

Г. А. Халилова\*, А. С. Тураев, Б. И. Мухитдинов, С. Б. Хайтметова,  
Н. С. Нормохамаатов

## ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИСАХАРИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЛОДОВОГО ТЕЛА БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА *Ganoderma lucidum*

Институт биоорганической химии имени А. С. Садыкова АН РУз, Республика Узбекистан, 100125, Ташкент, ул. Мирзо Улугбека, 83.

\* e-mail: gulnoza\_xalilova@mail.ru

Статья посвящена выделению полисахаридов из базидиомицетного сырья *Ganoderma lucidum*, собранного на территории Узбекистана, и изучению их цитотоксического действия и противоопухолевой активности. Методом последовательной водной экстракции из базидиомицетного сырья выделены водорастворимые полисахариды, выход которых составил 15,16 %. Очистку выделенных полисахаридов от белков проводили методом Savage. Фенол-сернокислотным методом определено количество углеводов (52,74 %). Результаты анализа элементного состава показали, что выделенный полисахарид содержит 5,27 % азота, 54,30 % углерода и 7,79 % водорода. Установлено, что выделенные полисахариды не обладают прямым цитотоксическим действием на клетки КМЛ и *HeLa* в условиях *in vitro*. Изучена противоопухолевая активность полисахаридов в условиях *in vivo*. Установлено, что под влиянием выделенного полисахарида (25 мг/кг/день, в течение 10 дней, перорально) наблюдается ингибирование роста солидной опухоли аденокарциномы Эрлиха у мышей на 59,34 % по объему и 60,21 % по массе.

**Ключевые слова:** полисахариды; выделение; противоопухолевая активность; цитотоксичность.

В последние годы базидиальные грибы становятся предметом для глубокого исследования с точки зрения поиска новых противоопухолевых и различных биологически активных лекарственных веществ. Многочисленные исследования показали, что разветвленные полисахариды, выделенные из базидиальных грибов, обладают разнообразной биологической активностью, антиоксидантным, противовоспалительным, гипогликемическим, антивирусным, противоаллергенным, гипогликемическим, гепатопротективным, гиполипидемическим действием, способностью усиливать иммунитет и другими эффектами [1, 2].

Базидиальные грибы в своем составе имеют широкий спектр различных биологически активных веществ, таких как полисахариды, сесквитерпены, три-терпены, белки, меланины, каротиноиды, фенольные соединения, в том числе флавоноиды и др.

Из литературы известно, что противоопухолевой активностью обладают полисахариды, выделенные из грибов родов *Grifola*, *Nidula*, *Agaricus auricularia*, *Inonotus*, *Lentinus*, *Boletus coriolus*, *Ganoderma*, *Coptinus*, *Flammulina*, *Calvatia*, *Piptoporus*, *Pleurotus*, *Tremella*, *Tricholoma*, *Volvariella*, представленные водорастворимыми β-D-глюканами с разветвленной структурой, а также β-D-гликанпротеиновыми комплексами (протеогликанами) [3, 4].

Способность β-глюканов активировать клетки иммунной системы (естественные киллеры, Т-лимфоциты, макрофаги) определяет их противоопухолевое действие, приводя к некрозу опухоли, за счет выработки интерлейкинов, α-интерферона, повышения фагоцитарной реакции макрофагов [5, 6].

Биологическая активность полисахаридов тесно связана с их структурными характеристиками, такими как молекулярная масса, моносахаридный состав, α/β-конфигурация гликозидных связей, степень разветвления и длина боковых цепей [7 – 9].

Одним из самых широко применяемых в медицине грибов является трутовик *Ganoderma lucidum*. Данный вид гриба – источник разветвленных и линейных α- и β-глюканов, в состав трутовика входят и более сложные полисахариды, такие как глюкуроноглюкан, арабиноксилоглюкан, гликопротеины, содержащие α-L-фукозу, а также разветвленные гетерополисахариды с главной цепью из (1,4)-связанных остатков D-маннозы или D-галактозы. Все эти биополимеры в той или иной степени проявляют противоопухолевое или иммуномодулирующее действие.

Исследование полисахаридов из базидиомицетного сырья и изучение их химических и биологических свойств позволит создать новые оригинальные биологически активные соединения с широким спектром воздействия на иммунологический статус организма, что дает возможность использования их в качестве противоопухолевых средств в иммунотерапии раковых заболеваний.

Целью настоящей работы является выделение полисахаридов из базидиомицетного сырья *Ganoderma lucidum*, распространенного на территории Узбекистана, и изучение их цитотоксического действия *in vitro* и противоопухолевой активности *in vivo*.

## Экспериментальная химическая часть

Объект исследования — базидиальный гриб *Ganoderma lucidum*, собранный в местах естественного произрастания на территории Узбекистана в Бустанлыкском районе.

Для выделения полисахаридов были использованы высушенные до постоянной массы в сушильном шкафу ШС-80-01 СПУ при температуре 40–50 °С плодовые тела базидиальных грибов *Ganoderma lucidum*.

**Обессмоливание сырья.** Плодовое тело базидиального гриба измельчали в лабораторном измельчителе до размера частиц от 2 до 5 мм. Для удаления низкомолекулярных примесей и белков грибное сырье экстрагировали в аппарате Сокслета смесью хлороформ — спирт этиловый 95 % (1:2) до полного истощения сырья. Полученное извлечение концентрировали при температуре 50–60 °С до состояния густой массы, затем высушивали при температуре 100 °С до остаточной влажности 5 %.

**Выделение водорастворимых полисахаридов.** Для выделения водорастворимых полисахаридов использовали метод последовательной экстракции водой. Обессмоленное сырье высушивали до удаления запаха растворителей, взвешивали и экстрагировали трижды горячей водой на кипящей водяной бане с обратным холодильником (при суммарном соотношении сырья и экстрагента 1:20, 1:15, 1:10). Суммарная продолжительность трех экстрагирований — 6 ч. Полученные водные экстракты объединяли и упаривали на роторно-пленочном испарителе при температуре 50 °С до 1/5 первоначального объема, фильтровали, лиофильно высушивали.

Лиофильно высушенные полисахаридные фракции растворяли в воде и методом Savage трехкратно очищали с 1/3 объема смеси хлороформ — *n*-бутанол (4:1, по объему). Водный раствор отделяли, диализовали через диализную мембрану (1000 Да) и лиофильно высушивали.

Количественное содержание полисахаридов определяли фенол-сернокислотным методом [10] по калибровочному графику для глюкозы.

Спектрофотометрические определения проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-VIS 1280 (Shimadzu Europa GmbH, Германия) при максимуме поглощения длин волн 490 нм.

Элементный анализ проводили на элементном анализаторе EURO EA 3000.

## Экспериментальная биологическая часть

**Определение цитотоксического действия *in vitro*.** Для определения цитотоксичности веществ использовали МТТ-тест с использованием красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразола, который под воздействием ферментов митохондрий приобретает синюю окраску. Только клетки с живыми митохондриями могут осуществлять эту реакцию, следовательно, интенсивность окраски прямо связана со степенью целостности митохондрий. Клетки *HeLa*

рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве 20–30 тыс. клеток/мл в 100 мкл среды RPMI 1640 с 10 % эмбриональной сыворотки теленка и культивировали при температуре 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Через сутки вводили образцы полисахаридов в дозах 100, 10 и 1 мкг/мл на 100 мкл среды, культивировали клетки в течение 24 ч и далее вводили в клетки МТТ для выявления живых клеток. После часовой инкубации среду осторожно сливали, добавляли ДМСО и инкубировали 20 мин, затем измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 620 нм.

**Определение противоопухолевой активности *in vivo*.** Для исследования использовали беспородных белых мышей-самцов массой 20 ± 2 г по 6 животных в каждой группе. Мышей содержали в 5 пластиковых клетках при относительной влажности 50–60 % и температуре воздуха 22 °С. Все манипуляции с лабораторными животными проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией (Всемирная медицинская ассоциация, Эдинбург, 2000). Все работы, связанные с препаратами и питательной средой, проводились в стерильных условиях с использованием ламинарного бокса. Стеклянные сосуды перед использованием стерилизовали при 120 °С в течение 120 мин. Оборудование из полимерных материалов стерилизовали ультрафиолетовым облучением в течение 30 мин. В экспериментах *in vivo* был использован штамм солидной опухоли аденокарциномы Эрлиха (*solid Ehrlich tumor model*), предоставленный Республиканским специализированным научно-практическим медицинским центром онкологии и радиологии Минздрава РУз.

**Имплантиция штамма опухоли.** Опухоль выделяли из растущего органа животного в стерильных условиях и гомогенизировали в 20–50 мл стерильной питательной среды RPMI-1640. Приготовленный гомогенат вводили подкожно в количестве 0,5 мл в область бедра интактным животным массой 20 ± 2 г. За животными наблюдали в течение 15 дней, и размер опухоли измеряли по методике [14] каждые 5 дней. Штаммы опухолей пересаживали новому животному каждые 20 дней для хранения.

## Статистический анализ полученных данных

Полученные данные подвергали статистической обработке на персональном компьютере Pentium-4 по программам, разработанным в пакете EXCEL, с использованием библиотеки статистических функций, с вычислением среднеарифметической (*M*), среднего квадратичного отклонения, стандартной ошибки, относительных величин (частота, %), критерия Стьюдента (*t*), с вычислением вероятности ошибки (*P*). Различия средних величин считали достоверными при уровне значимости *P* < 0,05.

## Результаты и их обсуждение

Для выделения полисахаридов нами проведена предварительная очистка (обессмоливание) исходного базидиомицетного сырья от липофильных веществ и низкомолекулярных примесей. Экстрагировали сме-

сью спирт — хлороформ при соотношении 2:1 в аппарате Сокслета по стандартной методике, принятой в фармакопейных статьях [15].

После обессмоливания сырья методом водной экстракции выделены водорастворимые полисахариды с выходом 15,16 %. Выделенные полисахариды представляют собой порошки коричневого цвета, которые хорошо растворяются в воде, при низкой концентрации образуют опалесцирующие растворы, а при высокой концентрации — вязкие растворы с высокими показателями относительной вязкости, с молекулярной массой 12300 Да и ММР = 1,5. Выделенные водорастворимые полисахариды относятся к разветвленным β-глюканам, имеющим β-(1,3)- и β-(1,6)-гликозидные связи.

Количественное содержание углеводов в выделенных полисахаридах определяли фенол-сернокислым методом [16] при максимуме поглощения длин волн 480 – 490 нм. Общее количество углеводов составило 52,74 %.

Результаты определения элементного состава выделенных полисахаридов из базидиомицетного сырья показали содержание в них азота 5,27 %, углерода 54,30 %, водорода 7,79 %, что указывает на наличие примесей в составе полученного образца, в частности меланина, белковых и других веществ в виде комплекса с полисахаридами. Из литературы известно, что полисахариды базидиальных грибов находятся в виде

меланин-глюканового комплекса [7, 17]. Присутствие меланина в составе полученных образцов полисахаридов подтверждено УФ-спектрами, в которых наблюдаются соответствующие меланинам пики в области 320 – 360 нм. Это говорит о том, что полученные образцы полисахаридов находятся в виде комплекса полисахаридов и меланина.

Далее выделенные полисахариды очищали от белков методом Savage. В УФ-спектре наблюдается отсутствие пиков при 280 и 260 нм, соответствующих белкам. Это означает, что данный образец полисахарида не содержит белков и пептидов.

Было изучено действие полученных образцов полисахаридов на перевиваемых линиях клеток КМЛ и HeLa. Для определения цитотоксичности веществ был использован МТТ-тест. Контролем служили клетки без воздействия веществ. В качестве положительного контроля использовали цисплатин (Beta Drugs Ltd, Индия).

Полученные данные приведены в табл. 1. В исследованиях противоопухолевой активности были изучены водорастворимые полисахариды, полученные из базидиомицетного сырья *Ganoderma lucidum* (GW), в сравнении с коммерческим β-(1,3)-, β-(1,6)-глюканом RU-BG (Bioresis Medicinal Micology, Malaysia) и цисплатином, который широко применяется в онкологии.

Как видно из табл. 1, полисахариды, выделенные из базидиомицетного сырья *Ganoderma lucidum* (GW), и

Таблица 1

Действие полисахаридов на клеточные культуры КМЛ и HeLa (n = 3)

Образцы	Жизнеспособность клеток КМЛ, %			Жизнеспособность клеток HeLa, %		
	100 мкг	10 мкг	1 мкг	100 мкг	10 мкг	1 мкг
Контроль	100	100	100	100	100	100
GW	*81,8 ± 1,21	*88,6 ± 1,13	*93,5 ± 0,87	*85,4 ± 1,43	*90,8 ± 0,93	*91,9 ± 1,21
RU-BG	*80,6 ± 1,12	*87,6 ± 1,45	*90,6 ± 1,02	*88,2 ± 0,98	*93,6 ± 0,87	*96,9 ± 0,87
Цисплатин	*4,0 ± 7,81	*46,1 ± 2,99	*50,7 ± 2,90	*12,2 ± 1,65	*45,8 ± 3,1	*48,5 ± 3,7

Примечание: \* — достоверно по отношению к контролю  $P < 0,05$ .

Таблица 2

Результаты *in vivo* исследования по изучению противоопухолевой активности образцов полисахаридов из базидиомицетного сырья *Ganoderma lucidum* (n = 3)

Группа	Доза, мг/кг	Число животных/группа	Масса животных, г		Объем опухоли, см <sup>3</sup>	Масса опухоли, г	Масса селезенки, г	Масса печени, г	Степень ингибирования, %	
			до эксперимента	после эксперимента					по объему	по массе
Контроль с опухолью 1 (перорально)		6/0	27,29 ± 9,75	23,00 ± 9,00	5,34 ± 3,72	3,00 ± 2,23	0,35 ± 0,11	1,41 ± 0,66	0,00	0,00
GW	25	6/0	19,05 ± 3,51	18,34 ± 3,43	*2,23 ± 3,23	*1,12 ± 1,23	0,19 ± 0,10	1,34 ± 0,22	59,34 ± 3,28	60,21 ± 2,85
RU-BG	25	6/0	24,78 ± 4,25	22,08 ± 6,75	*2,39 ± 1,64	*1,01 ± 0,70	0,18 ± 0,10	1,30 ± 0,55	55,18 ± 4,29	66,29 ± 3,85
Контроль с опухолью 2 (внутрибрюшинно)		6/1	22,66 ± 2,05	17,95 ± 2,2	2,44 ± 1,53	1,26 ± 0,80	0,29 ± 0,08	1,63 ± 0,53	0,00	0,00
GW	25	6/0	22,8 ± 4,3	22,54 ± 2,9	**0,80 ± 0,69	**0,52 ± 0,35	0,35 ± 0,09	1,66 ± 0,16	67,13 ± 3,12	58,26 ± 3,41
RU-BG	25	6/0	23,2 ± 5,45	22 ± 5,5	**0,91 ± 0,94	**0,572 ± 0,31	0,36 ± 0,08	1,53 ± 0,49	62,53 ± 2,56	54,43 ± 2,52

Примечание: Продолжительность введения препарата 10 дней;  $P < 0,05$ , \* — достоверное различие по сравнению с контролем с опухолью 1 (перорально); \*\* — достоверное различие по сравнению с контролем с опухолью 2 (внутрибрюшинно).

коммерческий глюкан (RU-BG) не обладают прямым цитотоксическим действием.

Из литературы известно, что большинство полисахаридов не действуют напрямую на опухолевые клетки, но активируя иммунную систему организма, способствуют созреванию, дифференцировке и размножению трех типов клеток лимфоцитов, макрофагов и естественных клеток-киллеров [18].

Изучение противоопухолевого действия полисахаридов, экстрагированных из базидиомицетного сырья, проводили на штамме аденокарцинома Эрлиха (solid Ehrlich tumor model) *in vivo*. Исследование противоопухолевой активности провели в дозах 5, 10, 25, 50 мг/кг. Выбрана оптимальная доза 25 мг/кг, результаты приведены в табл. 2.

При введении образцов в перевиваемой группе масса животных по сравнению с контролем уменьшилась. В группе с введением образца полисахарида масса животных уменьшилась в незначительной степени. Из табл. 2 видно, что под влиянием полисахаридов, выделенных из базидиомицетного сырья (GW), при пероральным введением наблюдалось ингибирование роста опухоли на 59,34 % (по объему) и 60,21 % (по массе). Влияние полисахарида (GW), в сравнении с коммерческим бета-глюканом (RU-BG), незначительно лучше ингибирует рост опухоли при дозе 25 мг/кг. Из табл. 2 также видно, что ингибирование роста опухоли идет лучше при внутрибрюшинном введении (RU-BG) 62,53% и (GW) 67,13%, в отличие от перорального введения (RU-BG) 55,18% и (GW) 59,34%. Это объясняется тем, что при введении в организм  $\beta$ -D-глюканов появляется иммунная реакция организма, т.е. организм их воспринимает как чужеродный агент. Причиной является то, что они по химической структуре, конфигурации и конформационным особенностям в растворе напоминают гликопротеины (рецепторы) патогенов, в частности, рецепторы оболочек опухолевых клеток. опытных животных гибели не наблюдалось, а в контрольной группе с опухолью смерть наблюдалась у одной мыши из шести.

Таким образом, полисахариды, полученные из базидиомицетного сырья (GW), обладают способностью

ингибировать рост опухоли, т.е. обладают противоопухолевой активностью и могут быть потенциальными объектами для разработки противоопухолевых препаратов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. P. Maity, I. K. Sen, P. K. Maji, et al., *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre*, **11**, 67 – 74 (2017); doi: 10.1016 / j.carbpol.2015.01.051
2. L. B. Zhou, B. Chen, *Int. J. Biol. Macromol.*, **48**, № 1, 1 – 4 (2011); doi: 10.1016 / j.ijbiomac.2010.09.004
3. Y. Yu, M. Shen, Q. Song, J. Xie, *Carbohydr. Polym.*, **183**, 91 – 101 (2018); doi: 10.1016 / j.carbpol.2017.12.009
4. J. Shen, H. Park, Y. Xia, G. Kim, et al., *Carbohydr. Polym.*, **103**, 319 – 324 (2014); doi: 10.1016 / j.carbpol.2013.12.044
5. U. Lindequist, T. J. Niedermeyer, W. D. Jülich, *Evid. Based Complementary Altern. Med.*, **96**, 285 – 299 (2005); doi: 10.1093 / ecam / neh107
6. S. P. Wasser, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **60**, 258 – 274 (2002); doi: 10.1007 / s00253-002-10767
7. Г. А. Халилова, А. С. Тураев, Б. И. Мухитдинов и др., *Химия раст. сырья*, № 3, 99 – 106 (2021); doi: 10.14258 / jcrpm.2021039028.
8. С. Б. Хайтметова, А. С. Тураев, Б. И. Мухитдинов, Г. А. Халилова, *Химия раст. сырья*, № 4, 75 – 82 (2021); doi: 10.14258 / jcrpm.2021048412
9. Л. Б. Азимова, А. В. Филатова, А. С. Тураев, Д. Т. Джурабаев, *Химия раст. сырья*, № 3, 115 – 122 (2021); doi: 10.14258 / jcrpm.2021039173
10. S. F. Liao, C. H. Liang, M. Y. Ho, T. L. Hsu, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**(34), 13809 – 13814 (2013); doi: 10.1073 / pnas.1312457110
11. X. F. Bao, X. S. Wang, Q. Dong J. N. Fang, *Phytochem.*, **59**(2), 175 – 181 (2002); doi: 10.1016 / s0031-9422(01)00450-2
12. B. Boh, *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **8**(3), 255 – 287 (2013); doi: 10.2174 / 1574891x113089990036
13. D. Sohretoglu, S. Huang, *Med. Chem.*, **18**(5), 667 – 674 (2018); doi: 10.2174 / 1871520617666171113121246
14. X. Y. Cao, J. L. Liu, W. Yang, et al., *Mol. Med. Rep.*, **12**, 2383 – 2389 (2015); doi: org / 10.3892 / mmmr.2015.3648
15. *Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье*, 11-е изд., Медицина, Москва (1990), с. 400.
16. M. Dubois, K. A. Gilles, J. Hamilton, et al., *Analyt. Chem.*, **28**, 350 – 356 (1956).
17. П. А. Якимов, *Чага и её лечебное применение при раке IV стадии*, Медгиз, Ленинград (1959), сс. 36 – 49.
18. L. Ren, C. Perera, Y. Hemar, *Food Funct.*, **3**(11), 1118 – 1130 (2012); doi: 10.1039 / c2fo10279j

Поступила 25.02.22

## STUDYING THE CYTOTOXIC EFFECTS AND ANTITUMOR ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES ISOLATED FROM THE FRUITING BODY OF *Ganoderma lucidum* BASIDIAL MUSHROOM

G. A. Khalilova\*, A. S. Turaev, B. I. Mulkhitdinov, S. B. Khaitmetova, and N. S. Normakhamatov

A. S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent, 100125 Uzbekistan

\* e-mail: gulnoza\_xalilova@mail.ru

This work was devoted to the isolation of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* basidiomycete raw material collected on the territory of Uzbekistan and the study of their cytotoxic effect and antitumor activity. Water-soluble polysaccharides were isolated from the basidiomycete raw material by method of successive water extraction, the yield of which was 15.16%. The isolated polysaccharides were purified from proteins by the Savage method. The amount of carbohydrates (52.74 %) was determined using the method of phenol-sulfuric acid. Results of the elemental composition analysis showed that isolated polysaccharides contained 5.27% nitrogen, 54.30% carbon, and 7.79% hydrogen. It was established that isolated polysaccharides did not produce direct cytotoxic effect on CML and HeLa cells *in vitro*. The antitumor activity of polysaccharides was studied *in vivo*. It was found that isolated polysaccharides at 25 mg/kg/day inhibited Ehrlich adenocarcinoma solid tumor growth in mice by 59.34 vol% and 60.21 wt% for 10 days.

**Keywords:** polysaccharides; isolation; antitumor activity; cytotoxicity.