

## КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

УДК 615.074

Т.Г. Горностай<sup>1</sup>, В.А. Чхенкели<sup>2</sup>, Т.А. Пензина<sup>1</sup>, М.С. Полякова<sup>1</sup>, Г.Б. Боровский<sup>1</sup>

### ИЗУЧЕНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ И АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ВОДНО-СПИРТОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ПЛОДОВЫХ ТЕЛ И МИЦЕЛИЯ *INONOTUS RHEADES* (PERS.) BONDARTSEV & SINGER

<sup>1</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск)

<sup>2</sup> Иркутский филиал Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (Иркутск)

Проведен анализ антиоксидантной и антимикробной активности водно-спиртовых экстрактов плодовых тел и мицелия *Inonotus rheades*. Установлено, что наибольшую антиоксидантную активность проявляют 70%-е водно-спиртовые экстракты из мицелиальной массы *I. rheades*. 30%-е водно-спиртовые экстракты плодовых тел и мицелия обладают антимикробной активностью против ряда микроорганизмов (*Salmonella enteritidis* ИМВЛ, *Enterococcus faecalis* ATCC 29217, *Salmonella* Ngor ИМВЛ, *Streptococcus* spp. 44, *Staphylococcus aureus* ATCC 209p, *Escherichia coli* ATCC 5218, *Escherichia coli* ТИ). Выявлена фунгистатическая активность 30%-х водно-спиртовых экстрактов мицелия против *Saccharomyces cerevisiae*.

**Ключевые слова:** *Inonotus rheades*, антиоксидантная активность, антимикробная активность, фунгистатическая активность

### RESEARCH OF ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AQUEOUS ALCOHOLIC EXTRACTS FROM MYCOTHALLUS AND MYCELIUM OF *INONOTUS RHEADES* (PERS.) BONDARTSEV & SINGER

T.G. Gornostay<sup>1</sup>, V.A. Chkhenkeli<sup>2</sup>, T.A. Penzina<sup>1</sup>, M.S. Polyakova<sup>1</sup>, G.B. Borovskiy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

<sup>2</sup> Irkutsk Branch of Institute of Experimental Veterinary Medicine of Siberia and Far East, Irkutsk

We analyzed antioxidant and antimicrobial activity of aqueous alcoholic extracts from mycothallus and mycelium of *Inonotus rheades*. It was found that 70% aqueous alcoholic extracts from mycelium of *I. rheades* had the biggest antioxidant activity. 30% aqueous alcoholic extracts from mycothallus and mycelium have antimicrobial activity against the variety of microorganisms (*Salmonella enteritidis* IMVL, *Enterococcus faecalis* ATSS 29217, *Salmonella* Ngor IMVL, *Streptococcus* spp. 44, *Staphylococcus aureus* ATSS 209p, *Escherichia coli* ATSS 5218, *Escherichia coli* TI). We determined fungistatic activity of 30% aqueous alcoholic extracts of mycelium against *Saccharomyces cerevisiae*.

**Key words:** *Inonotus rheades*, antioxidant activity, antimicrobial activity, fungistatic activity

#### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время постоянно ведется поиск новых природных соединений, способных нейтрализовать радикальную активность. Высшие базидиомицеты вызывают повышенный интерес многих ученых в качестве продуцентов с широким спектром соединений, обладающих разной биологической активностью [1, 5, 6, 9], в том числе антиоксидантной [10] и антибактериальной [3, 4].

Известно, что гриб *Inonotus obliquus* обладает высокими показателями антиоксидантной и антибактериальной активности [15]. Что касается других представителей рода *Inonotus*, которых только для средних широт Евразии и Северной Америки насчитывается около 20 видов [8, 13], то они все еще остаются малоизученными. Поэтому является актуальным дальнейшее исследование

биологической активности представителей рода *Inonotus*.

Целью данной работы явилось изучение антирадикальной и антимикробной активности водно-спиртовых экстрактов мицелия и плодового тела *I. rheades*.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования стал гриб *I. rheades* (Pers.) Bondartsev & Singer. В работе использовали мицелий двух штаммов данного вида (штамм I-1218 из окрестностей г. Иркутска введен в культуру (2012 г.) и штамм № 0186, полученный в лаборатории LE-BIN) из национального парка «Беловежская пуща» Белоруссии и плодовое тело, собранное в окрестностях г. Иркутска (2013 г.).

Чистую мицелиальную массу получали путем стерильного наращивания на березовых дисках (1 см)

при температуре  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . Затем мицелий высушивали при температуре  $45^\circ\text{C}$  и измельчали.

Водно-спиртовые экстракты 30%-й и 70%-й приготавливали из расчета 20 мг на 1 мл растворителя. Экстракцию проводили на ультразвуковой бане при температуре  $40^\circ\text{C}$  в течение 30 минут, оставляли на сутки в холодильнике, после этого фильтровали и центрифугировали в течение 20 минут при  $G = 13500$ .

Антирадикальную активность экстрактов определяли с применением DPPH-метода на основе 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил радикала [12] и ABTS+-метода, реакция с радикалом 2,2'-азино-бис(3-этил-бензо-тиазолин-6-сульфоновой кислоты) [11].

Антимикробную и фунгистатическую активность 30%-го водно-спиртового экстракта изучали методом диффузии в агар. В качестве тест-культур использовали референтные штаммы микроорганизмов, полученные из ГНИИ стандартизации и контроля медицинских препаратов им Л.А. Тарасевича (г. Москва) из музея ИФ ГНУ ИЭВСиДВ Россельхозакадемии, культуры микроорганизмов, выделенные из патологического материала в ФГБУ «Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория», производственный штамм *Saccharomyces cerevisiae*. Микробная нагрузка составляла  $1-2 \times 10^7$  КОЕ/мл.

Для изучения антимикробной активности экстрактов пропитывали стерильные стандартные диски фирмы BioMerieux образцами экстрактов, подсушивали их при  $40^\circ\text{C}$  в течение 30 мин и помещали на поверхность агара Мюллера – Хинтона, засеянную тест-культурой. Посевы инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Посевы культуры *Sacch. Cerevisiae* проводили на среде Сабуро и инкубировали при  $30^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Далее определяли зону подавления роста микроорганизмов.

Эксперименты проводили в 3 повторностях. Статистическую обработку результатов экспериментов и оценку достоверности проводили по критерию Стьюдента для уровня вероятности не менее 95 %.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Объективным критерием оценки антирадикальной активности является показатель IC50, который соответствует концентрации антиоксиданта, способного восстановить 50 % радикала.

В нашем эксперименте рассматривалась способность водно-спиртовых экстрактов из плодовых тел и мицелия проявлять антирадикальную активность в отношении катион-радикала ABTS+ и радикала DPPH.

Анализ антирадикальной активности показал, что 30%-й и 70%-й водно-спиртовые экстракты из плодовых тел и мицелия обладают выраженной антирадикальной активностью.

Наибольшим показателем IC50 в реакции с ABTS+ обладает штамм 0186 при экстракции 70%-м и 30%-м водно-спиртовым раствором –  $7,74 \pm 0,54$  и  $16,4 \pm 0,53$  мкг/мл соответственно (рис. 1).

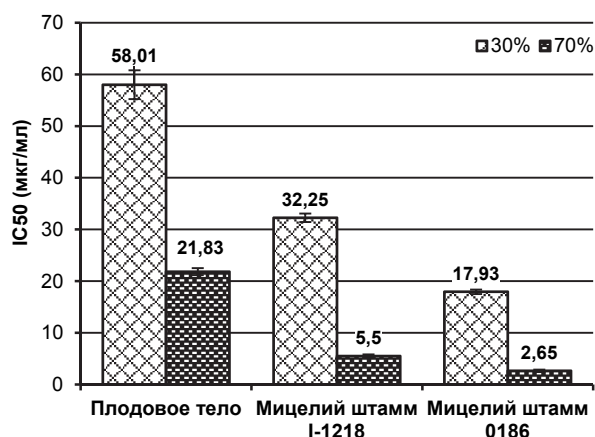


Рис. 1. Антиоксидантная активность водно-спиртовых экстрактов *I. reades* методом ABTS+.

В реакции с DPPH IC50 составляет  $2,65 \pm 0,23$  и  $17,93 \pm 0,44$  мкг/мл соответственно (рис. 2). Высокой антирадикальной активностью также обладают 70%-й и 30%-й водно-спиртовые экстракты штамма I-1218 в отношении DPPH, IC50 составляет  $5,60 \pm 0,32$  и  $32,25 \pm 0,81$  мкг/мл соответственно, реакция с ABTS+ проявляет меньшую активность.

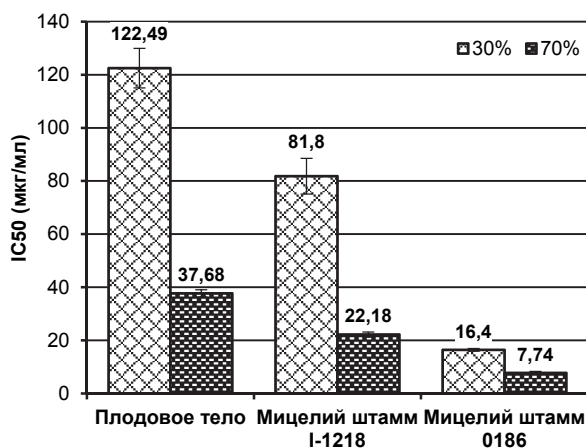


Рис. 2. Антиоксидантная активность водно-спиртовых экстрактов *I. reades* методом DPPH.

Экстракты плодового тела обладают менее выраженным антирадикальным свойством, чем экстракты мицелия, однако показатель IC50 преобладает у некоторых известных источников природных антиоксидантов грибного происхождения [2, 14].

Исследование антимикробной активности мицелия показало, что 30%-й водно-спиртовой экстракт мицелия *I. reades*, штамм 0186 проявляет высокую антимикробную активность в отношении всех рассмотренных тест-культур, в том числе и фунгистатическую активность (табл. 1).

Наибольшая величина зоны подавления роста ( $14,3 \pm 0,5$  и  $14,2 \pm 0,6$  мм) наблюдалась при действии на бактерии семейства *Enterobacteriaceae* *Salmonella enteritidis* ИМВЛ и *Enterococcus faecalis* ATCC 29217 соответственно. При тех же условиях экстракции пло-

Антимикробная активность 30%-х водно-спиртовых экстрактов *I. rheades*

| Тест- культуры                          | Диаметр зон подавления роста тест-культуры (мм) |               |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------|
|                                         | Мицелий (штамм 0186)                            | Плодовое тело |
| <i>Salmonella enteritidis</i> ИМВЛ      | 14,3 ± 0,5                                      | –             |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29217 | 14,2 ± 0,6                                      | –             |
| <i>Salmonella</i> Ngor ИМВЛ             | 13,9 ± 0,2                                      | –             |
| <i>Streptococcus</i> spp. 44            | 9,3 ± 0,4                                       | 12,3 ± 0,2    |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 209 p | 8,6 ± 0,3                                       | 12,6 ± 0,2    |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC3 5218      | 8,7 ± 0,2                                       | 11,7 ± 0,3    |
| <i>Escherichia coli</i> TI              | 9,3 ± 0,2                                       | 12,4 ± 0,3    |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>         | 12,4 ± 0,4                                      | –             |
| Контроль                                | –                                               | –             |

Примечание: «–» – отсутствие зон подавления роста; контроль – диски, пропитанные 30%-й водно-спиртовой смесью.

довое тело показывает избирательную антимикробную активность, но с повышенными значениями, по сравнению с экстрактами мицелия.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, водно-спиртовые экстракты плодовых тел и мицелия *I. rheades* показывают высокую антирадикальную активность. Необходимо отметить, что экстракты мицелия показывают значительно более высокие значения антирадикальной активности, чем экстракты плодового тела, что является важным выводом для биотехнологии.

Также вызывает интерес способность исследуемых экстрактов подавлять патогенную микрофлору и проявлять антимикробную и фунгистатическую активность.

Полученные результаты позволяют обосновать важность и перспективность дальнейшего изучения химического состава экстрактов *I. rheades* и получения метаболитов для новых антимикробных препаратов и препаратов-антиоксидантов.

### ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Гесслер Н.Н., Аверьянов А.А., Белозерская Т.А. Активные формы кислорода в регуляции развития грибов. Обзор // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 10. – С. 1342–1364.

Gessler N.N., Averjanov A.A., Belozerskaya T.A. Reactive oxygen intermediates in the regulation of fungus development. Review // Biohimija. – 2007. – Vol. 72, N 10. – P. 1342–1364. (in Russian)

2. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М., Агафонова С.В. Антиоксидантные компоненты плодовых тел *Laetiporus sulphureus* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 4. – С. 462–468.

Olennikov D.N., Tankhaeva L.M., Agafonova S.V. Antioxidant components of mycothallus of *Laetiporus sulphureus* // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. – 2011. – Vol. 47, N 4. – P. 462–468. (in Russian)

3. Сидоренко М.Л., Бузолева Л.С. Поиск новых видов сырья для получения антибактериальных

препаратов // Антибиотики и химиотерапия. – 2012. – Вып. 57. – С. 7–10.

Sidorenko M.L., Buzoleva L.S. Search of new species of raw material for antimicrobials // Antibiotiki i himioterapija. – 2012. – Vol. 57. – P. 7–10. (in Russian)

4. Чхенкели В.А. Препараты последнего поколения на основе грибов-ксилотрофов рода *Trametes*: обнаруженные эффекты, механизмы действия и применение. – М.: Перо, 2014. – 255 с.

Chkhenkeli V.A. Preparations of latest-generation based on *Trametes* xylophilic fungus: discovered effects, mechanisms of action and using. – Moscow: Pero, 2014. – 255 p. (in Russian)

5. Шариков А.М., Пашенова М.В., Манчук В.Т. Изучение антибиотической активности метаболитов гриба *Inonotus obliquus* Pilat в отношении штамма *Mycobacterium smegmatis* // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – № 1 (77). – С. 252–254.

Sharikov A.M., Pashenova M.V., Manchuk V.T. Studying antibiotic activity of metabolites of *Inonotus obliquus* Pilat towards *Mycobacterium smegmatis* strain // Bjul. VSNC SO RAMN. – 2011. – N 1 (77). – P. 252–254. (in Russian)

6. Шиврина А.Н. Биологически активные вещества высших грибов. – М. – Л.: Наука, 1985. – 200 с.

Shivrina A.V. Biologically active substances of higher fungi. – Moscow – Leningrad: Nauka, 1985. – 200 p. (in Russian)

7. De Silva D. et al. Medicinal mushroom in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer effects and putative mechanisms of action // Mushroom Research Foundation. – 2012. – Vol. 55. – P. 1–35.

8. Gilbertson R.L., Ryvarden L. North American Polypores. Abortiporus – Lindtneria. – Oslo: Fungiflora, 1986. – Vol. 1. – 433 p. – Megasporeporia – Thelephora. – 1987. – Vol. 2. – P. 434–885.

9. Kahlos K. *Inonotus obliquus* (Chaga Fungus) in vitro culture and the production of inotodiol, sterols, and other secondary metabolites // Biotechnology in Agriculture and Forestry. – 1994. – Vol. 26. – P. 179–198.

10. Kamra A., Bhatt A.B. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Ganoderma Lucidum* extracts

against human pathogenic bacteria // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2012. – Vol. 4, Iss. 2. – P. 359–362.

11. Kim D.O. et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 50, Iss. 13. – P. 3713–3717.

12. Preto P., Pineda M., Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E // Analytical Biochemistry. – 1999. – Vol. 269. – P. 337–341.

13. Ryvarden L., Gilbertson R.L. European Polypores. Abortiporus – Lindtneria. – Oslo: Fungiflora, 1993. – Vol. 1. – 387 p. – Meripilus – Tyromyces. – 1994. – Vol. 2. – P. 388–743.

14. Vukosavljevic P. et al. Antioxidant activities of herbs, fruit and medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* extracts produced by microfilm tration process // Journal of Agricultural Sciences. 2009. – V. 54. N. 1. – P. 44–61

15. Zheng W. et al. Production of antioxidant and antitumor metabolites by submerged cultures of *Inonotus obliquus* cocultured with *Phellinus punctatus* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2011. – Vol. 89. – P. 157–167.

#### Сведения об авторах

**Горностай Татьяна Геннадьевна** – аспирант, ведущий инженер Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132; e-mail: T.G.Gornostay@yandex.ru)

**Чхенкели Вера Александровна** – член-корр. РАН, заместитель директора Иркутского филиала Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока (664005, г. Иркутск, ул. Боткина, 4; e-mail: chkhkenkeli@rambler.ru)

**Полякова Марина Станиславовна** – ведущий инженер Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (e-mail: poljakova.m@gmail.com)

**Пензина Татьяна Александровна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (e-mail: penzina@sifibr.irk.ru)

**Боровский Геннадий Борисович** – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru)

#### Information about the authors

**Gornostay Tatyana Gennadjevna** – Postgraduate, Senior Engineer of Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (Lermontov str., 132, Irkutsk, 664033; e-mail: T.G.Gornostay@yandex.ru)

**Chkhkenkeli Vera Aleksandrovna** – Corresponding Member of RAS, Deputy Director of Irkutsk Branch of Institute of Experimental Veterinary Medicine of Siberia and Far East (Botkina str., 4, Irkutsk, 664005; e-mail: chkhkenkeli@rambler.ru)

**Polyakova Marina Stanislavovna** – Senior Engineer of Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (e-mail: poljakova.m@gmail.com)

**Penzina Tatyana Aleksandrovna** – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (e-mail: penzina@sifibr.irk.ru)

**Borovskiy Gennadiy Borisovich** – Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Research Officer of Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS (e-mail: borovskii@sifibr.irk.ru)