

УДК 615.322:582.284:547.915].015.4

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПИДНОЙ ФРАКЦИИ ТРУТОВИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*FOMITOPSIS OFFICINALIS* (VILL.) BOND. ET SING.)

©2013 А.Ю. Айрапетова, Е.О. Сергеева, Л.С. Ушакова, С.Г. Тираспольская

Пятигорский медико-фармацевтический институт –  
филиал Волгоградского государственного медицинского университета, г. Пятигорск

Поступила в редакцию 29.04.2013

Была получена липидная фракция плодового тела трутовика лекарственного в количестве 57,6% по отношению к массе сухого сырья, в составе которой обнаружены ненасыщенные жирные кислоты. Изучена ее антиоксидантная активность, которую оценивали по степени уменьшения концентрации комплекса продуктов окисления с тиобарбитуровой кислотой (метод *in vitro*) в опытных образцах по отношению к контрольным. Установлено, что растворы липидной фракции в диметилсульфоксиде обладают способностью ингибировать процессы перекисного окисления липидов. Изучение антиоксидантной активности проводили *in vitro* на модели Fe<sup>2+</sup>-индуцированного перекисного окисления липидов в системе, полученной на основе постъядерной фракции печени.

Ключевые слова: *трутовик лекарственный, липидная фракция, антиоксидантная активность, перекисное окисление липидов, тиобарбитуровая кислота, свободные радикалы*

В организме человека часто наблюдается развитие дисбаланса в системе «прооксиданты-антиоксиданты», возникающего по той или иной причине и приводящего к усилению деструктивных процессов, так называемый «окислительный стресс». Последний является фактором развития многих заболеваний и патофизиологических процессов, таких как воспаление, атеросклероз, канцерогенез, ишемическое поражение тканей, диабет, ревматоидные и дегенеративные заболевания опорно-двигательной системы и др. Известно, что антиоксиданты влияют на процессы свободно-радикального окисления липидов биологических мембран, замедляя или прекращая их. Развитию деструктивных свободно-радикальных процессов в организме препятствует сложная многокомпонентная система антиоксидантной защиты (АОЗ). Поэтому в состоянии физиологического оптимума существует равновесие между уровнем свободно-радикального

окисления и активностью данной системы, которая поддерживает процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) на стационарном, достаточно низком уровне в условиях значительных изменений в образовании свободных радикалов. Различают ферментативное и неферментативное звено АОЗ. Неферментативная АОЗ связана с участием таких соединений, как биогенные элементы, витамины А, С, Е, ненасыщенные жирные кислоты, флавоноиды, стероидные гормоны. Поэтому поиск растительных объектов, содержащих перечисленные группы соединений, практически не обладающих токсическим действием на организм и оказывающих антиоксидантное действие, является актуальным [5]. Современные исследования ученых доказали, что растительные, а не синтетические антиоксиданты помогают организму снижать уровень повреждения тканей, ускорять процесс выздоровления, предотвращать многие сердечно-сосудистые, инфекционные и онкологические заболевания.

Одним из природных объектов является листовенничная губка, или трутовик лекарственный, или белый агарик (*Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bond. et Singer, сем. Polyporaceae). Известно, что плодовое тело гриба, паразитирующего на листовнице, реже пихте накапливает до 80% смолистых веществ кислотного характера, в том числе агарициновую кислоту [4]. В народной медицине более столетия как само измельченное плодовое тело, так отвары и

*Айрапетова Ася Юрьевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии. E-mail: asyarpfga@mail.ru*

*Сергеева Елена Олеговна, кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры биохимии и микробиологии. E-mail: makleayandex.ru*

*Ушакова Любовь Семеновна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии. E-mail: ushakova2002@yandex.ru*

*Тираспольская Светлана Григорьевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии*

настойки трутовика применяют для профилактики онкологических заболеваний. Однако в научной литературе данные о химическом составе и фармакологической активности извлечений из трутовика лекарственного немногочисленны [1].

**Цель исследования:** выделение липидной фракции из плодового тела трутовика лекарственного, изучение ее химического состава и антиоксидантной активности (АОА) по степени уменьшения концентрации комплекса продуктов окисления с тиобарбитуровой кислотой (ТБК).

**Материалы и методы исследования.** Получение липидной фракции из плодового тела трутовика лекарственного проводили путем исчерпывающей экстракции измельченного плодового тела трутовика в аппарате Сокслета смесью растворителей хлороформ-спирт этиловый 1: 2. Полноту экстракции контролировали методом тонкослойной хроматографии по отсутствию характерного пятна агарициновой кислоты. После выделения и очистки из липидной фракции агарициновой кислоты остаток упаривали, высушивали при температуре 40° С до постоянной массы, взвешивали. Проводили определение жирнокислотного состава трутовика методом газовой жидкостной хроматографии [1]. Около 0,1 г липидной фракции трутовика (точная навеска) помещали в колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 1 мл спирта метилового и 3 капли ацетилхлорида и нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 ч. Избыток спирта метилового отгоняли. Остаток растворяли в 0,2 мл гексана. Количественное определение проводили методом внутренней нормализации. Разделение компонентов проводили на газовом хроматографе «Цвет 500» с пламенно-ионизационным детектором. Компоненты идентифицировали по стандартным образцам (Sigma) метиловых эфиров жирных кислот [3].

Антиоксидантное действие исследуемого объекта было изучено *in vitro* на модели Fe<sup>2+</sup>-индуцированного ПОЛ в системе, полученной на основе постъядерной фракции печени (ПФП). Для получения ПФП после декапитации животных (крысы линии Wistar) печень перфузировали холодным 0,125 М раствором калия хлорида, затем быстро извлекали и дополнительно охлаждали 3-5 мин на льду, содержащем 100 мМ трис-НСl буфер (рН 7,4), на котором готовили гомогенат в соотношении 1: 7. Навеску печени продавливали через стеклянный пресс и гомогенизировали со средой выделения на холоде в гомогенизаторе с тефлоновым пестиком 30 секунд. ПФП получали центрифугированием при 600 г в течение 10 мин при 4°С. При изучении

индуцированного (аскорбат-Fe<sup>+2</sup>-зависимого) ПОЛ инкубационная среда содержала 100 мМ трис НСl, рН 7,4, 0,5 мМ аскорбиновой кислоты, 12 мкМ соль Мора. Реакцию проводили на водяной бане при 37°С и определяли уровень продуктов ПОЛ [2]. С этой целью в нулевое время и через 20 минут инкубации отбирали по 0,5 мл суспензии, смешивали на холоде с 1 мл 30% раствора трихлоруксусной кислоты. Полученную смесь центрифугировали при 3 тыс. об/ мин. 15 минут. К надосадочной жидкости добавляли 0,1 мл 5 М раствора кислоты хлористоводородной и 1 мл 0,6% раствора ТБК в 0,5 М сульфате натрия, нагревали на водяной бане 15 минут при 100°С. После охлаждения до комнатной температуры записывали спектр поглощения ТБК-активных продуктов на СФ- LEKI SS 1207UV при длине волны 535 нм и рассчитывали количество ТБК-активных продуктов, используя коэффициент молярной экстинкции МДА – 1,56x10<sup>5</sup>М<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Результаты выражали в нмоль на 1 мг белка в реакционной смеси.

Эффективность антиоксидантного действия оценивали по степени ингибирования интенсивности ПОЛ в ПФП в опытных образцах по отношению к контрольным. В опытные пробы вносили исследуемые объекты в виде растворов в ДМСО в конечной концентрации 100 мкг/мл, 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 3,13 мкг/мл. В контрольные пробы добавляли только растворитель (вода очищенная и ДМСО соответственно). Рассчитывали процент торможения ПОЛ по отношению к контрольной пробе. В качестве критерия оценки АОА рассчитывали значение коэффициента I<sub>50</sub>, который показывает концентрацию вещества в среде инкубации, вызывающую снижение интенсивности ПОЛ на 50%.

**Результаты и обсуждение.** Содержание липидной фракции составило 57,6% по отношению к массе сухого плодового тела трутовика. Установлено, что липидная фракция содержит ненасыщенные жирные кислоты (табл. 1). В таблице 2 представлены данные о влиянии исследуемого образца на накопление ТБК-активных продуктов в следующих конечных концентрациях: 100 мкг/мл, 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 3,13 мкг/мл. Как видно из таблицы 2, липиды трутовика способствуют снижению накопления перекисных соединений по сравнению с контролем. Так, уже в концентрации 6,25 мкг/мл по сравнению с раствором ДМСО отмечено снижение накопления продуктов ПОЛ на 23%. Повышение конечной концентрации исследуемого образца до 100 мкг/мл привело к большему снижению интенсивности ПОЛ – на 63%. Значение коэффициента I<sub>50</sub> для исследуемого объекта составило 70,9 мкг/мл.

**Таблица 1.** Результаты определения жирно-кислотного состава липидной фракции плодового тела трутовика

№ пика	Содержание, %	Числовой символ	Результаты идентификации кислоты
1	0,91		не идентифицирована
2	0,88		не идентифицирована
3	8,65	16:0	пальмитиновая
4	0,99	17:0	маргариновая
5	0,56	18:0	стеариновая
6	41,96	18:1	олеиновая
7	35,77	18:2	линолевая
8	3,51	18:3	линоленовая
9	6,76		не идентифицирована

**Таблица 2.** Влияние липидов трутовика на Fe<sup>2+</sup>-аскорбатиндуцированное ПОЛ в постъядерной фракции печени

Конечная концентрация липидной фракции, мкг/мл	Интенсивность ПОЛ, нмоль МДГ/мг белка липидная фракция, n=3	
	100	1,40±0,088
50	2,30±0,088	-39%
25	2,61±0,180	-31%
12,5	2,76±0,098	-28%
6,25	2,92±0,188	-23%
3,13	3,17±0,330	-16%

Примечание: n – количество проб для каждой концентрации; % - снижение по отношению к контролю

**Выводы:** из плодового тела трутовика лекарственного выделена липидная фракция в количестве 57,6% по отношению к массе сухого сырья, в которой идентифицированы ненасыщенные жирные кислоты. Доказано наличие антиоксидантной активности у липидной фракции трутовика, исследуемой *in vitro*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Айрапетова, А.Ю. Антимикробная и противоожоговая активность липидной фракции трутовика лекарственного *Fomitopsis officinalis* (Vill.) Bond. et Sing. / А.Ю. Айрапетова и др. // Известия Самарского научного центра РАН. 2011. Т. 13, № 1 (4). С. 755-757.
2. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков. – М.: Наука, 1972. 252 с.
3. Международный стандарт ГОСТ 30418-96. Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава. Введ. 1998. 01.01. – Минск.: Издательство стандартов, 1996. 7 с.
4. Патент № 2330676 РФ. Способ получения агарициновой кислоты / А.Ю. Айрапетова, П.А. Цуканова, М.В. Гаврилин, Т.А. Шаталова. – Опубл. 10.08.08. 8 с.
5. Шанин, Ю.Н. Современные антиоксидантные препараты в клинической практике (Обзор) / Ю.Н. Шанин, Б.А. Парамонов, Е.В. Зиновьев // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2003. Т. 34, № 11. С. 11-28.

## STUDYING THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LIPIDIC FRACTION OF TINDER FUNGUS MEDICINAL (*FOMITOPSIS OFFICINALIS* (VILL.) BOND. ET SING. )

©2013 A.Yu. Ayrapetova, E.O. Sergeeva, L.S. Ushakova, S.G. Tiraspol'skaya

Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute –  
Branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk

It was received lipidic fraction of a fruit body of tinder fungus medicinal in number of 57,6% in relation to the mass of dry raw materials as a part of which nonsaturated fatty acids were found. Its antioxidant activity which estimated on extent of reduction the concentration of oxidation products complex with tiobarbituric acid (in vitro method) in test samples in relation to control is studied. It is established that solutions of lipidic fraction in dimethyl sulfoxide possess ability to inhibit processes of lipids peroxidation. Studying the antioxidant activity was carried out in vitro on the model of Fe<sup>2+</sup>-induced lipids peroxidation in system received on the basis of post-nuclear fraction of a liver.

Key words: *tinder fungus medicinal, lipidic fraction, antioxidant activity, lipids peroxidation, tiobarbituric acid, free radicals*

Asiya Ayrapetova, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Department of Pharmaceutical Chemistry. E-mail: asyapfga@mail.ru; Elena Sergeeva, Candidate of Pharmacy, Senior Lecturer at the Department of Biochemistry and Microbiology. E-mail: makleayandex.ru; Lyubov Ushakova, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Department of Pharmaceutical Chemistry. E-mail: uchakova2002@yandex.ru; Svetlana Tiraspol'skaya, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Department of Pharmaceutical Chemistry