

УДК 615.322:582

АКТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО БИОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ТАЛЛОМА ЛИШАЙНИКОВ И РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ

© 2015 г. В. В. Аньшакова, А. В. Степанова, Д. М. Уваров, А. Ш. Смагулова,
К. Н. Наумова, П. П. Васильев, *Б. М. Кершенгольц

Северо-Восточный федеральный университет им. М. К. Аммосова

*Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск

Разработана механохимическая технология получения высокоэффективных твёрдофазных биоконплексов (без участия растворителей) в одну технологическую стадию на основе «универсального активного наполнителя» – полимерной матрицы лишайниковых β-олигосахаридов.

Показано, что лишайниковое сырье может служить источником для получения наполнителя с выраженной адсорбционной активностью для твердых лекарственных форм. Статистически значимо установлено, что бикомпонентный растительный механокомплекс на основе наполнителя – лишайниковых β-олигосахаридов и небольшого количества родиолы розовой обладает широким спектром адаптогенного действия, повышая резистентность организма лабораторных животных к действию физических нагрузок и экстремальных факторов различной природы.

Ключевые слова: лишайник, родиола розовая, детоксикация, адаптогенная активность, механохимическая активация

ACTOPROTECTIVE ACTIVITY OF COMPLEX BIOLOGICS BASED ON LICHENS THALLI AND RHODIOLA ROSEA

V. V. Anshakova, A. V. Stepanova, D. M. Uvarov, A. Sh. Smagulova,
K. N. Naumova, P. P. Vasilev, *B. M. Kershengolts

North-Eastern Federal University named after M. K. Ammosov

*Institute of Biological Problems of the Cryolithozone, SB RAS, Yakutsk, Russia

There has been developed a mechanochemical technology of one-stage production of highly effective solid phase biocomplexes (without use of solvents) based on "the universal active filler" - lichenβ-oligosaccharides polymer matrix.

It has been shown that lichens can be a source for production of the filler with apparent adsorption activity for solid dosage forms (SDF). It has been a statistically significant establishment that the bicomponent vegetative mechanocomplex based on the lichen β-oligosaccharides filler and a small amount of Rhodiola rosea has a broad spectrum of adaptogenic effects, it increases body's resistance of laboratory animals to physical loads and extreme factors of different nature.

Keywords: lichen, Rhodiola rosea, detoxification, adaptogenic activity, mechanochemical activation

Библиографическая ссылка:

Аньшакова В. В., Степанова А. В., Уваров Д. М., Смагулова А. Ш., Наумова К. Н., Васильев П. П., Кершенгольц Б. М. Актопротекторная активность комплексного биопрепарата на основе таллома лишайников и родиолы розовой // Экология человека. 2015. № 5. С. 46–51.

Anshakova V. V., Stepanova A. V., Uvarov D. M., Smagulova A. Sh., Naumova K. N., Vasilev P. P., Kershengolts B. M. Actoprotective Activity of Complex Biologics Based on Lichens Thalli and Rhodiola Rosea. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2015, 5, pp. 46-51.

Известно, что ежегодные потери здравоохранения в мире вследствие низкой биодоступности и токсичности действующих веществ (ДВ) различных лекарственных препаратов составляют более 65 млрд долларов [10]. Процесс создания новых лекарств, биопрепаратов является длительным и требует больших финансовых вложений — именно поэтому актуальным является поиск путей повышения эффективности уже существующих действующих веществ. Одним из способов повышения биодоступности и, как следствие, терапевтической эффективности ДВ при снижении его дозы является получение высокоэффективных комплексов «носитель : ДВ», где активный носитель повышает биодоступность действующего вещества при снижении дозы и наряду с этим обладает детоксикационной активностью.

Носители (подложки) востребованы в группах различных препаратов для лечения социально значимых заболеваний (заболевания сердечно-сосудистой системы, онкологические заболевания, вирусные гепатиты, туберкулез, сахарный диабет). Например, при создании комплексных противомикробных препаратов (антибиотики, противогрибковые средства и т. п.). Причины востребованности — широкая распространенность инфекционных заболеваний, возникновение побочных эффектов при лечении, развитие резистентности к препаратам. Кроме того, носитель, повышающий терапевтическую эффективность ДВ, может быть востребован в группах витаминных и витаминно-микроэлементных препаратов, иммуномодуляторов, адаптогенов и т. п. по причине низкой усвояемости ДВ, входящих в состав указан-

ных препаратов. Также одна из групп препаратов, где будет востребован носитель, это препараты, имеющие выраженное побочное действие (например, цитостатические средства в онкологии), что позволит за счет подложки одновременно проводить детоксикацию организма, а повышение биодоступности ДВ позволит уменьшить терапевтически эффективную дозу. Создание новых комплексных препаратов позволит улучшить качество жизни пациентов из перечисленных групп, уменьшить их инвалидизацию и государственные расходы на лечение социально значимых заболеваний.

Для создания носителей (подложек) медицинского назначения необходимо привлекать как новые сырьевые источники, так и новые технологии их переработки. Теоретический анализ позволил нам предложить в качестве носителя лишайниковые β -олигосахариды, часть из которых содержит также аминокислоты, обладающие выраженной сорбционной активностью [3, 7].

При этом разрабатываемая в Северо-Восточном федеральном университете подложка обладает следующим набором свойств:

- хорошая всасываемость в желудочно-кишечном тракте и проникновение через различного рода мембранные комплексы, т. е. ее бифильная биогенная структура максимально приближена к структуре определенных, прежде всего гликокаликсовых, элементов клеточных мембран;
- высокая сорбционная способность по отношению к катионам тяжелых металлов и органическим соединениям, являющихся эндотоксинами — конечными продуктами обмена, интермедиатами воспалительных и аутоиммунных процессов (включая аллергические) и экзотоксинами, за счет большого числа слабых взаимодействий (не ковалентных связей), благодаря наличию в структуре полярных функциональных групп (OH -, $-\text{NH}_2$ -, $-\text{O}$ - и других);
- прочность структуры, не гидролизующейся и не окисляемой ферментами внутренних сред организма, так как определяется β -гликозидными связями;
- комплексы, образуемые подложкой с сорбируемыми эндо- и/или экзотоксинами, хорошо выводятся из организма: в случае гидрофильной природы токсина — через почки с мочой; в случае гидрофобной природы токсина — желчным клиренсом.

Кроме того, повышения базовых свойств ДВ можно достигнуть посредством его механохимического комплексобразования с предложенным носителем — лишайниковыми β -олигосахаридами [1].

Целью настоящей работы является изучение свойств носителя из таллома лишайников для твердых лекарственных форм и его комплекса с родиолой розовой.

Методы

В качестве объекта исследования как источника для расширения ассортимента носителей растительного происхождения, повышающего биодоступность

ДВ и обладающего при этом детоксикационными свойствами, нами использовалось сырье для производства биологически активной добавки к пище (БАД) «Ягель порошкообразный ультрадисперсный» [2, 8], полученный ультратонкой механохимической активацией таллома лишайников рода *Cladonia*, предварительно грубоизмельченного до размера частиц 1–3 мм на высокоскоростном миксере грануляторе KMS-50 (Корея).

Также исследовалась физиологически активная растительная композиция с повышенной фармакологической активностью адаптогенного действия, полученная нами на основе растительных субстанций, произрастающих в Якутии: слоевищ лишайников (*Cladonia*), корневищ родиолы розовой (*Rhodiolarosea*, сем. *Crassulaceae*), в массовом соотношении 10 : 1 из сухого сырья без участия растворителей в одну технологическую стадию с использованием механохимических технологий в шаровых мельницах с центробежным ускорением мельющих тел в интервале 10–30 г [9].

Сорбционную активность подложки «Ягель порошкообразный ультрадисперсный» *in vitro* определяли по отношению к маркеру метиленовому синему, моделирующему средне- и низкомолекулярные токсины, и ионам Co^{2+} , представляющему ионы тяжелых металлов, методом прямой спектрофотометрии по модифицированной методике ГОСТ 4453-74 на спектрометре с программным обеспечением LAMBDA 20 при длинах волн (λ) 400 и 590 нм соответственно в кюветах толщиной поглощающего свет слоя 10 мм относительно дистиллированной воды. Модификация заключалась в дополнительном фильтровании на этапе центрифугирования, т. к. обычное центрифугирование не дает полного разделения фаз.

Детоксикационные свойства носителя и физиологическую активность биоконцентра с родиолой розовой на его основе различной активации как грубого измельчения, так и механоактивированного определяли *in vivo* при пероральном введении мышам линии CD-1 ($n = 15$ в каждой группе). Животные контрольной группы получали растворитель (воду), остальные животные исследуемых групп получали биопрепарат из расчета 50 мг/кг зондовым введением в желудок. На 30-й день по 5 животных из каждой группы были подвергнуты эвтаназии с тотальным забором крови, на 45-й день оставшиеся экспериментальные животные также подвергнуты эвтаназии с тотальным забором крови для биохимического анализа на содержание токсина «усталости» — лактата.

Оценка поведенческой активности животных проводилась с использованием тестов «Плавание» и «AutoTrack» согласно стандартным операционным процедурам на 30-й и 45-й день введения препарата [5].

Поведенческие тесты отличаются высокой нестабильностью экспериментального объекта, поэтому корректно провели фоновое исследование поведенческой активности, которое мы сделали за один

день до начала введения, на основании полученных результатов провели формирование групп для снижения погрешности.

Для всех данных применена описательная статистика. Для определения значимости межгрупповых различий данные проанализированы тестом Манн-Уитни (U-test) для непараметрических данных. Для данных с нормальным распределением межгрупповое сравнение проводили с использованием t-критерия Стьюдента (t-test) для множественного сравнения. Анализ выполнен для каждого пола отдельно. Статистическую обработку результатов исследования выполняли с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010. Полученные данные обработаны статистически стандартными параметрическими методами с вычислением среднего арифметического (M), стандартного отклонения (SD), доверительного интервала по Стьюденту при критическом уровне значимости $p = 0,05$. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое значение, m — доверительный интервал.

Результаты

Лишайники из рода кладонии (*Cladonia*) — лекарственное растение, используемое в народной медицине для лечения многих заболеваний. В гифах лишайников обнаружен полисахарид лихенин, называемый еще лишайниковым крахмалом, количество которого доходит до 50 % на сухое вещество. При его гидролизе образуется 98–99 % D-глюкозы, остатки которой связаны в лихенине двояким образом — 73 % β -гликозидными связями между 1-м и 4-м и 27 % β -гликозидными связями между 1-м и 3-м углеродными атомами [3]. Синтез лихенина в лабораторных условиях еще не осуществлен. Организм человека лихенин не усваивает, северными оленями он усваивается благодаря гидролизу бактериями, находящимися в пищеварительном канале. β -полисахариды выстилают гифы лишайников, образуя трехмерную матрицу, в ячейках которой практически в «иммобилизованном» виде находятся другие биологически активные вещества (БАВ). Применение механохимической активации разрушает корковый слой, сформированный плотным сплетением грибных гиф, между которыми расположены клетки фикобионта, альгальная зона, гонидиальный слой, где и находится основная часть БАВ, например, широкий спектр метаболитов, обладающих антибактериальным действием [1, 3]. В результате такого биотехнологического воздействия происходит разрушение части прочных β -гликозидных связей с получением β -олигосахаридных молекул и деиммобилизацией других групп лишайниковых БАВ [9].

Анализ водорастворимых углеводов по методу «восстанавливающих концов» в экстрактах слоевищ лишайников рода *Cladonia* после грубого измельчения либо механохимической активации подтвердил факт частичной декструкции β -гликозидных связей в лишайниковых β -полисахаридах с образованием β -олигосахаридных молекул при механохимической

активации. Содержание легкогидролизуемых углеводов в пробах лишайника рода *Cladonia* увеличилось в 8 раз после его механоактивации и составило 33,48 мг/г сухого механоактивированного сырья и 4,61 мг/г сухого образца грубого помола на миксере KMS-50 до механоактивации.

Сорбционная суточная емкость у образца «Ягель порошкообразный ультрадисперсный» составила 48,0 мг/г по органическому веществу на примере метиленового синего — аналога, в том числе эндотоксинов малой и средней молекулярной массы — интермедиатов воспалительных процессов любой этиологии, к которым, в частности, относятся токсины пептидно-белкового происхождения. Следует отметить, что это очень высокие показатели по сравнению с известными адсорбентами, такими как полифепан и глина белая, адсорбционная емкость которых по метиленовому синему составляет 10,0 и 11,4 мг/г соответственно [4, 6].

Скорость адсорбции также выше у механоактивированного препарата «Ягель порошкообразный ультрадисперсный»: в первые 20 минут адсорбция составила 92 % его суточной адсорбционной емкости, в отличие от ягеля грубого помола, где за этот же промежуток времени адсорбционная емкость была в 2 раза ниже, чем у механоактивированного образца и составила лишь 69 % суточной активности.

Высокую сорбционную способность *in vivo* доказали на примере связывания «токсина усталости» — молочной кислоты (табл. 1), снижение уровня ее накопления в крови животных достигает 25 %.

Таблица 1
Содержание лактата в крови животных

Вводимый биопрепарат	Лактат, ммоль/л	
	30 день	45 день
Контроль	11,2 \pm 0,4	13,9 \pm 0,7
Порошок ягеля грубого помола	9,2 \pm 0,5	12,6 \pm 0,7
Ягель порошкообразный ультрадисперсный	8,4 \pm 0,4	11,4 \pm 1,3

Обсуждение результатов

Анализ результатов в тесте «Плавание» экспериментальных животных выявил статистически значимое увеличение времени плавания в 3 и 4 раза на 30-е и 45-е сутки соответственно в группе, получавшей биокомплекс «ягель : родиола» механоактивированный относительно остальных исследуемых групп (рис. 1). Что свидетельствует об адаптогенных пролонгированных во времени свойствах биокомплекса в условиях повышенных физических нагрузок.

На 30-е сутки исследования небольшое увеличение времени плавания проявилось и у группы животных, принимавших смесь «ягель : родиола», что можно объяснить низкой биодоступностью ДВ лекарственного растения.

Наблюдения в тесте «AutoTrack» были разделены на две группы: «Двигательная активность» — прой-

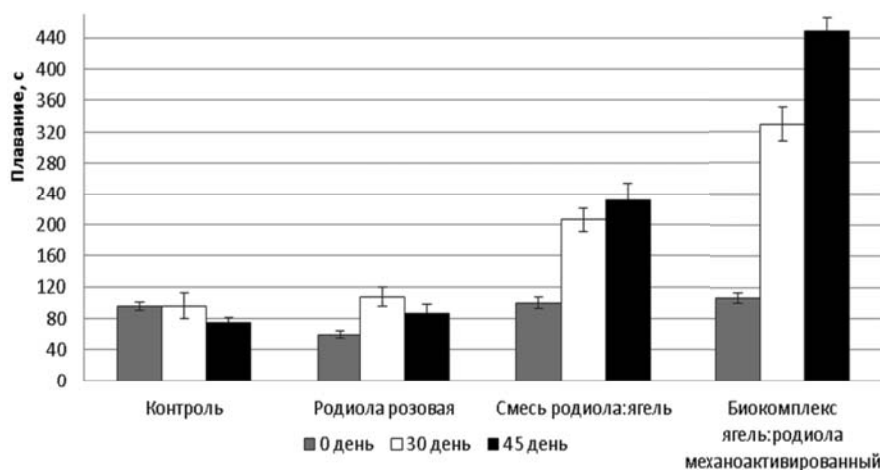


Рис. 1. Динамика изменения времени плавания животных

денное расстояние (рис. 2) и «Исследовательская активность» — количество стоек (табл. 2).

Таблица 2

Исследовательская активность (количество стоек) животных

День	Контроль № 1 (n=15)	Родиола розовая официальная — контроль № 2 (n=15)	Родиола и ягель в пропорции 1:10	
			Смесь грубо-измельченная (n=15)	Биокомплекс механоактивированный (n=15)
0	24,5±2,1	17,3±2,5	24,8±1,2	26,8±3,5
30	25,5±2,8	21,7±3,8	23,6±2,7	28,8±1,5
45	18,7±1,3	12,5±3,0	22,2±3,5	36,2±3,2

Физическая работоспособность в тесте «Двигательная активность» определялась путем выполнения предельной нагрузки. Предельной нагрузкой считался «бег до отказа», показателем отказа являлась неспособность животного продолжать бег против движущейся ленты, несмотря на электростимуляцию. Вся совокупность «AutoTrack» тестов характеризу-

ет целостное поведение, оценивающее действие на центральную нервную систему.

Анализ результатов показал, что на 45-й день тестирования в группе, получавших биокомплекс «ягель : родиола», обнаружено статистически значимое увеличение двигательной активности в 2,5 раза относительно всех тестируемых групп.

Важным показателем в исследовательской активности (эмоционально-стрессорная переносимость) является параметр «количество стоек» в тесте «AutoTrack». Количество стоек характеризует изменения эмоционально-стрессорного состояния экспериментального объекта. Увеличение параметра указывает на большую социальную заинтересованность объекта, адаптивность к окружающим объектам, увеличение поисковой активности. Снижение показателя — противоположный результат, скованность, низкая адаптация к условиям окружающей среды. Эти данные согласуются с классическими представлениями о том, что поисковая активность способствует успешному выходу из стрессовой ситуации.

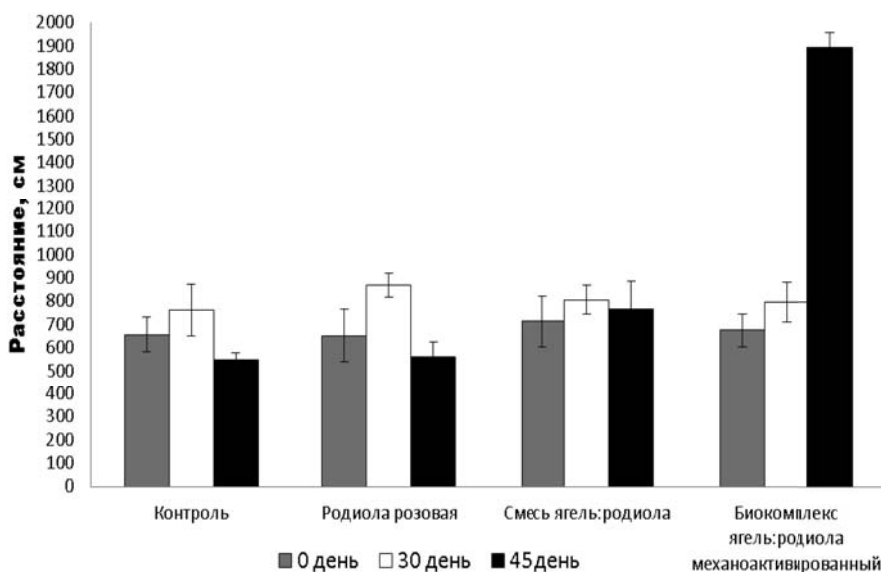


Рис. 2. Динамика изменения двигательной активности животных

Исследование выявило, что в контрольной группе есть тенденция к уменьшению количества стоек на 45-й день исследования.

В группе, принимавшей чистый препарат родиола розовая можно увидеть увеличение количества стоек на 30-й день исследования с последующим их снижением к 45-му дню. Что можно объяснить повышением адаптивного потенциала на короткий срок с последующей истощенностью ресурсов организма. В группе, принимавшей смесь «ягель : родиола» заметна небольшая тенденция к снижению результатов на 30-й и последующий 45-й день.

Анализ результатов показал, что на 30-й и 45-й день тестирования в группе, получавшей биоконкомплекс «ягель : родиола», обнаружено статистически значимое увеличение исследовательской активности относительно остальных исследуемых групп.

На наш взгляд, объяснением физиологической активности биопрепарата может служить эффект комплексообразования ДВ (например, салидрозид родиолы розовой) с активным наполнителем (рис. 3). В нашем случае спектр фармакологической активности наполнителя дополнен детоксикационной функцией, будучи активным сорбентом, он одновременно элиминирует из организма «токсин усталости» — молочную кислоту (см. табл. 1).

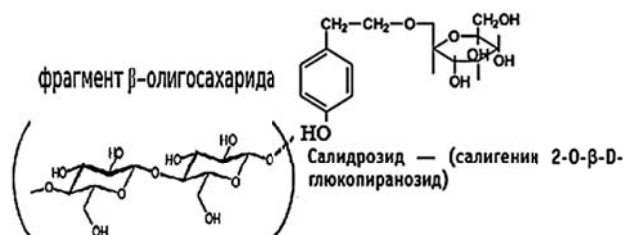


Рис. 3. Схема межмолекулярных взаимодействий салидрозид и β-олигосахарида

Присутствие природных БАВ (лишайниковые кислоты мягкого антибактериального действия, витамины, микроэлементы) в результате деиммобилизации из β-полисахаридного каркаса не ухудшает его сорбционных и комплексообразующих качеств. Вместе с тем они придают ему дополнительные лечебно-профилактические свойства.

Бактерицидное действие лишайниковых кислот также способствует формированию здоровой микрофлоры за счет лизиса патогенных и условно-патогенных бактериальных клеток и сорбции (выведения из организма) продуктов их жизнедеятельности. Известно, что лихестериновая кислота и ее производные активны в отношении различных видов стафилококка. Протолихестериновая кислота в опытах *in vitro* обладала ингибирующим действием на 5-липоксигеназу. Эта активность была изучена на культуре клеток человека, включающих три злокачественных клеточных штамма в сравнении с нормальными фибробластами кожи и периферическими кровяными лимфоцитами. Протолихестериновая кислота вызывала значительное

снижение синтеза ДНК во всех трех злокачественных штаммах. Средняя эффективная доза составила от 1,1 до 24,6 мкг/мл. Напротив, синтез ДНК, пролиферация и выживаемость нормальных фибробластов кожи не подвергались действию в дозах до 20 мкг/мл. Имеются сведения о действии этой кислоты в опытах *in vitro* в отношении *Helicobacter pylori*. Минимальная ингибирующая концентрация лежит в пределах 16–64 мкг/мл [7].

Доказано, что биопрепараты на основе лишайникового сырья, основным активным веществом которых являются лишайниковые амино-β-олигосахариды, обладают выраженной адсорбционной и детоксикационной активностью по отношению к средне- и низкомолекулярным токсинам и солям тяжелых металлов.

Твердофазный биоконкомплекс, полученный механохимической активацией растительных субстанций: слоевищ лишайников (*Cladonia*) и корней, корневищ родиолы розовой (*Rhodiolarosea*, сем. *Crassulaceae*) в массовом соотношении 10 : 1, обладает повышенным в 2,5–3 раза адаптогенным действием при снижении дозы лекарственного растения в 10 раз за счет эффекта комплексообразования ДВ и детоксикационной функции наполнителя — элиминации молочной кислоты.

Созданный механохимический биоконкомплекс может быть использован в качестве лечебно-профилактического средства для повышения физической активности, выносливости, ускорения восстановления после физической нагрузки людей, ведущих активный образ жизни или проживающих в неблагоприятных экологических условиях.

Список литературы

1. Аньшакова В. В. Биотехнологическая механохимическая переработка лишайников рода *Cladonia*. М. : Изд. дом Академии Естествознания, 2013. 116 с.
2. Аньшакова В. В., Кершенгольц Б. М., Шарина А. С., Каратаева Е. В. Способ получения сорбционного материала из слоевищ лишайников : пат. 2464997 Рос. Федерации. 2011. С. 1.
3. Дембицкий В. М., Толстиков Г. А. Органические метаболиты лишайников. Новосибирск : Изд-во «Гео», 2005. 135 с.
4. Маркелов Д. А., Ницак О. В., Геращенко И. И. Сравнительное изучение адсорбционной активности медицинских сорбентов // Химико-фармацевтический журнал. 2008. № 7. Т. 42. С. 30–33.
5. МУК 2.3.2.721-98. Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище. М., 1999. 88 с.
6. Решетников В. И. Оценка адсорбционной способности энтеросорбентов и их лекарственных форм // Химико-фармацевтический журнал. 2003. № 5. Т. 37. С. 28–32.
7. Сафонова М. Ю., Саканян Е. И., Лесновская Е. Е. *Cetrariaislandica* (L.) Ach.: химический состав и перспективы применения в медицине // Растительные ресурсы. 1999. № 2. Т. 35. С. 106–115.
8. Ягель порошкообразный ультрадисперсный: свид. № RU.77.99.11.003.E.003705.05.13. 2013.

9. Anshakova V. The mechanochemical technology for producing of biocomplexes based on lichen material // Russian Journal of Biopharmaceuticals. 2011. N 5. P. 33–42.

10. URL:<http://community.sk.ru/net/1110005/> (дата обращения: 18.07.2014).

References

1. Anshakova V. V. *Biotehnologicheskaya mekhanicheskaya pererabotka lishaynikov roda Cladonia* [Biotechnological mechanochemical processing of lichen genus Cladonia]. Moscow, Akademii Estestvoznaniia Publ., 2013, 116 p.

2. Anshakova V. V., Kershengol'c B. M., Sharina A. S., Karataeva E. V. *Sposob polucheniia sorbcionnogo materiala iz sloevishh lishainikov* [A method of producing a sorptive material from lichen thalli], pat. 2464997 Ros. Federatsii, 2011, p. 1.

3. Dembickiy V. M., Tolstikov G. A. *Organicheskie metabolity lishainikov* [Organic lichen metabolites]. Novosibirsk, Geo Publ., 2005, 135 p.

4. Markelov D. A., Nicak O. V., Gerashhenko I. I. A comparative study of adsorptive activity of medical sorbents. *Himiko-farmaceuticheskii zhurnal* [Chemical Pharmaceutical Journal]. 2008, 42 (7), pp. 30-33. [in Russian]

5. MUK 2.3.2.721-98. *Opredelenie bezopasnosti i effektivnosti biologicheskii aktivnykh dobavok k pishhe*

[Determination of the safety and efficacy of biologically active food supplements]. Moscow, 1999, 88 p.

6. Reshetnikov V. I. Evaluation adsorption capacity of enterosorbents and their dosage forms. *Himiko-farmaceuticheskii zhurnal* [Chemical Pharmaceutical Journal]. 2003, 37 (5), pp. 28-32. [in Russian]

7. Safonova M. Yu., Sakanian E. I., Lesnovskaya E. E. *Cetraria islandica* (L.) Ach.: chemical composition and prospects of medical uses. *Rastitel'nye resursy* [Plant resources]. 1999, 35 (2), pp. 106-115. [in Russian]

8. *Yagel' poroshkoobraznyi ul'tradispersnyi* [Lichen ultrafine powdered], svid. no RU.77.99.11.003.E.003705.05.13. 2013.

9. Anshakova V. The mechanochemical technology for producing of biocomplexes based on lichen material. *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2011, 5, pp. 33-42.

10. URL:<http://community.sk.ru/net/1110005/> (accessed 18 July 2014).

Контактная информация:

Аньшакова Вера Владимировна — кандидат педагогических наук, доцент, зав. учебно-научно-технологической лабораторией «Механохимические биотехнологии» Института естественных наук ФГАОУ ВПО «Северо-Восточный федеральный университет имени М. К. Аммосова» (СВФУ)

Адрес: 677000, г. Якутск, ул. Кулаковского, д. 46

E-mail: anshakova_v@mail.ru