

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

факультет хімії та фармації

Кафедра фармакології та технології ліків

Д и п л о м н а р о б о т а

на здобуття ступеня вищої освіти «магістр»

на тему: **«Виділення та нейтрофіломодулюючі ефекти біологічно активних
речовин вищих грибів»**

«Isolation and neutrophil-modulating effects of bioactive substances from higher
fungi»

Виконала: студентка денної форми навчання
Спеціальності 102 Хімія
Додіван Євгенія Олександрівна

Керівник: к. б. н., доц. Кобернік А.О.
Рецензент: д. б. н., с.н.с. Ларіонов В.Б.

Рекомендовано до захисту:
протокол засідання кафедри
№ ____ від _____ 2019 р.

Захищено на засіданні ЕК № ____
протокол № ____ від « ____ » _____ 2019 р.
Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою/ за шкалою ECTS/ бал)

Завідувач кафедри
_____ проф. Грицук О.І.
(підпис)

Голова ЕК
_____ к. х. н., доц. Чеботарьов О.М.
(підпис)

Одеса – 2019

РЕФЕРАТ

Останнім часом в розвинутих країнах світу зростає рівень впровадження ліків природного походження в клінічну практику як один із шляхів вдосконалення лікувального процесу, що обіцяє значні успіхи в збереженні здоров'я населення.

Робота присвячена дослідженню антиоксидантної активності біологічно активних речовин плодових тіл *Inonotus obliquus* (березовий гриб, чага).

Метою роботи була оцінка антиоксидантного потенціалу спиртового та водного екстрактів березового гриба.

За результатами проведеного дослідження було встановлено, що і етанольний, і водний екстракти гриба *Inonotus obliquus* виявляють антиоксидантні властивості. Водний екстракт є більш перспективним за своїми антиоксидантними властивостями та потребує подальшого вивчення.

Кваліфікаційна робота була виконана на кафедрі фармацевтичної хімії хімічного факультету Одеського національного університету (ОНУ) імені І.І. Мечникова МОН України в рамках науково-дослідної роботи кафедри).

Кваліфікаційна робота викладена на 57 сторінках друкованого тексту та містить: 6 таблиць; 13 рисунків; використано 50 літературних джерел.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Світовий фармацевтичний ринок препаратів рослинного походження та препаратів на основі грибів	9
1.2. Препарати з вищих грибів на світовому фармацевтичному ринку ..	12
1.2.1 Антибіотики.....	13
1.3. Чага, березовий гриб - загальна характеристика	16
1.3.1. Хімічний склад.....	16
1.3.2. Спектр фармакологічної активності березового гриба.....	17
1.3.3. Препарати на основі чаги.....	19
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	22
2.1. Матеріали та реактиви	22
2.2. Методи.....	23
2.2.1. Визначення маси сухої речовини	23
2.2.2. Визначення вмісту спирторозчинних сполук	23
2.2.3. Визначення вмісту водорозчинних сполук	24
2.2.4. Визначення вмісту ТБК-продуктів у модельній системі для вивчення антиоксидантної активності.....	25
2.2.5. Виділення лейкоцитів з крові мишей	26
2.2.6. Проведення НСТ тесту	26
2.2.7. Статистична обробка результатів дослідження.....	27
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	30
3.1 Дослідження антиоксидантної активності екстрактів грибів <i>Inonotus obliquus</i>	33
3.2 Вплив екстрактів <i>Inonotus obliquus</i> на фагоцитарну активність нейтрофілів у НСТ-тесті.....	40
3.3 Тест з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест)	43
3.4 Вплив екстрактів <i>Inonotus obliquus</i> на показники НСТ тесту	44
ВИСНОВКИ.....	53

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	54
---------------------------------	----

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАР	біологічно активні речовини
ЛС	лікарська сировина
ПФС	поліфенольні сполуки
АДФ	аденозиндифосфат
АФК	Активні форми кисню

ВСТУП

На сьогоднішній день продовжує зростати інтерес до лікарських рослин та препаратів на їх основі, які володіють достатньо вираженим впливом на біологічні процеси організму при мінімальних побічних токсичних ефектах. Лікування захворювань різної етіології та патогенезу природними фізичними факторами та біологічно активними речовинами (БАР) набуває широкого використання [1], оскільки серед переваг їх використання є наявність вираженої терапевтичної дії [2] на тлі зниження протипоказань до застосування та побічних ефектів, які притаманні, наприклад, нестероїдним протизапальним засобам (НПЗЗ) [3].

Сировинну базу в Україні становлять дикорослі лікарські рослини (ЛР), рослини, що культивуються, та імпортована сировина. ЛРС використовується підприємствами хіміко-фармацевтичної, парфумерно-косметичної, харчової промисловості [4, 5].

Лікарські засоби, отримані з грибів, викликають у дослідників особливий інтерес в тому зв'язку, що гриби продукують різні за своєю хімічною природою біологічно активні речовини, які можуть регулювати багато процесів в організмі людини.

Щороку в медичній літературі з'являються все нові дані про ефективність грибів при різного роду захворюваннях організму, на світовому фармацевтичному ринку щороку з'являються все нові препарати, отримані на основі грибів, частка їх у світовому обсязі продажів хоча поки і невелика, але збільшується стрімкими темпами [6, 7].

Препарати грибів частіше застосовуються не як самостійні засоби, а в якості загальнозміцнюючих засобів лікувального та профілактичного призначення широкого профілю, і не можуть бути альтернативою специфічних лікарських засобів. Препарати вищих грибів можна розглядати як важливі складові компоненти профілактики і лікування з метою регуляції

якнайшвидшого відновлення захисних сил і оздоровлення організму до, в процесі, або після важких захворювань.

Спектр фармакологічної дії вищих грибів досить великий, гриби є сировиною для отримання антибіотиків, ферментів, білків, полісахаридів.

Багато грибів виявляють загальнозміцнювальну, тонізуючу, імуномодуючу та протипухлинну дію. На світовому фармацевтичному ринку найбільш відомі такі лікарські препарати з вищих грибів, як бефунгін, МІКОТОН, хрестин, лентинан. Всі вони володіють потужними протираковими властивостями [8].

З усього вище сказаного, можна зробити висновок, що вищі гриби є цінним джерелом для отримання нових лікарських препаратів.

Перспективним об'єктом дослідження є *Inonotus obliquus*- березовий гриб, оскільки з літературних джерел відомо, його плодові тіла містять ряд біологічно активних речовин [9].

Тому актуальним завданням в межах виконання кваліфікаційної роботи було дослідження антиоксидантних властивостей плодових тіл березового гриба.

Метою роботи була оцінка антиоксидантного потенціалу спиртового та водного екстрактів березового гриба та визначення їх впливу на активність нейтрофілів у НСТ тесті

Для досягнення поставленої мети були сформовані наступні задачі:

1. Визначити вміст вологи та сухої речовини у зразках гриба *Inonotus obliquus* та загальну кількість сполук, що екстрагуються з нього при послідовних етанольній та водній екстракції.
2. У модельній ліпід-вмісній системі за показником - тіобарбітал-активних продуктів оцінити антиоксидантну дію отриманих з плодових тіл *Inonotus obliquus* водного та етанольного екстрактів.
3. На підставі часового профілю накопичення ТБК-продуктів у модельній системі з різною концентрацією екстрактів визначити можливість їх прооксидантної дії та інтервалу концентрацій антиоксидантної дії.

4. Визначити вплив водних та спиртових екстрактів гриба *Inonotus obliquus* на функціональні показники нейтрофілів у НСТ тесті за диференційними та інтегральними характеристиками

Об'єкт дослідження – плодові тіла *Inonotus obliquus*

Предмет дослідження – Антиоксидантна та нейтрофіл-стимулююча активність *Inonotus obliquus*

Методи дослідження: титрометричні, спектрофотометричні, статистичні.

ВИСНОВКИ

1. Вміст сухої речовини у плодових тілах грибів *Inonotus obliquus* складає $13,58 \pm 0,73$ %, з яких послідовною екстракцією вилучається $24,1 \pm 0,7$ % речовин етиловим спиртом та $20,27 \pm 1,23$ % водою.

2. Водний екстракт ефективно гальмує накопичення ТБК продуктів у модельній системі у діапазоні концентрацій 0,01-0,2 мг/см³.

3. Антиоксиданта дія спиртового екстракту при низьких концентраціях (0,01-0,05 мг/см³) більш виразна, ніж водного екстракту, але у високих концентраціях спостерігається (0,1-0,2 мг/см³) прооксиданта дія, що обмежує його можливе використання діапазоном низьких доз.

4. Максимальний вплив на підвищення утворення форм АФК як у спонтанному тесті, так й тесті з активацією відмічається при використанні водного екстракту у концентрації 0,1 %, тоді як підвищення концентрації до 0,2 % має пригнічуючу дію.

5. Екстрактивні речовини *Inonotus obliquus*, що екстрагуються спиртом, у значно більшому ступені здатні активувати нейтрофіли, що за результатами НСТ тесту проявляється у частковому підвищенні базального рівню утворення активних форм кисню та значному підвищенні їх фагоцитарної активності у тесті з активацією

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Улащик В. С. Влияние физических факторов на морфофункциональное состояние клеточных структур / В. С. Улащик, О. Н. Тимошенко // *Вопр. курортол.* – 2006. – №6. – С.48–52.
2. Сокурта В. М. Фізичні чинники в медичній реабілітації: Підручник: під редакцією акад. В. М. Казакова. – Донецьк: ДНМУ. – 2008. – 575 с.
3. Чичасова Н. В. Стратегические подходы к лечению ревматоидного артрита / Н. В. Чичасова // *Фарматека.* – 2009. – №20. – С.22–29.
4. Фармацевтичні та медико-біологічні аспекти ліків / І.М. Перцев, О.Х. Пімінов, М.М.Слободянюк та ін.; за ред. І.М. Перцева. – Вінниця, 2007.
5. Машковский М. Д. Лікарські засоби / М. Д. Машковский. – Харків.: Торсінг, 1998. Т. 2. – 1998 – 592 с.
6. Szwengiel A., Stachowiak B. Deproteinization of water-soluble β -glucan during acid extraction from fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushrooms // *Carbohydrate Polymers.* – 2016. – V. 146. – P. 310-319
7. In Vivo and In Vitro Anti-Tumor Effects of Fungal Extracts / H.-T. Wu, F.-H. Lu, Y.-C. Su et al. // *Molecules.* – 2014. – V. 19. – P. 2546-2556.
8. Antioxidant and Antityrosinase Activities of Various Extracts from the Fruiting Bodies. of *Lentinus lepideus* / K. N. Yoon, N. Alam, K. R. Lee et al. // *Molecules.* – 2011. – V. 16. – P. 2334-2347.
9. Баландайкин М.Э. Химическая структура и лечебные свойства чаги *Фармация* 2013, 5, 52-55.
10. Кожемякина Н. В. Состав и биологическая активность углеводных компонентов мицелия некоторых базидиомицетов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н. В. Кожемякина. – СПб., 2010. – 22 с.
11. Фундаментальные основы микологии и создание лекарственных препаратов из мицелиальных грибов / Е. П. Феофилова [и др.]. – М. : Национальная академия микологии, 2013. – 152 с.

12. Основы биотехнологии высших грибов: учеб, пособие / Н. А. Заикина [и др.]. –СПб.: Проспект науки, 2007. – 336 с.
- 13 . Филиппова И. А. Популярная фунготерапия: лечение лекарственными грибами / И. А. Филиппова. – СПб. : Диля, 2009. – 128с.
- 14 . 8Противовирусная активность базидиальных грибов. Обзор литературы / Т. В. Теплякова [и др.] // Проблемы медицинской микологии. – 2014. – Т. 16. - № 2. – С. 15-25.
15. Промышленная микология: Учебное пособие / В. А. Галынкин [и др.]. – СПб. : Изд-во СПХФА, 2003. – 220 с
16. Феофилова Е.П. Мицелиальные грибы как источники получения новых лекарственных препаратов с иммуномодулирующей, противоопухолевой и ранозаживляющей активностями // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2004. - №1. – С.27-32.
- 17 . Clinical trial of a mixture of six medicinal mushroom extracts [Electronic version] / R. Wang, Y. Xu, P. Ji et al. – 2001. – URL: http://alohamedicinals.com=clinical_trials.htm (дата обращения: 20.05.2017).
18. Хабибрахманова В.Р., Никитина С.А., Сысоева М.А. Исследование золя водных извлечений чаги. XIV. Количественный и качественный состав липидных веществ водного извлечения чаги - Вестник Казанского Технологического Университета 2012, 15, 18, 217-219.
19. Ma L., Chen H., Zhang Y., Zhang N., Fu L. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharide from mushroom *Inonotus obliquus* - Carbohydr. Polym. 2012, Jun 20, 89(2), 371-378.
20. Бурмасова М.А., Сысоева М.А. Состав веществ бутаноль-ного экстракта из меланина чаги - Химия растительного сырья 2012, 1, 149152.
21. Liu C., Zhao C., Pan H.H., Kang J., Yu X.T., Wang H.Q., Li B.M., Xie Y.Z., Chen R.Y. Chemical constituents from *Inonotus obliquus* and their biological activities - J. Nat. Prod. 2014, Jan 24, 77(1), 35-41.

22. Lee I.K., Yun B.S. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance - J. Antibiot. (Tokyo). 2011, May, 64(5), 349-359.
23. Ma L., Chen H., Dong P., Lu X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus* - Food Chem. 2013, Aug 15, 139(1-4), 503-508.
24. Yoon T.J., Lee S.J., Kim E.Y., Cho E.H., Kang T.B., Yu K.W., Suh H.J. Inhibitory effect of chaga mushroom extract on compound 48/80-induced anaphylactic shock and IgE production in mice - Int. Immunopharmacol. 2013, Apr., 15(4), 666-670.
25. Chen Y., Huang Y., Cui Z., Liu J. Purification, characterization and biological activity of a novel polysaccharide from *Inonotus obliquus* - Int. J. Biol. Macromol. 2015, Aug., 79, 587-594.
26. Song F.Q., Liu Y., Kong X.S., Chang W., Song G. Progress on understanding the anticancer mechanisms of medicinal mushroom: *inonotus obliquus* - Asian. Pac. J. Cancer. Prev. 2013, 14(3), 1571-1578.
27. Ríos J.L., Andújar I., Recio M.C., Giner R.M. Lanostanoids from fungi: a group of potential anticancer compounds - J. Nat. Prod. 2012, Nov 26, 75(11), 2016-2044
28. Ma L., Chen H., Dong P., Lu X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus* - Food Chem. 2013, Aug 15, 139(1-4), 503-508.
29. Xu H.Y., Sun J.E., Lu Z.M., Zhang X.M., Dou W.F., Xu Z.H. Beneficial effects of the ethanol extract from the dry matter of a culture broth of *Inonotus obliquus* in submerged culture on the antioxidant defence system and regeneration of pancreatic beta-cells in experimental diabetes in mice - Nat. Prod. Res. 2010, Apr., 24(6), 542-553. 81

30. Yue Z., Xiuhong Z., Shuyan Y., Zhonghua Z. Effect of Inonotus Obliquus Polysaccharides on physical fatigue in mice - J. Tradit. Chin. Med. 2015, Aug., 35(4), 468-472.
31. Du X., Mu H., Zhou S., Zhang Y., Zhu X. Chemical analysis and antioxidant activity of polysaccharides extracted from Inonotus obliquus sclerotia - Int. J. Biol. Macromol. 2013, Nov., 62, 691-696.
32. Коткова В.М. Трутовые грибы. Учебное пособие / В.М. Коткова, Т. Ниемеля, И.А. Винер, Д.С. Щигель, А.В. Кураков / Хельсинки.— 2015. —98с.
33. Варданыан Р. Л., Варданыан Л. Р., Айрапетян С. А., Арутюнян Л. Р., Арутюнян Р. С. Антиоксидантное и прооксидантное действие аскорбиновой кислоты. Химия растительного сырья. - 2018. - №1. - С. 113-119.
34. Мельникова Н.Б., Иоффе И.Д. Взаимодействие дигидрохверцетина с ионами металлов в водных растворах их солей и в изотонических медицинских средах. Химия растительного сырья. 2001. №4. С. 25–33.
35. Федотчева Н.И., Теплова В.В., Белобородова Н.В. Роль тиоловых антиоксидантов в восстановлении функций митохондрий, модифицированных микробными метаболитами. ББиофизика. - 2012. -Т.57, №. 5. - С. 820-826
36. Tafazoli S., Wright J.S., O'Brien P.J. Prooxidant and antioxidant activity of vitamin E analogues and troglitazone. Chem Res Toxicol. - 2005. - №18, V.10. - P.1567-1574.
37. Shi H., Noguchi N., Niki E. Dynamics of antioxidant action of ubiquinol: a reappraisal. - Biofactors. -1999. -№9, V.2-4. - P.141-148.
38. Владимиров Ю. А. // Соросовский общеобразовательный журнал. 2000. Т. 6. № 12. С. 13–19.
39. Скулачев В. П. // Соросовский общеобразовательный журнал. 1996. № 3. С. 1–8.
40. Кулинский В.И. // Соросовский общеобразовательный журнал. 1999. № 1. С. 2–7.

- 41 Cheeseman K. H., Slater T. F. // *Brit. Med. Bull.* 1993. Vol. 49. P. 481–493.
- 42 Зайцев В. Г. // *Вестник Волгоградской мед. акад. Волгоград.* 1998. Вып. 4. С. 49–53.
- 43 Cross A. R., Jones O. T. G. // *Biochem. biophys. acta.* 1991. Vol. 1057. P. 281–298.
- 44 Sandhu S. K., Kaur G. // *Biogerontol.* 2003. Vol. 4. № 1. P. 19–29.
- 45 Gutteridge J. M. // *Chem. biol. interact.* 1994. Vol. 91. P. 133–140.
- 46 Gottlieb E., Armour S. M. // *Cell death and differentiation.* 2003. Vol. 10. P. 709–717.
- 47 Болевич С. Б. // *Терап. Арх.* 1998. № 3. С. 54–57.
- 48 Коган А. Х. // *Вестник РАМН.* 1999. № 2. С. 3–10.
- 49 Kinnula V. L., Soini Y. // *Antioxid. redox signal.* 2002. Vol. 4. № 1. P. 27–34.
- 50 Маянский А. Н., Маянский Д. Н. *Очерки о нейтрофиле и макрофаге.* Новосибирск: Наука, 1983. 264 с.