

Сведения об авторах

Е.Э. Нурмамедова* - студент фармацевтического факультета

Д.А. Ключева - студент фармацевтического факультета

А.Л. Петров - кандидат фармацевтических наук, доцент

Information about the authors

E.E. Nurmamedova* - Student of Pharmacy Faculty

D.A. Klyueva - Student of Pharmacy Faculty

A.L. Petrov - Candidate of Sciences (Pharmacy), Associate Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

lena.nurmamedova17@mail.ru

УДК: 615.076-7

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ТРУТОВИКА БЕРЕЗОВОГО

Комлач Инесса Александровна, Горбачевич Глеб Иванович

Кафедра фармацевтической химии

Белорусский государственный медицинский университет

Минск, Республика Беларусь

Аннотация

Введение. В работе представлены результаты исследования антиоксидантной и антимикробной активности фракций различной полярности, полученных из водно-спиртового сухого экстракта трутовика березового. В качестве образцов сравнения использовались фракции различной полярности, полученные из водно-спиртового сухого экстракта чаги. **Цель исследования** – получение фракций водно-спиртового экстракта трутовика березового разной полярности и изучение их антиоксидантной и антимикробной активности. **Материал и методы.** Общее содержание фенольных соединений определяли с использованием реактива Фолина-Чокальтеу. С помощью спектрофотометрического метода установили радикал-ингибирующую активность на моделях DPPH и ABTS. Ингибирующую активность экстрактов в отношении оксида азота (II) определяли путем спектрофотометрического определения концентрации NO, сгенерированного в растворе натрия нитропруссиде. Исследование Fe (II)- и Cu (II)-хелатирующей активности, основанной на способности биологически активных веществ экстрактов связывать ионы металлов в стабильные комплексы, определяли фотометрически. Антимикробную активность 1 % фракций чаги и трутовика березового исследовали методом диффузии в агар. **Результаты.** В проведенных тестах трутовик березовый не показал выраженной антиоксидантной активности. Выявлено, что *P. betulinus* проявляет антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*, незначительно в отношении *Candida albicans*. **Выводы.** Высокий уровень антимикробной активности малополярных фракций экстракта *P. Betulinus* в отношении *Staphylococcus aureus* ($2,1 \pm 0,4$ мм), и *Bacillus subtilis* ($3,4 \pm 0,4$ мм) открывает перспективы для разработки очищенных лекарственных препаратов этого гриба с высоким содержанием действующих веществ, а также целенаправленной разработки технологии их выделения. **Ключевые слова:** трутовик березовый, водно-спиртовой экстракт, антимикробная, антиоксидантная активность.

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PIPTOPORUS BETULINUS

Komlach Inessa Alexandrovna, Harbatsevich Hleb Ivanovich

Department of Pharmaceutical Chemistry

Belarusian State Medical University

Minsk, Republic of Belarus

Abstract

Introduction. The paper presents the results of a study of the antioxidant and antimicrobial activity of fractions of different polarities obtained from an aqueous alcohol dry extract of *Piptoporus betulinus*. Fractions of different polarities obtained from water-alcohol dry extract of chaga were used as comparison samples. **The aim of the study** was to obtain fractions of water-alcohol extract of *Piptoporus betulinus* of different polarities and to study their antioxidant and antimicrobial activity. **Material and methods.** The total content of phenolic compounds was determined using the Folin-Chocalteu reagent. Using the spectrophotometric method, radical inhibitory activity was established on the DPPH and ABTS models. The inhibitory activity of the extracts with respect to nitric oxide (II) was determined by spectrophotometric determination of the concentration of NO generated in a sodium nitroprusside solution. The study of Fe (II)- and Cu (II)-chelating activity based on the ability of biologically active substances of extracts to bind metal ions into stable complexes was determined photometrically. The antimicrobial activity of 1% of the fractions of chaga and *Piptoporus betulinus* was studied by diffusion into agar. **Results.** In the tests conducted, *Piptoporus betulinus* did not show pronounced antioxidant activity. It was revealed that, *Piptoporus betulinus* exhibits antimicrobial activity against

Staphylococcus aureus and *Bacillus subtilis*, slightly against *Candida albicans*. **Conclusion.** High level of antimicrobial activity of low-polar fractions of *P. betulinus* in relation to *Staphylococcus aureus* (2.1 ± 0.4 mm), and *Bacillus subtilis* (3.4 ± 0.4 mm) opens up prospects for the development of purified medicines of this fungus with a high content of active substances, as well as the targeted development of technology for their isolation.

Keywords: *Piptoporus betulinus*, water-alcohol extract, antimicrobial, antioxidant activity.

ВВЕДЕНИЕ

Высшие базидиальные грибы на протяжении веков использовались в народной медицине во всем мире. Одним из таких грибов является трутовик березовый или берёзовая губка (*Piptoporus betulinus*), вызывающий бурую гниль древесины. Самые ранние доказательства применения *P. betulinus* человеком отмечены 5300 лет назад [1]. Настой из плодовых тел трутовика березового пользовался популярностью, особенно в России, странах Балтии, Венгрии, Румынии благодаря своим питательным и успокаивающим свойствам. Грибной чай использовался против различных типов рака, как иммуностимулирующее, противопаразитарное средство и средство от желудочно-кишечных расстройств. На раны накладывали антисептические повязки, приготовленные из свежих плодовых тел *P. betulinus*, а порошок, полученный из высушенных плодовых тел, использовали в качестве обезболивающего средства [2].

P. betulinus является богатым источником биологически активных соединений [3]. Своими антиоксидантными свойствами он обязан наличию β -каротина, ликопина, токоферолов, аскорбиновой кислоты и ряда соединений из группы флавоноидов и полифенолов. В свою очередь, противовоспалительные свойства могут быть связаны с наличием бетулиновой кислоты, бетулина, полипоровых кислот и лупеола. Эти соединения также обладают противораковой активностью, аналогичной α -(1 $\rightarrow$ 3) и β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-глюканам, а также производным эргостерина и индола, выделенным из экстракта *P. betulinus*.

В связи со стремительным развитием резистентности микроорганизмов к различным классам антибиотиков, ведется поиск альтернативных антимикробных агентов и препаратов природного происхождения. В этом контексте растет интерес к исследованию трутовика березового, который обладает широким спектром фармакологической активности и относительно низким уровнем токсичности экстрактов [4].

Цель исследования – получение фракций водно-спиртового экстракта трутовика березового разной полярности и изучение их антиоксидантной и антимикробной активности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись экстракты, полученные из плодовых тел *P. betulinus* (субстрат – береза пушистая), собранных в окрестностях д. Дукора, Пуховичского района, Минской области Республики Беларусь, а также выделенные из них фракции различной полярности. Для получения сухих водно-спиртовых экстрактов использовался метод циркуляционной экстракции по Сокслету. Плодовые тела трутовика березового экстрагировали 12 часов 70% (об/об) этиловым спиртом. Полученный экстракт упаривали в вакууме (40-50°C) на ротационном испарителе и высушивали в вакуумном эксикаторе до содержания влаги не более 5%. Готовый продукт хранили в герметично закрытой таре в холодильнике для дальнейшего использования. Для изучения антиоксидантной и антимикробной активности экстракты подвергали фракционированию. Для этого 1 г сухого экстракта диспергировали в 50 мл воды, а затем последовательно взбалтывали 5 порциями по 40 мл петролейного эфира (ПЭ), хлороформа (ХЛ), этилацетата (ЭА). Оставшийся раствор фильтровали: фильтрат представлял собой водную фракцию (H₂O), а осадок растворяли в 96% (об/об) этиловом спирте (EtOH-фракция). Содовый экстракт – выделение суммы тритерпеновых кислот. Для его получения измельченное сырье смешивали с 5% водным раствором NaHCO₃, выдерживали при температуре 50°C, после чего фильтровали. Затем добавляли HCl, отделяли осадок. Органические фракции отделяли, обезвоживали безводным натрием сульфатом и отгоняли растворитель под вакуумом.

Общее содержание фенольных соединений (TPC) определяли с использованием реактива Фолина-Чокальтеу. С помощью спектрофотометрического метода установили

радикал-ингибирующую активность экстрактов и их фракций на моделях DPPH и ABTS. Ингибирующую активность экстрактов в отношении оксида азота (II) определяли путем спектрофотометрического определения концентрации NO, сгенерированного в растворе натрия нитропрусида. Расчеты концентрации фракции, необходимой для полумаксимальной деградации (IC50 мкг/мл), проводили в программе Microsoft Excel. Исследование Fe (II)- и Cu (II)-хелатирующей активности, основанной на способности биологически активных веществ экстрактов связывать ионы металлов в стабильные комплексы, определяли фотометрически. Антимикробную активность 1 % фракций чаги и трутовика березового исследовали методом диффузии в агар (диффузно-луночным методом) в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus* ATCC 15442, *Bacillus subtilis* 26 D), грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6538) и дрожжевых грибах (*Candida albicans* ATCC 14053). Учет результатов проводили путем измерения диаметра зоны ингибирования роста вокруг лунок в миллиметрах (мм).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Общее содержание фенолов определяли с использованием реагента Фолина-Чокальтеу в пересчете на эквивалент галловой кислоты (GAE) в мг/г экстракта. Содержание фенольных веществ оценено с учетом калибровочной кривой галловой кислоты и выражено в эквивалентах GAE на грамм массы сухого экстракта (табл. 1).

Таблица 1.

Сравнительная характеристика теста ТРС для фракционированных экстрактов *Piptoporus betulinus* и *Inonotus obliquus*

Фракция	ТРС, мг/г (в пересчете на галловую кислоту)
<i>Piptoporus betulinus</i> ПЭ	17,42±0,87
<i>Piptoporus betulinus</i> ХЛ	15,21±0,76
<i>Piptoporus betulinus</i> ЭА	36,30±1,82
<i>Piptoporus betulinus</i> H ₂ O	46,70±2,34
<i>Piptoporus betulinus</i> EtOH	67,29±3,36
<i>Inonotus obliquus</i> ПЭ	25,18±1,26
<i>Inonotus obliquus</i> H ₂ O	19,48±0,97
<i>Inonotus obliquus</i> ЭА	93,37±4,67
<i>Inonotus obliquus</i> EtOH	105,48±5,27

Примечание: ТРС – общее содержание фенольных соединений, ПЭ – петролейный эфир, ХЛ – хлороформ, ЭА – этилацетат, H₂O – вода, EtOH – этанол

Согласно результатам теста ТРС, спиртовая фракция чаги, которая традиционной используется как мощный антиоксидант, характеризуется в 1,5 раза большим содержанием фенолов (105,48±5,27 мг/г), чем соответствующая фракция трутовика березового.

При DPPH и ABTS-скрининге установлено, что трутовик березовый не обладает выраженной способностью ингибировать свободные радикалы (IC50 для этанольной фракции составил 88,56±4,43 мкг/мл и 102,69±5,13 мкг/мл соответственно) (рис. 1). Важно отметить, что спиртовая фракция *Inonotus obliquus* проявляют примерно в 1,4 раз большую ингибирующую активность в отношении радикалов хромогена DPPH по сравнению с соответствующей фракцией *P. betulinus*.

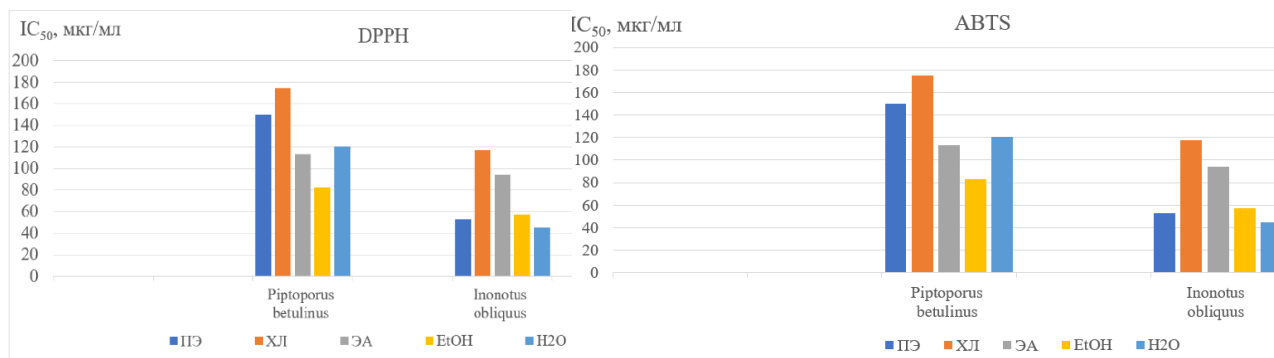


Рис. 1 – Анализ радикал-ингибирующей активности с помощью DPPH и ABTS тестов

Результаты исследования ингибирования NO-радикала для *P. betulinus* показали низкую активность ($IC_{50} = 22,90 \pm 1,15$ мкг/мл), что в 3,4 раза ниже по сравнению с чагой ($79,52 \pm 3,98$ мкг/мл). Обнаружено, что трутовик березовый демонстрирует незначительную способность связывать Fe^{2+} (для спиртовой фракции – $31,92 \pm 1,60$ мг*эквивалент ЭДТА/г). Хелатирующая активность трутовика березового и чаги в отношении Cu^{2+} сопоставимы ($52,45 \pm 2,62$ мг/г и $58,06 \pm 2,90$ мг/г соответственно).

Результаты испытания на антимикробную активность методом диффузии в агар представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2.

Результаты измерения диаметра зон для трутовика березового

Фракция/микроорганизм	ПЭ	ХЛ	ЭА	EtOH	Сумма тритерпеновых кислот
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 15442	-	2,1±0,4 мм	1,2±0,5 мм	1,2±0,5 мм	2,4±0,3 мм
<i>Bacillus subtilis</i> 26 D	-	3,4±0,4 мм	1,2±0,4 мм	3,2±0,6 мм	3,3±0,2 мм
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 6538	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	-	1,5±0,3 мм	-	-	-

Таблица 3.

Результаты измерения диаметра зон для чаги

Фракция/микроорганизм	ПЭ	ХЛ	ЭА	EtOH	H ₂ O
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 15442	-	0,8±0,1 мм	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> 26 D	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 6538	0,9±0,1 мм	0,5±0,1 мм	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	-	-	-	-	-

ОБСУЖДЕНИЕ

Трутовик берёзовый обладает высокой антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC15442 и *Bacillus subtilis* 26 D, а также способен ингибировать рост дрожжевого гриба *Candida albicans* ATCC 14053. При этом антимикробная активность более выражена для штамма *Bacillus subtilis* 26 D (табл. 2). Наибольшие зоны ингибирования наблюдаются для неполярных фракций: так, диаметры зон ингибирования *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis* фракциями ХЛ составляют 2,1±0,4 мм и 3,4±0,5 мм соответственно. Это связано с содержанием в данных фракциях антимикробных агентов, таких как тритерпеновые кислоты ланостанового ряда (полипореновые кислоты А и С, 3β-ацетокси-16α-гидрокси-24-оксо-5α-ланоста-8-ен-21-овая кислота [5]). Высокий уровень активности проявляет также сумма тритерпеновых кислот трутовика березового

($2,4 \pm 0,3$ мм и $3,3 \pm 0,2$ мм соответственно). Умеренную активность демонстрируют спиртовая и этилацетатная фракции ($1,2 \pm 0,5$ мм, $3,2 \pm 0,6$ мм для *Bacillus subtilis*), что определяется присутствием в их составе фенольных соединений ((Е)-2-(4-гидрокси-3-метил-2-бутенил)-гидрохинон, сиригиновая кислота, 3,4-дигидрофенилуксусная кислота) и смолистых веществ. Водный остаток, полученный после последовательного фракционирования органическими растворителями и содержащий преимущественно полисахариды [6] не проявляет заметной антимикробной активности. Антимикробная активность в отношении *Candida albicans* составляет $1,5 \pm 0,3$ мм хлороформным экстрактом. Исследуемые грибы не проявляют антимикробной активности в отношении грамотрицательных *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Следует отметить, что у чаги противомикробная активность в отношении грамотрицательных бактерий проявлялась лучше, чем в отношении грамположительных.

По сравнению с *P. betulinus*, способность ингибировать рост микроорганизмов у чаги слабо выражена (для хлороформной фракции в отношении *Pseudomonas aeruginosa* $0,5 \pm 0,1$ мм).

ВЫВОДЫ

1. В проведенных тестах трутовик березовый не показал выраженной антиоксидантной активности.

2. Выявлено, что *P. betulinus* проявляет антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*, незначительно в отношении *Candida albicans*.

3. Антимикробная активность трутовика березового предположительно связана с присутствием тритерпеновых кислот. Высокий уровень антимикробной активности малополярных фракций экстракта *P. betulinus* в отношении *Staphylococcus aureus* ($2,1 \pm 0,4$ мм), и *Bacillus subtilis* ($3,4 \pm 0,4$ мм) открывает перспективы для разработки очищенных лекарственных препаратов этого гриба с высоким содержанием действующих веществ, а также целенаправленной разработки технологии их выделения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Alresly, Zeyad. Chemical and Pharmacological Investigations of Fomitopsis betulina (formerly: Piptoporus betulinus) and Calvatia gigantea / Zeyad Alresly // Inaugural dissertation. – Greifswald, 2019. – 241 p.
2. K. Sułkowska-Ziaja, A. Szewczyk. Chemical composition and biological activity of extracts from fruiting bodies and mycelial cultures of Fomitopsis betulina / Sułkowska-Ziaja K., Szewczyk A. // Molecular Biology Reports. – 2018. – Vol. 45. – P. 2535–2544.
3. K. Sułkowska-Ziaja, P. Motyl, B. Muszyńska.. Piptoporus betulinus (Bull.) / Sułkowska-Ziaja K., Motyl P., Muszyńska B. A. // A rich source of biologically active compounds. – 2015. – Vol. 16. – P. 89–95.
4. Alresly, Zeyad. Bioactive Triterpenes from the Fungus Piptoporus betulinus / Zeyad Alresly, Ulrike Lindequist [et al.] // Records of natural products. – 2016. – Vol. 10, No 1. – P. 103–108.
5. Kawagishi, Hirokazu. Novel Hydroquinone as a Matrix Metallo-proteinase Inhibitor from the Mushroom, Piptoporus betulinus / Hirokazu Kawagishi // Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. – 2002. – Vol. 66, No 12. – P. 2748–2750.
6. Chemical characterization and wound healing property of a β -D-glucan from edible mushroom Piptoporus betulinus / L.I. de Jesus [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – Vol. 117. – P. 1361–1366

Сведения об авторах

И.А. Комлач* – студент фармацевтического факультета

Г.И. Горбачевич – кандидат химических наук, доцент

Information about the authors

I.A. Komlach* – Student of the Faculty of Pharmacy

H. I. Harbatsevich – Candidate of Chemical Sciences, Associate Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

innakomlac@gmail.com

УДК: 546

ТАРГЕТНЫЙ СИНТЕЗ БАКТЕРИЦИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ГЕРМАНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫХ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГНОЙНО-НЕКРОТИЧЕСКИХ РАН

Корпакова Татьяна Николаевна, Кадомцева Алёна Викторовна, Пискунова Марина Сергеевна
Кафедра общей химии

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России
Нижний Новгород, Россия