

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИПРОТОЗОЙНОЙ АКТИВНОСТИ МИЦЕЛИЯ ШЛЯПОЧНЫХ ГРИБОВ *LENTINULA EDODES* И *HYPHOLOMA FASCICULARE*

С.А. СИСАКЯН*, С.М. БАДАЛЯН**, Д.Ш. МАНУЧАРЯН*,
Л.Н. СИМОНЯН*, Н.Г. ГАРИБЯН**

*Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци, кафедра
медицинской биологии и генетики, 375025

**Ереванский государственный университет, кафедра ботаники, 375025

Приводятся данные об антипротозойной активности (АПА) мицелия (культуральная жидкость — КЖ и экстракт мицелия — ЭМ) макромисцев *Lentinula edodes* (съедобный) и *Hypholoma fasciculare* (ядовитый) в отношении одноклеточной инфузории *Paramecium caudatum*. Сильной активностью и быстрым эффектом обладала неразведенная КЖ исследованных видов. КЖ *L. edodes*, помимо АПА, проявила слабый митогенный эффект. ЭМ двух видов также обладали АПА, однако сильно выраженный митоз стимулирующий эффект проявил только ЭМ *L. edodes*.

Գլխարկավոր սնկերի խմբին պատկանող երկու ուռելի (*Lentinula edodes*) և բուցավոր (*Hypholoma fasciculare*) տեսակների կենսատեսնոլոգիական ճանապարհով ստացված միցելիումը օժտված է բարձր հակապրոտոզոային ակտիվությամբ (ՀՊԱ) ընդդեմ միաբջջի ինֆուզորիայի *Paramecium caudatum*: Արտահայտված արագ էֆեկտ գրանցվել է *L. edodes*-ի չնստացված կուլտուրալ հեղուկի (ԿՀ) ազդեցության տակ, որի նստացված որոշակի քանակ ՀՊԱ-ից բացի ցուցաբերել է նաև միտոզեն էֆեկտ: Երկու տեսակների միցելիումների էքստրակտները (ԵՏ) նույնպես օժտված են ՀՊԱ, որը սակայն արտահայտվում է սնկային մետաբոլիտների ավելի երկարատև ազդեցության արդյունքում: Ուժեղ միտոզ-խթանիչ ակտիվությամբ օժտված է միայն *L. edodes*-ի ԵՏ:

The cultural liquid (CL) and mycelial extract (ME) obtained from mycelia of medicinal edible mushroom *Lentinula edodes* and poisonous species *Hypholoma fasciculare* possess anti-protozoan activity (APA) against *Paramecium caudatum* culture. All tested fungal samples during 2-76 hours showed APA. The fastest effect was observed under the influence of 0.03 ml not diluted CL of *L. edodes*. The APA with 124% mytogen effect showed 0.06 ml CL of *L. edodes*, diluted in 2:1 ratio. The ME of both species demonstrated an APA, but only ME of *L. edodes* possessed strong mitosis-stimulating effect.

*Лекарственные грибы - мицелий - антипротозойная активность -
митогенный эффект - Paramecium caudatum*

О лечебных свойствах шляпочных (макроскопических) грибов известно из трудов Гиппократы. Азиатские народы 4000 лет назад использовали эликсиры из съедобного гриба *Lentinula edodes* (шиитакэ) как способ сохранения молодости и продления жизни. Этот вид был отмечен в китайской народной медицине как лекарственное растение [5, 7]. В клиниках Японии антиопухолевый глюкан — лентинан, полученный из *L. edodes*, параллельно с химиотерапией применяется в качестве иммуномодулятора в раковой терапии, а также при лечении ВИЧ инфекций [13]. Шиитакэ обладает гиполлипидным и гипогликемическим действием и назначается при сердечно-сосудистых недугах, гипотензии и других заболеваниях [5, 14]. Он тонизирует функцию нервной системы, почек и печени. Шиитакэ обладает комбинированным антибиотическим (антивирусным, антифунгальным и антибактериальным), а также антиоксидантным действием

[5-7]. Сообщается о способности экстрактов плодовых тел *L. edodes* ингибировать, а затем в 1.5-2 раза стимулировать нормальное митотическое деление клеток у растений (ростки гороха) [11]. Есть сведения, что добавление гриба в пищевой рацион подопытных животных приводит к стимуляции репродукции и индивидуального развития организма [12].

Ядовитый гриб *Hypholoma fasciculare* (серно-желтый опенок) обладает антибактериальной, антивирусной, антифунгальной, вазодилататорной и калмодулин антагонистической активностью [4, 5, 7]. Установлено, что экстракт плодовых тел *H. fasciculare* временно снижает количество сахара в крови у диабетических крыс [10]. Гриб содержит также нейротоксины, которые в зависимости от дозы могут вызвать паралич конечностей, дыхательного центра и смерть у подопытных животных [5]. В народной медицине *H. fasciculare* используют как рвотное средство.

Таким образом, результаты современных исследований подтверждают огромный терапевтический и профилактический потенциал отдельной группы макромицетов - лекарственных грибов (Medicinal Mushrooms). Однако сведения об их антипротозойной активности (АПА) единичны. Она отмечена лишь для некоторых ксилотрофных видов (*Omphalotus olearius*, *O. illudens*, *Polyporus anthelminticus* и *Picnoporus sanguineus*) [7]. Между тем в качестве природного источника биоактивных метаболитов эти организмы являются очень перспективными для получения биотех-соединений и пищевых добавок с разнообразными механизмами лечебного и профилактического действия, в том числе и антипротозойного [9, 15].

Целью настоящей работы является исследование АПА полученного биотехнологическим методом мицелия шляпочных грибов *L. edodes* и *H. fasciculare* в отношении двигательной активности одноклеточной инфузории *Paramecium caudatum*.

Материал и методы. Инфузории являются адекватными объектами для изучения влияния различных цитотропных препаратов. С другой стороны, они как самостоятельные организмы могут послужить модельным объектом для тестирования различных химических и биологически активных соединений на уровне организмов [3].

Инфузории культивировали в солевой среде Лозина-Лозинского (рН 7.2), при температуре 18-20°. Пищей служил дрожжевой экстракт [1, 2, 8].

Активно растущие культуры грибов стационарно выращивали в колбах Эрленмейера объемом 200 мл на жидкой питательной среде 7° суслу (рН 5.5). Среду разливали по 50 мл в колбы, инокулировали мицелием грибов и культивировали в течение 21 суток при 25°. Полученную мицелиальную биомассу отделяли от культуральной жидкости (КЖ) фильтрованием, затем трижды промывали дистиллированной водой, размельчали и экстрагировали 96° этанолом (1:10) в течение суток при 37°. Для получения сухого экстракта мицелия (ЭМ) после фильтрации надосадочную этанольную фракцию концентрировали в роторном испарителе.

Для опытов КЖ и ЭМ в различных количествах разбавляли средой Лозина-Лозинского. Использовали неразбавленные, а также разбавленные (2:1 и 1:1) КЖ грибов в количестве 0.03 и 0.06 мл. Образцы ЭМ в количестве 0.03 мл были тестированы в двух - 0.03 и 0.05%-ных концентрациях соответственно для *L. edodes* и *H. fasciculare*.

Инфузории по 5-8 особей помещали в лунки пластмассовых камер, содержащих по 0.5 мл солевой среды, куда добавляли тестируемые количества КЖ и ЭМ. Контрольные инфузории также помещали по 5-8 особей в лунки камер и содержали без воздействия грибных метаболитов.

Результаты фиксировали через каждые 5 мин в течение получаса, затем каждый час в течение суток и далее через 20-26 ч до 76-го часа.

Повторность опыта трехкратная.

Результаты и обсуждение. По нашим данным, быстрым антипротозойным действием обладала неразведенная КЖ *L. edodes* (0.03 мл), под влиянием которой через 2 ч отмечалась остановка движения всех инфузорий в камере. Аналогичной активностью обладало такое же количество КЖ при разведении 1:1, однако действие ее наступало к 21-му часу. Под воздействием КЖ в разведении 2:1 (0.06 мл) помимо АПА наблюдалось и митоз стимулирующее действие (124%) (табл. 1, 3).

Таким образом, КЖ *L. edodes* во всех испытанных концентрациях обладала сильной АПА в отношении *P. caudatum*, которая быстрее проявлялась под воздействием неразведенной КЖ. Однако в зависимости от ее количества и времени воздействия она была способна стимулировать также митотическое деление у инфузорий.

В испытанном количестве ЭМ *L. edodes* обладал невыраженной АПА и сильным митогенным эффектом (182%) (табл. 1, 3).

Обобщая полученные предварительные данные, можно констатировать, что наряду с АПА мицелий *L. edodes* обладает митогенным эффектом в отношении *P. caudatum*. Такие сведения приводятся впервые для этого вида и могут дополнить длинный список ценных профилактических и лечебных свойств этого лекарственного гриба.

По предварительным данным, КЖ *H. fasciculare* в испытанных количествах оказывает токсическое антипротозойное действие на инфузории в течение 4-24 ч, при этом не проявляя митогенного эффекта (табл. 2, 3).

Антипротозойное действие ЭМ *H. fasciculare*, как и у ЭМ *L. edodes*, проявилось через 76 ч после их воздействия, т.е. позже, чем действие КЖ (табл. 1, 2). Однако сильным митогенным эффектом, отмеченным для ЭМ *L. edodes*, ЭМ *H. fasciculare* не обладал (табл. 3).

Наблюдаемое токсическое действие *H. fasciculare* в первую очередь можно приписать действию токсинов - гифоломина и фасцикулина, синтезируемых мицелием этого гриба.

Таким образом, можно отметить, что в зависимости от концентрации КЖ исследованных грибов по сравнению с ЭМ обладали более эффективным антипротозойным действием. В опытных вариантах наблюдаемый выраженный митогенный эффект грибных экзо- и эндометаболитов был отмечен только под воздействием ЭМ *L. edodes*.

Стимуляция митоза является важным физиологическим механизмом, в частности в процессе заживления ран. Обнаружение у лекарственного гриба *L. edodes* такой активности позволит рекомендовать его для приготовления различных форм (настойки, мази и др.) ранозаживляющих препаратов.

Отмеченная АПА у исследованных видов шляпочных грибов, в частности съедобного шиитаке, позволит рекомендовать их для получения пищевых добавок с антипротозойным действием, имеющих большое профилактическое и лечебное значение при таких заболеваниях, как дисбактериоз, кишечные протозойные инфекции и др.

Таблица 1. Динамика действия экстракта мицелия и культуральной жидкости съедобного гриба *L. edodes* на двигательную активность *P. caudatum*

Образцы грибов	Число живых инфузорий в начале и в конце опыта	Время воздействия гриба и число неподвижных инфузорий																Общее число погибших инфузорий в конце опыта
		5'	10'	15'	20'	25'	30'	1 ч	2ч	3ч	4ч	21ч	24ч	26ч	48ч	52ч	76ч	
I КЖ 0.03 мл	53(0)	-	1	12	-	3	19	9	9									53
III КЖ 2:1 (0.03 мл)	49(0)	-	-	4	-	-	4	12	4	4	1	31						60
IV КЖ 2:1 (0.06 мл)	34(0)	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	15	35	3				55
II КЖ 1:1 (0.03 мл)	43(0)	2	2	-	-	-	-	5	5	-	-	29						43
V ЭМ 0.03% (0.03мл)	11(38)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				-	4	4
Контроль	41(58)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

Таблица 2. Динамика действия экстракта мицелия и культуральной жидкости ядовитого гриба *H. fasciculare* на двигательную активность *P. caudatum*

Образцы грибов	Число живых инфузорий в начале и в конце опыта	Время воздействия гриба и число неподвижных инфузорий																Общее число погибших инфузорий в конце опыта
		5'	10'	15'	20'	25'	30'	1 ч	2ч	3ч	4ч	21ч	24ч	26ч	48ч	52ч	76ч	
КЖ (0.03 мл)	50(0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	30					50
КЖ (0.06 мл)	58(0)	-	-	1	-	-	-	15	26	4	12							58
ЭМ 0.05% (0.03 мл)	14(0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16	16
Контроль	41(58)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

Таблица 3. Антипротозойная активность и митогенный эффект (%) мицелия видов *L. edodes* и *H. fasciculare* в отношении *P. caudatum*

Количество тестируемых грибных образцов	АПА	Митогенный эффект
<i>L. edodes</i> (КЖ)		
Без разведений (0.03 мл)	100	0
1:1 (0.03 мл)	100	0
2:1 (0.06 мл)	100	124
2:1 (0.03 мл)	100	0
<i>L. edodes</i> (ЭМ)		
0.03% (0.03 мл)	100	182
<i>H. fasciculare</i> (КЖ)		
Без разведений (0.03 мл)	100	0
"-" (0.06 мл)	100	0
<i>H. fasciculare</i> (ЭМ)		
0.05% (0.03 мл)	100	0
Контроль	0	100

Разработка оптимальных доз КЖ и ЭМ исследованных грибов *L. edodes* и *H. fasciculare* для достижения их максимально эффективного антипротозойного и митогенного действия является целью наших дальнейших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амбарцумян М.А. Труды Ереванского медицинского института, 31-38, 1971.
2. Амбарцумян М.А., Оганесян Э.Р. Материалы XLIX научной сессии. Ереван. 214-215, 1971.
3. Амбарцумян М.А. Материалы XLIX научной сессии. Ереван, 216-217, 1971.
4. Бадалян С.М. Систематика биоэкология и физиологическая активность серно-желтого опенка. Ереван, 193с., 1993.
5. Бадалян С.М. Биолог. журн. Армении, 51, 4, 289-301. 1998.
6. Бадалян С.М. Проблемы медицинской микологии. 2, 1. 23-28, 2000.
7. Бадалян С.М. Проблемы медицинской микологии. 3, 1, 16-23, 2001.
8. Кокова В.Е. Простейшие – новые объекты биотехнологии. Л., 113-140, 1989.
9. Badalyan S.M. International Journal of Medicinal Mushrooms. 3, 2-3, 108, 2001.
10. Badalyan S.M., Serrano J.-J., International Journal of Medicinal Mushrooms. 1, 3, 223-228, 2000.
11. Bolshakova M.A., Musatenko I., Grodzinskaya A.A. International Journal of Medicinal Mushrooms. 3, 2-3, 122, 2001.
12. Matjuskova N., Zorenko T., Muiznieks I. International Journal of Medicinal Mushrooms. 3, 2-3, 180, 2001.
13. Ock L. Ch., Chil C.E., Kak K.W. Arcvh. Pharmacol. Res., 4, 117-122, 1981.
14. Suzuki S., Oshima S. Mushroom Science, 9, 1, 509-520, 1976.
15. Wasser S.P., Nevo E., Sokolov D., Reshtnikov S., Timor-Tismenetsky M. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2, 1, 1-19, 2000.

Поступила 09.III.2002