования объектов были использованы метод сканирующей электронной микроскопии (сканирующий электронный микроскоп

TM-1000 Hitachi High Technologies, Япония) и ЯМР спектроскопии (Bruker) [2].

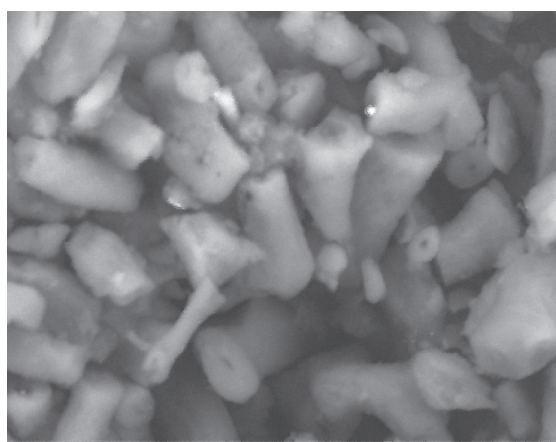
Антибактериальные свойства объектов исследовали *in vitro* на культурах бактериальных штаммов условно-патогенных и патогенных микроорганизмов [5].

Результаты исследования и их обсуждение

Использование механохимической обработки разрушает стенки клеток, где находится основная часть физиологически активных веществ растений (ФАВ) и приводит к образованию наноразмерных частиц в твердой фазе (рис. 1), тем самым способствует максимально эффективному выходу (ФАВ) из клеток.



а



б

Рис. 1. Сканирующие электронные фотографии структуры ягеля различного измельчения: грубого помола (а), механоактивированного (б)

Химический состав слоевищ лишайников р. *Cladonia* грубого и механоактивационного помола исследовали с точки зрения перспективности их применения и в качестве комплексообразователя с различными действующими веществами и как чистого лишайникового биопрепарата. Этим обусловлен выбор анализируемых веществ. Комплексообразующая функция обусловлена наличием в исследуемых механоактивированных объектах олигосахаридов. Способностью лизировать патогенные и условно патогенные бактериальные клетки обладают лишайниковые кислоты, ярким представителем которых является усниновая кислота.

Протонные спектры (рис. 2), полученные на ЯМР-спектрометре высокого разрешения Avance III 400 МГц (Bruker), свидетельствуют о том, что все образцы ягеля содержат большое количество усниновой кислоты. Исследуемые образцы готовили путем растворения соответствующих проб

в дейтерированной воде. ^1H -спектры были сняты по стандартной методике в хлороформе, используя внешний стандарт DMSO.

Все спектры образцов грубого помола и после механоактивационного воздействия в интервале частот 0–6 м.д. в аммонийном буфере идентичны в алифатической области спектра. В целом спектр представляет собой смесь усниновой кислоты и полисахаридных веществ.

В районе 3,0–3,4 м.д. проявляются сигналы протонов сахаридного остова лишайна, который состоит из последовательностей 1,3 и 1,4-связанных остатков глюкозы, помимо которых присутствуют сигналы аномерных протонов полисахаридов при 5,20 и 5,12 м.д. В ходе механоактивации наблюдается изменения интенсивностей сигналов 3,29 и 3,33 м.д., т.е. взаимозменение их интенсивностей: при механоактивации уменьшается интенсивность сигнала 3,29 при увеличении сигнала 3,33 м.д. (рис. 3), что, возможно, свидетельствует об измене-

нии химического окружения внутри циклов полисахарида. В отличие от щелочных экстрактов исследуемого вещества, в кислот-

ной среде таких изменений не происходит и спектры ягеля различного воздействия идентичны.

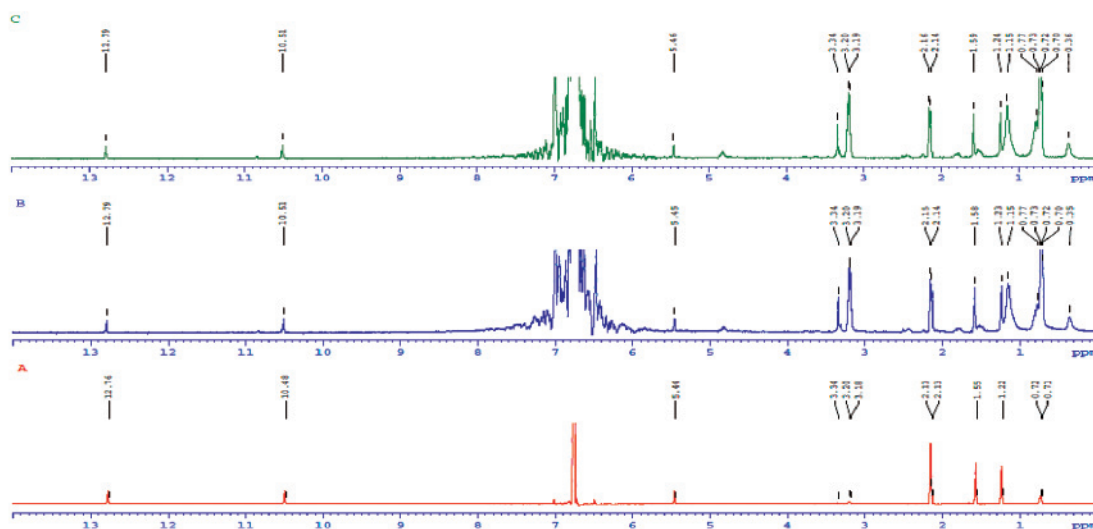


Рис. 2. Протонные спектры в CHCl_3 :
 А – усниновой кислоты; В – ягеля грубого помола С) ягеля после механоактивации

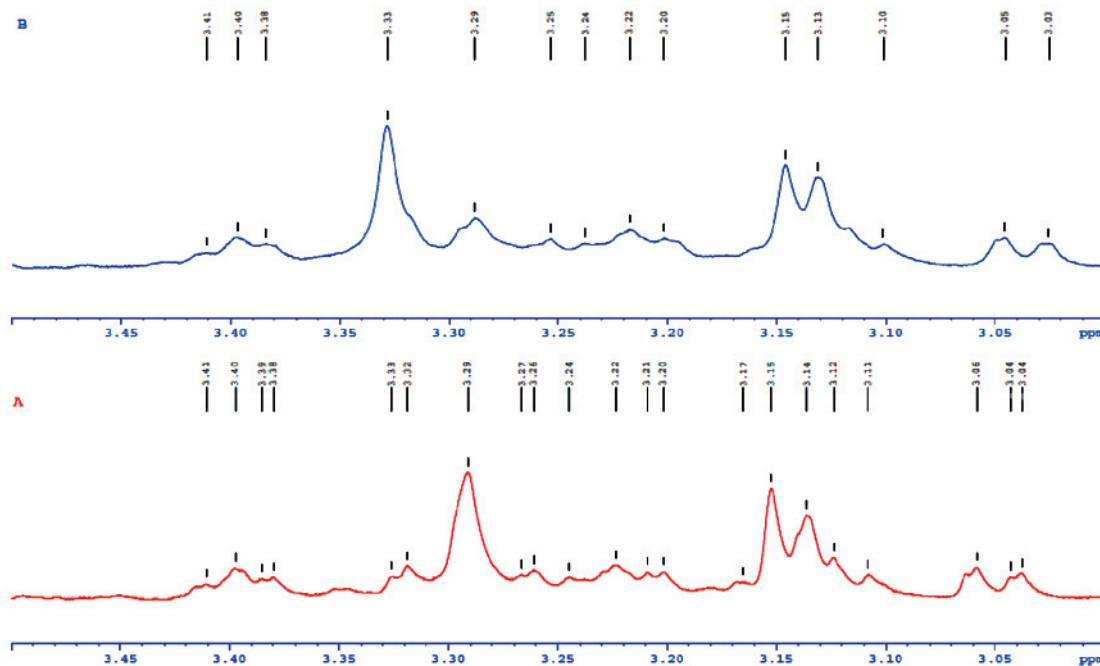


Рис. 3. Протонные спектры ягеля грубого помола (А) и ягеля после механоактивации (В) в аммонийном буфере в интервале 3–3,5 м.д.

Результатом механохимической активации наряду с образованием наноразмерных частиц является образование β -олигосахаридных молекул (активного наполнителя) за счёт расщепления части β -гликозидных связей в лишайниковых β -полисахаридах. Это также

подтверждено анализом водорастворимых углеводов (по методу восстанавливающих концов) в экстрактах слоевищ лишайников после грубого измельчения либо механохимической активации. Содержание легкогидролизуемых углеводов в пробах лишайника рода *Cladonia* составило 4,61 мг/г сухого

образца грубого помола и 33,48 мг/г сухого механоактивированного сырья.

Эффект повышения биоактивности фармакона можно объяснить его комплексообразованием с лишайниковыми β-олигосахаридами (рис. 4).

Поскольку вторичные метаболиты лишайников, например, лишайниковые кислоты (усниновая, леканоровая, физодовая),

обладающие антибиотическим действием, представляют своего рода «внутрилишайниковый фармакон», было исследовано влияние механохимической активации на антибактериальное действие ягелевого препарата без внесения дополнительных фармаконов, по отношению к восьми штаммам условно-патогенных бактерий (табл. 1).

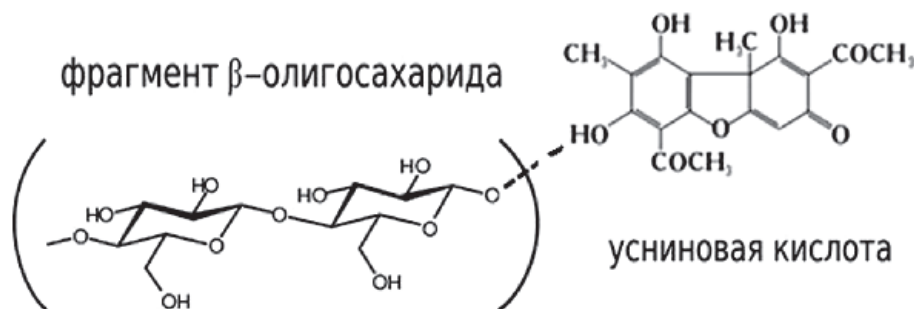


Рис. 4. Схема межмолекулярных взаимодействий усниновой кислоты с β-олигосахаридами

Таблица 1

Антибактериальное действие порошка (контроль) и препарата механохимически активированного ягеля на культуры условно-патогенных и патогенных бактериальных штаммов

Название видов бактериальных штаммов	Антибактериальное действие порошка грубоизмельченных слоевищ лишайников	Антибактериальное действие порошка механохимически активированных слоевищ лишайников
Enterobacter cloacae	+*	+++
Staphylococcus aureus	+	++++
Лактозо-негативная E.coli	++	++++
Klebsiella pneumonia	+	++++
Proteus vulgaris	++++	++++
Гемолитическая E.coli	+	++++
E.coli M-17	++	++++
Salmonella enteritidis	+	++++

Примечания:

*) + – слабый лизис; ++ – частичное лизирование;

+++ – почти полный лизис; ++++ – полный лизис.

Видно, что если при внесении в питательные среды для культивирования данных штаммов порошка грубоизмельченных слоевищ лишайников в концентрации 5,0 мг/мл наблюдался очень слабый лизис, то внесение механохимически активированных слоевищ лишайников в той же концентрации приводило к полному лизису бактериальных клеток.

Также была исследована способность лишайниковых β-олигосахаридов повышать активность дополнительно вводимого на стадии механоактивации фармакона, на

примере антибактериального препарата цефазолина по отношению к бактериальному штамму E.colli M17 (табл. 2). Видно, что цефазолин начинал оказывать частичное антибактериальное действие только при концентрациях выше 2,0 мкг/мл, в то время как механохимически активированный композит лишайниковых β-олигосахаридов с цефазолином оказывал аналогичное лизирующее действие уже при концентрации цефазолина 0,25 мкг/мл, т.е. активность цефазолина в таком комплексе возрастала в 8–10 раз.

Таблица 2

Антибактериальное действие комплексного препарата «Лишайник механохимически активированный + цефазолин» в соотношении 100:1, на штамм E.colli M17

№ п/п	Концентрация цефазолина мкг/мл	Антибактериальное действие	
		Комплексный препарат «Механохимически активированный лишайник + цефазолин»	Препарат цефазолина (контроль)
1	0,25	++ *)	-
2	0,5	++	-
3	1,0	++	+
4	2,0	+++	+
5	4,0	++++	++
6	Контроль	-	-

Примечания: *) + – слабый лизис; ++ – частичное лизирование; +++ – почти полный лизис; ++++ – полный лизис; – – полное отсутствие лизиса.

Заключение

Созданные механохимические биокомплексы на основе лишайникового сырья имеют существенно меньшую дозу активно действующей субстанции, следовательно, они менее токсичны, что позволяет достичь антибактериального эффекта при снижении дозы антибиотика в 10 раз.

Список литературы

1. Механохимические технологии получения биологически активных веществ из лишайников / В.В. Аньшакова, Б.М. Кершенгольц, Е.С. Хлебный, А.А. Шейн // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т.13, №1. – С. 236–240.
2. Структурное исследование полисахаридов лишайников *Setragia cucullata* и *S. islandica* / Р.П. Горшкова, Е.Л. Назаренко, В.А. Зубков, Л.С. Степаненко, В.В. Исаков. // Биоорганическая химия. – 1997. – Т. 23, №2. – С. 134–138.
3. Дембицкий В.М. Органические метаболиты лишайников / В.М. Дембицкий, Г.А. Толстиков. – Новосибирск: Изд-во: «Гео», 2005. – 135 с.
4. Официальный сайт Министерства природных ресурсов и экологии Российской Федерации <http://www.mnr.gov.ru/maps/?region=14>.
5. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания, утв. главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.2004.

References

1. An'shakova V.V., Kershengol'c B.M., Hlebnij E.S., Shein A.A. *Izvestija Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk* (News of the Samara center of science of the Russian Academy of Sciences), 2011, no. 1, pp. 236–240.
2. Gorshkova R.P., Nazarenko E.L., Zubkov V.A., Stepanenko L.S., Isakov V.V. *Bioorganic chemistry*, 1997, no. 2, pp. 134–138.
3. Dembickij V.M., Tolstikov G.A. *Organicheskie metabolity lishajnikov* (Organic metabolites of lichens). Novosibirsk, 2005, 135 p.
4. *Oficial'nyj sajt Ministerstva prirodnyh resursov i jeologij Rossijskoj Federacii* (Official site of the Ministry of natural resources and ecology of the Russian Federation) <http://www.mnr.gov.ru/maps/?region=14>.
5. МУК 4.2.1890-04. *Opređenje čuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nyh preparatam* (Methodical instructions RF) 04.03.2004.

Рецензенты:

Федорова С.А., д.б.н., зав. лабораторией молекулярной генетики Якутского научного центра комплексных медицинских проблем СО РАМН, г. Якутск.

Павлова А.И., д.в.н., профессор, проректор по научной работе, зав. кафедрой физиологии и экологии ФВМ ФГОУ ВПО Якутской государственной сельскохозяйственной академии, г. Якутск.

Работа поступила в редакцию 15.02.2012.