

# ХАРАКТЕРИСТИКА КОМПОНЕНТОВ МИЦЕЛИЯ *GANODERMA APPLANATUM* (PERS.) PAT.; ИЗУЧЕНИЕ ИХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОЙ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ

**Ананьева Е.П. (доцент каф. микробиологии)<sup>1</sup>, Гурина С.В. (доцент каф. микробиологии)<sup>1</sup>, Кожемякина Н.В. (аспирант каф. микробиологии)<sup>1</sup>, Стуков А.Н. (с.н.с.)<sup>2</sup>**

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия (СПХФА), Санкт-Петербург<sup>1</sup>, НИИ онкологии им. Петрова<sup>2</sup>, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2008

Изучен состав глубинного мицелия *Ganoderma applanatum* и выделенных из него углеводных фракций. Основным углеводным компонентом фракций и мицелия являлась глюкоза (71,1–75,3%), также были обнаружены значительные количества галактозы (13,8–14,0%), маннозы (9,0–11,9%) и следовые количества ксилозы и фукозы. Установлено, что исследуемые фракции оказывали стимулирующее действие на функциональную активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов. Более выраженным иммуностимулирующим действием обладала растворимая углеводная фракция по сравнению с нерастворимой. При исследовании противоопухолевой активности выделенных гликанов показано, что наиболее значительный и продолжительный противоопухолевый эффект оказывала растворимая фракция *G. applanatum*, нерастворимая фракция проявляла умеренную противоопухолевую активность.

**Ключевые слова:** базидиомицеты, гликаны, глубинный мицелий, иммуномодулирующая и противоопухолевая активности, перитонеальные макрофаги, углеводные фракции

## THE COMPONENTS OUT OF CULTIVATED MYCELIUM *GANODERMA APPLANATUM* (PERS.) PAT. AND STUDY OF THEIR IMMUNOBIOLOGICAL AND ANTITUMOR ACTIVITIES

**Ananyeva E.P. (docent of microbiology chair)<sup>1</sup>, Gurina S.V. (docent of microbiology chair)<sup>1</sup>, Kozhemyakina N.V. (aspirant of microbiology chair), Stukov A.N. (senior researcher)<sup>2</sup>**

Department of Microbiology, St. Petersburg State Chemical — Pharmaceutical Academy<sup>1</sup>, Scientific Research Institute of oncology named Petrov<sup>2</sup>, Saint Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2008

In the last few decades, mushrooms have increasingly used as a source of therapeutic agents, adaptogens, immunostimulants or health food supplement. The strain of higher Basidiomycetes *Ganoderma applanatum* was the object of research. The composition of cultured mycelium and aqueous extracts from mycelium has been studied. The objects contained 7,5 – 17,5% proteins, 67 – 88,9% polysaccharides and a insignificant amount of mineral substances. Biological activity and immune modulating effects have been determined by presence of polysaccharides. The glucose (71 – 75%) was main component of polysaccharides which also contained galactose, mannose and a insignificant amount of fucose and xylose. So, these components with biological activity are present mainly as glucans with different types of glycosidic linkages. The aqueous extracts from mycelium have been shown to have immune modulating and antitumor activities.

**Key words:** antitumor activity, aqueous extracts of polysaccharides, Basidiomycetes, cultured mycelium, immune modulating

## ВВЕДЕНИЕ

Грибы – базидиомицеты с давних времен используют в традиционной и народной медицине. Они являются перспективными объектами для получения биологически активных веществ различного спектра действия; их применяют в медицинской практике в качестве лечебных и профилактических средств [1, 2]. Одним из наиболее изученных базидиомицетов является *Ganoderma lucidum* (трутовик лакированный). Его мицелий и плодовые тела, а также выделенные из них соединения, обладают гиполипидемической, антимикробной активностью, способны стимулировать иммунитет, эффективны при заболеваниях сердечно-сосудистой и нервной систем [3, 4, 5]. Важнейшим компонентом базидиомицетов, в том числе рода *Ganoderma*, отвечающим за биологическую активность, являются полисахариды [2]. В связи с этим актуальным является выбор и исследование новых представителей базидиомицетов, их углеводных компонентов с целью получения препаратов медицинского назначения.

Цель настоящей работы — выделение и характеристика углеводных фракций мицелия базидиомицета *G. applanatum*, изучение их противоопухолевой активности и влияния на функции клеток системы мононуклеарных фагоцитов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали базидиомицет *G. applanatum* (трутовик плоский). На плотной питательной среде *G. applanatum* образовывал колонии белого цвета, складчатые, кожистые, опушенные, с неровным краем, со сла-

боразвитым воздушным мицелием белого цвета, субстратный мицелий — не пигментирован. При микроскопии культуры на септированном мицелии обнаружены пряжки, характерные для базидиомицетов. При культивировании в жидких питательных средах в динамических условиях культура росла в виде пеллет-шарообразных скоплений мицелия диаметром 4–7 мм.

Мицелий получали при глубинном культивировании гриба в глюкозо-пептонной среде в течение 10 суток при 24 °С в динамических условиях. Углеводные фракции выделяли водной экстракцией мицелия при 100 °С в течение 8 часов. Нерастворимую и растворимую фракции (НРФ и РФ) разделяли центрифугированием, раствор упаривали в 2 раза и осаждали полисахарид двумя объемами 96° этилового спирта, затем осадок отделяли центрифугированием, промывали этанолом и сушили на воздухе. В полученных фракциях определяли содержание редуцирующих веществ, белка, минеральных примесей, соотношение и тип гликозидных связей [6]. Кислотный гидролиз образцов проводили 4Н раствором серной кислоты в течение 1 часа при кипячении. Качественный моносахаридный состав в гидролизатах определяли методом тонкослойной хроматографии в системе 40:49:10:1 (бутанол : вода : этанол : аммиак). Количественный моносахаридный состав определяли методом ГЖХ в виде триметилсилильных (ТМС) производных сахаров на колонке НР-5 (SE-54) 30м\*0,25мм\*0,25мкм.

Иммунобиологическое действие выделенных углеводных фракций определяли по их влиянию на показатели функциональной активности перитонеальных макрофагов белых мышей, отражающие стадии фагоцитоза: хемотаксиса (оценивали по увеличению количества клеток в брюшной полости мышей после внутрибрюшинного введения препаратов) и распластывания фагоцитов на стекле, их микробацидности по отношению к клеткам *Staphylococcus aureus* и поглотительной способности убитых нагреванием клеток *Candida albicans*. Углеводные фракции вводили белым беспородным мышам в дозе 50 мг/кг в стерильном физиологическом растворе. Макрофаги получали из перитонеальной полости мышей промыванием средой 199, содержащей 20% сыворотки крупного рогатого скота. Клетки культивировали в монослое в течение 2 суток и затем оценивали их морфолого-функциональные изменения.

Противоопухолевую активность гликанов изучали в отношении солидной опухоли Эрлиха у мышей. Исследование проводили на мышках самцах в возрасте 2,5–3 месяцев с массой тела 22–30 г. Опухоль была перевита подкожно введением 0,2 мл 10%-ной взвеси клеток асцитной опухоли Эрлиха в стерильном физиологическом растворе. В исследовании были использованы 3 группы животных. Мыши 1 группы служили контролем. Мышам 2 и 3 группы вводили, соответственно, препараты НРФ и РФ внутрибрюшинно ежедневно в течение 5 дней, начиная через 48 часов после перевивки опухоли из расчета 0,4 мл

раствора (50 мг/кг) на 20 г массы тела мыши. Мышам контрольной группы вводили внутрибрюшинно физиологический раствор в те же сроки и в том же объеме. Учет результатов проводили с 7 дня после перевивки опухоли. Противоопухолевую активность оценивали по проценту торможения роста опухоли, индексу эффективности и индексу роста опухоли [7].

Процент торможения роста опухоли (Т%) или процентное соотношение изменения объема опухоли в опыте и контроле определяли по формуле:

$$T\% = \frac{V_k - V_y}{V_k} \times 100,$$

где  $V_y$  — средний объем опухоли в группе мышей, получавших препарат,

$V_k$  — средний объем опухолей у мышей контрольной группы.

Индекс эффективности (ИЭ), или индекс торможения роста опухоли, определяли по соотношению объемов опухоли в опыте и контроле по формуле:

$$\dot{EY} = \frac{V_e}{V_y}$$

Индекс роста опухоли, отражающий терапевтический эффект препаратов, определяли с помощью специальных кинетических кривых, отражающих соотношение динамики изменения объемов опухолей в опытной (при введении гликанов) и контрольной группах мышей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При глубинном культивировании *G. applanatum* выход биомассы мицелия составлял 5,5 г/л. Из мицелия были получены растворимая (РФ) и нерастворимая (НРФ) углеводные фракции в соотношении 1:12.

Показано, что мицелий и полученные из него фракции состояли преимущественно из углеводов. Фракции содержали от 84 до 88,9% углеводов, в то время как в исходном мицелии количество редуцирующих веществ не превышало 67%. Отмечали высокое содержание белка в мицелии (17,5%), тогда как в выделенных фракциях его количество существенно снижалось (5,0–7,5%). Содержание минеральных примесей в исследуемых образцах было незначительным (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика химического состава мицелия и углеводных фракций *G. applanatum*

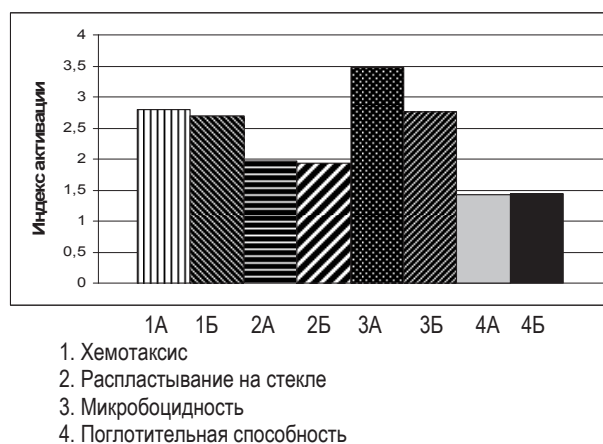
| Образец  | Редуцирующие вещества | Белок | Зольность | Моносахаридный состав, % |         |         |           |        |
|----------|-----------------------|-------|-----------|--------------------------|---------|---------|-----------|--------|
|          |                       |       |           | Глюкоза                  | Ксилоза | Манноза | Галактоза | Фукоза |
| Мицелий* | 67,0                  | 17,5  | 1,4       | +                        | след    | след    | -         | -      |
| РФ       | 88,9                  | 7,5   | 0,22      | 75,3                     | 1,1     | 9,0     | 13,8      | 0,8    |
| НРФ      | 84,0                  | 10,0  | 0,8       | 71,1                     | 2,1     | 11,9    | 14,0      | 1,0    |

\*В мицелии определяли только качественный моносахаридный состав.

В результате качественного анализа моносахаридного состава установлено, что в гидролизатах мицелия основным компонентом являлась глюкоза, остальные сахара не выявляли и были представлены в следовых количествах. Был определен количественный моносахаридный состав выделенных фракций. Они содержали 71,1 и 75,3% глюкозы, значительные количества галактозы (13,8-14,0%) и маннозы (9,0-11,9%), а также следовые количества ксилозы и фукозы (табл.1). Следует отметить, что полученные фракции незначительно отличались по моносахаридному составу. Растворимая фракция, вероятно, представляла собой гетерогенную систему, состоящую из различных гликанов, отличающихся по молекулярной массе. В результате гель-хроматографии Рф на сефарозе 4В были выявлены три углеводных пика.

Было установлено соотношение гликозидных связей в полученных фракциях. Содержание 1→3-гликозидных связей в нерастворимой фракции было выше, чем в растворимой (39,0 и 23,0% соответственно). Присутствие большого количества 1→4 гликозидных связей (37%) в нерастворимой фракции связано, вероятно, с высоким содержанием хитина в клеточных стенках *G. applanatum*. В углеводных полимерах растворимой фракции также были обнаружены различные типы гликозидных связей (57% — 1→4; 20% — 1→6 связей), что свидетельствовало о сложном строении этих полисахаридов. Наличие 1→3; 1→4; 1→6 гликозидных связей характерно для углеводных полимеров базидиомицетов, обладающих биологической активностью [2].

Иммунобиологическую активность углеводных фракций определяли по их влиянию на функции перитонеальных макрофагов белых мышей. Макрофаги являются зрелыми клетками системы мононуклеарных фагоцитов – важнейшего компонента иммунной системы, участвующих в реализации механизмов врожденного и приобретенного иммунитета. Под влиянием выделенных полисахаридов усиливалась хемотаксическая активность макрофагов в 2,7–2,8 раза по сравнению с контролем. Пластичность цитоплазматической мембраны (способность к распластыванию на стекле) повышалась почти в 2 раза (рис. 1). Указанные функции отражают начальные стадии фагоцитоза, за которыми следуют микробицидность и поглощение объектов. Микробицидные функции макрофагов под влиянием гликанов оценивали по отношению к *St. aureus*. Сравнивали выживаемость клеток *St. aureus* при контакте со стимулированными полисахаридами макрофагами и макрофагами, полученными от мышей контрольной группы.



**Рис. 1.** Влияние гликанов на разные стадии фагоцитоза: А – растворимая фракция, Б – нерастворимая фракция

Исследуемые гликаны достоверно увеличивали микробицидный эффект в 2,0–2,65 раза и поглощательную способность макрофагов по отношению к убитой нагреванием *C. albicans* в 1,5 раза по сравнению с контролем (рис. 1).

Действие НРф и Рф гликанов на функции макрофагов изучали в динамике в течение 10 суток после их однократного введения. Изучаемые полисахаридные фракции достоверно стимулировали функциональную активность макрофагов в течение всего срока наблюдения. Причём, можно отметить максимум стимулирующего эффекта на пятые сутки для растворимой фракции и длительный стимулирующий эффект нерастворимой фракции вплоть до 10-х суток, который, вероятно, связан с тем, что нерастворимый полисахарид медленнее выводится из организма.

При изучении противоопухолевой активности и переносимости гликанов *G. applanatum* установлено, что ежедневные в течение 5 дней введения НРф и Рф не отразились на общем состоянии мышей, их поведении, потреблении корма и воды. Это свидетельствовало о хорошей переносимости препаратов.

По результатам измерения объема опухоли в динамике (наблюдение в течение 21 дня) было установлено, что наиболее значительным противоопухолевым эффектом обладала Рф. Объемы опухолей у мышей, которым вводили этот препарат, были значительно меньше, чем у мышей контрольной группы. НРф в меньшей степени ингибировали рост опухоли.

При оценке изменения процента торможения роста опухоли (Т%) под действием препаратов установлено, что Рф вызывала статистически достоверное торможение роста опухоли на 47-58% на все сроки наблюдения (на 10,12, 14, 17, 19 и 21 дни после перививки). НРф также вызывала статистически достоверное торможение роста опухоли (на 31-38%), но на более поздние сроки (на 17, 19 и 21 день после перививки). Наибольшим индексом эффективности (ИЭ), отражающим степень торможения роста опухоли, обладала Рф (табл.2).



Таблица 2.  
Сравнительная характеристика противоопухолевого  
эффекта гликанов *G. applanatum*

| Группа | Кри-<br>терий | Дни после перевивки |                |                |                |                |                |                |
|--------|---------------|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|        |               | 7-й                 | 10-й           | 12-й           | 14-й           | 17-й           | 19-й           | 21-й           |
| НРФ    | Т%            | 22<br>p>0.2         | 22<br>p>0.2    | 17<br>p>0.5    | 23<br>p>0.2    | 31<br>p>0.05   | 39<br>p<0.01   | 38<br>p<0.01   |
|        | ИЭ            | 1.28<br>p>0.2       | 1.28<br>p>0.2  | 1.21<br>p>0.5  | 1.3<br>p>0.2   | 1.44<br>p>0.05 | 1.64<br>p<0.01 | 1.62<br>p<0.01 |
| РФ     | Т%            | 42<br>p>0.1         | 58<br>p<0.05   | 55<br>p<0.05   | 56<br>p<0.02   | 55<br>p<0.01   | 55<br>p<0.01   | 47<br>p<0.01   |
|        | ИЭ            | 1.74<br>p>0.1       | 2.39<br>p<0.05 | 2.22<br>p<0.05 | 2.25<br>p<0.02 | 2.21<br>p<0.01 | 2.24<br>p<0.01 | 1.89<br>p<0.01 |

Интегральным критерием противоопухолевого действия препаратов, учитывающим как величину, так продолжительность терапевтического эффекта служит индекс роста опухоли (ИРО). При лечении НРФ он составлял 0,68 (68% по сравнению с контролем), и разница между опытом и контролем не являлась статистически достоверной. При лечении препаратом РФ индекс роста опухоли достоверно отличался от контрольных значений и составил 0,46 (46% по отношению к контролю). Чем меньше индекс роста опухоли, тем продолжительнее и сильнее терапевтический эффект, следовательно, наиболее продолжительным и выраженным противоопухолевым действием обладала растворимая фракция мицелия *G. applanatum*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из глубинного мицелия гриба *G. applanatum* выделены нерастворимая и растворимая углеводные

фракции. Мицелий и фракции состояли преимущественно из углеводов (67–88,9%), белка (7,5–17,5%) и незначительного количества минеральных примесей. Основным углеводным компонентом полученных фракций являлась глюкоза (71,3–75%), также фракции содержали значительные количества галактозы (13,8–14,0%), маннозы (9,0–11,9%) и следовые количества ксилозы и фукозы. Данные полисахариды оказывали стимулирующее действие на функциональную активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов – важнейшего компонента иммунной системы, которое выражалось в активации процессов хемотаксиса, распластывания и поглотительной способности макрофагов. Более выраженным иммуностимулирующим действием обладала растворимая углеводная фракция по сравнению с нерастворимой. Показано, что изучаемые гликаны обладали противоопухолевой активностью. Наиболее значительный и продолжительный противоопухолевый эффект по показателям индекса эффективности, процента торможения роста опухоли и индекса роста опухоли оказывала растворимая фракция *G. applanatum*. Нерастворимая фракция проявляла умеренную противоопухолевую активность. Таким образом, мицелий *G. applanatum* и его углеводные компоненты перспективны для использования в качестве профилактических и лечебных средств для поддержания иммунной системы в норме и при патологических состояниях.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Wasser S. P., Weis A. L. Medical properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review) // Int. J. of Medicinal Mushrooms.- 1999. — Vol.1 — P.31-62.
2. Ooi V.E.C., Liu F. A review of Pharmacological activities of mushroom polysaccharides// Int. J. of Medicinal Mushrooms.- 1999. — Vol. 1 — p.195-206.
3. Автономова А.В., Завьялова Л.А., Гарибова Л.В., Краснопольская Л.М. Изучение характеристик штаммов *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P.Karst // Успехи медицинской микологии. Материалы I Всерос.конгр. по медицинской микологии. — М.: Изд. Национальная академия микологии, 2003.- Т.V, гл. 6.- С.164-165.
4. Бабицкая В.Г., Хлюстов С.В., Пленина Л.В. Физиологически активные соединения и биологическое действие глубинного мицелия базидиомицета *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P.Karst // Биотехнология. — 2003. — №4. — С.35-44
5. Бабицкая В.Г., Щерба В.В., Пучкова Т.А., Смирнов Д.А. Факторы, влияющие на образование полисахаридов *Ganoderma lucidum* // Прикладная биохимия и микробиология. — 2005. — Т. 41, №2. — с.194-199.
6. Захарова И.А., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. — Киев: Наук. Думка, 1982. — 189 с.
7. Стуков А.Н., Иванова М.А., Никитин А.К. и др. Индекс роста опухоли как интегральный критерий эффективности противоопухолевой терапии в эксперименте // Вопросы онкологии. — 2001. — Т. 47, №45. — с. 616- 618.

Поступила в редакцию журнала 23.04.08

Рецензент: Н.П. Елинов

