

УДК 633.1:(577.16:582.29)

МЕХАНОХИМИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЛИШАЙНИКОВ

© 2011 В.В. Аньшакова¹, Б.М. Кершенгольц², Е.С. Хлебный², А.А. Шеин²

¹Якутский государственный университет им. М.К.Аммосова, г. Якутск

²Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск

Поступила 03.03.2010

Разработана механохимическая технология получения высокоактивных комплексов биологически активных веществ антибиотического действия из слоевищ лишайников, включающая протекание твердофазных химических реакций преобразования как фармакона (лишайниковых кислот), так и расщепления части лишайниковых β -полисахаридов с образованием β -олигосахаридов, без участия растворителей в одну технологическую стадию. Далее фармакон образует с β -олигосахаридами наноразмерные клатратные комплексы, благодаря образованию которых, по-видимому, резко повышается их биодоступность и биоактивность. Это выгодно отличает технологичность предлагаемого подхода и свойства полученных биокомплексов от аналогов, произведенных с использованием классических технологий. По-видимому, в определенной степени, данные клатраты сохраняются и в жидкой фазе, что и приводит к резкому повышению антибиотической активности фармакона в наноразмерном комплексе с лишайниковыми β -олигосахаридами препарата «Ягель-М».

Ключевые слова: механохимия, биологически активные вещества, лишайники, нанобиотехнологии

Механохимическая активация является новой рациональной твердофазной технологией нанодиспергирования сухого природного биосырья. Использование данной технологии обработки веществ основывается на физико-химических эффектах, общих для прикладной механохимии – от активации твердых веществ, вследствие разупорядочения и образования дефектов, ускорения диффузионно-затруднённых стадий процессов в твердой фазе, до осуществления твердофазных химических реакций непосредственно в ходе обработки и образования супрамолекулярных наноразмерных частиц. Большая часть биологически активных веществ (БАВ) в растительном сырье связана в комплексы различными связями физической и химической природы и лишь небольшая их часть может находиться в биодоступной форме. Ударно-истирающее воздействие, даже без добавок твердофазных химических реагентов (например, щелочей, 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 с участием образовавшихся активных супрамолекулярных частиц. Результатом успешной реализации механохимической обработки биосырья является увеличение в продукте более полного спектра биоактивных веществ в биологически доступных (водорастворимых) формах без участия растворителей в одну технологическую стадию. Наличие биодоступных форм биологически активных веществ, безусловно, способствует эффективному усвоению препа-

рата, так как существует общая тенденция низкой усвоемости подавляющего большинства витаминно-микроэлементных комплексов, активных веществ (фармаконов) фармпрепаратов, пищевых и кормовых, связанная с большими проблемами при их всасывании в кишечнике. При этом наполнитель чаще всего проявляет пассивную функцию.

Ранее были получены предварительные данные, свидетельствующие о том, что интенсивная механическая активация растительного сырья, повышающая степень диспергирования, сопровождается увеличением выхода и разнообразия состава БАВ [1,2], а также их активацией [3-5]. Однако до сих пор отсутствуют полные научные представления о механизме активации при механообработке растительного сырья. Несмотря на имеющиеся результаты в области механохимической переработки природного растительного сырья, из-за сложности состава выделяемых БАВ требуются более детальные исследования с привлечением комплекса физико-химических и биологических методов.

Целью данной работы являлось изучение возможностей интенсификации процессов выделения комплексов биологически активных веществ из лишайникового сырья с использованием твердофазной механохимической технологии и исследования физико-химических свойств полученного биокомплекса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись слоевища лишайников родов *Cetraria* и *Cladonia*, произрастающие в Республике Саха (Якутия).

Механохимическую активацию проводили в воздушной среде в мельнице-активаторе планетарного типа АГО-2 (разработка Института химии твердого тела и механохимии СО РАН), которая представляет собой машину типа барабанных шаровых мельниц, где воздействие гравита-

Аньшакова Вера Владимировна, канд. педагогич. наук, доц., e-mail: anshakova_v@mail.ru; Кершенгольц Борис Моисеевич, докт. биол. наук, проф., e-mail: kerschen@asrs.ysn.ru; Хлебный Ефим Сергеевич, канд. биол. наук, e-mail: Chicloon@yahoo.ru; Шеин Алексей Анатольевич, канд. биол. наук, e-mail: bg98saa@yandex.ru.

ционного поля на рабочее тело (мелющие шары) заменено центробежной силой. В конструкции мельницы с периодической загрузкой используются два барабана объемом по 100 мл, заполненные в приведенных опытах на 1/3 объема стальными шарами диаметром 8 мм (воздействующие тела), на 1/3 исследуемым веществом (без добавления каких-либо щелочных реагентов) в количестве 20 г и 1/3 приходится на свободное воздушное пространство. Такая загрузка барабана – реактора соответствовала ударно-истирающему режиму работы, обеспечивая максимальное воздействие мелющих тел на объект исследования, при скорости вращения барабанов 1500 об/мин. Во время работы барабаны охлаждали водой для исключения разогрева обрабатываемого материала.

Предварительными опытами было установлено оптимальное время обработки 2-3 мин.

Для исследования структуры полученных наноструктурированных клатратов БАВ, перешедшие в результате механохимической реакции в биодоступную форму, использовали методы ИК-спектроскопии (Perkin Elmer) и атомно-силовой микроскопии (НТ-МТД).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что лишайниковое биосырье является источником природных веществ антибиотического действия (ПВАД) [6-10]. Для химического строения всех лишайниковых кислот характерно наличие двух остатков полизамещенных фенолов или фенолкарбоновых кислот, связанных друг с другом в различных комбинациях.

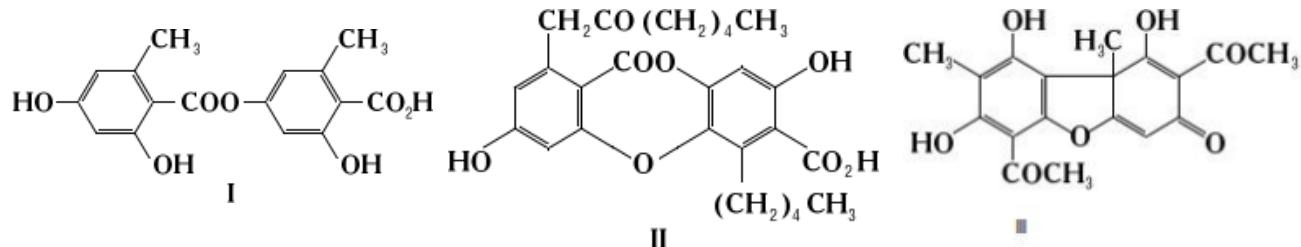


Рис. 1. Простейшие представители лишайниковых кислот: леканоровая (I); физодовая (II); усниновая (III).

Леканоровая кислота относится к структурному типу депсидов, простейший представитель лишайниковых кислот структурного типа депсидонов – антибиотик физодовая кислота. К структурному типу дибензофурана относится широко распространённая в лишайниках усниновая кислота. Использование механохимической стадии в технологическом цикле производства антибактериального препарата из слоевищ лишайников на этапе обработки сухого сырья позволяют выделять более полную группу ПВАД.

Исследование порошка ягеля, полученного твердофазной механохимической технологией без щелочных реагентов в одну стадию без применения растворителей, методом ИК-спектроскопии показало, что характер ИК-спектров в случае всех образцов механохимического ягеля идентичен (рис. 2).

Вместе с тем интенсивность всех наблюдаемых полос поглощения зависит от способа получения образца биопрепарата. Увеличение интенсивности поглощения в области валентных колебаний OH-группы ($3450-3350 \text{ см}^{-1}$) механохимического ягеля свидетельствует о разрыве прочных β -гликозидных связей в исходных нерастворимых полисахаридах, входящих в состав лишайникового сырья, и как следствие, об образовании более биодоступных амино- β -олигосахаридов.

Наличие в ИК-спектре ряда полос ($1670-1630 \text{ см}^{-1}$ – $\text{C}=\text{C}$ связи сопряженных систем; $1200-1270 \text{ см}^{-1}$ – $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ – группы атомов; $1100-1000 \text{ см}^{-1}$ – как пиранозные циклы, так и $-\text{C}-\text{OC}-$ группы атомов; 900 см^{-1} – деформационные коле-

бания С–Н.) характерных для образца усниновой кислоты свидетельствует о её наличии в исследуемом механохимическом образце.



Рис. 2. ИК-спектры образцов ягеля различного помола

Ранее было показано, что полученные природные лишайниковые амино- β -олигосахариды (рис. 3) проявляют себя как комплексообразователи – биодетоксиканты с большой широтой терапевтического индекса, так как способны прочно связывать и легко транспортировать через различные мембранные комплексы экзогенные и эндогенные токсины во внутренних средах организма человека, в том числе эндотоксины малой и средней молекулярной массы, образующиеся при токсикозах беременности, воспалительных процессах любой этиологии, обострениях аллергических со-

стояний и др., а также катионы тяжелых металлов, радионуклидов, токсические альдегиды и кетоны, канцерогены, шлаки [5].

С другой стороны, амино- β -олигосахариды могут проявлять себя как синергетная компонента в комплексе с природными веществами антибиотического действия - с лишайниковых кислотами.

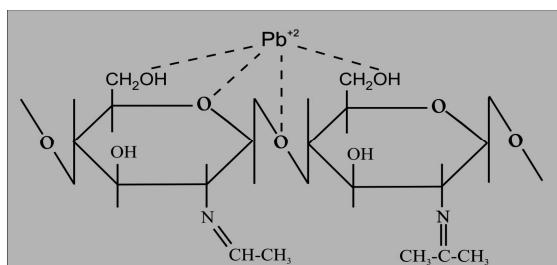


Рис. 3. Строение комплексов лишайниковых β -олигоаминосахаридов со связанными ими токсичными карбонильными соединениями (в виде оснований Шиффа) и катионами тяжелых металлов (на примере ионов свинца Pb^{+2}).

О строении образующихся супрамолекулярных структур, выступающих как самостоятельные биологически активные агенты, можно сказать следующее. Нерастворимые лишайниковые кислоты за счет полярных групп (например, -OH) обеспечивают не только связывание с углеводной

водорастворимой частью – образующимися в результате механохимического процесса β -олигосахаридами (рис. 4), но и способность к самоассоциации и тем самым лучшее связывание в водных растворах, следовательно в живых организмах. При этом углеводсодержащие метаболиты (амино- β -поли- и олигосахариды) слоевища лишайников образуют с ПВАД комплексы, представляющие собой типичные наноструктуры.

Доказано существование эффекта клатрирования в комплексах фармаконов с различными гликозидами [10, 11]. Образование новых наноструктур биоклатратов было зафиксировано в наших экспериментах методом атомно-силовой микроскопии (рис. 5б), в то время как неструктурированная поверхность порошка ягеля грубого помола отличалась отсутствием новых структур – наличием гладкого рельефа (рис. 5а).

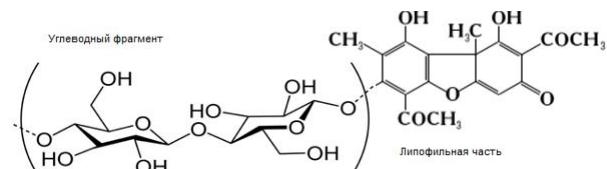


Рис. 4. Схема клатрата усниновой кислоты с β -олигосахаридами

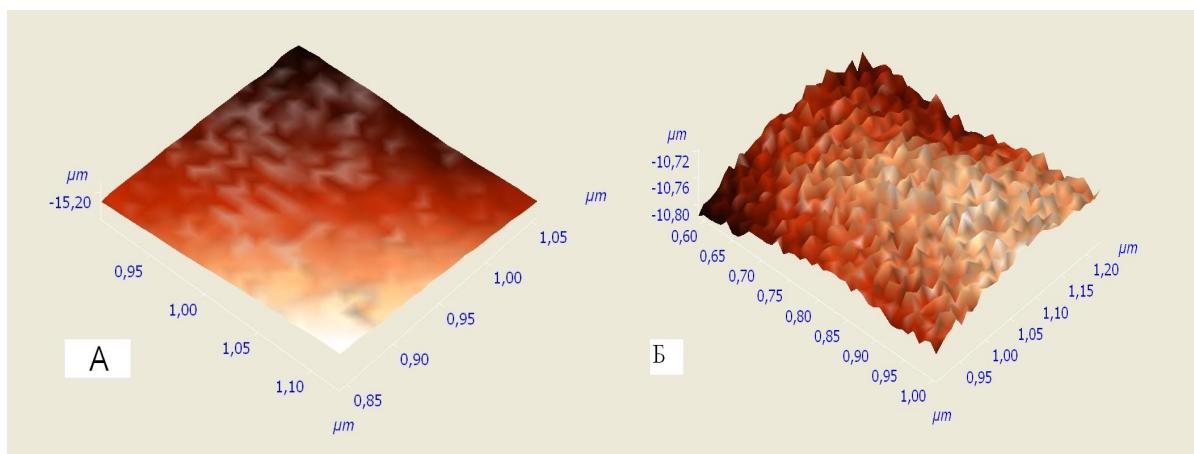


Рис. 5. Структура поверхности порошка ягеля:
а – механического грубого помола, б – механохимического

Таким образом, применение механохимической технологии при обработке лишайникового сырья позволяет получать нанодисперсный порошок ягеля, обладающий уникальным синергетным сочетанием свойств его составляющих. Во-первых, лишайники отличаются большим содержанием слизеобразующих веществ, β -олигосахаридов, обладающих способностью к детоксикации внутренних сред организма и отличными адсорбционными свойствами в качестве матрицы-носителя. Во-вторых, как источник БАВ (комплекс лишайниковых кислот), обладающих уникальными антибактериальными свойствами. Сочетание композитов нанодисперсного порошка

ягеля как матрицы-носителя и как источника БАВ имеет целый ряд преимуществ.

Ранее установлена очень высокая антибиотическая активность механохимических 45% водно-спиртовых экстрактов ягеля (препарат «Ягель-М» [3]) по отношению к восьми штаммам микрофлоры, в том числе условно-патогенной и патогенной (табл.) [3, 4]. Для сравнения исследовалась антибиотическая активность отваров ягеля, которая практически отсутствовала, а также 45%-ного водно-спиртового экстракта механически измельченного ягеля грубого помола. Последний обладал антибиотической активностью в пределах 10% от соответствующей активности препарата «Ягель-М».

Таблица 1. Антибиотические свойства 45%-ных водно-спиртовых экстрактов (рН –7,4) комплекса лишайниковых БАВ, полученных механохимической технологией (разбавление 1:50) по отношению к восьми стандартным штаммам микроорганизмов[4]

Вариант выделения комплекса БАВ	Штаммы микрофлоры							
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>L- E.coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Гемолитическая E.coli</i>	<i>L+m/6+E.coli (E.coli M-17)</i>	<i>Salmonella Enteritidis</i>
Водно-спиртовый экстракт ягеля, предварит обработанного механохимически 2 мин.	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++
Водно-спиртовый экстракт ягеля, предварит обработанного механохимически 3 мин.	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++	++++
Примечание	Очень хорошая чувствительность	---<>---	---<>---	---<>---	Умеренная чувствительность	Очень хорошая чувствительность	---<>---	---<>---

Условные обозначения (зона лизиса от 0,5 до 1,0 см): «++++» микроб лизирован полностью (полная зона просветления); «+++» - микроб лизирован почти полностью; «++» - микроб лизирован частично (на половину); «+» микроб слабо лизируется препаратом; «(+)» - еле заметная попытка к лизису; «->» - микроб нечувствителен к препарату

Предполагалось, что столь высокая антибиотическая активность препарата «Ягель-М» связана с более полной извлекаемостью лишайниковых кислот из ягелевого сырья за счёт перевода их в водорастворимую форму, благодаря проведению механохимической активации в присутствии твёрдой щёлочи натрия. Вместе с тем, расчёт показывает, что даже полное извлечение лишайниковых кислот могло бы дать не более 30-40% наблюдавшегося антибиотического действия. Совокупность вышеизложенных фактов позволяет предположить, что такое резкое повышение антибиотической активности препарата «Ягель-М» связано с тем, что в определенной степени клатраты фармакона (лишайниковых кислот) с лишайниковыми β -олигосахаридами сохраняются и в жидкой фазе, что и приводит к резкому повышению антибиотической активности фармакона в наноразмерном комплексе БАВ препарата «Ягель-М».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение твердофазных механохимических технологий переработки лишайникового сырья без участия растворителей и щелочных реагентов в одну технологическую стадию имеет большие перспективы, поскольку позволяет осуществлять процессы получения твердофазных препаратов самых различных БАВ (витамино-минеральные комплексы, активные вещества антибиотического, цитостатического, иммуномодуляторного и других направлений действия) доступными и экологически чистыми методами, получая при этом конечные продукты – высокоактивные и биодоступные

nanostructured complexes of pharmacological agents with «active» carrier (lichens β-oligosaccharides + lichen acids + lichen acids + lichen acids). Due to this and the fact that the reagent undergoes a sharp increase in the corresponding activity of the pharmacological agent and its bioavailability (absorption). This is a significant advantage of the resulting mechanochemical drugs over analogs produced with the use of classical technologies.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Королёв К.Г., Ломовский О.И., Рожанская О.А., Васильев В.Г. Механохимическое получение водорастворимых форм тритерпеновых кислот // Химия природных соединений. 2003. № 4. С. 295-300.
2. Иванов А.А., Юдина Н.В., Ломовский О.И. Влияние механохимической активации на состав и свойства гуминовых кислот торфов // Известия Томского политехнического университета. 2006. Т. 309, № 5. С. 73-77.
3. Кершенгольц Б.М., Филиппова Г.В., Шашурин М.М. и др. Способ получения препарата «ЯГЕЛЬ-М» для профилактики и лечения туберкулеза // Положительное решение о выдаче патента РФ по заявке № 2007133339/15 от 24.09.2008 (приоритет от 05.09.2007)
4. Филиппова Г.В., Павлов Н.Г., Шашурин М.М., Кершенгольц Б.М. Влияние биологически активных веществ из слоевищ северных лишайников, экстрагированных различными методами, на биологические свойства микробактерий туберкулеза // Сибирский медицинский журнал. 2008. № 3. С.99-103.
5. Кершенгольц Б.М., Ремигайло П.А., Шеин А.А., Кершенгольц Е.Б. Природные биологически активные вещества из тканей растений и животных Якутии: особенности состава, новые технологии, дости-

- жения и перспективы использования в медицине // Дальневосточный медицинский журнал. Приложение № 1, 2004. С.25-29.
6. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири. Новосибирск: Наука, 1991. 431 с.
 7. Витовская М.Л., Виноградова Т.И., Заболотных Н.В., Сафонова М.Ю. Роль ислаетета (экстракта из слоевищ цетрарии исландской) в комплексной терапии экспериментального туберкулеза // Пролемы туберкулеза и болезней легких. 2005. № 11. С. 44-47.
 8. Сафонова М.Ю. Фармакогностическое и фармакологическое изучение слоевищ цетрарии исландской
 - Cetraria islandica (L.) Ach.: Автореф. дис.... канд. фарм.наук. СПБ, 2002. 21 с.
 9. Савич В.П. и др. О новом антибиотике из лишайников - натриевой соли усниновой кислоты // Споровые растения. Ленинград-Москва: АН СССР, 1956. вып.11. с. 5-37.
 10. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Коваленко И.Л. и др. Влияние клатратообразования на активность фармакона в комплексах с глицирризиновой кислотой // Докл. АН. 2004. Т. 394, № 2. С. 707-709.
 11. Толстикова Т.Г., Толстиков А.Г., Толстиков Г.А. На пути к низкодозным лекарствам // Вестник РАН. 2007. Т. 77, № 10. С. 867-874.

MECHANOCHEMICAL TECHNOLOGIES OF PRODUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM LICHENS

© 2011 V.V. Anshakova¹, B.M. Kershengolc², E.S. Khlebnyy², A.A. Shein²

¹Yakut state university, Yakutsk

² Institute of biological problems of permafrost of Siberian branch of RAS, Yakutsk

There was developed mechanochemical technology of production of high active complexes of biologically active substances with antibacterial activity from lichens thalluses. In the technology take place hardphase chemical reactions of transformation farmakon (lichen's acids) and splitting of part of lichen's β -polysaccharides with formation β -oligosaccharides without solvent in the only technological phase. Then farmakon with β -oligosaccharides generate nanodimensional clathrating complexes, forming of which, probably, increase sharply their bioavailability and bioactivity. Namely this let technology of suggesting method and quality of developed biocomplexes to differ favourably from analogs made with use of classical technologies. In certain degree, the clathrates are apparently to be kept in liquid phase. That brings to a great rising of antibacterial farmakon activity in nanodimensional complex with lichen β -oligosaccharides of preparation "Yagel-M".

Keywords: *mechanochemistry, biologically active substances, lichens, nanobiotechnologies*