

ADRIAN WIATER, ROMAN PADUCH, KATARZYNA PRÓCHNIAK,  
MAŁGORZATA PLESZCZYŃSKA, MAREK SIWULSKI, WOJCIECH BIAŁAS,  
JANUSZ SZCZODRAK

**OCENA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ  
KARBOKSYMETYLOWANYCH POCHODNYCH  
 $\alpha$ -(1→3)-GLUKANÓW WYIZOLOWANYCH Z OWOCNIKÓW  
UPRAWNYCH GATUNKÓW BOCZNIAKA (*PLEUROTUS*)**

Streszczenie

$\alpha$ -(1→3)-Glukany stanowią najmniej poznaną grupę polisacharydów budujących ścianę komórkową grzybów. Celem pracy była ocena aktywności biologicznej karboksymetylowanych pochodnych  $\alpha$ -(1→3)-glukanów uzyskanych z owocników uprawnych gatunków rodzaju *Pleurotus* (*P. citrinopileatus*, *P. djamon*, *P. erynii* i *P. precocis*). Polisacharydy wyizolowane z owocników poddano analizom strukturalnym (FT-IR i <sup>1</sup>H NMR), w wyniku czego wykazano, że są one liniowymi  $\alpha$ -(1→3)-glukanami. Po zastosowaniu metody karboksymetylacji nierozpuszczalne w wodzie  $\alpha$ -(1→3)-glukany przeprowadzono w formy rozpuszczalne, tj. karboksymetyl- $\alpha$ -(1→3)-glukany (KM- $\alpha$ -(1→3)-glukany). Następnie analizowano ich wpływ na żywotność komórek prawidłowych CCD 841 CoTr (ludzkie komórki nabłonka jelita grubego) i CCD-18Co (miofibroblasty jelitowe) oraz komórek nowotworowych HeLa (ludzki rak szyjki macicy). Wykonano analizy aktywności metabolicznej i toksyczności (MTT i NR) oraz zdolności do redukcji wolnych rodników (DPPH). Wykazano, że żywotność komórek nowotworowych była najsilniej zredukowana przez KM- $\alpha$ -(1→3)-glukan otrzymany z owocników *P. citrinopileatus*. Z kolei metodą NR wykazano, że wszystkie badane KM- $\alpha$ -glukany w całym zakresie stężeń powodowały statystycznie istotny wzrost żywotności komórek prawidłowych (CCD 841 CoTr i CCD-18Co). Badane KM- $\alpha$ -glukany nie wykazywały aktywności zmierzającej do redukcji wolnych rodników tlenowych. Na podstawie analizy wyników różnicowego barwienia fluorescencyjnego stwierdzono, że KM- $\alpha$ -glukan z owocników *P. citrinopileatus* zaburza integralność błony komórek nowotworowych. Z kolei barwienie fluorescencyjne filamentów F-aktynowych (F-aktyny) wykazało, że nie wpływał on destrukcyjnie na cytoszkielet badanych komórek.

---

Dr hab. A. Wiater, mgr K. Próchniak, dr hab. M. Pleszczyńska, prof. dr hab. J. Szczodrak, Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, dr hab. R. Paduch, Zakład Wirusologii i Immunologii, Wydz. Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin, prof. dr hab. M. Siwulski, Katedra Warzywnictwa, Wydz. Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Dąbrowskiego 159, 60-594 Poznań, dr W. Białas, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań. Kontakt: [adrianw2@wp.pl](mailto:adrianw2@wp.pl)

**Słowa kluczowe:** *Pleurotus*,  $\alpha$ -(1→3)-glukan, analiza spektralna w podczerwieni (FT-IR), wodorowy magnetyczny rezonans jądrowy ( $^1\text{H}$  NMR), karboksymetylacja, hodowle komórkowe, aktywność biologiczna

## Wprowadzenie

Grzyby wielkoowocnikowe, poza znanymi właściwościami odżywczymi, stanowią istotne źródło substancji mających znaczenie prozdrowotne. Aktywność biologiczna grzybów została potwierdzona w licznych badaniach laboratoryjnych oraz klinicznych, które wykazały ich działanie antybakteryjne, antywirusowe, przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe, immunomodulacyjne, antyalergiczne, przeciwzapalne, przeciwmiażdżycowe, hepatoprotekcyjne, obniżające poziom cukru i cholesterolu we krwi oraz wpływające na ośrodkowy układ nerwowy [11]. Wartość prozdrowotna grzybów wynika głównie z obecności w ich ścianie komórkowej polisacharydów typu glukany, które obok glikoprotein są jej głównymi komponentami. Elementy te tworzą strukturę warstwową, w której na zewnątrz występują glikoproteiny, środkową warstwę stanowią  $\beta$ -(1→3)- i  $\beta$ -(1→6)-glukany kowalencyjnie związane z łańcuchami chityny, natomiast najgłębiej położone są nierozgałęzione łańcuchy  $\alpha$ -(1→3)-glukanów, przy czym nie wiadomo, czy stanowią one integralną część sieci  $\beta$ -glukanowo-chitynowej [5]. Taka struktura ściany komórkowej warunkuje jej sztywność, a jednocześnie zapewnia elastyczność niezbędną podczas wzrostu komórek.

Owocniki bocznika (*Pleurotus*) są, obok pieczarki (*Agaricus* L.), najczęściej kupowanymi i spożywanymi grzybami w naszym kraju [9]. Poza walorami kulinarnymi charakteryzują się zawartością substancji biologicznie czynnych o udowodnionych właściwościach prozdrowotnych [12]. Przykładem może być *P. tuber-regium*, bogate źródło  $\beta$ -glukanu, który – jak wykazano – skutecznie hamuje rozwój komórek nowotworowych linii HL-60 i HepG2, a także proliferację komórek MCF-7 [24]. Z kolei owocniki *P. ostreatus* są źródłem pleuranu, który ma wiele właściwości prozdrowotnych, m.in. odbudowuje nabłonek, zwiększa migrację makrofagów i granulocytów bezpośrednio do ogniska zapalnego, powodując tym samym eliminację patogenów, przyspiesza katabolizm cholesterolu, przez co obniża jego poziom we krwi i akumulację w wątrobie [1, 3].

$\alpha$ -(1→3)-Glukany stanowią najmniej poznaną grupę polisacharydów ściany komórkowej grzybów, w której obok funkcji strukturalnej pełnią również funkcję podporową oraz stanowią materiał zapasowy [20]. Obecność  $\alpha$ -(1→3)-glukanów stwierdzono w licznych grzybach należących zarówno do klasy *Ascomycetes*, jak i *Basidiomycetes*. Ich ilość w poszczególnych gatunkach waha się w granicach od 9 do 46 %, a w owocnikach *Laetiporus sulphureus* osiąga nawet 88 % suchej masy [5].  $\alpha$ -Glukany wykazują, potwierdzone doświadczalnie, działanie prozdrowotne. Na szczególną uwagę zasłu-

guje aktywność przeciwnowotworowa, immunostymulująca oraz antyoksydacyjna [17, 18]. Augustin i wsp. [2] podają, że rozpuszczalna w wodzie niskocząsteczkowa frakcja  $\alpha$ -glukanów wyizolowana z owocników *Pleurotus ostreatus* wykazywała silne działanie antyproliferacyjne i proapoptotyczne w stosunku do linii komórek nowotworowych uzyskanych z ludzkiego raka jelita grubego. Często jednak natywna, nierozpuszczalna w wodzie forma  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów nie wykazuje potencjału terapeutycznego. Aktywność biologiczna  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów w dużej mierze zależy od ich rozpuszczalności, stężenia, struktury oraz pochodzenia, co często wiąże się z koniecznością ich chemicznej modyfikacji. Yoshida i wsp. [21] wykazali, że karboksymetylacja liniowych  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów otrzymanych z owocników *Agrocybe cylindracea* oraz *Ammanita muscaria* istotnie zwiększyła ich przeciwnowotworową aktywność w stosunku do formy niemodyfikowanej. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, karboksymetylowana pochodna  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanu wyizolowanego z owocników *P. ostreatus* miała wysoką aktywność cytotoksyczną i antyproliferacyjną w stosunku do komórek nowotworowych linii HeLa [19]. Zwiększoną aktywność przeciwnowotworową i immunomodulacyjną wykazywały również  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukany izolowane z *Poria cocos* [10], *Lentinus edodes* [23], *Amanita muscaria* [21] oraz *Ramalina celastri* [16] poddane modyfikacjom typu: karboksymetylacja, sulfonowanie, aminopropylacja lub hydroksyetylowanie.

Celem pracy była ocena aktywności biologicznej karboksymetylowanych pochodnych  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów wyizolowanych z owocników uprawnych gatunków rodzaju *Pleurotus* (*P. citrinopileatus*, *P. djamor*, *P. eryngii* i *P. precoce*).

### Material i metody badań

W badaniach używano owocników uprawnych gatunków bocznika: *Pleurotus citrinopileatus* rasy B120, *P. djamor* rasy B62, *P. eryngii* rasy B127 i *P. precoce* rasy K22, które pochodziły z kolekcji Katedry Warzywnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Owocniki otrzymano z uprawy doświadczalnej prowadzonej w warunkach kontrolowanych. Uprawę większości badanych gatunków bocznika prowadzono na podłożu ze słomy pszennej. Jedynie w przypadku *P. eryngii* używano podłoża z trocin bukowych. Szczegółowe warunki uprawy charakterystyczne dla gatunków bocznika podali Siwulski i wsp. [15] oraz Zawirska-Wojtasiak i wsp. [22]. Biologiczną efektywność (BE) poszczególnych gatunków bocznika wyrażoną świeżą masą owocników w przeliczeniu na 100 g suchej masy podłoża uprawowego przedstawiono w tab. 1.

Do izolacji  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów ze ściany komórkowej owocników zastosowano metodę opisaną przez Kiho i wsp. [7]. Wydajność izolacji podano w tab. 1.

Zliofilizowane próbki polisacharydów poddawano analizom strukturalnym, tj. analizie spektralnej w podczerwieni (FT-IR) oraz analizie przy użyciu wodorowego

magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H}$  NMR). FT-IR wykonywano przy użyciu spektrofotometru FT-IR (Model 1725X, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) w zakresie długości fali  $\lambda$  4000  $\div$  400  $\text{cm}^{-1}$ . Próba właściwa zawierała 3 mg liofilizowanego glukanu w 20-milimetrowym krążku KBr. Odczytu dokonywano wobec krążka KBr niezawierającego polisacharydu. Wodorowe ( $^1\text{H}$ ) widma NMR glukanów badano z użyciem spektrometru NMR Avance (300 MHz) (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten/Karlsruhe, Niemcy) w temp. 60 °C. Odpowiednie wartości przesunięć chemicznych otrzymywano, używając acetonu ( $\delta_{\text{H}} - 2,225$  ppm) jako wzorca wewnętrznego. Glukany używane do analizy zawieszano w 30-procentowym NaOD (rozpuszczalnik deuterowany). Procentowy udział wiązań  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glikozydowych w poszczególnych biopolimerach obliczano na podstawie wielkości pola powierzchni charakterystycznych sygnałów widocznych na widmach NMR (tab. 1).

Nierozpuszczalne w wodzie  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukany wyizolowane z owocników poszczególnych gatunków bocznika przeprowadzano w formę rozpuszczalną na drodze karboksymetylacji (KM), zgodnie z metodą Sasaki i wsp. [14]. Wydajność procesu podano w tab. 1.

W badaniach wykorzystano następujące hodowle komórkowe: komórki CCD 841 CoTr No. CRL-1807 (ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), będące linią ludzkich nabłonkowych komórek jelita grubego, przekształconych fenotypowo wrażliwym na temperaturę mutantem wirusa SV40, komórki CCD-18Co No. CRL-1459 (ATCC), będące linią ludzkich prawidłowych miofibroblastów jelita, komórki HeLa No. CCL-2 (ATCC), będące linią ludzkich komórek nabłonkowych, wywodzącą się z raka szyjki macicy, które powstały w wyniku transformacji nowotworowej na skutek zakażenia ludzkim wirusem brodawczaka HPV-18.

Badania aktywności biologicznej KM- $\alpha$ -glukanów wykonywano standardowymi metodami: MTT i Neutral Red (NR) – żywotność komórek, DPPH – redukcja wolnych rodników, wykonano barwienie fluorescencyjne włókien F-aktyny rodaminą-falloidyną – analiza cytoszkieletu komórkowego oraz ocenę żywotności komórek po barwieniu różnicowym bromkiem etydy (Sigma, St. Louis, MO, USA) z oranżem akrydyny (Sigma) oraz Hoechst 33342 (Sigma) z jodkiem propidyny (Sigma). Wszystkie badania wykonano zgodnie z metodyką opisaną we wcześniejszych pracach autorów [18 - 20].

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  odchylenia standardowe z trzech eksperymentów. Analizę wykonano przy użyciu testu ANOVA z następnym testem Dunnetta. Różnice na poziomie  $p \leq 0,05$  oznaczano jako statystycznie istotne.

## Wyniki i dyskusja

W tab. 1. przedstawiono wydajność procesu izolacji  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów z owocników *P. citrinopileatus*, *P. djamor*, *P. erynii* i *P. precoce*. Wyizolowane polimery poddano analizie spektralnej w podczerwieni (FT-IR). Widma przedstawione na rys.

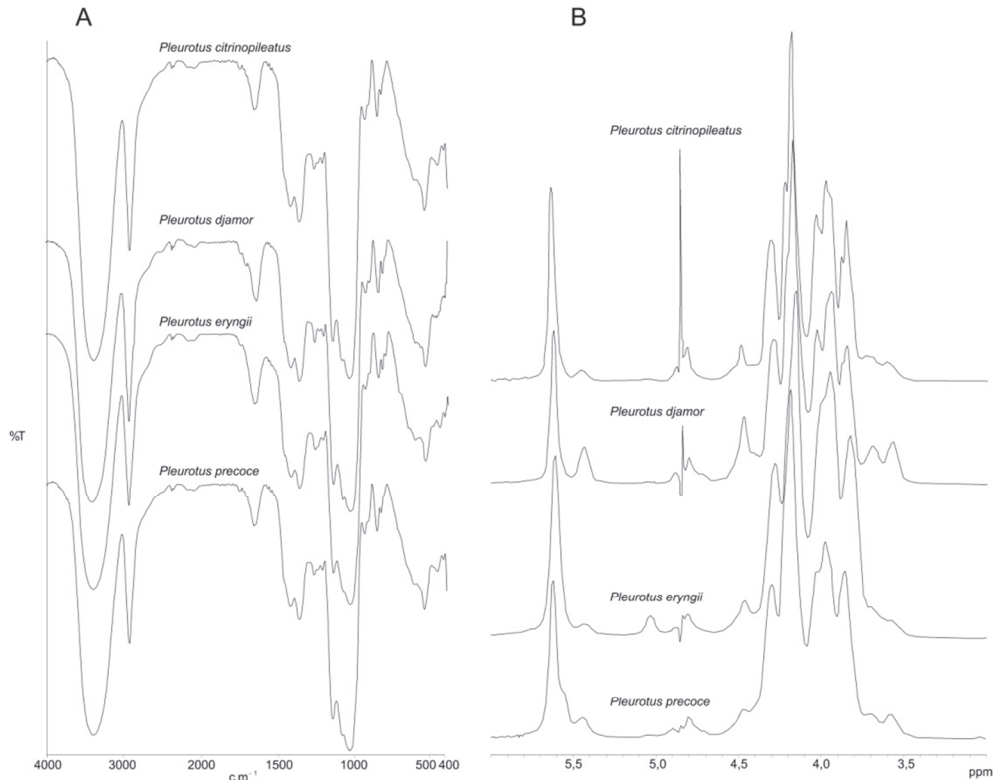
1A mają dwa charakterystyczne maksima przy długości fal  $847,78 \div 849,09 \text{ cm}^{-1}$  i  $822,65 \lambda \div 823,94 \text{ cm}^{-1}$ . Pierwsze z nich jest charakterystyczne dla wiązań  $\alpha$ -glikozydowych, drugie zaś sugeruje obecność wiązań glikozydowych typu  $\alpha$ -(1→3) [6]. Analizując glukany przy użyciu wodorowego magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H NMR}$ ), uzyskano we wszystkich przypadkach widma z pojedynczym singletem o wartości 5,6196-5,6271 ppm (rys. 1B). Świadczy to o obecności w badanych biopolimerach cząsteczek glukozy połączonych wiązaniem  $\alpha$ -(1→3)-glikozydowym oraz o ich liniowym charakterze [20].

Tabela 1. Charakterystyka owocników wybranych gatunków rodzaju *Pleurotus*  
Table 1. Profile of fruiting bodies of selected species of *Pleurotus* genus

Gatunek Species	Biologiczna efektywność Biological effectiveness [g/100 g]	Zawartość $\alpha$ -(1→3)-gukanów w suchej masie owocników Amount of $\alpha$ - (1→3)-glucans in dry matter of fruiting body [%]	Ilość wiązań $\alpha$ -(1→3)- glikozydowych w cząsteczce glukanu Number of $\alpha$ -(1→3)-glucosidic linkages in glucan [mol %]	Wydajność procesu karboksymetylacji [mg ze 100 mg $\alpha$ -(1→3)- glukanów] Yield of carbox- ymethylation [mg from 100 mg $\alpha$ -(1→3)-glucans]
<i>P. citrinopileatus</i>	43	4,0	91,2	123,9
<i>P. djamor</i>	32	3,1	73,8	122,7
<i>P. eryngii</i>	46	2,0	89,4	124,2
<i>P. precoce</i>	67	2,7	84,7	124,3

Ocenę aktywności biologicznej poszczególnych karboksymetylowanych  $\alpha$ -(1→3)-glukanów wykonano metodami spektrofotometrycznej analizy żywołności komórek (metody MTT i NR) i poprzez ocenę zdolności do wygaszania wolnych rodników tlenowych (DPPH) oraz struktury cytoszkieletu komórek w stosunku do trzech linii komórkowych: HeLa, CCD 841 CoTr oraz CCD-18Co.

Działanie cytotoksyczne KM- $\alpha$ -glukanów przedstawiono w tab. 2. (metoda MTT). Stwierdzono, że wszystkie badane KM- $\alpha$ -(1→3)-glukany powodowały statystycznie istotne ( $p \leq 0,05$ ) zmniejszenie intensywności metabolizmu komórek linii nowotworowej HeLa. Największą aktywność we wszystkich przypadkach uzyskano przy stężeniu 25  $\mu\text{g/ml}$ . Spośród badanych glukanów największą aktywnością charakteryzowały się polimery uzyskane z owocników *P. citrinopileatus* i *P. eryngii*.



Rys. 1. Widma FT-IR (A) i  $^1\text{H}$  NMR (B)  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów wyizolowanych ze ściany komórkowej owocników wybranych gatunków *Pleurotus*

Fig. 1. Infrared (FT-IR) (A) and  $^1\text{H}$  NMR spectra of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans isolated from fruiting body cell wall of selected *Pleurotus* species

Prawidłowe komórki nabłonka jelitowego (CCD 841 CoTr) nie wykazywały istotnej wrażliwości na obecność KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów w ich mikrośrodoisku (tab. 2). Natomiast KM- $\alpha$ -glukany z badanych gatunków bocznika hamowały metabolizm komórek linii CCD-18Co (miofibroblasty). Najbardziej aktywny KM- $\alpha$ -glukan z owocników *P. eryngii* redukował ten proces o około 40 % ( $p \leq 0,05$ ). Z kolei właściwościami pobudzającymi w stosunku do miofibroblastów charakteryzował się KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukan z owocników *P. citrinopileatus*, który przy stężeniu 250  $\mu\text{g/ml}$  stymulował proliferację komórek o około 20 %.

Metodą NR sprawdzono czy KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukany wpływają na integralność błon komórkowych trzech badanych linii (tab. 3). Analiza żywotności komórek wykazała, że KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukan pochodzący z owocników *P. citrinopileatus* w sposób statystycznie istotny ( $p \leq 0,05$ ) obniżał żywotność komórek linii HeLa w całym zakresie stosowanych stężeń o 20 do 30 %. Stwierdzono również, że KM- $\alpha$ -glukany wyizo-

lowane z owocników *P. eryngii* i *P. precoce* w całym zakresie zastosowanych stężeń stymulowały proliferację komórek linii HeLa. Z kolei wszystkie wyizolowane KM- $\alpha$ -glukany miały podobny wpływ na komórki linii CCD 841 CoTr i CCD-18Co. W całym zakresie stężeń powodowały statystycznie istotny ( $p \leq 0,05$ ) wzrost żywotności komórek względem próby kontrolnej.

Tabela 2. Ocena działania cytotoksycznego KM-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -glukanów z poszczególnych gatunków boczniaka na komórki linii nowotworowej HeLa oraz komórki linii prawidłowych CCD 841 CoTr i CCD-18Co, wykonana metodą MTT

Table 2. MTT test-based assessment of cytotoxic activity of CM-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -glucans from individual *Pleurotus* species on human cervical tumour cell line (HeLa), normal colonic epithelial cells (CCD 841 CoTr), and normal myofibroblasts (CCD-18Co)

		HeLa							
		<i>P. citrinopileatus</i>		<i>P. djamor</i>		<i>P. eryngii</i>		<i>P. precoce</i>	
KM-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -glukan CM-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -glukan [ $\mu$ g/ml]		[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD
0 (kontrola/control sample)		100,00	0,8	100,00	0,4	100,00	1,6	100,00	0,7
25		74,43*	0,7	87,83*	0,3	67,77*	0,3	84,71*	0,3
50		78,28*	1,5	92,59	2,3	71,33*	0,8	86,47*	2,2
100		78,96*	1,5	89,68*	1,7	73,93*	0,9	89,22*	1,8
150		87,10*	2,3	92,86*	0,5	77,25*	2,5	88,22*	1,3
200		95,02*	0,8	97,09	2,3	79,86*	2,2	91,48*	2,4
250		102,71	2,1	97,09	2,6	85,31*	1,4	99,00	2,6
		CCD 841 CoTr							
		<i>P. citrinopileatus</i>		<i>P. djamor</i>		<i>P. eryngii</i>		<i>P. precoce</i>	
KM-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -glukan CM-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ - glukan [ $\mu$ g/ml]		[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD
0 (kontrola/control sample)		100,00	1,3	100,00	0,7	100,00	1,0	100,00	0,5
25		98,17	1,1	98,32	1,0	103,98*	0,1	102,93	1,0
50		94,26*	1,0	93,00*	0,3	102,14	0,9	101,60	0,3
100		96,34	1,3	96,08*	0,6	98,47	0,9	100,27	0,3
150		97,13	0,5	99,44	1,2	93,88*	0,4	106,91*	1,3
200		99,48	1,4	100,84	0,5	104,28	0,6	108,24*	1,5
250		89,82*	1,9	109,8*	0,7	107,03*	1,0	107,45*	1,3

c.d. Tab. 2

CCD-18Co								
KM-(1→3)- $\alpha$ -glukan CM-(1→3)- $\alpha$ -glukan [ $\mu$ g/ml]	<i>P. citrinopileatus</i>		<i>P. djamor</i>		<i>P. eryngii</i>		<i>P. precoce</i>	
	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD
0 (kontrola/control sample)	100,00	0,6	100,00	0,3	100,00	0,2	100,00	0,3
25	107,33	1,5	97,77	0,3	79,53*	0,2	97,55	0,4
50	110,78*	0,2	98,66	0,2	71,16*	0,4	96,57*	0,1
100	109,05*	0,3	94,2*	0,6	68,84*	0,4	87,75*	0,5
150	102,16	0,5	92,86*	0,6	64,19*	0,2	83,33*	0,1
200	111,21*	0,8	91,07*	1,0	66,98*	0,1	80,88*	0,1
250	118,97*	0,8	84,38*	0,4	67,44*	0,9	80,39*	0,2

Objaśnienia: / Explanatory notes:

s / SD – odchylenie standardowe / standard deviation; \* – wyniki statystycznie istotnie różne w odniesieniu do wyników próby kontrolnej ( $p \leq 0,05$ ) / statistically significantly different results compared to the control sample at  $p \leq 0.05$ .

Tabela 3. Ocena integralności błon komórkowych komórek linii nowotworowej HeLa oraz linii prawidłowych CCD 841 CoTr i CCD-18Co po inkubacji z KM-(1→3)- $\alpha$ -glukanami z poszczególnych gatunków boczników, wykonana metodą NR

Table 3. NR test-based assessment of membrane integrity of HeLa line tumour cells and of normal CCD 841 CoTr as well as CCD-18Co after incubation with KM-(1→3)- $\alpha$ -glucans from individual *Pleurotus* species

HeLa								
KM-(1→3)- $\alpha$ -glukan CM-(1→3)- $\alpha$ -glukan [ $\mu$ g/ml]	<i>P. citrinopileatus</i>		<i>P. djamor</i>		<i>P. eryngii</i>		<i>P. precoce</i>	
	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD
0 (kontrola/control sample)	100,00	5,3	100,00	2,1	100,00	1,3	100,00	1,1
25	71,08*	0,8	84,83*	1,3	100,91	0,7	104,39	1,3
50	73,90*	1,0	91,47	2,2	105,94	1,3	114,47*	1,0
100	77,11*	0,9	96,68	3,3	112,33*	0,9	118,86*	1,1
150	74,70*	1,4	108,53	1,8	116,89*	1,8	120,18*	1,8
200	75,10*	1,8	98,58	0,7	115,07*	1,0	117,98*	1,2
250	81,93	0,8	118,96	4,5	106,85*	0,5	114,91*	1,6



c.d. Tab. 3.

CCD 841 CoTr								
KM-(1→3)- $\alpha$ -glukan CM-(1→3)- $\alpha$ -glukan [ $\mu$ g/ml]	<i>P. citrinopileatus</i>		<i>P. djamor</i>		<i>P. eryngii</i>		<i>P. precoce</i>	
	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD
0 (kontrola/control sample)	100,00	0,4	100,00	0,6	100,00	0,7	100,00	0,6
25	119,28*	0,9	116,67*	1,6	116,52*	0,8	123,31*	1,4
50	117,49*	1,5	106,22*	1,6	112,17*	2,6	115,04*	1,6
100	114,57*	2,2	119,11*	0,9	118,70*	1,6	113,77*	1,2
150	118,61*	1,0	116,67*	1,2	119,13*	2,8	111,44*	1,2
200	123,77*	0,8	111,78*	1,9	114,13*	1,2	111,02*	0,9
250	121,97*	0,6	117,56*	2,0	113,91*	1,7	122,46*	4,2
CCD-18Co								
KM-(1→3)- $\alpha$ -glukan CM-(1→3)- $\alpha$ -glukan [ $\mu$ g/ml]	<i>P. citrinopileatus</i>		<i>P. djamor</i>		<i>P. eryngii</i>		<i>P. precoce</i>	
	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD
0 (kontrola/control sample)	100,00	1,1	100,00	0,9	100,00	0,2	100,00	0,7
25	119,35*	1,2	118,12*	0,7	117,07*	0,7	120,68*	0,7
50	119,71*	1,0	122,65*	1,3	124,39*	0,5	121,05*	1,2
100	125,45*	1,3	119,16*	1,3	125,78*	1,1	121,43*	0,8
150	131,90*	1,9	119,86*	1,1	125,78*	1,2	121,05*	0,3
200	119,00*	1,0	121,95*	1,6	121,95*	1,2	123,31*	0,6
250	120,07*	0,6	110,45*	2,0	122,65*	0,8	124,81*	1,7

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2.

Dowiedziano, że KM- $\alpha$ -(1→3)-glukan wyizolowany z owocników *P. citrinopileatus*, działał cytotoksycznie na komórki nowotworowe linii HeLa. Jest to pożądaný efekt, ponieważ linia raka szyjki macicy jest linią szybko rosnącą i dość oporną na działanie różnego rodzaju czynników. W tym kontekście pozytywnie zaskakującym wynikiem był brak istotnej cytotoksycznej aktywności badanego KM- $\alpha$ -glukanu w stosunku do komórek prawidłowych, co dobrze rokuje na tym etapie badań. Wymaga to jednak dalszych testów w celu bardziej precyzyjnego określenia zaobserwowanych różnic, jak również stwierdzenia ewentualnych aktywności skierowanych na inne nowotwory. Podobne wyniki uzyskali również Gonzaga i wsp. [4], wykonując badania toksykologiczne bazujące na kompleksie białkowo-polisacharydowym ( $\alpha$ -(1→4)-glukan- $\beta$ -(1→6)-glukan-białko) izolowanym z owocników grzyba *Agaricus blazei*.

Polisacharydy izolowane z owocników grzybów rodzaju *Pleurotus* działają hamująco również na inne rodzaje komórek nowotworowych. Badania *in vitro* wykazały zahamowanie wzrostu komórek MCF-7 (ludzki rak piersi), sarkoma 180 (mysi mięsak), A549 (ludzki rak płuc) oraz SiHa i HeLa (ludzki rak szyjki macicy) [13, 25].

Stres oksydacyjny i wolne rodniki tlenowe biorą czynny udział w patogenezie chorób nowotworowych. Z tego względu przeanalizowano również właściwości antyoksydacyjne KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów (tab. 4). Wykazano, że karboksymetylowane  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukany wyizolowane z owocników *P. citrinopileatus* i *P. djamor* nie miały zdolności wygaszania wolnych rodników tlenowych. W przypadku KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów z owocników *P. eryngii* i *P. precoce* niewielką, statystycznie nieistotną redukcję rodnika DPPH zaobserwowano jedynie przy stężeniach odpowiednio: 50 i 100  $\mu$ g/ml. Obserwacja ta nie pozwala jednak jednoznacznie stwierdzić, że glukany te neutralizowały wolne rodniki. Słabą zdolność do usuwania wolnych rodników można tłumaczyć brakiem podwójnych wiązań w cząsteczkach  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów, których obecność, jak wskazują dane literaturowe, ma istotny wpływ na właściwości antyoksydacyjne [8].

Tabela 4. Ocena zdolności wygaszania wolnych rodników tlenowych przez KM-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -glukany z poszczególnych gatunków boczników, wykonana metodą DPPH

Table 4. DPPH method-based assessment of free radical scavenging ability of CM-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -glucans from individual *Pleurotus* species

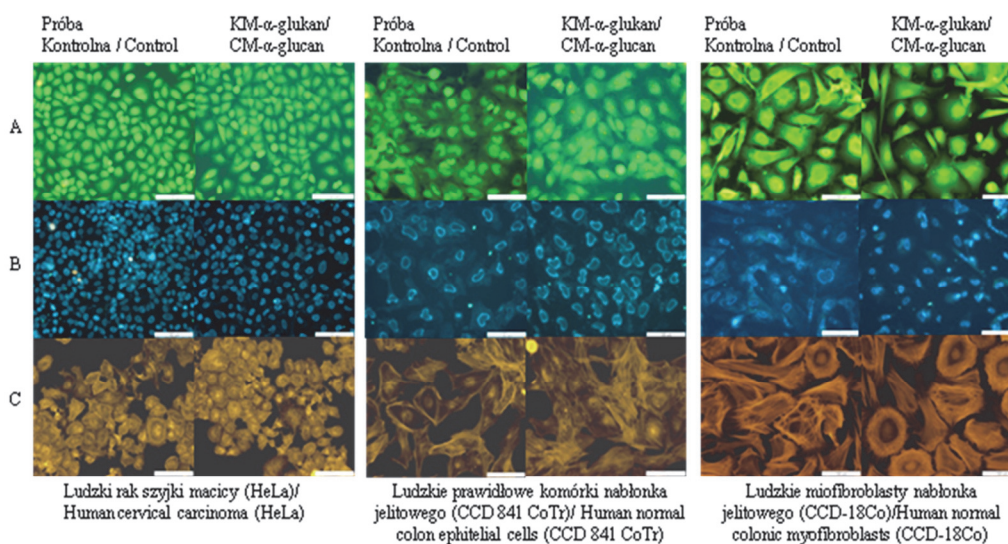
KM-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -glukan CM-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -glucan [ $\mu$ g/ml]	<i>P. citrinopileatus</i>		<i>P. djamor</i>		<i>P. eryngii</i>		<i>P. precoce</i>	
	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD	[% kontroli] [% of control sample]	s / SD
0 (kontrola/control sample)	100,00	3,4	100,00	0,8	100,00	1,7	100,00	0,8
25	118,17*	1,2	104,73*	1,5	103,09*	0,6	100,13	2,3
50	122,11*	1,2	106,27*	1,1	98,39	4,9	99,94	2,3
100	125,29*	0,8	108,40*	3,7	103,09*	4,3	99,87	3,3
150	126,88*	3,9	109,33*	2,2	108,38*	2,3	105,32*	2,4
200	126,05*	3,7	106,47*	2,4	105,48*	3,1	107,78*	5,0
250	123,12*	4,4	101,33	3,1	103,93*	3,1	103,54*	2,3

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2.

Zastosowanie barwienia fluorescencyjnego pozwala na śledzenie zmian morfologii i żywotności komórek poddanych działaniu różnych substancji. Ocena integralności błony komórek, a przez to rozróżnienie komórek żywych od apoptotycznych wykonano, stosując jedynie najaktywniejszy KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukan z *P. citrinopileatus* (rys. 2).

Na podstawie analizy wyników różnicowego barwienia fluorescencyjnego stwierdzono, że KM- $\alpha$ -glukan z owocników *P. citrinopileatus* zaburzał integralność błony komórek nowotworowych (rys. 2A i B). Świadczyła o tym mniejsza gęstość hodowli komórek po ich inkubacji z glukanem, wynikająca głównie z ograniczonej proliferacji oraz odklejania się komórek apoptotycznych od powierzchni nośnika. Natomiast KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukan z *P. citrinopileatus* nie wpływał istotnie na żywotność komórek prawidłowych.

Barwienie fluorescencyjne filamentów aktynowych (F-aktyny) wykazało, że KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukan z owocników *P. citrinopileatus* nie wpływał destrukcyjnie na cytoskielet komórek badanych linii. Wskazuje na to ich prawidłowa struktura oraz ułożenie mikrofilamentów (rys. 2C).



A - Barwienie OA/BE (oranz akrydyny/bromek etydydy) / OA/BE (orange acridine/ethidium bromide) staining; B - Barwienie HJP (Hoechst 33342/jodek propidyny) / HJP (Hoechst 33342/propidium iodide) staining; C - Barwienie mikrofilamentów aktynowych z rodaniną/falloidyną / Microfilaments staining with rhodamine-phalloidin; Bar = 100  $\mu$ m

Rys. 2. Fluorescencyjne barwienia oceniające żywotność komórek (A i B) oraz organizację cytoskieletu komórek (C) poddanych działaniu KM- $\alpha$ -glukanu wyizolowanego z *P. citrinopileatus*  
 Fig. 2. Fluorescent staining to assess cellular apoptosis (A and B) and cell cytoskeleton organisation (C) impacted by CM- $\alpha$ -glucan isolated from *P. citrinopileatus*

Przedstawione wyżej badania są uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy o właściwościach odżywczych i prozdrowotnych grzybów z rodzaju *Pleurotus*. Kontynuowanie badań na tych organizmach jest więc celowe.

## Wnioski

1. Owocniki uprawnych gatunków bocznika (*P. citrinopileatus*, *P. djamor*, *P. eryngii* i *P. precoce*) stanowiły wydajne źródło  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów.
2. Badania strukturalne (FT-IR i  $^1\text{H}$  NMR) potwierdziły poprawność metody izolacji  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów.
3. KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukan uzyskany z owocników *P. citrinopileatus* zaburzał integralność błony komórek linii nowotworowej HeLa, a tym samym obniżał ich żywotność.
4. KM- $\alpha$ -glukan uzyskany z owocników *P. citrinopileatus* w analizowanym zakresie stężeń nie wpływał istotnie na żywotność komórek prawidłowych.
5. Żadne z przebadanych KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukanów nie wykazywały właściwości wygaszania wolnych rodników tlenowych.

## Literatura

- [1] Augustin J.: Glucans as modulating polysaccharides: their characteristics and isolation from microbiological sources. *Biologia*, 1998, **53**, 277-282.
- [2] Augustin J., Jaworska G., Dandár A., Cejpek K.: Bocznik ostrygowaty (*Pleurotus ostreatus*) jako źródło  $\beta$ -D-glukanów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **6** (55), 170-176.
- [3] Bobek P., Ozdin L., Kuniak L.: Effect of oyster mushroom and isolated  $\beta$ -glucan on lipid peroxidation and on the activities of antioxidative enzymes in rats fed the cholesterol diet. *Nutr. Bioch.*, 1995, **8**, 469-471.
- [4] Gonzaga M.L.C., Bezerra D.P., Alves A.P.N.N., de Alencar N.M.N., de Oliveira Mesquita R., Lima M.W., de Aguiar Soares S., Pessoa C., de Moraes M.O., Costa-Lotufo L.V.: *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by an  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucan- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. *J. Nat. Med.*, 2009, **63**, 32-40.
- [5] Grün C.H.: Structure and biosynthesis of fungal  $\alpha$ -glucans. Ed. Utrecht University, the Netherlands, 2003.
- [6] Jelsma J., Kreger D.R.: Polymorphism in crystalline (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -D-glucan from fungal cell walls. *Carbohydr. Res.*, 1979, **71**, 51-64.
- [7] Kiho T., Yoshida I., Katsuragawa M., Sakushima M., Usui S., Ukai S.: Polysaccharides in Fungi XXXIV: a polysaccharide from fruiting bodies of *Amanita muscaria* and the antitumor activities of its carboxymethylated product. *Biol. Pharm. Bull.*, 1994, **17**, 1460-1462.
- [8] Kozarski M., Klaus A., Nikšić M., Vrvic M.M., Todorović N., Jakovljević D., van Griensven L.J.L.D.: Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *J. Food Compos. Anal.*, 2012, **26**, 144-153.
- [9] Kubiak K.: Rynek świeżych i przetworzonych grzybów uprawnych w Polsce. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2001, **48** (8), 50-52.
- [10] Lin Y., Zhang L., Chen L., Jin Y., Zeng F., Jin J., Wan B., Cheung P.C.K.: Molecular mass and antitumor activities of sulfated derivatives of  $\alpha$ -glucan from *Poria cocos* mycelia. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2004, **34**, 231-236.
- [11] Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Jülich W-D.: The Pharmacological Potential of Mushrooms. *eCAM*, 2005, **2**, 285-299.

- [12] Reguła J., Gramza-Michałowska A.: Wartość odżywcza oraz indeks glikemiczny produktów zbożowych z dodatkiem suszu boczniaka ostrygowatego (*Pleurotus ostreatus*). Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2013, **5** (90), 119-128.
- [13] Roupas P., Keogh J., Noakes M., Margetts C., Taylor P.: The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. J. Funct. Foods, 2012, **4**, 687-709.
- [14] Sasaki T., Abiko N., Nitta K.: Antitumor activity of carboxymethyl-glucans obtained by carboxymethylation of (1→3)-β-D-glucan from *Alcaligenes faecalis* var *myxogenes* IFO13140. Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 1979, **15**, 211-215.
- [15] Siwulski M., Jasińska A., Sobieralski K., Sas-Golak I.: Comparison of chemical composition of fruiting bodies of some edible mushrooms cultivated on sawdust. Ecol. Chem. Eng. A, 2011, **18** (1), 89-96.
- [16] Stuelp-Campelo P.Ma., Oliveira M.B., Leão A.M.A.C., Carbonero E.R., Gorin A.J., Iacomini M.: Effect of a soluble α-D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. Int. Immunopharm., 2002, **2**, 691-698.
- [17] Volman J.J., Mensink R.P., van Griensven L.J.L.D., Plat J.: Effects of α-glucans from *Agaricus bisporus* on ex vivo cytokine production by LPS and PHA-stimulated PBMCs; a placebo-control sampled study in slightly hypercholesterolemic subjects. Eur. J. Clin. Nutr., 2010, **64**, 720-726.
- [18] Wiater A., Paduch R., Choma A., Pleszczyńska M., Siwulski M., Dominik J., Janusz G., Tomczyk M., Szczodrak J.: Biological study on carboxymethylated (1→3)-α-D-glucans from fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*. Int. J. Biol. Macromol., 2012, **51**, 1014-1023.
- [19] Wiater A., Paduch R., Pleszczyńska M., Próchniak K., Choma A., Kandefer-Szerszeń M., Szczodrak J.: α-(1→3)-D-Glucans from fruiting bodies of selected macromycetes fungi and the biological activity of their carboxymethylated products. Biotechnol. Lett., 2011, **33**, 787-795.
- [20] Wiater A., Pleszczyńska M., Szczodrak J., Próchniak K.: α-(1→3)-Glukany ściany komórkowej żółciaka siarkowego – *Laetiporus sulphureus* (Bull.:Fr.) Murrill – izolacja, charakterystyka i zastosowanie do indukcji syntezy mutanazy. Biotechnologia, 2008, **2**, 174-189.
- [21] Yoshida I., Kiho T., Usui S., Sakushima M., Ukai S.: Polysaccharides in Fungi. XXXVII. Immunomodulating activities of carboxymethylated derivatives of linear (1→3)-α-D-glucans extracted from the fruiting bodies of *Agrocybe cylindracea* and *Amanita muscaria*. Biol. Pharm. Bull., 1996, **19**, 114-121.
- [22] Zawirska-Wojtasiak R., Siwulski M., Mildner-Szkudlarz S., Wąsowicz E.: Studies on the aroma of different species and strains of *Pleurotus* measured by GC/MS, sensory analysis and electronic nose. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment., 2009, **8** (1), 47-61.
- [23] Zhang P., Cheung P.C.K.: Evaluation of sulfated *Lentinus Edodes* α-(1→3)-D-glucan as a potential antitumor agent. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2002, **66**, 1052-1056.
- [24] Zhang M., Cheung P.C.K., Zhang L.: Evaluation of mushroom dietary fiber (nonstarch polysaccharides) from sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) singer as a potential antitumor agent. J. Agric. Food Chem., 2001, **49**, 5059-5062.
- [25] Zong A., Cao H., Wang F.: Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. Carbohydr. Polym., 2012, **90**, 1395-1410.

ASSESSING BIOLOGICAL ACTIVITY OF CARBOXYMETHYLATED DERIVATIVES  
OF  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-GLUCANS ISOLATED FROM FRUITING BODIES OF CULTIVATED  
*PLEUROTUS* SPECIES

S u m m a r y

$\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-Glucans constitute the least known group of polysaccharides that make up the fungal cell wall. The objective of the study was to assess the biological activity of carboxymethylated derivatives of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans extracted from fruiting bodies of the cultivated species of *Pleurotus* (*P. citrinopileatus*, *P. djamor*, *P. erynii*, and *P. precoce*) genus. The polysaccharides extracted from the fruiting bodies were structurally analyzed (using FT-IR and  $^1\text{H}$  NMR) and, based on the analysis results, it was proved that they were linear  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans. With the use of a carboxymethylation method, the water-insoluble  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans were converted into soluble forms, i.e. carboxymethyl- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans (KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans). Next, their effect was investigated on the viability of normal CCD 841 CoTr cells (normal human colonic epithelial cells), CCD-18Co (intestinal myofibroblasts), and HeLa tumour cells (human cervical cancer). The metabolic activity, toxicity (MTT and NR), and free radical scavenging ability (DPPH) were analyzed. It was shown that the effect of KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan derived from the *P. citrinopileatus* fruiting bodies was the strongest as regards the reduction of the cancer cell viability. Then, the NR method used showed that all the tested KM- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans within the entire concentration range caused the viability of normal cells (CCD 841 CoTr and CCD-18Co) to increase statistically significantly. The KM- $\alpha$ -glucans analyzed did not exhibit any free oxygen radical reduction activity. Based on the results of the differential fluorescent staining analysis, it was confirmed that the KM- $\alpha$ -glucan from fruiting bodies of *P. citrinopileatus* disturbed the membrane integrity of tumour cells. On the other hand, the fluorescent staining of the F-actin filaments proved that this KM- $\alpha$ -glucan did not have any destructive effect on the cytoskeleton of the cells studied.

**Key words:** *Pleurotus*,  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$  NMR), carboxymethylation, cell cultures, biological activity ☒