

О. Ф. Сенюк, Л. Ф. Горовой*, Л. А. Паламар, Н. И. Круль

*Институт проблем безопасности атомных электростанций
НАН Украины, 07270 Чернобыль*

**Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, 03143 Киев*

ВЛИЯНИЕ МЕЛАНИН-ГЛЮКАНОВОГО КОМПЛЕКСА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ГРИБОВ ТРУТОВИКА, НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНИ САМОК МЫШЕЙ ЛИНИИ ICR

Исследовали влияние пожизненного употребления в виде питья мощного антиоксиданта меланина в составе меланин-глюканового комплекса (МГК) из трутовика *Fomesfomentarius* на продолжительность жизни и спонтанный канцерогенез у мышей линии ICR. Результаты этого исследования свидетельствуют о способности МГК противодействовать развитию не только опухолевой болезни, но и значительно увеличивать продолжительность жизни мышей этой линии, у которых не возникли спонтанные опухоли и, согласно данным литературы, могли иметь место множественные соматические системные заболевания, не связанные с канцерогенезом.

Ключевые слова: старение, опухолевая болезнь, продолжительность жизни, антиоксиданты, меланин.

Сегодня наиболее популярными и приемлемыми для объяснения процесса старения считаются свободно-радикальная теория и теломерная гипотеза. Первая почти одновременно была выдвинута Д. Харманом [33] и Н. М. Эмануэлем [21], а основоположником теломерной гипотезы считается А. М. Оловников, сформулировавший теорию маргинотомии [44], которую со временем трансформировал в редусомную гипотезу [14].

За 70 лет жизни человека организм производит около одной тонны радикалов кислорода, и только 2–5 % вдыхаемого с воздухом кислорода

превращается в его токсические радикалы [24]. Подавляющее большинство из них нейтрализуется еще до того как успеют повредить те или иные компоненты клетки. Так, из каждого миллиона образующихся супероксидных радикалов от ферментной защиты ускользает не более четырех [2]. Тем не менее, показано, что за сутки в клетке крысы может возникать до 10^4 повреждений ДНК, вызванных активными формами кислорода (АФК), а до 10 % молекул белка могут иметь карбонильные модификации (результат окисления аминокислот) [24, 62]. Свободно-радикальная теория объясняет не только механизм старения [8], но и широкий круг связанных с ним патологических процессов (болезни Альцгеймера и Паркинсона, старческую катаракту [22, 57], атеросклероз [38, 66], гипертензию [47], диабет [32], рак [1, 67] и некоторые другие). Согласно этой теории, продуцируемые главным образом в митохондриях клеток молекулы супероксида, H_2O_2 , гидроксильного радикала и, возможно, синглетного кислорода повреждают клеточные макромолекулы ДНК, белки, липиды [53]. При старении в клетках доминирует накопление неустраняемых продуктов обмена веществ и свободных радикалов, повреждающих макромолекулы (ДНК, белки и др.) и хромосомы, а также нарушающих процессы репарации ДНК, зависящей от уровней фермента поли(АДФ-рибозы)-полимеразы-1 (*PARP-1*) [26]. Патологические последствия возникают при чрезмерном накоплении АФК, пероксидов и их вторичных продуктов, то есть при состоянии, называемом обычно оксидативным стрессом. С одной стороны, с АФК связывают развитие у человека широкого спектра хронических заболеваний, а с другой, показано, что высокие концентрации АФК и липидных гидропероксидов ингибируют синтез ДНК и деление клеток, а также могут активировать апоптоз, что полезно для организма, так как ценой гибели части клеток предупреждается прогрессирование злокачественных процессов и гибель всего организма [67]. Совсем недавно показано, что АФК представляют особый класс вторичных посредников, образование которых регулируется при помощи набора гормонов, цитокинов, ростовых факторов и т. п. [18, 28]. АФК стимулируют накопление в клетке циклонуклеотидов — цАМФ и цГМФ, вызывают накопление Ca^{2+} в цитозоле и стимуляцию фосфорилирования белков в результате активации протеинкиназ (особенно протеинкиназы С) и протеинтирозинкиназ и ингибирования протеинфосфатаз, а также активируют белок *Ras*, играющий важную роль в передаче сигналов в ядро клетки. АФК могут опосредовать функции гормонов. Они накапливаются при воздействии факторов роста клеток, цитокинов, инсулина, паратгормона, витамина Д₃. Эффекты этих гормонов модифицируются под влиянием АФК, снижаются или блокируются антиоксидантами. АФК и липидные гидропероксиды в низких концентрациях индуцируют экспрессию генов (в том числе генов раннего ответа и других протоонкогенов) и деление клеток. H_2O_2 , накапливающаяся при инвазии вирусов и бактерий, активирует транскрипционный фактор *NFκB* с последующей индукцией ряда цитокинов и иммунных рецепторов и стимуляцией иммунных и воспалительных ответов, а также индукцией

белков острой фазы и адгезии. Важная роль АФК в защите организма очевидна: она включает в себя не только фагоцитоз опасных клеток, но и запуск других воспалительных реакций и иммунных процессов [10].

Согласно теломерной гипотезе, в хромосомах есть особые концевые участки — теломеры, которые немного укорачиваются после каждого удвоения хромосомом и являются причиной потери клеткой способности делиться с последующим снижением ее жизнеспособности [36]. Совсем недавно было обнаружено, что оксидативный стресс также может влиять на утрату теломер, значительно ускоряя этот процесс в определенных тканях [69]. И хотя в 2003 г. сторонники этих теорий отказались рассматривать окислительный стресс [20] и укорочение теломер [15] как первопричину нормального старения, эти концепции приемлемы для объяснения механизмов патологического старения, формирующегося на фоне ряда заболеваний с выраженными воспалительными и нарушенными обменными процессами, которые, в свою очередь, связаны с повышенным образованием высоких концентраций токсичных АФК.

Клеточное старение, замеченное и описанное Л. Хейфликом в 1961 г. как потеря способности клеток к пролиферации после (50 ± 10) делений [35], вызывается самоускоряющимся процессом повреждения генома, когда нарушения в ДНК ведут к выбросу активных веществ, вызывающих новые нарушения в ДНК-коде. Из-за этого ткани организма перестают регенерировать, постепенно все хуже и хуже выполняют свои функции. Вместе с тем, нарушение механизмов клеточного старения приводит к бесконтрольному размножению клеток, то есть к раковым заболеваниям. Старение и рак идут параллельно. Опухоли развиваются преимущественно в пожилом возрасте: 70 % всех раков возникает после 50 лет [1].

Таким образом, для восстановления нормального функционирования стареющего организма среди широкого спектра антиоксидантных средств целесообразно отобрать те, которые не только снижают уровень свободных радикалов в его внутренних средах, но и способны одновременно нормализовать состояние системы окислительного гомеостаза. Это должны быть вещества естественного происхождения по следующим причинам: естественные метаболиты высокоспецифичны в отношении отдельных систем клеточного обмена, легко адаптируются к системам транспорта через клеточную мембрану и не нарушают регуляцию клеточного метаболизма [6].

Трутовые грибы, будучи мощным источником меланиновых пигментов, считаются наиболее перспективными для создания лекарственных антиоксидантных средств. К сожалению, наши практикующие врачи пока еще мало осведомлены о целебных свойствах этих грибов, тогда как в странах Индокитая ежегодный объем производства грибов составляет уже многие миллионы тонн. *Inonotus obliquus* — трутовик скошенный (чага), наиболее известный лекарственный гриб в народной медицине славян, использовавших его при опухолях, туберкулезе, язве желудка, гастритах, болезнях печени, сердца. На его основе создан даже противоопухолевый препарат Бефунгин, но этот гриб достаточно редкий. На территории Украины широко распространен *Fomes fomentarius* — тру-

товик настоящий, который в нашей народной медицине с успехом применяется как ранозаживляющий и помогающий при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. *Ganoderma applanatum* — трутовик плоский (рейши в Японии и линджи в Китае) — считается почти панацеей от многих острых и хронических заболеваний с мощным обезболивающим, седативным, тонизирующим эффектом и высокой онкостатической, противовирусной (в том числе против ВИЧ-инфекции), антибактериальной и антипаразитарной активностью.

Меланины относятся к группе высокомолекулярных (от 2 до 200 кДа) пигментов разнообразного, нерегулярного химического строения, которые образуются в результате совокупности окислительно-восстановительных и кислотно-основных реакций, сопровождающих полимеризацию фенолов в живой клетке. Они широко распространены в природе: в грибах, растениях, в организме животных и человека, и представляют собой естественные полимеры с сильно развитой системой сопряженных связей. По химическому строению среди меланинов выделяют эумеланины (черные пигменты животного, реже растительного происхождения, являются продуктами полимеризации тирозина или ДОФА, структурный элемент которых представлен индол-(5,6)-бензохиноном), феомеланины (продукты сополимеризации тирозина и цистеина желтого, красного или коричневого цвета, которые встречаются только у животных) и алломеланины (черно-коричневые пигменты высших растений и грибов, биополимеры нафталинового или катехольного типов). Грибные меланины относятся к подклассу алломеланинов пентакетидной природы [11].

Характерной особенностью меланинов является специфическая реакционная способность, обусловленная не только различными функциональными группами, но и существованием парамагнитных центров (ПМЦ), возникающих как при окислении органического вещества в форме стабильных (феноксильных или семихинонных) радикалов на отдельных фрагментах полимерных цепей, так и при комплексообразовании донорных атомов функциональных групп парамагнитными ионами переходных металлов.

Природные меланиновые пигменты растительного, грибного и животного происхождения отличаются низкой токсичностью и выступают не только в качестве фотоэкрана и радиопротектора. В зависимости от особенностей химического строения они обладают широким спектром свойств, включая антиоксидантную [6, 37, 56], генопротекторную [12, 13, 52], противоопухолевую [16], антибактериальную, вируцидную, антифунгальную [35] и гепатопротекторную [50] активность. Существует мнение, что кроме непосредственных воздействий на окислительно-восстановительный гомеостаз меланины также могут косвенно действовать на систему естественной резистентности; при этом механизм действия подобен действию биологически активных полисахаридов, когда имеет место стимуляция ретикулоэндотелиальной системы высокомолекулярными структурами меланина [8].

Цель работы состояла в исследовании влияния пожизненного употребления в виде питья мощного антиоксиданта меланина в составе

меланин-глюканового комплекса (МГК), выделенного из трутовика *Fomes fomentarius* на продолжительность жизни и спонтанный канцерогенез у мышей линии ICR (*Institute of Cancer Research*).

Материал и методы

Получение МГК и очищенного меланина из трутового гриба *F. fomentarius*. В качестве потенциального средства, способного противодействовать процессам старения через снижение избыточного количества свободно-радикальных метаболитов и нормализацию окислительного гомеостаза, использовали меланин в составе водорастворимого МГК. Для его получения препарат клеточной стенки *F. fomentarius* выдерживали в дистиллированной воде в течение суток при температуре 90–95 °С, пока жидкая фракция приобретала насыщенный коричневый цвет. Жидкость упаривали в 20 раз по объему при температуре 60 °С, а концентрат сушили лиофильным способом до образования сухого порошка при 40 °С. Полученный таким образом порошок имел черный цвет, смолянистую консистенцию и растворялся в воде при комнатной температуре в любых соотношениях.

Разделение МГК на фракцию меланинов и β-глюканов осуществляли осаждением меланинов при подкислении среды до рН 2 соляной кислотой. Меланины отделяли при помощи центрифугирования. Осадок черного цвета растворяли в воде при рН 8 и снова осаждали путем подкисления среды до рН 2, повторив процедуру трижды, после чего осадок меланинов высушивали. Соотношение β-глюканов и меланинов в полученном субстрате составило 1:4.

Изучение антиоксидантных свойств очищенного меланина и МГК.

Антиоксидантные свойства меланин-глюканового и очищенного меланинового препаратов, полученных из клеточных стенок *F. fomentarius*, оценивали по изменению скорости реакции пероксидазного окисления бензидина, которое проводили в 1 М цитратно-ацетатном буфере при рН 5,5. Реакционная смесь содержала $7 \cdot 10^{-11}$ М пероксидазы, 0,5 мМ бензидина и 0,1 мМ H_2O_2 . Результаты реакции определяли по накоплению окрашенных продуктов. Препараты вносили в реакционную смесь в концентрации 50, 100, 150, 200 и 250 мкг/мл и определяли накопление продуктов окисления ароматических аминов по изменению оптической плотности поглощения на спектрометре СФ-26. Интенсивность снижения скорости реакции (I) рассчитывали по формуле

$$I = \frac{\Delta A \cdot 100}{\Delta A'}$$

где ΔA — плотность поглощения реакционной смеси без ингибитора (контрольная проба), $\Delta A'$ — плотность поглощения реакционной смеси с ингибитором (опытная проба).

Электронный парамагнетизм сухих образцов МГК исследовали на спектрометре *Varian E-112* (США).

Определение токсичности МГК в *in vitro* и *in vivo* тест-системах.

Острое токсическое действие изучали *in vitro* на культуре лимфоцитов периферической крови мыши (линия *Balb/c*), экспонируя их в течение 24 часов в питательной среде *RPMI* 1640 с 5 % аутологичной сыворотки крови, содержащей широкий диапазон концентраций МГК — от 0,5 до 5000 мкг/л. Для определения содержания погибших клеток в пробирки с культивируемыми лимфоцитами (0,1 мл) добавляли 2 % раствор трипанового синего в соотношении 4:1, каплю смеси переносили на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и в световом микроскопе подсчитывали количество окрашенных в синий цвет (неживых) клеток и неокрашенных (живых) клеток. Реакцию оценивали в процентах.

Острую токсичность МГК *in vivo* изучали в модельной системе на мышах линии *Balb/c* (по 10 животных в группе), которым внутривенно вводили по 1 мл МГК в изотоническом растворе в разных концентрациях — 200, 100, 50, 101 и 1 мг/л.

Продолжительность жизни изучали у самок белых мышей линии *ICR*, созданной в 1948 г. Т. С. Хошка в Центре рака (Филадельфия, США). Эти мыши характеризуются быстрым ростом и относительно большой массой тела (за семь недель самки достигают 26 г, а самцы — 30 г), ранним половым созреванием и высокой плодовитостью (в помете в среднем 15 мышат) [4, 34]. Эта порода широко используется для изучения многих биологических проблем в онкологии, инфектологии и фармакологии. Мышей содержали в виварии Института проблем безопасности атомных электростанций НАН Украины согласно международным рекомендациям. В опыт брали самок в возрасте от 8 до 10 недель массой тела 24–26 г.

Животные были подразделены на следующие группы:

1 группа (контроль 1, $n = 172$) — мыши, содержащиеся на обычном рационе и получавшие в качестве питья воду;

2 группа ($n = 168$) — мыши, содержащиеся на обычном рационе, но получавшие в качестве питья водный раствор МГК (1,5 г/л) на протяжении дальнейшей жизни;

3 группа ($n = 100$) — мышата, рожденные самками 2 группы, которые после отсадки содержались на обычном рационе и получали в качестве питья водный раствор МГК, как и мыши 2 группы;

4 группа (контроль 2, $n = 100$) — мышата, рожденные самками 2 группы, которые после отсадки содержались на обычном рационе, а в качестве питья получали воду.

Контрольные и опытные группы мышей наблюдались параллельно, были аналогичного возраста и пола. У животных всех групп определяли не только продолжительность жизни, но и время появления макроскопических признаков опухолевой болезни.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Сравнение антиоксидантной активности МГК и выделенного из него меланина. Исследование антиоксидантной активности МГК и очищенного меланина выявило, что в первом случае при концентрации препарата 50 мкг/мл скорость реакции пероксидазного окисления бензидина снижалась на 60 %, а в другом — значительно меньше (на 10 %). При использовании концентрации в два раза выше (100 мкг/мл) МГК снижал скорость реакции пероксидазного окисления бензидина на 80 %. При этом дальнейшее увеличение концентрации МГК (до 250 мкг/мл) уже мало отражалось на процессе окисления. Препарат очищенного меланина показал почти прямую зависимость влияния концентрации на скорость пероксидазного окисления бензидина. При максимальной концентрации 250 мкг/мл значения этого показателя в описанных условиях снизились на 50 %. Для полученного указанным способом меланина, как и для всех меланинов, характерна плохая растворимость в воде и образование комплексов с аминокислотами, белками, катионами металлов, антибиотиками. Возможно, более высокие значения антиокислительной активности МГК объясняются большим содержанием функциональных групп, ПМЦ и развитой системой сопряженных двойных связей, частично разрушающихся в процессе очистки меланина. Учитывая полученные результаты, все дальнейшие исследования были выполнены с использованием в качестве антиоксидантного средства меланина в составе МГК.

Результаты оценки физико-химических свойств МГК из разных видов трутовиков. С целью сравнения физико-химических свойств материала из *F. fomentarius* с материалами, получаемыми из других трутовых грибов, дополнительно изучали сухие образцы МГК из *I. obliquus* и *G. applanatum*.

Как видно из данных табл. 1, меланин в составе МГК из *I. obliquus* содержал всего 0,6 % азота, что характерно для алломеланинов. Относительно высокое содержание азота в меланинах из МГК *F. fomentarius*, *G. applanatum* (5,6 % и 6,0 %) может быть связано как с азотсодержащими гетероциклами, так и с аминокислотами и пептидами. Антиоксидантная активность меланинов связана сокислительно-восстановительными свойствами, а также с наличием большого количества ПМЦ [3].

Таблица 1

Физико-химические свойства меланинов из трутовых грибов

Источник меланина	Элементный состав, %					$\epsilon^{0,001\%}$ в 0,01N NaOH				ПМЦ 10^{17} спин/г
	С	Н	N	О	H/C	УФС 240 нм	УФВ 285 нм	УФА 360 нм	465 нм	
Трутовик плоский <i>Ganoderma applanatum</i>	46,3	6,4	6,0	30,8	0,14	0,13	0,10	0,03	0,01	8,7
Трутовик настоящий <i>Fomes fomentarius</i>	47,4	6,2	5,7	34,9	0,13	0,16	0,12	0,06	0,02	5,9
Трутовик скошенный <i>Inonotus obliquus</i>	49,4	4,8	0,6	38,7	0,10	0,30	0,20	0,09	0,03	3,5

Токсическая активность МГК в системах *in vivo* и *in vitro*. Изучению биологического влияния МГК из *F. Fomentarius* на продолжительность жизни мышей линии *ICR* закономерно предшествовало определение его острой токсичности, которую оценивали в культуре лимфоцитов периферической крови мыши (линии *Balb/c*) на протяжении 24 часов в питательной среде с широким диапазоном концентраций МГК — от 0,5 до 5000 мкг/л. Полученные данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют, что в диапазоне изучаемых концентраций исследуемая субстанция не проявляет видимых лимфотоксических эффектов, за исключением первой самой высокой концентрации — 5000 мкг/л.

Таблица 2

Жизнеспособность лимфоцитов периферической крови мышей линии *Balb/c* после 24-часовой экспозиции с МГК из *F. fomentarius*

Исследуемые клетки	Концентрация препарата МГК, мкг/л				
	5000	500	50	5,0	0,5
Лимфоциты крови (количество живых клеток), %	72	93	95	97	98

Иная картина наблюдалась при оценке острой токсичности МГК *in vivo*. Данные по 24-часовой выживаемости мышей линии *Balb/c* после получения различных доз МГК приведены в табл. 3.

Таблица 3

Влияние однократной внутривенной инъекции различных доз МГК на смертность мышей линии *Balb/c*

Показатель	Концентрация МГК, мг/л				
	200	100	50	10	1
Смертность, %	Через 16 ч 100	Через 16 ч 100	Через 16 ч 40	Через 24 ч 0	Через 24 ч 0

Полученные результаты свидетельствуют о способности МГК оказывать острое токсическое воздействие, приводящее к тотальной смертности в группах мышей уже на протяжении 16 часов после инъекции двух первых доз вещества — 200 и 100 г/л. В группе мышей, получивших дозу МГК 50 мг/л, через 16 ч погибло 40 % мышей, а через 24 ч погибли все животные. Инъекции двух последних доз (10 и 1 мг/л) за период наблюдения не вызывали падежа животных. Исходя из этих данных, мышам в качестве питья пожизненно давали водный раствор МГК с концентрацией 1,5 мг/л.

Влияние МГК на продолжительность жизни мышей линии *ICR*. Результаты изучения влияния пожизненного употребления в качестве питья водного раствора МГК на длительность жизни мышей линии *ICR* представлены на рис. 1. Показано, что под влиянием приема этого мощного антиоксиданта она увеличилась по сравнению с контрольной группой в среднем на 48 сут (~10 %) и составила (480 ± 69) сут. При этом мыши, рожденные от самок, получавших водный раствор МГК, и

получавшие это вещество пожизненно после отсадки, по сравнению с контролем жили еще дольше — в среднем на 79 сут. Следует отметить, что у мышей контрольной группы 2 исследуемые характеристики практически не отличались от аналогичных показателей мышей 1 группы контроля — соответственно (441 ± 59) сут и (432 ± 41) сут. Поэтому графические данные контрольной группы 2 рис. 1 не приводятся. Полученные нами результаты свидетельствуют о положительном влиянии пожизненного приема антиоксиданта меланина в составе МГК на продолжительность жизни самок мышей линии *ICR*. Тем не менее, мы не считаем правомерным делать вывод о важном влиянии окислительного стресса на процессы нормального старения. Углубленный анализ качества здоровья наблюдаемых нами мышей свидетельствует о том, что их старение реализуется на фоне многих заболеваний. Известно, что у самок мышей этой линии часто (в 55 % случаев) возникают спонтанные опухоли, а также множественные новообразования (в 28 % случаев), составляя в среднем 1,7 опухоли на одну мышшь. При этом преобладают опухоли легких (23 %), за ними следуют лимфоретикулярные новообразования (20 %) и рак молочной железы (от 14 % до 23 %) [29], которые сопровождаются появлением видимых образований + ткани, очень удобных для длительного наблюдения. В нашем исследовании спонтанные опухоли различной локализации возникли у 60 % наблюдаемых мышей, что совпадает с данными литературы. Известно также, что в патогенезе опухолевой болезни важное значение имеет окислительный стресс, индуцирующий появление малигнизированных клеток и наличие которого оправдывает назначение антиоксидантной терапии. Поэтому положительное влияние антиоксиданта на продолжительность жизни мышей-опухоленосителей вполне объяснимо.

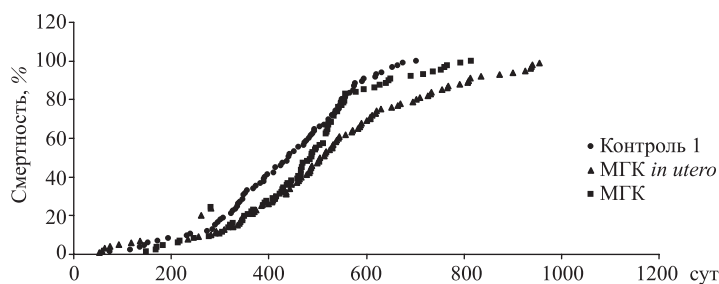


Рис. 1. Влияние МГК на смертность самок мышей линии *ICR*. МГК *in utero* — мыши, употреблявшие водный раствор МГК в качестве питья и рожденные самками, пожизненно получавших вместо воды такой же раствор МГК.

Влияние МГК на развитие спонтанной опухолевой болезни у мышей линии *ICR*. Было установлено, что количество спонтанно возникших опухолей у мышей, получавших после отсадки водный раствор МГК на протяжении всей жизни (57 % случаев), практически не отличалось как от аналогичного показателя мышей контрольных групп 1 и 2 (60 % и

58 %, соответственно), содержащихся без МГК, так и мышей, рожденных от самок, которые употребляли МГК всю жизнь (56 % случаев), получавших пожизненно МГК в виде раствора. Очевидно, антиоксидантная терапия с использованием низких доз МГК априори не может кардинально повлиять на генетически запрограммированную реализацию опухолевой болезни и снизить количество возникающих опухолей. Но, как показывает наш опыт, использование антиоксидантных веществ отодвигает сроки ее проявления, существенно увеличивая латентный период (рис. 2). Так, в группах мышей, которые получали МГК, выявление опухолевых узлов разной локализации было существенно отсрочено (в среднем на 40 сут). Если у мышей контрольной группы первые макроскопически идентифицируемые опухолевые узлы возникали на (411 ± 59) -е сут, то у мышей, пожизненно получавших МГК после отсадки, и у мышей, рожденных самками, всю жизнь получавших этот антиоксидант, срок макроскопического выявления опухолей был большим и составил, соответственно (451 ± 69) -е сут и (451 ± 48) -е сут. При этом время появления первых макроскопически различимых опухолевых узлов у мышей контрольной группы 2 составило (418 ± 78) -е сут и практически не отличалось от аналогичного показателя мышей контрольной группы 1.

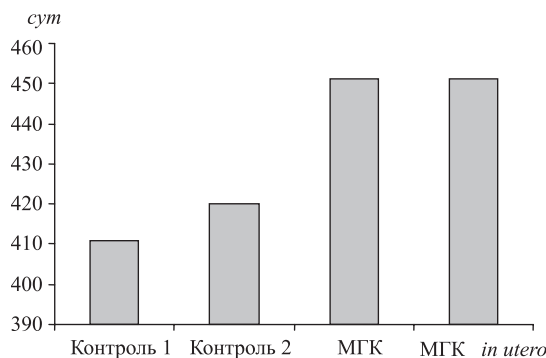


Рис. 2. Возраст диагностирования макроскопически определяемых опухолевых узлов у мышей линии *ICR* разных групп.

По данным литературы известно, что у 63 % мышей линии *ICR* не развиваются спонтанные опухоли [29]. Для более глубокого понимания качества здоровья этих животных необходимо четкое признание того факта, что отсутствие опухолевой болезни автоматически не гарантирует отсутствия других заболеваний. Интегральная картина качества здоровья этих мышей, проживших жизнь без опухолевой патологии, согласно исследованиям различных авторов выглядит следующим образом. Они имеют рецессивную мутацию *Pde6brd1*, связанную с дегенерацией сетчатки глаз, которая наблюдается в 9,8 % случаев; при этом в 4,2 % случаев выявляются рубцы на роговице и в 2,2 % случаев — фокальная катаракта [45]. Имеются сообщения о чувствительности мышей

этой линии к *Klebsiella pneumoniae* [31], *Salmonella ulteridies* [27], *Helicobacter bilis* [54], *Herpes Simplex Virus* [58], *Coxsackie virus* [40] и к другим возбудителям, вызывающих воспалительно-дегенеративные заболевания в разных органах и тканях [56], в частности в почках [25, 43], кишечнике [41], костной ткани [68], сердечной мышце, кровеносных сосудах, коже, легочной ткани [29]. У них выявляется неопухоловая патология — амилоидоз, сердечно-сосудистые заболевания, невирусные гепатиты (абсцессы, билиарные ангиоэктазии, перипортальные гепатиты, микроинфаркты), хронические язвенные дерматиты, заболевания легких (интерстициальные пневмонии, ассоциированные с вирусом Сендай, гнойные бронхопневмонии), гломерулонефрит с гломерулосклерозом, гемолитические анемии с эритроидной гиперплазией в селезенке. Болезни легких наблюдаются в 24,1 %, в основном у молодых особей, когда от заболеваний почек (31,2 %) и сердечно-сосудистой системы (10,2 %) страдали в основном животные старшего возраста. При этом на одну мышшь приходится около трех неопухоловых заболеваний одновременно [29].

Наша оценка продолжительности жизни мышшей с опухоловой болезнью и без нее выявила неожиданный факт: как видно на рис. 3, продолжительность жизни мышшей-опухоленосителей — (462 ± 53) сут — была на 20 % больше (на 82 сут) по сравнению с мышшами без опухолей — (380 ± 47) сут. Следует особо подчеркнуть, что в патогенезе перечисленных болезней важную роль играют системные воспалительные процессы, ассоциированные с инфекцией. Известно, что необходимым условием прогрессирования опухолового роста является депрессия иммунного воспаления. Очевидно, это обстоятельство может снижать интенсивность системной воспалительной реакции и пролонгировать сроки манифестации инфекционно-воспалительных процессов в различных органах и тканях и (как ни парадоксально это звучит) увеличивать продолжительность жизни стареющих мышшей-опухоленосителей линии *ICR* по сравнению с мышшами, у которых развились системные инфекционно-воспалительные заболевания.

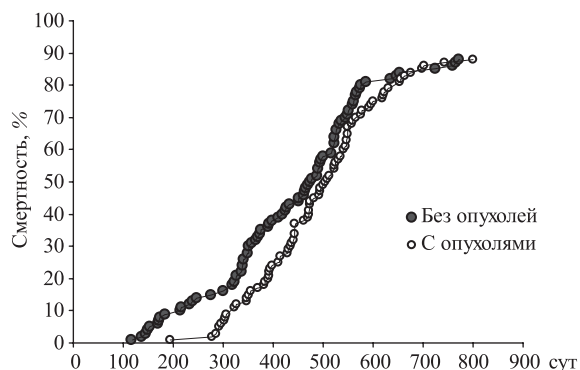


Рис. 3. Смертность мышшей-опухоленосителей и не имеющих опухоловой болезни.

Анализ данных рис. 3 показывает, что у мышей, проживших без опухолей и получавших МГК в течение всей жизни, ее продолжительность — (469 ± 47) сут — была увеличена на 89 сут и на 135 сут в группе мышей, рожденных от самок, употреблявших всю жизнь МГК, и также пожизненно получавших МГК в виде питья — (515 ± 59) сут. Очевидно, что попытка оптимизировать здоровье самок при помощи МГК не оказала видимого влияния на качество здоровья потомства, которому после отсадки в рацион не вводили МГК. Продолжительность жизни мышей контрольной группы 2, у которых не развился опухолевый процесс, составила (372 ± 62) сут и была практически такой же, как у мышей контрольной группы 1.

Хронические инфекционно-воспалительные процессы нарушают состояние системы окислительно-восстановительных реакций, которая преобразует энергию, накопившуюся в углеводах и липидах, в энергию макроэргических соединений. Последняя необходима для реакций синтеза биомолекул, детоксикации продуктов жизнедеятельности, активного транспорта молекул и ионов, поддержки мембранного потенциала. Наличие таких механизмов является залогом эффективной адаптации клеток к меняющимся условиям внеклеточной среды, связанных с различными инфекционными агентами (вирусами, бактериями, грибами, паразитами и т. д.), канцерогенезом, ионизирующими излучениями, токсическими воздействиями. Известно, что любой повреждающий фактор вызывает развитие окислительного стресса и изменяет активность специфических генов [23, 27]. При этом роль сенсорных молекул выполняют активные формы кислорода и азота, а также продукты перекисного окисления липидов, которые необходимо рассматривать в качестве субклеточных посредников в регуляции экспрессии генов и трансдукции сигналов. Антиоксиданты (в частности, меланины из грибных МГК), изменяя редокс-потенциал, могут вызвать активацию генов и метаболических путей, в частности влиять на процессы преобразования коллагена, посттрансляционный контроль метаболизма ферритина, транскрипционные факторы (например, *Myb*, *Egr-1*). Усиление окислительных процессов активировало некоторые протоонкогены. Например, супероксидный радикал и пероксид водорода стимулируют активацию *Jun-B*, *Jun-D*, *c-fos* и *fos-B* [23].

Увеличение продолжительности жизни мышей без опухолевых заболеваний под влиянием постоянного употребления МГК можно объяснить не только наличием в нем меланина со всеми положительными его качествами (мощная антиоксидантная активность, наличие окисленной и восстановленной форм меланина, наделяющих его свойствами полупроводников и обуславливающих наличие одновременно антиоксидантных, радио- и фотопротекторных, а также электронно-ионообменных свойств [7, 9, 17, 19, 30, 46, 51, 63], но и наличием β -глюканов.

Как уже указывалось ранее, использованный в этом исследовании МГК содержит 20 % грибных β -глюканов, имеющих широкий спектр биологических и иммуно-фармакологических активностей, выявление

которых зависит от структуры, растворимости в воде, молекулярной массы, степени ветвления и конформации. Противоопухолевую активность β -глиуканов связывают с влиянием на проницаемость сосудов [64], с активацией апоптоза и угнетением пролиферации опухолевых клеток [42, 49, 59, 65, 66], непосредственной индукцией выработки ряда цитокинов, в частности фактора ракового некроза (*TNF- λ*) [39, 49, 60, 61], модификацией иммунного ответа на опухоль [19, 39, 61, 64], производством противоопухолевых нейтрализующих антител *in vivo* [46]. Таким образом, наличие в МГК β -глиуканов должно усиливать противоопухолевый антиоксидантный эффект имеющегося в нем меланина за счет одновременной мобилизации защитных сил организма — стимуляции его иммунных реакций.

Ранее мы показали наличие у МГК одновременно сильной антибактериальной, антивирусной и антимикотической активности, превышающей в ряде случаев аналогичную активность фармакопейных препаратов [50]. Вследствие указанных свойств МГК его постоянное присутствие в организмах наблюдаемых животных также может неблагоприятно влиять на инфекционные процессы, закономерно возникающие у стареющих мышей линии *ICR*.

Таким образом, результаты этого исследования свидетельствуют о способности МГК замедлять возникновение не только опухолевой болезни, но и значительно увеличивать продолжительность жизни мышей линии *ICR*, у которых не возникли спонтанные опухоли, но, согласно данным литературы, могли иметь место множественные соматические системные заболевания, не связанные с канцерогенезом.

Список использованной литературы

1. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2 т. — Т. 2. — СПб.: Наука, 2008. — 434 с.
2. Анисимов В. Н., Соловьев М. В. Эволюция концепций в геронтологии // Биомед. журн. — 2002. — 3, № 5. — С. 55–56.
3. Барабой В. А. Меланин: структура, биосинтез, биологические функции // Укр. биохим. журн. — 1999. — 71, № 4. — С. 5–12.
4. Бландова З. К., Душкин В. А., Малащенко А. Н. и др. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. — М.: Наука, 1983. — 180 с.
5. Борщевская М. И. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов // Вопр. мед. химии. — 1999. — 46, № 1. — С. 38–42.
6. Борщевская М. И., Васильева С. И. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов // Вопр. мед. химии. — 1998. — 45, № 1. — С. 13–23.
7. Гавриленко Н. В., Кукулянская Т. А., Новиков Д. А., Курченко В. П. Генотекторные свойства меланиновых пигментов различного происхождения // Сб. трудов БГУ. — Минск, 1997. — С. 234–238.
8. Жданова Н. Н., Борщевская М. И. Биомелан — лечебный препарат грибного происхождения // Современная микология в России: Тез. докл. 1-го съезда микологов России. — М., 2002. — С. 259.

9. *Запрометова Л. М., Мирчинк Т. Г.* Микробные метаболиты // Пигменты темноокрашенных грибов и их экологическая роль. — М.: Изд-во МГУ, 1979. — С. 193–209.
10. *Кулинский В. И.* Активные формы кислорода и оксидативная модификация макр-молекул: польза и вред // Соросовский образовательный журнал. — 1999. — № 1. — С. 2–7.
11. *Курченко В. П., Кухулянская Т. А., Сенчук В. В.* и др. Сравнительная характеристика меланиновых пигментов *Phellinus igniarius* и *Inonotus sp.* // Вестник БГУ: Сер. 2. — 1998. — № 3. — С. 38–41.
12. *Курченко В. П., Сеньюк О. Ф., Горовой Л. Ф.* и др. Антиоксидантные и генопротекторные свойства природных меланиновых пигментов // Биохимия. — Минск: РИВШ, 2005. — С. 86–93.
13. *Моссе И. Б., Кострова Л. Н., Дубовик Б. В.* и др. Влияние меланина на мутагенное действие хронического облучения и адаптивный ответ у мышей // Радиц. Биология. Радиоэкология. — 1999. — **39**, № 2–3. — С. 329–333.
14. *Оловников А. М.* Редусомная гипотеза старения // Биохимия. — 2003. — **68**. — С. 2–33.
15. *Оловников А. М.* Редусомное старение: комментарии // Успехи геронтологии. — 2003. — Вып. 12. — С. 28–45.
16. *Сеньюк О. Ф., Сушинская Н. В., Горовой Л. Ф.* и др. Генопротекторные свойства меланиновых пигментов грибов // Экологическая антропология. — Минск: Беларус. комитет "Дзеці Чарнобыля", 2006. — С. 214–219.
17. *Тарасов Б. П., Юрлова Н. А., Елинов Н. П.* Меланины, образуемые культурой *Auerobasidium (Pullularia) pullulans* Arnaud (DeBary), 1910 // Химия природных соединений. — 1977. — № 2. — С. 254–261.
18. *Турнаев К. Т.* Активные формы кислорода в регуляции генной экспрессии // Биохимия. — 2002. — **67**. — Р. 339–352.
19. *Филлипова С. Н., Кузнецов В. Д., Заславская П. Л.* Синтез меланина *Streptomyces gatus* как ответ на повышение температуры культивирования и локализация меланина // Микробиология. — 1987. — **57**, № 5. — С. 710–771.
20. *Халаякин А. В., Блохин А. В.* Длительное ограничение пролиферации клеток в культуре не приводит к их пролиферативному старению // Цитология. — 1994. — **36**, № 5. — С. 460–468.
21. *Эммануэль Н. М.* Свободные радикалы и старение // Биологические возможности увеличения продолжительности жизни. — Киев, 1976. — С. 103–110.
22. *Яхно Н. Н., Штульман Д. Р.* Болезни нервной системы. — М.: Медицина, 2001. — 744 с.
23. *Allen R. G., Tresini M.* Oxidative stress and gene regulation // Free Radical Biol. Med. — 2000. — **28**, № 3. — Р. 463–499.
24. *Antes B. N., Shigenaga M. K., Hogen T. M.* Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging // Proc: Natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — **90**. — Р. 7915–7921.
25. *Baze W. B., Steinbach T. J., Fleetwood M. L.* et al. Karyomegaly and intranuclear inclusions in the renaltubules of sentinel ICR mice (mus. musculus) // Comp. Med. — 2006. — **56**, № 5. — Р. 435–438.
26. *Burke A.* Physiology and pathophysiology of poly (ADP-rebosyl)ation // Bioessay. — 2001. — **23**. — Р 795–806.
27. *Carter P. B., Collings F. M.* The rout of enteric infections in normal mice // J. Exp. Med. — 1974. — **135**. — Р. 1189–1204.
28. *Droge W.* Free radicals in the physiological control of cell function // Physiol. Rev. — 2002. — **82**. — Р. 47–95.

29. *Eaton Q. J., Johnson F. N., Custer R. F., Crane A. R.* The Icr: Ha (ICR) mouse: a current account of breeding, mutations, diseases and mortality // *Laboratory Animals*. — 1980. — **14**. — P. 17–24.
30. *Fogarty R. V., Tobin J. M.* Fungal melanins and their interactions with metals // *Enzyme Microb. Technol.* — 1996. — **19**. — P. 311–317.
31. *Georgieva P., Ivanovska N., Barot C. K.* Immunomodulatory properties of Nocardia lysozyme digest (NLD) in complement normal and C5-deficient mice // *Vaccine*. — 1998. — **16**. — P. 1237–1242.
32. *Giacco F., Brownlee M.* Oxidativestressanddiabeticcomplications // *Circ. Res.* — 2010. — **107**, № 9. — P. 1058–1070.
33. *Harman D.* Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry // *J. Gerontol.* — 1956. — **11**, № 3. — P. 298–300.
34. *Hauschka T. S., Mirand E. A.* The Breeder: Ha-(ICR) "Swiss" mouse, a multipurpose stock selected for fecundity // *Perspectives in cancer research and treatment* / Ed. G. P. Murphy. — New-York: Liss, 1973. — P. 319–331.
35. *Hayflick L.* Biological aging is no longer an unsolved problem // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 2007. — **1100**. — P. 1–13.
36. *Hayflick L., Moorhead P. S.* The serial cultivation of human diploid cell strains // *Exp. Cell Res.* — 1961. — **253**. — P. 585–621.
37. *Jacobson E. S., Hove E., Emeri H. S.* Antioxidant function of melanin in black fungi // *Infect. Immun.* — 1995. — **63**. — P. 4944–4945.
38. *Kaneto H., Katakami N., Matsuhisa M., Matsuoka T. A.* Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis // *Mediators Inflamm.* — 2010. — doi: 10.1155/2010/453892.
39. *Keypour S., Riahi H., Moradali M., Rafati H.* Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetidae), from Iran // *Int. J. Med. Mushrooms*. — 2008. — **10**, № 4. — P. 345–349.
40. *Khativ R., Chason J. L., Sielberger B. K., Lerner A. M.* Age-dependent pathogenicity of group B coxsackievirus in Swiss-Webster mice: in faculty for myocardium and pancreas // *J. Infect. Dis.* — 1980. — **141**. — P. 394–403.
41. *Krugner-Higly L., Girard I., Welter J. et al.* Clostridial enteropathy in lactating outbred swiss-derived (ICR) mice // *J. Am. Ass. Lab. Animals Sci.* — 2006. — **45**, № 6. — P. 80–87.
42. *Montana R. A. A., Jansen R., Julich W.-D. et al.* Ganomycin A and B, new antimicrobial farnesil hydroquinones from the basidiomycete *Ganoderma pheifferi* // *J. Nat. Prod.* — 2000. — **63**. — P. 416–418.
43. *Ogura A., Asano J., Matsuda J. et al.* Development of the nephritic ICGN mic the origin reproductive ability, and incidence of glomeruloneohritis // *Exp. Anim.* — 1989. — **38**, № 4. — P. 349–352.
44. *Olovnikov A. M.* A theory of marginotomy: The in-complete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // *J. Theor. Biol.* — 1973. — **41**. — P. 181–190.
45. *Park S. A., Jeong S. M., Yi N. Y. et al.* Study on the ophthalmic diseases in ICR mice and Balb/c mice // *Exp. Anim.* — 2006. — **55**, № 2. — P. 83–90.
46. *Prota G.* Melanins and melaninogenesis. — San Diego: Acad. Press, 1992. — 248 p.
47. *Rodrigo R., González J., Paoletto F.* The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension // *Hypertens Res.* — doi: 10.1038/hr.2010.264.
48. *Romano A. D., Serviddio G., de Matthaes A. et al.* Oxidative stress and aging // *J. Nephrol.* — 2010. — **23**, № 15. — P. 29–36.
49. *Rouhana-Toubi A., Wasser S. P., Fares F.* Ethyl acetate extracts of submerged cultured mycelium of Higher Basidiomycetes mushrooms inhibit human cancer

- ovarian cancer cell growth // Proc. 5th Internat. Med. Mushroom Con. (Nantong, China, 5th–8th September, 2009). — Nantong, 2009. — P. 703–712.
50. *Seniuk O. F., Gorovoj L. F., Beketova G. V.* et al. AntiInfective properties of melanin-glucan complex (Obtained L.: Fr.) F. Aphylophormyeteidae // Int. J. Med. Mush. — 2011. — **13**, № 1. — P. 7–18.
 51. *Seniuk O., Gorovoj L., Kovalev V.* et al. Anticancerogenic propertis of melanin-glucan complex from higher fungi // Proc. 5th Internat. Med. Mushroom Con. (Nantong, China, 5th–8th September, 2009). — Nantong, 2009. — P. 142–149.
 52. *Senyuk O., Gorovoj L., Kurchenko V.* et al. Genome protection properties of the melanin-containing complexes from the Hygher Basidiomycetes. Current problems of radiation research // Proc. 35th Annual Meeting of the European Radiation Research Society (Kiev, Ukraine, Aug 23–25, 2006). — Kiev, 2007. — P. 224–239.
 53. *Shigenaga M. K., Hogen T. M., Ames B. N.* Oxidative damage and mitochondrial decay in aging // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1994. — **91**. — P. 10771–10778.
 54. *Shomer N. H., Dangler C. A., Schrenzel M. D., Fox J. C.* Helicobacter bilis — induced inflammatory bowels diseases in scid mice with defined flora // Infect. Immunol. — 1997. — **65**, № 11. — P. 4858–864.
 55. *Sichel G., Corsaro C., Scalia M.* et al. *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against O²⁻ // Free Radicals Biol. Med. — 1991. — **11**, № 1. — P. 1–8.
 56. *Silberman M.* Experimentally induced osteoarthritis in the temporomandibular joint of the mouse // Acta Anatomica. — 1976. — **96**. — P. 9–24.
 57. *Skulachev V. P., Anisimov V. N., Antonenko Y. N.* et al. Mitochondrial physiology and pathology. An attempt to prevent senescence: A mitochondrial approach. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) // Bioenergetics. — 2009. — **1787**, № 5. — P. 437–461.
 58. *Sohn S.* Etiopathology of behcet's disease, herpes simplex virus infection and animal model // Yonsei Med. J. — 1997. — **38**, № 6. — P. 359–364.
 59. *Solo K., Kiranmayi K.* Extracts from White Button, Shiitake, Portabella and maitake mushrooms increase intracellular alpha-defensis 1–3 concentration in HL60 cells // Proc. 5th Internat. Med. Mushroom Con. (Nantong, China, 5th–8th September, 2009). — Nantong, 2009. — P. 72–81.
 60. *Smania E. F. A., Delle Monache F., Smania Jr. A., Yunes R. A.* Cuneo. Antifungal activity of sterols and triterpenes from *Ganoderma anulare* // Fitoterapia. — 2003. — **74**. — P. 375–377.
 61. *Smania Jr. A., Delle Monache F., Smania E. F. A., Cuneo R. S.* Antibacterial activity of steroidal compounds isolated from *Ganoderma applanatum* (Pers). Pat. (Aphylophormy-ceideae) fruitbody // Int. J. Med. Mushrooms. — 1999. — **1**. — P. 325–330.
 62. *Stadtman E. R.* Protein oxidation and aging // Science. — 1992. — **257**. — P. 1220–1224.
 63. *Swan G. A.* Chemical structure of melanins // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1963. — **100**. — P. 1005–1019.
 64. *Tidke G., Rai M.* Biotechnological potential of mushrooms: drugs and dey production // Int. J. Med. Mushrooms. — 2006. — **8**. — P. 351–360.
 65. *Tsvetkova I., Naydenski H., Petrova A.* et al. Antibacterial activity of some Bulgarian Higher Basidiomycetes Mushrooms // Int. J. Med. Mushrooms. — 2006. — **8**. — P. 63–66.
 66. *Uno K., Nicholls S. J.* Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis // Biomark Med. — 2010. — **4**, № 3. — P. 361–373.
 67. *Wiseman H., Halliwell B.* Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen to cancer // Biochem. J. — 1996. — **313**, № 1. — P. 17–29.

68. *Yamasaki K., Itakura Ch.* Osteosclerosis in aged ICR mice // *J. Vet. Sci.* — 1985. — 47, № 5. — P. 799–802.
69. *Zglinicki T. von.* Oxidative stress shortens telomeres // *Trends Biochem. Sci.* — 2002. — 27. — 339–344.

Поступила 19.12.2013

**ВПЛИВ МЕЛАНИН-ГЛЮКАНОВОГО КОМПЛЕКСУ,
ВИДІЛЕНОГО З ГРИБІВ ТРУТОВИКА, НА ТРИВАЛІСТЬ
ЖИТТЯ САМИЦЬ МИШЕЙ ЛІНІЇ ICR**

О. Ф. Сенюк, Л. Ф. Горовий*, Л. А. Паламар, М. І. Круль

Інститут проблем безпеки атомних електростанцій
НАН України, 07270 Чорнобиль

*Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, 03143 Київ

Досліджували вплив довічного вживання у виді пиття потужного антиоксиданта меланіну у складі меланін-глюканового комплексу (МГК), виділеного з трутовика *Fomesfomentarius* на тривалість життя і спонтанний канцерогенез у мишей лінії ICR. Результати цього дослідження свідчать про здатність МГК протидіяти розвитку не тільки пухлинної хвороби, але і значно збільшувати тривалість життя мишей цієї лінії, у яких не виникли спонтанні пухлини і, згідно з даними літератури, могли мати місце множинні соматичні системні захворювання, не пов'язані з канцерогенезом.

**EFFECTS OF MELANIN-GLUCAN COMPLEX, ISOLATED
FROM POLYPORE FUNGI, ON THE LIFESPAN OF
FEMALE ICR MICE**

O. F. Seniuk, L. F. Gorovyi*, L. A. Palamar, N. I. Krul

Institute for Safety Issues at the Atomic Power Stations NAS
Ukraine, 07270 Chernobyl

*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS Ukraine, 03143 Kyiv

The effects of life-long *per os* consumption of powerful antioxidant melanin in the melanin-glucan complex (MGC) from polypore *Fomes fomentarius* on the lifespan and spontaneous carcinogenesis were studied in the ICR mice. The results obtained testify to the ability of MGC to counteract the development of tumor diseases, as well as significantly increase the lifespan of mice of this strain, in which there were no spontaneous tumors and which, according to literature data, might have numerous somatic systemic diseases, not associated with carcinogenesis.

Сведения об авторах

Інститут проблем безопасности атомных электростанций НАН Украины

Сектор радиобиологии и радиозащиты

О. Ф. Сенюк — зав. сектором, к.м.н. (olga.seniuk@yahoo.com)

Л. А. Паламар — м.н.с.

Н. И. Круль — инженер 2-й категории

Інститут клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины

Л. Ф. Горовой — гл.н.с. отдела молекулярной генетики, д.б.н.