

УДК 582.284: 615.277.3

Способ получения экстрактов с противоопухолевой активностью из *Daedaleopsis confragosa* K-1326

© 2019 Л.Р. ЛЕБЕДЕВ^{1,*}, Т.В. ТЕПЛЯКОВА¹, Е.А. ВЯЗОВАЯ¹, Е.Д. ДАНИЛЕНКО¹

¹ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, р.п. Кольцово Новосибирская обл. 630559

*e-mail: lebedev_lr@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 25.09.2018 г.

После доработки 31.10.2018 г.

Принята к публикации 15.01.2019 г.

Разработан способ экстракции и фракционирования белков и полисахаридов из биомассы базидиального гриба *Daedaleopsis confragosa* K-1326, обладающих противоопухолевой активностью, показанной на линии клеток эпидермоидной карциномы A431 и клетках меланомы В16. Способ позволяет получать воспроизводимые результаты при наработке серий препаратов и может быть использован для получения препаратов из других базидомицетов. Полученные результаты убеждают в перспективном применении препаратов на основе базидиальных грибов для терапии онкозаболеваний.

Ключевые слова: базидомицеты, *Daedaleopsis confragosa*, противоопухолевая активность, фракционирование, экстракция

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-68-72

Онкологические заболевания уносят каждый год не менее 300 тыс. жизней только в России (<http://worldofoncology.com/materialy/o-rake/statistika/>). В связи с этим поиск и разработка новых противоопухолевых средств и их источников представляет особенно актуальную задачу.

Противоопухолевая активность обнаружена у биологически активных веществ, выделенных из многих базидомицетов [1–3]. Показано, что практически все базидомицеты содержат большое количество полисахаридов в плодовых телах, но особенно высока их концентрация в мицелии. Эти вещества отличаются химической структурой, но все они имеют (1-3)-глюкановые группы в главной цепи и дополнительные (1-6)-глюкановые группы, которые необходимы для проявления их противоопухолевой активности, – в боковых цепях [4].

Одной из проблем при разработке лекарственных средств из растительного сырья является получение стандартных препаратов, которое зави-

сит от стандартности самого исходного сырья, условий его выращивания, времени сбора, методов экстракции и фракционирования.

Цель работы – разработка способа, позволяющего воспроизводимо получать экстракты *Daedaleopsis confragosa* K-1326 с противоопухолевой активностью.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали штамм базидиального гриба *Daedaleopsis confragosa* K-1326 из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Культивирование проводили в качалочных колбах объемом 750 мл, содержащих по 100 мл глюкозо-пептонной среды (глюкоза – 3%, пептон – 0,5%, дрожжевой экстракт – 0,2%, КН₂Р₀4 – 0,1%, MgSO₄·7H₂O – 0,02%) или среды С1 состава, г/л: меласса – 20,0; кукурузный экстракт – 10,0;

Список сокращений: буфер PBS – фосфатно-солевой буфер; ГПС – глюкозо-пептонная среда; ЛД₅₀ – доза, летальная для 50% тест-клеток; МТТ-тест – определение степени подавления роста клеток под влиянием тестируемого агента.

$\text{KН}_2\text{PО}_4$ – 3,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2. Скорость вращения качалок, применяемых для культивирования грибов, составляла от 160 до 180 об./мин.

При исследовании процесса ферментации стерильно отбирали по 25 мл культуры, биомассу отделяли фильтрованием через бумажный фильтр (Filtrak, Германия). Измеряли массу влажного мицелия и рассчитывали содержание биомассы в пересчете на 1 л питательной среды.

Концентрацию белка в растворах определяли по методу Бредфорда [5], полисахаридов – с антроновым реактивом¹. Белковый состав образцов анализировали методом электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях с окрашиванием красителем Кумаси G-250. Для гель-хроматографии использовали сефадекс G-25 (Pharmacia, Швеция). Трипсин фирмы Sigma (США), 10000 ВАЕЕ ед/мг. Реактивы (натрия хлорид, сульфат аммония, натрия фосфат) квалификации «х.ч.». Набор белковых маркеров (10–250 кДа) от фирмы «СибЭнзим», Россия.

Определение противоопухолевой активности препаратов проводили на линиях клеток эпидермоидной карциномы А431 и меланомы В16 в МТТ-тесте [6]. Анализ цитотоксического действия препарата экстракта проводили методом МТТ (определение степени подавления роста клеток под влиянием тестируемого агента). Для определения специфической активности препарата клетки А431 по 10^4 кл./лунку помещали в лунки плоскодонного микропланшета в 200 мкл полной среды (питательная среда DMEM с 10% эмбриональной сыворотки и с 0,04 мг/мл гентамицина); переносили планшет в CO_2 -инкубатор при 37 °С в атмосфере с 5% CO_2 . Через 24 ч вносили тестируемый препарат в объеме 10 мкл в разных концентрациях (шаг разведения – 2). В контрольные лунки вносили по 10 мкл физиологического раствора. Далее клетки культивировали в объеме 0,2 мл при 37 °С в атмосфере с 5% CO_2 в течение 72 ч. По окончании инкубации проводили оценку числа живых клеток с помощью МТТ-теста. В лунки вносили по 20 мкл раствора витального красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид в концентрации 5 мг/мл и инкубировали клетки в CO_2 -инкубаторе при температуре 37 °С в течение 4 ч. Затем удаляли среду из лунок, вносили по 200 мкл/лунку диметилсульфоксида, помещали микропланшеты в шейкер на 5 мин при

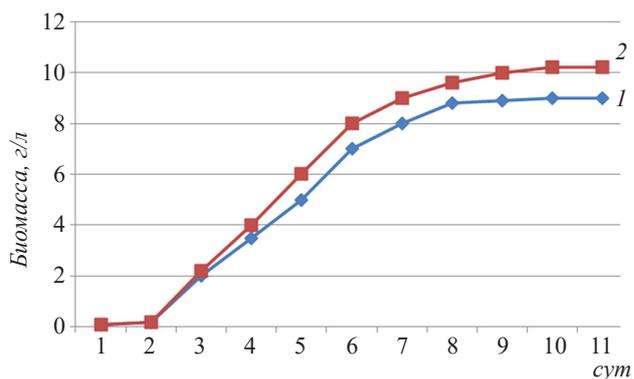


Рис. 1. Динамика накопления биомассы гриба *Daedaleopsis confragosa* K-1326, г/л. 1 – глюкозопептонная среда (ГПС), 2 – среда C1

Fig. 1. Dynamics of accumulation of the biomass of the fungus *Daedaleopsis confragosa* K-1326, g/L. 1 – glucose-peptone medium (GPM), 2 – medium C1

скорости вращения 120 об/мин и затем измеряли оптическую плотность на многоканальном планшетном сканере при $\lambda = 540$ нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование

Использование глубинного культивирования базидиальных грибов является наиболее перспективным для получения как их биомассы, так и биологически активных соединений. В отличие от бактерий, дрожжей и микромицетов, где посев может быть проведен определенным количеством клеток или конидий, стандартизировать посевной материал базидиального макромицета *Daedaleopsis confragosa*, образующего плотные мицелиальные колонии на поверхности агаризованных питательных сред, затруднительно без применения специально разработанных приемов. Поэтому засев в жидкую питательную среду для наработки посевного инокулята проводили кусочками 6-, 7-суточного мицелия, выращенного на агаризованной среде. Для этого в колбы с 100 мл питательной среды помещали по 10 круглых блоков диаметром 7 мм, вырезанных из агара с молодым мицелием, и проводили культивирование в течение 4 сут. Затем по 20 мл инокулята засевали в колбы, содержащие по 100 мл питательной среды, и проводили ферментацию. Процесс накопления биомассы показан на рис. 1.

¹ОФС.1.2.3.0019.15 Определение сахаров спектрофотометрическим методом (<https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-3-0019-15-opredelenie-saharov-spektofotometricheskim-metodom/>)

На графиках (рис. 1) видно, что процесс накопления биомассы достигает стационарной фазы на 8-е, 9-е сутки ферментации при использовании обеих сред. Но при использовании среды С1 (меласса и кукурузный экстракт) накопление и выход биомассы гриба *Daedaleopsis confragosa* K-1326 наблюдались до 10% выше. Вероятно, это обусловлено составом ростовых факторов и микроэлементов среды С1.

Экстракция

Применение значительных механических или химических воздействий (ультразвуковая дезинтеграция, обработка кислотой или щелочью) для разрушения стенок грибов могло бы привести к разрушению гликопротеинов и полисахаридов. Поэтому использовали метод замораживания/оттаивания суспензии, используемый для разрушения клеток дрожжей [7]. Полученную биомассу суспендировали в изотоническом растворе из расчета на один грамм биомассы 25 мл раствора и перемешивали 20 мин при 25 °С. Затем суспензию замораживали при температуре минус 20 °С в течение 2 ч. После этого суспензию размораживали на водяной бане при температуре 25–30 °С и продолжали перемешивать 30 мин. Экстракт извлекали центрифугированием (10000g – 20 мин), а осадок суспендировали в том же объеме изотонического раствора и процедуру экстракции повторяли. В объединенных экстрактах определяли содержание белка. Параллельно проводили экстракцию без этапа замораживания/оттаивания.

На графиках (рис. 2) видно, что основная масса белкового материала переходит в экстрагент после двух-трех последовательных процедур замораживания–оттаивания с добавлением новой порции экстрагента. При этом выход по белку с этапом замораживания/оттаивания наблюдается в два раза выше, чем без него. Для более полного извлечения целевого продукта при получении препарата использовали три повтора экстракции.

Очистка препарата

К полученному экстракту добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 70%, выдерживали 2 ч при 4–6 °С для формирования осадка и собирали последний центрифугированием (8000 g – 20 мин). Осадок, содержащий белки и полисахариды, растворяли в воде и проводили гель-хроматографию на колонке с сефадексом G-25, используя буфер PBS (10 мМ натрий-фосфат, рН 7,4 и 0,15 М натрий хлорид). Собирали фракцию, вытекающую в свободном объеме ко-

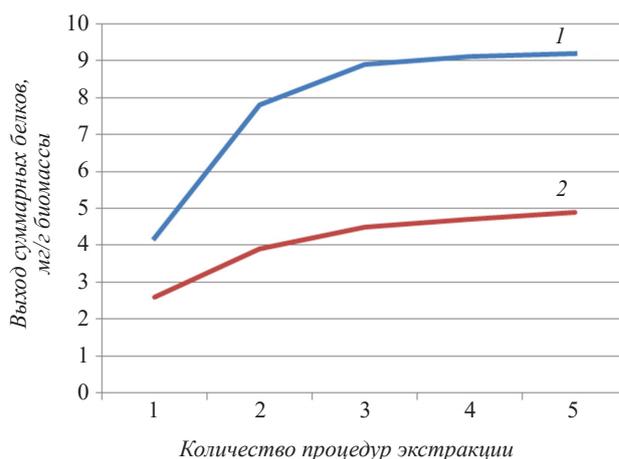


Рис. 2. Динамика извлечения суммарных белков из биомассы базидиального гриба *Daedaleopsis confragosa* K-1326 в зависимости от количества процедур экстракции. 1 – с замораживанием/оттаиванием, 2 – без него

Fig. 2. Dynamics of extraction of total proteins from the biomass of the basidiomycete *Daedaleopsis confragosa* K-1326 (mg/g of biomass) on the number of extraction procedures. 1 – with freeze-thaw, 2 – without it

лонки и поглощающую в ультрафиолетовом свете при $\lambda=280$ нм. Полученный раствор дополнительно диализовали против 20-кратного объема буфера PBS, стерилизовали через фильтры с диаметром пор 22 нм, разливали по 1 мл во флаконы и лиофильно высушивали. В конечных препаратах определяли количество белка и полисахаридов. Результаты приведены в табл. 1.

Из данных табл. 1 следует, что средний выход по белку составляет $65,4 \pm 8,5$ мг из литра культуры, по полисахаридам соответственно 325 ± 88 мг. Основной разброс выходных значений вносило использование для культивирования среды С1 (меласса и кукурузный экстракт), по белку $67,3 \pm 14,9$, по полисахаридам $273,7 \pm 107,6$ мг/л, тогда как при использовании для культивирования среды ГПС средний выход по белку составлял $63,5 \pm 1,7$, по полисахаридам $376,5 \pm 9,3$ мг/л. Вероятно, это обусловлено более стандартными компонентами, входящими в состав глюкозо-пептонной среды.

При анализе препаратов, полученных после их фракционирования, электрофорезом в ПААГ (рис. 3) показано, что в экстрактах присутствует целый спектр молекул белков. Их молекулярные массы находятся в диапазоне от 10 до 55 кДа. Низкомолекулярные полипептиды и не связанные с белками сахара были удалены при гель-хроматографии.

Экспериментальные данные по выходу водорастворимых белков и полисахаридов из биомассы *Daedaleopsis confragosa* K-1326 по шести сериям препарата

Experimental data on the yield of water-soluble proteins and polysaccharides from the biomass of *Daedaleopsis confragosa* K-1326 in six series of the preparation

Серия	Исходный объем, мл	Среда	Выход по белку		Выход по полисахаридам	
			мг	на 1 л культуры, мг	мг	на 1 л культуры, мг
010118	200	С1	16,50	83,0	87,00	435,0
020118	600	С1	27,30	45,0	97,65	163,0
030218	200	С1	14,75	74,0	44,60	223,0
040218	600	ГПС	38,40	64,0	229,20	382,0
050618	200	ГПС	12,20	61,0	72,50	362,5
060618	200	ГПС	13,10	65,5	77,00	385,0

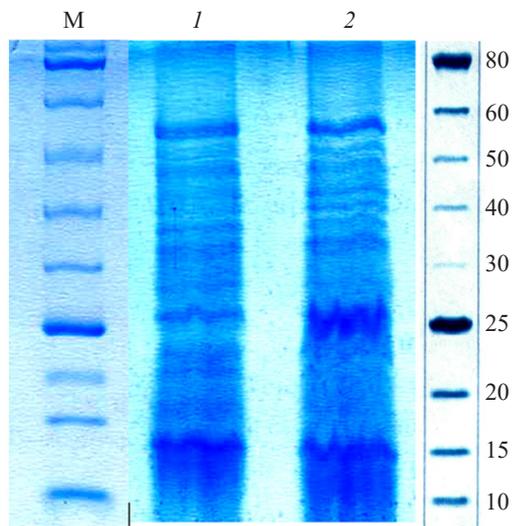


Рис. 3. Электрофореграмма препарата экстракта *Daedaleopsis confragosa* K-1326 (15%-ный ПААГ, окрашивание Кумасси G-250). М – маркер молекулярной массы, 1 – образец экстракта, 2 – образец экстракта, обработанный трипсином (24 кДа)

Fig. 3. Electrophoregram of the preparation of *Daedaleopsis confragosa* K-1326 extract (15% PAAG, staining with Coomassie G-250). Tracks: M – marker of mol. masses, 1 – sample of extract, 2 – sample of the extract treated with trypsin (24 kDa)

При обработке белков экстракта протеазой (25 ВАЕЕ ед. трипсина на 10 мкг белков экстракта, 1 ч при 25 °С) обнаружено, что значительная часть молекул белков не подвергается гидролизу, т.е. не имеет сайтов расщепления для трипсина (рис. 3).

Анализ противоопухолевой активности экстрактов показал, что как исходные белки экстракта, так и обработанные трипсином в диапазоне концентраций 0,14–0,56 мкг/мл полностью пода-

вляли жизнеспособность клеток эпидермоидной карциномы A431 (рис. 4).

На культуру клеток меланомы В16 действие препарата наблюдалось слабее. Минимальный эффект (90–95% подавления жизнеспособности клеток) наблюдался при концентрациях 1,0–1,1 мкг/мл, а ЛД₅₀ – 9,25 мкг/мл.

При исследовании комплекса низкомолекулярных компонентов (<10 кДа), полученных во

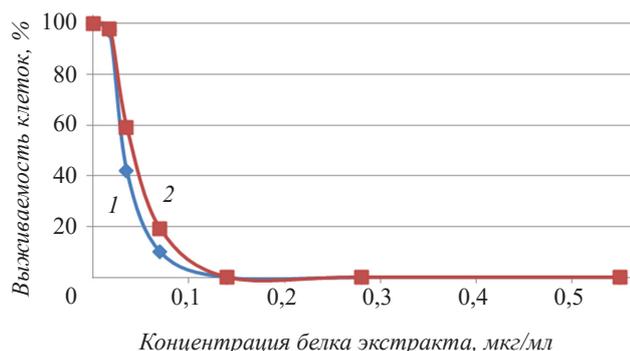


Рис. 4. Жизнеспособность клеток линии A431 в МТТ-тесте при инкубации их с экстрактом гриба *Daedaleopsis confragosa* K-1326 (1) и тем же экстрактом, после обработки трипсином (2). Длительность инкубации 72 ч

Fig. 4. Percentage of living cells of A431 line in MTT assay when incubated with the fungus *Daedaleopsis confragosa* K-1326 extract (1) and with the same extract after treatment with trypsin (2). Incubation time 72 hrs

втором пике гель-хроматографии при очистке компонентов экстрактов, удалось обнаружить некоторую противоопухолевую активность (при одинаковых концентрациях по полисахаридам) которая составляла около 5–8% от белковой фракции.

Таким образом, предложенный способ, включающий культивирование базидиального гриба *Daedaleopsis confragosa* K-1326, экстракцию и фракционирование целевых продуктов, позволяет получать препараты, обладающие противоопухолевой активностью, показанной на линиях клеток эпидермоидной карциномы A431 и меланомы B16. Метод экстракции не содержит «экстремальных» процедур (нагревание, механическое воздействие, обработка протеолитическими ферментами). Способ позволяет получать воспроизводимые результаты при наработке серий препаратов и может быть использован для получения препаратов из других базидиальных грибов. Полученные результаты позволяют говорить о многообещающих перспективах использования экстрактов базидиальных грибов в терапии онкозаболеваний.

Работа проводилась в рамках выполнения государственного задания «Разработка профилактических и лекарственных препаратов на основе базидиальных грибов для лечения и профилактики гриппа с пандемическим потенциалом».

ЛИТЕРАТУРА

1. Заикина Н.А., Коваленко А.Е., Галынкин В.А., Дьяков Ю.Т., Тищенко А.Д. Основы биотехнологии высших грибов: учебное пособие. СПб: Проспект Науки, 2007, 336.
2. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties occurring in higher basidiomycetes mushrooms current perspectives (review). *Intern. J. Med. Mushrooms*, 1999, 3, 31–62.
3. Корсун В.Ф. Краснополянская Л.М., Корсун Е.В., Авхукова М.А. Противоопухолевые свойства грибов. М.: Мэйлер, 2012, 210.
4. Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, 60(3), 58–74.
5. Bradford M. M. A Rapid and Sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72(1–2), 248–254.
6. Tian R., Li Y., and Gao M. Shikonin causes cell-cycle arrest and induces apoptosis by regulating the EGFR–NF- κ B signalling pathway in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biosci. Rep.*, 2015, 35(2), art:e00189. doi: 10.1042/BSR20150002
7. Shevchenko Z. A., Lebedev L. R., Klimenko V. P. et al. Production methods and properties of virus - like particles of *Saccharomyces cerevisiae* yeast killer strain. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2015, 51(8), 812–817.

Method for Obtaining *Daedaleopsis confragosa* K-1326 Extracts with Antitumor Activity

L.R. LEBEDEV^{1,*}, T.V. TEPLYAKOVA¹, E.A. VYAZOVAYA¹, E.D. DANILENKO¹

¹State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 630559, Koltsovo, Novosibirsk oblast

*e-mail: lebedev_lr@vector.nsc.ru

Received September 25, 2018

Received October 31, 2018

Accepted January 15, 2019

Abstract—A method for extraction and fractionation of proteins and polysaccharides from the biomass of the basidial fungus *Daedaleopsis confragosa* K-1326, having antitumor activity, shown on the epidermoid carcinoma cell line A431 and the cells of melanoma B16, has been developed. This method allows for reproducible production of series of preparations and can be used to obtain preparations from other basidiomycetes. The results obtained in this work show the promising prospects for the development and use of drugs from basidiomycetes for treatment of cancer.

Key words: Basidiomycetes, *Daedaleopsis confragosa*, antitumor activity, fractionation, extraction

Acknowledgements—The work was performed under the State Assignment «Development of preventive and therapeutic drugs based on basidiomycetes for the prevention and treatment of influenza with pandemic potential».

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-1-68-72