Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирское отделение Российской академии наук

На правах рукописи

Горностай Татьяна Геннадьевна

Химический состав, способ получения и фармакогностическая характеристика мицелия *Inonotus rheades* (Hymenochaetaceae)

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

> Научный руководитель: доктор фармацевтических наук Оленников Даниил Николаевич

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОСНОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. РОД <i>INONOTUS</i> Р. KARST.: ОПИСАНИЕ, ХИМИЧЕСКИ	Й СОСТАВ,
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
1.1. Эколого-морфологическая характеристика кси	ілотрофных
базидиомицетов рода Inonotus P. Karst.	13
1.2. Химический состав видов рода <i>Inonotus</i> P. Karst	17
1.3. Влияние субстратного и светового факторов на химичес	кий состав
базидиальных грибов	24
1.3.1. Влияние субстрата	24
1.3.2. Влияние света	28
1.4. Биологическая активность извлечений из различных видов ро	да Inonotus
P. Karst.	35
1.5. Выводы к главе 1	53
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
2.1. Объект исследования	55
2.2. Микологические методы	55
2.4. Экстракция и фракционирование мицелия	58
2.5. Физико-химические методы	58
2.6. Методы хроматографического анализа (ВЭЖХ-УФ) тритер	пеноидов и
фенольных соединений	59
2.7. Методы выделения и анализа полисахаридов	60
2.8. Методы выделения и анализа жирных кислот	61
2.9. Методы исследования биологической активности ф	ракций и
индивидуальных соединений	62
2.10. Статистическая обработка данных	70
ГЛАВА 3. ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИЦЕЛИЯ <i>I. RHEADES</i>	71
3.1. Обоснование выбора объекта	71
3.2. Биохимический анализ мицелия <i>I. rheades</i>	74

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	133
СПИСОК ТАБЛИЦ	165
СПИСОК РИСУНКОВ	168
ПРИЛОЖЕНИЯ	170
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	171
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	180
ПРИЛОЖЕНИЕ 3	183
ПРИЛОЖЕНИЕ 4	187
ПРИЛОЖЕНИЕ 5	196
ПРИЛОЖЕНИЕ 6	199
ПРИЛОЖЕНИЕ 7	206

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОСНОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC)

ГПС – глюкозо-пептонная среда

ИУК – индолилуксусная кислота

МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот

НЖК – насыщенные жирные кислоты

ННЖК – ненасыщенные жирные кислоты

ЖК – жирные кислоты

РК – ростовой коэффициент

 O_2 - супероксид анион-радикал

ОН - гидроксил-радикал

ОАП – общий антиоксидантный потенциал

ОФС – общее содержание фенолов

ABTS '- 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин)-6-сульфоновая кислота

Ara – арабиноза

Fuc – фукоза

САТ – каталаза

CBA – Carotene Bleaching Assay (эксперимент по изучению антиоксидантной активности, перекисная деструкция каротина)

DCF – 2',7'-дихлородигидрофлюорисцеин

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (одномерный ЯМР эксперимент, усиление без искажений путем переноса поляризации)

Gal – галактоза

Glc – глюкоза

GalA – галактуроновая кислота

GlcA – глюкуроновая кислота

DPPH⁻ – 2,2'-дифенил-1- пикрилгидразилрадикал

HeLa – культура клеток опухоли рака шейки матки человека

HMBC — Heteronuclear Multiple Bond Correlation (двухмерный ЯМР эксперимент, гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия, корреляция между протонами и углеродами)

FRAP – железо связывающая антиоксидантная активность

ІАА – эндогенный инсулин

ІААО – индол-оксидаза уксусной кислоты

IC₅₀ – концентрация 50% ингибирования

 LD_{50} — средняя доза вещества, вызывающая гибель половины членов испытуемой группы

LIOP – низкомолекулярные полисахариды

LPS – липополисахарид

Мап – манноза

MDCK – монослойная культура клеток почки собаки

PI – пропидий йодид

POD – пероксидаза

РРО – полифенолоксидаза

ROS – активные формы кислорода

SOD – супероксиддисмутаза

ТЕАС – антиоксидантная активность эквивалентах тролокса

TYR – тирозиназа

Vero – клеточная линия почки африканской зеленой мартышки

Rha – рамноза

Xyl – ксилоза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В современной медицине и фармакологии все больше внимания уделяется природным источникам биологически активных соединений. Этот интерес обусловлен нарастающим объемом производства синтетических лекарств и все большим количеством нежелательных побочных последствий для организма, а также адаптацией патогенной микрофлоры к вновь созданным препаратам, имеющим узкую направленность в применении. Природные соединения, в отличие от синтетических, имеют многофункциональное и многонаправленное действие в организме, за счет чего в значительной степени снижаются отрицательные последствия и привыкание.

В настоящее время базидиальные грибы рассматривают как источник различных биологически активных веществ. Наиболее изученным широкораспространенным объектом в фунготерапии является стерильный склероций трутовика скошенного [Inonotus obliquus (Ach. ex Pers.) Pilát], формирующийся, в основном, на живых стволах берез. Выявлен широкий диапазон проявления биологических активностей экстрактов и соединений из I. obliquus (Zhong et al., 2009; Zheng et al, 2010; Balandaykin, Zmitrovich, 2015). На основе данного грибного вида разработан ряд лекарственных средств (Кузнецова, 2016; Аляутдин и др., 2009). Однако природная сырьевая база І. obliquus ограничена, а по причине широкого ареала распространения вида и разных условий его произрастания существуют сложности в стандартизации из-за вариабельности его химического состава. В связи многочисленностью видов рода *Inonotus*, значительная часть из них до сих пор малоизучена. Таким образом, изучение химического состава одного из представителей данного рода *I. rheades* – трутовика лисьего, как продуцента потенциального ценных веществ является актуальным.

Углубленное исследование факторов влияющих на накопление целевых веществ данного вида также не проводились. Получение таких знаний необходимо как для фундаментальной науки, так и для возможного применения в биотехнологии с целью управления химическим составом выращиваемого сырья для последующего использования грибных метаболитов.

Степень разработанности проблемы. Анализ литературы показал, что данные о химическом составе многих представителей рода *Inonotus* ограничены или отсутствуют вообще, таким образом, углубленные исследования компонентного состава представителей данного рода необходимы, в том числе *I. rheades*.

Целью исследования явилось изучение химического состава мицелия *Inonotus rheades*, разработка способа его получения и методов анализа.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1. Изучить состав тритерпеноидов, жирных кислот, стирилпиронов и полисахаридов мицелия *I. rheades*.
- 2. Установить особенности изменения химического состава мицелия *I. rheades* полученного с ипользованием различных типов субстрата и параметров освещенности.
 - 3. Разработать способ получения мицелия *I. rheades* сухого.
- 4. Определить товароведческие показатели и разработать методы стандартизации мицелия *I. rheades* сухого.
 - 5. Разработать проект ФПС «Трутовика лисьего мицелий сухой».

Научная новизна. В результате экспериментальной работы был впервые изучен химический состав мицелия Inonotus rheades. Впервые для вида выявлено присутствие стеролов (инотодиол, ланостерол, эргостерол пероксид), лупановых тритерпеноидов (лупеол, бетулин, бетулиновая кислота, бетулон, бетулоновый альдегид, бетулоновая кислота, бетулиновый альдегид), полисахаридов, жирных кислот, также

стирилпиронов (феллинины A1 и A2, 1,1-дистирилпирилэтан, транс-/цис-3-биснорянгонил-14'-гиспидин, 3,14′-бисгиспидинил, биснорянгонины, транс-/цис-гиспидины, гифоломины А и В), в TOM числе нового бис(стирилпирона) – реадинина, представляющего собой 3,3'-этилиден-бис-[4-гидрокси-6-(4-гидроксистирил)-2Н-пиран-2-он]. Установлено, изменение в синтезе стирилпиронов, водорастворимых полисахаридов, жирных кислот и терпеноидов в зависимости от использованого типа субстрата и светового режима при культивирования мицелия *I. rheades*. Впервые показана способность мицелия *I. rheades* к биотрансформации бетулина бетулиновую кислоту.

работы. Выявлена Практическая значимость возможность получения чистой мицелиальной массы *I. rheades* на твердом древесном субстрате разных пород. Показала световая и субстратная зависимость синтеза компонентного состава мицелиальной массы мицелия I. rheades. Предложен способ получения мицелия трутовика лисьего Определены показатели качества нового лекарственного сырья «Трутовика лисьего мицелий сухой» и разработаны методы его стандартизации.

Методология и методы исследования. Методология исследования заключалась в изучении и разработке универсальных физико-химических методик анализа, которые могут быть применены в сквозной стандартизации ЛРС и препаратов с учетом метаболома лекарственных грибов, их обобщении алгоритме выбора методики анализа параметра стандартизации. При выполнении работы были использованы микробиологические, биотехнологические, физико-химические методы, препаративного И аналитического выделения соединений, методы математические методы анализа и обработки результатов.

Степень внедрения. Результаты разработки технологии получения сухого мицелия трутовика лисьего, а также результаты разработки и валидации методики количественного определения гиспидина в грибном мицелии методом ВЭЖХ используются в учебном процессе кафедры химии

и пищевой технологии им. проф. В.В. Тутурина ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет».

На защиту выносятся:

- 1. Результаты исследования химического состава мицелия *I. rheades*.
- 2. Характеристика нового природного соединения реадинин, выделенного из мицелия *I. rheades*.
- 3. Результаты исследований влияния древесного субстрата и освещенности на химический состав мицелия *I. rheades*.
- 4. Показатели качества нового лекарственного сырья «Трутовика лисьего мицелий сухой».

Степень достоверности результатов. Научные положения, выводы диссертационной работы большом объеме основываются на экспериментального материала, полученного с использованием современных химических, физико-химических методов анализа. При выполнении экспериментальной работы части использовано современное сертифицированное оборудование, прошедшее поверку. Все результаты работы обработаны статистически в соответствии с требованиями ГФ РФ XIII издания, а также с помощью программы «Microsoft Excel». Различия группами считались статистически значимыми при p < 0.05. между Достоверность подтверждена многократным повторением экспериментов, валидационной оценкой разработанных методик, статистической обработкой полученных данных.

Апробация работы. Основные положения и результаты работы докладывались и обсуждались на: Всероссийской конференции «Факторы устойчивости растений в экспериментальных природных условиях и техногенной среде» (Иркутск, 2013), III Международной конференции «Biomedical Engineering and Biotechnology. Bio-Medical Materials and Engineering» (Beijing, China, 2014), I Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых «Фундаментальные и прикладные аспекты в медицине и биологии» (Иркутск, 2014), IX Международной конференции

«Биоантиоксидант» (Москва, 2015), Mongolian-Russian forum of young scientists (Ulaanbaatar, Mongolia, 2016), Всероссийской научной конференции школой молодых ученых «Факторы международным участием и устойчивости растений и микроорганизмов в экспериментальных природных И техногенной среде» (Иркутск, 2016), II Всероссийской конференции с участием иностранных ученых «Проблемы изучения и сохранения растительного мира Евразии» (Иркутск - Кырен, Всероссийской научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 2018).

Связь исследования проблемным задач планом фармацевтических Диссертационная работа наук. выполнена соответствии с программой и планом научно-исследовательских работ Института общей и экспериментальной биологии CO РАН (Проект РФФИ № 16-43-030857 на тему: «Фенольные ингибиторы реакции Майларда и некоторых пищеварительных ферментов (амилаза, альфа-глюкозидаза) природного происхождения как модельные соединения для создания антидиабетических лекарственных средств», Проект ЦНМТ СО РАН № 25.10. «Структурно-функциональное на тему: исследование низкомолекулярных фенольных соединений как антитирозиназных агентов», Проект СО РАН № VI.62.1.8 на тему: «Создание лекарственных средств системного действия на основе Тибетской медицины», Проект СО РАН № VI.52.1.3. на тему: «Молекулярно-клеточные механизмы индуцированных патологических состояний и коррекция их средствами природного происхождения»).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности «14.04.02-фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенных экспериментов соответствуют области исследований специальности, конкретно пунктам 3, 5, 6, 7 паспорта специальности «14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Личный вклад автора в получении научных результатов. Автором диссертационной работы проведен поиск и анализ данных по теме исследования, осуществлены планирование экспериментов, сбор данных; соискателем непосредственно проведены все биологические, химические и аналитические эксперименты. Согласно сформулированным задачам подготовлены доклады, тезисы и статьи, оформлена диссертация и автореферат, представленные к защите.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 14 научных работ, в том числе 9 статей в изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 208 печатных страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, трех глав, отражающих результаты собственных экспериментальных исследований, выводов, заключения, списка цитируемой литературы, состоящего из 279 источников, в том числе 241 на иностранном языке, и включает 18 рисунков, 32 таблицы и 7 приложений.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю д.фарм.н. Д.Н. Оленникову за всестороннюю помощь, ценные рекомендации. Автор благодарен д.б.н., профессору Г.Б. советы Боровскому за ценные рекомендации при обсуждении работы, а также сотруднику лаборатории медико-биологических исследований ИОЭБ СО РАН к.фарм.н. Н.И. Кащенко и сотруднику лаборатории физиологической генетики СИФИБР СО РАН к.б.н. А.В. Степанову за помощь в проведении экспериментальной работы И методическую помощь проведении лабораторией исследований. Автор благодарит заведующего физиологической генетики СИФИБР СО РАН д.б.н., О. И. Грабельных и весь коллектив лаборатории за тёплое отношение и моральную поддержку.

<u>ГЛАВА 1. РОД INONOTUS Р. KARST.: ОПИСАНИЕ, ХИМИЧЕСКИЙ</u> СОСТАВ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Эколого-морфологическая характеристика ксилотрофных базидиомицетов рода *Inonotus* P. Karst.

Ксилотрофные базидиомицеты — многочисленная экологическая группа сапротрофных грибов, развивающихся на древесине. Способность разрушать лигноцеллюлозы — важнейшая черта ксилотрофных базидиомицетов, под которыми понимаем собственно дереворазрушающие грибы (Мухин, 1993), способные утилизировать здоровую древесину в качестве источника энергии посредством ферментативного разложения клеточных стенок (Gilbertson, 1980).

Грибы рода *Inonotus* относятся к наиболее известному отделу *Basidiomycota*, классу *Basidiomycetes*, подклассу *Homobasidiomycetidae*, порядку *Aphyllophorales* или непластинчатые, семейству *Hymenochaetaceae*. Плодовые тела однолетние, сидячие, копытообразные, распростертые. Растут одиночно или черепитчатыми группами, без корки на поверхности. Ткань молодых плодовых тел мягкая, мясистоволокнистая, водянистая, с возрастом пробково-мясистая. Споры в зрелости окрашенные. Род относят к грибам белой гнили. Растут на живых и сухостойных деревьях лиственных пород, валеже. Род *Inonotus* насчитывает 18 видов грибов (Ryvarden, Gilbertson, 1993). Наиболее изученным и широкораспространённым видом является *I. obliquus*.

Inonotus obliquus (Fr.) Pilat. – Трутовик скошенный.

Распространение. На протяжении всего ареала *Betula sp*. Редко встречается в Великобритании и вдоль западного побережья Европы. Циркумбореальной в бореальных лесных экосистемах с *Betula* и в меридиональных горных лесах с *Fagus*. Встречается также в Азии и Северной Америке (Ryvarden, Gilbertson; 1993 Ниемеля, 2001).

Субстраты. Часто: виды *Betula*, *Fagus*; редко: виды *Acer*, *Alnus*, *Populus*, *Quercus* (Ryvarden, Gilbertson, 1993).

Описание. Плодовое тело однолетнее, может достигать очень больших размеров, твёрдое. Плодовое тело развивается только один раз, после смерти дерева-хозяина. Активно растущая поверхность пор тёмного цвета корицы и с шелковатым блеском, у полностью выросших грибов становится кофейно-коричневой и теряет блеск (Ниемеля, 2001). Поры крупные 6-8 мм. На срезе: подстилка и трубочки темно-коричневые; контекст в области раздувшихся краев и узлов волокнистый, с сильным металическим блеском (Ниемеля, 2001). Базидиоспоры эллипсоида яйцевидные 9-10×5,5-6,5 мкм. *І. obliquus* образует заметные черные «стерильные» выросты на живых деревьях (рис. 1), которые широко используются в России и странах Азии для медицинских целей. Стерильные наросты многолетние, чёрные, шершавые, размером с кулак или больше, коричневого цвета внутри (Ниемеля, 2001). Гифальная система мономитическая, гифы без пряжек, коричневые, щетинки коричневые, формы узкой луковицы. (Ryvarden, Gilbertson, 1993; Ниемеля, 2001).

Inonotus rheades (Pers.) Karst. – Трутовик лисий.

Распространение. Восточный вид, в Европе с севера на юг центральной части Норвегии и Швеции. В Центральной Европе, известен в Восточной Франции, редко встречается в Дании и Северной Германии. Циркумбореальный, известен также в Азии и Северной Америке (Ryvarden, Gilbertson, 1993; Ниемеля, 2001).

Субстраты. Часто: *Populus tremula* (Европа); редко: другие виды *Populus*, виды *Quercus*, *Salix*, *Sorbus* (Ryvarden, Gilbertson, 1993).

Описание. Однолетний, имеет шляпку, одиночный или растёт группами из нескольких шляпок, средних размеров, плоский или трёхгранный, имеет толстое основание, с равномерно окрашенной верхней поверхностью (рис. 1) (Ниемеля, 2001). Старое основание шершавое коричневого цвета, молодые крайние зоны волосистые жёлто-коричневого

цвета. Верхняя поверхность темная, активно растущий край бледный, мягкий, матовый. Поры размером 2-3×1 мм, угловатой или извилистой формы, с поверхностью коричневого цвета. На срезе: контекст волокнистый, светлее сверху и темнее ближе к трубчатому слою (изменение цвета

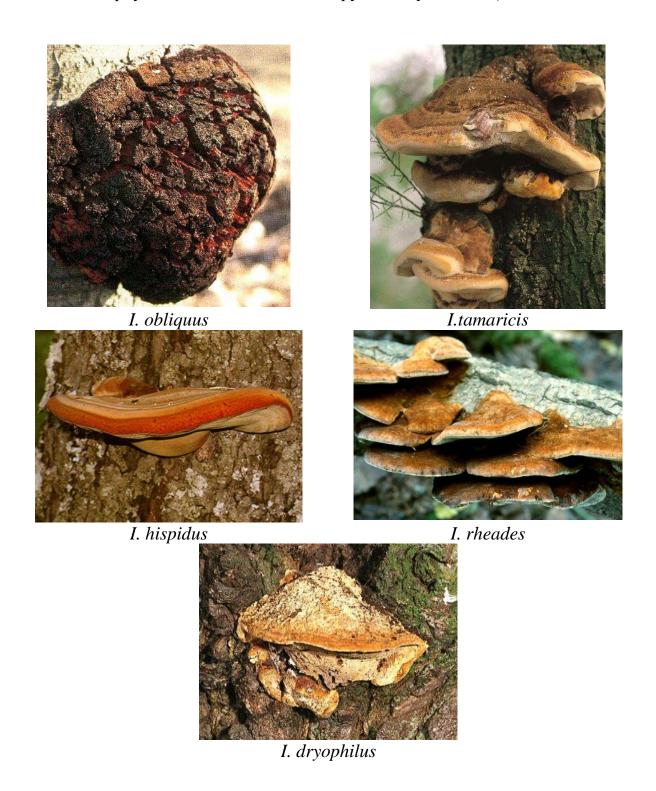


Рисунок 1 — Виды *Inonotus* (взято с ресурса

http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=13696&Fields=All)

постепенное); общая толщина трубочек 2-4 см тёмно-коричневого цвета. Гифальная система мономитическая, гифы без пряжек, коричневые, без щетинок. Базидиоспоры яйцевидной формы в виде эллипсоида 5-6×3,5-4 мкм (Ryvarden, Gilbertson, 1993; Ниемеля, 2001).

Inonotus hispidus (Bull.:Fr.) Karst – Трутовик щетинистоволосый.

Распространение. Восточный вид, в Европе с севера на юг, в центральной части Норвегии и Швеции. В Центральной Европе, встречается в Восточной Франции, редко в Дании и Северной Германии. Циркумбореальный и известен также в Азии и Северной Америке (Ryvarden, Gilbertson, 1993; Ниемеля, 2001).

Субстраты. Часто: *Populus tremula* (Европа); редко: другие виды *Populus*, виды *Quercus*, *Salix*, *Sorbus* (Ryvarden, Gilbertson, 1993).

Описание. Плодовые тела однолетние, размер шляпок $5\times8\times2$ см. Верхняя поверхность бархатистая, имеет рыжий цвет, темнеющая с возрастом, край тупой (рис. 1). Нижняя поверхность цвета корицы, поры угловатые $2-4\times1$ мм. На срезе: контекст кофейно-коричневый, волокнистый, 1-4 см толщиной (Ниемеля, 2001). Гифальная система мономитическая, гифы без пряжек, коричневые, щетинки коричневые, редкие, споры с толстыми стенками коричневые $8,8-10,4\times7,5-8,8$ мкм (Ниемеля, 2001). Базидии широко булавовидные $20-27\times9-11$ мкм (Ryvarden, Gilbertson, 1993; Ниемеля, 2001).

Inonotus dryophilus (Berk.) Murr. – Трутовик древолюбивый.

Распространение. В южно-центральной части Европы, очень редко в Фенноскандии, (в Швеции и Финляндии). Широко распространен в Европе. Циркумбореальный в северной умеренной зоне через Азию в Северную Америку (Ryvarden, Gilbertson, 1993; Ниемеля, 2001).

Субстраты. Часто: *Quercus Petrea*, *Q. Robur* (Европа); реже: виды *Eucalyptus* и *Fraxinus* (Ryvarden, Gilbertson, 1993).

Описание. Плодовые тела однолетние, шляпки размером 11×19×9 см. Верхняя поверхность красновато-коричневого цвета, войлочные или голые, край закругленный (рис. 1). Поры угловатые, размером 1-3 мм, с

шероховатой темно-красно-коричневой поверхностью. Контекст коричневого цвета, с тонким волокнистым слоем, трубочки беловатые внутри, толщиной до 3 см. Гифальная система мономитическая, гифы без пряжек, коричневые, без щетинок, молодые споры декстриноидные, старые споры коричневые безцветные 6,5-7,8×5-5,8 мкм (Ниемеля, 2001). Базидии булавовидные 17-20×6-8 мкм (Ryvarden, Gilbertson, 1993; Ниемеля, 2001).

Inonotus tamaricis (Pat.) Maire – Трутовик тамарисковый.

Распространение. Южная Европа (Португалия, Франция, Италия и Югославия), Израиль, Центральная Азия, Северная Африка и Сенегал.

Субстрат. Исключительно на видах *Tamarix* (Ryvarden, Gilbertson, 1993).

Описание. Плодовые тела однолетние, мягкие, когда свежие хрупкие, когда сухие, до 9 см в ширину и длину, 2-5 см толщиной. Верхняя поверхность колючая, ржаво-коричневого цвета, с возрастом становится голой и черной (рис. 1). Поверхность пор ржаво-коричневого цвета, поры угловатые, 1-2 MM. Контекст ржаво-коричневый, волокнистый, чередованием светлых и темных зон, слой трубочек ржавый коричневый, толщиной до 3 см. Гифальная система мономитическая; гифы волокнистого контекста с простыми перегородками, от желтого до коричневого цвета. Щетинки отсутствуют. Споры почти шаровидные до эллипсоида, ржавокоричневого цвета, толстостенные, гладкие. Базидии широко булавовидные 7-9,5×5-7 мкм (Ryvarden, Gilbertson, 1993; Ниемеля, 2001).

1.2. Химический состав видов рода Inonotus P. Karst.

Известные сведения о химическом составе грибов рода *Inonotus* в научной литературе касаются соединений фенольной природы (Приложение 1), терпеноидов, летучих и углеводных компонентов.

Фенольные соединения. Из этилацетатного извлечения плодовых тел *I. obliquus* было выделено семь соединений, являющихся производными фенольных кислот и альдегидов: 2-гидрокси-1-гидроксиметилэтиловый эфир $(1),^{1}$ сиреневой кислоты протокатеховая (2),3,4кислота гидроксибензальдегид (3),сиреневая (4),2,5кислота дигидрокситерпаталовая кислота (5),кофейная кислота **(6)** и 3,4-80% дигидроксибензальацетон **(7)**. Доминирующими соединениями метанольного извлечения плодовых тел *I. obliquus* были 2, 3, 6 и 7 (Nakajima et al., 2007). В плодовых телах I. obliquus из Кореи доминировала nоксибензойная кислота (8) (263 мкг/ Γ), а также обнаружены феруловая (9), гомогентизиновая (10), сульфосалициловая (11), o-кумаровая кислоты (12), кемпферол (13), нарингин (14), ванилин (15), резвератрол (16) и кверцетин (17), (Kim et al., 2008). В ходе биоконтролируемого фракционирования с радикалом $ABTS^{+}$ этилацетатного и бутанольного извлечений I. obliquus были выделены шесть соединений, обладающих высокой антирадикальной активностью, производные гиспидина — инонобилины A(18), B(19), C(20), феллигридины D (21), E (22), G (23) (Lee et al., 2007a). Гиспидин (24) впервые выделили из плодового тела *I. hispidus* (Edwards et al., 1961), культурального мицелия I. hispidus, а также его димер биснорянгонин (25) (Perrin, Towers, 1973) и гисполон (**26**) (Awadh Ali et al., 2003). Позднее из плодовых тел *I*. xeranticus выделен гиспидин (24) и его димеры, 3,14'-бигиспидинил (27), гифоламин В (28) и 1,1-дистирилпирилэтан (29) (Jung et al., 2008). Zheng c соавторами в плодовых телах *I. obliquus* из Китая идентифицировали 15 фенольных соединений, а в культуральной жидкости – 12. В составе плодовых тел obliquus обнаружены производные гиспидина феллигридины A (30) и D (21), иноскавины A (31) и B (32), а также такие фенольные соединения как протокатеховая (2), галловая (33), феруловая кислоты (34), 2,3-дигидроксибензальдегид (35) и флавоноиды – кемпферол

 $^{^{1}}$ Здесь и далее цифры приведенные жирным шрифтом в скобках после названия химического соединения, далее используются для его краткого обозначения в тексте.

(13), нарингенин (36), нарирутин (37), фортунелетин (38), эриоцитрин (39) и эпигаллокатехин (40). Иноскавины А (31) и В (32) (в сумме около 25%), феллигридины А (30) и D (21) (в сумме около 20%) были доминирующими (Zheng et al., 2008). Феллигридины А (30) и D (21) впервые были выделены из *Phellinus ignarius* (Мо et al., 2003; 2004), а иноскавины А (31) и В (32) – из *I. xeranticus* (Кіт et al., 1999; Lee et al., 2006). Из плодовых тел *I. xeranticus* были выделены феллигридин F (41), метилиноскавин А (42), иноскавин В (43) и метилиноскавин В (44) (Lee et al., 2006), иноскавин С (45) и метилиноскавин С (46), даваллиалактон (47), метилдаваллиалактон (48) (Lee, Yun, 2006), иноскавин D (49), метилиноскавин D (50), феллигридин D (21), 3,4-дигидроксибензальдегид (3), протокатеховая кислота (2) (Lee et al., 2006а), иноскавин Е (51) (Lee et al., 2007), интерфугины А (52), В (53), С (54) (Lee, Yun, 2007).

В составе культуральной жидкости I. obliquus обнаружены кемпферол (13), нарингенин (36), нарирутин (37), эпигаллокатехин (40), нарингин (14), эпикатехингаллат (55), галловая (33) и феруловая (34) кислоты, иноскавин А (31) и фортунелетин (38). Доминирующими являлись кемпферол (13) (30-40% от общего числа фенольных соединений) и нарингин (14) (Zheng et al., 2008). В мицелии *I. obliquus* обнаружено 26 фенольных соединений, включая фенолокислоты – протокатеховую (2), кофейную (6), галловую (33), феруловую (34), 2,5-дигидрокситерефталевую (56), *п*-кумаровую кислоты (57); флавоноиды – кемпферол (13), нарингенин (36), нарингин (14), кверцетин (17), изорамнетин (58), лютеолин (59), апигенин (60), роифолин **(61)**, изороифолин **(62)**, изорамнетин-3-рутинозид **(63)**, рутин **(64)**, нарирутин (37); полифенолы – феллигридин G (23), иноскавин В (32), эпикатехингаллат (55), феллигридин F (41), эпигаллокатехингаллат (65), даваллиалактон (47) (Zheng et al., 2009). Содержание данных соединений варьировалось в зависимости от возраста культуры и среды. Так, например, доминирующими соединениями при культивировании в течение 72 ч были галловая (33), кофейная (6) и феруловая (34) кислоты, а к 168 ч преобладали рутин (64) и нарирутин (37). Флавоноидные агликоны и полифенолы были минорными компонентами. При обработке мицелия пероксидом водорода наблюдались значительные изменения, при которых доминирующими соединениями становились флавоноидные агликоны и полифенолы на всех периодах роста. В составе экзоцеллюлярных компонентов обнаружены те же соединения за исключением феруловой кислоты (34) и роифолина (61). Также из *I. obliquus* выделен фенольный пигмент фускопорин (66) (He, Feng, 2001).

Содержание общих фенолов *I. clemensiae* и *I. cuticularis* составляет 643,2 и 102,8 мг-экв. галловой кислоты/г (Tamrakar et al., 2016).

Тритерпеновые соединения. В разное время из склероциев І. obliquus было выделено более сорока соединений, включая 3β гидроксиланоста-8,24-диен-21-аль **(67)** (Kahlos al., 1984), $3\beta,22$ et дигидроксиланоста-8,24-диен-7-он (68)(Kahlos, 1986), $3\beta,21$ дигидроксиланоста-8,24-диен (**69**), 3β ,22,25-тригидроксиланоста-8,23-диен (70) (Kahlos, Hiltunen, 1986a), 3β ,22-дигидроксиланоста-7,9(11),24-триен (71) (Kahlos, Hiltunen, 1986b), инотодиол (72), ланостерол (73), траметеноловая кислота (74), метилтраметенолат (75) (Kahlos et al., 1987), 3β -гидрокси-8,24диен-ланоста-21,23-лактон (76), 21,24-циклопенталаноста- 3β ,21,25-триол-8ен (77), 3β ,22,25-тригидроксиланоста-8-ен (78) (Shin et al., 2002), 3β -(Shin al., гидрокси-8,24-диен-ланоста-21,23-лактон **(79)** et 2000), фускопорианолы A (**80**; 25-метокси-21,22-циклоланоста-8-ен-3 β ,21 α -диол), В (81; 3β ,22-дигидроксиланоста-8,23*E*-диен-25-пероксид), С (82; 3β ,22 α ,25тригидроксиланоста-8,23E-диен) (He et al., 2001), 3 β -гидроксиланоста-8,24диеновая-21-кислота (83), $3\beta,22R$ -дигидроксиланоста-8,24-диен эргостерола пероксид (85) (He, Feng, 2001a), 21,24-циклопенталаноста- 3β ,21,25-триол-8-ен (**86**) (Shin et al., 2001a), 3β ,22,25-тригидроксиланоста-8ен (87) (Shin et al., 2001b), ланост-24-ен-3 β ,21-диол (88) (Zhao, Piao, 2006), инонотсутриолы A (89; $(3\beta,21R,24S)-21,24$ -циклоланост-8-ен-3,21,25-триол), **(90**: В $(3\beta,21R,24R)$ -21,24-циклоланост-8-ен-3,21,25-триол), **(91**; $(3\beta,21R,24S)$ -21,24-циклоланоста-7,9(11)-диен-3,21,25-триол) (Тајі al.,

2008), **(92**; ланоста-8,24-диен-3 β ,11 β -диол), инонотсудиол A инонотсуоксодиол A (93; (22R)-3 β ,22-дигидроксиланоста-8,24-диен-11-он) (Taji et al., 2008; Handa et al., 2010), инотерпены A (94), B (95), C (96), D (97), Е (98), F (99), 3β ,25-дигидроксиланоста-8,23-диен (100) (Nakamura et al., 2009), инонотсуоксодиол В (**101**; 3β ,22R-дигидроксиланоста-9(11),24-диен-7он), инонотсуоксодиол С (**102**; 3β ,22R-дигидроксиланоста-7,24-диен-11-он), эпокси-инонотодиол (103; $9\alpha,11\alpha$ -эпокси-ланоста-7,24-диен-3 β ,22R-диол), метокси-иноноцетриол (**104**; 7β -метоксиланоста-8,24-диен-3 β ,11 α ,22R-триол) (Handa et al., 2012), инонутаны A (**105**; $(3\beta,215,24R)$ -21,24-циклоланост-8-ен-3,21,25-триол), В (**106**; ($3\beta,21S,24S$)-21,24-циклоланост-8-ен-3,21,25-триол), С (107; 3β -гидрокси-25,26,27-тринорланоста-8,22*E*-диен-24-аль), 3β -гидрокси-25,26,27-тринораланоста-8,22*E*-диен-24-овая кислота (**108**) (Zhao et al., 2015).

В мицелии *I. obliquus* были обнаружены **71**, **73**, **85**, эргостерол (**111**) (Shin et al., 2002), **67**, **69**, **72**, **74**, **75**, **78** (Shin et al., 2004), а в погруженной культуре *I. obliquus* — инотолактоны A (**110**; (22R)-3 β -гидрокси-24-метилланоста-7,9,24(25)-триен-26,22-олидин), В (**111**; (22R)-3 β -гидрокси-24-метилланоста-8,24(25)-диен-26,22-олидин) и С (**112**; (5 α H,8 β H,9 α H)-3 β -гидроксидриман-12,11-олидин) (Ying et al., 2014).

Установлено, что прекурсором в склероциях полученного при «шейкерном» и стационарном культивировании мицелия является ланостерол (73) (Shin et al., 2004). Эргостерол (109) и его пероксид (85) были выделены из «шейкерной» культуры, а замещенные по С-21 и С-22 производные ланостерола – выделены из стационарной культуры.

Исследование стерольных компонентов в мицелии *I. obliquus* при выращивании в полевых условиях и стационарном культивировании мицелия показали, что мицелий, полученный в полевых условиях, содержал инотодиол (72) и ланостерол (73) как доминантные и другие стеролы, включая 24-метилен-дигидроланостерол (113), 4,4-диметил-фекостерол (114), 4-метил-фекостерол (115), фекостерол (116), эпистерол (117), ланостерин (118), инотодиол (119), траметеноловую кислоту (120), фоскопарианол В

(121) и D (122) (Zheng et al., 2007). В культивированном мицелии эргостерол (109) определяется как преобладающий, ланостерин (73) и эргостерин (123) — в качестве второстепенных компонентов.

Из плодового тела *I. rickii* выделены инонотовая кислота A (**124**), 3-O-формил-инонотовая кислота A (**125**), инонотовая кислота B (**126**) и 3α ,6 β -дигидроксициннамолид (**127**) (Chen et al., 2014). Из плодового тела *I. vaninii* был выделен новый сесквитерпен, названный инонолан A (**128**), феллилан D (**129**) и *N*-[2-(1*H*-индол-3-ил)-2-оксоэтил]ацетамид (**130**) (Yang et al., 2013).

Меланин. Исследование элементного состава пигмента погруженной культуры *I. obliquus* выявило содержание 38,2% С, 5,54% Н и следовые количества N (Bisko et al., 2002), фракции меланина склероция I. obliquus содержали 48,63-60,17% С, 4,48-5,92% Н, 33,89-45,01% О и 0,19-0,49% N (Olennikov et al., 2012), а фракции меланина спор *I. obliquus* 46,77–59,00% С, 3,73-4,50% H, 0-0,40% N и 0-0, 03% S (Mazurkiewicz, 2006). Для меланинов погруженной культуры *I. obliquus* было характерно содержание групп: СООН -0.93%, C=O -1.05%, OCH₃ -0.96%, общие гидроксильные группы OH -16,9%, включая алифатические группы, 15,65% и фенольные группы 1,25% (Babitskay et al., 2002). Количество функциональных групп меланинов склероция: СООН - 2,33-10,40%, фенольных гидрогсилов 1,96-5,61%, пирокатехол гидроксидов 1,06–2,15% (Olennikov et al., 2012). ИКспектрометрия выявила для меланинов спор наличие групп ОН и NH, C=O и ароматического кольца, а также C-O, C-OH, C-O-C, COO (Mazurkiewicz, 2006). Анализ элементов и функциональных групп, а также спектры УФвидимого, ИК-излучения и термические исследования выявили структурные различия в составе меланина культивируемого *I. obliquus* от природной формы, с более сложной структурой последнего (Kukulyanskaya et al., 2002).

Углеводы. Из мицелия *I. obliquus* были выделен сорбит (Shin et al., 2002) и маннит (He, Feng, 2001). Химическое исследование суммарной полисахаридной фракции *I. obliquus* (IOPS) показало, что она содержит нейтральные и кислые углеводы в соотношении 3,03:1, а также белок – до

42,5% от массы фракции. Нейтральные углеводы представлены рамнозой, ксилозой, галактозой и глюкозой (Chen et al., 2009). Из мицелия I. obliquus, полученного при жидком культивировании, выделен глюкоманнан с неустановленной структурой, содержащий маннозу, фукозу, глюкозу (Кіт еt al., 2006). Водорастворимый полисахарид IP3a, выделенный из I. obliquus, состоял из рамнозы, арабинозы, глюкозы и галактозы в молярном отношении 2,5:4,6:1,0:2,6 со средней молекулярной массой 48 820 Да (Chen et al., 2015). Щелочнорастворимые полисахариды из *I. obliquus* (IOA1, IOA2 и IOA3) 6.1×10^4 , 2.9×10^4 и 3.5×10^4 г/моль, массы молекулярные имели соответственно. Результаты анализа моносахаридов показали, что ІОА1 главным образом состоял из глюкозы, галактозы, маннозы и ксилозы в молярных соотношениях 9:1:1:4. ІОА2 в основном состоял из глюкозы, галактозы и ксилозы в молярных соотношениях 12:3:4, тогда как ІОАЗ в основном состоял из тех же моносахаридов в молярных соотношениях 5:1:2 (Niu et al., 2016).

Из плодового тела *I. obliquus* был выделен и охарактеризован гомогенный полисахарид со средним молекулярным весом 6,3 кДа (AIOPA) с общим содержанием сахара 92,6%, белка 7,2%, уроновой кислоты 3,1%. АІОРА состоял из L-рамнозы, D-ксилозы, D-манозы, D-галактозы, D-глюкозы и D-галактуроновой кислоты в молярном соотношении 3,09:1,61:2,06:4,45:19,7:1 (Zhang et al., 2011).

В склероциях *I. obliquus* были обнаружены водорастворимые гетерополисахариды с доминированием глюкозы, маннозы и галактозы — Un-IOPS (2,7:1,2:1), глюкозы и галактозы — Su-IOPS (6,0:1), Ac-IOPS (4,4:1), глюкозы, ксилозы и маннозы — Ca-IOPS (5,1:2,4:1) (Ma et al., 2012), глюкозы, рамнозы и галактозы — IOPS-F (1,2:1,1:1) и IOPS-H (1,32:1,29:1), галактозы и рамнозы — IPOS-V (1,6:1) (Ma et al., 2013a).

Биомасса *I. levis* в основном содержит полисахарид следующей структуры: β -GlcA-(1 \rightarrow 2)- α -gal-(1 \rightarrow 6)- α -Gal3OMe-(1 \rightarrow [\rightarrow 6)- α -gal-(1 \rightarrow 6)- α -Gal3OMe-(1 \rightarrow] (Vinogradov, Wasser, 2005).

Летучие компоненты. В составе летучих компонентов *I. obliquus* (0,01% от массы плодовых тел) были обнаружены представители разных классов соединений (Nahla et al., 2009). Нетерпеноидные соединения были представлены в основном окисленными алифатическими соединениями и жирными кислотами, причем основным является линолевая кислота. В составе сесквитерпеновых соединений (32,5%) обнаружены β -селинен (16,4%), *цис*- и *транс*-бергамотены, α -сантален, β -сесквифенхен, *эпи*- β -сантален, фотосанталол, β - и γ -эудесмол. В ходе другого исследования было показано, что основными летучими компонентами *I. obliquus* являются инотодиол (35,5%) и ланостерол (49,7%) (Ji et al., 2007).

Таким образом, мы видим, что наиболее химически исследованным представителем рода *Inonotus* является *I. obliquus*, другие виды данного рода менее изучены. Всвязи с этим, использование в качестве объектов исследования неизученных и малоизученных представителей рода *Inonotus* важно как для фунфаментальной, так и для прикладной науки.

1.3. Влияние субстратного и светового факторов на химический состав базидиальных грибов

1.3.1. Влияние субстрата

Распределение грибов по территории и возможность произрастания в определенных территориях в первую очередь зависит от лесного массива (Мухин, 1993). Данные знания используют при подборе субстратов и составлении сред с добавлением природного сырья для увеличения скорости роста и выхода биомассы при культивировании грибов. Так на среде с 3% содержанием опилок древесины березы увеличивается линейная скорость роста мицелия *I. rheades*, *H. coralloides*, *H. ulmarius* (Горностай и др., 2014а). Использование модифицированной среды Королевой-Скоробогатько с подсолнечной лузгой и глицерином в концентрации 1-3% при поверхностном культивировании трутового гриба *Fomes fomentarius* увеличило выход

грибной биомассы в 1,6-1,7 раза (Шараева и др., 2014). Геометрические соотношения формы и размера волокна жмыха сахарного тростника сильно влияют на плотность упаковки субстрата и воздействуют на производство внеклеточных ферментов, темпы роста *Pleurotus ostreatus* и изменения состава в субстрате. При использовании частиц с размером 0,92 мм, 1,68 мм и 2,9 мм в диаметре, самая высокая селективность по отношению активностей ксиланазы к целлюлазе, что соответствует максимальному количеству гемицеллюлаз, наблюдалась при использовании частиц размером 1,68 мм. Лигнин и целлюлоза преимущественно разлагаются в мельчайших частицах 0,92 мм (Membrillo et al., 2011).

Показано влияние древесного субстрата на содержание экстрактивных веществ из плодовых тел *Daedaleopsis tricolor*. Количество общего белка, полисахаридов, каротиноидов и фенолов различались при исследовании плодовых тел, собранных с березы и ивы (Проценко и др., 2014).

Широко исследуется влияние субстратного фактора на ферментную активность грибов в культуре. При исследовании ингибиторов субстратной специфичности POD у Bjerkandera fumosa, показано, что добавление NaN₃, твин-80, антрацена и флуорена в среду приводит к снижению активности фермента, но добавление в среду *п*-аминобензойной кислоты увеличивает ее (Pozdnyakova et al., 2013). В фильтратах культуральной жидкости F. fomentarius обнаружены ферменты, способные окислять пирокатехин. На среде Королевой-Скоробогатько с подсолнечной лузгой с концентрацией глицерина 1% наблюдается значительное увеличение окислительной активности фильтратов культуральной жидкости, а 3% глицерина в среде существенно снижали окислительную активность фильтратов (Шараева и др., 2014). Широкая субстратная специфичность на производство фермента пиранозин 2-оксидазы была показана для погруженной культуры T. versicolor. Субстрат, содержащий 12 г/л соломы клевера в водопроводной воде, на 9-й день культивирования давал наибольшее количество пиранозин 2-оксидазы – 2,332 ед/г (Pazarlioglu et al., 2012). При исследовании использования оливковых листьев в качестве субстрата для производства лакказы грибом белой гнили *T. versicolor* FPRL 28A INI при твердофазных условиях ферментации выявлено, что высокую активность лакказы (276,62±25,67 ед/г сухого субстрата) можно получить при достижении 80% исходной влажности, размере частиц 1,4-1,6 мм и внесении 1% дрожжевого экстракта (Aydinoglu, Sargin, 2013). Наиболее эффективным индуктором синтеза лакказы *Coriolus hirsutus* был сирингалдазин, добавление которого в среду в концентрации 0,11 мкМ позволило увеличить выход фермента на 1000% (Koroljova-Skorobogat'ko et al., 1998).

Производство экзополисахаридов в погруженной культуре дает уникальные преимущества, связанные cвысокой концентрацией относительно чистого продукта, воспроизводимостью процесса и стабильных затратах, а также с независимостью от сезонных колебаний (Shin et al., 2007). Изучение оптимального состава среды культивирования показало, что добавление различных жирных кислот, поверхностно-активных веществ и органических растворителей В качестве клеточных мембранореорганизующих веществ стимулирующее химических оказывает воздействие производство экзополисахаридов (EPS) на рост И эндополисахаридов (IPS) грибного мицелия. Добавление 0,1% твин 80, на ранней стадии роста, обеспечивает максимальное производство биомассы, EPS, IPS1 и IPS2 мицелия *I. obliquus* с увеличением на 16,6, 81,6, 37,7 и 18,1% соответственно (Xu et al., 2015). Использование мальтозы, нитрата кальция, пептона, сульфатов меди и марганца приводит к выраженному повышению содержания полисахаридов в мицелии *I. obliquus* (Zhou et al., 2006). Улучшение процесса накопления полисахаридов в *I. obliquus* с помощью глубинной ферментации позволило достичь максимального производства полисахарида вплоть до 3,9-7,8 г/л (Chen et al., 2007; Zhang et al., 2009).

Источники питания оказывают влияние на количественный выход липидов. Содержание суммарных липидов для погруженных культур

Agrocybe aegerita, Laetiporus sulphureus, Lentinus edodes в большей степени зависело от источника азота (Винокуров и др., 2011).

Экстракты культуры Mycena leptocephala показали более высокий противогрибковой активности, когда солодовый добавлением глюкозы были использованы в качестве источника углерода и дрожжевой экстракт в качестве источника азота. При использовании крахмала в качестве источника углерода для роста грибов наблюдался самый низкий уровень роста и противогрибковой активности (Vahidi et al., 2004). Добавление лигноцеллюлозных материалов при жидком культивировании І. obliquus увеличивало выход экзо- и внутриклеточных фенольных соединений (соответственно, ЕРС И IPC) и ИХ антиоксидантную активность. Производство EPC и IPC значительно улучшилось при добавлении соломы пшеницы (на 151,2 и 45,3%), сахарного тростника (на 106,9 и 26,1%) и рисовой соломы (на 67,6 и 38,9%). Выявлено увеличение полифенолов: эпикатехин-3-галлата, эпигаллокатехин-3-галлата И фелигридина даваллиялактона на всех трех средах (Zhu, Xu, 2013). Усиление производства и антиоксидантной активности экзополисахаридов культуры I. obliquusвыявлено при добавлении в среду культивирования кукурузного мотыля в качестве источника лигноцеллюлозы (Xiang et al., 2012).

Выявлена способность регулировать накопление каротиноидов в мицелии некоторых базидиальных грибов. Внесение в стандартную глюкозопептонную среду (ГПС) пептона в концентрации 5 г/л вызывает повышение содержания каротиноидов у штамма *L. sulphureus* Ls-08, для штаммов *Fasciola hepatica* Fh-18 и *F. fomentarius* Ff-1201 – в концентрации 4 г/л. Также целесообразно внесение в ГПС пролина или валина при культивировании штамма *L. sulphureus* Ls-08; аланина – штамма *F. fomentarius* Ff-1201; пролина, аспарагина и серина – штамма *F. hepatica* Fh-18 (Велигодская и др., 2014). Гидролизат осажденных горчичных отходов улучшил производство астаксантина в *Xanthophyllomyces dendrorhous* в 11 раз по сравнению с обычно используемой коммерческой солододрожжевой

средой, в 1,3-2,1 раза по сравнению с другими экстрактами горчичных отходов (экстракт остатков горчичных отходов, гидролизат остатков горчичных отходов и осажденный экстракт отходов горчицы) (Tinoi et al., 2006).

1.3.2. Влияние света

Свет имеет определяющее значение для жизни фотосинтезирующих организмов, а также служит важным экологическим фактором для нефотосинтезирующих видов. Известно, что грибы имеют светочувствительные системы – хроматофоры, воспринимающие свет и участвующие в ответных реакциях грибного организма (Purschwitz et al., 2006). Для грибов отмечено существование механизмов восприятия УФ излучения, синего, зеленого и красного света (Purschwitz et al., 2006; Herrera-Estrella, Horwitz, 2007).

Свет оказывает непосредственное влияние на морфологию развития и физиологию грибов (Tisch, Schmoll, 2010), в частности, образование гимений и шляпки у грибов индуцируется светом (Бисько, Дудка, 1987). Например, образование гимений и шляпки *Polyporus brumalis* зависело от наличия света (Zharikova et al., 1977). Свет ведет к интенсивному производству плодовых тел *Pleurotus sajor-caju* и *P. eryngii*, а также структурной деградации субстрата (Каmra, Zadrazil, 1986). Максимально активное формирование примордий и созревание базидиокарпов *Coprinus stercorarius* происходило при освещении светом с длинной волны в диапазоне 440-470 нм (Ellis et al., 1999).

Развитие современных технологий привело к возможности более детального исследования влияния света разных участков спектра на рост грибов с использованием светодиодных ламп, которые все чаще применяют в биотехнологических целях. Отмечено усиление роста и увеличение выхода биомассы мицелия *Laetiporus sulphureus* (Поединок и др., 2007), *Coprinus vaporaris* и *Serpula lacrimans* (Manachere, 1971) при использовании красной

области спектра. Наибольший выход биомассы для мицелия Ganoderma lucidum выявлен при использовании белых светодиодов, хотя наибольшая скорость роста наблюдалась в темноте (Wangun al., 2011), близкий эффект выявлен при использовании красных и синих светодиодов (Poyedinok et al., 2008; Wang et al., 2011; Mei et al., 2013). Зеленый свет облучения снижал темпы роста и общий выход мицелиальной массы для этого гриба (Mei et al., 2013). Следует отметить, что более выраженный стимулирующий эффект когерентного и импульсного света на продукцию мицелиальной массы G. lucidum по сравнению с некогерентным и непрерывным светом (Poyedinok et al., 2008). Перспективность использования синих и зеленых диодов отмечена для получения большого количества плодовых тел Hypsizigus marmoreus (Namba et al., 2002), а для Pleurotus citrinopileatus красных, при этом полученные плодовые тела имели более высокую биологическую эффективность (Hu et al., 2013). Повышение биологической активности также глубинной *P*. обнаружено при облучении культуры ostreatus. Низкоинтенсивное лазерное облучение с длиной волны 632,8 нм в непрерывном и импульсном режиме позволило увеличить антимикробную активность мицелия и культуральной жидкости P. ostreatus к Micrococcus luteus, Staphyloccocus aureus и Bacillus mycoides на 10-20% (Поединок и др., 2007).

Использование светодиодов в культивировании грибов позволило также оценить влияние интенсивности и времени воздействия светового потока на рост мицелия. В ряде работ отмечено подавление роста с повышением плотности потока фотонов, так, для мицелия *P. ostreatus* наблюдалось замедление роста при обработке синим светом в ряду (6, 11, 26, 51, 105 мкмоль/м/с) (Nakano et al., 2010). Мощность зеленого света свыше 1,8 Вт/м² уменьшала выход биомассы *Lentinula edodes* на 50% по сравнению с мощностью 0,4 Вт/м² (Glukhova et al., 2014).

Время светового воздействия влияет на морфологию развития мицелия. Кратковременная световая обработка стимулирует рост и производство

биомассы вегетативного мицелия. Данный эффект показан для мицелия *I. obliquus* при воздействии когерентным синим светом низкой интенсивности (Poyedinok et al., 2015), а также при облучении УФ длительностью 4 мин/сут (Zhang, 2008). Для мицелия *Lentinula edodes*, освещенного зеленым светом интенсивностью 0,4 Вт/м² в течение 1 мин/сут, наблюдали увеличение биомассы на 50-100%, при этом световая обработка 30 мин/сут уже не оказывала положительного эффекта в повышении выхода мицелиальной массы (Glukhova et al., 2014).

В настоящее время доказано влияние света на метаболизм грибов (Tisch, Schmoll, 2010). Культивирование в непрерывной темноте усиливало образование фелигридинов, даваллиялактонов и иноскавинов. Образование фелигридинов и даваллиялактонов также отмечается в мицелии, выращенном в синем и красном свете, однако с меньшим содержанием, чем в темноте. Кроме того, полифенолы, синтезированные в условиях дневного света, показали меньший антиоксидантный потенциал, чем таковой в других освещенности (Zheng et al., 2009a). Под действием света отмечено изменение полисахаридов. Использование содержания синего света при культивировании гриба Ganoderma lucidum приводило К большему накоплению полисахаридов на каждой стадии его развития, чем в темноте (Hao et al., 2010; Mei et al., 2013), при культивировании с применением зеленого света наибольшее содержание отмечено в период стадии роста (Нао et al., 2010). Применение УФ увеличивало содержание полисахаридов в мицелии *I. obliquus* до 2,39% (Zhang, 2008). Облучение синим и красным lucidum светом мицелия G. увеличивало накопление ЭК30-И эндополисахаридов (Poyedinok et al., 2008). Действие света низкой мицелий P. ostreatus приводит к накоплению Lинтенсивности на аскорбиновой, D-изоаскорбиновой, $5-O-(\alpha-D-глюкопиранозил)-D$ изоаскорбиновой, $5-O-(\alpha-D-\kappa \text{силопиранозил})-D$ -изоаскорбиновой, 5-метил-5-5-метил-5-O-(α -D-O-(α -D-глюкопиранозил)-изоаскорбиновой И ксилопиранозил)-D-изоаскорбиновой кислот (Lee et al., 2011).

Пигментная система грибов, так же, как и растений, зависит от световых условий. В работах Н.Л. Поединок отмечено положительное влияние синего света на количество синтезируемого меланина вегетативном мицелии *I. obliquus*, как некогерентного синего света (до 10,5) Γ/Λ , в контроле – 6,05 Γ/Λ) (Поединок и др., 2007), так и при кратковременном воздействии когерентного синего света низкой интенсивности (Poyedinok et al., 2015). Облучение красным светом влияло на накопление каротиноидных пигментов L. sulphureus (Поединок и др., 2007). Облучение зеленым светом никак не сказывалось на синтезе каротиноидов культурального мицелия (Glukhova et al., 2014). Lentinula edodes Показано, что стирилпирона гиспидина в мицелии I. hispidus требует освещения, наиболее эффективная стимуляция отмечена при использовании синего света в двух точках 440 и 380 нм (Vance et al., 1974).

Особое место уделяется исследованиям по выявлению механизмов фоторегуляции ферментной активности грибов. Корично кислотный путь метаболизма фенилаланина, приводящий к синтезу гиспидина *Polyporus* hispidus, регулируется светом. Стимуляция фенилаланин-аммиак-лиазы происходит деятельность тирозин-аммиак-лиазы на свету, И аминотрансферазы выше темноте. Пара-кумарат В гидроксилазная активность, катализирующая превращение пара-кумарата в кофеат, может быть обнаружена только в культурах, подвергшихся воздействию света (Nambudiri et al., 1973). Кратковременное воздействие когерентного синего низкой интенсивности на вегетативный мицелий *I. obliquus* увеличивало внеклеточную и внутриклеточную деятельность тирозиназы (TYR), полифенолоксидазы (PPO) и внеклеточной каталазы (CAT). Красный когерентный свет в том же режиме эффективно повышал внутриклеточную и внеклеточную активности PPO, внеклеточную CAT и TYR, внутриклеточную пероксидазу (POD) (Poyedinok et al., 2015). Активность оксидазы индол-3уксусной кислоты, POD и триптофан синтетазы мицелия G. lucidum под действием синего света показали высокий уровень на начальных этапах

инкубации, но снижались со временем. Мицелий, облученный желтым светом, продемонстрировал наиболее высокую активность оксидазы индол-3-уксусной кислоты, и триптофан синтетазы, а также средний уровень содержания эндогенной индолилуксусной кислоты. Наибольший уровень индолилуксусной кислоты обнаружен при облучении красным светом (Mei et al., 2013).

Таблица 1 — Влияние различного светового режима на химический состав базидиальных грибов

Вид	Световой режим	Исследуемые соединения, активность ферментов	Литературные данные
Inonotus obliquus	Темнота, синий и красный свет	Накопление фелигридина, даваллиялактона	Zeng et al., 2009
	Синий свет низкой интенсивности	Увеличение синтеза меланина	Поединок и др., 2007; Poyedinok et al., 2015
	Воздействие УФ	Увеличение количества полисахаридов	Zhang, 2008
	Кратковременное воздействие когерентным синим светом низкой интенсивности	Увеличение внеклеточной и внутриклеточной деятельности тирозиназы и полифенолоксидазы и внеклеточной каталазы	Poyedinok et al., 2015
	Красный когерентный свет	Стимуляция внутриклеточной и внеклеточной активности полифенолоксидазы, внеклеточной каталазы и тирозиназы и внутриклеточной пероксидазы	Poyedinok et al., 2015
Inonotus (Polyporus) hispidus	Белый свет	Стимуляция фенилаланин аммиак-лиазы	Nambudiri et al., 1973
	Темнота	Стимуляция тирозин аммиак-лиазы и аминотрансферазы	Nambudiri et al., 1973
	Синий свет	Синтез гиспидина	Vance et al., 1974
Laetiporus sulphureus	Красный свет	Увеличение количества каротиноидов	Поединок и др., 2007

Вид	Световой режим	Исследуемые соединения, активность ферментов	Литературные данные
Pleurotus ostreatus	Свет низкой интенсивности	Накопление L -аскорбиновой кислоты, D -изоаскорбиновой кислоты, 5 - O -(α - D -глюкопиранозил)- D -изоаскорбиновой кислоты, 5 - O -(α - D -ксилопиранозила)- D -изоаскорбиновой кислоты, 5 -метил- 5 - O -(α - D -глюкопиранозил)- D -изоаскорбиновой кислоты, 5 -метил- 5 - O -(α - D -ксилопиранозила)- D -изоаскорбиновой кислоты 5 -метил- 5 - O -(α - D -ксилопиранозила)- D -изоаскорбиновой кислоты	Lee et al., 2011
Lentinus edodes	Воздействие УФ	Увеличение количества витамина D2	Ko et al., 2008
Hypsizigus marmoreus	Синий свет	Повышение количества эгростерина	Namba et al., 2002
Ganoderma lucidum	Синий свет	Накопление полисахаридов	Poyedinok et al., 2008; Hao et al., 2010; Mei et al., 2013
	Желтый свет	Повышение активности индол-оксидазы уксусной кислоты, триптофан синтетазы и средний уровень содержания эндогенной индолуксусной кислоты	Mei et al., 2013
	Красный свет	Наибольший уровень индолуксусной кислоты	Mei et al., 2013
Agaricus bisporus	Воздействие УФ	Увеличениеколичества витамина D2	Ko et al., 2008
	Импульсное УФ воздействие	Увеличение количества витамина D2, провитамина D2, лимистерола, тахистерола	Kalaras et al., 2012

С накоплением знаний об ответных реакциях грибов на свет стало актуальным использование их целенаправленной обработки светом для получения функциональных продуктов. Так, например, освещение синим светом при получении плодовых тел *Н. marmoreus* повышало количество эгростерина (Namba et al., 2002). Обработка ультрафиолетовым светом (УФ) хорошо зарекомендовала себя в производстве витамина D2 из эргостерина в

грибах. Обработка грибов A. bisporus импульсным УФ приводила к образованию фотопродуктов производных эргостерина: составлял наибольшее количество, провитамин D2, ламистерол и тахистерол в порядке убывания их содержания, стоит отметить, что необработанные образцы грибов не содержали идентифицированных при УФ облучении вышеуказанных фотопродуктов (Kalaras et al., 2012). Воздействия УФ в дозе 25 кДж/м увеличивало концентрацию витамина D2 для шляпки, ножки и гименофора L. edodes (Ko et al., 2008). По мере увеличения дозы облучения концентрация витамина D2 также увеличивается для гименофора и шляпки A. bisporus (Ko et al., 2008), однако воздействие солнечных лучей более двух и трех часов приводило к достижению плато в содержании витамина D2. Дополнительное облучение в течение двух часов вызывало значительное снижение содержания витамина D2 (Urbain, Jakobsen, 2015). Облучение кусочков A. bisporus является более эффективным способом увеличения содержание витамина D2, чем облучение гименофора или шляпки целых грибов из-за большей площади (Ko et al., 2008; Urbain, Jakobsen, 2015). Обработка грибов после сбора урожая через 1 и 4 дня не оказывала существенного влияния на формирование витамина D2 в грибах. Витамин D2 деградирует в обработанных грибах при хранении с константой скорости разложения 0,025 ч (Roberts et al., 2008).

Таким образом, применение различных световых режимов, как при культивировании мицелия, так и получении плодовых тел оказывает влияние на изменение морфологии, физиологии и химии грибного организма.

Из всего выше сказанного видно, условия произрастания гриба оказывают прямое воздействие на его рост и развитие, что сказывается в изменении не его только физиологических, но и биохимических параметров. Понимая последствия влияния абиотических факторов можно не только понимать пределы распространения и обильность вида в природе, но и управлять морфогенезом и биосинтезом вторичных метаболитов при культивировании. Анализ литературных данных показал, что у грибов

разных родов в целом не прослеживаются общие закономерности в механизмах ответных реакций на воздействие светового фактора. Тем не менее, можно предположить, что данные закономерности могут быть выявлены в пределах рода. Таким образом, изучение света, как наиболее контролируемого экологического фактора регулирующего рост, развитие и химического состава грибов с применением светодиодных установок является актуальным.

1.4. Биологическая активность извлечений из различных видов рода *Inonotus* P. Karst.

1.4.1. Антиоксидантная активность

Широко известна и наиболее изучена антиоксидантная активность (AOA) различных извлечений из склероция и биомассы *I. obliquus*. Так, различными методами *in vitro* выявлено наличие AOA водного извлечения (Сысоева и др., 2009; Hu et al., 2009; Liang et al., 2009), суммарных этанольных и метанольных экстрактов (Li et al., 2006; Nakajima et al., 2007; Hu et al., 2009; Liang et al., 2009a), этилацетата и *н*-бутанола (Liang et al., 2009). Исследование фракций *I. obliquus*, полученных с применением наибольшей растворителей разной полярности, показало, что антиоксидантной активностью обладала этилацетатная фракция, показавшая наилучшие результаты с использованием 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразил (DPPH') радикала, железосвязывающей антиоксидантной активности (FRAP) и анализа деградации каротина (CBA) (Liang et al., 2009b). Установлена AOA этанольных экстрактов у других представителей рода. Так экстракты І. clemensiae и I. cuticularis ингибировали активность радикалов DPPH на 83,2 2,2'-азино-6uc(3-этилбензтиазолин)-6-сульфоновой И 82,3%, кислоты (АВТЅ'+) на 92,2 и 39,8%, соответственно, а также проявили АОА способность поглощения кислорода (ORAC) 31,9 и 13,2%, выраженные как эквивалент мМ тролокса на грамм экстракта (Tamrakar et al., 2016).

Циклогексановый, дихлорметановый, метанольный и водный экстракты из плодовых тел *I. hispidus*, полученные в ходе дробной экстракции, проявляли активность против свободных радикалов ABTS^{*+}, DPPH*, FRAP, ORAC (Smolskaite et al., 2015).

Суммарная полисахаридная фракция *I. obliquus* обладала выраженной связывающей активностью в отношении гидроксид-радикалов ОН, а также ингибировала эндогенное, Fe^{2+} -цистеин-индуцированное окисление липидов (Hui et al., 2006). Водорастворимые полисахаридные фракции, полученные из склероция *I. obliquus*, проявляли активность против свободных радикалов O_2 , DPPH, OH, и H_2O_2 (Du et al., 2013).

Полифенольный экстракт *I. obliquus* на модели клеточной линии кератиноцитов человека (HaCaT) подавлял окислительный стресс, вызванный пероксидом водорода (Cui et al., 2005). Учитывая высокую антиоксидантную активность полифенольных соединений *I. obliquus*, предложено их использование в качестве пищевых антиоксидантов для масляных и других пищевых продуктов с целью увеличения их срока годности (Gao et al., 2008; Liang et al., 2009а).

Антиоксидантной активностью обладают также меланины *I. obliquus* (Сысоева и др., 2009; Olennikov et al., 2012). Меланины спиртовых экстрактов более активные, чем из водных (Сысоева и др., 2009).

Инобилины А–С, фелигридины D, E и G из плодового тела *I. obliquus* демонстрировали высокую активностью против свободных радикалов O_2 . АВТS^{*+} и DPPH (Lee et al., 2007а). Было установлено, что стирилпироны гиспидин и его димеры, 3,14′-бигиспидинил, гифоламин B и 1,1-дистирилпирилэтан, изолированные из плодовых тел *I. xeranticus*, обладали мощным антиоксидантным эффектом (Lee et al., 2006; Jung et al., 2008). Иноскавины A и B *I. obliquus* активны в отношении O_2 . IC_{50} 78 и 95 мкМ, соответственно (Lee et al., 2006). Иноскавин A и B, метилиносткавин A и B (Lee et al., 2006), даваллиялактон, метил даваллиялактон (Lee, Yun, 2006), а также интерфугины A, B и C (Lee, Yun, 2007), 3,4-дигидроксибензальдегид

(Lee et al., 2006), выделенные из метанольного экстракта плодовых тел *I*. xeranticus, проявляли антирадикальную активность против O_2 , DPPH и ABTS^{*+}. Иноскавин С, метилиноскавин С (Lee, Yun, 2006), иноксавин D и фелигридин D (Lee et al., 2006a) из плодового тела *I. xeranticus* были активны только в отношение $IC_{50}^{ABTS^{+}}$ – 7,8, 12,3, 12,5, 13,7 мкМ, соответственно. Иноскавин E (Lee et al., 2007) и метилиноскавин D (Lee et al., 2006) O_2 ABTS⁺ радикалы. инактивировали Установлена также антирадикальная активность иноскавина Е: $IC_{50}^{ABTS^{+}}$ 22 мкМ и $IC_{50}^{O2^{\bullet-}}$ 49 мкМ (Lee, 2007). Инонотусин А, В и Е, 4-(3,4-дигидроксифенил)бут-3-ен-2-она, гиспидин и 3,4-дигидроксибензальдегид, полученные из плодового тела I. hispidus, обладали выраженной антиоксидантной активностью в эквивалентах тролокса (ТЕАС) 12,71, 59,53, 23,88, 14,47, 5,90 мМ, соответственно, что было обнаружено с использованием ABTS-метода (Zan et al., 2011). С применением методов DPPH и FRAP показано, что соединения, выделенные из плодовых тел *I. obliquus* (2-гидрокси-1гидроксиметилэтиловый эфир сиреневой кислоты, протокатеховая кислота, сиреневая кислота, 2,5-дигидрокситерпаталовая кислота, кофейная кислота, 3,4-дигидроксибензальацетон), обладают антиоксидантной активностью, 3,4-гидроксибензальдегид обладал наиболее причем выраженной активностью (IC_{50}^{DPPH} 18,06 мкМ, IC_{50}^{FRAP} 5,74 мМ) (Nakajima et al., 2007).

Инотодиол, выделенный из *I. obliquus*, может предотвратить окислительный стресс при ишемическом инсульте на клетках PC12 (клетки феохромоцитомы надпочечников крысы), уменьшая образование активных форм кислорода, понижая содержание малонового диальдегида и увеличивая активность супероксиддисмутазы (Li et al., 2017). Иноскавин A из плодовых тел *I. xeranticus* ингибировал перекисное окисление липидов в микросомах печени крыс с IC_{50} 0,3 пг/мл, а также оказывал выраженное антирадикальное действие IC_{50}^{DPPH} 0,1 мкг/мл (Kim et al., 1999). 3,4-дигидроксибензальацетон и кофеиновая кислота, извлеченные из *I. obliquus*, эффективно подавляли

внутриклеточный уровень ROS в клетках PC12 (надпочечниковая феохромоцитома крыс), обработанных H_2O_2 (Nakajima et al., 2009).

1.4.2. Противоопухолевая активность

Противоопухолевая и антиметастатическая активность вторичных метаболитов выделенных из биомассы видов рода *Inonotus*, в основном, изучена в отношении I. obliquus и в значительно меньшей степени для других видов. Так, при исследовании цитотоксического действия в отношении клеток рака шейки матки человека (HeLa) S3 установлено, что при концентрациях 10-2000 мкг/мл водный экстракт *I. obliquus* оказывает ингибирующее действие. Наблюдалось снижение клеточного белка и митотического индекса, причем последний эффект обусловлен влиянием на количество митотических клеток в метафазе (Burczyk et al., 1996). Водные экстракты культурального мицелия I. obliquus оказывали противомитотическое действие на клетки HeLa, преимущественно в M-, G1и G2-фазах роста (Jarosz et al., 1990). Для клеток меланомы B16-F10 *in vitro* и in vivo выявлена остановка клеточного цикла в G0, G1 фазе, а также ингибирование пролиферации и индукция апоптоза у раковых клеток при использовании водного экстракта *I. obliquus* в дозе 20 мг/кг/день (Youn et al., 2009). Водные экстракты из склероция *I. obliquus* индуцировали апоптоз раковых клеток саркомы S180 у больных мышей и в культуре клеток (Chen et al., 2007a).

Противоопухолевое действие *I. obliquus* было также установлено в модельной системе щелевых внутриклеточных контактов (gap junctional intercellular communication, GJIC) на эпителиальных клетках печени крыс (Park et al., 2006). Клетки инкубировали совместно с экстрактом *I. obliquus* и опухолевым промотором 12-О-тетрадеканоилфорбол-13-ацетатом. I. Применение экстракта obliquus приводило ИЗ К снижению фосфорилированной ERK1/2- и p38-протеин киназы. Отсутствие изменений в уровне с-Jun N-терминальной киназы (JNK) свидетельствовало о том, что

экстракт может блокировать активацию ERK1/2- и р38-протеин киназы. Кроме того, экстракт предотвращал ингибирование GJIC путем блокирования фосфорилирования коннексина 43.

Водный экстракт из *I. obliquus* оказывал антипролиферирующее действие на клетки карциномы желудка человека BGC-823. С применением флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии показано, что в дозах 10-80 мг/л экстракт вызывал апоптоз клеток данной опухоли (Zhong et al., 2006; Zhong et al., 2007). В эксперименте с лабораторными мышами была показана активность водных экстрактов из I. obliquus против колоний метастатических клеток в легких (спонтанная модель метастазиования) линия 3LL карциномы легких Льюиса. Непрерывное потребление экстракта *I*. obliquus мышами в течение 3 недель до прививки опухоли и в течение всего экспериментального периода в концентрации около 6 мг/кг в 5 мл питьевой воды в день приводило к снижению васкуляризации опухоли, подавлению прогрессирования рака, а также значительному уменьшению количества опухолевых узелков в легких и уменьшению их размеров (Arata et al., 2016). Водный экстракт *I. obliquus* также оказывал антипролиферирующее действие на клетки рака толстой кишки человека НТ-29. При обработке раствором с концентрацией экстракта 1,0 мг/мл в течение 48 ч ингибирующий эффект достигал 56% (Lee et al., 2009a).

Воздействие этанольного экстракта *I. obliquus* вызывало индукцию апоптоза в раковых клетках толстой кишки человека DLD-1. Введение экстракта в концентрации 400 мкг/мл в течение 24 и 48 ч приводило к четкому морфологическому изменению фрагментации ядер, однако данный эффект не наблюдался при использовании водных экстрактов (Hu et al., 2009).

Хлороформный экстракт из ингибировал склероциев I. obliquus причем пролиферацию клеток лейкемии мышей Р388, исследование компонентов фракции показало, что наиболее активным соединением инотодиол. P388, обработанных инотодиолом являлся В клетках

концентрации 30 мкМ, наблюдали фрагментацию ДНК и активацию каспазы3/7. Внутрибрюшное введение инотодиола 10 мг/кг продлевало срок выживания экспериментальных животных (Nomura et al., 2008). Водный экстракт *I. obliquus*, содержащий бетулин, бетулиновую кислоту и инотодиол, оказывал цитотоксическую активность в отношении клеток аденокарциномы легких человека А549 (Gery et al., 2018).

В работах Chen с соавторами отмечается, что водорастворимые полисахариды из *I. obliquus* проявляли незначительную противоопухолевую активность *in vitro*, однако *in vivo* могут значительно ингибировать рост трансплантированной Т-клеточной лимфомы (jurkat cells) (Chen et al., 2015) и В-клеточной лимфомы (DAUDI cells) у мышей (Chen et al., 2010). Полисахариды *I. obliquus* оказывали антиопролиферативное действие на клетки рака печени линии SMMC7721 (Zhang et al., 2006). В экспериментах *in vivo* показано, что полисахариды *I. obliquus* значительно подавляли рост опухолевых клеток гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, вызывали их апоптоз и существенно сдерживали рост саркомы S180 у мышей при одновременном усилении иммунной функции, снижении активности NO-синтазы, концентрации NO и сиаловых кислот (Jin et al., 2004; Zhang et al., 2007). Пероральное введение полисахаридной фракции *I. obliquus* подавляло *in vivo* рост опухоли меланомы у мышей линии C57BL/6, несущих опухоль (Won et al., 2011).

Противоопухолевую активность проявляли не только экстракты из *I. obliquus*, но и препараты из минимально обработанной биомассы. Так, использование порошка *I. obliquus* в качестве пищевого компонента с размером частиц 1 мкм повышало выживаемость экспериментальных животных в модели с использование клеток меланомы B116BL6 (Kim et al., 2009).

Нанокомпозиты на основе наночастиц золота с использованием экстрактов *I. obliquus* (AuNPs) показали отличную антиоксидантную и цитотоксическую активность против линии клеток рака молочной железы

человека МСГ-1 и линии клеток рака желудка NСІ-N87 (Lee et al., 2015). А нанокомпозиты, синтезируемые из раствора нитрата серебра с использованием экстракта *I. obliquus* (AgNPs), показали антипролиферативную активность против линии клеток рака легкого A549 и рака молочной железы МСГ-7 (Nagajyothi et al., 2014).

Скрининг противоопухолевой активности *in vivo* на модели вируса Эпштейна-Барра (EBV-EA) показал ингибирующую активность соединений ланоста-8,23E-диен- $3\beta,22R,25$ -триол, ланоста-7:9(11),23E-триен-3 β ,22R,25триол и 3β -гидроксиланоста-8,24-диен-21-аль, выделенных из склероциев I. obliquus. Наиболее распространенное соединение 3β -гидроксиланоста-8,24диен-21-аль также проявило высокую противоопухолевую активность в тесте на канцерогенез кожи мыши (mouse-skin carcinogenesis test) с использованием модели DMBA/TPA (Таji, 2008а). 3β ,21-дигидроксиланоста-8,24-диен и $3\beta,22,25$ -тригидроксиланоста-8,23-диен I. obliquus оказывали действие цитотоксическое карциносаркомы Walker 256, на клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и лейкоза P388 (Kahlos et al., 1987). Инотодиол I. obliquus оказывал цитостатическое действие на клетки рака легких A549, вызывая их апоптоз (Wang et al., 2007), а также оказывал ингибирующее действие на активацию раннего антигена Эпштейна-Барра (EBV-EA) в лимфобластоидных Raji-клетках, индуцированную 12-Oтетрадеканоилфорбор-13-ацетатом (TPA) (Nakata et al., 2007). Траметиновая кислота, 3β -гидроксилано-8,24-диен-21-аль и инонотусоксид А проявляли умеренную цитотоксическую активность на мышиную Р388 клеточную линию лейкемии (Nakata et al., 2009).

Некоторые соединения *I. obliquus* (феллигридин С, феллигридин Н, метил-иосакавин А, иноскавин С, иноскавин В, даваллиялактон, метил-даваллиялактон, фоскопарианол D, 21,24-циклопентанона- 3β ,21,25-триол-8-ен, ланоста-7,9,(11),23-триен- 3β ,22,25-триол, инотодисахарид, меланин) ингибировали пролиферацию опухолевых клеток HeLa-229 (Zheng et al., 2011). Сапонацеиновая кислота, эргостерин пероксид, 9,11-

дегидроэргостерин пероксид проявили сильную цитотоксичность против MCF-7 (рак молочной железы человека) и 4T1 (рак молочной железы мышей) (Zhao et al., 2016). Соединения инонотутриол A, инонотутриол E, D. $3\beta,22\alpha$ -дигидроксиланоста-8,25-диен-24-он инонотутриол продемонстрировали выраженную цитотоксичность по отношению к линиям опухолевых клеток A549 со значениями IC₅₀ 2,34, 1,63, 8,39 и 5,39 мкМ, соответственно. Умеренная цитотоксичность против линий опухолевых клеток A549, HT29, Hela или L1210 была показана для инонотусана C, инонотусоксида A, инонотусоксида B, бетулина, инонотсутриола, 3β , 22дигидроксиланоста-7,9,24-триена и 3β ,22 α -дигидроксиланоста-8,25-диен-24она (Zhao et al., 2015). Соединения спироинонотсуоксодиол, инонотсудиол A и инонотсуоксодиол A, выделенные из склероциев I. obliquus, показали умеренную цитотоксическую активность против культур клеток Р388, L1210, HL-60 (Handa et al., 2010).

Вторичные метаболиты других видов рода *Inonotus* также исследовались в качестве противоопухолевых агентов, однако количество данных значительно меньше. Так, соединение инонотусин A, полученное из плодового тела *I. hispidus*, показало умеренную цитотоксичность против клеточной линии рака молочной железы человека МСF-7 с IC_{50} 19,6 мкМ (Zan et al., 2011), а 3α ,6 β -дигидроксициннамолид, выделеный из плодового тела *I. rickii*, проявил умеренную ингибирующую активностью на раке толстой кишки человека SW480 (IC_{50} 20,4 мкмоль) (Chen et al., 2014).

1.4.3. Противовирусная активность

Для извлечений из грибов рода *Inonotus* показано наличие противовирусной активности. Так, водные экстракты склероция *I. obliquus* подавляли размножение высокопатогенного вируса гриппа птиц (субтип A/H5N1) в монослойной культуре клеток почки собаки (MDCK) и в легких лабораторных мышей (Филиппова и др., 2013). Этанольные экстракты плодовых тел и культур мицелия *I. hispidus* показали противовирусную

активность в отношении вируса гриппа типа A (H1N1, H3N2) и вируса гриппа типа В. Данный вид активности также найден у гисполона и гиспидина, выделеных из спиртовых экстрактов культур мицелия *I. hispidus* (Awadh Ali et al., 2003). В других исследованиях I. obliquus обнаружено наличие противовирусной активности против вирусов гриппа человека А (A/H1N1, A/H3N2), В (B/Yamagata/16/18) и вируса гриппа лошади А (A/Equine2), что связано с присутствием тритерпеновых соединений (Kahlos et al., 1996). Водные экстракты *I. obliquus* были малотоксичны для культуры клеток MDCK и мышей Balb/c. Установлено, что экстракт подавлял размножение пандемического вируса гриппа A/Moscow/226/2009 (H1N1)v в культуре клеток MDCK при 2,69-3,22 г/л, что сравнимо с эффектом референс-препарата Тамифлю экспериментах В ЭТИХ (подавление репродукции вируса составило 2,90 г/л). В опытах *in vivo* при пероральном введении экстракта мышам, инфицированным штаммом пандемического вируса гриппа A/Moscow/226/2009 (H1N1)v, наблюдалось уменьшение его продукции в легких животных (Филиппова и др., 2014).

Водные экстракт измельченного склероция *I. obliquus*, аптечного препарата из *I. obliquus* Бефунгина (08-39), а также меланин, полученный из *I. obliquus*, обладали противовирусной активностью в отношении вируса натуральной оспы и вируса осповакцины (Теплякова и др., 2012).

Также показано действие извлечений на активность вируса герпеса. При внутрибрющинном введении водных экстрактов *I. obliquus* 0,4-2,0 мг сухого вещества на мышь за сутки до заражения животных вирусом простого герпеса ІІ типа была выявлена 90% выживаемость животных (Разумов, 2013). Водный экстракт из *I. obliquus*, воздействуя на вирусные гликопротеины, показал заметное снижение инфекции вируса простого герпеса (HSV) с 50% ингибирующей концентрацией 12,29 мкг/мл, а также предотвращению слияния мембран (Pan et al., 2013). Экстракты, полученные из *I. obliquus*, обладали способностью защищать клетки Vero (клеточная линия почки африканской зеленой мартышки) от цитодеструктивного действия вируса

простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1) штамм Л2, при концентрации 5 мкг/мл. Спиртовый, водный и щелочной экстракты *I. obliquus* обеспечивали защиту клеток на 87,5, 91,6 и 100%, соответственно. Максимальный защитный эффект наблюдали при внесении экстрактов *I. obliquus* до инфицирования клеток или в течение часа после него (Полковникова и др., 2014). Обработка водным экстрактом *I. obliquus* приводила к снижению его патологического эффекта в 100 раз. Профилактическое проявление противовирусного эффекта наблюдали при использовании вышеупомянутых экстрактов за 24 ч до заражения, терапевтическое – при введении вместе с заражением свиных клеток почек эмбриона, в данном случае происходило торможение развития инфекции (Shibnev et al., 2011).

Исследования продемонстрировали действие также вторичных метаболитов грибов рода *Inonotus* на вирус ВИЧ. Так, меланин *I. obliquus* ингибировал протеазу ВИЧ-1 в отличие от низкомолекулярных компонентов водного экстракта и мономерных компонентов меланина, которые оказались неактивными (Ichimura et al., 1998). Водный и водно-спиртовый экстракты гриба *I. obliquus* на культуре клеток человека МТ-4, инфицированной ВИЧ-1, оказывали выраженный ингибирующий эффект как при одновременном с вирусом внесении в культуру клеток (Гашникова и др., 2011; Шибнев и др., 2015), так и в постадсорбционных условиях (Теплякова и др., 2009). Гиспидин и кофейная кислота, полученные из культуральной среды І. tamaricis, проявляли способность ингибировать интегразы ВИЧ-1 (Singh et al., 2003).

1.4.4. Антибактериальная активность

Для *I. obliquus* также обнаружена антибактериальная активность. Так, водные растворы культуральной среды *I. obliquus* ингибировали рост *Francisella tularensis* линии 15 НИИЭГ (Шариков и др., 2008) и *Mycobacterium smegmatis* линии 15 НИИЭГ (Шариков и др., 2011). Антибактериальную активность против *Staphylococcus aureus* проявляли

водный и этанольный (Glamoclija et al., 2015), метанольный и ацетоновый (Liu et al., 2009) экстракты *I. obliquus*. Водные и этанольные экстракты проявляют антибактериальную активность против *Bacillus cereus* (Glamoclija et al., 2015), а метанольный экстракт *I. obliquus* в концентрации 10 мг/мл оказывал антибактериальный эффект в отношении *Escherichia coli* (Liu et al., 2009). Циклогексановый, дихлорметановый и метанольный экстракты из плодовых тел *I. hispidus*, полученные в ходе дробной экстракции, проявляли антимикробную активность против *B. cereus* и *Pseudomonas aeruginosa* (Smolskaite et al., 2015).

Нанокомпозиты, синтезируемые из раствора нитрата серебра с использованием экстракта I. obliquus (AgNPs), показали самостоятельную эффективную антибактериальную активность против грамотрицательных бактерий $E.\ coli$, отмечено увеличение антибактериальной активности **AgNPs** пенициллина И тетрациклина В присутствии против грамположительных (S. epidermidis) и грамотрицательных бактерий (E. coli и P. mirabilis) бактерий (Nagajyothi et al., 2014). Нанокомпозиты на основе наночастиц золота с использованием экстрактов *I. obliquus* (AuNPs) показали высокую антибактериальную активность против грамположительных (В. substilis и S. aureus) и грамотрицательных (E. coli) бактерий (Lee et al., 2015). Гисполон из I. hispidus проявляет антибактериальную активность против грамположительных (B. substilis, B. pumilis) и грамотрицательных (E. coli, P.aeruginosa) бактерий (Venkateswarlu et al., 2002).

1.4.5. Гипогликемическая активность

Для извлечений *I. obliquus* установлена глюкозидазная ингибиторная активность, что, в свою очередь, приводило к выраженному гипогликемическому действию. Установлено, что проявление активности напрямую зависит от общего количества фенолов и флавоноидов в экстрактах. Так, извлечения этилацетата и бутанола проявляют выраженную

активность, по сравнению с петролейно-эфирным и водным экстрактами (Lu et al., 2009).

После однократного приема экстракта *I. obliquus* у пациентов с диабетом 2-го типа наблюдалось уменьшение постпрандиального пика глюкозы, уменьшались макрососудистые осложнения и повреждения эндотелия при постпрандиальной гипергликемии (Maenaka et al., 2008).

На модели аллоксан-индуцированного диабета у мышей показано, что применение порошкового препарата из погруженной культуры *I. obliquus* давало стойкий гипогликемический эффект (Sun et al., 2008; 2009). На той же модели показано снижение уровня глюкозы в крови мышей от применения этилацетатной фракции *I. obliquus*, а также значительное снижение общего холестерина, уровня триглицеридов, малонового диальдегида, повышение уровня липопротеинов высокой плотности в сыворотке крови, повышение активности глутатион-пероксидазы и уровня печеночного гликогена. Инонотодиол и траметеноловая кислота оказывали ингибиторный эффект на α-амилазу (Lu et al., 2010). Положительное влияние отмечено также на модели стрептозоцин-индуцированного диабета (Zhang et al., 2008a, 2008b).

Показано, что экстракты полисахаридов *I. obliquus* регулируют метаболизм липидов и имеют антигипергликемический эффект на модели стрептозотоцин-индуцированного диабета у мышей. При введении мышам элюированной фракции 0,2 моль/л наблюдалось уменьшение уровня триглицерида по сравнению с контролем диабетической группы, а также отсутствие побочных эффектов экстракта на физиологическое состояние мышей (Hu et al, 2012). Полисахариды, полученные из мицелия и склероций *I. obliquus*, в основном состоящие из β -глюкана, гетерогликана и белкового комплекса, сохраняли гипогликемический эффект в течение 3-48 ч после их введения мышам (Mizuno et al., 1999). Прием низкомолекулярных полисахаридов *I. obliquus* 10-100 кДа в течение восьми недель в дозе 300 мг/кг приводил к постепенному увеличению чувствительности к глюкозе с

уменьшением толерантности к инсулину у мышей C57BL/6 с диабетической нефропатией (Chou et al., 2016).

Обнаружено, что водорастворимый меланиновый комплекс из *I. obliquus* улучшал чувствительность к инсулину и приводил к снижению количества жира у (HF)-fed мышей с патологическим ожирением (Lee, Hyun, 2014).

 3β -Гидроксициннамолид, выделеный из погруженной культуры *I. obliquus*, проявил умеренную способность ингибирования α -глюкозидазы, в то время как для инотолактонов A и B обнаружена сильная ингибирующая активность, связанная присутствием в структуре α,β -диметил, α,β - ненасыщенных боковых цепей δ -лактона (Ying et al., 2014).

1.4.6. Противовоспалительная активность

Оксид азота (NO) является воспалительным медиатором, который инициирует высвобождение цитокинов, поэтому ингибирование NO является показателем лечебного эффекта соединений (Zamora et al., 2000). Метанольный (Park et al., 2005) и этанольный (Kim et al., 2007; Van et al., 2009) экстракты *I. obliquus* оказывали противовоспалительный эффект на индуцированную липополисахаридом (LPS) воспалительную реакцию in vitro в клеточной линии RAW-264,7, ингибируя образование оксида азота. Соединения (траметеновая кислота, пероксид эргостерина, 3β -гидрокси-8,24диен-21-аль, эргостерин, инотодиол), полученные из *I. obliquus*, проявляют более выраженную противовоспалительную способность, чем метанольные экстракты, ингибируя синтез NO (Ma et al., 2013). Даваллиалактон, полученный из плодовых тел I. xeranticus, значительно тормозил LPSиндуцированную воспалительную реакцию в клетках RAW-264,7, подавляя фосфорилирование и активность киназы Src. При этом даваллиалактон не изменял жизнеспособности и морфологии клеток (Lee et al., 2008). Этанольный экстракт культурального мицелия *I. obliquus*, выращенный на среде с пророщенным коричневым рисом (IOGBR), заметно ингибировал продукцию воспалительных медиаторов NO и PGE2 в LPS-стимулированном RAW-264,7 клетках, кроме того, уменьшал экспрессию одной из изоформ синтазы оксида азота (NOS) — индуцибельной NOS (iNOS), которая катализирует продукцию NO и COX-2, участвующей в производстве простагландинов из арахидоновой кислоты (Debnath et al., 2013).

В экспериментах *in vivo* при использовании 100 или 200 мг/кг метанольного экстракта *I. obliquus* в день уменьшался острый отек лапы, индуцированный карагенином у крыс, при этом отмечена анальгетическая активность (Park et al., 2005).

obliquus Полисахаридная фракция I. способна стимулировать образование NO/ROS, секрецию TNF-α и фагоцитарное поглощение в макрофагах, а также пролиферацию клеток, комитогенный эффект и секрецию IFN-у/IL-4 в спленоцитах мыши. Полисахаридная фракция индуцировала фосфорилирование трех MAPK. также ядерную транслокацию NF-кВ, что привело к активации макрофагов RAW-264,7. Полисахаридная фракция индуцировала ингибирование секреции TNF-а анти-TLR2 mAb, следовательно, полисахариды *I. obliquus* могут участвовать в секреции TNF- α через рецептор TLR2 (Won et al., 2011).

1.4.7. Иммуностимулирующая активность

Для водного экстракта *I. obliquus* показана иммуностимулирующая активность (400 мг/кг массы тела) на мышах с химическим иммунодефицитом, вызванным циклофосфамидом (Кіт, 2005). Водные экстракты из склероция *I. obliquus* продемонстрировали стимулирующее действие на выделение макрофагов у мышей с саркомой S180 (Chen et al., 2007а).

Основное число работ указывает на иммуностимулирующее действие полисахаридов рода *Inonotus*. Так, полисахариды *I. obliquus* в экспериментах *in vitro* и *in vivo* проявляла выраженную иммуностимулирующую активность (Zhang et al., 2008c, Won et al., 2011). Водорастворимый полисахарид ISP2a из

I. obliquus не только показал противоопухолевую активность, но также значительно усиливал иммунный ответ на опухоль у мышей. Кроме того, ISP2a значительно повышал пролиферацию лимфоцитов и увеличивал **TNF** (tumor necrosis factor-α) (Fan al.. 2012). производство Водорастворимый полисахарид из *I. obliquus* (IP3a) усиливал пролиферацию спленоцитов и пролиферацию лимфоцитов, индуцированную ConA и LPS дозозависимым образом. В то же время ІРЗа стимулировал секрецию цитокинов (IL-2, IL-6, IL-12, TNF-α) и фагоцитоз макрофагов у мышей (Chen et al., 2015). Щелочерастворимые полисахариды из *I. obliquus* (IOA1-IOA3) активировали иммунные клетки-макрофаги за счет значительной индукции образования NO в RAW-264,7 клетках по сравнению с контролем (Niu et al., 2016).

1.4.8. Кардиопротекторное действие

На модели инсульт-подверженных крыс со спонтанной гипертензией было показано кардиопротекторное действие водного экстракта I. obliquus. Применение экстракта в течение 60 дней приводило к понижению артериального давления, небольшому повышению количества лейкоцитов и снижению гликозилированного гемоглобина. Также наблюдалось повышение общей плотности капилляров в субэндомиокарде. Соотношение капилляров и миоцитов оставалось без изменений (Koyama et al., 2006). Применение водного экстракта I. obliquus в количестве 5 мл в день здоровыми взрослыми добровольцами показало значительное снижение систолического диастолического артериального давления, В TO время как уровень триглицерида был увеличен (Yonei et al., 2007).

Выявлены кардиозащитные эффекты даваллиалактона, полученного из плодовых тел *I. xeranticus*, в исследовании с помощью животной модели адриамицин-индуцированной острой кардиомиопатии, а также в Н9с2 культуре клеток крыс. Введение даваллиалактона значительно повышало жизнеспособность поврежденных клеток Н9с2, при этом снижалось

адриамицин-индуцированное производство ROS, уменьшалось количество апоптозных клеток, увеличивалась экспрессия Cu/Zn SOD и Mn-SOD, также ингибировалась экспрессия проапоптозных белков семейства MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Arunachalam et al., 2012).

Показан защитный эффект инотодиола, выделенного из *I. obliquus*, при PC12 инсульте на клетках (клетки феохромоцитомы ишемическом надпочечников крысы), поврежденных оксигенацией И депривацией/восстановлением глюкозы за счет снижения уровня внутриклеточного кальция и увеличения потенциала митохондриальной мембраны. Инотодиол ингибировал апоптоз клеток РС12 через подавление каспазы-3 и Вах, а также стимулируя увеличение количества Bcl-2 (Li et al., 2017).

1.4.9. Гепатопротекторная активность

Данная петролейно-эфирного активность выявлена ДЛЯ И этилацетатного извлечения ИЗ Ι. obliquus при острой печеночной недостаточности у мышей, *D*-галактозамин- и эндотоксин-индуцированного гепатита. Отмечено снижение содержания аспартатаминотрансферазы (AST), (ALT), аланинаминотрансферазы малонового диальдегида (MDA) повышение активности SOD и глутатионпероксидазы в сыворотке крови (Song et al., 2007). На модели острого повреждения печени тетрахлорметаном у мышей для спиртового экстракта *I. obliquus* также отмечен высокий гепатозащитный эффект (Wu et al., 2008). Инонотусол F и инонотусовая кислота показали гепатопротекторный эффект против повреждения клеток WB-F344, индуцированного D-галактозамином (Liu et al., 2014).

1.4.10. Гиполипидемическое действие

Гиполипидемическое действие полисахаридного комплекса *I. obliquus* обусловлено способностью к снижению концентрации триглицеридов и холестерина в сыворотке крови (Cui, Jin, 2007). Введение порошка

культуральной среды *I. obliquus* значительно уменьшало содержание в сыворотке свободных жирных кислот, общего холестерина, триглицеридов и липопротеинов низкой плотности и одновременно эффективно увеличивало содержание липопротеинов высокой плотности, уровень инсулина и содержание гликогена в печени у диабетических мышей (Sun et al., 2008).

1.4.11. Фунгистатическая активность

Экстракты фенолов и алкалоидов, полученные из плодовых тел *I. hispidus* проявляли фунгистатическую активность, являясь эффективными ингибиторами липазы *Candida rugosa* (Benarous et al., 2015). Циклогексановый, дихлорметановый и метанольный экстракты из плодовых тел *I. hispidus* ингибировали *C. albicans* (Smolskaite et al., 2015).

Водный и этанольный экстракты *I. obliquus* показали значительное противогрибковое воздействие на все тестируемые грибы: *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron*, *P. verrucosum*. Фунгицидный эффект был достигнут при 0,75-3,00 мг/мл и 0,40-3,00 мг/мл для этанольных и водных экстрактов, соответственно. Наиболее восприимчивым грибом был *Trichoderma viride*, тогда как наиболее устойчивыми были *Aspergillus niger* и *Aspergillus fumigatus* (Glamoclija et al., 2015).

1.4.12. Антимутагенная активность

Для соединений 3β -гидроксиланоста-8,24-диен-21-аль и индотодиола, извлеченных из *I. obliquus* выявлена антимутагенная активность (Ham et al., 2009), соединения ингибировали мутагенез, индуцированный 1-метил-3-нитро-1-нитрозогуанидином (MNNG) в *Salmonella typhimurium* TA100 на 80,0% и 77,3%, соответственно.

Водные экстракты *I. obliquus* предохраняли эндогенную ДНК в лимфоцитах человека при повреждении, вызванном H_2O_2 (Park et al., 2004).

1.4.13. Токсичность

Изучение токсичности грибных извлечений и экстрактов является необходимым этапом исследований перед непосредственным применением их на животных. Токсичность водного экстракта *I. obliquus* при подкожном введении мышам составляла около 500 мг/кг (LD_{50}). Установлено, что в дозах 50-100 мг/кг токсических эффектов не проявляется. При приеме препарата в дозах 200-300 мг/кг отмечалась некоторая вялость животных и легкие нарушения координации движений. Признаки интоксикации исчезали через несколько часов. Значительные нарушения отмечались при приеме препарата в дозах 500-2000 мг/кг; при этом наблюдались резкие расстройства локомоции (ковыляния, покачивания, расползания лап мышей), ограничения подвижности, а впоследствии адинамия, утрата рефлексов, расстройства дыхания и даже его прекращение. При энтеральном введении слабые признаки интоксикации проявлялись только в дозах 3000-5000 мкг/кг, а полная картина отравления развивалась в дозах 6000-8000 мг/кг. Показатель LD_{50} составляет ~ 6500 мг/кг. Картина отравления сходна с таковой при введении. Исследование причин двигательного подкожном паралича показало, что водный экстракт *I. obliquus* угнетает центральную нервную систему, а не периферическую. В опытах по исследованию кумулятивных свойств I. obliquus на крысах и кроликах в течение 5 месяцев не отмечалось изменений особенностей поведения, картины крови и изменений внутренних органов (кроме нескольких меньшей) массы тела экспериментальных животных (Лазовская, 1959а). Также не отмечалось влияния экстракта І. obliquus на базальную температуру тела животных (Лазовская, 1959b).

При совместном исследовании токсичности и противовирусной активности водных экстрактов *I. obliquus* показано, отсутствие острой токсичности в дозах от 0,8 до 4 мг на мышь при пероральном и внутрибрющинном введении. Однако, гибель половины экспериментальных животных наблюдалась при повышении дозы сухого вещества экстракта до 20 мг на мышь (Разумов и др., 2013). Концентрация водных экстрактов *I.*

obliquus, токсичная для 50% культуры лимфобластоидной линии клеток человека МТ-4 варьирует от 0,006 до 0,380 мг/мл (Гашникова и др., 2011).

При пероральном применении полисахаридов из *I. obliquus* в дозе 5000 мг/кг массы тела у мышей не наблюдалось токсических проявлений для печени, почек, сердца, тимуса и селезенки, что свидетельствует о том, что данные полисахариды относятся к группе веществ с очень низкой токсичностью (Chen et al., 2009).

1.5. Выводы к главе 1

- 1. Наукометрический анализ данных литературы свидетельствует об актуальности исследований представителей рода *Inonotus*.
- 2. Химические исследования видов рода *Inonotus* демонстрируют наличие соединений фенольной природы, терпеноидов, летучих и углеводных компонентов. Проведенный анализ выявил отсутствие данных о химическом составе многих представителей рода *Inonotus*. Поэтому необходимы углубленные исследования компонентного состава представителей данного рода, в том числе *I. rheades*.
- 3. Условия, при которых растет гриб, оказывают прямое воздействие на развитие грибов, при этом регулируя не только физиологические параметры, но и биохимические. Зная механизмы влияния факторов возможно регулирование биосинтеза накопления вторичных метаболитов. Однако, анализ литературных данных показал, что у грибов разных родов в целом не прослеживаются общие закономерности в механизмах ответных реакций на воздействие субстратного и светового фактора. Поэтому исследование изменений химического состава отдельных представителей под влиянием субстрата и света позволит разобраться в данном вопросе.
- 4. Согласно имеющимся сведениям препараты, извлечения и индивидуальные соединения из мицелия и грибов рода *Inonotus* обладают

различной биологической антиоксидантной, активностью, Т.Ч. В противоопухолевой, антибактериальной, противовирусной гипогликемической, противовоспалительной, иммуностимулирующей, кардиопротекторной, гиполипидемической, гепатопротекторной фунгистатической антимутагенной активностью.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

В работе использовали чистые культуры базидиальных грибов рода *Inonotus*, входящих в семейство Hymenochaetaceae: *I. rheades* (Pers.) Bondartsev et Singer штамм 0186, *I. hispidus* (Bull.:Fr.) Karst. штамм 2108, *I. dryophilus* (Berk.) Murr. штамм 1422, *I. tamaricis* (Pat.) Maire штамм 2734, *I. obliquus* (Fr.) Pilat. Данные объекты были приобретены в коллекции культур высших базидиальных грибов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (LE BIN). Далее штаммы поддерживались в ЦКП «Биоресурсный центр» СИФИБР СО РАН.

2.2. Микологические методы

- **2.2.1. Условия хранения грибных культур.** Чистую культуру грибов хранили на обедненной дрожжевой среде на косяках, температура хранения 4 °C (Richardson, Gilbertson, 1975). Пересадку культур проводили не менее одного раза в год.
- 2.2.2. Условия культивирования грибных культур. Мицелий после хранения пересевали на чашки Петри с сусло-агаризованной средой, выращенный в течение 7 суток мицелий использовали для инокуляции. Далее мицелий пересаживали на чашки Петри и выращивали в термостате при температуре 25 °C в течение 4 суток, затем в чашку помещали стерильные древесные диски пород Betula pendula Roth (Betulaceae) или Populus tremula L. (Salicaceea), которые предварительно стерилизовали в автоклаве при давлении 0,9 атмосфер в течение 30 минут. После частичного обрастания дисков, их помещали в стерильную емкость и продолжали инкубировать до полного обрастания древесины и накопления мицелиальной массы в течение

30 суток. Культивирование мицелия велось в стационарных камерах KBW 720 («Віпder», Германия) при температуре 25±1 °C, так исключали влияние температурного фактора на развитие мицелия дереворазрушающих грибов и его химический состав. Полученную чистую мицелиальную массу высушивали до воздушно-сухого состояния при температуре не выше 45 °C с последующим измельчением в однородную массу с величиной частиц не больше 2 мм. Полученный материал хранили в темноте (Горностай и др., 2018).

2.2.3. Определение ростовых характеристик грибов. Рост культур изучали на питательной сусло-агаризованной среде. Инкубацию проводили в термостате при температуре 25±1 °C. Каждые сутки измеряли диаметр разрастания колоний, наблюдали за их морфологическими признаками, плотностью и высотой (Бухало, 1988). На основе полученных данных вычисляли ростовой коэффициент (РК) по формуле **1**:

$$PK = d \times h \times g/t, \tag{1}$$

где d — диаметр колонии, мм; h — высота колонии, мм; g — плотность колонии, балл; t — возраст колонии, сут.

Согласно классификации А.С. Бухало, по скорости роста мицелиальные колонии базидиальных грибов делят на три группы: I – быстрорастущие (РК>100), II – растущие со средней скоростью (РК = 50-100), III – медленнорастущие (РК<50) (Бухало, 1988).

2.2.4. Световая обработка мицелия. Культивирование мицелия для исследовании влияния светового фактора велось на древесном субстрате *Betula pendula* Roth (*Betulaceae*) при температуре 25±1 °C. В качестве источника излучения были выбраны цветные и белые (холодный белый) высокоэффективные трехкристальные светодиоды «SMD-5050» (Рубикон, Барнаул, Россия). Светодиоды были проверены на спетрофотометре «ТКА-Спектр» (НТП ТКА, Санкт-Петербург, Россия). Диапазон излучения красных

светодиодов находился в пределах 625-630 нм, желтых 590-595 нм, зеленых 525-530 нм, синих 465-470 нм с пиком посередине. Спектр холодных белых светодиодов представляет собой участок в диапазоне от 370 до 740 нм с максимальным пиком на 460 нм. Поскольку светодиоды были вмонтированы в боксы со светоотражающим покрытием, то было принято, что все излучение от светодиодов поглощается поверхностью мицелия, расчеты велись на площадь равную 0,0348 м². В работе использовали освещение мицелиальной массы с интенсивностью светового потока для красного 46,4 мкмоль/ M^2 *с, желтого 41,5 мкмоль/ M^2 *с, 55,3 мкмоль/ M^2 *с зеленого, синего 48.3 мкмоль/м^2 к и белого 58.8 мкмоль/м^2 с. Также использовали синий свет с разной мощностью светового потока 24,1 мкмоль/м² «с (2 светодиода), 48,3 мкмоль/ M^2 *с (4 светодиода), 96,8 мкмоль/ M^2 *с (8 светодиодов), 144,9 мкмоль/ м^2 *с (12 светодиодов), 193,2 мкмоль/ m^2 *с (16 светодиодов), 241,5 мкмоль/ M^2 *с (20 светодиодов), 289,8 мкмоль/ M^2 *с (24 светодиода) (Ландсберг, 1975). Культивирование мицелия проводили в течение 30 суток при непрерывном освещении.

2.3. Фармакогностические методы

2.2.1. Микроскомический анализ. Для проведения световой микроскопии использовали тонкие поперечные и продольные срезы сырья. Полученный срез помещали на предметное стекло в каплю спирта этилового 70%. Для приготовления препаратов порошка кусочки сырья помещали в небольшое количество спирта этилового 70%, перемешивали 5 минут, после чего помещали на предметное стекло. Исследование проводилось на микроскопе Axiostar PLUS Carl Zeiss (Германия). Фотографии были сделаны с помощью програмного обеспечения микроскопа Akcio Vision при увеличении ×400 и ×1000.

- **2.2.2.** Определение товароведческих показателей. Определение влажности, золы общей, примесей, ситовой анализ проводили согласно рекомендациям (Государственная Фармакопея СССР, 1990).
- **2.2.3.** Определение показателей качества. Определение микробиологической чистоты, содержание тяжелых металлов проводили согласно рекомендациям (Государственная Фармакопея СССР, 1990).

2.4. Экстракция и фракционирование мицелия

массу, высушенную до мицелиальную воздушно-сухого состояния, измельчали И подвергали фракционированию растворителей с увеличивающейся полярностью: гексан, дихлорэтан, этилацетат, этанол и вода в соотношении 1:30. Экстракцию проводили на ультразвуковой ванне (ВУ-09-«Я-ФП», Россия) при 25 °C в течение 40 минут дважды, затем органическое извлечение отфильтровали и высушивали на роторном испарители досуха. Остаток ткани далее экстрагировали способом дихлорэтаном этилацетатом, аналогичным И после температуру экстракции увеличивали до 70 °C и продолжили извлечение 90% этанолом и водой.

2.5. Физико-химические методы

- **2.5.1. Температура плавления.** Температуру плавления исследуемых соединений определяли в запаянных капиллярах на приборе для определения температуры плавления IA-9100 (Melting PointApparatus, Electrothermal, UK).
- **2.5.2.** Спектроскопия в УФ- и видимой областях. Спектральные исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр, Санкт-Петербург, Россия), используя кварцевые кюветы с толщиной поглощающего слоя 1 см.

- **2.5.3.** Спектроскопия в инфракрасной области. Образцы для анализа смешивали (растирали) с КВг (1:100) и высушивали в вакууме. ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре ФТ-801 (Симекс, Новосибирск, Россия) в интервале 4000-450 см⁻¹.
- **2.5.4. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР).** Спектры 13 С-ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре VXR 500S (Varian), рабочая частота 125,7 МГц и J=140 Гц. Спектры сняты для 1% растворов веществ в d_6 -ДМСО, D_2 О и 5% NaOD в D_2 О. Обработку результатов 13 С-ЯМР проводили с применением пакета программ MestReC 4.9.9.6 (Mestelab Research).

2.6. Методы хроматографического анализа (ВЭЖХ-УФ) тритерпеноидов и фенольных соединений

- **2.6.1. ВЭЖХ тритерпеноидов.** Анализ осуществляли на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром A-02 (Эконова); колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ ($2\times75\,$ мм, Ø5 мкм; Metrohm AG); подвижная фаза: 0,2 M LiClO₄ в 0,006 MHClO₄ (A), MeCN (B); градиентный режим (% B): 0–10 мин 50–100, 10–20 мин 100; v 150 мкл/мин; температура колонки 35 °C; УФ-детектор, λ 210, 250 нм. Расчет содержания индивидуальных компонентов проводили по градуировочным графикам, построенным с применением коммерческих образцов лупеола, бетулина и бетулиновой кислоты (Sigma Aldrich).
- **2.6.2. ВЭЖХ фенольных соединений.** Анализ осуществляли на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром А-02 (Эконова); колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2×75 мм, \emptyset 5 мкм; Metrohm AG); подвижная фаза: 0,2 М LiClO₄ в 0,006 MHClO₄ (A), MeCN (B); градиентный режим (% B): 0–20 мин 5–76; v 150 мкл/мин; температура колонки 35 °C; УФ-детектор, λ 360 нм. Расчет содержания индивидуальных компонентов

проводили по градуировочным графикам, построенным с применением коммерческих образцов стандартных соединений (гиспидин, Sigma Aldrich) и выделенных образцов соединений с чистотой ≥95% (1,1-дистирилпирилэтан, биснорянгонин, феллинины A1/A2, 3-биснорянгонил-14′-гиспидин, гифоломин B, 3,14′-бисгиспидинил).

2.7. Методы выделения и анализа полисахаридов

- **2.7.1.** Выделение водорастворимых полисахаридов. Сухой остаток от водной экстракции растворяли в воде (50 мл) и осаждали полисахариды этанолом (1:5). Выпавший осадок отделяли центрифугированием (3000 g, 15 мин), после чего растворяли в воде (50 мл) и обрабатывали по методу Севага для удаления белковых компонентов (Staub, 1965). Супернатант после удаления белка диализовали против дистиллированной воды в течение 48 ч в диализных тубах с пределом диализа 2 кДа. Недиализованный остаток осаждали ацетоном (1:4), выпавший осадок отделяли центрифугированием (3000 g, 10 мин) и высушивали с получением фракции водорастворимых полисахаридов (ВРПС) (Оленников и др., 2012).
- **2.7.2.** Гель-хроматография полисахаридов. Использовали Sephacryl® 300 HR (Sigma-AldrichInc., Германия), колонка 1,6×60 см, элюент фосфатный буфер, рН 5,5, скорость потока 800 мкл/мин, объем элюатов 1 мл, температура колонки 20 °C. Колонку градуировали с использованием стандартов декстранов с молекулярными массами 6, 100, 200, 500 кДа (Fluka, Швейцария). Внешний объем колонки определяли по синему декстрану (2000 кДа, Pharmacia, Швеция). Концентрация раствора полисахарида 10 мг/мл, стандартов декстранов 1 мг/мл, объем вводимой пробы 1 мл. Объем выхода определяли спектрофотометрическим фенол-сернокислотным методом при 480 нм (Оленников, Рохин, 2013).

2.7.3. Моносахаридный состав. Растворяли 10 мг полисахарида в 5 мл 2 М ТФУ и нагревали при 120 °C в течение 2 ч. ТФУ удаляли в вакууме в присутствии метанола, остаток растворяли в смеси ацетонитрил-вода (3:1) и анализировали методом ВЭЖХ. Для этого использовали жидкостной хроматограф Милихром А-02 (Эконова, Новосибирск, Россия), снабженный колонкой Separon 5-NH₂ (80×2 мм, 5 мкм, Tessek Ltd., Чехия). Подвижная фаза: ацетонитрил — вода (3:1), скорость подвижной фазы 0,1 мл/мин, температура колонки 22 °C. Детектирование проводили при 190 нм (Оленников, Рохин, 2013).

2.7.4. Метилирование и анализ метилированных производных методом ГХ/МС. Метилирование полисахарида осуществляли йодистым метилом с последующим формолизом, гидролизом перметилата и анализом методом ГХ/МС, который проводили на хромато-масс-спектрометре 5973N/6890N MSD/DS (Agilent, США) с масс-селективным детектором (№5973) с диффузным насосом с применением капиллярной колонки PH-Innowax (30 м×250 мкм×0,50 мкм). Градиент температуры — 150-250 °С, скорость нагрева 2 °С/мин. Газ-носитель — гелий, скорость потока 1 мл/мин (Оленников и др., 2012).

2.8. Методы выделения и анализа жирных кислот

2.8.1. Выделение липидной фракции и получение метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК). Навеску 0,5 г растирали в ступке, добавляли 10 мл смеси хлороформ/метанол (1:2), тщательно гомогенизировали и оставляли на 30 мин (Bligh and Dyer, 1959).

Раствор после фильтрования расслаивали с добавлением 1 мл воды, таким образом отделяя хлороформный слой и концентрировали в вакууме досуха. К остатку добавляли $1\% \ H_2SO_4$ в метаноле и нагревали на водяной бане при $60\ ^{\circ}$ С в течение $30\$ мин, полученные МЭЖК после охлаждения трижды экстрагировали гексаном (Christie, 1993) и наносили на

алюминиевые пластинки с силикагелем Sorbfil ПТСХ-АФ-В (Имид, Краснодар, Россия). Подвижная фаза — бензол. Зону МЭЖК удаляли с пластинки и элюировали с силикагеля гексаном (Горностай и др., 2018).

2.8.2. Анализ МЭЖК методом ГХ / МС. Анализ МЭЖК проводили методом ГЖХ на хромато-масс-спектрометра 5973/6890N MSD/DS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US) с квадрупольный масс-спектрометрическим детектором, с применением капиллярной колонки PH-Innowax (30 м×250 мкм×0,50 мкм), градиент температуры − 150-250 °C, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром, 280 °C. Газ-носитель − гелий, скорость потока газа 1 мл/мин. Диапазон сканирования 41-450 а.е.м. (Горностай и др., 2018).

2.9. Методы исследования биологической активности фракций и индивидуальных соединений

2.9.1. Антимикробная и фунгистатическая активность. Антимикробное действие изучалось методом диффузии в агар с использованием агара Мюллера-Хинтона производства НИЦФ (г. Санкт-Петербург). В качестве тесткультур использовали референтные штаммы микроорганизмов, полученные из ГНИИ стандартизации и контроля медицинских препаратов им Л.А. Тарасевича (г. Москва) из музея ИФ ГНУ ИЭВС и ДВ Россельхозакадемии, культуры микроорганизмов, выделенные из патологического материала в ФГБОУ «Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория», производственный штамм Saccharomyces cerevisiae. Микробная нагрузка составляла 1-2×10⁷ КОЕ/мл. Для изучения антимикробной активности экстрактов пропитывали стерильные стандартные диски фирмы ВіоМегіеих образцами экстрактов, подсушивали их при 40 °С в течение 30 мин и помещали на поверхность агара Мюллера—Хинтона, засеянный тест-культурой. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Посевы культуры S. cerevisiae проводили на среде Сабуро и инкубировали при 30 °С в течение 24 ч. Далее определяли зону

2.9.2. Для Иммуномодулирующая активность. проведения экспериментальных исследований использовали 44 половозрелых самца мышей линии CBA, 260 гибридов F1 (CBA×C57Bl/6) с массой тела 20-22 г, 8-10-недельного возраста (Cunningham, 1965). Линейные животные получены из питомника РАМН «Столбовая». Содержание животных соответствовало «Правилам лабораторной практики» (GLP) и Приказу МЗ РФ № 708H от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики». Перед началом экспериментов животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, распределялись на группы с учетом пола, возраста, массы и принципа рандомизации. Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с приказом M3 PФ № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики» от 19.06.2003 и «Правилами Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целях» (Страсбург, 1986). Протокол исследований согласован с этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (протокол № 7 от 12.11.2013 г.) (Цыренова, 2017).

Воспроизведение экспериментальной иммуносупрессии. Экспериментальную модель иммуносупрессии у животных создавали введением цитостатика азатиоприна (ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н. А. Семашко, лекарственная форма — таблетки), в дозе 50 мг/кг перорально в объеме 0,1 мл/мышь 1 раз в сутки в течение 5 дней (Цыренова, 2017).

Реакция гиперчувствительности замедленного типа $(\Gamma 3T)$. Сенсибилизацию мышей корпускулярным тимусзависимым антигеном, с последующим введением разрешающей дозы эритроцитов барана (ЭБ) для воспроизведения реакции ГЗТ, производили согласно стандартной методике ГЗТ локальной (Цыренова, 2017). Мышей сенсибилизировали внутрибрюшинно введением 0,1% взвеси ЭБ в физиологическом растворе. На 4 сутки под подошвенный апоневроз задней лапки вводили разрешающую дозу антигена – 50 мкл 50% взвеси ЭБ. В контрлатеральную лапку

инъецировали физиологический раствор в том же объеме. Оценку реакции ГЗТ проводили спустя 24 часа по разнице массы опытной (m_0) и контрольной (m_K) лапок. Обе лапки отрезали сразу же после забоя животных по голеностопному суставу. Индекс реакции (ИР ГЗТ) вычисляли по формуле (13):

$$\text{MP }\Gamma 3T = (m_0 - m_K/m_K) \times 100,$$
 (2)

где m_0 — масса лапки в опытной группе, г; m_K — масса лапки в контрольной группе, г.

2.9.3. Общий антиоксидантный потенциал (Total Antioxidant Capacity, TAC). 1 мл исследуемого раствора переносили в пробирку вместимостью 10 мл, приливали 5 мл реактива и нагревали на кипящей водяной бане в течение 90 мин. Раствор после охлаждения переносили водой очищенной в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем. Оптическую плотность раствора определяли при длине волны 695 нм. Для приготовления раствора сравнения смесь 1 мл воды очищенной и 5 мл реактива обрабатывали, как указано выше (Preito et al., 1999).

Приготовление реактива. 4,37 г натрия дигидрофосфата дигидрата, 4,95 г аммония молибдата тетрагидрата переносили в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяли в 500 мл воды очищенной, приливали 60 мл кислоты серной концентрированной и доводили объем раствора до метки водой очищенной.

TAC Для величины предварительно расчета определяли ВИД градуировочного графика, построенного по растворам аскорбиновой кислоты. По полученным значениям оптической плотности растворов аскорбиновой кислоты строили градуировочный график в координатах с $(мкг/мл) - A^{695}$ (опт. ед.) и после регрессионного анализа определяли вид уравнения регрессии, с применением которого рассчитывали условную концентрацию аскорбиновой кислоты в исследуемом препарате.

2.9.4. Антирадикальная активность

2.9.4.1. DPPH-метод (связывание свободного радикала DPPH'). Для реакции использовали 0,04% раствор 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила радикала (DPPH) в 95% спирте этиловом. К 1 мл DPPH вносили 900 мкл воды и 100 мкл извлечения. Оптическую плотность раствора определяли через 30 мин при длине волны 520 нм. В качестве контроля (I) использовали раствор аскорбиновой кислоты, контроля (II) воду очищенную (Asker, Shawky, 2010). Антирадикальную активность (DPPH_%) рассчитывали по формуле (**12**):

$$DPPH_{\%} = [(A - A_{I})/(A_{II} - A_{I})] \times 100,$$
 (3)

где A — оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{\rm I}$ — оптическая плотность раствора $I; A_{\rm II}$ — оптическая плотность раствора II.

2.9.4.2. АВТЅ-метод (связывание свободного радикала **АВТЅ'**⁺). К 1 мл раствора 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин)-6-сульфоновой кислоты (АВТЅ'⁺) вносили 900 мкл воды и 100 мкл извлечения. Оптическую плотность раствора определяли через 10 мин при длине волны 700 нм. В качестве контроля (I) использовали раствор аскорбиновой кислоты, контроля (II) воду очищенную (Ding et al., 2010). Антирадикальную активность (АВТЅ'+, рассчитывали по формуле (**13**):

где A — оптическая плотность исследуемого раствора; $A_{\rm I}$ — оптическая плотность раствора $I; A_{\rm II}$ — оптическая плотность раствора II.

Приготовление раствора ABTS^{*+}: 7,7 мг ABTS^{*+} растворяли в 10 мл воды очищенной (раствор 1). 2 мг натрия персульфате растворяли в 10 мл воды очищенной (раствор 2). Растворы 1 и 2 смешивали и оставляли при 20 °C в темноте на 16 ч. Полученный раствор разбавляли водой очищенной до значения оптической плотности при длине волны 700 нм не менее 2,0 оптических единиц.

2.9.5. Антикомплементарная активность

Анализ проводили по методу Samuelsen (Samuelsen et al., 1999). Эритроциты барана отмывали дважды 0,9% NaCl и один раз вероналовым буфером (рН 7,2), содержащим 145 мМ NaCl, 190 мкМ Ca²⁺, 826 мкМ Mg²⁺, 2 мг/мл BSA и 0,02% NaN₃ (VB/BSA) и сенсибилизировали с помощью антител кролика. После инкубации при 37°C в течение 30 мин на шейкере клетки промывали, как описано выше, и 1%-ную суспензию клеток в VB/BSA готовили и хранили при 4°C. Сыворотку человека с интактными белками комплемента, взятого от здорового донора, обрабатывали для удаления антител к эритроцитам барана (Michaelsen et al., 1991). Сыворотку разбавляли VB/BSA (1:40) до концентрации, дающей около 50% гемолиза.

Образцы, растворенные в VB/BSA 50 мкл, и сыворотку 50 мкл вносили в лунки микропланшета и инкубировали на шейкере при 37°C в течении 30 мин. Далее вносили сенсибилизированные эритроциты барана 50 мкл и инкубацию продолжали аналогичным способом. После центрифугирования при 1700 оборотов в течении 10 мин определяли оптическую плотность супернатанта при 405 нм (A_S).

Образец со 100% лизисом был получен с дистиллированной водой и сенсибилизированными эритроцитами овец (A_{100}). Смесь VB/BSA, сыворотки и сенсибилизированных эритроцитов барана была использована в качестве контроля (A_K), а фракцию РМП из листьев *Plantago major* L. использовали в качестве положительного контроля.

Степень лизиса (D_L) рассчитывали по формуле (**14**):

$$D_L = \frac{A_K}{A_{100}} \times 100\% \tag{5}$$

Антикомплементарную активность (ACA) в процентах рассчитывали по формуле (15):

$$ACA = \frac{A_K - A_S}{A_K} \times 100\% \tag{6}$$

По полученным данным строили графики в координатах «концентрация, мкг/мл» - «антикомплементарная активность %».

2.9.6. Ингибирование термической денатурации белка по Paszkowska c coabt. (противовоспалительная активность)

Анализ проводили по методу Paszkowska с соавт. (Paszkowska et al.,2015). Исследуемый раствор, состоящий из 450 мкл 5% раствора BSA и 50 мкл раствора экстракта (или соединения) в ДМСО (10–1000 мкг/мл), инкубировали при 37°C в течение 20 мин, после чего температуру смеси повышали до 57°C и продолжали инкубацию еще 5 мин. Далее исследуемый раствор охлаждали, приливали 2,5 мл фосфатного буфера (рН 6,3) и измеряли оптическую плотность при 416 нм. Для приготовления контрольного раствора смешивали 450 мкл воды дистиллированной и 50 мкл раствора экстракта (или соединения) в ДМСО (10–1000 мкг/мл). Для приготовления раствора отрицательного контроля смешивали 450 мкл 5% раствора BSA и 50 воды дистиллированной. Контрольный раствор раствор МКЛ отрицательного контроля обрабатывали также как и исследуемый раствор. Процент ингибирования термической денатурации белка рассчитывали по формуле:

$$\%I=100-\{[(A_1-A_2)/A_3]\times 100\},\tag{7}$$

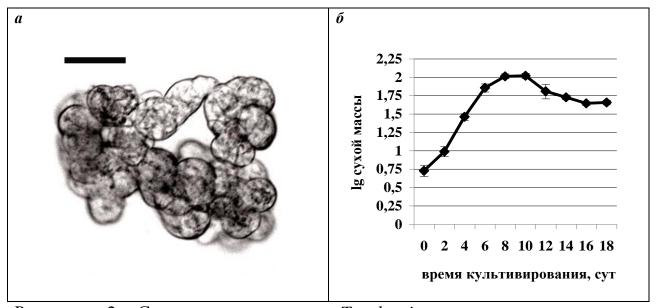
где A_1 – оптическая плотность исследуемого раствора; A_2 – оптическая плотность контрольного раствора; A_3 – оптическая плотность раствора отрицательного контроля.

В качестве раствора сравнения (положительный контроль) использовали раствор диклофенака натрия (10–1000 мкг/мл).

2.9.5. Антиоксидантная активность. Моделирование окислительного стресса на культкре клеток растений

Для определения антиоксидантной активности *in vivo* использовали суспензионную культуру клеток pacteний *Thellungiella salsuginea*,

полученную в СИФИБР СО РАН. Культуру клеток выращивали в термостатируемой комнате при 26 °C на среде Мурасиге-Скуга (Murashige, Scoog, 1962), содержащей 3% сахарозы, 0,5 мг/л тиамина и 0,3 мг/л 2,4-Д. Культуру пересевали каждые 14 дней с разведением свежей средой в 10 раз. Для суспензионной культуры *Т. salsuginea* был построен график кривой роста (рис. 2).



Скорость прироста биомассы суспензионной культуры была высокой, стационарная фаза начиналась уже на 6-8-е сутки. В экспериментах использовали 3 суточную суспензионную культуру, находящуюся в экспоненциальной фазе роста.

Моделирование окислительного стресса суспензии растительных клеток *T. salsuginea* проводили с применением теплового воздействия в диапазоне от 30 °C до 65 °C с шагом в 5 °C в течение 10 минут. Температурную обработку проводили в термошейкерах (BioSan, Латвия) и инкубаторах MIR-153 и MIR-154 (Sanyo, Япония).

Определение жизнеспособности клеток. Выживаемость клеток суспензионной культуры *T. salsuginea* определяли с помощью окрашивания флюоресцентным летальным красителем пропидий йодид (PI), конечная

концентрация 7 мкМ (Biotium, США). По 100 мкл культуры помещали в микроцентрифужные пробирки объёмом 2 мл, инкубировали в течение 10 минут при 26 °C на минитермошейкере TS-100 (BioSan, Латвия) и использовали для микроскопического анализа на AxioObserverZ1 (CarlZeiss, Германия). РІ не способен проникать через мембрану нативной клетки, поэтому накапливается только в погибших клетках, имеющих мембранные дефекты, и связывается там с ДНК, образуя связи между основаниями ДНК в пропорции одна молекула на 4-6 пар оснований. Он также способен связываться с РНК. Для регистрации сигнала использовали Filterset 15 (EXBP 546/12, BSFT 580, EMLP 590). (Koukalova et al., 1997). Количество мертвых клеток, окрашенных РІ, а также количество живых неокрашенных клеток подсчитывалось в 10-ти полях, содержащих не менее 500 клеток, в 3-х повторностях. Интенсивность флуоресценции выражали в процентах от контроля.

Определение содержания АФК в клетках. Для количественного определения АФК в клетках суспензионной культуры T. salsuginea использовали флуоресцентный краситель 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат – H₂DCF-DA (Fluka, Швеция), который добавляли в культуральную среду в количестве 1 мкМ, после чего инкубировали при 26 °C в течение 10 мин и анализировали свечение образованного флуоресцеина на микроскопе AxioObserverZ1 (CarlZeiss, Германия). H₂DCF-DA легко проникает в живые клетки, где при действии неспецифических клеточных эстераз в присутствии АФК подвергается окислению с преобразованием молекулы в 2',7'дихлорфлюоресцеин (DCF), который флуоресцирует в зеленом канале. Для регистрации сигнала использовали Filterset 10 (EXBP450-490, BSFT 510, ЕМВР 565). Специфичность красителя оценивали по уровню флуоресценции в ответ на добавление 5 мМ H_2O_2 (отрицательный контроль) и 100 мМ аскорбиновой (положительный контроль). Интенсивность кислоты флуоресценции подсчитывали в 10-ти полях, содержащих не менее 500 клеток в 3-х проворностях, и выражали в процентах от контроля.

2.10. Статистическая обработка данных

Во всех случаях проводили не менее 3-х независимых экспериментов, в каждом из которых повторность была 2-6 кратной. В подписях к рисункам «п» означает количество независимых экспериментов. Данные представлены как средняя арифметическая (М), разброс значений — в виде стандартного отклонения (±S.D.). Различия между экспериментальными данными считали статистически значимыми при р < 0,05 (Гланц, 1998). Статистические расчеты осуществляли с помощью пакета Sigma Plot 12.0.

ГЛАВА 3. ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИЦЕЛИЯ *I. RHEADES*

3.1. Обоснование выбора объекта

Для проведения экспериментов было запланировано получение чистой мицелиальной массы нескольких грибов рода Inonotus: I. obliquus, I. tamaricis, I. hispidus, I. dryophilus, I. rheades на древесных дисках. Использование чистой мицелиальной массы является актуальным по ряду причин. Во-первых, нет сезонной зависимости в получении сырья по сравнению с плодовыми телами, собранными в природе. Известно, что период плодоношения грибов очень ограничен (1-3 недель), а некоторые виды не способны плодоносить каждый год (Ryvarden, Gilbertson, 1993; Ниемеля, 2001). Во-вторых, отсутствуют количественные ограничения для мицелиальной получения массы, которые ΜΟΓΥΤ быть связаны индивидуальными особенностями плодоношения грибов, изменением климатических и погодных условий. Учитывая физиологические особенности грибов и ареал их распространения, следует помнить, что некоторые грибы не образуют достаточного количества плодовых тел, а также могут являться редкими (Мухин, 1993). В природе развитие грибного организма также напрямую зависит и от климатических факторов, например, в периоды засухи развитие мицелия замедляется, а образование примордиев и плодовых тел не происходит (Xing et al., 2013). В-третьих, получаемая микробиологически мицелиальная масса является чистой И стандартизированной по качеству. В природных условиях любой организм подвержен контаминации, грибы в этом случае не являются исключением. При множественном действии различных факторов среды, сырье, собранное в природных условиях, имеет варации химического состава (Olennikov et al., 2009). В-четвертых, мицелий является более удобным объектом для регулирования его свойств. С применением экологических параметров

выращивания мицелия возможна регуляция его химического состава, например, параметры освещения оказывают непосредственное влияние на морфологию развития, физиологию и метаболизм грибов (Tisch et al., 2010). Учитывая вышесказанное, экспериментальную работу вели с применением чистой мицелиальной массы, плодовые тела использовались только для сравнения.

При выращивании мицелия на чашках Петри было выявлено, что исследованные виды грибов *I. obliquus, I. tamaricis,I. hispidus, I. dryophilus, I. rheades*, можно отнести к быстрорастущим (РК>100) и растущим со средней скоростью (РК=50–100) согласно классификации А. С. Бухало (Бухало, 1988). Так, при 25 °C ростовой коэффициент составил 85, 120, 75, 102, 95, соответственно.

При получении чистой мицелиальной массы на древесных дисках Вetula pendula Roth (Betulaceae), оказалось, что не все представленные виды могут накапливать мицелиальную массу, так, мицелий I. tamaricis даже при длительном выращивании не накапливал мицелий. При культивировании данного гриба наблюдался только «захват» субстрата, подобным образом вел себя и мицелий I. obliquus. Таким образом, мицелиальную массу на древесных дисках удалось получить у следующих объектов: I. hispidus, I. dryophilus и I. rheades. Стоит отметить, что I. hispidus обладал низкой скоростью роста и небольшим количеством мицелиальной массы на древесных дисках и в дальнейшей работе нами не использовался.

В ходе дальнейшего исследования была проанализирована биологическая активность двух видов рода *Inonotus*, показавших наибольший выход биомассы *I. dryophilus* и *I. rheades*. Для 30 и 70% водно-спиртовых экстрактов из мицелия был выявлен выраженный антирадикальный эффект (табл. 2). Также была проанализирована активность экстрактов из плодового тела *I. rheades*, собранного в окрестностях г. Иркутск (2013 г.). В результате было выявлено, что экстрактивные вещества мицелия *I. rheades* проявляют большую антирадикальную активность, чем плодовых тел.

Таблица 2 – Сравнительная характеристика антирадикальной активности водно-спиртовых экстрактов грибов

Анализируемый	Водно-спиртовой	IC ₅₀ (мкг/мл)	
образец	экстракт	$ABTS^{+}$	DPPH
Мицелий <i>I. rheades</i>	30%	16,4±0,53	17,93±0,44
Мицелии 1. Theades	70%	7,74±0,54	2,65±0,23
Myyanyi I dmanhilus	30%	22,25±0,35	16,56±1,06
Мицелий <i>I. dryophilus</i>	70%	10,98±0,37	3,92±0,18
Плодовое тело	30%	58,01±1,35	122,49±3,25
I. rheades	70%	21,83±0,57	37,68±0,95
Контроль		4,26±0,17	1,81±0,11

Примечание: n=3. M±S.D. Контроль – протокатеховая кислота.

Далее была проанализирована антимикробная и фунгистатическая активность 30% водно-спиртовых экстрактов. В ходе анализа установлено, что мицелий *I. rheades* и плодовое тело *I. rheades* обладают антимикробной активностью по отношению к исследуемым тест – микроорганизмам (табл. 3) (Горностай и др., 2014).

Таблица 3 – Антимикробная активность водно-спиртовых экстрактов грибов

	Зона подавления роста микроорганизмов, мм					
Тест-культуры	Мицелий	Мицелий	Плодовое тело	Контроль		
	I. rheades	I. dryophilus	I. rheades	Контроль		
Salmonella enteritidis ИМВЛ	$14,3\pm0,5$	-	-	-		
Enterococcus faecalis ATCC 29217	14,2±0,6	-	-	-		
Salmonella ngor ИМВЛ	$13,9\pm0,2$	-	-	-		
Streptococcus spp.44	9,3±0,4	-	12,3±0,2	-		
Staphylococcus aureus ATCC 209 p	8,6±0,3	-	12,6±0,2	-		
Escherichia coli ATCC3 5218	8,7±0,2	-	11,7±0,3	-		
Escherichia coli-ТИ	9,3±0,2	-	12,4±0,3	-		
Saccharomyces cerevisiae	12,4±0,4	-	-	-		

Примечание: n=3. M±S.D. Указана зона подавления 30% водно-спиртового экстракта; «-» отсутствие зон подавления роста; контроль – диски пропитывались водно-спиртовой смесью (7:3). ИМВЛ – Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория; АТСС – Американская коллекция типовых культур.

Образец *I. rheades* обладает фунгистатической активностью по отношению к тест – культуре *S. cerevisiae*. Экстракты *I. dryophilius* не проявляют активности в отношении всех представленных микроорганизмов.

В ходе предварительных работ было выявлено, что мицелий *I. rheades* наиболее удобен для проведения дальнейших исследований, так как способен активно накапливать мицелиальную массу на разных субстратах, более того, экстракты из мицелия проявляют выраженную биологическую активность.

3.2. Биохимический анализ мицелия *I. rheades*

На первом этапе работы был проведен сравнительный количественный анализ мицелия и плодовых тел *I. rheades* на наличие основных групп органических соединений. В результате было установлено, что содержание общих углеводов в мицелии в 1,8 раз больше, чем в плодовых телах (табл. 4).

Таблица 4 – Биохимический состав мицелия и плодовых тел *I. rheades*

Показатель	Мицелий	Плодовое тело
Влажность, г/100 г	4,54±0,16	5,22±0,15
Углеводы, г/100 г	5,74±0,12	3,11±0,09
Водорастворимые, г/100 г	2,29±0,08	$0,83\pm0,05$
Спирторастворимые, г/100 г	2,19±0,05	1,38±0,07
Щелочерастворимые, г/100 г	1,46±0,03	0,91±0,10
Волокна, г/100 г	79,04±3,47	87,57±3,69
Белок, г/100 г	$0,92\pm0,02$	$0,09\pm0,00$
Липиды, г/100 г	0,67±0,01	$0,14\pm0,00$
Аминокислоты, г/100 г	$0,72\pm0,02$	1,23±0,05
Фенолы, г/100 г	0,54±0,04	$0,09\pm0,00$
Зола, г/100 г	2,60±0,10	$5,63 \pm 0,28$
Энергия, ккал/100 г	32,67	14,06

Примечание: n=3. M±S.D.

общей Выявлено, что мицелий И плодовые тела не имеют закономерности в содержании водорастворимых, спирторастворимых и щелочерастворимых углеводов, содержание углеводов распределяется следующим образом: в мицелии (водорастворимые > спирторастворимые > щелочерастворимые), (спирторастворимые > В плодовых телах

щелочерастворимые > водорастворимые). Установлено, что в мицелии содержание белка, липидов и фенолов в 10, 4,7 и 6 раз выше, чем в плодовых телах соответственно. Количество аминокислот в плодовом теле в 1,7 раза больше. Полученные данные подтверждают перспективность использования мицелия *I. rheades* в качестве источника для поиска биологически активных веществ.

3.3. Фракционирование и предварительная химико-биологическая характеристика экстрактивных веществ мицелия *I. rheades*

Для предварительного анализа химического профиля мицелия *I. rheades* было осуществлено фракционирование экстрактивных веществ рядом растворителей с увеличивающейся полярностью последних, включая гексан, дихлорэтан, этилацетат, этанол и воду. Для этого использовали 120 г измельченного мицелия *I. rheades*. В результате было получено пять фракций (табл. 5).

Таблица 5 – Выход фракций экстрактивных веществ из мицелия *I. rheades*

Обозначение	Экстрагент	Выход, г	Выход, %
Ir-01	гексан	0,564	0,47
Ir-02	дихлорэтан	0,828	0,69
Ir-03	этилацетат	0,252	0,21
Ir-04	этанол	4,176	3,48
Ir-05	вода	4,920	4,10
Общая экст	рактивность	10,740	8,95

Химическая характеристика фракций была осуществлена методами УФ- и ИК-спектроскопии (рис. 3). В результате чего было показано, что для фракций Ir-01 и Ir-02 не характерно присутствие УФ-активных соединений (в частности фенольных веществ), однако сильное поглощение в области ИК-спектра 3000-2800 см⁻¹ свидетельствовало о высоком содержании липидов. Данное явление свойственно фракциям, полученным с применением экстрагентов низкой полярности, каковыми являются гексан и дихлорэтан.

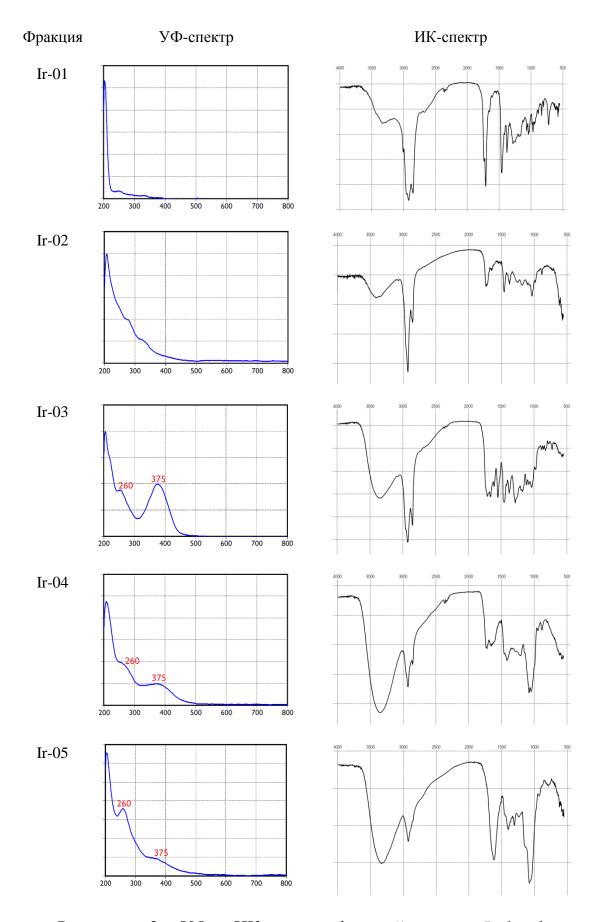


Рисунок 3 – УФ- и ИК-спектры фракций мицелия *I. rheades*

Фракция Ir-03 обладала специфическим поглощением в УФ-области спектра при 260 и 375 нм, что указывало на доминирование фенольных компонентов, содержащих систему конъюгированных связей. В спектрах фракций, полученных с использованием более полярных растворителей (этанол, вода), также присутствовали экстремумы в УФ-области, однако их выраженности были незначительными.

Следует отметить, что особенностью ИК-спектра фракции Ir-05 являлась система полос в области 1200-100 см⁻¹, указывающая на наличие полимерных углеводных компонентов (полисахаридов). Данная фракция давала положительную реакцию на спирто-нерастворимые углеводные компоненты, что подтвердило данный факт. Таким образом, мицелий *I. rheades* характеризовался присутствием соединений различной полярности, в том числе неполярных (липиды), средней (фенольные соединения) и высокой полярности (углеводы).

биологической Исследование активности фракций Ir-01–Ir-05 осуществляли с использованием стандартных методов, включая метод ингибирования термической денатурации альбумина для исследования противовоспалительных свойств (Paszkowska et al.,2015), определение показателей общего антиоксидантного потенциала и индекса 50%-ого связывания радикалов DPPH - для изучения антиоксидантных свойств (Asker, Shawky, 2010), а также выявляли фагоцитарный индекс в реакции гиперчувствительности замедленного типа при исследовании иммуномодулирующих свойств (Cunningham, 1965) (табл. 6).

Проведенные исследования показали, что наиболее выраженной противовоспалительной активностью обладала фракция Ir-01, которая в дозе 50 мкг/мл способствовала ингибированию процесса термической денатурации альбумина на 69,2% (препарат сравнения – диклофенак натрия, 74,2%). Ранее было обнаружено, что эргостерин, эргостерин пероксид и траметеноловая кислота, входящие в состав фракции петролейного эфира из *Lobliquus* оказывают значительное ингибирующее действие на продукцию

NO и активность люциферазы NF-кВ в клетках макрофагов RAW 264,7 проявляя противовоспалительную активность (Ma et al., 2013).

Таблица 6 – Биологическая активность экстрактивных веществ фракций из мицелия *I. rheades*

Фромуна	ИТДА, %	ОАП,	DPPH', IC ₅₀ ,	ИР ГЗТ, ФИ,
Фракция	ИТДА, 70	мг-экв. ГК/г	мкг/мл	%
Ir-01	69,2±2,1	99,00±2,37	>1000	38,1±1,1
Ir-02	<10	125,71±3,64	695,25±21,61	36,0±1,4
Ir-03	48,4±1.4	893,83±25,92	0,12±0,00	47,4±1,6
Ir-04	<10	318,36±9,86	6,21±4,26	40,9±1,1
Ir-05	24,6±0,7	219,59±6,36	148,94±6,37	54,9±1,5
Диклофенак натрия	74,2±2,8	н.и.	н.и.	н.и.
Галловая кислота	н.и.	1000	2,14±0,06	н.и.
Интактная группа	н.и.	н.и.	н.и.	78,2±2,4
Азатиоприн	н.и.	н.и.	н.и.	36,4±1,6
Иммунал®	н.и.	н.и.	н.и.	58,2±1,9

Примечание: n=3. M±S.D. Фракции: Ir-01 — гексановая, Ir-02 — дихлорэтаная, Ir-03 — этилацетатная, Ir-04 — этанольная, Ir-05 — водная; ИТДА — ингибирование термической денатурации альбумина, % от контроля; ОАП — общий антиоксидантный потенциал, мгэквивалент галловой кислоты в г; DPPH — антирадикальная активность против радикала дифенилпикрилгидразила; ИР ГЗТ, ФИ — индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа, фагоцитарный индекс, % от контроля; н.и. — не изучалось. Жирным шрифтом указаны наибольшие значения каждого вида биологической активности.

Максимальные показатели общего антиоксидантного потенциала и антирадикальной активности были отмечены для фракции Ir-03 – 893,83 мг-экв. ГК/г и 0,12 мкг/мл, соответственно (препарат сравнения – галловая кислота, 2,14 мкг/мл). Величина фагоцитарного индекса для фракции Ir-05 составила 54,9%, что близко к таковому значению препарата Иммунал (58,2%), что указывало на способность фракции Ir-05 восстанавливать показатели сниженного иммунитета в условиях экспериментальной иммуносупрессии.

Полученные сведения демонстрировали широкий диапазон биологической активности комплекса экстрактивных веществ мицелия *I. rheades*, обладающих противовоспалительной, антиоксидантной и

иммуностимулирующей активностью. Дальнейшая экспериментальная работа была ориентирована на изучение компонентного состава наиболее активных фракций, а именно гексановой (Ir-01), этилацетатной (Ir-03) и водной (Ir-05).

3.4. Лупановые тритерпеноиды и стеролы фракции Ir-01

Фракцию Ir-01 (0,5 г) разделяли методом колоночной хроматографии на силикагеле (3×30 см, элюент гексан—этилацетат $100:0 \rightarrow 70:30$) в результате чего были получены подфракции Ir-01/1—Ir-01/7. Подфракции Ir-01/1 и Ir-01/2 далее хроматографировали на силикагеле (1×20 см, элюент петролейный эфир—ацетон $100:0 \rightarrow 80:20$), в результате чего были выделены **1** (10 мг), **2** (18 мг) и **3** (4 мг). Подфракции Ir-01/4 и Ir-01/5 разделяли на силикагеле (2×20 см, элюент гексан—этилацетат—ацетон $100:0:0 \rightarrow 80:10:10$), что привело к выделению **4** (36 мг), **5** (92 мг), **6** (27 мг), **7** (5 мг), **8** (4 мг), **9** (8 мг) и **10** (9 мг).

Идентификацию соединений осуществляли с применением массспектрометрии и ЯМР-спектроскопии, в результате чего были идентифицированы три стерола **1-3**:

- инотодиол (= ланоста-8,24-диен-3 β ,22-диол; **1**; $C_{30}H_{50}O_2$; EI-MC, m/z: 442 [M]⁺) (Du et al., 2011);
- ланостерол (= ланоста-8,24-диен-3 β -ол; **2**; $C_{30}H_{50}O$; EI-MC, m/z: 426 [M]⁺) (Dias, Gao, 2009);
- эргостерол пероксид (= 5,8-эпидиокси-эроста-6,22-диен-3 β -ол; **3**; $C_{28}H_{44}O_3$; EI-MC, m/z: 428 [M]⁺) (Kim et al., 1997) (**puc. 4**).

Шесть лупановых тритерпеноидов **4-10** были идентифицированы со следующими соединениями:

- лупеол [= луп-20(29)ен-3 β -ол; **4**; $C_{30}H_{50}O$; EI-MC, m/z: 426 [M]⁺] (Mouffok, 2012);
- бетулин [= луп-20(29)ен-3 β ,28-диол; **5**; C₃₀H₅₀O₂; EI-MC, m/z: 442 [M]⁺] (Ferreira et al., 2013);

- бетулиновая кислота [= 3β -гидрокси-луп-20(29)-ен-28-оевая кислота; **6**; $C_{30}H_{48}O_3$; EI-MC, m/z: 456 [M] $^+$] (Bisoli et al., 2008);
- бетулон [= луп-20(29)ен-3 β -он-28-ол; **7**; $C_{30}H_{48}O_2$; EI-MC, m/z: 440 [M]⁺] (Liu et al., 2012);

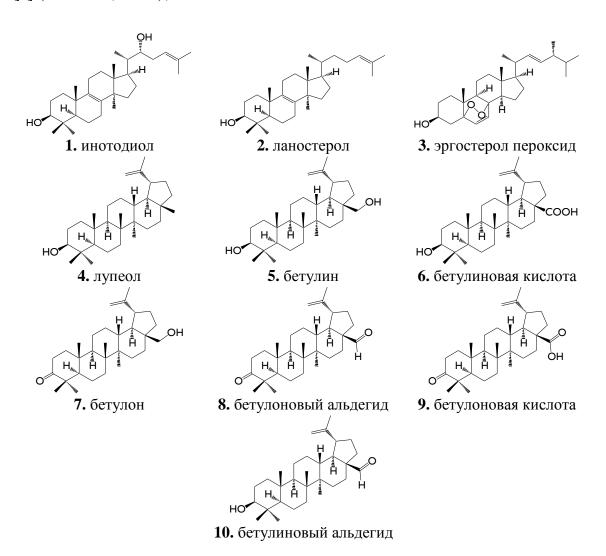


Рисунок 4 – Структуры соединений, выделенных из фракции Ir-01

- бетулоновый альдегид [= луп-20(29)ен-3 β -он-28-аль; **8**; $C_{30}H_{46}O_2$; ЕІ-МС, m/z: 438 [M] $^+$];
- бетулоновая кислота [= луп-20(29)ен-3 β -он-2 β -оевая кислота; **9**; $C_{30}H_{46}O_3$; EI-MC, m/z: 454 [M] $^+$] (Melnikova et al., 2012);
- бетулиновый альдегид [= 3β -гидрокси-луп-20(29)-ен-28-аль; **10**; $C_{30}H_{48}O_2$; EI-MC, m/z: 440 [M]⁺] (Macias et al., 1994) **(рис. 4)**. Все соединения выделены

из *I. rheades* впервые. Инотодиол (1), ланостерол (2) (Nomura et al., 2008), лупеол (4) и бетулин (5) ранее были обнаружены у *I. obliquus* (Кіт et al., 2011), эргостерол пероксид (3) выделены из *I. obliquus* (Капд et al., 2015) и *I. radiatus* (Каһlos et al., 1989). Присутствие бетулиновой кислоты (6), а также соединений 7–10 впервые выявлено для рода *Inonotus*. В результате исследования биологической активности, было показано, что выделенные стерины проявляют слабую антигликозидазную активность, тогда как лупановые тритерпеноиды обладают выраженной активностью (Приложение 2).

3.5. Стирилпироны и бис(стирилпироны) фракции Ir-03 мицелия *I. rheades*

Ir-03 (2,88 г) разделяли с применением колоночной Фракцию хроматографии на силикагеле (4×45 см, элюент гексан-этилацетат $100:0 \rightarrow 80:10$), в результате чего были получены подфракции Ir-03/1 – Ir-03/5. Из подфракции Ir-03/1 после колоночной хроматографии на обращенофазовом силикагеле (1×20 см, элюент вода-ацетонитрил $50:50\rightarrow0:100$) были выделены соединения 11 (10 мг), 12 и 13 в виде смеси изомеров (6 мг), а также **14** (5 мг). Подфракции Ir-03/2 и Ir-03/3 объединяли и разделяли на обращено-фазовом силикагеле $(2\times30$ CM, элюент вода-ацетонитрил $40:60 \rightarrow 0:100$), что привело к выделению соедиений **15** (11 мг), **16** (9 мг), **17** (19 мг) и **18** (12 мг). Из подфракций Ir-03/4 и Ir-03/5 после колоночной хроматографии на силикагеле (2×50 см. элюент гексан-этилацетат $100:0 \rightarrow 80:10$) и обращено-фазовом силикагеле (3×40 см, элюент водаацетонитрил $20:80 \rightarrow 0:100$) были выделены **19** (104 мг), **20** (14 мг), **21** (8 мг).

Идентификация соединений проводили с использованием УФ-, ИК-, МС-, ЯМР-спектроскопии. Применение методов ультраэффективной ВЭЖХ с диодноматричным и масс-спектрометрическим детектированием дало дополнительную возможность в профилировании фенольных соединений мицелия *I. rheades* (рис. 5).

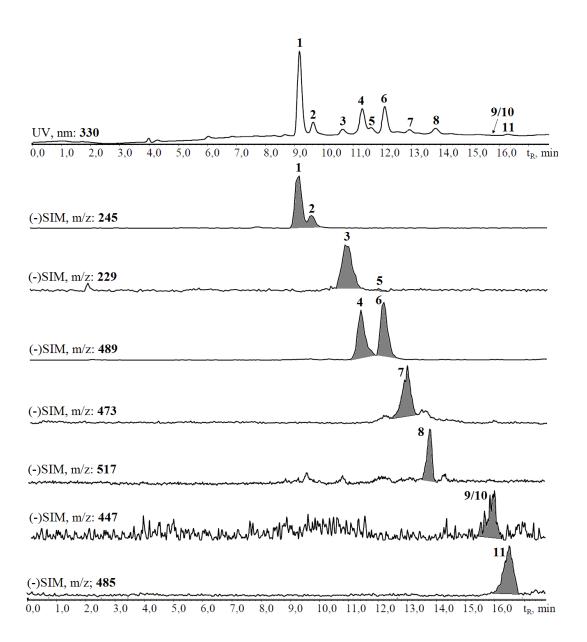


Рисунок 5 — Хроматограммы RP-UPLC-DAD (UV, 330 нм) и RP-UPLC-ESI/MS для выбранного ионного мониторинга (SIM, отрицательные ионы) этанольного экстракта мицелия *I. rheades*

Примечание: Регистрация ионов со следующими значениями (SIM, ESI) m/z: 245 для *транс*- (1) и *цис*-гиспидина (2), 229 для *транс*- (3) и *цис*-биснорянгонина (5), 489 для 3,14'- бисгиспидинила (4) и гифоломином В (6), 473 для 3-биснорянгонил-14'-гиспидин (7), 517 для 1,1-дистирилпирилэтана (8), 447 для феллининов А1 и А2 (9/10) и 485 для реадинин (11). Субстрат – *В. pendula*.

Режим отрицательной ионизации и применение мониторинга по выбранным ионам (SIM) обеспечивают соответствующую чувствительность для определения большинства классов грибных фенолов, включая

стирилпироны и бис(стирилпироны), специфичные для рода *Inonotus* (Lee, Yun, 2011; Dias, Gao, 2009).

Всего в экстракте мицелия *I. rheades* было обнаружено шесть стирилпиронов и пять бис(стирилпиронов) (табл. 7). Соединения 19 и 20 были идентифицированы как стирилпироны *транс* и *цис*-гиспидин (рис. 6), соответственно, путем сравнения их хроматографических свойств УФ и масс с данными, полученными из коммерческих стандартов. Оба соединения являются общими компонентами комплекса стирилпиронов рода *Inonotus* и систематически близкого рода *Phellinus* (Lee, Yun, 2011).

Таблица 7 — Время удерживания (tR), УФ поглащение (λ_{max}) и отношение m/z (ESI) фенольных соединений, обнаруженных в мицелии *I. rheades*

Соединение (№. на Рис. 1)	t _R , min	λ_{max} , нм	m/z	Ссылки*
<i>транс</i> -Гиспидин (1)	9,18	250, 368	245 [M-H] ⁻	i, ii, (Purtov et al., 2015)
<i>цис</i> -Гиспидин (2)	9,65	254, 361	245 [M-H]	i, ii, (Purtov et al., 2015)
транс-Биснорянгонин (3)	10,28	264, 365	229 [M-H]	ii, (Purtov et al., 2015)
3,14'-Бисгиспидинил (4)	11,31	258, 368	489 [M-H]	ii, iii, (Jung et al., 2008; Purtov et al.,2015),
цис-Биснорянгонин (5)	11,42	350	229 [M-H]	ii, (Purtov et al., 2015)
гифоломин В (6)	12,08	256, 385	489 [M-H]	ii, iii, (Jung et al., 2008)
3-Биснорянгонил-14'- гиспидин (7)	12,44	270, 370	473 [M-H]	ii, iii, (Jung et al., 2008)
1,1-Дистирилпирилэтан (8)	13,81	250, 374	517 [M-H]	ii, iii, (Jung et al., 2008)
Феллинин А1/А2 (9/10)	15,43	254, 390	447 [M-H]	ii, (Lee et al., 2009a, b)
Реадинин (11)	16,32	240, 367	485 [M-H] ⁻	ii, iii, (Olennikov et al., 2017)

Примечание: * Полученные данные сравнивались с соответствующими параметрами для коммерческих образцов (i), ранее выделенных соединений (ii) и литературных данных.

Остальные компоненты, **12-18** и **21** были идентифицированы с использованием внутренней библиотеки и данных для составных образцов, выделенных ранее. Дегидроксилированные аналоги гиспидина, *транс* и *цис*изомеры биснорянгонина или 6-(4-гидроксистирил)-4-гидрокси-2-пирона (**15** и **16**) идентифицированы как характерные пики квазимолекулярных ионов при т/z 229 [М-Н] в режиме отрицательных ионов и конкретных спектрах

УФ-спектра (Purtov et al., 2015). Появление *транс*- и *цис*-биснорянгонина обычно ограничено видами *Phellinus* и *I. hispidus* (Lee, Yun, 2011).

14. пиниллидин

15. транс-биснорянгонин

16. цис-биснорянгонин

OH HO O OH OH OH

17. 3-биснорянгонил-14'-гиспидин

18. 3,14′-бисгиспидинил

19. транс-гиспидин

20. *цис*-гиспидин

21. гифоломин В

Рисунок 6 – Структуры соединений, выделенных из фракции Ir-03

Важно отметить наличие в мицелии *I. rheades* двух редких пренилированных стирилпиронов – феллининов A1 (12) и A2 (13). Их особые УФ-спектры с широкой полосой поглощения при 390 нм и пиком квазимолекулярных ионов при m/z 447 [M-H] коррелировали с литературными данными (Lee et al., 2009a, b), где присутствие феллинина A1 (12) и A2 (13) было показано для *Phellinus* sp. KASS93057P культура 23 и рода *Inonotus*.

Соединения 11, 14, 17, 18 и 21 были определены как димеры стирилпиронов бис(стирилпиронов). 1,1-Дистирилпирилэтан или (пиниллидин, 14) и 3,14'-бисгиспидинил (18), которые являются основными антиоксидантами I. xeranticus и Phellinus linteus (Berk. Et Curt.) (Jung et al., 2008), легко идентифицируются и обладают наибольшей антиоксидазной активностью в мицелии *I. rheades* (Приложение 3). Гифоломин В (21) также был обнаружен в мицелии *I. rheades* как «ожидаемый» компонент из-за его широкого распространения в роде *Inonotus* и близкородственных грибов (Lee, Yun, 2011). Конъюгат биснорянгонина и гиспидина – 3-биснорянгонил-14'гиспидин (17) имел пик квазимолекулярного иона в m/z 473 [M-H] $^-$ и может быть охарактеризован как дегидроксилированный аналог 3,14'бигиспидинила (**18**) (Jung et al., 2008).

3.5.1. Строение реадинина – нового бис(стирилпирона) из мицелия *I. rheades*

Соединение **11** представляло собой желтый порошок, растворы которого обладали характерным спектром поглощения (λ_{max} 238, 270, 368 нм), типичным для стирилпиронов. На основании данных HR-ESI-MC и ¹³C ЯМР спектроскопии для **11** была определена молекулярная формула $C_{28}H_{22}O_8$. В спектре ¹H ЯМР присутствовали два ароматических метиновых сигнала, отнесенных к AA'BB' системе *пара*-замещенного фенильного кольца ($\delta_{\rm H}$ 6,75, 7,40), два сигнала олефиновых метиновых протонов ($\delta_{\rm H}$ 6,71, 7,25) с

КССВ 16.0 Гц, что характерно для *также* sp^2 -метиновый сигнал при δ_H 6,12 **(табл. 8)**.

Таблица 8 — Спектры ЯМР 1 Н (500 МГц, МеОН- d_{4} , δ_{H} , м.д., Ј/Гц) и 13 С (125 Гц, МеОН- d_{4} , δ_{C} , м.д.) соединения **11**

C-	DEPT	$\delta_{ m H}$	$\delta_{ m C}$	НМВС
атом	DELL	ОН	OC	THVIDC
2, 2'	С		165,9	
3, 3'	C		105,7	
4, 4'	C		167,8	
5, 5'	СН	6.12 (c)	101,7	C-3, C-4, C-6, C-7, C-3', C-4', C-
				6′, C-7′
6, 6'	С		157,2	
7, 7'	СН	6,71 (2Н, д, Ј = 16.0)	116,3	C-5, C-6, C-9, C-5', C-6', C-9'
8, 8'	СН	7,25 (2Н, д, Ј = 16.0)	134,5	C-6, C-10, C-14, C-6', C-10', C-14'
9, 9'	С		126,4	
10, 10'	СН	7,40 (2H, д, J = 8.5)	129,1	C-12, C-14, C-12', C-14'
11, 11'	СН	6,75 (2Н, д, Ј = 8.5)	115,4	C-9, C-13, C-9', C-13'
12, 12'	С		158,0	
13, 13'	СН	6,75 (2Н, д, Ј = 8.5)	115,4	C-9, C-11, C-9', C-11'
14, 14'	СН	7,40 (2Н, д, Ј = 8.5)	129,1	C-10, C-12, C-10', C-12'
1"	CH	4,56 (1H, кв., J = 7.5)	25,4	C-2, C-3, C-4, C-2', C-'3, C-4'
2"	CH ₃	1,48 (3Н, д, Ј = 7.5)	16,2	C-1", C-3, C-3'

Спектр ¹Н ЯМР содержал сигналы метинового квартета при $\delta_{\rm H}$ 4,56 и метильного дуплета при $\delta_{\rm H}$ 1,48, интенсивность которых значительно была ниже остальных сигналов. В спектре ¹³С ЯМР выявлено присутствие 15 сигналов, включая сигналы от метильного ($\delta_{\rm C}$ 16,2), sp³-метинового ($\delta_{\rm C}$ 25,4), семи sp²-метиновых и шести четвертичных атомов углерода. Сигнал при $\delta_{\rm C}$ 165,9 указывал на присутствие конъюгированной карбоксильной группы, что также подтверждалось наличием полосы при 1656 см⁻¹ в ИК-спектре соединения. Совокупность спектральных данных указывала на близость строения **11** к известному симметричному бис(стирилпирону) – 1,1-дистирилпирилэтану (**14**), представляющему собой димер гиспидина (**19**) (Wangun, Hertweck, 2007).

В спектре НМВС установлено наличие протон-углеродных корреляций между Н-10 и С-12, С-14 (Н-10' и С-12', С-14'), Н-13 и С-9, С-11 (Н-13' и С-9', С-11') и Н-14 и С-10, С-12 (Н-14' и С-10', С-12'), что подтверждает присутствие В структуре соединения *n*-гидроксистирильного (биснорянгонильного) остатка. Корреляции между протоном Н-1" и атомами С-2, С-3, С-4, С-2', С-3', С-4', а также Н-2" и атомами С-1", С-3, С-3' свидетельствовали о присоединении этильного остатка С-1"-С-2" к атомам С-3 и С-3'. Таким образом, соединение 11 представляло собой димер биснорянгонина, симметричный по оси этильной группы, или 3,3′этилиденбис[4-гидрокси-6-(4-гидроксистирил)-2H-пиран-2-он], названный нами реадинин (рис. 7).

Рисунок 7 – Структура реадинина (11)

Примечание: Реадинин (**11**). $C_{28}H_{22}O_8$. HR-ESI-MC, m/z: 485.483 ([M–H]⁻; расч. для $C_{28}H_{21}O_8$ 485.475). [α]_D²⁵ -0° (c = 0,5, MeOH). УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 238 пл., 270 пл., 368. ИК-спектр (ν , см⁻¹): 1656, 1602, 1548, 1510, 1252. Спектр ЯМР ¹H (500 Гц, MeOH-d₄, δ, м.д.): **табл. 9**. Спектр ЯМР ¹³C (125 Гц, MeOH-d₄, δ, м.д.): **табл. 9**.

К настоящему времени известно о существовании шести бис(стирилпиронов), в том числе пиниллидин (**14**) из родов *Inonotus* и *Phellinus* (Lee, Yun, 2011), скваррозидин из *Pholiota squarrosa* (Oeder) Р. Китт. (Strophariaceae) (Wangun, Hertweck, 2007) и феолшидины А–D из *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) Pat. (Fomitopsidaceae) (Han et al., 2013) (**рис. 5**).

Согласно полученным данным общее количество стирилпиронов в мицелии *I. rheades* составило 3,75 мг/г, доминирующим компонентом в их составе был гиспидин (19/20), составляющий 2,33 мг/г от массы мицелия (табл. 9). Меньшее содержание было характерно для биснорянгонина (15/16) - 0,70 мг/г, и 1,1-дистирилпирилэтана (14) - 0,31 мг/г. Соединения

феллинины A1 (**12**), феллинины A2 (**13**), 3-биснорянгонил-14'-гиспидин (**17**), и гифоломин B (**21**) присутствовали в мицелии в следовых концентрациях. Таким образом, мицелий *I. rheades* содержит комплекс обычных и необычных стирилпиронов и бис (стирилпиронов), которые легко могут быть охарактеризованыметодами хроматомасс-спектрометрии, например, RP-HPLC-DAD-ESI/MS.

Таблица 9 — Содержание стирилпиронов в мицелии и плодовом теле I. rheades, мг/г

Соедиение	Мицелий	Плодовое тело
Феллинин А1/А2 (12/13)	<0,01±0,00	Н.О.
1,1-Дистирилпирилэтан (14)	0,31±0,01	Н.О.
транс-Биснорянгонин (15)	0,52±0,02	0,04±0,00
цис-Биснорянгонин (16)	0,18±0,00	Н.О.
3-Биснорянгонил-14'-гиспидин (17)	0,08±0,00	Н.О.
3,14'-Бисгиспидинил (18)	<0,01±0,00	Н.О.
<i>транс-</i> Гиспидин (19)	2,33±0,11	0,11±0,00
<i>цис</i> -Гиспидин (20)	0,29±0,01	<0,01±0,00
гифоломин В (21)	0,04±0,00	<0,01±0,00
Сумма (Σ)	3,75	0,15

Примечание н.о. – не обнаружено. Субстрат – *B. pendula.* n=3. $M\pm S.D$.

Сравнительный анализ суммарного содержания стирилпиронов в мицелии *I. rheades* и плодовом теле показал, что количество стирилпиронов в плодовом теле в 23 раза меньше и составило 0,15 мг/г. Согласно работе (Jung 2008), ферментные системы, производящие полифенольные et соединения, отличаются у мицелия и плодовых тел, так соединения, являющиеся мажорными в плодовых телах, например, кофеиная кислота, не были изолированы или не являлись основным компонентом культивируемого мицелия. Однако отмечается, что полифенолы, содержащие стирилпироновую часть, выделенные из плодового тела I. xeranticus (Lee et al., 2006a; Lee, Yun, 2007) были более сложными и имели большее структурное разнообразие по сравнению с метаболитами, выделенными из культуры мицелия (Jung et al., 2008).

На основании вышесказанного можно заключить, что использование мицелиальной массы *I. rheades* в качестве источника биологически активных стирилпиронов имеет значительное преимущество и перспективу перед плодовыми телами. В результате исследования биологической активности фракции Ir-03 мицелия *I. rheades* с помощью различных методов была показана выраженная антиоксидантная активность (Приложение 4).

3.6. Водорастворимые полисахариды фракции Ir-05 мицелия *I. rheades*

Фракция Ir-05 характеризовалась высоким содержанием полисахаридов, содержание которых составило 44,7% от массы фракции. Выделение данной группы соединений проводили из фракции Ir-05 (4,5 г), в результате было получено 1,54 г водорастворимых полисахаридов (ВРПС) Ir- $05^{\Pi C}$.

Для $Ir-05^{ПС}$ характерно высокое содержание углеводов (более 80%) и низкое — уроновых кислот (не более 3%); выявлено присутствие белка (4,32%), неудаляемого по методу Севага (табл. 10).

В ИК-спектре $Ir-05^{\Pi C}$ присутствовали полосы, отнесенные к деформационным колебаниям C_1 - H_{α} типа (874 см⁻¹), пиранозного кольца (958 см⁻¹), связей С-С и С-О моносахаридных фрагментов (1039-1239 см⁻¹) (рис. 8). В целом ИК-спектр $Ir-05^{\Pi C}$ типичен для грибных полисахаридов (Chen et al., 2008, Olennikov et al., 2009, Chen et al., 2015).

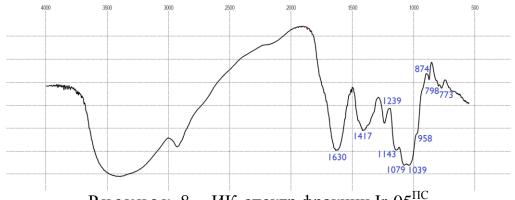


Рисунок 8 – ИК-спектр фракции Ir-05^{ПС}

Таблица 10 – Основные физико-химические характеристики водорастворимых полисахаридов мицелия *I. rheades*

Показатель	Значение
Выход, % от массы сырья	1,28
Содержание углеводов, %	82,67±2,14
Содержание уроновых кислот, %	2,40±0,06
Содержание белка, %	4,32±0,12
$\alpha_{\rm D}^{40}$, °	
Реакция с йодом	отрицат.
Реакция с резорцином	отрицат.
Реакция с реактивом Феллинга	отрицат.
Реакция с реактивом Yariv	отрицат.
Моносахаридный состав, моль%	
Ara	3,7
Fuc	6,5
Gal	49,1
Glc	21,5
Man	11,1
Rha	1,2
Xyl	4,7
GalA	1,5
GlcA	0,6

Данные гель-проникающей хроматографии (ГПХ) свидетельствовали о гетерогенности $Ir-05^{\Pi C}$, в которой было выявлено присутствие пяти компонентов с молекулярными массами 110-1520 кДа. С помощью препаративной ГПХ были выделены 5 компонентов суммарного комплекса ВРПС мицелия *I. rheades* ($Ir-05^{\Pi C}$): $Ir-05^{\Pi C}-1-Ir-05^{\Pi C}-5$ (**рис. 9**).

Три минорных высокомолекулярных компонента $Ir-05^{\Pi C}-1$, $Ir-05^{\Pi C}-2$ и $Ir-05^{\Pi C}-3$ имели молекулярную массу 1520, 1150 и 820 кДа, соответственно (табл. 11).

Анализ моносахаридного сотава в виде производных с 3 метил-1-фенил-2-пиразолин-5-оном (РМР) осуществляли методом ВЭЖХ (рис. 10). Полимер $Ir-05^{\Pi C}-1$ характеризовался доминированием глюкозы, галактозы и маннозы в соотношении 6,1:1,2:1. Полимер $Ir-05^{\Pi C}-2$ также содержал глюкозу, галактозу и маннозу в качестве основных моносахаридов, в

соотношении 2,9:2,2:1. Для компонента $Ir-05^{\Pi C}-3$ было отмечено повышенное содержание ксилозы (15,9 моль%); соотношение основных моносахаридов галактозы, маннозы и ксилозы составляло 3,6:1,2:1.

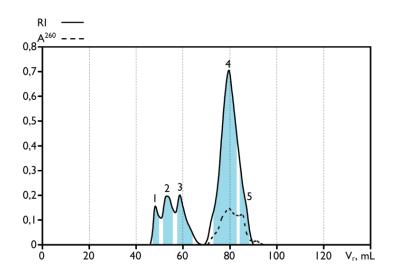


Рисунок 9 — Хроматограмма (ГПХ) фракции Ir- $05^{\Pi C}$ на Sephacryl 400HR *Примечание:* Числами обозначено положение компонентов: **1** — Ir- $05^{\Pi C}$ -1, **2** — Ir- $05^{\Pi C}$ -2, **3** — Ir- $05^{\Pi C}$ -3, **4** — Ir- $05^{\Pi C}$ -4, **5** — Ir- $05^{\Pi C}$ -5. Цветом отмечены границы сбора фракций в условиях препаративной ГПХ.

Таблица 11 — Содержание, молекулярные массы и моносахаридные составы компонентов $\text{Ir-05}^{\text{IIC}}$

Показатель	Ir-05 ^{ΠC} -1	Ir-05 ^{IIC} -2	Ir-05 ^{IIC} -3	Ir-05 ^{ΠC} -4	Ir-05 ^{IIC} -5
		Содержани	е в Ir-05 ^{пс}		
%	5,8	11,1	11,3	71,7	сл.
		Молекуляр	оная масса		
кДа	1520	1150	820	148	110
		Моносахари	дный состав		
Ara	2,8	2,2	<0,1	1,7	2,4
Fuc	<0,1	0,8	3,4	1,0	<0,1
Gal	13,8	33,7	57,5	60,9	8,7
Glc	71,0	44,5	4,9	14.5	81,7
Man	11,6	15,3	18,3	20,3	7,1
Rha	0,7	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Xyl	<0,1	3,4	15,9	1,5	<0,1
GalA	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
GlcA	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

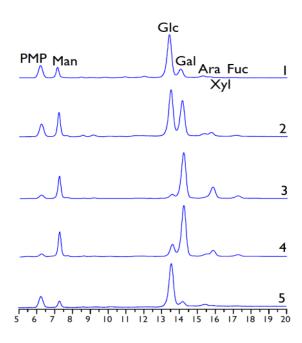


Рисунок 10 — Хроматограммы (ВЭЖХ) РМР-производных моносахаридов в гидролизатах компонентов $Ir-05^{\Pi C}-1-Ir-05^{\Pi C}-5$

Примечание: На рисунке обозначено положение РМР-производных моносахаридных компонентов. РМР – избыток дериватизирующего агента 1-фенил-3-метил-5-пиразолон. Glc – глюкоза, Gal – галактоза, Man – манноза, Xyl – ксилоза.

Доминирующий полимер $Ir-05^{IIC}-4$ имел молекулярную массу 148 кДа и представлял собой гетерополисахарид, содержащий галактозу, маннозу и глюкозу в качестве основных моносахаридов в соотношении 4,2:1,4:1; на долю минорных моносахаридов приходилось не более 4,5 моль%.

Низкомолекулярный компонент $Ir-05^{\Pi C}-5$ представлял собой глюкан с содержанием глюкозы 81,7 моль%. Таким образом, комплекс водорастворимых полисахаридов мицелия *I. rheades* представляет собой смесь глюканов ($Ir-05^{\Pi C}-1$, $Ir-05^{\Pi C}-2$, $Ir-05^{\Pi C}-5$) и галактанов ($Ir-05^{\Pi C}-3$, $Ir-05^{\Pi C}-4$) с различной молекулярной массой. При исследовании биологической активности, была выявлена антикомплементарная активность галактанов $Ir-05^{PS}-3$ и $Ir-05^{PS}-4$ (Приложение 5).

Учитывая высокое содержание полимера $Ir-05^{IIC}-4$ в составе фракции $Ir-05^{IIC}$, нами было изучено его строение после метилирования и анализа O-метилированных альдитол ацетатов методом Γ X-MC. Согласно данным метилирования $Ir-05^{IIC}-4$ представляет собой высокоразветвленный

полисахарид, содержащий на невосстанавливающих концах цепей остатки галактозы (2,3,4,6-Me₄-Gal), маннозы (2,3,4,6-Me₄-Man), глюкозы (2,3,4,6-Me₄-Glc), ксилозы (2,3,4-Me₃-Xyl), арабинозы (2,3,4-Me₃-Ara) и фукозы (2,3,4-Me₃-Fuc) (табл. 12).

Таблица 12 — Содержание O-метил-альдитол ацетатов в гидролизате Ir- $05^{\Pi C}$ -4

О-Метил-альдитол	Содержа	Содержание, %	
ацетат	Ir-05 ^{ΠC} -4	Ir-05 ^{ΠC} -4*	Тип связи
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	0,9	3,6	Gal-(1→
3,4,6-Me ₃ -Gal	7,2		\rightarrow 2)-Gal-(1 \rightarrow
2,3,4-Me ₃ -Gal	21,6	92,9	→6)-Gal-(1→
3,4-Me ₂ -Gal	34,7	3,5	→2,6)-Gal-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Man	17,8		Man-(1→
3,4,6-Me ₃ -Man	2,5		\rightarrow 2)-Man-(1 \rightarrow
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	14,0		Glc-(1→
2,3,4-Me ₃ -Glc	0,5		→6)-Glc-(1→
2,3,4-Me ₃ -Xyl	0,5		Xyl-(1→
2,3,4-Me ₃ -Ara	0,2		Ara-(1→
2,3,4-Me ₃ -Fuc	0,1		Fuc-(1→

Выявлено высокое содержание 6-O- (2,3,4- Me_3 -Gal) и 2,6-ди-Oзамещенных галактозных остатков (3,4- Me_2 -Gal), дающих в сумме 56,3% остатков в молекуле полимера. Также установлено присутствие таких углеводных остатков как 2-O-замещенные галактоза (3,4,6- Me_3 -Gal) и манноза (3,4,6- Me_3 -Man), а также 6-O-замещенная глюкоза. Последние остатки, вероятно, образуют боковые цепи полисахарида.

Для определения типа моносахаридов, образующих основную цепь молекулы полимера, был осуществлен частичный гидролиз, приведший к образованию фрагмента $Ir-05^{IIC}-4*$ с молекулярной массой 25 кДа, единственным компонентом которого является галактоза. Анализ альдитол ацетатов после метилирования показал, что основным фрагментом $Ir-05^{IIC}-4*$ является 6-O-замещенная галактоза $(2,3,4-Me_3-Gal; 92,6%)$, которая формирует кор молекулы полимера в виде цепи $[\rightarrow 6)$ -Gal- $(1\rightarrow)$.

Таким образом, проведенные исследования позволили впервые установить предварительное строение доминирующего полимера из мицелия $\text{Ir-}05^{\Pi C}$ -4 в виде (1 \rightarrow 6)-связанного галактана, у которого более 60% остатков галактозы замещено по положению C-2 различными углеводными фрагментами.

Присутствие галактанов и глюканов в комплексе полисахаридов рода *Inonotus* было показано ранее. Так, из *I. levis* P. Karst. был выделен ($1\rightarrow 6$)-связанный галактан в составе щелочерастворимой фракции полисахаридов (Vinogradov, Wasser, 2005). В склероциях *I. obliquus* были обнаружены водорастворимые гетерополисахариды с доминированием глюкозы, маннозы и галактозы — Un-IOPS (2,7:1,2:1), глюкозы и галактозы — Su-IOPS (6,0:1), Ас-IOPS (4,4:1), глюкозы, ксилозы и маннозы — Ca-IOPS (5,1:2,4:1) (Ma, 2012), глюкозы, рамнозы и галактозы — IOPS-F (1,2:1,1:1) и IOPS-H (1,32:1,29:1), галактозы и рамнозы — IPOS-V (1,6:1) (Ма, 2013). Полисахариды мицелия *I. rheades* охарактеризованы нами впервые.

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ СУБСТРАТА И СВЕТА НА ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ МИЦЕЛИИ *I. RHEADES*

4.1. Влияние субстрата на химический состав мицелия *I. rheades*

В природе мицелий *I. rheades*, как правило, развивается на древесине *P. tremula*, однако получение мицелиальной массы возможно на *B. pendula*, т.е. не типичном для данного гриба субстрате. Использование нехарактерного субстрата вызывает стресс и ведет к развитию адаптивных реакций, сопровождающихся изменениями состава экстрактивных веществ мицелия.

4.1.1. Влияние субстратного фактора на накопление лупановых тритерпеноидов в мицелии *I. rheades*

бетулиновая кислота и лупеол являются обычными компонентами древесины Betula pendula, используемой в качестве субстрата для получения мицелия I. rheades. Суммарное содержание этих соединений в использованном нами субстрате составило 10,21 мг/г. Для подтверждения влияния субстрата на химический состав нами были получены образцы rheades мицелия I. использованием древесины *Populus* tremula, характеризующейся присутствием только лупеола (0.50 мг/г), а также жидкой среды, не содержащей тритерпеноиды. В результате было показано, что мицелий, полученный на P. tremula, содержит лупеол, а применение жидкой среды приводит к получению мицелия, не содержащего тритерпеноидов (табл.13).

Таким образом, полученные нами данные продемонстрировали, что мицелий *I. rheades* способен концентрировать тритерпеновые соединения, источником которых является древесина, используемая в качестве субстрата.

Таблица 13 – Содержание тритерпеноидов в мицелии *I. rheades* на разных субстратах, мг/г

Объект	Лупеол	Бетулин	Бетулиновая	Σ
	J	- J-	кислота	
Мицелий <i>I. rheades</i> (субстрат – <i>B. pendula</i>)	$0,22\pm0,00$	1,23±0,03	$0,97\pm0,02$	2,42
Древесина B. pendula	$0,53\pm0,01$	9,35±0,24	$0,33\pm0,00$	10,21
Мицелий <i>I. rheades</i> (субстрат – <i>P. tremula</i>)	$0,19\pm0,00$	H.O.	н.о.	0,19
Древесина P. tremula	$0,50\pm0,01$	H.O.	н.о.	0,50
Мицелий <i>I. rheades</i> (субстрат – жидк. ср.)	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Жидкая среда	н.о.	H.O.	н.о.	н.о.

Примечание: н.о. – не обнаружено. n=3. M±S.D.

4.1.2. Влияние субстрата на жирнокислотный состав мицелия *I. rheades*

С применением метода ГХ/МС был изучен состав жирных кислот (ЖК) мицелия *I. rheades* в виде метиловых эфиров. Относительное содержание ЖК определяли в весовых процентах (вес. %) от общего их содержания (Lyons et al., 1964). Качественный состав ЖК мицелия I. rheades, выращенного на разных субстратах (B. pendula и P. tremula) при постоянной температуре 25 °C в темноте был близок к таковому плодового тела, однако отличался количественно (Горностай и др., 2018). Концентрация насыщенных жирных кислот (НЖК) и ненасыщенных жирных кислот (ННЖК) мицелия I. rheades, B. pendula, составила 34,1 выращенного на древесине 65,7%, (табл.14). соответственно Следует отметить меньшее значительно содержание мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) (14,3%) при одновременно высоком показателе для полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) (51,4%). На долю олеиновой кислоты ($C_{18:1 \omega 9}$) приходилось 7,6%, а содержание линолевой кислоты ($C_{18:2\ \omega 6}$) составило 51,4% (Горностай и др., 2018).

Анализ липидной фракции мицелия *I. rheades*, выращенного с применением *P. tremula* в качестве субстрата, характеризовался большим содержанием НЖК (41,1%) и меньшим – ННЖК (58,7%), чем на *B. pendula* (Горностай и др., 2018). Было также выявлено, что использование в качестве субстрата *P. tremula* приводит к получению мицелия с большим содержанием

олеиновой (12,3%) и бегеновой кислот ($C_{22:0}$; 11,1%) и сниженным линолевой кислоты (39,6%), в данном случае можно предположить, что культивирование мицелия на P. tremula приводит к большему синтезу бегеновой кислоты за счет превращения в нее линолевой кислоты (Горностай и др., 2018).

Таблица 14 – Состав жирных кислот мицелия *I. rheades*, культивированного на двух древесных субстратах, % от общего содержания жирных кислот*

Соединение	Субстрат			
Соединение	B. pendula	P. tremula		
$C_{14:0}$	1,01±0,31	0,95±0,18		
$C_{15:0}$	1,31±0,38	1,35±0,24		
$C_{16:0}$	21,55±2,20	20,03±2,13		
$C_{16:1}$	1,01±0,47	1,05±0,10		
$C_{17:0}$	0,96±0,12	0,96±0,19		
$C_{18:0}$	4,64±0,98	4,12±0,57		
C _{18:1 \omega9}	7,65±1,24	12,26±1,39		
C _{18:1 ω7}	5,73±0,08	5,83±0,40		
C _{18:2 \omega\text{6}}	51,43±4,28	39,60±1,00		
$C_{20:0}$	1,17±0,41	1,41±0,42		
$C_{21:0}$	1,20±0,14	1,37±0,20		
$C_{22:0}$	2,37±0,18	11,09±0,99		
Σ	99,8±0,20	99,8±0,20		
ЖК	34,19	41,27		
ННЖК, в т.ч.	65,81	58,73		
МННЖК	14,3	19,1		
ПННЖК	51,4	39,6		
ПННЖК/МННЖК	3,59	2,07		
ИЖН/ХЖНН	1,93	1,43		
ИН	1,17	0,98		
ИНС ₁₈	1,67	1,57		

Обозначения: $C_{16:1}^{*}$ — сумма изомеров пальмитолеиновой кислоты; НЖК — сумма насыщенных жирных кислот; ННЖК — сумма ненасыщенных жирных кислот; МННЖК — сумма мононенасыщенных жирных кислот; ПННЖК/мннжк — отношение содержания полиненасыщенных жирных кислот к мононенасыщенным жирным кислотам; НЖК/ННЖК — отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот; ИН — индекс двойной связи; ИНС₁₈ — индекс двойной связи жирных кислот с длиной цепи C_{18} (Горностай и др., 2018); n=4-6. M±S.D.

Показатель соотношения содержания полиненасыщенных жирных кислот к мононенасыщенным жирным кислотам (ПННЖК/МННЖК) был ниже (2,07) в сравнении с таковым для мицелия, полученного на B. pendula (3,59). Индекс ненасыщенности жирных кислот был меньше 1 и составил 0,98, против аналогичного показателя у мицелия, выращенного на B. pendula — 1,17. Индекс ННЖК с длиной цепи C_{18} был наибольшим для мицелия, выращенного на B. pendula (1,67) (Горностай и др., 2018).

Известные сведения о составе ЖК плодовых тел рода *Inonotus* указывают на то, что к числу основных компонентов относятся арахиновая (47,9%) и олеиновая кислоты (27,9%) у *I. hispidus*; олеиновая (39,6%), линолевая (35,2%) и пальмитиновая кислоты (11,9%) у *I. radiates* (Olennikov, 2014).

Полученные результаты свидетельствовали о том, что природа субстрата влияла на жирнокислотный профиль в мицелии *I. rheades*, выраженная субстратная зависимость в синтезе выявлена для трех ЖК: олеиновой, линолевой, бегеновой. Данные о ЖК составе мицелия *I. rheades* получены впервые.

4.1.3. Влияние субстратного фактора на накопление стирилпиронов и бис(стирилпиронов) в мицелии *I. rheades*

Субстрат оказывает существенное влияние на состав стирилпиронов и бис(стирилпиронов) мицелия *I. rheades* — мицелий, полученный в темноте при использовании древесины *B. pendula*, содержал значительно большее количество соединений, чем мицелий, выращенный на *P. tremula* (табл. 15).

Синтез и накопление этих соединений, имеющих высокую антиоксидантную активность, вероятно, свидетельствует об успешной адаптации мицелия к стрессу, вызванному использованием древесины *В. pendula* в качестве субстрата.

Таблица 15 – Содержание стирилпиронов и бис(стирилпиронов) в мицелии *I. rheades* на разных субстратах, мкг/г

Соединение	Субстрат		
	B. pendula	P. tremula	
транс-Биснорянгонин	1,26±0,05	следы	
цис-Биснорянгонин	$0,94\pm0,02$	следы	
3-Биснорянгонил-14'-гиспидин	3,72±0,11	0,63±0,01	
транс-Гиспидин	16,21±0,82	3,75±0,08	
цис-Гиспидин	1,40±0,06	следы	
Σ	23,53	4,38	

Примечание: н.о. – не обнаружено. n=3. M±S.D.

4.1.4. Влияние субстратного фактора на накопление водорастворимых полисахаридов в мицелии *I. rheades*

При изучении состава водорастворимых полисахаридов (ВРПС) мицелия *I. rheades* было показано, что синтез доминирующих моносахаридов изменяется при выращивании мицелии на разных древесных субстратах **(табл.16)**. Выявлено, для мицелия, полученного на *P. tremula* характерно преобладание галактанов, в то время как мицелий на *B. pendula* накапливает больше глюканов и маннанов.

Таблица 16 – Моносахаридный состав полисахаридных фракций (моль%)

Образец	Ara	Gal	Glc	Fuc	Man	Rha	Xyl	GalA	GlcA
B. pendula	0,4	56,8	13,8	3,9	15,3	1,7	5,0	2,3,	0,7
P. tremula	1,6	74,2	4,4	2,8	7,6	2,6,	3,4	2,9	0,4

Примечание: н.о. – не обнаружено. n=3.

Следует отметить, что в мицелии, выращенном на B. pendula содержание фукозы и ксилозы больше, чем в мицелии на P. tremula, содержание арабинозы и рамнозы напротив выше при использовании P. tremula в качестве субстрата.

Использование в качестве субстрата *В. pendula* ведет к адаптивным изменениям метаболизма мицелия, что выражается в синтезе и накоплении веществ, имеющих антиоксидантные свойства. Меняется также состав полисахаридов мицелия.

4.2. Влияние светового фактора на химический состав мицелии *I. rheades*

В природе вегетативный мицелий ксилотрофных базидиомицетов находится внутри древесины, то есть его развитие происходит в темноте. Стоит отметить, что в литературе нет данных о необходимости света для развития вегетативного мицелия. Фоточувствительность вегетативного результате перестроек метаболизма мицелия появляется В мицелия, вызванных органичением ресурсов питания и пространства в древесине, ведущих к задерживанию мицелиального роста (Lu, 1965), таким образом, гриб переходит к следующей стадии своего морфологического состояния – плодоношению.

Так как присутствие света несвойственно для развития вегетативного мицелия в естественных условиях, его появление вызывает стресс и, как следствие ведет к развитию адаптивных реакций организма, сопровождающихся изменениями биохимических процессов. Учитывая сказанное, нами было изучено влияние светового режима на характер накопления тритерпеновых соединений, ЖК, стирилпиронов и ВРПС в мицелии *I. rheades*, выращенного на древесном субстрате *Betula pendula*.

4.2.1. Влияние светового режима на накопление лупановых тритерпеноидов в мицелии *I. rheades*

Исследование влияние светового режима на характер накопления тритерпеновых соединений в мицелии *I. rheades* показали, что длина волны света оказывает влияние на состав тритерпеноидов мицелия *I. rheades* (рис. 11) (Горностай и др., 2017). В частности, в мицелии, полученном в условиях освещения красным, желтым и зеленым светом наблюдалось доминирование бетулиновой кислоты (6) с максимальными показателями содержания в области желтого света 4,84 мг/г. Под действием синей части спектра мицелий накапливал бетулин (5), максимальное накопление лупоела при красном свете (табл. 17).

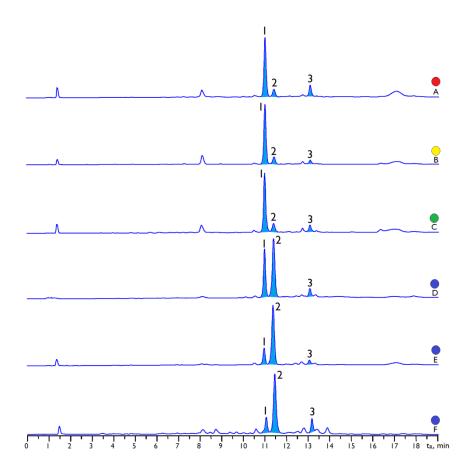


Рисунок 11 — ВЭЖХ хроматограммы (210 нм) гексановых фракций из мицелия *I. rheades* (субстрат — *B. pendula*) при различных световых режимах

Обозначения: 1 — бетулиновая кислота, 2 — бетулин, 3 — лупеол; А — красный свет с интенсивность светового потока (46,4 мкмоль/м 2 *c), В — желтый свет (41,5 мкмоль/м 2 *c), С — зеленый свет (55,3 мкмоль/м 2 *c), D — синий свет (24,1 мкмоль/м 2 *c), Е — синий свет (144,9 мкмоль/м 2 *c), F — синий свет (289,8 мкмоль/м 2 *c).

Таблица 17 — Содержание тритерпеноидов в мицелии *I. rheades*, выращенного при различных световых режимах, мг/г

Световой	Интенсивность	Лупеол (4)	Бетулин	Бетулиновая	Σ
Темнота		< 0,01	$0,24\pm0,00$	$0,10\pm0,00$	0,34
Красный свет	46,4	$0,59\pm0,01$	$0,34\pm0,00$	2,69±0,07	3,62
Желтый свет	41,5	$0,40\pm0,01$	$0,42\pm0,00$	4,84±0,14	5,66
Зеленый свет	55,3	$0,37\pm0,00$	$0,50\pm0,01$	2,53±0,07	3,40
Синий свет	24,1	$0,22\pm0,00$	1,57±0,04	1,01±0,03	2,80

Примечание: субстрат – B. pendula. n=3. M±S.D.

Видимый свет является стрессовым фактором для грибов. В ответ организм запускает активацию различных защитных систем, в том числе антиоксидантной. Известно, что различные источники ионизирующего

излучения (α -, β -, γ -, рентгеновские лучи), УФ-излучение (дальний 200–290 нм, средний 290–320 нм и ближний 320–420 нм), а также свет видимой области спектра вызывают образование АФК у грибного организма (Гесслер и др., 2007). Таким образом, можно предположить, что наибольшее накопление бетулина при культивировании с использованием синего света, связано с активацией антиоксидантной системы, направленной на синтез внутриклеточных антиоксидантов, способных снизить уровень АФК в клетках. Стоит упомянуть, что для бетулина *I. obliquus* выявлены выраженные антиоксидантные свойства (Bai et al., 2012).

Учитывая высокое содержание бетулина (**5**) в мицелии *I. rheades*, выращенного с использованием синего света, дополнительно изучено влияние интенсивности синего света на процесс накопления тритерпеноидов. В результате чего было установлено, что повышение мощности светового потока от 24,1 до 48,3–96,8 мкмоль/м²*с способствует повышению концентрации тритерпеноидов в мицелии от 2,80 до 6,15–6,19 мг/г, в том числе бетулина (**5**) от 1,57 до 4,85–4,87 мг/г (**табл. 18**) (Горностай и др., 2017).

Таблица 18 — Содержание тритерпеноидов в мицелии *I. rheades*, выращенного с применением синего света различной интенсивности, мг/г

Интенсивность	Лупеол (4)	Бетулин (5)	Бетулиновая	Σ
24,15	$0,22\pm0,00$	1,57±0,04	1,01±0,03	2,80
48,3	0,26±0,00	4,85±0,13	1,08±0,03	6,19
96,8	0,25±0,00	4,87±0,14	1,03±0,02	6,15
144,9	$0,40\pm0,01$	4,73±0,14	1,06±0,03	6,19
193,2	0,52±0,01	4,57±0,12	1,10±0,03	6,19
241,5	$0,86\pm0,02$	4,23±0,12	1,11±0,03	6,20
289,8	$0,90\pm0,02$	4,18±0,12	1,10±0,03	6,18

Примечание: субстрат – B. pendula. n=3. M \pm S.D.

Дальнейшее повышение интенсивности света не приводило к значительным изменениям в концентрации тритерпеноидов (Горностай и др., 2017). Следует отметить, что при повышении интенсивности света от 48,3 до

289,8 мкмоль/м²*с наблюдалось снижение концентрации бетулина (**5**) с 4,85 до 4,18 мг/г при одновременном повышении содержания лупеола (**4**) от 0,26 до 0,90 мг/г. Концентрация бетулиновой кислоты (**6**) изменялась незначительно.

Учитывая, что основным тритерпеноидом субстрата (*Betula pendula*) является бетулин, можно предположить, что мицелий *I. rheades* при облучении длинноволновым светом способен к трансформации данного соединения в бетулиновую кислоту. Ранее подобное явление было показано для культур клеток *Armillaria luteovirens* (Alb. & Schwein.) Sacc. (Physalacriaceae) (Liu et al., 2011) и *Cunninghamella blakesleeana* Lendn. (Cunninghamellaceae) (Feng et al., 2013). Таким образом, наши исследования позволяют предположить схему возможных путей биотрансформации лупановых тритерпеноидов в мицелии *I. rheades* (**puc. 12**).

Рисунок 12 — Возможные пути биотрансформации лупановых тритерпеноидов в мицелии *I. rheades*

Обозначения: 4 — лупеол, 5 — бетулин, 6 — бутулиновая кислота, 7 — бетулон, 8 — бетулоновый альдегид, 9 — бетулоновая кислота, 10 — бетулиновый альдегид, red — направление реакции восстановления, ох — направление реакции окисления.

Бетулин транспортируется в мицелий *I. rheades* в процессе роста организма, подвергаясь при этом некоторым химическим изменениям. В частности, нами было показано, что под влиянием желтой части светового спектра наблюдается сдвиг химического профиля тритерепеноидов в сторону окисленных форм бетулина (5), каковой является бетулиновая кислота (6), образующаяся в результате каскада реакций окисления/восстановления. Обнаружение промежуточных продуктов данного процесса бетулона (7), бетулонового альдегида (8), бетулоновой кислоты (9), бетулинового альдегида **(10)** подтверждает данный факт. Синий свет высокой интенсивности препятствует реакциям окисления, сохраняя бетулин (5) в нативном состоянии переводя его в восстановленную форму – лупеол (4) (Горностай и др., 2017).

Способность мицелиальной культуры базидиомицета К биотрансформации бетулина (5) в бетулиновую кислоту (6) показана впервые. Природные лупановые тритерпены (бетулин и лупеол) считаются доступными, что обусловлено достаточным содержанием этих веществ в широко распространенной в России березе повислой Betula pendula Roth, в то же время, содержание бетулиновой кислоты ограничено (Абышев и др., 2007). Широкий спектр биологической активности бетулиновой кислоты Mullauer, (Толстикова 2006; 2011), позволяет др., предполагать возможность использования трансформации бетулина в бетулиновую кислоту, протекающей в мицелии *I. rheades*.

Для культурального мицелия *I. obliquus* выявлено изменение соотношения эргостерол/ланостерин, при добавлении в жидкую среду культивирования Ag^+ , что автор связывает с ингибированием ферментативных процессов в направлении синтеза эргостерина. Повышение концентрации Ag^+ в среде культивирования приводило к значительному увеличению количества ланостерола и уменьшению количества эргостерина в мицелии *I. obliquus*, с появлением промежуточных продуктов биосинтеза эргостерина (Zheng et al., 2007).

Таким образом, можно заключить, что у разных представителей рода *Inonotus* показана возможность регуляции качественного и количественного состава стеринов и тритерпенов в условиях лабораторного культивирования мицелия, в природе баланс данных соединений, вероятно, поддерживается субстратным и световым факторами.

4.2.2. Влияние видимого света разной длины на жирнокислотный состав мицелия *I. rheades*

В настоящее время известно о светозависимости биосинтеза отдельных групп соединений у грибов, в том числе каротиноидов, углеводов, нуклеотидов, аминокислот, а также ЖК (Tisch, Schmoll, 2010). Известно, что варьирование длины света у Neurospora crassa приводило к изменению состава липидов как насыщенного (Cote, Brody, 1987), так и ненасыщенного ряда (Brody, Martins, 1979), что также было также отмечено для Trichoderma viride (Betina, Koman, 1980). Следует отметить, что основное число исследований в этой области было выполнено для микромицетов, в связи с чем базидиальные макромицеты, к которым относятся виды Inonotus, остаются малоизученными (Горностай и др., 2018).

Рассматривая характер изменений, происходящих cжирными мицелия I. rheades, культивирование кислотами которого велось использованием разных световых режимов, при температуре 25 °C, на субстрате B. pendula следует переходе отметить, что при коротковолнового (синего) длинноволнового (красного) ДО света, наблюдалось снижение содержания НЖК от 40% при синем свете до 37% при зеленом свете, а также повышение содержания ННЖК от 59,6 до 62,8% **(табл. 19)** (Горностай и др., 2018).

Световой режим выращивания влияет на жирнокислотный профильмицелия *I. rheades*. Изменения носят, как правило, количественный характер, и касаются в первую очередь показателей содержания основных компонентов. Содержание стеариновой ($C_{18:0}$), линолевой ($C_{18:1\omega6}$) кислот в

темноте составило 3,92 и 46,37%, на свету 5,59-8,05% и 51,14-54,78%, соответственно. Содержание олеиновой ($C_{18:1\omega 9}$) и вакценовой ($C_{18:1\omega 7}$) и бегеновой ($C_{20:0}$) кислот в условиях освещения составило 3,96-5,27%,

Таблица 19 — Состав жирных кислот мицелия *I. rheades*, культивированного при разных световых режимах, % от общего содержания жирных кислот*

Соединение	Световой режим культивирования мицелия					
Соединение	Темнота	Синий	Зеленый	Желтый	Красный	Белый
C _{14:0}	1,29±0,05	0,52±0,90	1,57±0,47	1,23±1,44	0,24±0,42	1,25±0,17
C _{15:0}	2,21±0,08	2,25±0,82	2,63±0,59	2,49±0,60	1,92±0,38	2,15±0,34
C _{16:0}	22,81±1,46	26,74±0,95	24,92±0,94	24,77±0,51	29,17±0,86	23,50±0,52
C _{16:1}	1,64±0,32	-	2,51±0,35	$0,84\pm0,43$	1,85±0,93	1,24±0,33
C _{17:0}	1,65±0,25	1,46±0,07	1,36±0,66	1,66±0,48	0,67±0,58	1,30±0,34
C _{18:0}	3,92±0,56	8,05±1,11	5,73±0,18	5,64±1,08	5,59±0,30	5,89±1,00
C _{18:1 \omega9}	7,66±1,29	5,27±1,98	4,03±0,31	4,27±0,93	4,49±1,13	3,96±1,30
C _{18:1 ω7}	5,43±0,59	3,36±0,39	3,03±0,21	3,68±0,43	3,33±0,36	3,47±0,82
C _{18:2 \omega6}	46,37±0,45	51,14±0,62	53,35±0,69	53,49±2,89	52,00±2,16	54,78±2,42
C _{20:0}	1,13±0,19	-	-	0,85±0,13	-	0,66±0,23
C _{21:0}	1,77±0,40	-	-	-	-	-
C _{22:0}	4,13±0,31	1,20±0,29	0,88±0,39	1,10±0,29	0,74±0,76	1,14±0,35
Σ	99,8±0,2	99,6±0,4	99,8±0,2	99,9±0,1	99,9±0,1	99,1±0,8
НЖК	38,23	40,22	37,09	37,49	38,33	36,21
ННЖК, в т.ч.	61,77	59,78	62,91	62,51	61,67	63,79
МННЖК	14,6	8,5	9,5	8,8	9,6	8,6
ПННЖК	46,4	51,1	53,3	53,5	52,0	54,8
ПННЖК/	2.10	6.01	5.61	6.00	5 41	6.27
МННЖК	3,18	6,01	5,61	6,08	5,41	6,37
ННЖК/НЖК	1,62	1,49	1,70	1,68	1,61	1,77
ИН	1,08	1,11	1,16	1,16	1,14	1,19
ИНС ₁₈	1,67	1,64	1,72	1,71	1,71	1,72
%HHC ₁₈	93,84	88,23	91,36	91,65	91,44	91,34

Обозначения: $*C_{16:1}$ — сумма изомеров пальмитолеиновой кислоты; НЖК — сумма насыщенных жирных кислот; ННЖК — сумма ненасыщенных жирных кислот; МННЖК — сумма полиненасыщенных жирных кислот; ПННЖК / мннжк — отношение содержания полиненасыщенных жирных кислот к мононенасыщенным жирным кислотам; НЖК/ННЖК — отношение суммы ненасыщенных жирных кислот к сумме насыщенных жирных кислот; ИН — индекс двойной связи; ИНС $_{18}$ — индекс двойной связи жирных кислот с длиной цепи С $_{18}$; %ННС $_{18}$ — процент ненасыщенных жирных кислот с длиной цепи С $_{18}$ (Горностай и др., 2018); n=4-6. М \pm S.D. Субстрат, применяемый при культивировании мицелия — $Betula\ pendula$.

3,03-3,68% и 0,74-1,20%, максимум в темноте 7,66%, 5,43% и 4,13%, соответственно. Максимальное содержание стеариновой ($C_{18:0}$) кислоты приходится на область синего света. Применение желтого света при выращивании мицелия способствовало синтезу маргариновой ($C_{17:0}$) и *цис*вакценовой кислот ($C_{18:1 \, \omega 7}$) (Горностай и др., 2018).

Рассматривая сведения о концентрации жирных кислот с длиной цепи C_{18} , можно отметить «осцилляции» уровней содержания насыщенных ($C_{18:0}$) и ненасыщенных соединений ($C_{18:1}$ $_{\omega 9}$, $C_{18:1}$ $_{\omega 7}$, $C_{18:2}$ $_{\omega 6}$) для различных световых режимов (Горностай и др., 2018). Причиной данного явления могут быть процессы циклической активации/дезактивации или синтеза/деградации десатураз, участвующих в биосинтезе ЖК (Roeder et al, 1982).

Изменения качественного состава были незначительными, однако следует отметить присутствие генейкозановой кислоты ($C_{21:0}$) только в мицелии, культивируемом в темноте, а арахиновой ($C_{20:0}$) в темноте и при освещении мицелия желтым и зеленым светом. Наличие данных кислот выявлено и в плодовом теле *I. rheades* (Горностай и др., 2018). Изомеры пальмитолеиновой кислоты ($C_{16:1}$) не были выявлены в мицелии, культивируемом при синем свете. Кроме того, изомеры пальмитолеиновой ($C_{16:1}$) кислоты не были выявлены в мицелии, культивируемом при синем свете, их максимальное содержание приходилось на область зеленого света (2,51%). Максимум содержания при зеленом свете приходится также на миристиновую ($C_{14:0}$) и пентадекановую ($C_{15:0}$) кислоты.

Индекс ненасыщенности варьировал от 1,11 при синем свете до 1,16 при зеленом и желтом свете, что повторяло общую картину для индекса ненасыщенности жирных кислот с длиной цепи C_{18} . Содержание ненасыщенных компонентов в ряду C_{18} было близким для зеленой, желтой и красной областей спектра (91,36-91,65) и белого света (91,34) в то время как для синего участка спектра этот показатель был несколько ниже (88,23) (Горностай и др., 2018). Сумма мононенасыщенных жирных кислот (МННЖК) в условиях темноты выше, а сумма полиненасыщенных жирных

кислот (ПННЖК) меньше, чем в условиях освещения. Количественные данные для образца мицелия, культивированного с использованием белого света, в основном носили промежуточный характер (Горностай и др., 2018).

Таким образом, проведенные исследования показали, что световой режим выращивания влияет на жирнокислотный профиль мицелия *I. rheades*. Изменения носят, как правило, количественный характер, и касаются в первую очередь показателей содержания основных компонентов (Горностай и др., 2018).

4.2.3. Влияние светового режима на накопление стирилпиронов и бис(стирилпиронов) в мицелии *I. rheades*

Синтез стирилпиронов в грибах происходит от фенилаланина через ряд циннамоильных производных, причем данный процесс является было показано на культуре hispidus, светозависимым, что I. не накапливающей пигменты в темноте (Nambudir et al., 1973).

Нами изучено влияние спектра светового потока на синтез стирилпиронов в мицелии *I. rheades*. В результате выявлено, что максимальное накопление стирилпиронов наблюдалось при использовании синей части спектра (табл. 20).

Суммарное содержание пигментов в образце, полученном при культивировании мицелия под действием синего света, составило 8,10 мг/г и постепенно снижалось до 0,54 мг/г в красной части спектра и 0,02 мг/г в отсутствие света (рис. 13).

Компонентный состав фенольных соединений не претерпевал выраженных изменений: основным компонентом был гиспидин (19), содержание 5.30 $M\Gamma/\Gamma$. Образец, максимальное которого составило обработанный белым светом, накапливал в 2,5 раза меньше пигментов, чем образец, культивирование которого велось под синим светом. Способность

мицелия *I. rheades* накапливать стирилпироны при культивировании в условиях синего света показана впервые (Gornostai et al., 2018).

Таблица 20 – Содержание стирилпиронов и бис(стирилпиронов) в мицелии *I. rheades*, выращенного при различных световых режимах, мг/г

Образец	Световой режим культивирования						
Ооразец	темнота	красный	желтый	зеленый	синий	белый	
Феллинин A1/A2 (12/13)	н.о.	н.о.	<0,01±	<0,01±	0,06±	<0,01±	
			0,00	0,00	0,00	0,00	
1,1-Дистирилпирилэтан (14)	н.о.	н.о.	0,05±	$0,05\pm$	$0,07\pm$	$0,09\pm$	
1,1 дистиризниризготан (14)	11.0.	11.0.	0,00	0,00	0,00	0,00	
<i>транс</i> -Биснорянгонин (15)	н.о.	0,06±	0,08±	$0,24 \pm$	$0,32\pm$	0,11±	
транс-висноряні онин (13)	п.0.	0,00	0,00	0,02	0,02	0,00	
цис-Биснорянгонин (16)	шо	0,08±	0,16±	$0,14\pm$	0,50±	0,21±	
цис-виснорянгонин (10)	Н.О.	0,00	0,00	0,00	0,03	0,01	
3-Биснорянгонил-14'-гиспидин	и о	0,11±	0,23±	0,30±	0,78±	0,34±	
(17)	н.о.	0,00	0,01	0,01	0,03	0,01	
3,14'-Бисгиспидинил (18)	н.о.	<0,01±	<0,01±	<0,01±	0,20±	<0,01	
3,14 - Вистиспидинил (16)		0,00	0,00	0,00	0,01	±0,00	
транс-Гиспидин (19)	0,02±	0,20±	1,10±	1,44±	5,30±	2,13±	
транс-1 испидин (13)	0,00	0,01	0,03	0,04	0,15	0,09	
4446 ENORMANIA (20)	<0,01±	0,09±	0,22±	0,20±	0,56±	0,32±	
<i>цис</i> -Гиспидин (20)	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,01	
rudarayyy P (21)	и о	и о	0,04±	0,07±	0,31±	0,06±	
гифоломин В (21)	Н.О.	Н.О.	0,00	0,00	0,01	0,00	
Σ	0,02	0,54	1,88	2,44	8,10	3,26	

Примечание: н.о. — не обнаружено. Интенсивность светового потока для красного составляла (46,4 мкмоль/м 2 *с), для желтого (41,5 мкмоль/м 2 *с), для зеленого (55,3 мкмоль/м 2 *с), синего (48,3 мкмоль/м 2 *с), и белого (58,8 мкмоль/м 2 *с). Субстрат — *B. pendula.* n=3. M±S.D.

В литературе отмечено, что умеренный окислительный стресс способен вызывать адаптацию антиоксидантных систем, позволяющую затем выдерживать более сильный стресс. Так споры аскомицета *Magnaporthe oryzae*, подверженные ежедневному двенадцатичасовому освещению 2 кЛк проявляли большую толерантность к окислительному стрессу, в отличие от спор, выдержанных в темноте, при этом природа индуцированных светом

метаболитов гриба, отвечающих за ингибирование АФК, не была выявлена (Аверьянов и др., 2015). Выше упоминалось, что облучение вегетативного мицелия в лабораторных условиях вызывает стресс у мицелиальных клеток, что приводит к включению адаптационных механизмов. Освещение синим светом мицелия *I. rheades*, вероятно, вызывает активацию синтеза вторичных метаболитов – стирилпиронов, как ответ на окислительный стресс. Мицелий накапливает данные соединения как антиоксиданты, для уменьшения количества АФК, образованных в результате воздействия света.

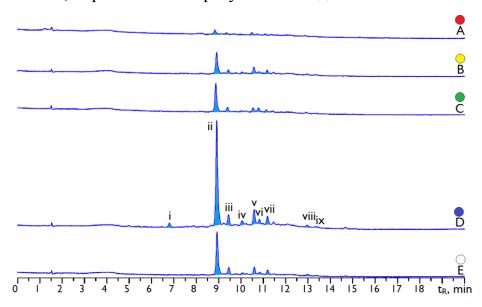


Рисунок 13 — ВЭЖХ хроматограммы (360 нм) спиртовых извлечений из мицелия *I. rheades* при различных световых режимах

Примечание: А – красный свет с интенсивность светового потока (46,4 мкмоль/м 2 *с), В – желтый свет (41,5 мкмоль/м 2 *с), С – зеленый свет (55,3 мкмоль/м 2 *с), D – синий свет (48,3 мкмоль/м 2 *с), Е – белый свет (58,8 мкмоль/м 2 *с). Субстрат – В. pendula. Цифрами обозначено положение соединений: \mathbf{i} – 3,14'-бисгиспидинил, \mathbf{ii} – тиспидин, \mathbf{iii} – иис-гиспидин, \mathbf{iv} – гифоломин B, \mathbf{v} – 3-биснорянгонил-14'-гиспидин, \mathbf{vi} – транс-биснорянгонин, \mathbf{vii} – \mathbf{iv} –

В ходе изучения влияния интенсивности синего света на способность мицелия *I. rheades* накапливать стирилпироны было показано, что максимальные показатели содержания были характерны для культур, выращенных при световом потоке интенсивностью 48,3 мкмоль/м 2 *с (**табл. 21**).

Повышение интенсивности света до значений 144,9 мкмоль/м 2 *с не оказывало значительного влияния на концентрацию стирилпиронов в мицелии. Дальнейшее повышение интенсивности света до 289,9 мкмоль/м 2 *с, равно как и снижение такового до 24,1 мкмоль/м 2 *с отрицательно сказывалось на накоплении стирилпиронов. Таким образом, оптимальный световой режим, обеспечивающий максимальную продукцию стирилпиронов в мицелии *I. rheades*, является синий свет с интенсивностью 48,3-96,8 мкмоль/м 2 *с.

Таблица 21 – Содержание стирилпиронов и бис(стирилпиронов) в мицелии *I. rheades*, выращенного с применением синего света различной интенсивности, мг/г

Образец	Интенсивность светового потока, мкмоль/м ² *c							
Соризец	24,1	48,3	96,8	144,9	193,2	241,5	289,8	
Феллинин А1/А2 (12/13)	<0,01±	0,05±	0,06±	0,05±	<0,01±	<0,01±	<0,01±	
Феллинин А1/А2 (12/13)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
1,1-Дистирилпирилэтан (14)	<0,01±	0,09±	0,12±	0,10±	0,05±	0,05±	<0,01±	
1,1-дистирилпирилэтан (14)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
mnaua Fuorionauronium (15)	0,05±	0,34±	0,31±	0,34±	0,32±	0,25±	0,20±	
<i>транс</i> -Биснорянгонин (15)	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	
иис-Биснорянгонин (16)	0,04±	0,52±	0,50±	0,42±	0,45±	0,40±	0,40±	
цис-виснорянгонин (10)	0,00	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
3-Биснорянгонил-14'-гиспидин	0,57±	0,81±	0,78±	0,79±	0,83±	0,74±	0,70±	
(17)	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	
2 14' Fuoruspungung (18)	<0,01±	0,18±	0,21±	0,20±	0,15±	0,17±	0,15±	
3,14'-Бисгиспидинил (18)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
транс-Гиспидин (19)	3,16±	5,46±	5,47±	5,38±	5,14±	4,98±	4,31±	
тринс-т испидин (17)	0,12	0,20	0,20	0,19	0,17	0,15	0,11	
<i>цис</i> -Гиспидин (20)	0,12±	0,52±	0,54±	0,56±	0,52±	0,53±	0,47±	
<i>цис-</i> 1 испидин (20)	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	
гифоломии В (21)	<0,01±	0,25±	0,20±	0,18±	0,19±	0,21±	0,20±	
гифоломин B (21)	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	
Σ	3,94	8,22	8,19	8,02	7,65	7,33	6,43	

Примечание: н.о. – не обнаружено. Субстрат – $B. pendula. n=3. M\pm S.D.$

В литературе отмечено влияние мощности светового потока на синтез nкумарат гидроксилазы и гиспидина культурального мицелия $I.\ hispidus$, где

указано что максимая активность фермента приходится на 5 Дж/см², а содержание пигмента на 0,5 Дж/см². Выявлено влияние времени обработки светом, так, синтез гиспидина выходит на плато после 24 часов, а ферментная активность n-кумарат гидроксилазы выходит на плато после 12 часов освещения. В нашей работе данный непрерывного параметр рассматривался, использовали непрерывное освещение в течение 30 дней. Однако, стоит отметить, что максимальное содержание стирилпиронов, показаное в синей области для культурального мицелия *I. hispidus* при 440 нм, составило 2,3 мг/г (Vance et al., 1974), что в 3,5 раза меньше полученного нами результата для мицелия *I. rheades* при 460нм.

Однако, стоит заключить, что свет является необходимым условием для синтеза стирилпиронов для рода *Inonotus*. Сравнение полученных данных у грибов, относящихся к данному роду, демонстрирует различные механизмы регулирования, что, веротно, может быть связано с циркадными ритмами территории произрастания вида (свет, температура и др.). Такая адаптация в природе может иметь значение для выживания организмов.

4.2.4. Влияние светового режима на накопление водорастворимых полисахаридов в мицелии *I. rheades*

Световой фактор оказывает влияние на углеводный обмен у грибов разных систематических групп, регулируя при этом активность внутриклеточных ферментов и синтез полисахаридов (Tisch, Schmoll, 2010).

В ходе изучения влияния светового режима на состав водорастворимых полисахаридов (ВРПС) мицелия *I. rheades* было показано, что синтез доминирующих моносахаридов ВРПС зависит от светового режима выращивания мицелия (табл. 22).

В мицелии, выращенном в темноте, преобладают галактаны, в то время как мицелий на свету, вне зависимости от длины волны используемого светового режима, содержит меньшее количество галактанов. При

культивировании мицелия на свету содержание глюканов почти в 2 раза выше. Содержание глюкозы составляло 24,7-30,3 моль% с максимумом при облучении желтым светом. Содержание галактозы в полисахаридных комплексах было наибольшим при использовании синего света (30,5 моль%). Следует отметить, что при переходе от красного к синему типу света в ВРПС снижалось содержание фукозы (11,8 \rightarrow 6,2 моль%) и ксилозы (12,4 \rightarrow 7,4 моль%), напротив, концентрация маннозы (14,3 \rightarrow 20,2 моль%) и кислых моносахаридов повышалась (0,6 \rightarrow 1,5 моль% и 0,1 \rightarrow 0,3 моль% для галактуроновой и глюкуроновой кислот, соответственно). Для мицелия, выращенного при белом свете, были характерны усредненные показатели содержания всех углеводов.

Таблица 22 – Моносахаридный состав полисахаридов мицелия *I. rheades* при разных световых режимах

Световой режим		Моносахаридный состав (моль%)							
культивирования	Ara	Gal	Glc	Fuc	Man	Rha	Xyl	GalA	GlcA
Красный	2,3	25,4	28,1	11,8	14,3	4,9	12,4	0,6	0,1
Желтый	1,8	25,2	30,3	9,6	14,9	6,3	11,1	0,5	0,2
Зеленый	1,9	28,2	26,9	7,0	17,2	8,0	9,5	1,0	0,2
Синий	2,3	30,5	24,7	6,2	20,2	6,8	7,4	1,5	0,3
Белый	2,0	25,5	25,9	8,1	19,2	8,2	9,6	1,2	0,2
Темнота	0,4	56,8	13,8	3,9	15,3	1,7	5,0	2,3	0,7

Примечание: Интенсивность светового потока для красного составляла (46,4 мкмоль/м 2 *с), для желтого (41,5 мкмоль/м 2 *с), для зеленого (55,3 мкмоль/м 2 *с), синего (48,3 мкмоль/м 2 *с), и белого (58,8 мкмоль/м 2 *с).

Для базидиальных грибов характерной ответной реакцией на световую обработку при культивировании мицелия низкоинтенсивным лазерным светом и коротковолновой областью спектра явлется увеличение общего содержания полисахаридов (Поединок, 2013). В то же время, применение УФ повышало общее содержание полисахаридов мицелия *I. obliquus* до 2,39%. (Zhang, 2008), а применение облучения синим светом *G. lucidum*, приводило к существенному накоплению полисахаридов на каждой стадии развития гриба (Нао et al., 2010; Mei et al., 2013).

Сравнивая собственные данные с литературными по моносахаридному составу полисахаридов мицелия *G. lucidum* (Поединок, 2013), можно выявить общую ответную реакцию высших грибов на освещение светом 632-488 нм при культивировании — увеличение содержания ксилозы и глюкозы. Вероятно, увеличение количества данных соедиений связанно с подготовкой мицелия к следующей стадии развития гриба — образованию примордиев, которая происходит только в присутствии света.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что для *I. rheades* характерен светозависимый характер биосинтеза полисахаридов определенных типов.

4.3. Технологическая схема получения мицелия трутовика лисьего сухого

Стадии основных технологических процессов:

- ВР.1. Санитарная обработка и подготовка производства;
- ВР.2. Подготовка древесного субстрата;
- ВР.3. Подготовка вегетативного мицелия;
- ТП.4. Инокуляция древесного субстрата;
- ТП.5. Культивирование мицелия;
- ТП.6. Удаление древесного субстрата;
- ТП.7. Сушка мицелия;
- УМО.8. Фасовка, упаковка и маркировка мицелия сухого.

Схема технологического процесса получения мицелия трутовика лисьего сухого представлена на (рис. 14).

BP.1. Санитарная обработка И подготовка производства. Технологический процесс производства осуществляется согласно OCT 64-002-96 регламенту, составленному ПО И технологическим инструкциям, разработанным в соответствии с требованиями ОСТ 64-002-96. Допуск К работе аппаратчиков осуществляется после проведения

обучения и инструктажа по безопасной эксплуатации специального используемого оборудования, средств измерений ДЛЯ определения параметров технологического процесса, по правилам производственной санитарии, пожарной безопасности и после ознакомления с планом ликвидации аварий. Технологическое оборудование проверяется на наличие технических неисправностей и при необходимости подвергается ремонту. На рабочих должны находиться комплекты производственных местах инструкций ПО данному рабочему месту, инструкции ПО технике безопасности и пожарной безопасности. Перед началом технологического процесса проводится подготовка персонала и производственных помещений микробной обсемененности ПО предупреждению нестерильных лекарственных форм с применением моющих растворов. Обработку помещений производится при включенной приточно-вытяжной вентиляции. Применяются средства индивидуальной защиты И другие соответствии с ОСТ 64-7-473-83 и «Основными правилами безопасной работы в химических лабораториях».

ВР.2. Подготовка древесного субстрата. Предварительно высушенные древесные диски (влажность не более 10%) диаметром 5-7 см и высотой 4 см заливают водой очищенной (ФС.2.2.0020.15), помещают в камеру для вымачивания, заливают водой очищенной до зеркала и оставляют на 12-16 часов при температуре 20 °C. Вымоченные древесные диски помещают в автоклав, где стерилизуют при температуре 130 °C и давлении 0,9 атмосфер в течение 60 минут. Древесные диски после охлаждения до 20 °C передают на ТП.4.

ВР.3. Подготовка вегетативного мицелия. В емкость 1 л заливают 500 мл питательной среды, состоящей из 375 мл воды очищенной (ФС.2.2.0020.15), 125 мл сусла (ГОСТ 31711-2012, плотность 11%, рН 6,39), 5 г сахарозы (ГОСТ 5833-75), 5 г глюкозы (ГОСТ 975-88) и перемешивают 10 мин, затем помещают в автоклав, где стерилизуют при температуре 130 °С и давлении 0,9 атмосфер в течение 30 мин. Для выращивания мицелия

используют стеклянные чашки Петри, после предварительной стерилизации в сухожаровом шкафу 3-4 часа при 130 °C остужают и в них разливают горячую питательную среду, по 20 мл, эту и все дальнейшие процедуры проводят в стерильных условиях (ламинарном боксе). На застывшую питательную среду, в центр чашки Петри с помощью микробиологической иглы высаживают инокулят разметом 5×5 мм. Чашки закрывают и помещают в термостат, где инкубируют при температуре 25 °C в течение 7 суток.

- **ТП.4. Инокуляция древесного субстрата.** На дно стерильной камеры размером 100×150×20 см с отверстиями для дыхания (рис. 15) стерильным пинцетом помещают 20 древесных дисков, на каждый из которых переносят вегетативного мицелия размером 2×2 см и сверху накрывают вторыми дисками. Камеру закрывают.
- ТП.5. Культивирование мицелия. Закрытую стерильную камеру переносят в термостат, снабженный высокоэффективными трехкристальными светодиодами синего света (465-470 нм; интенсивность светового потока 48,3 мкмоль/м²∗с) при температуре 25 °C и закрытых отверстиях для дыхания в темноте в течение 6-7 суток до начала видимого обрастания древесного субстрата. Далее инкубирование продолжают при включенной лампе при постоянном световом потоке и температуре 25 °C в течение 30 суток при открытых отверстиях для дыхания.
- **ТП.6.** Удаление древесного субстрата. Древесные диски вынимают из стерильных камер и отделяют путем отрезания скальпелем. Получают 1,05 кг мицелия желтовато-коричневого цвета. Древесный субстрат далее не используют, его отправляют в отвал.
- **ТП.7. Сушка мицелия**. Мицелий, полученный на этапе ТП.6 помещают в сушильный шкаф, где сушат при температуре 38-40 °C в течение 12 ч. Получают мицелий сухой массой 105 г.
- УМО.8. Фасовка, упаковка и маркировка мицелия сухого. Фасовку, упаковку и маркировку мицелия сухого проводят согласно ОФС.1.1.0019.15 «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного

растительных препаратов». Мицелий сухой лекарственных расфасовывают по 50 и 100 г в картонные коробки из картона марки «А» по ОСТ 9347-74. Пачки с мицелием трутовика лисьего сухим упаковывают по 10, 12 или 20 шт. в картонные коробки из картона марки «А» по ОСТ 9347-74. Картонные коробки с мицелием трутовика лисьего сухим должны упаковываться в фанерные ящики по ГОСТ 10131 или ящики гофрированного картона по ГОСТ 15629-93. На первичной и вторичной (потребительской) упаковке мицелия трутовика лисьего сухого согласно ОФС.1.1.0019.15 указывается наименование лекарственного сырья, номер Дополнительно серии, объем. вторичной срок годности, на (потребительской) упаковке лекарственного препарата указывают торговое наименование лекарственного сырья, наименование производителя лекарственного сырья, номер регистрационного удостоверения, способ применения, лекарственную форму, условия отпуска, условия хранения, предупредительные надписи и штриховой код.

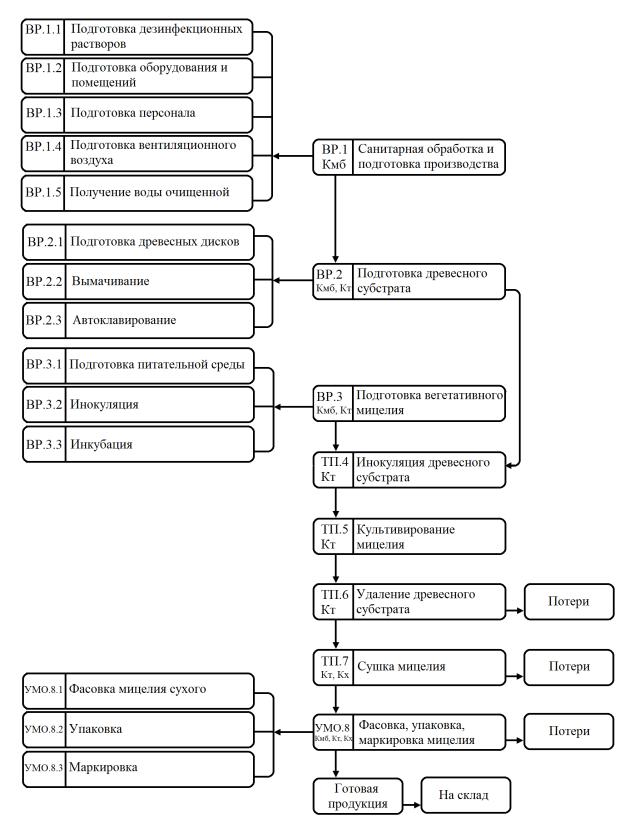


Рисунок 14 — Технологическая схема производства мицелия трутовика лисьего сухого

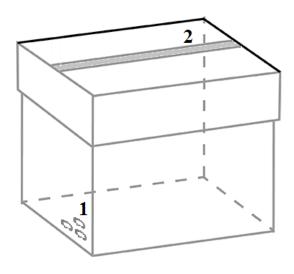


Рисунок 15 – Схема стерильной камеры

Примечание: – отверстия для дыхания, 2 – светодиоды.

ГЛАВА 5. ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МИЦЕЛИЯ ТРУТОВИКА ЛИСЬЕГО

5.1. Внешние и микроскопические признаки мицелия трутовика лисьего

Внешние признаки. Цельное сырье. Куски различной формы размером до 12 см. Ткань мицелия плотная, пористая, однородная по строению. Наружный слой мицелия темно-коричневого цвета, цельный, без трещин; внутренний слой – желтого цвета. Запах специфический слабый. Цвет водного извлечения светложелтый. Вкус водного извлечения специфический.

Измельченное сырье. Кусочки мицелия различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет сырья желтовато-коричневый. Запах специфический слабый. Цвет водного извлечения светло-желтый. Вкус водного извлечения специфический.

Кусочки Порошок. сырья, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 1 ∐вет MM. желтоватокоричневый. Запах специфический слабый. Цвет водного извлечения светложелтый. Вкус водного извлечения специфический.



Рисунок 16 — Внешний вид сырья Примечание: а — цельного сырья, б — измельченного сырья, в — порошка.

Микроскопические признаки. Микроскопическое исследование проводилось на микроскопе Axiostar PLUS Carl Zeiss (Германия). Фотографии были сделаны с помощью програмного обеспечения микроскопа Akcio Vision при увеличении ×400 и ×1000. Для проведения световой микроскопии использовали тонкие поперечные и продольные срезы сырья. Полученный срез помещали на предметное стекло в каплю спирта этилового 70%. Для приготовления препаратов порошка кусочки сырья помещали в небольшое количество спирта этилового 70%, перемешивали 5 минут, после чего помещали на предметное стекло.

Цельное и измельченное сырье. При рассмотрении поперечного и продольного среза обнаружено мицелий состоит из септированных, ветвящихся однородно распределеных гиф, большая часть стенок которых пигментирована, пряжки отсутствуют (рис. 17).

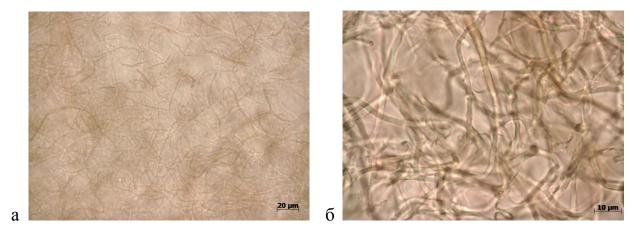


Рисунок 17 — Фрагменты микроскопического строения цельного сырья трутовика лисьего

Примечание: a – увеличение $\times 400$, б – увеличение $\times 1000$.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка мицелия по поверхности и по краям кусочков видны ветвящиеся однородно распределеные гифы, часть их которых пигментирована полностью (рис. 18).

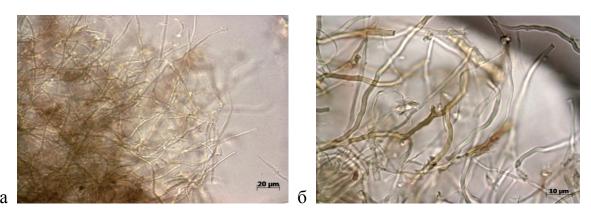


Рисунок 18 — Фрагменты микроскопического строения порошка трутовика лисьего.

Примечание: a - yвеличение $\times 400$, 6 - yвеличение $\times 1000$.

5.2. Качественное определение полифенольных соединений и гиспидина в мицелии трутовика лисьего

1. В коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл помещают 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, прибавляют 10 мл этилового спирта 70%, присоединяют обратный холодильник, кипятят на водяной бане в течение 15 мин и фильтруют. К 1 мл полученного извлечения прибавляют 0,5 мл раствора Фолина и 0,5 мл натрия карбоната раствора 10%, появляется темносинее окрашивание (полифенольные соединения) (табл. 23).

Таблица 23 — Соответствие 5 партий сырья мицелия трутовика лисьего сухого показателю 1

		Партия сырья		
IR-01	IR-02	IR-03	IR-04	IR-05
Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует

2. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, полученного при количественном определении методом ВЭЖХ (раздел 5.4), должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО гиспидина (табл. 24).

Таблица 24 — Соответствие 5 партий сырья мицелия трутовика лисьего сухого показателю 2

		Партия сырья		
IR-01	IR-02	IR-03	IR-04	IR-05
Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует	Соответствует

5.3. Методы испытаний мицелия трутовика лисьего

Влажность. Для *цельного сырья*, *измельченного сырья* и *порошка* мицелия трутовика лисьего сухого показатель «Влажность» должен быть не более 5% (табл. 25).

Таблица 25 — Значение показателя «Влажность» для 5 партий сырья мицелия трутовика лисьего сухого, % от массы воздушно-сухого сырья

		Партия сырья		
IR-01	IR-02	IR-03	IR-04	IR-05
3,33	3,65	2,37	2,09	2,62

Зола общая. Для *цельного сырья*, *измельченного сырья* и *порошка* мицелия трутовика лисьего сухого показатель «Зола общая» должен быть не более 10% (табл. 26).

Таблица 26 – Значение показателя «Зола общая» для 5 партий сырья мицелия трутовика лисьего сухого, % от массы воздушно-сухого сырья

		Партия сырья		
IR-01	IR-02	IR-03	IR-04	IR-05
5,37	6,28	9,17	7,13	6,94

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Для *цельного сырья*, *измельченного сырья* и *порошка* мицелия трутовика лисьего сухого показатель «Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте» должен быть не более 3% (табл. 27).

Таблица 27 — Значение показателя «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте» для 5 партий сырья мицелия трутовика лисьего сухого, % от массы воздушно-сухого сырья

Партия сырья					
IR-01	IR-02	IR-03	IR-04	IR-05	
1,64	2,32	2,79	2,65	2,45	

Измельченность сырья. Для *цельного сырья* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм должно быть не более 3% (табл. 28). Для *измельченного сырья* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм должно быть не более 3%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм должно быть не более 5%. Для порошка частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм должно быть не более 7%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм должно быть не более 5%.

Таблица 28 — Значение показателя «Измельченность» для 5 партий сырья мицелия трутовика лисьего сухого, % от массы воздушно-сухого сырья

		Партия сырья				
IR-01	IR-02	IR-03	IR-04	IR-05		
		Цельное сырье				
Час	стиц, проходящих с	сквозь сито с отверо	стиями размером 3	MM		
2,1	2,0	1,7	2,0	1,2		
	I I	Измельченное сырь	e			
Част	иц, не проходящих	сквозь сито с отве	рстиями размером	7 мм		
1,8	1,5	1,0	0,8	1,1		
Част	иц, проходящих ск	возь сито с отверст	гиями размером 0,2	5 мм		
3,2	3,0	3,1	1,7	2,0		
		Порошок				
Част	Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм					
4,0	4,3	2,7	2,5	2,9		
Част	Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм					
3,7	2,1	1,0	1,2	3,3		

Органическая примесь. Для *цельного сырья*, *измельченного сырья* и *порошка* остатков древесины должно быть не более 1% **(табл. 29)**.

Таблица 29 — Значение показателя «Органическая примесь» для 5 партий сырья мицелия трутовика лисьего сухого, % от массы воздушно-сухого сырья

Партия сырья					
IR-01	IR-02	IR-03	IR-04	IR-05	
0,95	0,82	0,12	0,24	0,28	

Минеральная примесь. Для *цельного сырья*, *измельченного сырья* и *порошка* остатков минеральной примеси должно быть не более 0,5% **(табл. 30)**.

Таблица 30 — Значение показателя «Минеральная примесь» для 5 партий сырья мицелия трутовика лисьего сухого, % от массы воздушно-сухого сырья

Партия сырья						
IR-01	IR-02	IR-03	IR-04	IR-05		
0,45	0,32	0,38	0,48	0,42		

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

5.4. Количественное определение гиспидина в мицелии трутовика лисьего

Для осуществления количественного анализа гиспидина в мицелии трутовика лисьего была разработана методика количественного анализа методом ВЭЖХ, описание которой приведено ниже. Для *цельного сырья*, *измельченного сырья* и *порошка* мицелия трутовика лисьего сухого показатель «Содержание гиспидина» должен быть не менее 0,5%.

Методика количественного определения гиспидина в мицелии трутовика лисьего сухом. *Приготовление растворов*. *Раствор СО гиспидина*. Около 10,0 мг (точная навеска) СО гиспидина растворяют в спирте 96% в мерной колбе вместимостью 10 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают. Срок годности раствора не более 1 мес. при хранении в плотно укупоренной таре в прохладном, защищенном от света месте.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия: фактор асимметрии пика гиспидина должен находиться в пределах от 0,8 до 1,5; эффективность хроматографической колонки должна быть не менее 5000 теоретических тарелок.

Приготовление испытуемого раствора. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 40 мг (точная навеска) измельченного сырья помещают в пробирку Эппендорфа вместимостью 2 мл, прибавляют 1 мл спирта 70% и нагревают в ультразвуковой ванне при 50 °C в течение 40 мин. После охлаждения пробирку центрифугируют. Около 100 мкл супернатанта фильтруют через нейлоновый фильтр (с размером пор 0,45 мкм) (испытуемый раствор).

Условия хроматографирования. Колонка: нержавеющая сталь, 70×2 мм, эндкеппированный октадецилсиликагель (C18) для хроматографии (5 мкм). Подвижная фаза: A - 0.2 М раствор лития перхлората в 0.006 М

перхлорной кислоте. В – ацетонитрил для хроматографии. Скорость потока, мл/мин: 0,15. Температура колонки, °C: 35. Детектор: УФ-спектрофотометрический или диодная матрица; длина волны, нм: 250. Объем вводимой пробы, мкл: 1. Время регистрации хроматограммы, мин: 20. Способ элюирования: программа градиента

Время, мин	А, об.%	В, об.%
0 - 10	$50 \rightarrow 0$	$50 \rightarrow 100$
10 - 20	0	100

Хроматографируют попеременно испытуемый раствор и раствор СО, получая не менее 3 хроматограмм. Результаты считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Расчет содержания гиспидина проводят методом внешнего стандарта.

Содержание гиспидина в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 1}{S_0 \times a \times 1} \times \frac{100 \times 100}{100 - W} \times \frac{P}{100} = \frac{S \times a_0}{S_0 \times a} \times \frac{100 \times P}{100 - W},$$

где S — площадь пика гиспидина на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 — площадь пика гиспидина на хроматограмме СО гиспидина; a — навеска сырья, мг; a_0 — навеска СО гиспидина, мг; P — содержание основного вещества в СО гиспидина, %; W — влажность сырья, %.

При 5 независимых определениях количественного содержания гиспидина в мицелии трутовика лисьего сухого ошибка определения не привышала 1,50% (табл. 31).

Таблица 31 — Метрологические характеристики разработанной методики (n = 5, P = 0.95, tP,f = 2.57)

Партия сырья	\bar{x} ,%	S^2	S_x	$\pm \Delta x$,%	<i>E</i> ,%
1	0,72	9,16·10 ⁻⁵	$4,29\cdot10^{-3}$	0,01(1)	1,53
2	0,64	$9,50\cdot10^{-5}$	$4,36\cdot10^{-3}$	0,01(1)	1,72
3	0,67	$3,71 \cdot 10^{-5}$	$2,72 \cdot 10^{-3}$	0,00(7)	1,04
4	0,58	$6,14\cdot10^{-5}$	$3,50\cdot10^{-3}$	0,00(9)	1,55
5	0,60	$7,57 \cdot 10^{-5}$	$3,89 \cdot 10^{-3}$	0,01(0)	1,67
	0,64	7,21·10 ⁻⁵	$3,75\cdot10^{-3}$	0,00(9)	1,50

Валидационный анализ показал, что зависимость площади хроматографического пика от концентрации гиспидина в диапазоне концентрации 5-1000 мкг/мл описывалась линейной регрессией со значением коэффициента детерминации 0,9999 (табл. 32).

Таблица 32 — Валидационные параметры методики количественного анализа гиспидина методом ВЭЖХ

Параметр	Гиспидин	
a ^a	0,032	
b ^a	1,463	
Линейность (r^2)	0,9999	
$S_{ m YX}$	1,02·10 ⁻²	
LOD, мкг/мл	1,05	
LOQ, мкг/мл	3,18	
Диапазон, мкг/мл	5-1000	
Воспроизводимость 6, %	1,04	
Правильность:		
день-в-день ^в , %	1,12	
день-через-день ^в , %	1,29	
Точность В, %	98,67-101,92	

Примечание: а коэффициенты в уравнении регрессии $Y = a \times X + b$, где X — концентрация, мкг/мл, Y — площадь пика, mAU; n = 6; n = 6.

Величины пределов детектирования (LOD) и количественного определения гиспидина (LOQ) составили 1,05 и 3,18 мкг/мл, соответственно. Показатели воспроизводимости, вариабельности и стабильности не превышали 1,5%, а точность методики, определенная для пяти уровней концентрации (80-120%) составила 98,67-101,92%.

Проведенные фармакологические исследования показали, что экстракты мицелия *I. rheades* обладают антиоксидантной, противовоспалительной, иммуностимулирующей, антикомплементарной, антиглюкозидазной и антибактериальной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним направлений ИЗ приоритетных развития современных исследований разработка использованием является технологий cбазидиальных грибов для получения биологически активных соединений. Благодаря научным достижениям последних десятилетий, стало известно, что базидиальные грибы являются продуцентами целого ряда биологически активных веществ. Свет и субстрат относятся к основным экологическим факторам, регулирующим метаболизм базидиальных ксилотрофов.

В представленной работе были проведены исследования химического состава и особенностей накопления биологически активных соединений в мицелии гриба белой гнили *I.rheades* при культивировании на разном субстрате и при различных условиях освещенности. Данный вид гриба был выбран для детального исследования в результате предварительных экспериментов, которые показали что: 1) мицелий *I. rheades* способен активно накапливать мицелиальную массу на разных субстратах; 2) экстракты из мицелия проявляют антиоксидантную и антибактериальную активность. Таким образом, было установлено, что *I.rheades*, перспективный с точки зрения биотехнологии объект, вероятно, содержащий биологически активные соединения, остается малоисследованным. Поскольку температура фактором, биосинтез является мошным влияющим на вторичных метаболитов, для адекватной оценки роли субстрата и света в работе использовалась одна температура культивирования мицелия 25 °C.

Впервые был охарактеризован химический состав мицелия *I.rheades*, подробно были изучены тритерпеновые соединения, жирные кислоты, стирилпироны и полисахариды.

При исследовании экстрактивных веществ из мицелия впервые для грибов рода *Inonotus* было выявлено наличие бетулиновой кислоты. Впервые из мицелия *I. rheades* выделен и охарактеризован новый бис(стирилпирон) –

реадинин (3,3'-этилиденбис[4-гидрокси-6-(4-гидроксистирил)-2H-пиран-2-он]), установлено предварительное строение доминирующего полимера из мицелия в виде $(1\rightarrow 6)$ -связанного галактана.

Для решения одной из основных задач исследования, было изучено влияние условий освещения на химический состав и особенности накопления биологически активных метаболитов в мицелии. Результаты показали, что изменение параметров освещенности напрямую влияет на содержание разных классов соединений. Наибольшую фотозависимость тритерпеноидов проявляют бетулиновая кислота и бетулин, на накопление бетулина также оказывает влияние интенсивность светового потока. Накоплению стирилпиронов способствует облучение синим светом, при интенсивности светового потока не превышающей 96.8 мкмоль/м 2 *с. Доминирующей группой полисахаридов в мицелии *I. rheades*, выращенном в темноте являются галактаны, на свету их содержание в 2 раза меньше, при этом содержание глюканов 2 раза выше. Особое значение свет имеет для синтеза стеариновой кислоты и ее производных, накоплению бегеновой кислоты способствовало культивирование мицелия в темноте.

Исследование накопления разных классов соединений в мицелии выявило влияние субстрата на способность мицелия *I. rheades* концентрировать тритерпеновые соединения: бетулин, бетулиновую кислоту и лупеол. Результаты показали, что среди жирных кислот субстратная зависимость прослеживается для олеиновой, линолевой и бегеновой кислот.

Таким образом, трутовик лисий является потенциальным продуцентом ценных лекарственных веществ.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

- 1. Впервые детально охарактеризован химический состав мицелия *I*. Установлено наличие в составе мицелия следующих групп rheades. соединений: фенольных соединений 0,54%; аминокислот 0,72%; углеводов 5,74%, В TOM числе: водорастворимых полисахаридов 1,28%, 1.46%. щелочерастворимых полисахаридов спирторастворимых полисахаридов 2,19%, белков 0,92%; липидов 0,67%, золы 2,60%. Впервые в мицелии I. rheades идентифицированы три стерола (инотодиол, ланостерол, эргостерол пероксид) и семь лупановых тритерпеноидов (лупеол, бетулин, бетулиновая кислота, бетулон, бетулоновый альдегид, бетулоновая кислота, бетулиновый альдегид). Также первые идентифицированы стирилпиронов (транс- и цис-гиспидин, транс- и цис-биснорянгонин, феллининов А1 и А2) и пять бис(стирилпиронов) (3,14'-бисгиспидинил, гифоломином В, 3-биснорянгонил-14'-гиспидин, 1,1-дистирилпирилэтана), а также выделен и охарактеризован новый бис(стирилпирон) – реадинин (3,3'этилиден-бис-[4-гидрокси-6-(4-гидроксистирил)-2H-пиран-2-он]). Впервые полисахариды Ι. rheades. выделены охарактеризованы мицелия Установлено предварительное строение доминирующего полимера из мицелия в виде $(1 \rightarrow 6)$ -связанного галактана.
- 2. В результате исследования влияния субстратного и светового фактора на химический состав мицелия *I. rheades*, было показано, мицелий *I.* rheades способен накапливать тритерпеновые соединения из древесины Betula pendula, используемой в качестве субстрата. Доминирование бетулиновой кислоты тритерпеноидов наблюдается среди культивировании мицелия в условиях освещения красной, желтой и зеленой частями спектра, с максимальным содержанием в желтой, и накоплением бетулина в синей части спектра. Использование в качестве субстрата Р. tremula повышает насыщенность жирных кислот мицелия на 17 %, основные

изменения приходятся на долю олеиновой, линолевой и бегеновой кислот. Мицелий *I. rheades* способен накапливать стирилпироны под действием света, с уменьшением их количества при изменении облучения от синей (8,10 мг/г) к красной (0,54 мг/г) части спектра и почти исчезая (0,02 мг/г) в темноте. Показан светозависимый характер биосинтеза полисахаридов определенных типов. Для моносахаридного состава установлено, в темноте преобладают галактаны, на свету глюканы.

- 3. Разработана технология получения сырья трутовика лисьего сухого, обогащённого гиспидином. Проведена стандартизация сырья (цельного, измельченного и порошка) трутовика лисьего сухого, в результате установлены показатели подлинности и доброкачественности с установлением его макро- и микроскопических признаков. Рекомендуемое содержание гиспидина в сырье не менее 0,5%. Разработанные числовые показатели и нормы качества мицелия трутовика лисьего сухого включены в проект ФСП «Мицелий трутовика лисьего сухого».
- 4. Разработана методика количественного анализа гиспидина в мицелии трутовика лисьего методом ВЭЖХ. Методика валидирована и соответствуют критериям правильность, прецизионность, специфичность и линейность. Установлены числовые показатели качества сырья, включенные в проект ФСП «Мицелий трутовика лисьего сухого».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Абышев, А.З. Исследование химического состава экстракта коры березы *Cortex Betula* сем. *Betulaceae* / А.З. Абышев, Э.М. Агаев, А.Б. Гусейнов // Химико-фармацевтический журнал. 2007. Т. 41, №8. С. 22–26.
- Аляутдин, Р.Н. «Чаговит» при сахарном диабете II типа / Р.Н. Аляутдин, Г.И. Кабацкая, Б.К. Романов [и др.] // Вестн. нов. мед. технол. 2009. Т. 16, № 4. С.169–170.
- 3. Бисько, Н.А. Биология и культивирование съедобных грибов рода вешенка / Н.А. Бисько, И.А. Дудка // Киев: Наук. думка, 1987. 148 с.
- 4. Бухало, А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало // Киев: Наук. думка, 1988. 144 с.
- 5. Велигодская, А.К. Влияние источников азота на синтез каротиноидов некоторыми штаммами базидиомицетов / А.К. Велигодская, О.В. Федотов, А.С. Петреева // Биологический вестник Мелитопольского государственного педагогического университета им. Богдана Хмельницкого. 2014. Т. 4, № 1. С. 22–34.
- Винокуров, В.А. Получение липидов базидиальных грибов в погруженной культуре / В.А. Винокуров, О.В. Попова, А.В. Автономова [и др.] // Башкирский химический журнал. 2011. Т. 18, № 4. С. 71–76.
- 7. Гашникова, Н.М. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении вируса иммунодефицита человека / Н.М. Гашникова, Т.А. Косогова, Л.И. Пучкова // Наука и современность. 2011. № 12-1. С. 12–18.
- 8. Горностай, Т.Г. Влияние температурного и субстратного факторов на скорость роста *Inonotus rheades*, *Hericium coralloides*, *Hypsizygus ulmarius* / Т.Г. Горностай, М.С. Полякова, С.Н. Осипенко [и др.] // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. − 2014а. − № 1 (6). − С. 90–93.

- 9. Горностай, Т.Г. Изучение антирадикальной и антимикробной активности водно-спиртовых экстрактов плодовых тел и мицелия *Inonotus rheades* (Pers.) Bondartsev and singer / Т.Г. Горностай, В.А. Чхенкели, Т.А. Пензина [и др.] // Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН. 2014. № 5 (99). С. 76–79.
- 10. Горностай, Т.Г. Липиды *Inonotus rheades* (Pers.) Bondartsev&Singer влияние субстрата и светового режима на жирнокислотный профиль мицелия / Т.Г. Горностай, М.С. Полякова, Г.Б. Боровский [и др.] // Хим. раст. сырья. 2018. № 1. С. 105–111.
- 11. Горностай, Т. Г. Трансформация лупановых тритерпеноидов в мицелии *Inonotus rheades* (Pers.) Bondartsev & Singer под действием света / Т. Г. Горностай, Д. Н. Оленников, Ю. Б. Захаров, Г. Б. Боровский // Проблемы изучения и сохранения растительного мира Евразии: Материалы II Всерос. конф. Иркутск, 2017. С. 188–189.
- 12. Государственная Фармакопея СССР: 11 изд. М.: Медицина. 1990. 398с.
- 13. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. М.: Практика, 1998.-459 с.
- 14. Кузнецова, О.Ю. Обзор современных препаратов с биологически активными композициями березового гриба Чаги / О.Ю. Кузнецова // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. Т. 1, № 14. С. 128–141.
- 15. Лазовская, А.В. О токсичности чаги / А.В. Лазовская // Чага и ее лечебное применение при раке IV стадии. Л.: Медгиз, 1959а. С. 96–102.
- 16. Лазовская, А.В. Об отсутствии у чаги пирогенных свойств / А.В. Лазовская // Чага и ее лечебное применение при раке IV стадии. Л.: Медгиз, 1959б. – С. 103–104.
- 17. Мухин, В.А. Биота ксилотрофных базидиомицетов Западно-Сибирской равнины / В.А. Мухин // Екатеренбург: УИФ «Наука», 1993. 231 с.

- 18. Ниемеля, Т. Трутовые грибы Финляндии и прилегающей территории России / Т. Ниемеля// Хельсинки: Изд-во Хельсинского ун-та, 2001. 120 с.
- 19. Оленников, Д. Н. Водорастворимые глюканы семян кардамона настоящего *Elettaria cardamomum* / Д. Н. Оленников, А. В. Рохин // Приклад. биохимия и микробиол. 2013. Т. 49, № 2. С. 197–202.
- 20. Оленников, Д.Н. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов / Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева // Химия растит. сырья. 2006. № 4. С.29–33.
- 21. Оленников, Д. Н. Разветвленный глюкан плодовых тел *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr.) Karst. / Д. Н. Оленников, С. В. Агафонова, А. В. Рохин и др. // Приклад. биохимия и микробиол. 2012. Т. 48, № 1. С. 74–80.
- 22. Поединок, Н.Л. Биосинтетическая активность некоторых высших лекарственных грибов после световых воздействий / Н.Л. Поединок, О.В. Ефременкова, О.Б. Михайлова [и др.] // Успехи медицинской микологии. 2007. Т. 9. С. 176–178.
- 23. Полковникова, М.В. Изучение противогерпетических свойств экстрактов из березового гриба *Inonotus obliquus* / М.В. Полковникова, Н.Н. Носик, Т.М. Гараев [и др.] // Вопр. вирусологии. − 2014. − Т. 59, № 2. − С. 45–48.
- 24. Проценко, М.А. Биологически активные соединения плодовых тел и культивируемого мицелия базидиального гриба *Daedaliopsis tricolor* / М.А. Проценко, Г.П. Трошкова, Т.А. Косогова // Фундам. исслед. 2014. № 12. С. 136–140.
- 25. Разумов, И.А. Протективная активность водных экстрактов из высших грибов при экспериментальной герпесвирусной инфекции у белых мышей // И.А. Разумов, Е.И. Казачинская, Л.И. Пучкова [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58, № 9–10. С. 8–12.
- 26. Сысоева, М.А. Сравнительная активность антиоксидантной активности и спиртовых извлечений Чаги / М.А. Сысоева, Л.Р. Юмаева, В.С. Гамаюрова [и др.] // Химия растит. сырья. 2009. № 2. С. 121—124.

- 27. Теплякова, Т.В., Гашникова Н.М., Пучкова Л.И., Проняева Т.Р., Косогова Т.А. Ингибитор репродукции вируса иммунодефицита человека 1 типа: пат. 2375073 С1 Рос. Федерация. № 2008124179/15; заявл. 11.06.2008; опубл. 10.12.2009, Бюл. № 34. 14 с.
- 28. Теплякова, Т.В. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов / Т.В. Теплякова, Л.Е. Булычев, Т.А. Косогова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. Т. 3, №113. С. 99–101.
- 29. Толстикова, Т.Г. Терпеноиды ряда лупана биологическая активность и фармокологические перспективы І. Природные производные лупана / Т.Г. Толстикова, И.В. Сорокина, Г.А. Толстиков [и др.] // Биоорган. химия. 2006. Т. 32, № 1. С. 42–55.
- 30. Федяева, А.В. Продукция активных форм кислорода и митохондриальный мембранный потенциал при температурном воздействии в клетках растений и дрожжей: дис. ... канд. биол. наук. Иркутск. 2015. 158 с.
- 31. Филиппова, Е.И. Экстракты базидиальных грибов подавляют репродукцию вируса гриппа птиц A(H5N1) в экспериментах *in vitro* и *in vivo* / Е.И. Филиппова, А.С. Кабанов, М.О. Скарнович и [и др.] // Соврем. пробл. науки и образ. 2013. № 5. URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=10250.
- 32. Филиппова, Е.И. Противовирусные свойства водных экстрактов, выделенных из высших базидиомицетов, в отношении пандемического вируса гриппа A(H1N1)2009 / Е.И. Филиппова, Н.А. Мазуркова, А.С. Кабанов [и др.] // Научное обозрение. Биологические науки. − 2014. − № 1. − С. 129–130.
- 33. Шараева, А.А. Влияние глицерина на рост и окислительную активность трутового гриба продуцента внеклеточных оксидоредуктаз / А.А. Шараева, Н.И. Петухова, Л.Х. Халимова [и др.] // Башкирский химический журнал. 2014. Т. 21, № 3. С. 17—20.

- 34. Шариков, А.М. Выраженнность бактерицидной активности гриба *Inonotus obliquus* Pilat в отношении *Francisella tularensis* линии 15 НИИЭ / А.М. Шариков, Н.В. Пашенова, И.А.Новицкий // Сиб. мед. обозрение. 2008. № 1(49) С. 19–21.
- 35. Шариков, А.М. Изучение антибиотической активности метаболитов гриба *Inonotus obliquus* Pilat в отношении штамма *Mycobacterium smegmatis* / А.М. Шариков, Н.В. Пашенова, В.Т. Манчук // Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН. 2011. № 1. С. 252–254.
- 36. Шибнев, В.А. Противовирусное действие водных экстрактов березового гриба *Inonotus obliquus* на вирус иммунодефицита человека / В.А. Шибнев Т.М. Гараев, М.П. Финогенов и [и др.] // Вопр. вирусологии. 2015. № 2. С. 37–40.
- 37. Цыренова, Д. 3. Иммуномодулирующая активность экстракта сухого из клубней *Phlomoides tuberosa* (L.) Moench при экспериментальной иммуносупрессии: дис. ... канд. мед. наук: 14.03.06 / Цыренова Дарима Золтоевна. Улан-Удэ, 2017. 133 с.
- 38. Якимов, П.А. Общая биологическая и химическая характеристика чаги как исходного сырья для получения лечебных препаратов / Якимов П.А. // Чага и ее лечебное применение при раке IV стадии. Л.: Медгиз, 1959. С. 36–48.
- 39. Arata, S. Continuous intake of the Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) aqueous extract suppresses cancer progression and maintains body temperature in mice / S. Arata, J. Watanabe, M. Maeda [et al.] // Heliyon. 2016 Vol. 2, I. 5. P. 1–16.
- 40. Arunachalam, S. Davallialactone protects against adriamycin-induced cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo* / S. Arunachalam, S.Y. Kim, S.H. Lee [et al.] // J. Nat. Med. 2012. Vol. 66, I. 1. P. 149–157.
- 41. Asker, M.M.S. Structural characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide isolated from Brevibacterium otitidis BTS 44 /

- M.M.S. Asker, B.T. Shawky // Food Chem. 2010. Vol. 123, I. 2. P. 315–320.
- 42. Awadh, Ali N.A. Antiviral activity of *Inonotus hispidus* / N.A.Awadh Ali, R.A.A. Mothana, A. Lesnau, [et al.] // Fitoterapia. 2003. Vol. 74. P. 483–485.
- 43. Aydinoglu, T. Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate / T. Aydinoglu, S. Sargin // Bioprocess Biosyst. Eng. 2013. Vol. 36, N 2. P. 215–22.
- 44. Babitskay, V.G. Melanin complex from medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilat (Chaga) (Aphyllophoromycetideae) / V.G. Babitskay, V.V. Scherba, N.V. Ikonnikova [et al.] // Int. J. Med. Mushrooms. 2002. Vol. 4, I. 2. P. 139–145.
- 45. Balandaykin, M.E. Review on Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Higher Basidiomycetes): realm of medicinal applications and approaches on estimating its resource potential / M.E. Balandaykin, I.V. Zmitrovich // Int. J. Med. Mushrooms. 2015. Vol. 17, I. 2. P. 95–104.
- 46. Betina, V. Changes in the lipid composition during the photo-induced conidiation of *Trichoderma viride* / V. Betina, V. Koman // Folia Microbiol. 1980. Vol. 25. P. 295–300.
- 47. Benarous, K. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: *In silico* and *in vitro* studies / K. Benarous, I. Bombarda, I. Moraleda [et al.] // Bioorg. Chem. 2015. Vol. 62. P. 1–7.
- 48. Bisoli, E. Bioactive pentacyclic triterpenes from the stems of *Combretum laxum* / E. Bisoli, W.S. Garcez, L. Hamerski [et al.] // Molecules. 2008. Vol. 13. P. 2717–2728.
- 49. Bligh, E.G. A rapid method of total lipid extraction and purification / E.G. Bligh, W.J. Dyer // Canad. J. Biochem. Physiol. 1959. Vol.37. P. 911–919.

- 50. Brody, S. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: effects of unsaturated fatty acids / S. Brody, S.A. Martins // J. Bacteriol. 1979. Vol. 137, N 2. P. 912–915.
- 51. Burczyk, J. Antimitotic activity of aqueous extracts of *Inonotus obliquus* / J. Burczyk, A. Gawron, M. Slotwinska [et al.] // Boll. Chim. Farm. 1996. Vol. 135. P. 306–309.
- 52. Chen, C.F. Submerged fermentation conditions for synthesis of extracellular polysaccharide by *Inonotus obliquus* / C.F. Chen, X.Y. Xiang, Q. Gu [et al.] // Chin. Trad. Herb. Drugs. 2007. Vol. 19. P. 358–361.
- 53. Chen, C. Aqueous Extract of *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat (Hymenochaetaceae) significantly inhibits the growth of sarcoma 180 by inducing apoptosis / C. Chen, W. Zheng, X. Gao [et al.] // Am. J. Pharm. Toxicol. 2007a. Vol. 2, I. 1. P. 10–17.
- 54. Chen, H. Acute toxicity evaluation and compositional analysis of a polysaccharide from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus* / H. Chen, L. Fu, P. Dong [et al.] // 3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering (ICBBE 2009). Beijing, China, 2009. P. 1–4.
- 55. Chen, H.P. Four new sesquiterpenoids from fruiting bodies of the fungus *Inonotus rickii* / H.P. Chen, W.B. Dong, T. Feng [et al.] // J. Asian Nat. Prod. Res. 2014. Vol. 16, I. 6. 581–586.
- 56. Chen, W. Hispidin derived from *Phellinus linteus* affords protection against acrylamide-induced oxidative stress in Caco-2 cells / W. Chen, Y. Shen, H. Su [et al.] / Chem. Biol. Interact. 2014a. Vol. 219. P.83–89.
- 57. Chen, Y. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum* / Y. Chen, M.Y. Xie, S.P. Nie [et al.] // Food Chem. 2008. Vol. 107, I. 1. P. 231–241.
- 58. Chen, Y. Optimization of ultrasonic/microwave assisted extraction (UMAE) of polysaccharides from *Inonotus obliquus* and evaluation of its anti-tumor activities / Y. Chen, X. Gu, S. Huangc [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. 2010. Vol. 46. P. 429–435.

- 59. Chen, Y. Purification, characterization and biological activity of a novel polysaccharide from *Inonotus obliquus* / Y. Chen, Y. Huang, Z. Cui [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. 2015. Vol. 79. P. 587–594.
- 60. Chou, Y.J. Renal protective effects of low molecular weight of *Inonotus obliquus* polysaccharide (LIOP) on HFD/STZ-induced nephropathy in mice / Y.J. Chou, W.C. Kan, C.M. Chang [et al.] // Int. J. Mol. Sci. 2016. Vol. 17, I. 9. P.1535.
- 61. Christie, W.W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis / W.W. Christie // Advances in lipid methodology. 1993. Vol. 2. №. 69. P. 69–111.
- 62. Cote, G.G. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: a clock mutant, prd-l, is altered in membrane fatty acid composition / G.G. Cote, S. Brody // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 904. P. 131–139.
- 63. Cui, H.S. Effects of the *Fuscoporia obiliqua* polysaccharide on experimental hyperlipemia in rats / H.S. Cui, G. Jin // J. Med. Sci. Yanbian Univ. 2007. Vol. 3. P. 173–174.
- 64. Cui, Y. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus* / Y. Cui, D.S. Kim, K.C. Park // J. Ethnopharmacol. 2005. Vol. 96. P. 79–85.
- 65. Cunningham, A.J. A Method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells / A.J. Cunningham // Nature. 1965. Vol. 207, I. 5001. P. 1106–1107.
- 66. Debnath, T. Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of *Inonotus obliquus* and germinated brown rice extracts / T. Debnath, S.R. Park, D.H. Kim [et al.] // Molecules. 2013. Vol.18, I. 8. P. 9293–9304.
- 67. Dias, J.R. ¹³C nuclear magnetic resonance data of lanosterol derivatives-profiling the steric topology of the steroid skeleton via substituent effects on its ¹³C NMR / J.R. Dias, H. Gao // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 2009. Vol. 74, I. 5. P. 1064–1071.

- 68. Ding, H. Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare* / H. Ding, T. Chou, C. Liang // Food Chem. 2010. Vol. 123, I. 2. P. 254–262.
- 69. Du, D. Rapid isolation and purification of inotodiol and trametenolic acid from *Inonotus obliquus* by high-speed counter-current chromatography with evaporative light scatting detection / D. Du, F. Zhu, X. Chen [et al.] // J. Phytochem. Anal. 2011. Vol. 22, I. 5. P. 419–423.
- 70. Du, X.J. Chemical analysis and antioxidant activity of polysaccharides extracted from *Inonotus obliquus* sclerotia / X.J. Du, H.M. Mu, S. Zhou [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. 2013. Vol.62. P. 691–696.
- 71. Fan, L. Advances in mushroom research in the last decade / L. Fan, H. Pan, A.T. Soccol [et al.] // Food Technol. Biotechnol. 2006. Vol. 44. P. 303–311.
- 72. Fan, L. Antitumor and immunomodulatory activity of water-soluble polysaccharide from *Inonotus obliquus* / L. Fan, S. Ding, L. Ai [et al.] // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 90, I. 2. P. 870–874.
- 73. Feng, Y. A novel one-step microbial transformation of betulin to betulinic acid catalysed by *Cunninghamella blakesleeana* / Y. Feng, M. Li, J. Liu [et al.] // Food Chem. 2013. Vol. 136, I. 1. P. 73–79.
- 74. Ferreira, R. Microwave assisted extraction of betulin from birch outer bark / R. Ferreira, H. Garcia, A.F. Sousa [et al.] // RSC Adv. 2013. Vol. 3. P. 21285–21288.
- 75. Edwards, R.L. Constituents of the higher fungi. Part I. Hispidin, a new 4-hydroxy-6-styryl-2-pyrone from *Polyporus hispidus* (Bull.) Fr. / R.L. Edwards, D.G. Lewis, D.V. Wilson // J. Chem. Soc. 1961. P. 4995–5002.
- 76. Ellis, R.J. Properties of the blue light requirements for primordia initiation and basidiocarp maturation in *Coprinus stercorarius* / R.J. Ellis, G.A. Bragdon, B.J. Schlosser // Mycol. Res. 1999. Vol. 103, I. 6, P. 779–784.
- 77. Fiasson, J.L. Uber die farb und fluoreszenzst off des Grunblattrigen Schwefelkopfes (*Hypholoma fasciculare*, Agaricales) / J.L. Fiasson, K.

- Gluchoff-Fiasson, W. Steglich // Chem. Ber. 1977. Vol. 110, I. 3. P. 1047–1057.
- 78. Fiasson, J.L. Distribution of styrylpyrones in the basidiocarps of various Hymenochaetaceae / J.L. Fiasson // Biochem. Syst. Ecol. 1982. V. 10, I. 4. P. 289–296.
- 79. Gao, X.L. Study on antioxidant effect of *Inonotus oblique* polyphenol on edible oil / X.L. Gao, Y.J. Gao, J.G. Li [et al.] // Sci. Technol. Food Ind. 2008. Vol. 1. P. 135–137.
- 80. Gery, A. Chaga (*Inonotus obliquus*), a future potential medicinal fungus in oncology? A chemical study and a comparison of the cytotoxicity against human lung adenocarcinoma cells (A549) and human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) / A. Gery, C. Dubreule, V. Andre [et al.] // Integr. Cancer Ther. 2018. doi: 10.1177/1534735418757912.
- 81. Gilbertson, R.L. Wood-Rotting Fungi of North America / R.L. Gilbertson // Mycologia. 1980. Vol. 72, N 1. P. 1–49.
- 82. Glamoclija, J. Chemical characterization and biological activity of Chaga (*Inonotus obliquus*), a medicinal "mushroom" / J. Glamoclija, A. Ciric, M. Nikolic [et al.] // J. Ethnopharmacol. 2015. Vol. 162. P. 323–332.
- 83. Glukhova, L.B. Increased mycelial biomass production by *Lentinula edodes* intermittently illuminated by green light emitting diodes / L.B. Glukhova, L.O. Sokolyanskaya, E.V. Plotnikov [et al.] // Biotechnol. Lett. 2014. Vol. 36. P. 2283–2289.
- 84. Gornostai, T.G. Phenolic compounds of *Inonotus rheades* mycelium: RP-UPLC-DAD-ESI/MS profile and effect of light wavelength on the styrylpyrone content / T.G. Gornostai, G.G. Borovskii, N.I. Kashchenko [et al.] // Int. J. Med. Mushrooms. 2018. Vol. 20, I. 6. P. 637–645.
- 85. Gu, Y.H. Anti-tumor immunity and radioprotection effect of *Fuscoporia oblique* / Y.H. Gu, T. Yamashita, T. Maenaka [et al.] // Med. Bio. 2005. Vol. 149. P. 314–318.

- 86. Ham, S.S. Antimutagenic effects of subfractions of Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extract / S.S. Ham, S.H Kim, S.Y. Moon [et al.] // Mutat. Res. 2009. Vol. 672, I. 1. P. 55–59.
- 87. Han, J.J. Phaeolschidins A–E, five hispidin derivatives with antioxidant activity from the fruiting body of *Phaeolus schweinitzii* collected in the Tibetan Plateau / J.J. Han, L. Bao, L.W. He [et al.] // J. Nat. Prod. 2013. Vol. 76, I. 8. P. 1448–1453.
- 88. Handa, N. An unusual lanostane-type triterpenoid, spiroinonotsuoxodiol, and other triterpenoids from *Inonotus obliquus* / N. Handa, T. Yamada, R. Tanaka // Phytochemistry. 2010. Vol. 71, I. 14–15. P.1774–1779.
- 89. Handa, N. Four new lanostane-type triterpenoids from *Inonotus obliquus /* N. Handa, T. Yamada, R. Tanaka // Phytochemistry Letters. 2012. Vol. 5, I. 3. P. 480–485.
- 90. Hao, J. Effect of light quality on growth and polysaccharides content of *Ganoderma lucidum* / J. Hao, X. Chen, J. Lan // China J. Chinese Mat. Medica. 2010. Vol. 35, I. 17. P. 2242–2245.
- 91. He, J. Studies on chemical constituents of *Fuscoporia oblique* / J. He, X.Z. Feng // Chin. Trad. Herb. Drugs. 2001. Vol. 32. P. 4–6.
- 92. He, J. Three new triterpenoids from *Fuscoporia oblique* / J. He, X.Z. Feng, Y. Lu [et al.] // J. Asian Nat. Prod. Res. 2001. Vol. 3. P. 55–61.
- 93. Herrera-Estrella, A. Looking through the eyes of fungi: molecular genetics of photoreception / A. Herrera-Estrella, B.A. Horwitz // Mol. Microbiol. 2007. Vol. 64. P. 5–15.
- 94. Hu, H. Comparative study of antioxidant activity and antiproliferative effect of hot water and ethanol extracts from the mushroom *Inonotus obliquus* / H. Hu, Z. Zhang, Z. Lei [et al.] // J. Biosci. Bioeng. 2009 Vol. 107. P. 42–48.
- 95. Hui, J. Antioxidant activity of polysaccharides from *Inonotus obliquus* / J. Hui, Y.N. Song, X.J. Sun [et al.] // Acta Edulis Fungi. 2006. Vol. 13. P. 29–35.

- 96. Hu, S.H. Effect of light and atmosphere on the cultivation of the golden oyster culinary-medicinal mushroom, *Pleurotus citrinopileatus* (higher Basidiomycetes) / S.H. Hu, C.Y. Wu, Y.K. Chen [et al.] // Int. J. Med. Mushrooms. 2013. V. 15, I. 1. P. 101–111.
- 97. Hu, T. Isolation, purification and effects of hypoglycemic functional polysaccharides from *Inonotus obliquus* / T. Hu, P. Liu, Y. Ni [et al.] // African J. Biotechnol. 2012. Vol. 11, I. 30. P. 7738–7743.
- 98. Ichimura, T. Inhibition of HIV-1 protease by water-soluble lignin-like substance from an edible mushroom, *Fuscoporia oblique* / T. Ichimura, O. Watanabe, S. Maruyama // Biosci., Biotechnol., Biochem. 1998. Vol. 62. P. 575–577.
- 99. Jarosz, A. Effect of the extracts from fungus *Inonotus obliquus* on catalase level in HeLa and nocardia cells / A. Jarosz, M. Skorska, J. Rzymowska [et al.] // Acta Biochim. Pol. 1990. Vol.37. P. 149–151.
- 100. Ji, F. Analysis of constituents of volatile oil from *Inonotus obliquus* by GC/MS / F. Ji, W.F. Zheng, X.Y. Wei [et al.] // Lishizhen Med. Mater. Med. Res. 2007. Vol. 18. P. 2469–2470.
- 101. Jin, G. Studies on antitumor activities of *Fuscoporia obique* polysaccharide / G. Jin, E. Yang, Q. Jin [et al.] // J. Med. Sci. Yanbian Univ. 2004. Vol. 4. P. 257–259.
- 102. Jung, J.Y. Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotus xeranticus* and *Phellinus linteus* / J.Y. Jung, I.K. Lee, S.J. Seok // J. Appl. Microbiol. 2008 Vol. 104. P. 1824–1832.
- 103. Kahlos, K. 3β-Hydroxy-lanosta-8,24-dien-21-al, a new triterpene from *Inonotus obliquus* / K. Kahlos, M.V. Schantz, R. Hiltunen // Planta Med. 1984. Vol. 50. P. 197–198.
- 104. Kahlos, K. 3β,22-Dihydroxy-lanosta-8,24-dien-7-one, a new 7-keto compound from *Inonotus obliquus* / K. Kahlos // Acta Pharm. Fenn. 1986. Vol. 95. P. 113–117.

- 105. Kahlos, K. Two new oxygenated lanostane type triterpenes from *Inonotus obliquus* / K. Kahlos, R. Hiltunen // Acta Pharm. Fenn. 1986a. Vol. 95. P. 71–76.
- 106. Kahlos, K. 3β,22-Dihydroxylanosta-7,9(11),24-triene: a new, minor compound from *Inonotus obliquus* / K. Kahlos, R. Hiltunen // Planta Med. 1986b. Vol. 52. P. 495–496.
- 107. Kahlos, K. Antitumor activity of some compounds and fractions from an *n*-hexane extract of *Inonotus obliquus* / K. Kahlos, L. Kangas, R. Hiltunen // Acta Pharm. Fenn. 1987. Vol.96. P. 33–40.
- 108. Kahlos, K. Ergosterol peroxide, an active compound from *Inonotus radiates* / K. Kahlos, L. Kangas, R. Hiltunen // Planta Med. 1989. Vol. 55. P. 389–390.
- 109. Kahlos, K. Preliminary tests of antiviral activity of two *Inonotus obliquus* strains / K. Kahlos, A. Lesnau, W. Lange [et al.] // Fitoterapia 1996. Vol. 67. P. 344–347.
- 110. Kakkar, S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential / S. Kakkar, S. Bais // Pharmacology. 2014. Vol. 2014, P. 1-9.
- 111. Kalaras, M.D. Generation of potentially bioactive ergosterol-derived products following pulsed ultraviolet light exposure of mushrooms (*Agaricus bisporus*) / M.D. Kalaras, R.B. Beelman, M.F. Holick [et al.] // Food Chem. 2012. Vol. 135, I. 2. P. 396–401.
- 112. Kamra, D.N. Influence of gaseous phase, light and substrate pretreatment on fruit-body formation, lignin degradation and in vitro digestibility of wheat straw fermented with *Pleurotus spp.* / D.N. Kamra, F. Zadrazil // Agricultural Wastes. 1986. Vol. 18, I. 1, P.1–17.
- 113. Kang, J.H. Ergosterol peroxide from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) exhibits anti-cancer activity by down-regulation of the *β-catenin* pathway in colorectal cancer / J.H. Kang, J.E. Jang, S.K.J. Mishra [et al.] // Ethnopharmacol. 2015. Vol. 173. P. 303–12.

- 114. Kim, D.E. The protective effect of hispidin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through Akt/GSK-3β and ERK1/2 signaling pathway / D.E. Kim, B. Kim, H.S. Shin [et al.] // Exp. Cell Res. 2014. Vol. 327. P. 264–275.
- 115. Kim, D.H. The anticancer effect of *Inonotus obliquus* Pilat (Chaga) processed by nanomill technology *in vivo* / D.H. Kim, Y.C. Teng, Y.S. Yoon [et al.] // Korean J. Microscopy. 2009. Vol. 39. P. 125–132.
- 116. Kim, D.O. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals / D.O. Kim, K.W. Lee, H.J. Lee [et al.] // J. Agric. Food. Chem. 2002. Vol. 50, I. 13. P. 3713–3717.
- 117. Kim, D.S. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data / D.S. Kim, N. Baek, S.R. Oh [et al.] // Arch. Pharmacal Res. 1997. Vol. 20. P. 201–205.
- 118. Kim, H.G. Ethanol extract of *Inonotus obliquus* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells / H.G. Kim, D.H. Yoon, C.H. Kim [et al.] // J. Med. Food. 2007. Vol. 10. P. 80–89.
- 119. Kim, J.P. Inoscavin A, a new free radical scavenger from the mushroom *Inonotus xeranticus* / J.P. Kim, B.S. Yun, Y.K. Shim [et al.] // Tetrahedron Lett. 1999. Vol. 40. P. 6643–6644.
- 120. Kim, M.Y. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea / M.Y. Kim, P. Seguin, J.K. Ahn [et al.] // J. Agric. Food Chem. 2008. Vol. 56. P. 7265–7270.
- 121. Kim, Y.O. Anti-cancer effect and structural characterization of endopolysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*/ Y.O. Kim, H.W. Park, J.H. Kim [et al.] // Life Sciences. 2006. Vol.79. P. 72–80.
- 122. Kim, Y.J. Chemical constituents from the sclerotia of *Inonotus obliquus* / Y.J. Kim, J. Park, B.S. Min [et al.] // J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 2011. Vol. 54, I. 2. P. 287–294.

- 123. Kim, Y.R. Immunomodulatory activity of the water extract from medicinal mushroom *Inonotus obliquus* / Y.R. Kim // Mycobiology. 2005. Vol. 33, I. 3. P. 158–162.
- 124. Klaar, M. Pilzpigmente, XXVII. Isolierung von hispidin und 3,14′-bihispidinyl aus *Phellinus pomaceus* (Poriales) / M. Klaar, W. Steglich // Chem. Ber. 1977. Vol. 110, I. 3. P. 1058–1062.
- 125. Ko, J.A. Effect of UV-B exposure on the concentration of vitamin D2 in sliced shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) and white button mushroom (*Agaricus bisporus*) / J.A. Ko, B.H. Lee, J.S. Lee [et al.] // J. Agric. Food Chem. 2008. Vol. 56, I. 10. P. 3671–3674.
- 126. Koroljova-Skorobogat'ko, O.V. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis / O.V. Koroljova-Skorobogat'ko, E.V. Stepanova, V.P. Gavrilova [et al.] // Biotechnol. Appl. Biochem. 1998. Vol. 28. P. 47–54.
- 127. Koukalova, B. Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress / B. Koukalova, A. Kovarik, J. Fajkus [et al.] // FEBS Lett. 1997. Vol. 414. P. 289–292.
- 128. Koyama, T. Cardiovascular effects produced by a traditional fungal medicine, *Fuscoporia obliqua* extract, and microvessels in the left ventricular wall of stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP) / T. Koyama, A. Taka, H. Togashi // Clin. Hemorheol. Microcirc. 2006. Vol. 35. P. 491–498.
- 129. Kukulyanskaya, T.A. Physicochemical properties of melanins produced by the sterile form of *Inonotus obliquus* ("Chagi") in natural and cultivated fungus / T.A. Kukulyanskaya, N.V. Kurchenko, V.P. Kurchenko [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. 2002. Vol. 38, I. 1. P. 58–61.
- 130. Lee, I.K. Hispidin analogs from the mushroom *Inonotus xeranticus* and their free radical scavenging activity / I.K. Lee, B.S. Yun // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006. Vol.16. P. 2376–2379.

- 131. Lee, I.K. Hispidin derivatives from the mushroom *Inonotus xeranticus* and their antioxidant activity / I.K. Lee, S.J. Seok, W.K. Kim [et al.] // J. Nat. Prod. 2006. Vol. 69. P. 299–301.
- 132. Lee, I.K. Free radical scavengers from the medicinal mushroom *Inonotus xeranticus* and their proposed biogenesis / I.K. Lee, J.Y. Jung, S.J. Seok [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006. Vol. 16, I. 21. P. 5621–5624.
- 133. Lee, I.K. Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms *Inonotus* and *Phellinus* / I.K. Lee, B.S. Yun // Bioorg. Med. Chem. 2007. Vol. 15. P. 3309–3314.
- 134. Lee, I.K. Inoscavin E, a free radical scavenger from the fruiting bodies of *Inonotus xeranticus* / I.K. Lee, Y.S. Kim, S.J. Seok [et al.] // J. Antibiot. 2007. Vol. 60, I. 12. P. 745–747.
- 135. Lee, I.K. New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus* / I.K. Lee, Y.S. Kim, Y.W. Jang [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007. Vol. 17. P. 6678–6681.
- 136. Lee, I.K. Phellinins A1 and A2, new styrylpyrones from the culture broth of *Phellinus* sp. KACC93057P: I. Fermentation, taxonomy, isolation and biological properties / I.K. Lee, G.S Seo, N.B Jeon [et al.] // J Antibiot. 2009a. Vol. 62, I. 11. P. 631–634.
- 137. Lee, I.K. Phellinins A1 and A2, new styrylpyrones from the culture broth of *Phellinus* sp. KACC93057P: II. Physicochemical properties and structure elucidation / I.K. Lee, J.Y. Jung, Y.S. Kim, [et al.] // J. Antibiot. 2009b. Vol. 62, I. 11. P. 631–634.
- 138. Lee, I.K. Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance / I.K. Lee, B. S. Yun // J. Antibiot. 2011. Vol. 64, N 5. P. 349–359.
- 139. Lee, J.H. Hispidin isolated from *Phellinus linteus* protects against hydrogen peroxide–induced oxidative stress in pancreatic MIN6N b-cells / J.H. Lee,

- J.S. Lee, Y.R. Kim [et al.] // J. Med. Food. 2011. Vol.14, I. 11. P. 1431–1438.
- 140. Lee, J.H. Insulin-sensitizing and beneficial lipid-metabolic effects of the water-soluble melanin complex extracted from *Inonotus obliquus* / J.H. Lee, C.K. Hyun // Phytother. Res. 2014. Vol. 28, I. 9. P. 1320–1328.
- 141. Lee, K.D. Eco-friendly synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) using *Inonotus obliquus* and their antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities / K.D. Lee, P.C. Nagajyothi, T.V.M.Sreekanth [et al.] // J. Ind. Eng. Chem. 2015. Vol. 26. P. 67–72.
- 142. Lee, Y. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars / Y. Lee, L.R. Howard, B. Villalon // J. Food Sci. 1995. Vol. 60, I. 3. P. 473–476.
- 143. Lee, S.R. Effect of light and reductones on differentiation of *Pleurotus ostreatus* / S.R. Lee, W.J. Joo, Y.U. Baek [et al.] // J. Microbiol. 2011. V. 49, I. 1. P. 71–77.
- 144. Lee, Y.G. Src kinase-targeted anti-inflammatory activity of davallialactone from *Inonotus xeranticus* in lipopolysaccharide-activated RAW264.7 cells / Y.G. Lee, W.M. Lee, J.Y. Kim [et al.] // Br. J. Pharmacol. 2008. –Vol. 154, I. 4. P. 852–863.
- 145. Li, W.Z. Radical scavenging activity of extracts from fermentation broth of *Inonotus obliquus* and the fermentation condition optimization / W.Z. Li, F.L. Hu, X.S. Wan [et al.] // J. Biol. 2006. Vol. 4. P. 22–25.
- 146. Li, Y. Inotodiol protects PC12 cells against injury induced by oxygen and glucose deprivation/restoration through inhibiting oxidative stress and apoptosis / Y. Li, W. Zhang, C. Chen [et al.] // J. App. Biomed. 2017. https://doi.org/10.1016/j.jab.2017.11.004.
- 147. Liang, L. Antioxidant activities of extracts and subfractions from *Inonotus obliquus* / L. Liang, Z. Zhang, H. Wang // Int. J. Food Sci. Nutr. 2009. Vol. 60(S2). P. 175–184.

- 148. Liang, L.Y. Study on extracting technology of antioxidant bio-active components from *Inonotus obliquus* / L.Y. Liang, Z.S. Zhang, C. Lu [et al.] // Food Res. Devel. 2009a. Vol. 4. P. 32–35.
- 149. Liang, L.Y. Study on antioxidant activity and extraction separation of ethanol crude extracts from *Inonotus obliquus* / L.Y. Liang, Z.S. Zhang, W. Sun [et al.] // J. North Univ. China. 2009b. Vol. 2. P. 153–158.
- 150. Liu, C. Chemical constituents from Inonotus obliquus and their biological activities / C. Liu, C. Zhao, H.H. Pan [et al.] // J. Nat. Prod. 2014. Vol. 77, I. 1. P. 35–41.
- 151. Liu, J. Biotransformation optimization of betulin into betulinic acid production catalysed by cultured *Armillaria luteo-virens* Sacc ZJUQH100-6 cells / J. Liu, M.L. Fu, Q.H. Chen // J. Appl. Microbiol. 2011. Vol. 110, I. 1. P. 90–97.
- 152. Liu, M. Chemical constituents of the ethyl acetate extract of *Belamcanda chinensis* (L.) DC roots and their antitumor activities / M. Liu, S. Yang, L. Jin [et al.] // Molecules. 2012. Vol. 17. P. 6156–6169.
- 153. Liu, Y.Q. Antibacterial activity of different extracts from sclerote of *Inonotus obliquus* on bacteria / Y.Q. Liu, H.X. Xiong, H.Y. Bao [et al.] // Edible Fungi China. 2009. Vol. 20. P. 31–35.
- 154. Lu, X. Phytochemical characteristics and hypoglycaemic activity of fraction from mushroom *Inonotus obliquus* / X. Lu, H. Chen, P. Dong [et al.] // J. Sci. Food Agric. 2010. Vol. 90. P. 276–280.
- 155. Lu, X.M. Studies on the antioxidant activities and glycosidase inhibitory effects of different extracts from *Inonotus obliquus* / X.M. Lu, H.X. Chen, Z.S. Qu [et al.] // Nat. Prod. Res. Devel. 2009. Vol. 21, I. 1. P. 132–135.
- 156. Lyons, J.M. Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plant / J.M. Lyons, T.A. Wheaton, H.K. Pratt // Plant Physiol. 1964. Vol.39. P.262–268.

- 157. Ma, L. Chemical modification and antioxidant activities of polysaccharides from mushroom Inonotus obliquus / L. Ma, H. Chen, Y. Zhang [et al.] // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 89. P. 371–378.
- 158. Ma, L. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus* / L. Ma , H. Chen, P. Dong, [et al.] // Food Chem. 2013. Vol. 139, I. (1-4). P. 503–8.
- 159. Ma, L. Effect of different drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides extracted from mushroom *Inonotus obliquus* / L. Ma, H. Chen, W. Zhu [et al.] // Food Res. Int. 2013. Vol. 50. P. 633–640.
- 160. Macias, F.A. Potential allelopathic lupane triterpenes from bioactive fractions of melilotus messanensis // F.A. Macias, A.M. Simonet, M.D. Esteban // Phytochemistry. 1994. Vol. 36. P. 1369–1379.
- 161. Maenaka, T. Effects of *Fuscoporia obliqua* on postprandial glucose excursion and endothelial dysfunction in type 2 diabetic patients / T. Maenaka, M. Oshima, Y. Itokawa [et al.] // J. Trad. Chin. Med. 2008. Vol. 28, I. 1. P. 49–57.
- 162. Manachere, G. Research on the fruiting rhythm of a basidiomycete mushroom *Coprinus congregatus* Bull. Ex Fr. / G. Manachere // J. Interdisc. Cycle Res. 1971. –Vol. 2, I. 2. P. 199–209.
- 163. Mazurkiewicz, W. Analysis of aqueous extract of Inonotus obliquus // W. Mazurkiewicz / Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research. 2006. Vol. 63, N 6 P. 497–501.
- 164. Mei, X.L. Light quality regulation of growth and endogenous IAA metabolism of *Ganoderma lucidum* mycelium / X.L. Mei, Z. Zhao, X.D. Chen [et al.] // China J. Chin. Mater. Med. 2013. Vol. 12. P. 1887–1892.
- 165. Melnikova, N.A Practical synthesis of betulonic acid using selective oxidation of betulin on aluminium solid support / N. Melnikova, I. Burlova, T. Kiseleva [et al.] // Molecules. 2012. Vol. 17, I 10. P. 11849–11863.

- 166. Membrillo, I. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse / I. Membrillo, C. Sanchez, M. Meneses [et al.] // Bioresour. Technol. 2011. Vol.102, I. 2. P. 1581–1586.
- 167. Michaelsen T.E. Human IgG subclass pattern of inducing complement mediated cytolysis depends on antigen concentration and to a lesser extent on epitope patchiness, antibody affinity and complement concentration / T.E. Michaelsen, P. Garred, A. Aase // Eur. J. Immunol. 1991. Vol. 221. P. 11–16.
- 168. Mitropolskaya, N.Y. Melanin complex from medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pilat (Chaga) (Aphyllophoromycetidae) / N.Y. Mitropolskaya, N.A. Bisko, V.G. Babitskaya [et al.] // Int. J. Med. Mushrooms. 2002. Vol. 4, I. 2. P. 139–145.
- 169. Mizuno, T. Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pil. (Aphyllophoromycetideae) / T. Mizuno, C. Zhuang, K. Abe [et al.] // Int. J. Med. Mushrooms. 1999. Vol. 1, I. 4. P. 301–316.
- 170. Mo, S. Phelligridins C-F: cytotoxic pyrano[4,3-c][2]benzopyran-1,6-dione and furo[3,2-c]pyran-4-one derivatives from the fungus *Phellinus igniarius* / S. Mo, S. Wang, G. Zhou [et al.] // J. Nat. Prod. 2004. Vol. 67. P. 823–828.
- 171. Mo, S.Y. Two pyrone derivatives from fungus *Phellinus igniarius* / S.Y. Mo, Y. C. Yang, W. Y. He [et al.] // Chin. Chem. Lett. 2003. Vol. 14. P. 704–706.
- 172. Mouffok, S. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. / S. Mouffok, H. Haba, C. Lavaud [et al.] // Rec. Nat. Prod. 2012. Vol. 6, I. 3. P. 292–295.
- 173. Mullauer, F.B. Betulinic Acid Induced Tumor Killing / F.B. Mullauer // 2011 p. 155.

- 174. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // Physiol. plantarum. 1962. Vol. 15. P. 473–497.
- 175. Nagajyothi, P.C. Mycosynthesis: Antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of silver nanoparticles synthesized from *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom) extract / P.C. Nagajyothi, T.V.M. Sreekanth, J. Lee [et al.] // J. Photochem. Photobiol., B. 2014. Vol. 130. P. 299–304.
- 176. Nahla, A. Volatile constituents of the medicinal fungus Chaga *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilat (Aphyllophoromycetideae) / A. Nahla, L. Dennis, S. Wulf // Int. J. Med. Mushrooms. 2009. Vol. 11, I. 1. P. 55–60.
- 177. Nakajima, Y. Antioxidant small phenolic ingredients of *Inonotus obliquus* (persoon) Pilat (Chaga) / Y. Nakajima, Y. Sato, T. Konishi // Chem. Pharm. Bull. 2007. Vol. 58. P. 1222–1226.
- 178. Nakajima, Y. Prevention of hydrogen peroxide-induced oxidative stress in PC12 cells by 3,4-dihydroxybenzalacetone isolated from Chaga (Inonotus obliquus (persoon) Pilat) / Y. Nakajima, H. Nishida, Y. Nakamura // Free Radical Biol. Med. 2009. Vol. 47, I. 8. P. 1154–1161.
- 179. Nakamura, S. Absolute stereostructures of inoterpenes A–F from sclerotia of *Inonotus obliquus* / S. Nakamura, J. Iwami, H. Matsuda [et al.] // Tetrahedron.
 2009. Vol. 65. P. 2443–2450.
- 180. Nakano, Y. Identification of blue-light photoresponse genes in oyster mushroom mycelia / Y. Nakano, H. Fujii, M. Kojima // Biosci., Biotechnol., Biochem. 2010. Vol. 74, I. 10. P. 2160–2165.
- 181. Nakata, T. Structure determination of inonotsuoxides A and B and in vivo anti-tumor promoting activity of inotodiol from the sclerotia of *Inonotus obliquus* / T. Nakataa, T. Yamadaa, S. Tajia [et al.] // Bioorg. Med. Chem. 2007. Vol. 15, I. 1. P. 257–264.
- 182. Nakata, T. New lanostane triterpenoids, inonotsutriols D, and E from *Inonotus obliquus* / T. Nakata, S. Taji, T. Yamada [et al.] // Bulletin of Osaka University of Pharmaceutical Sciences. 2009. Vol. 3. P. 54–64.

- 183. Namba, K. Effects of LED lights on fruiting-body production in *Hypsizigus marmoreus* / K. Namba, S. Inatomi, K. Mori [et al.] // Mushroom Sci. Biotechnol. 2002. Vol. 10. P. 141–146.
- 184. Nambudir, A.M.D. Effect of light on enzymes of phenylpropanoid metabolism and hispidin biosynthesis in *Polyporus hispidus* / A.M.D. Nambudir, C.P. Vance, G.H.N. Towers // Biochem. J. 1973. Vol. 134, I. 4. P. 891–897.
- 185. Niu, H. Investigation of three lignin complexes with antioxidant and immunological capacities from *Inonotus obliquus* / H. Niu, D. Song, H. Mu [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. 2016. Vol. 86. P. 587–593.
- 186. Nomura, M. Inotodiol, a lanostane triterpenoid, from *Inonotus obliquus* inhibits cell proliferation through caspase-3-dependent apoptosis / M. Nomura, T. Takahashi, A. Uesugi [et al.] // Anticancer Res. 2008. Vol. 28. P. 2691–2696.
- 187. Olennikov, D.N. Water-soluble endopolysaccharides from the fruiting bodies of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr. / D.N. Olennikov, S.V. Agafonova, G.B. Borovskii [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. 2009. Vol. 45. I. 5. P. 536–543.
- 188. Olennikov, D.N. Physicochemical properties and antioxidant activity of melanin fractions from *Inonotus obliquus* sclerotia / D.N. Olennikov, L.M. Tankhaeva, A.V. Rokhin [et al.] // Chem. Nat. Comp. – 2012. – Vol.48, I. 3. – P. 396–403.
- 189. Olennikov, D.N. Rheadinin, a new bis(styrylpyrone) from mycelium of Inonotus rheades / D.N. Olennikov, T.G. Gornostai, T.A. Penzina // Chem. Nat. Comp. – 2017. – Vol. 53, N 4. – P. 629–631.
- 190. Olennikov, D.N. Lupane triterpenoids and sterols from *Inonotus rheades* mycelium and its antiglycosidase activity / Olennikov D.N., Gornostay T.G., Penzina T.A. [et al.] // Chem. Nat. Comp. 2017. Vol. 53, N 5. P. 841–842.

- 191. Pan, H.H. Aqueous extract from a chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher Basidiomyetes), prevents herpes simplex virus entry through inhibition of viral-induced membrane fusion / H.H. Pan, X.T. Yu, T. Li [et al.] // Int. J. .Med. Mushrooms. 2013. Vol. 15, I. 1. P. 29–38.
- 192. Park, J.R. Reversal of the TPA-induced inhibition of gap junctional intercellular communication by Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) extracts: Effects on MAP kinases / J.R. Park, J.S. Park, E.H. Jo [et al.] // BioFactors. 2006. Vol. 27. P. 147–155.
- 193. Park, Y.K. Chaga mushroom extract inhibits oxidative DNA damage in human lymphocytes as assessed by comet assay / Y.K. Park, H.B. Lee, E. J. Jeon [et al.] // BioFactors. 2004. Vol. 21. P. 109–112.
- 194. Park, Y.M. In vivo and in vitro anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus* / Y.M. Park, J.H. Wona, Y.H. Kim // J. Ethnopharmacol. 2005. Vol. 101, I. 1. –3. P. 120–128.
- 195. Paszkowska J. Synthesis and biological evaluation of 5'-glycyl derivatives of uridine as inhibitors of 1,4-β-galactosyltransferase / J. Paszkowska, K. Kral, T. Bieg [et al.] // Bioorg. Chem. 2015. Vol. 58. P. 18–25.
- 196. Pazarlioglu, N.K. Batch production of Pyranose 2-oxidase from *Trametes versicolor* (ATCC 11235) in medium with a lignocellulosic substrate and enzymatic bleaching of cotton fabrics / N.K. Pazarlioglu, E.Erden, M.C. Ucar [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. 2012. Vol. 28, I. 4. P.1523–1531.
- 197. Perrin, P.W. Hispidin biosynthesis in cultures of *Polyporus hispidus* / P.W. Perrin, G.H.N. Towers // Phytochemistry. 1973. Vol.12, I. 3. P. 589–592.
- 198. Poyedinok, N.L. Light regulation of growth and biosynthetic activity of ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae), in pure culture / N.L. Poyedinok, O.B. Mykhailova, V.V. Shcherba [et al.] // Int. J. Med. Mushrooms. 2008. Vol. 10, I. 4. P. 369–377.

- 199. Poyedinok, N. Effect of light wavelengths and coherence on growth, enzymes activity, and melanin accumulation of liquid-cultured *Inonotus obliquus* (Ach.:Pers.) Pilat / N. Poyedinok, O. Mykhaylova, T. Tugay [et al.] // Appl. Biochem. Biotechnol. 2015. Vol. 176. P. 333–343.
- 200. Pozdnyakova, N. Versatile peroxidase of *Bjerkandera fumosa*: Substrate and inhibitor specificity / N. Pozdnyakova, O. Makarov, M. Chernyshova [et al.] // Enzyme Microb. Technol. 2013. Vol. 52, I. 1. P. 44–53.
- 201. Preito, P. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E / P. Preito, M. Pineda, M. Aguilar // Anal. Biochem. 1999. Vol. 269. P. 337–341.
- 202. Purschwitz, J. Seeing the rainbow: light sensing in fungi / J. Purschwitz, S. Müller, C. Kastner [et al.] // Curr. Opin. Microbiol. 2006. Vol. 9, I. 6. P. 566–71.
- 203. Purtov, K.V. Cover picture: the chemical basis of fungal bioluminescence / K.V. Purtov, V.N. Petushkov, M.S. Baranov [et al.] // Angew. Chem. Int. Ed. 2015. Vol. 54, I. 28. P. 8124.
- 204. Purtov, K.V. The chemical basis of fungal bioluminescence / K.V. Purtov, V.N. Petushkov, M. S. Baranov [et al.] // Angew. Chem. Int. Ed. 2015. Vol. 127, I. 28. P. 8242–8246.
- 205. Richardson, L.T. A simple culture tube closure method or prevent ion of contamination by air-borne fungi and mites / L.T. Richardson // Phytopathology. 1975. Vol. 65, I. 7. P. 833–834.
- 206. Roberts, J.S. Vitamin D2 formation from post-harvest UV-B treatment of mushrooms (*Agaricus bisporus*) and retention during storage / J.S. Roberts, A. Teichert, T.H. McHugh // J. Agric. Food. Chem. 2008. Vol. 56, I. 12. P. 4541–4544.
- 207. Roeder, P.E. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: oscillations in fatty acids / P.E. Roeder, M.L. Sargent, S. Brody // Biochemistry. 1982. Vol. 21, I.20. –P. 4909–4916.

- 208. Ryvarden, L. European Polypores Part 1 / L. Ryvarden, R.L. Gilbertson // Synopsis Fungorum. Vol. 6. Norway: Grønlands Grafiske A/S, 1993. p. 387.
- 209. Samuelsen, A.B. Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. / A.B. Samuelsen, I.L. Jalil, M. Djahromi [et al.] // Carbohydrate Polymers. 1999. Vol. 38, N. 2. P. 133–143.
- 210. Singh, S.B. Isolation, structure, and HIV-1-integrase inhibitory activity of structurally diverse fungal metabolites / S.B. Singh, H. Jayasuriya, R. Dewey [et al.] // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2003. Vol. 30. P. 721–731.
- 211. Shibnev, V.A. Antiviral activity of *Inonotus obliquus* fungus extract towards infection caused by hepatitis C virus in cell cultures / V.A. Shibnev, D.V. Mishin, T.M. Garaev // Bull. Exp. Biol. Med. 2011. Vol. 151, I. 5. P. 549–551.
- 212. Shin, K.S. Production of anti-complementary exopolysaccharides from submerged culture of *Flammulina velutipes* / K.S. Shin, K.W. Yu, H.K. Lee [et al.] // Food Technol. Biotechnol. 2007. Vol. 45. P. 319–326.
- 213. Shin, Y. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* I: a new triterpene, 3β-hydroxy-8,24-dien-lanosta-21,23-lactone from sclerotium / Y. Shin, Y. Tamai, M. Terazawa // Eurasian J. For. Res. 2000. Vol. 1. P. 43–50.
- 214. Shin, Y. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* II: a new triterpene, 21,24-cyclopentalanosta-3β,21,25-triol-8-ene from sclerotium / Y. Shin, Y. Tamai, M. Terazawa // J. Wood Sci. 2001a. Vol. 47. P. 313–316.
- 215. Shin, Y. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* III: A new triterpene, 3β,22,25-trihydroxylanosta-8-ene from screrotia / Y. Shin, Y. Tamai, M. Terazawa // Int. J. Med. Mushrooms. 2001b. Vol. 2, I. 3. P. 201–207.
- 216. Shin, Y. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* IV. Triterpene and steroids from cultured mycelia / Y. Shin, Y. Tamai, M. Terazawa // Eurasian J. For. Res. 2001c. V. 2. P. 27–30.

- 217. Shin, Y. Triterpenoids, steroids, and a new sesquiterpen from *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.) Pilat / Y. Shin, Y. Tamai, M. Terazawa // Int. J. Med. Mushrooms. 2002. Vol. 4. P. 77–84.
- 218. Shin, Y.S. Chemical constituent of stationary mycelia of *Inonotus obliquus* / Y.S. Shin, T. Minoru, N.S. Cho // J. Korean Wood Sci. Technol. 2004. Vol. 32. P. 52–57.
- 219. Sisoeva, M.A. Research of colloidal water extracts of Chaga. IV. Antioxidant activity of water extraction and polyphenols of Chaga / M.A. Sisoeva, O.Y. Kuznetsova, V.S. Gamaiorora [et al.] // Chem. Plant Raw Mater. 2005. Vol. 9. P. 41–47.
- 220. Smolskaite, L. Comprehensive evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of different mushroom species / L. Smolskaite, P.R. Venskutonis, T. Talou // LWT–Food Sci. Technol. 2015. –Vol. 60, I. 1. –P. 462–471.
- 221. Song, Z.W. Protective effects of extracts of *Inonotus obliquus* on acute hepatic failure in mice / Z.W. Song, Y.L. Wu, H.S. Piao // J. Med. Sci. Yanbian Univ. 2007. Vol. 1. P. 34–36.
- 222. Staub, A.M. Removal of proteins: Sevag method / A.M. Staub // Methods Carbohydr. Chem. 1965. Vol. 5. P.5–6.
- 223. Sun, J.E. Antihyperglycemic and antilipidperoxidative effects of dry matter of culture broth of Inonotus obliquus in submerged culture on normal and alloxan-diabetes mice / J.E. Sun, Z.H. Ao, Z.M. Lu [et al.] // J. Ethnopharmacol. 2008. Vol. 118, I. 1. P. 7–13.
- 224. Sun, J.E. Hypoglycemic effect of dry matter of culture broth of *Inonotus obliquus* and *Tricholoma matsutake* in submerged culture / J.E. Sun, H.Y. Xu, Z.H. Ao [et al.] // Nat. Prod. Res. Devel. 2009. Vol. 21. P. 339 342.
- 225. Suzuki, N. ROS and rebox signaling in the response of plant to abiotic stress / N. Suzuki, S. Koussevitzky, R. Mittler [et al.] // Plant Cell Environ. 2012. Vol. 35, I. 2. P. 259–70.

- 226. Taji, S. Lanostane-type triterpenoids from the sclerotia of *Inonotus obliquus* possessing anti-tumor promoting activity / S. Taji, T. Yamada, S. Wada // Eur. J. Med. Chem. 2008. Vol. 43, I. 11. P. 2373–2379.
- 227. Taji, S. Three new lanostane triterpenoids, inonotsutriols A, B, and C, from *Inonotus obliquus* / S. Taji, T. Yamada, R. Tanaka // Helv. Chim. Acta. 2008. Vol. 91. P. 1513–1524.
- 228. Tamrakar, S. Antioxidative activities of 62 wild mushrooms from Nepal and the phenolic profile of some selected species / S. Tamrakar, H. B. Tran, M. Nishida [et al.] // J. Nat. Med. 2016. Vol. 70. P. 769–779.
- 229. Tang, Y.J. Submerged culture of mushrooms in bioreactors challenges, current state-of-the-art, and future prospects / Y.J. Tang, L.W. Zhu, H.M. Li [et al.] // Food Technol. Biotechnol. 2007. Vol. 45. P. 221–229.
- 230. Tinoi, J. Utilization of mustard waste isolates for improved production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous* / J. Tinoi, N. Rakariyatham, R.L. Deming / J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2006. Vol. 33, I. 4. P. 309–314.
- 231. Tisch, D. Light regulation of metabolic pathways in fungi / D. Tisch, M. Schmoll // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 85 P. 1259–1277.
- 232. Urbain, P. Dose-response effect of sunlight on vitamin D2 production in *Agaricus bisporus* mushrooms / P. Urbain, J. Jakobsen // J. Agric. Food. Chem. 2015. Vol. 63, I. 37. P. 8156–8161.
- 233. Vahidi, H. Effect of cultivation conditions on growth and antifungal activity of *Mycena leptocephala* / H. Vahidi, F. Kobarfard, F. Namjoyan // Afr. J. Biotechnol. 2004. Vol. 3, I. 11. P. 606–609.
- 234. Van, Q. Anti-inflammatory effect of *Inonotus obliquus*, *Polygala senega* L., and *Viburnum trilobum* in a cell screening assay / Q. Van, B. N. Nayak, M. Reimer [et al.] // J. Ethnopharmacol. 2009. Vol. 125, I. 3. P. 487–493.
- 235. Vance, C.P. Styrylpyrone biosynthesis in *Polyporus hispidus*: I. Action spectrum and photoregulation of pigment and enzyme formation / C.P. Vance,

- A.M.D. Nambudiri, E.B. Tregunna [et al.] // BBA. 1974. Vol. 343, I. 1. P. 138–147.
- 236. Venkateswarlu, S. Sinthesis and antioxidant activity of hispolon, a yellow pigment from *Inonotus hispidius* / S.Venkateswarlu, M.S. Ramachandra, K. Sethuramu [et al.] // Indian J. Chem. 2002. Vol. 41, I. 4. P. 875–877.
- 237. Vermerris, W. Phenolic Compound Biochemistry / W. Vermerris, R. Nicholson // N.Y.: Springer, 2006. P. 151–196.
- 238. Vinogradov, E. The structure of a polysaccharide isolated from *Inonotus levis* P. Karst. mushroom (Heterobasidiomycetes) / E. Vinogradov, S.P. Wasser // Carbohydr. Res. 2005. Vol. 340. P. 2821–2825.
- 239. Wang, L.B. Observation on antiproliferation and apoptosis inducement of cells of lung cancer from *Inonotus obliquus* / L.B. Wang, D. Z. Sun, X.H. Zhong [et al.] // Edible Fungi China. 2007. Vol. 18. P. 40–43.
- 240. Wang, L. Effect of different light of LED light quality on growth and antioxidant enzyme activities of *Ganoderma lucidum* / L. Wang, X. Chen, Q. Wang [et al.] // China J. Chin. Mater. Med. 2011. Vol. 36, I. 18. P. 2471–2474.
- 241. Wangun, H.v. Squarrosidine and pinillidine: 3,3'-fused bis(tyrylpyrones) from *Pholiota squarrosa* and *Phellinus pini* / H.V. Wangun, C. Hertweck // Eur. J. Org. Chem. 2007. Vol. 2007, I. 20. P. 3292–3295.
- 242. Wasser, S.P. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective / S.P. Wasser, A.L. Weis // Crit. Rev. Immunol. 1999. Vol. 19 P. 65–96.
- 243. Won, D.P. Immunostimulating activity by polysaccharides isolated from fruiting body of *Inonotus obliquus* / D.P. Won, J.S. Lee, D.S. Kwon [et al.] // Mol. Cells. 2011. Vol. 31, I. 2. P. 165–173.
- 244. Wu, Y.L. Protective effects of alcohol extracts of the *Inonotus obliquus* on acute liver failure in mice / Y.L. Wu, J.X. Nan, H.S. Piao // J. Med. Sci. Yanbian Univ. 2008. Vol. 1. P. 25–27.

- 245. Xiang, Y. Chemical properties and antioxidant activity of exopolysaccharides fractions from mycelial culture of Inonotus obliquus in a ground corn stover medium / Y. Xiang, X. Xu, J. Li // Food Chem. 2012. Vol. 134, I. 4. P. 1899–1905.
- 246. Xing, Y.M. Sclerotial formation of *Polyporus umbellatus* by low temperature treatment under artificial conditions / Y.M. Xing, L.C. Zhang, H.Q. Liang [et al.] // PLoS One. 2013. Vol. 8, I. 2. doi:10.1371/journal.pone.0056190.
- 247. Xu, X. Effect of chemicals on production, composition and antioxidant activity of polysaccharides of *Inonotus obliquus* / X. Xu, L. Quan, M. Shen // Int. J. Biol. Macromol. 2015. Vol. 77. P.143–150.
- 248. Yang, J. A new sesquiterpene from the medicinal fungus *Inonotus vaninii /* J. Yang, N. Wang, H.S. Yuan // Chem. Nat. Compd. 2013. Vol. 49, I. 2. P. 261–263.
- 249. Yin, Y. Study on extraction of polysaccharide from *Inonotus obliquus* by high intensity pulsed electric fields / Y. Yin, Y. Cui, T. Wang // Trans. Chinese. Soc. Agric. Machin. 2008. Vol. 17. P. 89–92.
- 250. Ying, Y.M. Terpenoids with alpha-glucosidase inhibitory activity from the submerged culture of *Inonotus obliquus* / Y.M. Ying, L.Y. Zhang, X. Zhang [et al.] // Phytochemistry. 2014. Vol. 108. P. 171–176.
- 251. Yonei, Y. Double blind study of health claims for food containing extract of Kabanoanatake (Charga: *Fuscoporia obliqua*) (RCT: randomized controlled trial) / Y. Yonei, Y. Takahashi, K. Matsushita [et al.] // J. Anti- Aging Med. 2007. Vol. 4. P. 1–10.
- 252. Youna, M.J. Potential anticancer properties of the water extract of *Inontus obliquus* by induction of apoptosis in melanoma B16-F10 cells / M.J. Youna, J.K. Kima, S. Parka [et al.] // J. Ethnopharmacol. 2009. Vol. 121. P. 221–228.
- 253. Zamora, R. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases / R. Zamora, V. Vodovotz, T.R. Billiar // Molec. Med. 2000. Vol. 6, I. 5. P. 347–373.

- 254. Zan, L.F. Antioxidant hispidin derivatives from medicinal mushroom *Inonotus hispidus /* L.F. Zan, J. Qin, Y. Zhang // Chem. Pharm. Bull. 2011. Vol. 59, I. 6 P. 770–772.
- 255. Zhang, H. Effect on cancer cell proliferation of polysaccharide extracted from *Inonotus obliquus* fruit bodies using ultrasound / H. Zhang, S. Yang, W. Kou [et al.] // Acta Edulus Fungi. 2007. Vol. 14. P. 51–54.
- 256. Zhang, H.L. Extraction of *Inonotus obliquus* polysaccharide and the effect of anti-proliferation on SMMC7721 cells of lung cancer / H.L. Zhang, S. Yang, Y. Li. [et al.] // Edible Fungi China. 2006. Vol. 17 P. 31–33.
- 257. Zhang, L. Chemical composition and antitumor activity of polysaccharide from *Inonotus obliquus* / L. Zhang, C. Fan, S. Liu [et al.] / J. Medicinal Plants Research. 2011 Vol. 5, I. 7. P. 1251–1260.
- 258. Zhang, L.Q. Effect of UV on the growth of *Inonotus obliquus* and the content of polysaccharide / L.Q. Zhang // Renshen Yanjiu. 2008. Vol. 9. P. 16–19.
- 259. Zhang, X.H. Effects of extracts from *Inonotus obliquus* on biochemical indicator in diabetic rats / X.H. Zhang, D.Z. Sun, H.Y. Chen [et al.] // Edible Fungi China. 2008a. Vol. 19. P. 41–43.
- 260. Zhang, X.H. The protective effects of *Inonotus obliquus* on tissue injury in diabetic rats / X.H. Zhang, D.Z. Sun, H.Y. Chen [et al.] // Edible Fungi China. 2008b. Vol. 19. P. 31–33.
- 261. Zhang, Z.S. The effects of *Inonotus obliquus* on immunity ability of mice / Z.S. Zhang, C.H. Yang, L.Y. Liang // Food Sci. Technol. 2008c. Vol. 7. P. 234–236.
- 262. Zhang, Z.S. Optimization of the polysaccharide accumulation by *Inonotus obliquus* in submerged fermentation / Z.S. Zhang, J.N. Shi, J. Zhang [et al.] // Mod. Food Sci. Technol. 2009. Vol. 10. P 298–301.
- 263. Zhao, F. Studies on anti-mutation active constituents of the *Fuscoporia oblique* // F. Zhao, H. Pu, C. Han // J. Med. Sci. Yanbian Univ. 2004. Vol. 4. P. 250–252.

- 264. Zhao, F.Q. Chemical constituents of *Inonotus obliquus* / F.Q. Zhao, H.S. Piao // Lishizhen Med. Mater. Med. Res. 2006. Vol. 17 P. 1178–1181.
- 265. Zhao, F.Q. Inotodiol the active compound in *Inonotus obliquus* / F.Q. Zhao, L.Y. Deng, C.Y. Yang [et al.] // Pharm. Care Res. 2009. Vol. 9. P. 455–458.
- 266. Zhao, F. Triterpenoids from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities / F. Zhao, Q. Mai, J. Ma [et al.] // Fitoterapia. 2015. Vol. 101. P. 34–40.
- 267. Zhao, F. Chemical constituents from *Inonotus obliquus* and their antitumor activities / F. Zhao, G. Xia, L. Chen [et al.] // J. Nat. Med. 2016. Vol. 70 P. 721–730.
- 268. Zharikova, G.G. Effects of weightlessness, space orientation and light on geotropism and the formation of fruit bodies in higher fungi / G.G. Zharikova, A.B. Rubin, A.V. Nemchinov // Life Sci. Space Res. 1977. Vol. 15. P. 291–294.
- 269. Zheng, W. Accumulation of antioxidant phenolic constituents in submerged cultures of *Inonotus obliquus* / W. Zheng, M. Zhang, Y. Zhao [et al.] // Biores. Technol. 2009. Vol. 100. P. 1327–1335.
- 270. Zheng, W. NMR-based metabonomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus* / W. Zheng, M. Zhang, Y. Zhao [et al.] // Bioresour. Technol. 2009. Vol. 100, I. 19. P. 4481–4487.
- 271. Zheng, W. Chemical diversity of biologically active metabolites in the sclerotia of *Inonotus obliquus* and submerged culture strategies for upregulating their production / W. Zheng, K. Miao, Y. Liu [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. Vol. 87. P. 1237–1254.
- 272. Zheng, W. Production of antioxidant and antitumor metabolites by submerged cultures of *Inonotus obliquus* cocultured with *Phellinus* punctatus / W. Zheng, Y. Zhao, X. Zheng [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. Vol. 89, I. 1. P. 157–167.

- 273. Zheng, W.F. Sterol composition in field-grown and cultured mycelia of *Inonotus obliquus* / W.F. Zheng, T. Liu, X.Y. Xiang [et al.] // Acta Pharm. Sin. 2007. Vol. 42, I. 7. P. 750–756.
- 274. Zheng, W.F. Phenolic compounds from *Inonotus obliquus* and their immunestimulating effects / W.F. Zheng, Y.X. Zhao, M.M. Zhang [et al.] // Mycosystema. 2008. Vol. 27. P. 574–581.
- 275. Zhong, X. Apoptosis of human gastric cell line BGC-823 induced by extracts from *Inonotus obliquus* / X. Zhong, S. Yang, Y. Zhang [et al.] // China Pharmacy. 2007. Vol. 34. P. 2661–2663.
- 276. Zhong, X. Progress of research on *Inonotus obliquus* / X. Zhong, K. Ren, S. Lu [et al.] // Chin. J. Integr. Med. 2009. Vol. 15, I. 2. P. 156–160.
- 277. Zhong, X.H. Effects of anti-hyperplasis and apoptosis of BGC-823 human gastric carcinoma cell lines mediated by extracts from *Inonotus obliquus* / X.H. Zhong, D.Z. Sun, J.C. Cui [et al.] // J. Med. Sci. Yanbian Univ. 2006. Vol. 2. P. 82–86.
- 278. Zhou, L.J. Effects of nutrients on the mycelia growth and polysaccharide contents of *Inonotus obliquus* / L.J. Zhou, Y.L. Jin, Y.Q. Chen // J. Agric. Sci. Yanbian Univ. 2006. Vol. 8. P. 96–101.
- 279. Zhu, L. Stimulatory effect of different lignocellulosic materials for phenolic compound production and antioxidant activity from *Inonotus obliquus* in submerged fermentation / L. Zhu, X. Xu / Appl. Biochem. Biotechnol. 2013. Vol. 169. P. 2138–2152.

СПИСОК ТАБЛИЦ

$N_{\underline{0}}$	Название	Стр.
1	Влияние различного светового режима на химический	34
	состав базидиальных грибов	
2	Сравнительная характеристика антирадикальной	75
	активности водно-спиртовых экстрактов грибов	
3	Антимикробная активность водно-спиртовых экстрактов	75
	грибов	
4	Биохимический состав мицелия и плодовых тел I. rheades	76
5	Выход фракций экстрактивных веществ из мицелия І.	77
	rheades	
6	Биологическая активность экстрактивных веществ	80
	фракций из мицелия I. rheades	
7	Время удерживания (tR), УФ поглащение (λ_{max}) и	85
	отношение m/z (ESI) фенольных соединений,	
	обнаруженных в мицелии I. rheades	
8	Спектры ЯМР 1 Н (500 МГц, MeOH-d ₄ , δ_{H} , м.д., J/Гц) и 13 С	88
	(125 Гц, MeOH-d ₄ , δ_{C} , м.д.) соединения 11	
9	Содержание стирилпиронов в мицелии и плодом теле І.	90
	rheades, $\text{M}\Gamma/\Gamma$	
10	Основные физико-химические характеристики	92
	водорастворимых полисахаридов мицелия I. rheades	
11	Содержание, молекулярные массы и моносахаридные	93
	составы компонентов Ir-05 ^{ПС}	
12	Содержание O -метил-альдитол ацетатов в гидролизате Ir-	95

13	Содержание тритерпеноидов в мицелии I. rheades на	98
	разных субстратах, мг/г	
14	Состав жирных кислот мицелия I. rheades,	99
	культивированного на двух древесных субстратах, % от	
	общего содержания жирных кислот*	
15	Содержание стирилпиронов и бис(стирилпиронов) в	101
	мицелии I. rheades на разных субстратах, мкг/г	
16	Моносахаридный состав полисахаридных фракций	101
	(моль%)	
17	Содержание тритерпеноидов в мицелии I. rheades,	103
	выращенного при различных световых режимах, мг/г	
18	Содержание тритерпеноидов в мицелии I. rheades,	104
	выращенного с применением синего света различной	
	интенсивности, мг/г	
19	Состав жирных кислот мицелия I. rheades,	108
	культивированного при разных световых режимах, % от	
	общего содержания жирных кислот*	
20	Содержание стирилпиронов и бис(стирилпиронов) в	111
	мицелии <i>I. rheades</i> , выращенного при различных	
	световых режимах, мг/г	
21	Содержание стирилпиронов и бис(стирилпиронов) в	113
	мицелии I. rheades, выращенного с применением синего	
	света различной интенсивности, мг/г	
22	Моносахаридный состав полисахаридов мицелия <i>I</i> .	115
	rheades при разных световых режимах	
23	Соответствие 5 партий сырья мицелия трутовика лисьего	124
	сухого показателю 1	
24	Соответствие 5 партий сырья мицелия трутовика лисьего	125
	сухого показателю 2	

25	Значение показателя «Влажность» для 5 партий сырья	125
	мицелия трутовика лисьего сухого, % от массы	
	воздушно-сухого сырья	
26	Значение показателя «Зола общая» для 5 партий сырья	125
	мицелия трутовика лисьего сухого, % от массы	
	воздушно-сухого сырья	
27	Значение показателя «Зола, нерастворимая в	126
	хлористоводородной кислоте» для 5 партий сырья	
	мицелия трутовика лисьего сухого, % от массы	
	воздушно-сухого сырья	
28	Значение показателя «Измельченность» для 5 партий	126
	сырья мицелия трутовика лисьего сухого, % от массы	
	воздушно-сухого сырья	
29	Значение показателя «Органическая примесь» для 5	127
	партий сырья мицелия трутовика лисьего сухого, % от	
	массы воздушно-сухого сырья	
30	Значение показателя «Минеральная примесь» для 5	127
	партий сырья мицелия трутовика лисьего сухого, % от	
	массы воздушно-сухого сырья	
31	Метрологические характеристики разработанной	129
	методики	
32	Валидационные параметры методики количественного	130
	анализа гиспидина методом ВЭЖХ	

СПИСОК РИСУНКОВ

$N_{\underline{0}}$	Название	Стр.
1	Виды Inonotus	17
2	Суспензионная культура T. salsuginea	70
3	УФ- и ИК-спектры фракций мицелия <i>I. rheades</i>	78
4	Структуры соединений, выделенных из фракции Ir-01	82
5	Хроматограммы RP-UPLC-DAD (UV, 330 нм) и RP-	84
	UPLC-ESI/MS для выбранного ионного мониторинга	
	(SIM, отрицательные ионы) этанольного экстракта	
	мицелия I. rheades	
6	Структуры соединений, выделенных из фракции Ir-03	86
7	Структура реадинина (11)	89
8	ИК-спектр фракции $Ir-05^{\Pi C}$	91
9	Хроматограмма (ГПХ) фракции Ir- $05^{\Pi C}$ на Sephacryl	93
	400HR	
10	Хроматограммы (ВЭЖХ) РМР-производных	94
	моносахаридов в гидролизатах компонентов Ir- $05^{\Pi C}$ -1 –	
	$Ir-05^{IIC}-5.$	
11	ВЭЖХ роматограммы (210 нм) гексановых фракций из	103
	мицелия $I.\ rheades\ (субстрат-B.\ pendula)$ при различных	
	световых режимах	
12	Возможные пути биотрансформации лупановых	105
	тритерпеноидов в мицелии I. rheades	
13	ВЭЖХ хроматограммы (360 нм) спиртовых извлечений	112
	из мицелия I. rheades при различных световых режимах	
14	Технологическая схема производства мицелия трутовика	120
	лисьего сухого	

15	Схема стерильной камеры	
16	Внешний вид цельного сырья (а), измельченного сырья	122
	(б) и порошка (в).	
17	Фрагменты микроскопического строения цельного сырья	123
	трутовика лисьего	
18	Фрагменты микроскопического строения порошка	124
	трутовика лисьего	

приложения

Приложение 1	171
Приложение 2	180
Приложение 3	183
Приложение 4	187
Приложение 5	196
Приложение 6	199
Приложение 7	206

приложение 1

Таблица 1. 1 – Структуры фенольных соединений, идентифицированных у представителей рода *Inonotus*

№	Структура	Название
1	HO OH OOH OOH OOH OOH OOH	2-гидрокси-1-гидроксиметилэтиловый эфир сиреневой кислоты
2	ОН	протокатеховая кислота
3	ОН	3,4-гидроксибензальдегид
4	H ₃ CO OCH ₃	сиреневая кислота
5	но соон	2,5-дигидрокситерпаталовая кислота
6	ОН	кофейная кислота
7	H ₃ C O OH	3,4-дигидроксибензальацетон
8	ОН	п-оксибензойная кислота
9	COOH OCH3	феруловая кислота

10	ОН	гомогентизиновая кислота
11	COOH OH HO ₃ S	сульфосалициловая кислота
12	ОН	о-кумаровая кислота
13	HO OH OH	кемпферол
14	Rut-O OH OH	нарингин
15	COH OCH ₃	ванилин
16	НООН	резвератрол
17	HO OH OH	кверцетин
18	HO OH OH	иноноблин А
19	HO O O O O O O O O O O O O O O O O O O	иноноблин В

20	OH HO OH HO OH OH	иноноблин С
21	но	феллигридин D
22	HO O O O O O O O O O O O O O O O O O O	феллигридин Е
23	но о о о о о о о о о о о о о о о о о о	феллигридин G
24	HO H OH	гиспидин
25	H T T T T T T T T T T T T T T T T T T T	биснорянгонин
26	ОНООН	гисполон
27	ОН	3,14'-бигиспидинил

28	но он он	гифоламин В
29	ОН ОН ОН	1,1-дистирилпирилэтан
30	HO O CH ₃	феллигридин А
31	HO OH OH	иноскавин А
32	HO OH OH OH	иноскавин В
33	но он	галловая кислота
34	COOH OCH ₃	феруловая кислота
35	ОН	2,3-дигидроксибензальдегид
36	HO OH O	нарингенин
37	Rut-O OH O	нарирутин

38	HO OCH ₃	фортунелетин
39	OH OH OH OH OH OH OH OH	эриоцитрин
40	HO OH OH	эпигаллокатехин
41	HO OCH3 OH OH	феллигридин F
42	HO O O O O O O O O O O O O O O O O O O	метилиноскавин А
43	HO OH OH OH H ₃ CO OH	иноскавин В
44	HO OCH ₃ OCH ₃ OH H ₃ CO OH	метилиноскавин В
45	но о о о о о о о о о о о о о о о о о о	иноскавин С
46	HO O O O O O O O O O O O O O O O O O O	метилиноскавин С

47	HO OH OH OH	даваллиалактон
48	HO OH OH	метил даваллиялактон
49	H ₃ CO OH OH	иноскавин D
50	HOOO OOCH3	метилиноскавин D
51	НО ОН ОН	иноскавин Е
52	HO HO OH OH OH	интерфугин А
53	HO CH ₃ OH OH	интерфугин В
54	HO OH OH	интерфугин С
55	ОН	эпикатехингаллат

56	соон соон	2,5-дигидрокситерефталевая кислота
57	ОН	<i>n</i> -кумаровая кислота
58	HO OH OH	изорамнетин
59	HO OH OH	лютеолин
60	НООНООН	апигенин
61	Nhp-O OH O	роифолин
62	Rut-O OH O	изороифолин
63	HO O-Rut	изорамнетин-3-рутинозид
64	OH O	рутин

65	HO OH OH OH OH	эпигаллокатехингаллат
66	OH OH OH OH	фускопорин

приложение 2

Антигликозидазная активность лупановых тритерпенов I. rheades

Стерины и лупановые тритерпены, выделенные из гексановой фракции (Ir-01) мицелия *I. rheades*, были проанализированы на наличие антиглюкозидазной активности с использованием спектрофотометрического метода микропланшетов, позволяющий определить способность соединений ингибировать пищеварительный фермент α-глюкозидазу.

Исследования биологической активности соединений 1-10 показали, что стерины 1-3 являются слабыми ингибиторами α -глюкозидазы ($IC_{50}>200$ мкг/мл), тогда как лупановые тритерпеноиды обладают выраженной активностью (табл.2. 1).

Таблица 2. 1 – Антиглюкозидазная активность лупановых тритерпеноидов мицелия *I. rheades*

Соединение	Активность
Инотодиол (1)	> 200
Эргостерол пероксид (2)	> 200
Ланостерол (3)	> 200
Лупеол (4)	9,71±0,24
Бетулин (5)	9,59±0,34
Бетулиновая кислота (6)	5,79±0,17
Бетулон (7)	8,80±0,22
Бетулоновый альдегид (8)	7,27±0,16
Бетулоновая кислота (9)	4,76±0,1
Бетулиновый альдегид (10)	7,70±0,17
Акарбоза (контроль)	125,62±2,88

Примечание: n=3. M±S.D.

Бетулоновая кислота (9) была наиболее эффективным ингибитором α -глюкозидазы, IC_{50} составил 4,76 г/мл. Лупеол (4) обладал самой низкой активность IC_{50} 9,71 г/мл. Результаты показывают, что соединения, содержащие альдегид (бетулоновый (8) и бетулиновый (10) альдегид) или карбоновую кислоту (бетулиновая (6) и бетулоновая (9) кислота) на C-28 были лучшими ингибиторами α -глюкозидазы, чем их менее окисленные аналоги бетулин (5) и бетулон (7). Присутствие карбонила C-3 также увеличивало активность.

Для тритерпеновых соединений ланостанового ряда из *I. obliquus* инотлактанов A и B показано наличие выраженной антиглюкозидазной активности, однако более известные соединения данного класса, в том числе инотодиол (1) не показали активности (Ying et ai., 2014). Таким образом можно заключить что тритерпеновые соединения лупанового ряда выделенные из мицелия *I. rheades* являются более эффективными ингибиторами α-глюкозидазы.

приложение 3

Антиоксидантная активность стирилпиронов и бис(стирилпиронов) мицелия *I. rheades* методом предколоночной дериватизации пробы радикалом DPPH^{*}

Ранее было показано (раздел 3.2.1.), что этилацетатная фракция (Ir-03) мицелия I. rheades обладала наиболее выраженными свойствами. C антиоксидантными целью предварительного анализа присутствия антиоксидантов во фракции применяли метод предколоночной котором дериватизации пробы радикалом DPPH, при наблюдается уменьшение площади пика на хроматограмме вещества с антиоксидантными свойствами после взаимодействия с раствором радикала в сравнении с площадью пика на исходной хроматограмме. При анализе фракции Ir-03 было установлено достоверное снижение площадей практически всех детектируемых соединений в течение 5-30 мин после реакции с DPPH (рис. **3. 1.**).

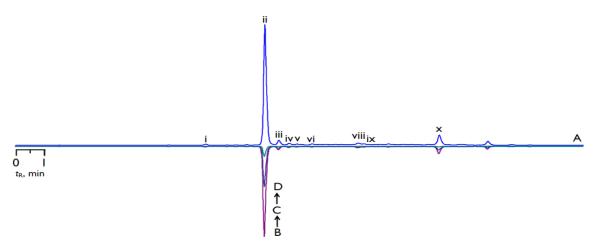


Рисунок 3. 1 - BЭЖХ хроматограммы (360 нм) спиртовых извлечений из мицелия *I. rheades* до (A) и после взаимодействия с радикалом DPPH в течение 5 (B), 15 (C) и 30 мин (D).

Числами обозначено положение соединений: **i** − 3,14′-бисгиспидинил, **ii** − *транс*гиспидин, **iii** − *цис*-гиспидин, **iv** − гифоломин B, **v** − 3-биснорянгонил-14′-гиспидин, **vii** − *цис*-биснорянгонин, **viii** − 1,1-дистирилпирилэтан, **ix** − феллинины A1/A2, **x** − реадинин. Условия ВЭЖХ: хроматограф Милихром A-02; колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2×75 мм, \emptyset 5 мкм); подвижная фаза: 0.2 M LiClO₄ в 0.006 M HClO₄ (A), MeCN (B); градиентный режим (% B): 0–20 мин 5–76; v 150 мкл/мин; температура колонки 35 °C; УФ-детектор, λ 360 нм.

Исследование антирадикальной активности соединений **11–21** в отношении радикала DPPH показало, что не все выделенные компоненты обладали способностью инактивировать свободные радикалы (**табл. 3. 1.**).

Наибольшее действие было выявлено для гиспидина (**19**) с показателем IC_{50} 0,91 мкг/мл. Следует отметить, что высокой активностью обладали растворы 3,14′-бисгиспидинила (IC_{50} 1,83 мкг/мл) и 1,1-дистирилпирилэтана (IC_{50} 3,86 мкг/мл). Близкие значения антиоксидантной активности данных соединений ранее были выявлены для культуральной жидкости *I. xeranticus* и *P. linteus* (Jung et al., 2008). Выраженность действия остальных соединений находилась в диапазоне от 4,45 (гифоломин B (**21**)) до 15,62 мкг/мл (реадинин (**11**)), что превышало активность вещества сравнения – тролокс (IC_{50} 18,64 мкг/мл). Сведения об активности реадинина (**11**) и 3-биснорянгонил-14′-гиспидина (**17**) приводятся впервые.

Таблица 3. 1 — Антирадикальная активность стирилпиронов и бис(стирилпиронов) мицелия *I. rheades* в отношении радикала DPPH^{*}, мкг/г

Образец	$IC_{50} \pm SD$
Реадинин (11)	$15,62 \pm 0,43$
Феллинин А1/А2 (12/13)	н.о.
1,1-Дистирилпирилэтан (14)	$3,86 \pm 0,08$
<i>транс</i> -Биснорянгонин (15)	$7,19 \pm 0,20$
цис-Биснорянгонин (16)	н.о.
3-Биснорянгонил-14'-гиспидин (17)	$5,32 \pm 0,15$
3,14'-Бисгиспидинил (18)	$1,83 \pm 0,05$
<i>транс-</i> Гиспидин (19)	$0,91 \pm 0,02$
цис-Гиспидин (20)	н.о.
гифоломин B (21)	$4,45 \pm 0,12$

Примечание: н.о. — не определялось; IC_{50} тролокс $18,64\pm0,55$ мкг/мл. Субстрат — B. pendula. n=3. M±S.D.

Сравнение величин показателей IC_{50} в парах «гиспидин (**19**) – биснорянгонин (**15**)» (0,91 – 7,19), «3,14′-бисгиспидинил (**18**) – 3-биснорянгонил-14′-гиспидин (**17**)» (1,83 – 5,32), «1,1-дистирилпирилэтан (**14**) – реадинин (**11**)» (3,86 – 15,62) подтвердило данное предположение. Следует отметить, что биологическая активность стирилпиронов была выше, чем у

соответствующих им димерных бис(стирилпиронов); например, «гиспидин (**19**) -1,1-дистирилпирилэтан (**14**)» (0,91 -3,86) и «биснорянгонин (**15**) - реадинин (**11**)» (7,19 -15,62).

Изучение зависимости «структура – активность» указывало на важную роль орто-диоксо-бензоильного (катехольного) фрагмента в проявлении антирадикальной активности соединений. Данный фрагмент принадлежит остатку гиспидина, наиболее активному из изученных стирилпиронов. орто-дигидрокси-бензоильного фрагмента Замена на моногидроксибензоильный, принадлежащий структуре биснорянгонина снижало биологическую активность соединений. Полученные данные подтверждают выдвинутое J. Y. Jung с соавт. предположение о наличии выраженной антирадикальной активности у гифоломина В, 3,14'-бисгиспидинила и 1,1дистирилпирилэтана, выявленных из культуральной жидкости I. xeranticus и P. linteus за счет наличия катехольнового фрагмента (Jung et al., 2008), данный эффект авторы объясняют наличием двух фрагментов катехола в их структуре.

Таким образом, проведенные исследования показали, что наличие антиоксидантной активности у этилацетатной фракции мицелия *I. rheades* (Ir-03) обусловлено присутствием фенольных соединений, относящихся к группам стирилпиронов и бис(стирилпиронов), способных проявлять данную активность, выявленную не только методами *in vitro*, но и *in vivo* (Lee, Yun, 2011; Zan et al., 2011).

приложение 4

Антиоксидантное действие экстрактивных веществ мицелия *I. rheades* на растительные клетки *Thellungiella salsuginea* при тепловом стрессе

Для исследования антиоксидантного действия экстрактивных веществ мицелия *I. rheades*, была взята растительная суспензионная культура *T. salsuginea*, которая является стабильным модельным объектом с высоким уровнем жизнеспособности.

Формированию избыточного количества АФК в культуре клеток растений, т.е. возникновению окислительного стресса способствует как повышение, так и понижение температуры (Федяева, 2015). Чтобы изменяется уровень АФК в клетках T. salsuginea в определить, как зависимости интенсивности теплового воздействия OT использовали флуоресцентный 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин краситель (H₂DCF-DA). Данный краситель легко проникает в живые клетки, где при действии неспецифических клеточных эстераз В присутствии АФК 2',7'преобразованием подвергается окислению c молекулы дихлорфлуоресцеин (DCF), который флуоресцирует в зеленом канале (Suzuki et al., 2012). Чувствительность и пецифичность окрашивания данного красителя на образование АФК в культуре при тепловом шоке определяли с помощью пероксида водорода и протокатеховой кислоты (фенолокислота, обнаруженная во многих грибах и растениях) (Lee et al., 2006a; Lee, Yun, 2011; Kakkar, Bais, 2014) при 26 °С в течение 10 мин. (рис. 4. 1).

T. salsuginea Суспензионную культуру подвергали тепловому воздействию повышенными температурами в диапазоне от 30 до 65 °C. В экспериментах было показано, что температурная обработка 45 °C приводила к статистически значимому увеличению интенсивности флуоресценции DCF по сравнению с контролем 26 °C (рис. 4. 2a). Дальнейшее повышение температуры обработки увеличивало интенсивность флуоресценции, максимальный ее пик отмечен при 55 °C. Интенсивность флуоресценции при воздействии 60 °C значительно снижалась, а при 65 °C не отличалась от контрольных значений.

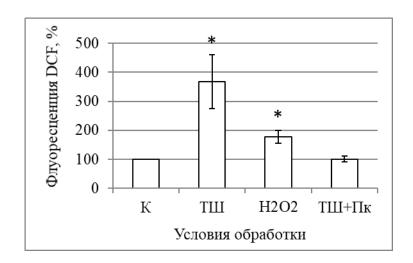


Рисунок 4. 1 — Повышение содержания $A\Phi K$ в культуре клеток T. salsuginea при тепловом воздействии

Примечание: Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции DCF. Культуру клеток инкубировали в течение 10 минут при указанных температурах и измеряли флуоресценцию. К – клетки контрольной культуры, инкубированные при 26 °C, их флуоресценцию принимали за 100%. ТШ – тепловой шок 55 °C. Обработку 200 мкМ H_2O_2 проводили при 26 °C. Обработку 1 мМ протокатеховой кислоты (Пк) проводили при 55 °C (ТШ+Пк). * – различия с контролем достоверны при уровне значимости (р≤0,05). n=3. М±S.D.

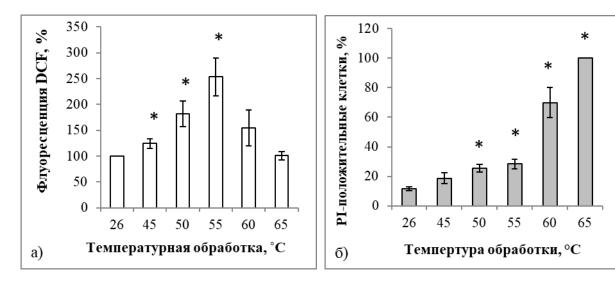


Рисунок 4. 2 — Изменение содержания АФК (а) и жизнедеятельности (б) в клетках суспензионной культуры T. salsuginea при тепловом воздействии

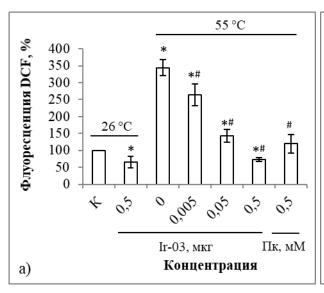
Примечание: Культуру клеток инкубировали в течение 10 минут при указанных температурах и измеряли флуоресценцию. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции DCF (а) и РІ-положительных клеток (б). За 100% принимали флуоресценцию клеток контрольной культуры при 26 °C. * — различия с контролем достоверны при уровне значимости (р≤0,05). n=3. М±S.D.

Известно, что накопление АФК может привести к гибели клеток. Необходимо было проанализировать, как обработка повышенными температурами влияет на жизнеспособность данной культуры. Выживаемость клеток суспензионной культуры *T. salsuginea* определяли с помощью окрашивания флуоресцентным летальным красителем пропидий йодид (PI). Данный краситель не способен проникать через мембрану нативной клетки, поэтому накапливается только в погибших клетках, имеющих мембранные дефекты, и связывается там с ДНК, образуя связи между основаниями ДНК в пропорции одна молекула на 4-6 пар оснований. Он также способен связываться с РНК. Молекулы РІ флуоресцируют в красном канале.

Тепловое воздействие 55 °C, при котором было выявлено максимальное количество АФК, снижает жизнеспособность клеток на 16,73%, однако более жесткое тепловое воздействие 60 °C приводило к гибели свыше 58% клеток (рис. 4. 26).. Полная гибель культуры наступала при 65 °C.

Таким образом, далее в работе использовали температурное воздействие 55 °C, приводящее к максимальной продукции АФК в клетках, при котором жизнеспособность суспензионной культуры *T. salsuginea* сохранялась на 70%.

Так как ранее было показано, что этилацетатная фракция мицелия *I. rheades* (Ir-03) обладает выраженными антиоксидантными свойствами, связанного присутствием фенольных соединений, относящихся к группам стирилпиронов и бис(стирилпиронов). Далее необходимо было проверить, оказывает ли данная фракция подобное действие на живом объекте. Для этого фракцию Ir-03 добавляли в разных концентрациях в культуру клеток перед тепловым воздействием. В результате было выявлено наличие антиоксидантной активности фракции Ir-03, которая снижала количество АФК в клетках *T. salsuginea* до контрольных значений (рис. 4. 3а).



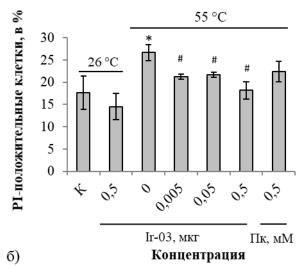


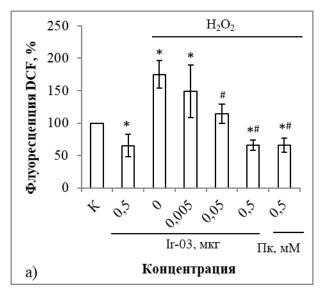
Рисунок 4. 3 — Действие фракции Ir-03 на содержание АФК (a) и жизнеспособность (б) культур клеток *T. salsuginea* при тепловом воздействии

Примечание: Культуру клеток инкубировали в течение 10 минут при указанных температурах и измеряли флуоресценцию. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции DCF (а) и PI-положительных клеток (б). К − клетки, инкубированные при 26 °C, их флуоресценцию принимали за 100%. Тепловое воздействие 55 °C. Обработку 0,005, 0,05 и 0,5 мкг/мл фракции Ir-03 выявляли при 55 °C. Пк − действие на клетки протокатеховой кислоты (вещество сравнения). * − различия с контролем достоверны при уровне значимости (p<0,05), # − различия с тепловым воздействием достоверны при уровне значимости (p<0,05). n=3. M±S.D.

Данный эффект наблюдался при добавлении фракции Ir-03 в среду инкубации клеток в концентрациях 0,005-0,5 мкг/мл, наибольшее ингибирование отмечено при добавлении 0,5 мкг/мл, проявляющих эффект близкий к действию протокатеховой кислоты при тепловом воздействии.

При исследовании действия фракции Ir-03 на жизнедеятельность суспензионной культуры *T. salsuginea* было установлено отсутствие пагубного действия на клетки как в контрольных условиях, так и при тепловой обработке. Добавление 0,5 мкг/мл фракции Ir-03 при тепловом воздействии позволяет сохранить жизнеспособность клеток в пределах контрольных значений (рис. 4. 36).

Антиоксидантное действие фракции Ir-03 также было установлено при окислительном стрессе, вызванном пероксидом водорода (рис. 4. 4a).



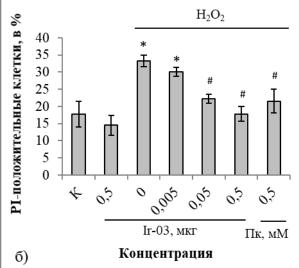


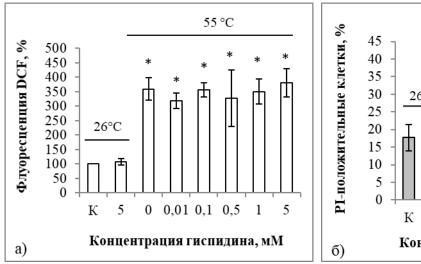
Рисунок 4. 4 — Действие фракции Ir-03 на содержание $A\Phi K$ (a) и жизнеспособность (б) культуры клеток T. salsuginea при действии пероксида водорода

Примечание: Культуру клеток инкубировали в течение 10 минут при температуре 26 °C и измеряли флуоресценцию. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции DCF (а) и PI-положительных клеток (б). К – клетки, инкубированные при 26 °C, их флуоресценцию принимали за 100%. Обработку фракцией Ir-03 проводили в концентрациях 0,005, 0,05 и 0,5 мкг/мл при 26 °C с добавлением 200 мкМ H_2O_2 . Пк – действие на клетки протокатеховой кислоты (вещество сравнения). * — различия с контролем достоверны при уровне значимости (р≤0,05), # — различия с воздействием 200 мкМ H_2O_2 достоверны при уровне значимости (р≤0,05). n=3. M±S.D.

Результаты показали статистически достоверное уменьшение количества АФК в клетках *T. salsuginea* при добавлении Ir-03 концентрациях 0,05 и 0,5 мкг/мл (до значением близким к контролю). Жизнеспособность клеток в присутствии перекиси водорода увеличивался при добавлении фракции Ir-03, наибольший положительный эффект наблюдался при действующей концентрации 0,5 мкг/мл (рис. 4. 46).

Учитывая данные ВЭЖХ о составе фракции (Ir-03), где показано, что гиспидин составляет 67,33 % от общего количества (раздел 3.5), необходимо было проверить, является ли данное вещество ключевым в оказании антиоксидантного эффекта на растительной культуре клеток. Из литературных данных известно, что данное вещество оказывает АОА в экспериментах с использованием культуры клеток млекопитающих (Кіт et

al., 2014; Lee et al., 2011; Chen et al., 2014). В ходе исследований показано, что гиспидин не оказывал антиоксидантного действия на культуру клеток растений при ТШ (рис. 4. 5а).



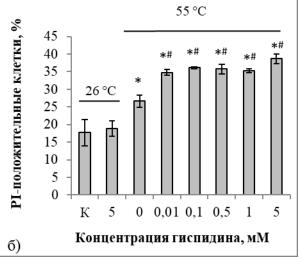
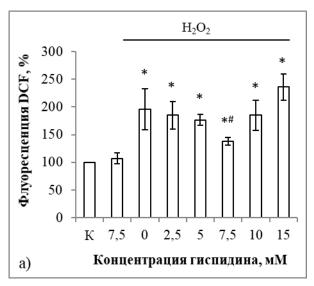


Рисунок 4. 5 — Действие гиспидина на содержание АФК (a) и жизнеспособность (б) клеток T. salsuginea при гипотермии

Примечание: Культуру клеток инкубировали в течение 10 мин при указанных температурах и измеряли флуоресценцию. Представлен количественный анализ интенсивности флуоресценции DCF (а) и РІ-положительных клеток (б). К — клетки, инкубированные при 26 °C. Тепловой шок 55 °C. Обработку гиспидином проводили в указанных концентрациях, при 55 °C. * — различия с контролем достоверны при уровне значимости (p≤0,05). n=3. M±S.D.

Уровень АФК в клетках оставался в пределах контрольных значений ТШ, стоит отметить, что при данных условиях наблюдалось увеличение гибели клеток более чем 35% от их общего числа (рис. 4. 56).

Однако при окислительном стрессе, вызванном добавлением H_2O_2 , данный эффект наблюдали только в узком диапазоне концентраций гиспидина (рис. .4. 6а). При окислительном стрессе, вызванном добавлением 200 мкМ пероксида водорода, жизнеспособность клеток увеличивалась при одновременном добавлении гиспидина в концентрациях 2,5-7,5 мМ (рис. 4. 6б). В то же время при дальнейшем увеличении концентраций гиспидина жизнеспособность клеток снижалась, вероятно, в результате слишком сильного сдвига редокс потенциала клеток в сторону восстановления.



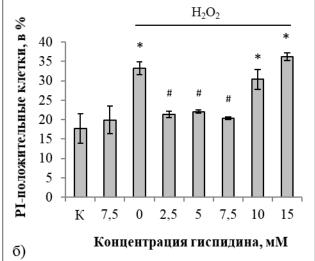


Рисунок 4. 6 — Действие гиспидина на содержание $A\Phi K$ (a) и жизнеспособность (б) клеток культуры T. salsuginea при действии пероксида водорода

Примечание: Культуру клеток инкубировали 10 мин при 26 °C (К) или в тех же условиях с добавлением 200 мкМ H_2O_2 , затем измеряли флуоресценцию DCF (а) и РІ-положительных клеток (б). Обработку гиспидином проводили при указанных концентрациях одновременно с воздействием пероксида водорода. * — различия с контролем достоверны при уровне значимости ($p \le 0.05$), # — различия с воздействием 200 мкМ H_2O_2 достоверны при уровне значимости ($p \le 0.05$). n=3. M±S.D.

Полученные нами данные позволяют предположить, что за проявление АОА фракции Ir-03 могут отвечать как отдельные соединения, входящие в состав данной фракции, так и их комплекс. При этом гиспидин, являющийся основным составляющим фракции и демонстрирующий наибольшие антирадикальные свойства в экспериментах in vitro (рис. 10), не проявил столь сильного действия на культуру клеток *T. salsuginea*. При этом нельзя не отметить, что гиспидин проявляет выраженное антиоксидантное действие на млекопитающих. Так, например, культурах клеток показано эффективное снижение внутриклеточных АФК при действии 70 мМ гиспидина на b-клетки MIN6N с ингибированием апоптоза (Lee et al., 2011), в клетках H9c2 (кардиомиобласты крысы) гиспидин из Phellinus linteus снижал апоптоз, индуцированный окислительным стрессом, без проявлений цитотоксичности, при этом гиспидин заметно усиливал экспрессию

антиоксидантных ферментов, таких как гемоксигеназа-1 и каталаза (Kim et al., 2014), выявлено, предварительная обработка клеток человека Сасо-2 гиспидином в концентрации 5-10 мкг/мл ингибировала генерацию АФК индуцированную акриламидом, а также сохраняла жизнеспособность клеток (Chen et al., 2014а). Выявление механизма антиоксидантного действия веществ на растительные клетки и идентификация действующих соединений, является перспективной для дальнейших исследований.

Таким образом, показано, что вещества, входящие во фракцию Ir-03 из мицелия I. rheades, снижают количество АФК, увеличивающихся при тепловом шоке клеток *T. salsuginea* или действии пероксида водорода. На основании ранее описанных данных (раздел диссертации 3.5, 3.5.2.) нами было сделано заключение, что стирилпироны являются веществами, обуславливающими это действие. В литературе описано действие гиспидина, составляющего основную часть фракции Ir-03, как вещества, снижающего количество АФК и подавляющего апоптоз, вызванный окислительным стрессом, на широком круге культур клеток млекопитающих. В то же время наши данные показывают, что действие чистого гиспидина на культуру незначительно растительных клеток при развитии окислительного повреждения, вызванного пероксидом водорода, и отсутствует при индукции окислительного стресса гипертермией. Можно предположить, что защитное действие фракции Ir-03 клетки *T*. salsuginea на оказывают стирилпироны, входящие в эту фракцию. Идентификация этих соединений может быть темой дальнейших исследований, так же как и исследование их влияния на клетки млекопитающих. Возможно, что это влияния многократно превосходит действие гиспидина, считающегося наиболее перспективным биологически активным соединением.

приложение 5

Антикомплементарная активность гетерополисахаридов мицелия I. rheades

Для биологического действия исследования индивидуальных полисахаридов мицелия I. rheades определяли их антикомплементарную активность на модели ингибирования гемолиза сенсибилизированных эритроцитов барана комплементом из сыворотки человека. Данный метод позволяет изучать способность полисахаридов участвовать в каскаде реакций системы комплемента. Необходимо отметить, что система комплемента является важной частью иммунной системы организма, включающей различные сывороточные белки, активируемые по каскадному принципу. Активация системы комплемента играет важную роль в инициации воспалительных и иммунных реакций, включая активацию лейкоцитов и дегрануляцию базофилов и тучных клеток. В результате было установлено, что полисахариды $Ir-05^{PS}-1$, $Ir-05^{PS}-2$ и $Ir-05^{PS}-5$ обладали слабой комплементфиксирующей активностью, демонстрируя в концентрациях 500 мкг/мл эффективность связывания в 12, 18 и 12%, соответственно (рис. 5. 1).

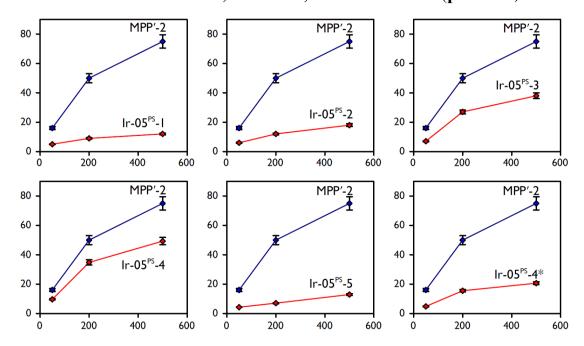


Рисунок 5. 1 — Антикомплементарная активность полисахаридов Ir- 05^{PS} -1, Ir- 05^{PS} -2, Ir- 05^{PS} -3, Ir- 05^{PS} -4, Ir- 05^{PS} -5 и Ir- 05^{PS} -4*

Примечание: Полисахарид сравнения (положительный контроль) MPP'-2 из *Mentha*×*piperita*. По оси абсцисс – концентрация, мкг/мл; по оси ординат – комплементфиксирующая активность, %.

Показатель связывания для полисахарида сравнения, применявшегося в качестве положительного контроля (полисахарид MPP'-2 из *Mentha* \times *piperita*) составил 75%. Полисахариды Ir-05^{PS}-3 и Ir-05^{PS}-4 показали наибольшую антикомплементарную активность, составившую в концентрации 500 мкг/мл 38 и 49%, соответственно.

Таким образом, учитывая данные о химическом составе исследованных утверждать, что биологическая полисахаридов, ОНЖОМ компонентов, представляющих собой глюканы (Ir-05^{PS}-1, Ir-05^{PS}-2, Ir-05^{PS}-5) была значительно ниже таковой полимеров, обогащенных галактозой – галактанов (Ir-05^{PS}-3, Ir-05^{PS}-4). Сравнительный анализ антикомплементарной активности сильноразветвленного галактана Ir-05^{PS}-4 и неразветвленного фрагмента его полисахаридного кора Ir-05^{PS}-4* указывал на низкую эффективность последнего (21% при 500 мкг/мл), что свидетельствовало о важной роли степени разветвления в проявлении биологической активности полисахарида. Настоящие результаты показали, что гетерогалактаны Ir-05^{PS}-4 и Ir-05^{PS}-3 являются анти-комплементарными полисахаридами, что указывает на их потенциальные иммуностимулирующие и противовоспалительные свойства. Наличие антикомплементарной активности экзополисахаридов показана для ряда макромицетов, в том числе и *I. obliquus* (Yang et al., 2007). Выявлено, что активация системы комплемента некоторых грибных полисахаридов усиливает активацию макрофагов, цитолиз, и противоопухолевую активность (Wasser, Weis, 1999). По литературным данным, некоторых полисахаридов выявлена корреляция между активацией противоопухолевым эффектом. системы комплемента И Следовательно, полученные нами данные могут предполагать, что Ir-05^{PS}-3 и Ir-05^{PS}-4 могут иметь потенциал в качестве веществ с противоопухолевыми свойствами.

приложение 6

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ Руководитель Департамента государственного контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники Минздрава России _______Ф.И.О. " " "

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ ПРЕДПРИЯТИЯ (Проект)

Трутовик лисий	ФСП	
Inonotus rheades	Вводится впервые	

Полученная в лаборатории на древесном субстрате (*Betula pendula Roth* (*Betulaceae*)) стерильная мицелиальная масса трутовика лисьего *Inonotus rheades* (Pers.) Karst. сем. Гименохетовых – *Hymenochaetaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Цельное сырье. Куски различной формы размером до 12 см. Ткань мицелия плотная, пористая, однородная по строению. Наружный слой мицелия темно-коричневого цвета, цельный, без трещин; внутренний слой — желтого цвета. Запах специфический слабый. Цвет водного извлечения светло-желтый. Вкус водного извлечения специфический.

Измельченное сырье. Кусочки мицелия различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет сырья желтовато-коричневый. Запах специфический слабый. Цвет водного извлечения светложелтый. Вкус водного извлечения специфический.

Порошок. Кусочки сырья, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Цвет желтовато-коричневый. Запах специфический слабый. Цвет водного извлечения светло-желтый. Вкус водного извлечения специфический.

Микроскопические признаки. Цельное и измельченное сырье. При рассмотрении поперечного и продольного среза обнаружено мицелий состоит из септированных, ветвящихся однородно распределеных гиф, большая часть стенок которых пигментирована, пряжки отсутствуют (рис 6.1 а, б).

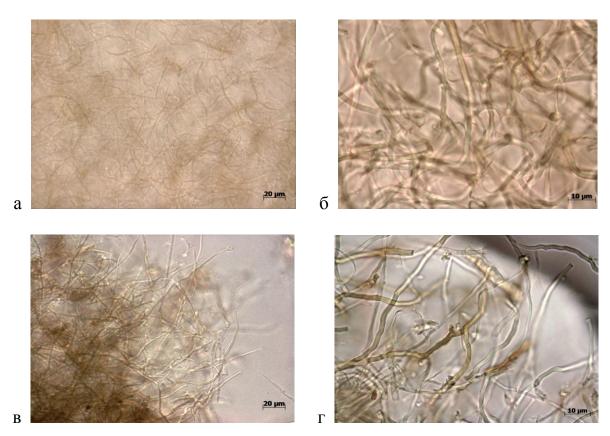


Рисунок 6.1. Фрагменты микроскопического строения мицелия трутовика лисьего.

а — цельное сырье, увеличение $\times 400$, б — цельное сырье, увеличение $\times 1000$, в — порошок, увеличение $\times 400$, г — порошок, увеличение $\times 1000$.

Порошок. При рассмотрении микропрепаратов порошка мицелия по поверхности и по краям кусочков видны ветвящиеся однородно

распределеные гифы, часть их которых пигментирована полностью (рис 6.1 в, Γ).

Примечание 1.

Для проведения световой микроскопии использовали тонкие поперечные и продольные срезы сырья. Полученный срез помещали на предметное стекло в каплю спирта этилового 70%. Для приготовления препаратов порошка кусочки сырья помещали в небольшое количество спирта этилового 70%, перемешивали 5 минут, после чего помещали на предметное стекло.

Определение основных групп биологически активных веществ.

- 1. Определение полифенольных соединений. В коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл помещают 0,5 г сырья, измельченного до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, прибавляют 10 мл этилового спирта 70%, присоединяют обратный холодильник, кипятят на водяной бане в течение 15 мин и фильтруют. К 1 мл полученного извлечения прибавляют 0,5 мл раствора Фолина и 0,5 мл натрия карбоната раствора 10%, появляется темно-синее окрашивание (полифенольные соединения).
- **2.** Определение гиспидина. Время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора, полученного при количественном определении методом ВЭЖХ, должно соответствовать времени удерживания основного пика на хроматограмме раствора СО гиспидина.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 5%.

Зола общая. *Цельное сырье*, *измельченное сырье*, *порошок* – не более 10%.

Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте. «*Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 3%»

Измельченность сырья. *Цельное сырье*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, – не более 3%.

Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, — не более 3%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, — не более 5%.

Порошок: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, — не более 7%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, — не более 5%.

Посторонние примеси

Органическая примесь. Для *цельного сырья* и *измельченного сырья* остатков древесины должно быть не более 1%.

Минеральная примесь. Для *цельного сырья*, *измельченного сырья* и *порошка* остатков древесины должно быть не более 0,5%.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. Для цельного сырья, измельченного сырья и порошка мицелия трутовика лисьего сухого показатель «Содержание гиспидина» должен быть не менее 0,5%.

Методика количественного определения гиспидина в мицелии трутовика лисьего сухом. *Приготовление растворов*. *Раствор СО гиспидина*. Около 10,0 мг (точная навеска) СО гиспидина растворяют в

спирте 96% в мерной колбе вместимостью 10 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают. Срок годности раствора не более 1 мес. при хранении в плотно укупоренной таре в прохладном, защищенном от света месте.

Проверка пригодности хроматографической системы. Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- фактор асимметрии пика гиспидина должен находиться в пределах от 0,8 до 1,5;
- эффективность хроматографической колонки должна быть не менее 5000 теоретических тарелок.

Приготовление испытуемого раствора. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 40 мг (точная навеска) измельченного сырья помещают в пробирку Эппендорфа вместимостью 2 мл, прибавляют 1 мл спирта 70% и нагревают в ультразвуковой ванне при 50°С в течение 40 мин. После охлаждения пробирку центрифугируют. Около 100 мкл супернатанта филтруют через нейлоновый фильтр (с размером пор 0,45 мкм) (испытуемый раствор).

Условия хроматографирования.

Колонка: нержавеющая сталь, 70×2 мм, эндкеппированный октадецилсилика (С18) для хроматографии (5 мкм).

Подвижная фаза: A - 0.2 M раствор лития перхлората в 0,006 M перхлорной кислоте. B – ацетонитрил для хроматографии.

Способ элюирования: программа градиента

Время, мин	А, об.%	В, об.%
0 - 10	$50 \rightarrow 0$	$50 \rightarrow 100$
10 - 20	0	100

Скорость потока, мл/мин: 0,15.

Температура колонки, °C: 35.

Детектор: УФ-спектрофотометрический или диодная матрица.

Длина волны, нм: 250.

Объем вводимой пробы, мкл: 1.

Время регистрации хроматограммы, мин: 20.

Хроматографируют попеременно испытуемый раствор и раствор СО, получая не менее 3 хроматограмм. Результаты считаются достоверными если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Расчет содержания гиспидина проводят методом внешнего стандарта.

Содержание гиспидина в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times a_0 \times 1}{S_0 \times a \times 1} \cdot \frac{100 \times 100}{100 - W} \times \frac{P}{100} = \frac{S \times a_0}{S_0 \times a} \times \frac{100 \times P}{100 - W},$$

где S – площадь пика гиспидина на хроматограмме испытуемого раствора;

 S_0 – площадь пика гиспидина на хроматограмме СО гиспидина;

a – навеска сырья, мг;

 a_0 – навеска СО гиспидина, мг;

P – содержание основного вещества в СО гиспидина, %;

W – влажность сырья, %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

приложение 7

УТВЕРЖДАЮ

Проектор по научной работе и инновационной деятельности ФГБОУ ВО

«Иркутский национальный исследовательский технический университет»

ехнический университет» Е.Ю. Семенов 2» ембаре 2019 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование разработки: технология получения сухого мицелия трутовика лисьего.

Кем предложено: ведущий инженер Горностай Т.Г.

Где внедрено: кафедра химии и пищевой технологии им. проф. В.В. Тутуриной, научно-исследовательская лаборатория прикладной химии и биотехнологии.

Результаты применения предложения за период: с 4.09.2018 г. по настоящее время.

Эффективность внедрения: результаты разработки технологии получения сухого мицелия трутовика лисьего используются в учебном процессе по дисциплине химия природных соединений.

«<u>22</u>» <u>ОГ</u> 2019 г.

С.Н. Евстафьев

Зав. каф. химии и пищевой технологии им. проф. В.В. Тутуриной ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет», д.х.н., профессор

УТВЕРЖДАЮ:

Проектор по научной работе и инновационной деятельности

ФГБОУ ВО

«Иркутский национальный исследовательский технический университет»

Е.Ю. Семенов

enfare 2019 r.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Наименование разработки: результаты разработки и валидации методики количественного определения гиспидина в грибном мицелии методом ВЭЖХ.

Кем предложено: ведущий инженер Горностай Т.Г.

Где внедрено: кафедра химии и пищевой технологии им. проф. В.В. Тутуриной, научно-исследовательская лаборатория прикладной химии и биотехнологии.

Результаты применения предложения за период: с 4.09.2018 г. по настоящее время.

Эффективность внедрения: результаты разработки и валидации методики количественного определения гиспидина в грибном мицелии методом ВЭЖХ используются в учебном процессе по дисциплине химия природных соединений.

«21» or 2019 r.

С.Н. Евстафьев

Зав. каф. химии и пищевой технологии им. проф. В.В. Тутуриной ФГБОУ ВО «Иркутский национальный исследовательский технический университет», д.х.н., профессор

208