УДК 615.214.22:615.322

ЛИШАЙНИКОВЫЕ АМИНО-β-ОЛИГОСАХАРИДЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА, ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ, СРАВНЕНИЕ С ХИТОЗАНОМ

Аньшакова В.В. [2], Кершенгольц Б.М. [1, 2], Шеин А.А. [1, 2]

[1] *ФГБУН Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, г. Якутск, kerschen@mail.ru*
[2] *ФГАОУ ВПО Северо-Восточный федеральный университет, г. Якутск*

Проведен сравнительный анализ структуры, свойств и некоторых областей применения лишайниковых амино-β-олигосахаридов и хитозана. Показано, что препараты, полученные из тканей лишайникового сырья с применением технологии экстракции в среде сверхкритического диоксида углерода, обладают детоксикационным и антибиотическим свойствами. Применение механохимической биотехнологии позволяет в одну стадию получать высокоактивные твёрдофазные супрамолекулярные комплексы, состоящие из универсального «активного наполнителя» – лишайниковых амино-β-олигосахаридов и фармакона любой природы (лишайниковые кислоты антибиотического действия, известные препараты антибиотического, иммуномодуляторного, адаптогенного, цитостатического действия, витаминно-микроэлементные комплексы и т.д.) и способные существенно снижать биоэффективную дозу, что особенно важно в таких областях, как онкология, радиопротекция, спортивная медицина.

Ключевые слова: хитозан, лишайник, амино-β-олигосахариды.

LICHEN AMINO-β-OLIGOSACCHARIDES – STRUCTURE, PROPERTIES, PRACTICAL APPLICATION, COMPARISON WITH HITOZAN

An'shakova V.V. [2], Kershengoltz B.M. [1, 2], Shein A.A. [1, 2]

[1] *Institute of Biological Problems of Cryolithozone SB RAS, Yakutsk, Russia*
[2] *North-Eastern Federal University, Yakutsk, Russia*

The comparative analysis of structure, characteristics and some applications of lichen amino-β-oligosaccharides and hitozan is carried out. It is shown that the preparations received from tissues of lichen raw materials with application of technology of an extraction in the medium of supercritical carbon dioxide, possess detoxicating and antibiotic properties.
Mechano-chemical biotechnologies allow receiving in one stage highly active solid-phase supramolecular complexes consisting from universal «active filler» - lichen amino-β- oligosaccharides and farmakon of any nature (lichen acids of antibiotic actions, known preparations of antibiotic, immunomodulating, adaptogenic and cytostatic action, complex of vitamin and trace element). These complexes are capable of substantially reduce bioeffective dose which is especially important in such fields as oncology radioprotection, sports medicine.

Keywords: chitosan, lichen, amino-β-oligosaccharides.

Введение

Структуры лишайниковых полисахаридов и хитозана имеют ряд общих черт, вероятно, потому, что лишайники – это симбиоз грибов и водорослей, а известно, что наиболее распространенная кристаллографическая модификация хитина (α-хитин) встречается в панцирях членистоногих и гифах некоторых грибов. Известно, что, хитозан – линейный аминополисахарид. Его макромолекулы состоят из случайно связанных β-(1-4) D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина, который образуется при деацетилировании хитина. Мономером хитина является N-ацетил-1,4-β-D-глюкопиранозамин [10]. В гифах лишайников обнаружены хитин и полисахариды лихенаны. Их количество доходит до 45–50% на сухое вещество. Лихенаны – β-D-глюканы, содержащие β-1,4 (до 73%) и β-1,3 (до 27%)

связанные остатки D-глюкозы, а также водорастворимые изолихенаны, построенные из α-1,3 и α-1,4 связанных остатков D-глюкозы, а также смесь гетерополисахаридов, построенных из остатков D-маннозы, D-галактозы, D-глюкозы и гексуроновой кислоты [10]. Причем часть остатков D-глюкозы лихенанов также связана с аминогруппами [4].

Целью работы является проведение сравнительного анализа структуры, свойств и некоторых областей применения лишайниковых амино-β-олигосахаридов и хитозана.

Материалы и методы исследования

Производство олигомеров хитозана ведется кислотно-щелочным способом или методом ферментативного гидролиза с последующей ультрафильтрацией. Расщепить хитин и хитозан до N-ацетил-D-глюкозамина и D-глюкозамина можно под действием микробных ферментов, таких как хитиназы и хитобиазы [10].

Процессы дезацетилирования хитина с образованием хитозана и его олигомеров могут происходить и в твердом состоянии при механическом воздействии [1]. Олигомеры лихенана также можно получать экстракцией кипящей водой с 2%-ной щелочью [7] и ферментативным гидролизом.

Результаты и обсуждение

Благодаря своему строению (большое количество свободных положительно заряженных аминогрупп, гидроксильных групп, образующих водородные связи, гидрофобных групп), хитозан обладает высокой хелатирующей способностью в отношении ионов различных металлов, в том числе радиоактивных изотопов и токсичных элементов, токсинов, жиров и жирорастворимых соединений. Хитозан способен снижать уровень холестерина, оказывать иммуномодулирующее действие (аналогично действию 1,3-глюкана, но более слабое), при этом он не только не является аллергеном, но и ингибирует процессы воспаления. Ввиду схожей химической структуры олигомеров хитозана (ОХ) с компонентами хрящевой и соединительной тканей человека, прежде всего со структурой олигосахаридных компонентов гликокаликса клеточных мембран, они могут быть отнесены к «сигнальным» молекулярным веществам, способным запускать иммунные реакции, обладающим высокой противоопухолевой активностью, стимулирующим рост и размножение нормальных клеток [10].

Известен также широкий спектр фармакологической активности и лишайниковых лихенанов. Они обладают антигипоксическим, отхаркивающим, противовоспалительным, иммунотропным, энтеросорбирующим, гепатопротекторным, гиполипидемическим, противоопухолевым, общеукрепляющим действием [7]. Причем максимальной антиопухолевой и иммуномодулирующей (антикомплементарной) активностью обладают β-1,3-олиго-D-глюканы, со средней степенью разветвления (присоединения по 1-6-связям остатков D-

глюкозы): 1:3, 1:2, 1:24 [7], а по своей структуре они ещё более близки к олигосахаридным компонентам гликокаликса.

Вместе с тем сырьевая доступность слоевищ лишайников существенно выше, чем панцирей членистоногих, поэтому в нашей работе, во-первых, были апробированы новые физико-химические биотехнологии получения лишайниковых амино-β-олигосахаридов (ЛА-β-ОС; обработка диоксидом углерода в состоянии сверхкритической жидкости, механохимические биотехнологии). Во-вторых, исследованы свойства ЛА-β-ОС и оценены области их возможного применения.

Создан БАД «Ягель» – водно-спиртовый экстракт слоевищ лишайников рода *Cladonia,* предварительно обработанных CO_2 в состоянии сверхкритической жидкости [8].

Основные активные вещества – амино-β-олигосахариды (до 3мг/мл), образующиеся из амино-β-полисахаридов при обработке их водой в среде сверхкритического CO_2. Содержит также комплекс веществ антиоксидантного действия: орселиновые, леканоровые, грифоровые, хиастовые кислоты и хиноны; природные антибиотики – усниновые кислоты и их производные. Содержание ЛА-β-ОС определяли как хроматомасс-спектрометрическим методом, так и стандартным нингидриновым титрованием раствора веществ, остающихся на нанофильтре (размер пор 5 нм) при пропускании через него БАД «Ягель», предварительно обработанной амилазой до полного гидролиза α-олиго- и α-дисахаридов.

Разработана также *механохимическая биотехнология* получения высокоактивных твёрдофазных супрамолекулярных комплексов, состоящих из универсального «активного наполнителя» – ЛА-β-ОС, получаемых при механохимической активации амино-β-полисахаридов, и фармакона любой природы (лишайниковые кислоты антибиотического действия, известные препараты антибиотического, иммуномодуляторного, адаптогенного, цитостатического действия, витаминно-микроэлементные комплексы и т.д.) – препараты серии «Ягель-ТМ» [4]. Особенностью данной биотехнологии является то, что «активный наполнитель» образуется при механохимической активации части ЛА-β-ОС одновременно с образованием супрамолекулярных комплексов с фармаконом. Соответственно, вся совокупность механохимических превращений в твердой фазе в реакторе проточного типа проходит в одну стадию, поэтому весь процесс очень технологичен.

Сравнение ИК-спектров порошков ягеля грубого помола и механоактивированного, а также анализ водорастворимых углеводов (по методу восстанавливающих концов) в экстрактах слоевищ лишайников после вышеуказанных обработок подтвердили, что при механохимической активации происходит частичное расщепление β-гликозидных связей в лишайниковых β-полисахаридах с образованием водорастворимых, легко усвояемых ЛА-β-ОС, концентрация которых увеличивалась при двухминутной механоактивации в 7,3 раза.

С помощью сканирующей электронной и атомно-силовой микроскопии показано, что механохимическая активация слоевищ лишайников и их композитов с природными физиологически активными веществами (ФАВ) приводит к образованию наноразмерных частиц в твердой фазе [3].

Благодаря наноразмерам и особенностям структуры β-олигосахариды и их супрамолекулярные комплексы с ФАВ хорошо растворяются в воде, легко всасываются в желудочно-кишечном тракте и транспортируются через клеточные мембраны, выступая в качестве «активного транспортного средства» для фармаконов, обеспечивая тем самым их высокую усвояемость (почти 100%-ное всасывание и транспорт в клетки без потери биоактивности фармакона) и биоактивность. Вследствие этого биоэффективная доза в ряде направлений применения таких комплексов может быть снижена в 5–10 раз, что особенно важно в таких областях, как онкология, радиопротекция, спортивная медицина и др.

Слоевища лишайников содержат лишайниковые кислоты антибактериального действия, поэтому получаемые механоактивированные препараты *a priori* обладают также естественной стерильностью. Во внутренних средах организма ЛА-β-ОС не гидролизуются и после «разгрузки от фармакона» за счет активных функциональных групп способны связывать *эндо*токсины (напр., обуславливающие тяжесть протекания воспалительных процессов, аллергических реакций и аутоиммунных заболеваний, включая бронхиальную астму; алкогольные токсины – альдегиды, кетоны; избытки холестерина) и *экзо*токсины (тяжелые металлы, радионуклиды, канцерогены и др.), эффективно выводя их из организма и оказывая, таким образом, детоксикационное действие внутренних сред организма (кровь, лимфа, меж- и внутриклеточные жидкости).

В модельном эксперименте показано, что адсорбционная активность биопрепарата «Ягель-ТМ» по катионам Co^{2+} повышается после механоактивации в 3,6 раза, а по метиленовому синему (аналог эндотоксинов малой и средней молекулярной массы, образующихся при воспалениях любой этиологии и обуславливающих, в значительной степени, тяжесть воспалительного процесса) – в 1,6 раза [5].

Показано, что введение БАД «Ягель» в водочные изделия в соотношении 1:100 в целях детоксикации, а также профилактики алкогольных патологий позволяет снизить в 2÷3 раза токсическое действие алкоголя при полном сохранении эйфорического эффекта; более чем в 20 раз уменьшить постинтоксикационный эффект, в 5,6 раза уменьшить скорость формирования наркоманической алкогольной зависимости [8].

За счет близости структуры β-олигосахаридов структуре олигосахаридов гликокаликса внешнего слоя клеточных мембран 3–4 недельный приём БАД «Ягель» повышает секрецию инсулина β-клетками панкреаса в 1,8–1,9 раза [11], соответственно снижается в 1,8–1,9 раза

уровень сахара и на 20–40% содержание гликозилированного гемоглобина при одновременном снижении доли липопротеидов низкой плотности на 18÷37% в крови у больных сахарным диабетом II типа и β-холестерина у страдающих атеросклерозом [6].

Антитромбиновая активность препарата «Ягель» показана в Гематологическом научном центре РАМН (г. Москва). Наряду с выявленной антиатерогенной активностью это позволяет рекомендовать препарат «Ягель» в целях профилактики и купирования последствий тяжелейших сосудистых патологий, включая инсульты и инфаркты.

Создан механохимический композит, состоящий из ЛА-β-ОС («активный наполнитель») стандартного препарата «витаминно-микроэлементного комплекса» (ВМЭК, «фар-макон») в соотношении 20:1. Исследование его физиологической активности показало повышение в 1,9–2,5 раза резистентности (характеристик, связанных с выносливостью, двигательной и исследовательской активностью) животного организма к действию физических нагрузок и экстремальных факторов различной природы по сравнению со смесью грубого помола, за счет большей биодоступности ВМЭК и детоксикационной функции «активного наполнителя» (содержание лактата в мышцах при одной и той же нагрузке снизилось в 1,5 раза). При этом изменение массы в контрольной и экспериментальных группах не выявили достоверных отличий, т.е. исследуемые препараты не способствуют наращиванию мышечной массы и не обладают анаболическими свойствами.

Аналогичные по характеру эффекты, но ещё более выраженные в количественном отношении (в 2,5–5,2 раза), были получены при совместной механоактивации слоевищ лишайников с тканями некоторых лекарственных растений: корней и корневищ родиолы розовой, листьев и верхних побегов рододендрона золотистого в соотношении 10:1. Созданные механохимические композиты могут быть использованы в качестве лечебно-профилактического средства для повышения физической активности, выносливости, ускорения восстановления после физической нагрузки спортсменов и работоспособности людей, ведущих активный образ жизни, проживающих в экологически неблагоприятных регионах, а также в ветеринарии.

По аналогичной методологии создан препарат антибиотического действия НАНОЯГЕЛЬ-М, антибактериальная активность которого повышена в 8–10 раз по сравнению с исходным фармаконом – стандартным препаратом антибактериального действия. Это позволило снизить дозу вводимого антибиотика в 5–8 раз при повышении терапевтической активности препарата в 1,4–1,6 раза [3].

Испытания биопрепарата «Ягель-М», проведенные на лабораторных животных, инфицированных лекарственно устойчивыми штаммами микобактерий (туберкулеза) показали очень высокую эффективность: при 100%-ной летальности в контрольной группе, в группе

животных, принимающих препарат «Ягель-М», летальность равна 0, более того, животные за время эксперимента (2,5 месяца) прибавили в весе на 20%. Причем на такой препарат антибактериального действия не развивается реакция привыкания соответствующих микробиологических штаммов [9].

Показано, что механоактивация слоевищ лишайников позволяет значительно снизить дозировку ягелевого сырья как пищевой добавки в хлебобулочные изделия с 1–3% до 0,2–0,5%, при этом пищевая ценность, качество хлебобулочных изделий значительно возрастают. Благодаря этому разработан способ повышения качества хлебобулочных изделий и срока их хранения без черствления и плеснения (без введения химиоконсервантов) в 2,5–3,0 раза за счет введения при хлебопечении милликоличеств биопрепарата «Ягель-ТМ». Результатом является также обогащение хлебобулочных изделий эссенциальными микроэлементами, негормональными ФАВ, повышение степени их усвояемости и улучшение физико-химических показателей хлеба. При этом, кроме того что появляется возможность выпускать продукты с повышенным сроком годности, решается также задача выпуска продуктов питания оздоровительной направленности [2].

Заключение

Все вышеизложенное позволяет предложить лишайниковые амино-β-олиго-сахариды, получаемые с помощью новых физико-химических биотехнологий, с учетом их большего сырьевого потенциала, в качестве альтернативы олигосахаридам хитозана в некоторых направлениях использования.

Список литературы

1. Акопова Т.А. Химические превращения хитина и хитозана в твердом состоянии при механическом воздействии : дисс. … канд. хим. наук. – М., 2001. – 120 с.
2. Аньшакова В.В., Каратаева Е.В., Кершенгольц Б.М. Повышение качества хлебобулочных изделий с помощью механохимического биопрепарата из лишайников // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 8 (ч. 3). – С. 593-596.
3. Аньшакова В.В. [и др.] Низкодозовые антибактериальные биопрепараты на основе лишайников рода Cladonia // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 4. – С. 172-176.
4. Аньшакова В.В. [и др.] Механохимические технологии получения биологически активных веществ из лишайников // Известия Самарского НЦ РАН. – 2011. – Т. 13 (39). – № 1. – С. 236-240.
5. Аньшакова В.В. [и др.] Получение сорбционного биоматериала из слоевищ лишайников // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2012. – № 1. – С. 29-32.

6. Гольдерова А.С. [и др.] Влияние БАД «Ягель» на биохимические показатели крови // Якутский медицинский журнал. – 2010. – № 4. – С. 73-76.

7. Оводов Ю.С. Полисахариды грибов, мхов и лишайников, структура и физиологическая активность // Проблемы химии древесины и лесохимии. Труды коми научного центра УрО РАН. – Сыктывкар, 1997.

8. Патент РФ № 2006100978 от 01.08.2007, приоритет от 10.01.2006.

9. Филиппова Г.В. [и др.] Влияние биологически активных веществ из слоевищ северных лишайников, экстрагированных различными методами, на биологические свойства микобактерий туберкулеза // Сибирский медицинский журнал. – 2008. – № 3. – С. 99-103.

10. Хитин и хитозан: получение, свойства и применение / под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М. : Наука, 2002. – 368 с.

11. Чуркина Е.В., Кершенгольц Б.М., Шаройко В.В. Эффект препарата «Ягель» из слоевищ лишайника рода Cladonia на секрецию инсулина // Дальневосточный медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 67-70.

Рецензенты

Борисова Н.В., д.м.н., зам. директора по учебной работе Медицинского института СВФУ, г. Якутск.

Нюкканов А.Н., д.б.н., профессор кафедры зоогигиены и внутренних болезней ФГБОУ ВПО «Якутская государственная сельскохозяйственная академия», г. Якутск.