

**ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

---

**И Н Е С А А Р М Е Н О В Н А А В А Г Я Н**

**ЗАВИСИМОСТЬ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ  
ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ ГРИБОВ *PLEUROTUS OSTREATUS*,  
*GANODERMA LUCIDUM*, *LENTINULA EDODES*  
ОТ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ И  $\beta$ -ГЛЮКОЗИДАЗЫ**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

**на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**по специальности 03.00.17 - Микология**

**Научный руководитель:**

**доктор биологических наук,**

**профессор НАНАГЮЛЯН С.Г.**

**ЕРЕВАН 2016**

# ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

---

## ԻՆԵՍԱ ԱՐՄԵՆԻ ԱՎԱԳՅԱՆ

ԲՆԱՓԱՅՏ ՔԱՅՔԱՅՈՂ ՄՆԿԵՐԻ՝ *PLEUROTUS OSTREATUS*, *GANODERMA LUCIDUM*, *LENTINULA EDODES* ՏԵՍԱԿՆԵՐԻ ՀԱԿԱԲՈՐԲՈՔԱՅԻՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ԿԱԽՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊԵՐՕՔՍԻԴԱԶ և  $\beta$ -ԳԼՅՈՒԿՈԶԻԴԱԶ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԻՑ

Գ.00.17 “Սնկաբանություն” մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի աստիճանի հայցման

## ԱՏԵՆԱԽՈՍՈՒԹՅՈՒՆ

Գիտական ղեկավար՝  
կենսաբանական գիտությունների դոկտոր,  
պրոֆեսոր Նանագյուլյան Ս.Գ.

ԵՐԵՎԱՆ 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ОГЛАВЛЕНИЕ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Характеристика дереворазрушающих грибов.....	9
1.1.1. Базидиомицеты - основные представители дереворазрушающих грибов.....	12
1.2. Основные ферментные комплексы базидиомицетов.....	15
1.2.1. Лигнолитическая система ферментов базидиомицетов.....	17
1.2.2. Целлюлолитический ферментативный комплекс дереворазрушающих базидиомицетов.....	23
1.3. Влияние крайне высоких частот электромагнитного излучения (КВЧ ЭМИ) на физиологические параметры грибов.....	32
1.4. Лечебное использование дереворазрушающих грибов.....	34
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	43
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	56
3.1. Изменение метаболической активности культур исследуемых дереворазрушающих грибов под воздействием КВЧ ЭМИ.....	57
3.2. Изменение содержания белка в экстрактах мицелиальных культур изученных грибов.....	66
3.3. Изменение активности пероксидаз в мицелиальных экстрактах культур изученных грибов под воздействием КВЧ ЭМИ.....	73
3.4. Изменение активности $\beta$ -глюкозидазы в экстрактах культур исследованных дереворазрушающих грибов под воздействием КВЧ ЭМИ.....	82
3.5. Противовоспалительная активность экстрактов культур исследуемых дереворазрушающих грибов.....	85
3.6. Антиканцерогенная активность грибных экстрактов.....	95
3.7. Определение фракций и аминокислотного состава белков мицелиальных экстрактов вешенки обыкновенной.....	102
ВЫВОДЫ.....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Одной из актуальных задач фармацевтики и биохимии грибов является проведение исследований по совершенствованию ресурсной базы лекарственных препаратов нового поколения – фармакологически важных наноструктурированных белков, нуклеиновых кислот и их компонентов; расширению сферы использования ферментов и биокаталитических технологий, разработке биологических средств для профилактики и защиты растений и животных от биоповреждений и различных заболеваний. Значительную ценность представляют пищевые добавки на основе лекарственных грибов с высокой иммуностимулирующей, противоопухолевой, гепатопротекторной, антиоксидантной, антимикробной, противовирусной и сорбционной активностями. Лекарственные свойства грибов *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, *Trametes versicolor*, *Hericium erinaceus*, *Grifola frondosa*, *Cordyceps sinensis* и других видов в течение нескольких тысяч лет используются в народной медицине стран Юго-Восточной Азии. В настоящее время лекарственные грибы широко используются как в странах Юго-Восточной Азии, так и в Западной Европе, Канаде, США, России, на Украине и др. На их основе готовят биологически активные добавки (БАД), лекарственные препараты, кормовые добавки, экстракты, энерготоники и т.п. Мировой объем продаж таких продуктов по всему миру составляет свыше 10 млрд. долларов (Wasser, 2011; Chang and Wasser, 2012; Patel et al., 2012; Sojocarú et al., 2013; и др.).

В Армении лечебно-профилактические грибные препараты иммуностимулирующего и антиоксидантного действия (лентин, диалентин, рейшидин и летипорин) на основе фармацевтических культур грибов не производят. Перспективным является расширение работ с такими искусственно выращиваемыми грибами как вешенка, рейши и шиитакэ, которые по скорости роста мицелия в 1,5–2 раза превосходят другие виды лекарственных грибов и отличаются высоким содержанием иммуностимулирующих полисахаридов. На

фармацевтическом рынке в настоящее время наблюдается тенденция к увеличению количества лекарственных препаратов на основе сырья природного происхождения. Одними из перспективных объектов для создания новых препаратов, БАД и косметических средств различной направленности действия являются лекарственные грибы. Данные последних лет показывают, что фенольные соединения, входящие в состав лигнина, проявляют выраженную антибактериальную, противовирусную и антиоксидантную активности, они также обладают нейропротекторным и противоопухолевым действием (Patel et al., 2012; Teplyakova et al. 2015; Saltarelli et al., 2015; и другие). Поскольку исследуемые нами грибы *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*, относятся к дереворазрушающим видам, то в составе вторичной клеточной оболочки содержат хитин,  $\beta$ -глюканы, в том числе целлюлозу ( $\beta(1,4)$ глюкан), а также богаты  $\beta$ -глюкозидазами и различными пероксидазами, необходимыми для их синтеза и расщепления. В связи с этим, важное значение имеет исследование воздействия мм-волн на активность некоторых ферментов ксилотрофных грибов, что может улучшить их лечебные свойства.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было выявление оптимальных режимов обработки культур грибов крайне высокими частотами электромагнитного излучения (КВЧ ЭМИ) в интервале 45-53 ГГц (мм-волны) для увеличения биомассы, количественного и качественного содержания белка и активности ферментов культур грибов – *Pleurotus ostreatus* P. Kumm., *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. и *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. Такая обработка культур грибов позволит использовать их в качестве дешевого фармацевтического сырья, обладающего повышенным терапевтическим действием. Для осуществления поставленной цели перед нами стояли следующие задачи:

- сбор плодовых тел и изолирование мицелиальных культур дикорастущих дереворазрушающих грибов *Pleurotus ostreatus* и *Ganoderma lucidum*, а также изолирование штаммов из коммерческого гриба *Lentinula edodes*;

- оценка влияния мм-волн на скорость роста, биомассу, морфологию, метаболическую активность и суммарное содержание белков в мицелиальных культурах исследуемых видов дереворазрушающих грибов;
- исследование активности пероксидазы и  $\beta$ -глюкозидазы, определение возможности увеличения уровня их активности в мицелиальных экстрактах культур исследуемых видов грибов посредством воздействия мм-волнами;
- изучение противовоспалительной активности водных экстрактов, полученных из обработанных мм-волнами мицелиальных культур грибов *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* и *Ganoderma lucidum*;
- проведение гистологического исследования тканей ушей крыс после воздействия водного экстракта мицелия *Pleurotus ostreatus*;
- определение молекулярного веса фракций суммарного белка и некоторых аминокислот в мицелиальном экстракте гриба *Pleurotus ostreatus* под воздействием мм-волн;
- оценка влияния водных экстрактов мицелия *Pleurotus ostreatus* на рост и пролиферацию некоторых видов канцерогенных тканей *in vitro*.

Научная новизна, научно-практическая значимость работы. В работе впервые в Армении исследовано воздействие мм-волн на содержание белка и уровень активности ферментов пероксидазы и бета-глюкозидазы в мицелиальных экстрактах грибов *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* и *Lentinula edodes*. Выявлено, что внешнее физическое поле влияет на скорость роста культуры гриба и увеличивает выход биомассы в среднем до 60%. Наблюдаемые изменения имеют разнонаправленный характер и зависят от частоты и длительности обработки мм-волнами.

Модулируя условия выращивания культур грибов *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum* и *Lentinula edodes* посредством обработки мм-волнами ЭМИ, получены культуры грибов с высоким выходом биомассы и повышенной активностью пероксидаз, которые

могут быть использованы в качестве доступного фармакологического сырья. Внутриклеточные экстракты обработанных мм-волнами культур грибов обладают более сильным противовоспалительным действием, чем необработанные, что позволит полученные в диссертации данные применять на практике и использовать в фармацевтике.

Нами также показано, что мицелиальные экстракты вешенки обыкновенной оказывают подавляющее действие на клеточные культуры некоторых онкологических тканей *in vitro*. Эти работы открывают широкие возможности для применения искусственно выращиваемых грибов в фармакологических целях и для профилактики и лечения острых воспалительных процессов и, возможно, в недалеком будущем – для лечения некоторых онкологических заболеваний.

Практическая ценность диссертационной работы заключается в том, что полученные результаты носят как теоретический, так и практический характер, и направлены на выявление оптимальных частот мм-волн для повышения биологической активности экстрактов лекарственных грибов.

Полученные данные могут быть использованы в специальных лекционных курсах для студентов соответствующих кафедр ЕГУ, ЕГМУ, РАУ, в научных лабораториях, занимающихся исследованием лечебных свойств природных биологически активных соединений, а также могут быть рекомендованы для использования в фармацевтике при производстве БАД и сывороток для инъекции.

Апробация работы. Материалы диссертации докладывались на: международной конференции “Успехи биотехнологии: перспективы развития в Армении” (Цахкадзор, Армения, 2006); междисциплинарных микологических форумах “Успехи медицинской микологии” (Москва 2008, 2009, 2010); FEBS Workshops: “Inflammatory Diseases and Immune Response” (Вена, Австрия, 2010) и “Cell Biology & Pharmacology of Mendelian Disorders” (Вико-Эквенс, Италия, 2011); международных конференциях Elsevier “Colloids and Nanomedicine 2012” (Амстердам, Нидерланды, 2012), PIERS – “Progress In Electromagnetics

Research Symposium", (Стокгольм, Швеция, 2013) и 38-th FEBS Congress (Санкт-Петербург, Россия, 2013); международных I, III и IV конференциях "Биотехнология и здоровье" (Ереван 2005, 2009, 2010); международной школе-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века" (Пушино, Россия, 2009) и "FEBS Young Scientists' Forum" (Санкт-Петербург, 2013), а также на региональных конференциях молодых ученых: "Международная студенческая биологическая конференция", посвященная 75-летию факультета биологии (Ереван, 2009) и "Новые аспекты молекулярной биотехнологии и биохимии", посвященной 70-летию НАН Армении (Ереван, 2013), МНТЦ семинаре "Ionizing and non-ionizing radiation influence on structure and biophysical properties of living cells", (Цахкадзор, 2015).

Были получены исследовательские гранты: "Purification of biological active compounds from *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. extracts" Grant of ANSEF-FAR Found of Armenian Relief (plant-3261) и "Изучение противовоспалительной активности дереворазрушающих грибов" грант Гос. комитета по науке при Министерстве образования и науки Республики Армении (13A-1g29).

Публикации. Основные результаты исследований отражены в 17 научных публикациях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3-х глав, выводов, списка сокращений и списка литературы. Список литературы включает 233 работ, в том числе 159 на английском языке. Общий объем диссертации 140 страниц, 30 рисунков и 8 таблиц.

Автор диссертации благодарит за ценные советы и поддержку в течение проведения и написания диссертационной работы научного руководителя д.б.н., проф. С.Г. Нанагюлян и сотрудников кафедры Ботаники и микологии; зав. каф. биофизики д.б.н., проф. П.О. Вардеваняна и сотрудников кафедры биофизики; заведующих кафедрами ЕГМУ фарм. факультета д.м.н. проф. А.В. Топчяна и к.м.н. доценту А.Г. Жамгарян, а также зав. лабораторией ИМБ НАН РА д.м.н. З. Караляна за совместное сотрудничество и консультации.

# ГЛАВА I

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Характеристика дереворазрушающих грибов

Грибы – это довольно обширная группа гетеротрофных организмов с абсорбционным (осмотрофным) способом питания, которая включает от 100 до 250 тысяч видов (Гарибова, Лекомцева, 2005). На сегодняшний день известны 140 тысяч видов грибов, половина из которых съедобна, более 2000 из них безопасны и около 700 видов обладают значительными фармакологическими свойствами (Lull, 2005).

Грибы занимают особое положение в системе органического мира, представляя собой особое царство, наряду с такими царствами как растений и животных, имеют как общие черты, так и различия. В отличие от автотрофных зеленых растений, грибы лишены хлорофилла, и поэтому им необходимы готовые органические вещества, что и определяет их принадлежность к гетеротрофным редуцентам. В то же время, клетки грибов как гетеротрофных организмов отличаются и от животных клеток. Основные отличия грибов от простейших следующие:

- грибы питаются абсорбционным способом питания, то есть всей поверхностью тела, а не голозойным - путем заглатывания пищи,
- грибы размножаются спорами, а не почкованием
- им характерна неподвижность таллома.

Современные данные о биохимии и физиологии грибов, ультраструктуры клетки, составу и строению клеточной оболочки грибов позволяет считать, что они занимают промежуточное положение между животными и растениями. И уже с начала 1970 года грибы стали рассматривать как самостоятельное царство живого мира *Mycota* или *Fungi*. Царство *Fungi* подразделяют на сумчатые, базидиальные грибы, зигомицеты, хитридиомицеты и оомицеты (Гарибова, Лекомцева, 2005). Грибы являются перспективным источником для

получения биологически активных соединений, углеводов, белков, липидов, фенолов, витаминов и других соединений (Пучкова и др., 2011; Куликова и др. 2011). Повышенный интерес к ним обусловлен тем, что по обмену веществ царство грибов занимает промежуточное положение между царствами растений и животных, и вполне вероятно, что в этих уникальных организмах можно обнаружить такие соединения, которые не продуцируются ни в животных, ни в растениях (Гарибова, Сидорова, 1997).

Как гетеротрофы, грибы получают из субстрата все необходимые питательные вещества, и по типу трофических и топических связей их разделяют на: сапротрофы (это гумусовые и подстилочные грибы), ксилотрофы (дереворазрушающие грибы), капротрофы (развиваются в почве), микотрофы, бриотрофы, микоризные грибы т.д. (Даниляк и др., 1998).

Высшие базидиомицеты с участием, в основном, внеклеточных глюкозидазных, оксидазных и других ферментативных систем, осуществляют биodeградацию таких сложных биополимеров как целлюлоза, лигнин, пектиновые вещества, гемицеллюлоза и белки (Даниляк и др., 1998). В итоге, благодаря грибам превращение древесины в природе сводится к ее полному разложению и гумификации. Основную роль в этом процессе играют различные грибы – ксилотрофы (Рабинович и др., 2001).

Структурный каркас почти всех наземных растений состоит из полимеров: лигнина, гемицеллюлозы и целлюлозы. Объединяясь в различных пропорциях, они образуют лигноцеллюлозный материал. На его долю приходится основная часть биомассы, остающейся в огромных количествах в виде отходов сельского хозяйства, деревообрабатывающей промышленности и других отраслей хозяйственной деятельности человека: древесина, солома, рисовая шелуха, использованная бумага, картон и т.д. Эти отходы необходимо использовать или перерабатывать в качестве промышленного сырья (Глик, Пастернак, 2002).

На древесину в течение всего жизненного цикла дерева воздействует целый ряд факторов окружающей среды, приводя к ее старению и разрушению. Среди них такие

климатические факторы, как УФ-излучение, влажность, ветровые нагрузки, кислород воздуха, а также биологические факторы– грибные поражения, поражения насекомыми, бактериями, водорослями. Особенностью дереворазрушающих грибов является приспособленность к существованию в порах плотного субстрата, бедного питательными веществами, но содержащий трудноусваиваемые источники углерода – лигнин и кристаллическую целлюлозу. Благодаря мощной внеклеточной ферментативной системе, грибы-ксилотрофы способны утилизировать труднодеградируемые полимеры клеточных стенок древесины вплоть до полного разложения. На их долю приходится более 90% разлагаемой древесины. Это стимулирует интерес к их интенсивным исследованиям (Croan, 2004). Бактерии также содержат широкий набор целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ, однако они в очень ограниченной степени способны разлагать лигнин (Рабинович и др., 2001).

В последнее время грибы рассматривают в качестве перспективных источников получения липидов, полиненасыщенных жирных кислот (линоленовой, арахидоновой и др.), пигментов ( $\beta$ -каротина, ликопина, астаксантина), фосфолипидов – фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и других соединений (Пучкова и др., 2011). В составе липидов высших грибов преобладает линолевая кислота (C18:2), составляющая до 75% от суммы жирных кислот. Содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина у макромицетов может достигать 30–40% от суммы фосфолипидов. Эти фосфолипиды широко используются в медицине. Содержание в макромицетах изопреноидных и ароматических соединений (терпены, флавоноиды, меланины и др.) наряду с липофильными обеспечивает высокий уровень антиоксидантного статуса грибов. Полученные из грибов лечебно-профилактические препараты и биологически активные добавки (БАД) активно применяются в современной клинической практике Японии, Китая, Кореи и других стран Востока. Большой интерес к ним наблюдается в США и Европе, возникло даже такое направление, как фунготерапия (Пучкова и др., 2011; Wasser, 2010). Выращиванием ксилотрофов на лигноцеллюлозных отходах можно получать не только дополнительный источник белка, но и

ценные компоненты для медицины, получаемые из плодовых тел и мицелия грибов (полисахариды, стерины). При этом одновременно решается проблема загрязнения окружающей среды и биоконверсии.

В связи с этим, нами исследованы лигнолитический и целлюлолитический ферментативные комплексы некоторых представителей базидиальных грибов, а также были проведены лабораторные испытания, полученных нами активированных мицелиальных экстрактов на крысах для определения возможности их применения в фармацевтики.

#### 1.1.1. Базидиомицеты – основные представители дереворазрушающих грибов

Грибы, развивающиеся на древесине (ксилофилы, ксилотрофы), в основном принадлежат к высшим грибам, базидиомицетам – отдел *Basidiomycota*. Процесс поражения древесины начинается с появления плесневых грибов *Penicillium*, *Aspergillus* и других на поверхности древесины, питающихся соками живого дерева. Затем, в увлажненной плесневыми грибами древесине, начинают размножаться деревоокрашивающие грибы. Процесс разложения древесины завершают дереворазрушающие грибы. Они вызывают сильное гниение древесины, приводящее к появлению продольных и поперечных трещин, а затем и к полной минерализации древесины (Стороженко и др., 2000).

Поверхностная часть грибницы плесневых грибов развивается на поверхности древесины и образует на ней налет в виде скопления окрашенных спор, мицелия и органов спороношения. Плесневые грибы развиваются в температурном диапазоне 24°C – 30°C. Они являются возбудителями окислительного брожения. В результате деятельности плесневых грибов образуются промежуточные продукты – такие органические кислоты, как глюконовая, фумаровая, винная, яблочная, щавелевая, янтарная и лимонная. Эти органические кислоты способны разъедать биологический материал, в том числе и древесину. К этим видам плесневых грибов относятся виды: *Sporotrichum*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium* (Рабинович и др., 2001; Семенкова, 2008).

На подготовленной плесневыми грибами влажной древесине начинают развиваться древоокрашивающие грибы, которые вызывают специфическую синевато-серую окраску. Макроскопические признаки поражения древесины этими грибами в виде окраски обычно проявляются уже на 2-3 сутки после инфицирования, поскольку молодой мицелий бесцветен и начинает выделять типичный пигмент не сразу. Древоокрашивающие грибы оптимально развиваются в диапазоне влажности 50-90%, поскольку в древесине, насыщенной водой отсутствует кислород, необходимый для их нормального развития. Для прорастания грибов этой группы главными факторами роста является как высокая влажность, так и хорошая аэрация (Рабинович и др., 2001; Болобова и др., 2002). Древоокрашивающие грибы способствуют дальнейшему разрушению древесины дереворазрушающими грибами, которые способны разрушать клеточные стенки древесины и существенно изменять ее физико-механические свойства. Таким образом, основной причиной разрушения древесины является гниение грибами-деструкторами “бурой” и “белой” гнили (Suzuki et al., 2006; Гелес, 2007; Семенкова, 2008).

Дереворазрушающие грибы увлажняют древесину в процессе ее освоения за счет воды, образующейся при разложении целлюлозы. Возбудители биоповреждений древесины относятся в основном к следующим родам грибов: *Coniophora*, *Tyromyces*, *Lentinula*, *Serpula*, *Gloeophyllum*, *Trametes*, *Pleurotus*, *Schizophyllum* и другие (Семенкова, 2008; Куликова и др. 2011).

Внешний вид древесины в начале деятельности дереворазрушающих грибов не изменяется, а присутствие грибных нитей в ней можно обнаружить только в тонком срезе под микроскопом. В дальнейшем древесина изменяет свой естественный цвет и становится желтой или красноватой, а затем – бурой или коричневой из-за увеличения относительного содержания лигнина. В результате плотность и прочность древесины постепенно снижаются, она становится лёгкой, мягкой, теряет вязкость. Гниль такого типа называют деструктивной (Рабинович и др., 2001; Болобова и др., 2002). Возбудители деструктивных гнилей, прони-

кают в клетки древесины из сердцевинных лучей отдельными разветвленными гифами, разлагая целлюлозу, а лигнинразрушающие грибы - пучком гиф, который затем обильно разветвляется. Затем мицелий этого гриба заполняет полость клетки густым переплетением гиф, причем мицелий иногда собирается в клубки, как у *Serpula frustulosum*. Существует множество дереворазрушающих грибов, которые различаются между собой и классифицируются по форме, строению и окраске грибницы, шнуров, плодовых тел и спор, а также по скорости и силе разрушения древесины (Гарибова и др., 2005). Виды грибов, поражающие растущие деревья и вызывающие “белую” гниль способны усваивать в первую очередь лигнин древесины (Куликова и др., 2011), оставляя нетронутой целлюлозу, белые пятна и выцветы которой видны на поверхности среза.

Характер и степень гниения древесины зависит от того, какими ферментами и в какой последовательности гриб воздействует на древесину, какие именно компоненты клеточных оболочек он разрушает. Все без исключения дереворазрушающие грибы вырабатывают фермент целлюлазу, расщепляющую целлюлозу (Даниляк и др., 1989). Таким образом, в зависимости от состава ферментного комплекса их условно подразделяют на следующие типы гнилей:

- Белая гниль разрушает все структурные компоненты древесины, приводя к появлению характерного волокнообразного и бледного внешнего вида.
- Бурая гниль разрушает целлюлозу, что вызывает расщепление древесины. Участок дерева, пораженный такой гнилью, становится коричневым. Дерево темнеет, трескается и рассыпается. Они представлены значительно меньшим числом видов, чем грибы белой гнили. Они преобладают в хвойных лесах и гораздо быстрее разрушают древесину.

Дереворазрушающую активность грибов “белой” гнили в основном связывают с их внеклеточной лигнинолитической ферментной системой (Ohm et al., 2014). Начальная стадия деградации лигнина включает деметилирование метоксифенилпропановых остатков лигнина

с участием лакказы и пероксидазы, и зависит от концентрации  $O_2$  в среде (Даниляк и др., 1989). Для прикрепления к твердому субстрату и сохранения внеклеточных ферментов вблизи поверхности гифов грибы используют особые структуры — гифальные чехлы, построенные из слизистых полисахаридов предположительно  $\beta$ -1,3- $\beta$ -1,6-глюканов (Рабинович и др. 2001; Болобова и др., 2002).

Грибы “белой” гнили известны также как активные деструкторы широкого ряда поллютантов, включая полихлорированные фенолы, нитро- и аминзамещенные фенолы, полициклические ароматические углеводороды, хлорфенолы, пестициды, диоксины и муниципальные отходы (Никифорова и др., 2010; Куликова и др. 2011). Это единственные эукариоты, способные разлагать полициклические ароматические углеводороды (ПАУ). Например, они могут метаболизировать фенантрен, нафталин, антрацен, флюорантен, флюорен, пирен, бензапирен, бензаантрацен, хризен, карбазол и другие соединения (Русинова, 2007).

Деградация ПАУ, также как и процесс деградации лигнина является окислительным и протекает наиболее интенсивно при pH 4,0-5,0. Современные исследования деградации ПАУ грибами “белой” гнили направлены на детальное изучение метаболических путей и вовлеченных в них ферментных систем (Русинова, 2007; Куликова и др. 2011). Уникальная способность базидиомицетов к синтезу внеклеточных ферментов, обладающих широкой субстратной специфичностью привлекает пристальное внимание исследователей как с точки зрения понимания механизмов разложения лигнино-целлюлозного субстрата, так и с целью разработки биотехнологий утилизации древесных и растительных отходов (Куликова и др., 2011; Salvachua et al., 2013).

## 1.2. Основные ферментные комплексы представителей базидиомицетов

В настоящее время во всем мире ведется интенсивная разработка технологий на основе базидиальных лигнолитических грибов и их ферментов как для обработки лигнино-

целлюлозных материалов, так и для утилизации лигнинсодержащих отходов, накапливающихся в природе в огромных количествах (Лукаткин и др., 2008; Куликова и др., 2011).

Дереворазрушающие базидиомицеты отличаются высоким содержанием окислительно-восстановительных ферментов, в первую очередь это – пероксидазы, Mn-пероксидазы, тирозиназы и лакказы (Болобова и др., 2002). Высшие базидиомицеты по составу лигнолитических ферментов объединяют в следующие группы (Никифорова и др., 2010):

1. В первую группу входят грибы, обладающие лакказой, лигнин- и марганец-пероксидазой активностью: *Phellinus pini*, *Trametes hirsuta*, *Bjerkandera adusta*, *Phanerochaete chrysosporium*.
2. Вторая группа представлена грибами *Lentinula edodes*, *Panus tigrinus*, *Penicillium chrysosporium*, *Dichomitus squalens*, обладающих Mn-пероксидазной и лакказной активностью.
3. Третья группа характеризуется лигнинпероксидазной и лакказной активностью - грибы *Trametes versicolor*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*.
4. Грибы, составляющие четвертую группу определены как *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii*, *Bjerkandera adusta* – для них характерна лакказа, арилалкогольоксидаза и другие ароматические оксидазы.

Разнообразное сочетание ферментных комплексов у лигнинразрушающих грибов связано в первую очередь с экологическими особенностями грибов, трофической специализацией и является следствием длительной эволюции растений и грибов (Стороженко и др., 2000). Представители различных таксономических и экологических групп обладают сходным составом ферментов. Однако уровень активности внеклеточных ферментов имеет существенную штаммовую и видовую вариабельность (Даниляк и др., 1989; Гелес, 2007).

Внеклеточные лигнинолитические ферментные комплексы грибов “белой гнили” включают следующие типы окислительно-восстановительных ферментов: I. гемсодержащие

ферменты, II. флавиносодержащие ферменты, III. целлобиозодегидрогеназы, IV. медьсодержащие ферменты (Рабиновичи др., 2001). Гемсодержащие ферменты, среди которых особого внимания заслуживают лигнинпероксидазы (LiP) и марганец-пероксидазы (MnP). Дереворазрушающие грибы помимо лигнинолитических ферментов содержат также целлюлолитические ферменты: системы гидролаз, целлюлаз и гемицеллюлаз (Семенкова, 2008). Спектр целлюлолитических ферментов грибов состоит как из эндолитических (эндоглюканаз), так и экзолитических (целлобиогидролазы, экзоцеллюлазы) ферментов, действующих на целлюлозу.

#### 1.2.1. Лигнолитическая система ферментов базидиомицетов

Наиболее характерная отличительная особенность многих дифференцированных клеток – лигнификация их клеточных стенок. Образование лигнинов свойственно всем сосудистым растениям. Лигнинами называют нерегулярные трехмерные полимерные сети из фенилпропаноидов – ароматических фенольных соединений со структурой С<sub>6</sub>–С<sub>3</sub> (рис. 1). За редкими исключениями, лигнин отсутствует в первичных клеточных стенках (Алехина и др., 2005). Его синтез строго совпадает с началом дифференциации клетки и образованием вторичной клеточной стенки. Фенилпропаноиды, входящие в состав лигнина, представлены оксикоричными спиртами – “монолигнолами”. К ним относятся п-кумаровый, кониферилловый и синаповый спирты. Конденсация этих трех компонентов и образует сеть лигнина. Монолигнолы могут связываться между собой различным образом – простой эфирной связью, сложноэфирной связью, либо С-С – связями. Синтез монолигнолов довольно хорошо изучен. Все его этапы происходят в цитозоле, где образуются СоА–эфиры монолигнолов, и кроме того, они могут быть гликозилированы. Гликозилирование может быть важно для направленного мембранного транспорта. После попадания СоА–эфиров монолигнолов в клеточную стенку происходит их окислительная полимеризация (Hatakka, 2001; Morreel et al., 2010). В клеточных стенках этот процесс могут осуществлять три фермента – лакказа,

полифенолоксидаза и пероксидаза (рис.2). В последнее время получены данные, свидетельствующие о том, что за полимеризацию лигнина ответственна, прежде всего, пероксидаза (Алехина и др., 2005; Lebo et al., 2007; Martone et al., 2009; Капич, 2011; Rencoret et al., 2015).

Из всех распространенных в природе натуральных материалов, лигнин наиболее насыщен ароматическими полимерами. Благодаря своей гетерогенности и сложной полимерной структуре, лигнин стенок растительных клеток устойчив к биологической атаке большинством микроорганизмов (Tsukira et al., 2006). Заслуживает внимания и тот факт, что базидиомицеты “белой гнили” разлагают лигнин, а также стойкие остатки окружающей среды до углекислоты и воды (Baldrian, Valaskova, 2008). По этой причине они дереворазрушающие грибы находятся в центре внимания исследователей для решения проблемы эффективной утилизации ресурсов растительной массы и применения биоремедиации загрязнителей среды, содержащей различные вредные соединения (Kirk et al., 1987; Gold, Alic, 1993; Cullen, 1997; Duran, Esposito, 2000; Куликова и др., 2011).

Некоторые виды *Pleurotus* и *Bjerkandera* отличаются от других представителей базидиомицетов “белой” гнили секретированием пероксидаз с исключительно широким спектром действия субстратной специфичности (Mester, Field, 1998; Camarero et al., 1999; Kamisutji et al., 2005). Эти пероксидазы называются универсальными или гибридными (иногда полифункциональными) пероксидазами (versatile peroxidase), поскольку они обладают свойствами, подобными двум популярным семействам грибных пероксидаз: лигнин пероксидазам (LiP/ЛиП) и марганец пероксидазам (MnP/МнП) (Cohen et al., 2001; Martone et al., 2009; Куликова и др., 2011). Универсальные пероксидазы (УП) имеют сайт  $Mn^{2+}$ -связывания и эффективно окисляют  $Mn^{2+}$  до  $Mn^{3+}$ , точно также как это делают непосредственно типичные марганец пероксидазы. В то же время, подобно ЛиП они способны непосредственно окислять фенольные и нефенольные соединения, включая вератрил алкоголь (Camarero et al., 1999; Ha et al., 2001; Gomez-Toribio et al., 2001).

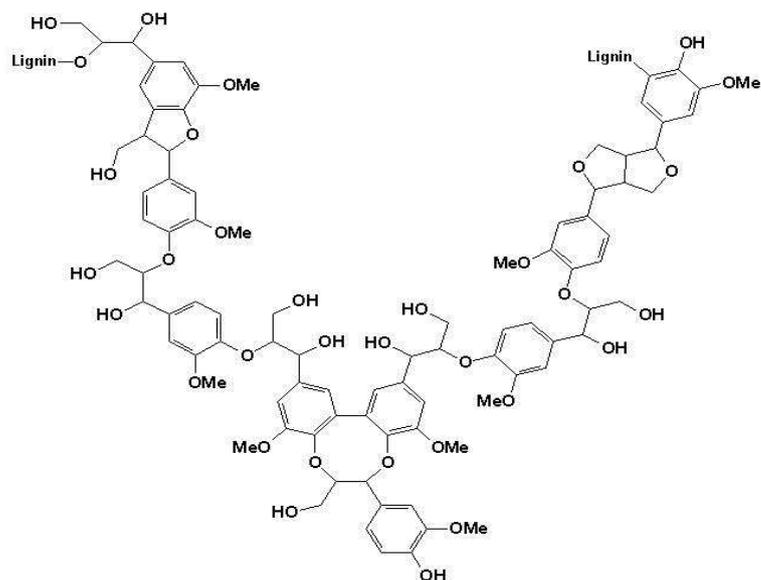


Рис.1. Трехмерные полимерные сети из фенилпропаноидов – лигнин (Lebo et al., 2007)

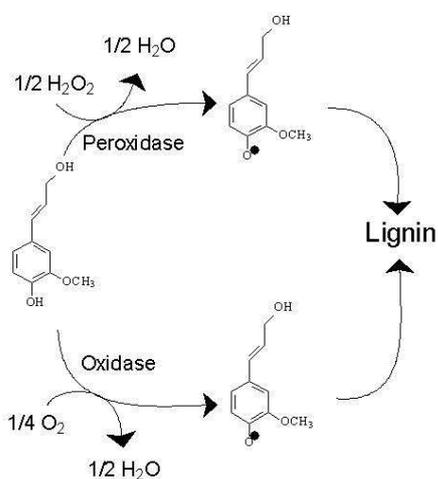


Рис. 2. Полимеризация кониферилового спирта до лигнина. Реакция протекает двумя альтернативными циклами, катализируемыми двумя различными окислительными ферментами: пероксидазой и оксидазой (Martone et al., 2009).

Уникальные свойства демонстрирует УП и МНП ферменты гриба *P.ostreatus*, поскольку они непосредственно окисляют такие высоко-молекулярные соединения как PolyR-478(краску) и даже РНазуА (Tsukihara et al., 2006). Кроме того, определенную роль в разложении лигнина играют ферменты, участвующие в продукции перекиси водорода  $H_2O_2$ , необходимой для проявления активности пероксидаз, а также некоторые другие ферменты, например, такие как пероксигеназа, целлобиозодегидрогеназа и др. (Hildén et al., 2005; Hofrichter et al., 2010). Литературные данные свидетельствуют, что в процессе биодegradации лигнина грибы белой гнили генерируют активные формы кислорода ( $H_2O_2$  перекись водорода, супероксидный радикал  $\bullet OO\cdot$ , гидроксильный радикал  $\bullet OH$  и др.), при участии лигнинпероксидазы с образованием катион-радикалов фенольной природы (Palmer et al., 1987; Sapparot et al., 2002).

Поскольку ненасыщенные жирные кислоты легко подвергаются свободнорадикальному окислению в присутствии активных форм кислорода и свободных радикалов (Владимиров, Арчаков, 1972; Бурлакова, Храпова, 1985), исследователями предполагалось, что в мицелии дереворазрушающих грибов могут активно протекать реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ). Образующиеся при этом высокоактивные перекисные радикалы липидов могут быть вовлечены в деградацию лигнина, что впервые подтвердилось американскими, а затем и российскими учеными (Bao et al., 1994; Капич, 2011).

Пероксидазы относятся к группе ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции, и могут служить показателем интенсивности окислительных процессов. Токсичные молекулы, такие как супероксид и гидроксид радикалы обнаруживаются в клетках в присутствии кислорода. Они являются вторичными продуктами аэробного дыхания. Повышение активности ПО свидетельствует об активации окислительных процессов и может быть вызвано образованием в облученной системе большого количества перекиси водорода, усилением свободнорадикальных процессов, ведущих к изменению свойств мембран. Эти изменения могут быть результатом как непосредственного воздейст-

вия КВЧ ЭМИ на мембраны, так и опосредованного – через воздействие на воду (Чеснокова и др., 2006).

Все представители группы дереворазрушающих грибов осуществляют расщепление лигноцеллюлозного комплекса древесины – наиболее важный этап в ее биодegradации (Hatakka, 2001; Martinez et al., 2004, 2009). Способность этих грибов к расщеплению лигнина связана с тем, что они продуцируют комплекс лигнинолитических ферментов (Hatakka, 1994; Hammel et al., 2008; Hofrichter et al., 2010), которые осуществляют разрушение лигнина. Последние работы показывают, что главную роль в деградации лигнина, играют лигнинолитические ферменты, в частности, Mn-пероксидазы (Капич, 2011).

Лигнинпероксидаза (LiP) является хорошо изученной пероксидазой грибного происхождения, вместе с другими грибными пероксидазами ее относят к классу II надсемейства пероксидаз. Молекулярная масса ее составляет около 40 кДа. Изоэлектрические точки лежат в области pI=3.2- 4.7 (Айзенштадт и др., 2009). LiP содержат как соседствующий с гемом, так и отдаленный Ca-связывающие сайты, однако в ней отсутствуют дополнительные структурные элементы между  $\alpha$ -спиралями F и G, характерные для пероксидаз класса III. Активный центр LiP сходен с закрытой структурой активного центра HRP (так называемый гемовый карман) и отличается от других гемсодержащих белков: глобинов, каталазы, хлоропероксидазы и других, у которых гем расположен наружу (Айзенштадт и др., 2009; Fernandez-Fueyo et al., 2014).

Большой интерес представляет выделение гибридных пероксидаз из дереворазрушающих грибов. Грибная универсальная пероксидаза (УП) содержит четыре дисульфидные связи и два катиона кальция на молекулу фермента, тем самым отличаются от растительных ПО (Nielsen et al., 2001; Газарян и др., 2006; Айзенштадт и др., 2009). По последним данным в грибе *P.ostreatus* отсутствуют гены лигнин-пероксидазы, а ключевую роль в разрушении лигнина играют Mn-пероксидазы и УП (Fernandez-Fueyo et al., 2014), которые представлены на рис 3. Этими же авторами был исследован аминокислотный состав

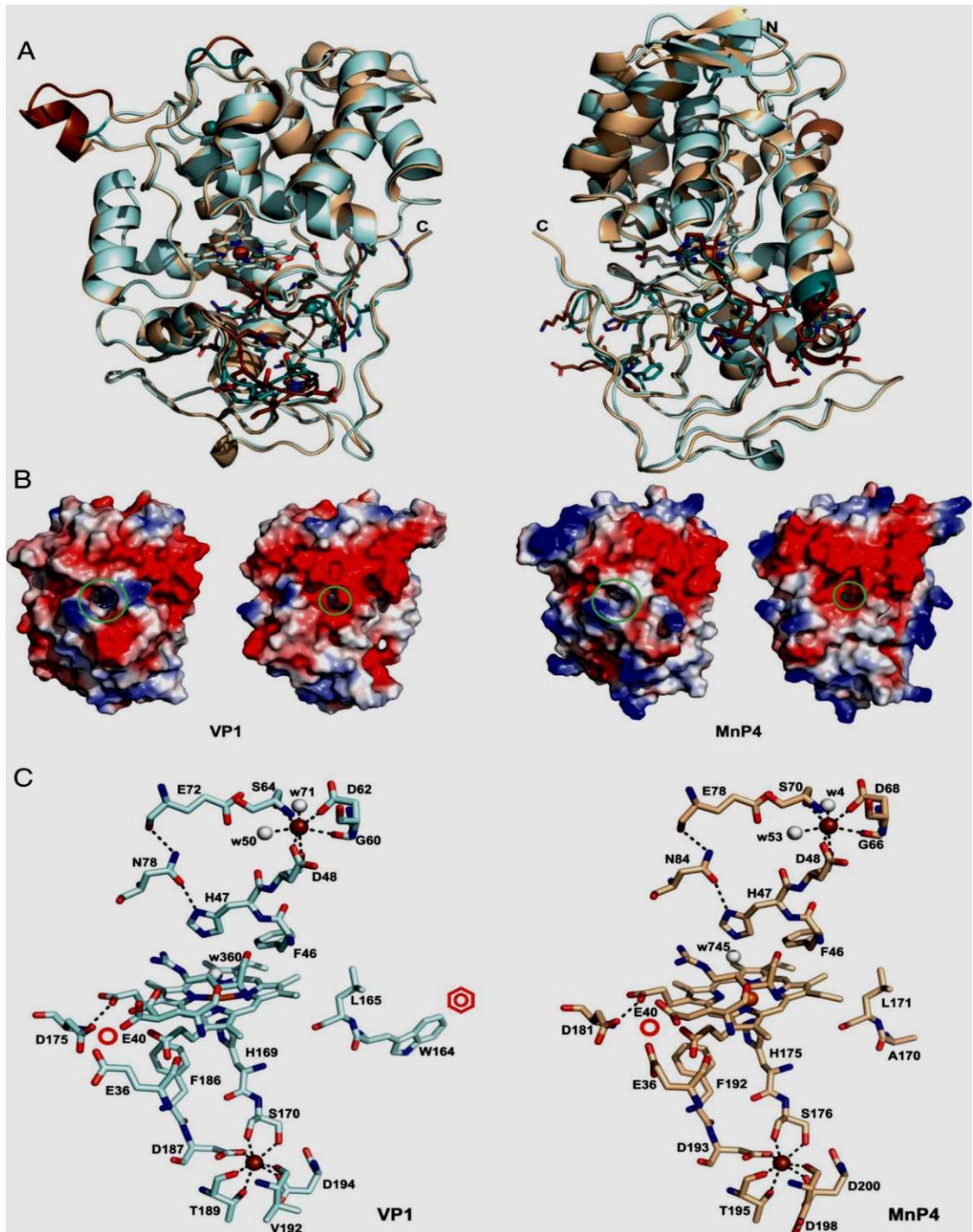


Рис.3. Кристаллическая структура наиболее значимых изоэнзимов УП/МнП в составе генома вешенки обыкновенной. А– наложение кристаллических структур УП 1 (светло голубой) и МнП 4 (светло коричневый); В– электростатические поверхности УП 1 и МнП4, где отмечены основным гем доступный канал (большая окружность) и более узкий  $Mn^{2+}$  доступный канал. С–детальная структура УП и МнП гема и прилегающих регионов (Fernandez-Fueyo et al., 2014).

и выявлено, что в формировании водородного канала дистального гистидина участвуют две молекулы аспарагина (N78 и N84 соответственно) и два остатка глутамата (E 72 и E 78 соответственно). Сайт окисления  $Mn^{2+}$ , предположительная позиция которого помечена красным кружком(рис.3, С), также состоит из двух молекул глутамата (E36 и E40) и одного аспартата (D 175 и D 181 соответственно).

Таким образом, глутамат (глутаминовая кислота) играет достаточно важную роль в создании электростатического поля и каналов фермент-субстрат связывания. Грибная УП обладает высоким окислительно-восстановительным потенциалом, в результате чего способна окислять не только фенольные, но и нефенольные модельные соединения лигнина, ароматические эфиры и полициклические ароматические соединения (Baldrian, 2006; Куликова и др., 2011).

Ферментные препараты, получаемые из грибов “белой гнили”, находят широкое применение в самых различных отраслях пищевой и легкой промышленности, в косметологии, в производстве синтетических моющих средств, в медицине, в аналитических исследованиях, сельском хозяйстве, охране окружающей среды и ряде других областей (Русинова, 2007). Пероксидаза широко применяется для диагностики острых и хронических, бактериальных и вирусных (в том числе СПИД), а также в тестировании эндокринных заболеваний и злокачественных новообразований в качестве иммуногена при синтезе моноклональных антител методом иммунологического анализа (Давыдова и др., 1998). В промышленности пероксидаза применяется для очистки от фенолов при производстве бензина, каучука и т.д. (Gunde-Cimerman et al., 1995; Rad et al., 2007).

### 1.2.2. Целлюлолитический ферментативный комплекс дереворазрушающих базидиомицетов

Целлюлоза - основной полимерный компонент клеточных стенок растений, самый распространенный полисахарид на планете и важный возобновляемый ресурс (Baldrian,

Valaskova, 2008). Химический состав целлюлозы простой, она содержит остаток D-глюкозы, связанной  $\beta$ -1,4-глюкозидными связями, образуя линейные полимерные цепи, состоящие из более чем 10.000 глюкозидных остатков. Целлюлоза содержит как высоко кристаллические области, в которых отдельные цепи связаны между собой, так и менее упорядоченные – аморфные. Хотя по структурному содержанию целлюлоза проста, однако участки с межмолекулярными связями приводят в результате к сложной морфологии (Нон, 1994). Базидиомицеты являются самыми мощными деструкторами этого полимера, поскольку многие виды растут на мертвой древесине или подстилке, в среде богатой клетчаткой. Целлюлолитическая система грибов отличается от сложной целлюлолитической системы бактерий, однако различия между отдельными таксономическими группами менее выражены (Lynd et al., 2002).

Несмотря на то, что разложение целлюлозы базидиомицетами интенсивно изучается с середины прошлого века (Reese, Levinson, 1952), однако представление о деградации целлюлозы изменилось только за последние несколько лет. Основными причинами этого были формулировка вклада окислительных систем в деградацию целлюлозы, в том числе первые попытки количественно оценить их важность (Suzuki et al., 2006), обнаружение поступления эндоглюканаз в грибах “бурой гнили” (Cohen et al., 2005; Yoon et al., 2007), а также появление первой последовательности генома *Phanerochaete chrysosporium*–дереворазрушающего базидиомицета (Martinez et al., 2004), что значительно повысило мощь протеомических методов и их моделирования для обнаружения отдельных компонентов модели целлюлолитической системы (Van den Wymelenberg et al., 2005, 2006; Kersten, Cullen, 2007; Sato et al., 2007).

Как ранее было отмечено, классический спектр целлюлолитических ферментов грибов состоит из эндолитических (эндоглюканаз) и экзолитических (целлобиогидролазы, экзоцеллюлазы) ферментов, действующих на целлюлозу. Полученная целлобиоза или целло-олигосахарид, как правило, обрабатываются внеклеточными или внутриклеточными  $\beta$ -

глюкозидазами или подлежат дегидрированию целлобиоз-дегидрогеназой.  $\beta$ -глюкозид глюкогидролазы (рис. 4), обычно называемые  $\beta$ -глюкозидазами, катализируют гидролиз алкил- и арил- $\beta$ -глюкозидов, таких как диглюкозиды и олигосахариды (Henrissat et al., 1995).  $\beta$ -глюкозидаза – общее название ферментов класса гидролаз (КФ 3.2.1.21), катализирующих гидролиз  $\beta$ -глюкозидной связи в природных и синтетических  $\beta$ -глюкозидах и олигосахаридах. Цепь расщепления целлюлозы до глюкозы с участием  $\beta$ -глюкозидазы и гидролаз представлена на схеме (рис. 5). В организме человека также имеется  $\beta$ -глюкозидаза, наследственная недостаточность которой является причиной развития керинового ретикулогистиоцитоза (болезнь Гоше). Эти ферменты широко используются в различных биотехнологических процессах, включая производство горючего этанола из целлюлозных сельскохозяйственных остатков (Bothast et al., 1997; Fernandez-Fueyo et al., 2014).

Большинством микроорганизмов синтезируются  $\beta$ -глюкозидазы, поскольку целлобиоза является субстратом, имеющимся в природе в изобилии (Lynd et al., 2002; Baldrian, Valaskova, 2008). Этот фермент был выделен из нескольких видов дереворазрушающих грибов – как белой гнили, так и бурой гнили (табл. 1). Выделенные  $\beta$ -глюкозидазы проявляют структурную вариабельность, что частично отражает внутриклеточную или внеклеточную локализацию фермента (табл. 1), четвертичная структура которого может состоять из мономера, гомо-олигомера или гомо-тримера и т.д.. Поэтому молекулярные массы этого фермента, обнаруженные в различных ксилотрофах, могут колебаться в интервале от 35 до 640 кДа. Были выделены небольшие по размеру мономерные ферменты с молекулярной массой около 100 кДа, имеющими в основном внеклеточную локализацию (Baldrian, Valaskova, 2008). С другой стороны, внутриклеточная мембраносвязанная  $\beta$  – глюкозидаза, выделенная из гриба *Trametes versicolor*, имела молекулярную массу в 300кДа, хотя представляет собой мономерный гликопротеин, который на 90% гликозилирован. Четвертичная структура больших внутриклеточных ферментов, выделенных из таких грибов

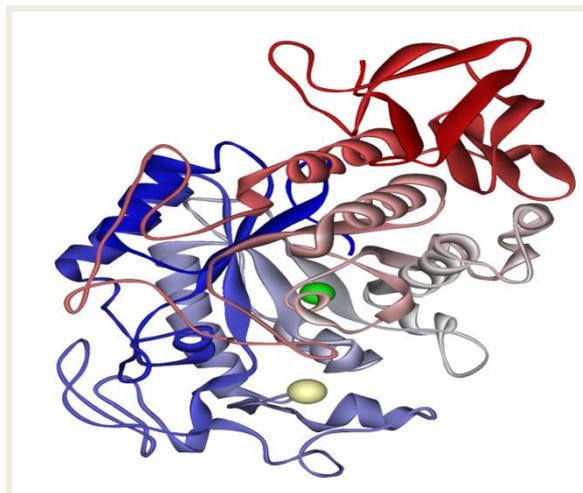


Рис. 4. Модель глюкозид гидролазы (Henrissat, 1995).

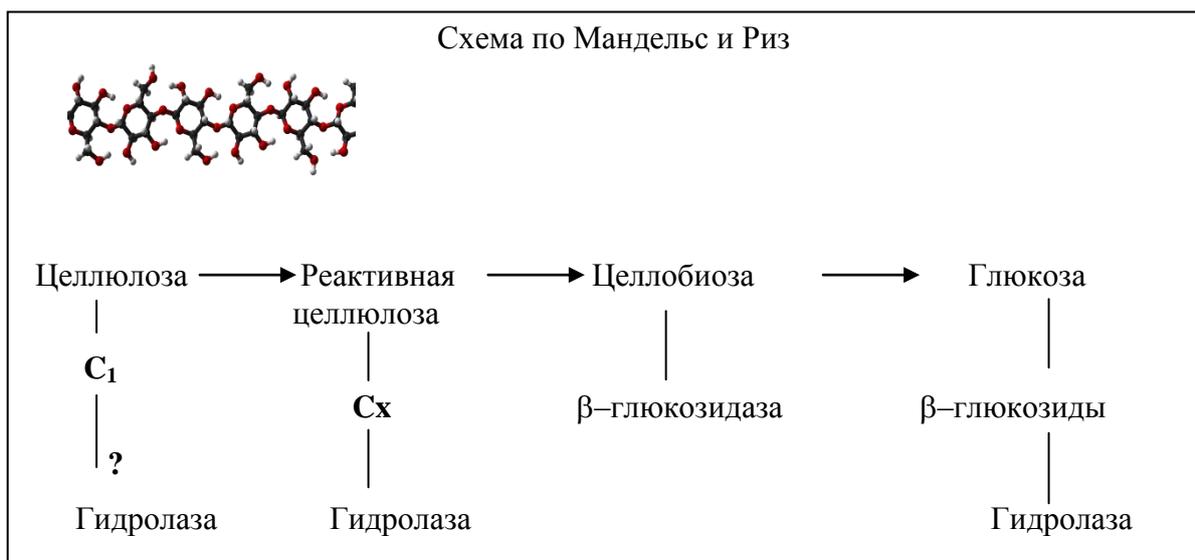


Рис.5. Цепь расщепления целлюлозы с участием β-глюкозидазы (Родионова, Тиунова, 1967)

Некоторые свойства  $\beta$ -глюкозидаз, выделенных из грибов белой и бурой гнили  
(Baldrian, Valaskova, 2008)

Вид гриба	Группа	Мол.мас. (в кДа)	pI	K <sub>M</sub> (mM)	pH оптимум	Ссылки
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	WR	110		390	3.5	Magalhaes et al. (2006)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	WR	53				Magalhaes et al. (2006)
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	BR	320		41	4.5	Herr et al. (1978a, b)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	WR	90		160	5.5	Smith & Gold (1979)
<i>Ph. chrysosporium</i>	WR	114		96	4.0–5.2	Lymar et al. (1995)
<i>Ph. chrysosporium</i>	WR	410		110	7.0	Smith & Gold (1979)
<i>Ph. chrysosporium</i>	WR	45	4.7	5300	5.0	Copa-Patino, Broda (1994)
<i>Ph. chrysosporiumz</i>	WR	116		3350		Igarashi et al. (2003)
<i>Ph. chrysosporium A1</i>	WR	165	4.8	150	4.0–4.5	Deshpande et al. (1978)
<i>Ph. chrysosporium A2</i>	WR	172	4.5	150	4.0–4.5	Deshpande et al. (1978)
<i>Ph. chrysosporium B</i>	WR	165–182	4.6–5.2	210	4.0–4.5	Deshpande et al. (1978)
<i>Ph. chrysosporium BGL1Ak</i>	WR	53		230		Tsukada et al. (2006)
<i>Ph. chrysosporium BGL1Bk</i>	WR	60		620		Tsukada et al. (2006)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	WR	35	7.5	2300		Morais et al. (2002)
<i>P.ostreatus</i>	WR	50	7.3	2360		Morais et al. (2002)
<i>P. ostreatus</i>	WR	66	8.5	2430		Morais et al. (2002)
<i>Poria vailantii</i>	BR		4.2			Sison, Schubert (1958)
<i>Schizophyllum commune</i>	WR	94–96				Willick, Seligy (1985)
<i>Sch. communeI</i>	WR	110				Lo et al. (1988)
<i>Sch. commune II</i>	WR	96				Lo et al. (1988)
<i>Trametes gibbosa</i>	WR	640	3.5			Bhattacharjee (1992)
<i>Trametes versicolor</i>	WR	300		276		Evans (1985)

\*BR- бурая гниль (brown rot); WR- белая гниль (white rot).

как *Phanerochaete chrysosporium* (410 кДа) и *Volvariella volvacea* (256 кДа), пока что не определена (Smith, Gold, 1979; Cai et al., 1998).

Как свидетельствуют данные некоторых авторов практически все  $\beta$ -глюкозидазы гликозилированы, но содержание мономеров сахара в них колеблется (Evans, 1985; Lymar et al., 1995). Изоэлектрической точкой (pI) для связанных с клеточной стенкой и внеклеточных ферментов кислотная, в пределах между 3.5 и 5.2, в то время как для внутриклеточных ферментов pI находится в пределах от 6.2 до 7.0 (Baldrian, Valaskova, 2008).

Как уже упоминалось,  $\beta$ -глюкозидазы могут быть внеклеточные, связанные с клеточной стенкой, и внутриклеточные. Общая активность всех этих фракций мицелий-ассоциированных (внеклеточных) ферментов в *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* и *Piptoporus betulinus* составляет 65%, 13%, и 35% соответственно (Baldrian, Valaskova, 2008).

Внутриклеточная локализация некоторых  $\beta$ -глюкозидаз требует переноса целлобиозы в клетку. Хотя не доказано, но вполне вероятно, что пермеазы, похожие на диглюкозид-пермеазы из *Trichoderma reesei*, также действуют в базидиомицетах (Kubicek et al., 1993). Наличие внеклеточных и внутриклеточных ферментов находит свое отражение в синтезе молекул фермента, различающихся по структурным и каталитическим свойствам.

Самый маленький обнаруженный внеклеточный белок в 45 кДа, в дополнение к его *p*-нитрофенил- $\beta$ -глюкозид (PNPG) активности, также может расщеплять *p*-нитрофениловый- $\beta$ -D-ксилопиранозид (pNPX) и дисахарид – ламинарибиоза ( $\beta$ -1-3), который почти не активен в отношении полимерной целлюлозы и ксилана (Cora-Patino, Broda, 1994). Фермент  $\beta$ -глюкозидаза конкурентно ингибируются глюкозой, глюконолактоном, а также целлобионолактоном, который является продуктом окисления целлобиозы целлобиоз-дегидрогеназой (Lymar et al., 1995). Так, внутриклеточный фермент с молекулярной массой в 410 кДа сильно индуцируется целлобиозой, но слабо – целлюлозой (Smith, Gold, 1979). Согласно данным исследователей глюкоза воздействует как репрессор синтеза  $\beta$ -глюкозидазы в грибах *Phanerochaete chrysosporium* (Smith, Gold, 1979).

Активность  $\beta$ -глюкозидазы конкурентно подавляется глюкозой ( $K_i$  0.2–6 mM), глюконолактоном и целлобионолактоном. Оптимальное значение pH, как правило, составляет от 3,5 до 5,5, но для внутриклеточного фермента из *Phanerochaete chrysosporium* оптимум pH может быть нейтральным (Smith, Gold, 1979), а оптимальная температура находится между 45<sup>0</sup> и 75<sup>0</sup>С.

В пищевой промышленности  $\beta$ -глюкозидаза также является ключевым ферментом в ферментативном высвобождении ароматических соединений из глюкозидных предшественников, представленных в фруктах и ферментативных продуктах (Bothast et al., 1997). Так, многие натуральные ароматические соединения, такие как, монотерпенолы, С-13 норизопреноиды, шикимат-производные соединения, аккумулируются в фруктах как предшественники без запаха, связанные с моно- и диглюкозидами, и для высвобождения их ароматов требуется ферментативный либо кислотный гидролиз (Roitner et al., 1984), схема этого процесса представлена на рис. 6.

Наконец,  $\beta$ -глюкозидазы могут также улучшать органолептические свойства цитрусовых фруктовых соков, в которых горечь обусловлена содержанием глюкозидного соединения: наринджином (4',5, 7-тригидроксилфлавонол-7-рамноглюкозид), для гидролиза которого необходима последовательная обработка  $\alpha$ -рамнозидазой и  $\beta$ -глюкозидазой (Roitner et al., 1984).

Определенные монотерпенолы винограда (линалол, гераниол, нерол, цитронелол,  $\alpha$ -терпениол и линалол оксид) соединены с такими дигликозидами, как 6-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозил, 6-О- $\alpha$ -L-арабинофуранозил и 6-О- $\beta$ -D-апиофуранозил- $\beta$ -D-глюкозиды, которые определяют вкусовые качества вина. Для ферментативного гидролиза этих соединений требуются последовательные реакции: во-первых,  $\alpha$ -L-рамнозидаза,  $\alpha$ -L-арабинофуранозидаза, или  $\beta$ -D-апиофуранозидаза, расщепляет 1→6 связь, а затем ароматические соединения высвобождаются из моноглюкозидов воздействием  $\beta$ -глюкозидаз (Günata et al., 1997).

Синтез ароматических кислот (фенолов)

эритрозо - 4 - фосфат + фосфоенолпируват →

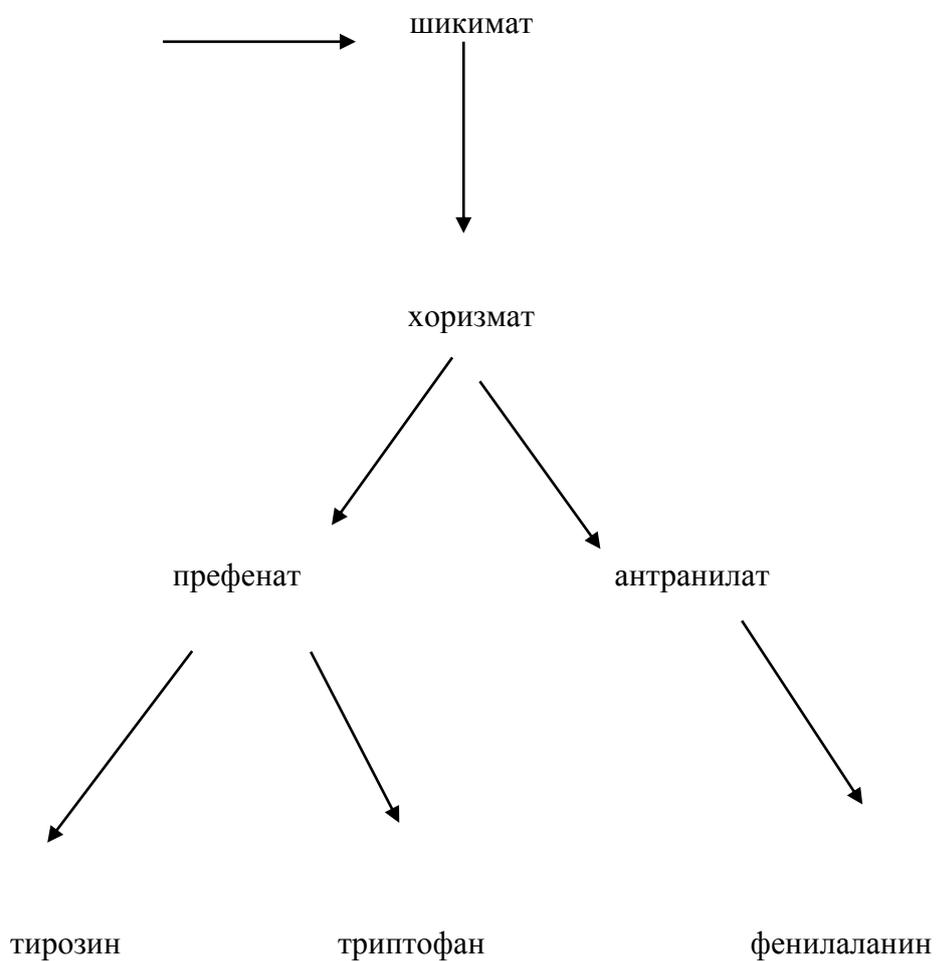


Рис. 6. Ферментативный гидролиз шикимата до ароматических аминокислот

(Günata et al., 1997).

В отличие от кислотного гидролиза, ферментативный гидролиз очень эффективен и не приводит к модификациям ароматического характера. Однако, виноградные и дрожжевые глюкозидазы проявляют наименьшую активность на монотерпенил-глюкозиды в виноделии, и большая часть фракции ароматических предшественников остается необработанной. Добавление экзогенной  $\beta$ -глюкозидазы в течение или после ферментации оказывается более эффективным для улучшения гидролиза глюкозосвязанных ароматических компонентов с целью улучшения аромата вина (Riou et al., 1998).

Идеальные  $\beta$ -глюкозидазы должны функционировать и быть устойчивыми при низких значениях pH ( в пределах pH от 2,5 до 3,8), и должны сохранять активность при высоких концентрациях глюкозы (10-20%) и в присутствии 10-15% этанола. Однако, большинство бактериальных  $\beta$ -глюкозидаз очень чувствительны к ингибции глюкозой и глюконо- $\delta$ -лактоном. Вдобавок  $\beta$ -глюкозидаза бактерий ингибируется виноград-поражающими грибами, если их концентрация в вине превышает 2г/л.

Необходимость нахождения более подходящих ферментов приводит многих исследователей к поиску новых  $\beta$ -глюкозидаз с предпочтительными свойствами. Недавно было показано, что внеклеточные глюкозо-устойчивые и pH-стойкие  $\beta$ -глюкозидазы могут вырабатываться штаммами *Aspergillus* (Riou et al., 1998). Однако, представляющий интерес фермент, составляет только минорную фракцию всей  $\beta$ -глюкозидазной активности, а большая фракция высокочувствительна к ингибированию глюкозой.

Как показали исследования, *Aspergillus oryzae* оказался эффективным продуцентом минорных глюкозо-толерантных форм фермента  $\beta$ -глюкозидазы, если выращивается на кверцетине (3,3',4',5,7-пентагидроксилафлавон), а фенольные флавоноиды обнаружены в растительных клеточных стенках (Riou et al., 1998). Исследования и поиск других растительных и грибных источников  $\beta$ -глюкозидаз, толерантных к ингибированию глюкозой, продолжаются. Возможно, модификации условий выращивания также могут привести к получению устойчивых форм фермента.

### 1.3. Влияние крайне высоких частот электромагнитного излучения на физиологические параметры грибов

Исследованиями ученых за последние несколько лет показано, что электромагнитные поля способны оказывать воздействие на биологические системы в условиях *in vivo* и *in vitro* (Pilla, 1994). Все большее внимание ученых направлено на приложение биоэлектромагнитной стимуляции живых культур для биотехнологии и биоэнергетики, используя низкочастотные электромагнитные поля. Ряд биопроцессов может быть успешно интегрирован с электромагнитной или электрохимической стимуляцией, если правильно спланировать условия культивирования с использованием специализированных реакторов, как, например, электролитические биореакторы, электро-биореакторы и биоэлектрореакторы (Velizarov, 1999).

Особенность свойств крайне высоких частот электромагнитного излучения (КВЧ ЭМИ) или, так называемых, мм-волн заключается в том, что их активное биологическое воздействие на живые организмы проявляется при крайне низком, нетепловом уровне мощности. За этим скрывается новое качество взаимодействия электромагнитных волн с биологическими средами. В результате научно-исследовательской деятельности научных коллективов была выдвинута гипотеза об информационно-резонансном, а не энергетическом характере взаимодействия мм-радиоволн с биологической средой (Девятков и др., 1991). Однако и с этих позиций трудно объяснить, каким образом при лечении внутренних органов “информация” передается вглубь биологической среды организма, являющегося на 70-80 % водной средой. Поскольку известно, что вода сильнейший поглотитель мм-волн, то волны мм-диапазона не должны были бы проникать глубже поверхностного слоя, толщиной более 0.1мм. Для объяснения строились различные физические и биомедицинские модели (Девятков и др., 1991; Бецкий, 1993; Бецкий и др., 1996), но ни одна из них не решала проблему принципиально.

Электромагнитные излучения миллиметрового (крайне высокие частоты - КВЧ) и сантиметрового (сверхвысокие частоты - СВЧ) диапазона низкой интенсивности в настоящее

время успешно применяются в медицине. Исследование действия СВЧ-излучения, сравнительно высокой интенсивности, на физиологические параметры актиномицетов показали, что под влиянием СВЧ-облучения изменяется скорость накопления биомассы в погруженной культуре у двух изученных штаммов стрептомицетов (Лукьянов, 2001). В качестве объектов были исследованы выделенные из почвы культуры актиномицетов *Streptomyces xanthochromogenes* штамм N8 и *Streptomyces cinoreoerectus* штамм N10 (Комарова и др., 2010). Физиологическое состояние контролировалось по сохранению жизнеспособности вегетативных клеток и спор, приросту биомассы и изменению реакционной способности (РС) выделяемых в среду нативных экзометаболитов. В этих исследованиях было обнаружено, что облучение может усиливать РС, и коррелирует с приростом биомассы и сохранением жизнеспособности. Таким образом, в этих экспериментах было показано, что действие СВЧ-облучения на актиномицеты может оказывать не только стимулирующий эффект на прирост биомассы, но и, вероятно, влияет на изменение метаболизма клеток актиномицетов (Комарова и др., 2010; Лукьянов, Тамбиев, 2013).

На фоне активного экспериментального исследования действия мм-волн КВЧ-излучения низкой интенсивности на различные объекты, а также успешного применения его в практической медицине (КВЧ-терапия), в последние годы сформировалось новое направление, заключающееся в действии этого фактора на фотосинтезирующие объекты. В работе некоторых авторов показана перспективность использования КВЧ-излучения для стимуляции роста цианобактерий и микроводорослей (про- и эукариот), в том числе у таких фотобиотехнологических объектов, как *Spirulina platensis* и *Platymonas viridis* (Tambiev et al., 1997; Лукьянов, 2007). Для этого в первую очередь была разработана методика непрерывного облучения цианобактерий и микроводорослей, и проведена оптимизация параметров облучения. Получен также статистически достоверный стимулирующий эффект при однократном облучении, имеющий временную, частотную и мощностную зависимость, который сопровождался интенсивным накоплением биомассы (Tambiev et al., 1997). Как

было получено во многих исследованиях этой группы, взаимодействие КВЧ излучения с цианобактериями и микроводорослями имело выраженный резонансный характер, оказывало эффект интенсификации фотосинтетических процессов в облученных клетках, заключающийся в повышении выделения кислорода и содержания пигментов, который можно рассматривать как один из первичных механизмов стимулирующего действия КВЧ – излучения. На основе данных экспериментов была предложена возможность применения КВЧ-излучения в качестве нового экологически чистого биотехнологического метода физиологической регуляции метаболизма клеток фотосинтезирующих организмов, в том числе стимуляции выхода биомассы и ускорения роста, что является перспективным для биотехнологии биорафинирования биомассы в производстве биотоплива, энергии и других ценных продуктов (Tambiev et al., 2000; Лукьянов, 2007; Chisti et al., 2007; Hunt et al., 2009).

#### 1.4. Лечебное использование дереворазрушающих грибов

Лечебное использование грибов базидиомицетов имеет очень давнюю традицию в странах Азии. В странах же Запада интерес к целебным свойствам грибов стал расти только в последние десятилетия. Наряду с большим вкладом таких микроскопических грибов, как *Penicillium*, *Aspergillus*, *Tolypocladium inflatum*, *Claviceps purpurea* в производство биоактивных метаболитов, а также богатым опытом использования грибов в народной медицине Востока и растущими возможностями генетического, фармакологического и химического анализа, позволяет говорить о перспективности исследований лечебного применения грибов-макромицетов. Из литературы известно, что фармацевтические препараты, получаемые из макромицетов, ускоряют вывод из организма радионуклидов, тяжелых металлов, холестерина и различных токсических веществ, имеют антиканцерогенное, антибактериальное, противовирусное и анти-СПИД-овую активность (Lull et al., 2005; Sanz et al., 2008; Wu et al., 2011; Liu et al., 2012; Patel et al., 2012; Teplyakova, Kosogova 2015).

Во многих странах мира грибы производятся уже не только для употребления в пищу, но также и для использования их в качестве дешевого сырья при получении фармацевтических препаратов. Как нами ранее отмечалось, широкое практическое применение в разных отраслях промышленности и медицины нашли ряд ферментов, содержащихся в грибах. Ферменты грибов применяются для различных целей: целлюлазы – для осветления фруктовых соков, переработки сырья, грубых кормов, разрушения остатков бумажных отходов; протеазы – для гидролиза белков; амилазы – для гидролиза крахмала, пероксидазы применяются для диагностики острых и хронических бактериальных и вирусных (в том числе СПИД), эндокринных заболеваний и злокачественных новообразований методом иммунологического анализа, а также для очистки от фенолов при производстве бензина, каучука и т.д. (Давыдова и др., 1998; Gunde-Cimerman, 1999; Rad et al., 2007).

Высшие базидиальные грибы обладают не только большой питательной ценностью, но также служат источником биологически активных веществ (Kawagishi et al., 1997; Gunde-Cimerman, 1999), что выдвигает их на первый план в качестве дешевого сырья для получения фармакологически ценных компонентов. На сегодняшний день приоритетным направлением стала разработка новой терапевтической стратегии, такой как интегративная и комплементарная медицина, для лечения иммунодефицита, рака и т.п. Одним из подходов является поиск эффективных адьювантных веществ из съедобных или медицинских грибов, которые способны активировать клеточный ответ апоптоза в раковых клетках (Lindequist et al., 2005; Sullivan et al., 2006).

В настоящее время нет научной основы для использования грибов либо грибных экстрактов в лечении пациентов, однако имеется значительный стимул для тщательных исследований, чтобы понять потенциальные возможности грибов в лечении болезней, с последующим фокусированием на соответствующие клинические испытания, что позволит продемонстрировать их потенциальную эффективность или токсичность (Borchers et al.,

2008). Однако для понимания эффективности использования грибов необходимы сравнительные исследования различных видов грибов или подобных соединений, выделенных из одних и тех же, или разных видов грибов на одной и той же модели с целью определения, какое вещество лучше всего подходит для решения конкретной задачи (Borchers, 2008). На сегодняшний день имеются единичные работы в этом направлении (Wu et al., 2011).

Биополимеры клеточных стенок высших грибов – *Lentinus edodes*, *Pleurotus sajor-caju*, *Hericium erinaceum* содержат полисахариды, обладающие выраженной антираковой активностью. В клеточных стенках грибов *Ganoderma lucidum* обнаружен меланин-белковый комплекс, функция которого, вероятно, заключается в защите активной формы белка от неблагоприятного воздействия окружающей среды, в частности от ультрафиолетового излучения (Полесскова и др., 2006). Экстракт гриба *Pleurotus ostreatus* при индивидуальном действии является слабым индуктором апоптоза, поскольку вызывает аномальную сегрегацию хромосом трансформированных клеток на стадии метафазы (Поляков и др., 2007). Большое количество соединений, таких как полисахариды и полисахарид-белковые комплексы с иммуномодулирующим и антиканцерогенным действием были выделены из грибов (Wasser and Weis, 1999; Бадалян, 2001; Wang et al., 2002; Badalyan, 2003). Есть около 650 представителей высших базидиомицетов, которые обладают противоопухолевой активностью, среди них виды из таких родов, как *Ganoderma*, *Grifola*, *Lentinula*, *Trametes* и *Pleurotus*, которые богаты  $\beta$ -глюканами (Wasser, 2002, 2010, 2011; Jedinak et al., 2011; Wu et al., 2011; Patel et al., 2012).

Полезные для здоровья свойства *Pleurotus ostreatus* обусловлены содержанием широкого спектра биологически активных компонентов, таких как ловастатин, плевран, (Gunde-Cimerman et al., 1995; Teplyakova et al., 2015), аминокислот – цистеин, метионин и аспарагиновая кислота (Mattila et al., 2002), белков, углеводов, минеральных веществ – кальций, железо и фосфор, и витаминов – тиамин, рибофлавин и ниацин (Wolff et al., 2008).

Апоптотические механизмы, индуцированные белковыми экстрактами базидиомицетов *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* и *Volvariella volvacea* были оценены на культурах линий человеческих клеток аденокарциномы толстой кишки (клеток SW480) и моноцитарной линии клеток лейкемии (клетки ТНР-1) и предложена гипотетическая модель апоптоза (рис.7). Под действием белковых экстрактов из *P.ostreatus* и *V.volvacea* увеличивался процент клеток SW480 в фазе SubG1 (маркер апоптоза), индуцировался синтез активных форм кислорода (ROS), истощение глутатионом (GSH) и потеря трансмембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\Psi_m$ ). Таким образом, белковые экстракты из грибов можно считать важным источником новых противораковых препаратов (Wu et al., 2011).

В отличие от бактериальных инфекционных болезней при вирусных заболеваниях обычные антибиотики малоэффективны, и потребность в новых средствах очень высока. Антивирусные свойства препаратов на основе грибов заключены в способности блокировать вирусные ферменты, синтез вирусных нуклеиновых кислот, или адсорбцию и внедрение вирусов в материнские клетки, а также косвенно – в иммуностимулирующей деятельности полисахаридов или других сложных молекул (Терлюкова, Kosogova, 2015).

Имеются исследования, касающиеся антиоксидантных свойств экстрактов *Pleurotus ostreatus* в водном растворе (Badalyan, 2003), ацетоновом и петролейном эфире (Iwalokun et al., 2007), в метаноле (Kim et al., 2009), а также его полисахаридов (Vamanu, 2012 ). Как упоминалось выше, белковые экстракты грибов вызывали апоптоз в раковых клетках (Wu et al., 2011), однако водные экстракты полисахаридов *in vitro* не оказывали апоптотического действия на эпителиальные клетки колоректальной аденокарциномы человека, хотя, возможно, ингибируют проникновение раковых клеток толстого кишечника через базальную мембрану (Sojocaru et al., 2013). Противовоспалительную активность *Pleurotus ostreatus* можно отнести к различным соединениям, поскольку этот гриб содержит такие активные аминокислоты, как изолейцин, лейцин, тирозин и фенилаланин. Интересно, что первое исследование, опубликованное 30 лет назад, продемонстрировало, что изолейцин и лейцин

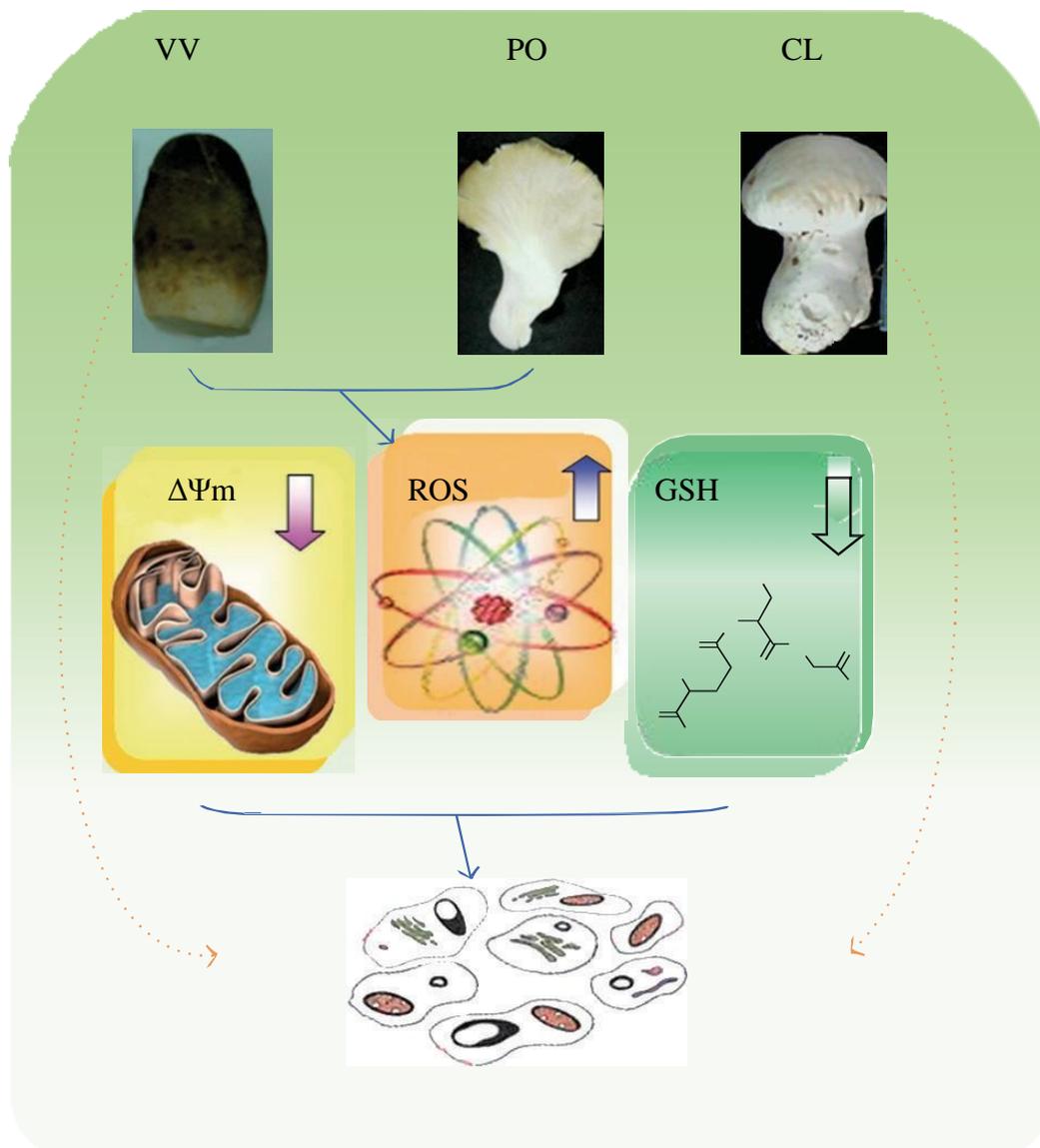


Рис.7. Гипотетическая диаграмма антиканцерогенной активности белковых экстрактов из грибов VV-*Volvariella volvacea*, PO-*Pleurotus ostreatus* и CL-*Calvatia lilacina* (Wu et al., 2011).

обладают противовоспалительной активностью и, поэтому предположили, что, возможно, противовоспалительная активность гриба связана со взаимодействием или синтезом простагландинов (Saxena et al., 1984).

Другое соединение, обладающее противовоспалительной активностью, содержащееся в вешенке обыкновенной – это витамин В2. Как было продемонстрировано, витамин В2 подавляет TNF-а, IL-1, IL-6 и уровень окиси азота плазмы, подавляет экспрессию iNOS (inducible nitric oxide synthase) в печени у зараженных мышей липополисахаридозом (Toyosawa et al., 2004; Kodama et al., 2005). В этих грибах содержатся также в больших количествах глюканы и их присутствие ассоциируется активированием иммунной системы (Lull et al., 2005; Borchers et al., 2008). Предполагается, что за противовоспалительную активность *P. ostreatus* также могут быть ответственны глюканы, хотя надо отметить, что *P. ostreatus* содержит всего 5,8% водорастворимых глюканов (5,56% β-глюканы и 0,26% α-глюканы) (Jedinak et al., 2011). Недавно было показано, что водорастворимые β-глюканы съедобного гриба *Collybia dryophila* проявляют противовоспалительную активность посредством ингибирования синтеза оксида азота NO в активированных макрофагах (Pacheco-Sanchez et al., 2006). Нерастворимый β-глюкан (плевран), выделенный из *P. ostreatus* подавлял воспаление кишечника у крыс (Bobek et al., 2001), ингибировал миграцию лейкоцитов к поврежденным тканям (из *Pleurotus pulmonarius*) (Smiderle et al. 2008), и ингибировал отек (выделенный из *Agaricus blazei*) (Padilha et al., 2009).

Несколько тритерпенов из *G. lucidum*: ганодериол F, ганодерманонтриол, ганодерная кислота В – действуют как противовирусные агенты против репликации ВИЧ -1. Минимальная концентрация ганодериола F и ганодерманонтриола для полного блокирования ВИЧ -1 вызывает цитопатическое действие в МТ-4 клетках - 7,8 мг/мл. Ганодерная кислота В ингибирует протеазу ВИЧ -1 с уровнем IC 50 в 0,17 ммоль/л. Ганодермадиол, лацитадиол и аппланоксидная кислота G, выделенные из *G. pfeifferi*, также найденные и в других видах *Ganoderma*, проявили активность *in vitro* против вируса гриппа типа А. Кроме того, ганодер-

мадиол активен против вируса простого герпеса, вызывающего экзантему губ (Lindequist et al., 2005, Teplyakova et al., 2015).

Согласно предложенной гипотетической модели воздействия *G. lucidum* (рейши или трутовик лакированный) на организм человека (рис.8), предполагается, что  $\beta$ -глюканы *G. lucidum* воздействуют опосредованно, способствуя ускорению созревания и активирования макрофагов, натуральных киллеров (НК-клетки) и цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), что способствует появлению большого количества зрелых боеспособных форм, проявляющих высокую цитотоксическую активность к любым изменённым клеткам. Тритерпены *G. lucidum* непосредственно воздействуют на трансформированные клетки (Lull et al., 2005). Основной механизм действия рейши на рак похож на механизм воздействия других противоопухолевых грибов – *Agaricus brazelionis*, *Lentinula edodes*, *Grifola frondoza*, *Cortinarius varicolor*. Клинические исследования показали, что пациенты, принимающие *G. lucidum*, лучше переносят курсы химиотерапии и облучения. У них нет выраженного падения лейкоцитов и иммунологических показателей (Lindequist et al., 2005; Chan et al., 2008; Cheng, Sliva, 2015; Feitelson et al., 2015; Jiang et al., 2015).

Таким образом, грибы, как и растения, имеют большой потенциал для производства полезных биоактивных метаболитов и являются богатым лекарственным ресурсом (Wu et al., 2011; Patel et al., 2012; Feitelson et al., 2015). Наиболее важные биоактивные составы принадлежат нескольким химическим группам, чаще относящимся к полисахаридам или тритерпенам. Один вид может обладать высоким разнообразием биоактивных составов, и связанного с ним фармакологическим действием. Спектр обнаруженных фармакологических действий грибов очень широк. С развитием химии, биотехнологии и молекулярной биологии грибов и усовершенствованием методов скрининга можно ожидать быстрый рост использования грибов в лечебных целях (Fereira et al., 2010; Froufe et al., 2011; Chang et al., 2011; Cheng, Sliva, 2015; Teplyakova et al., 2015).

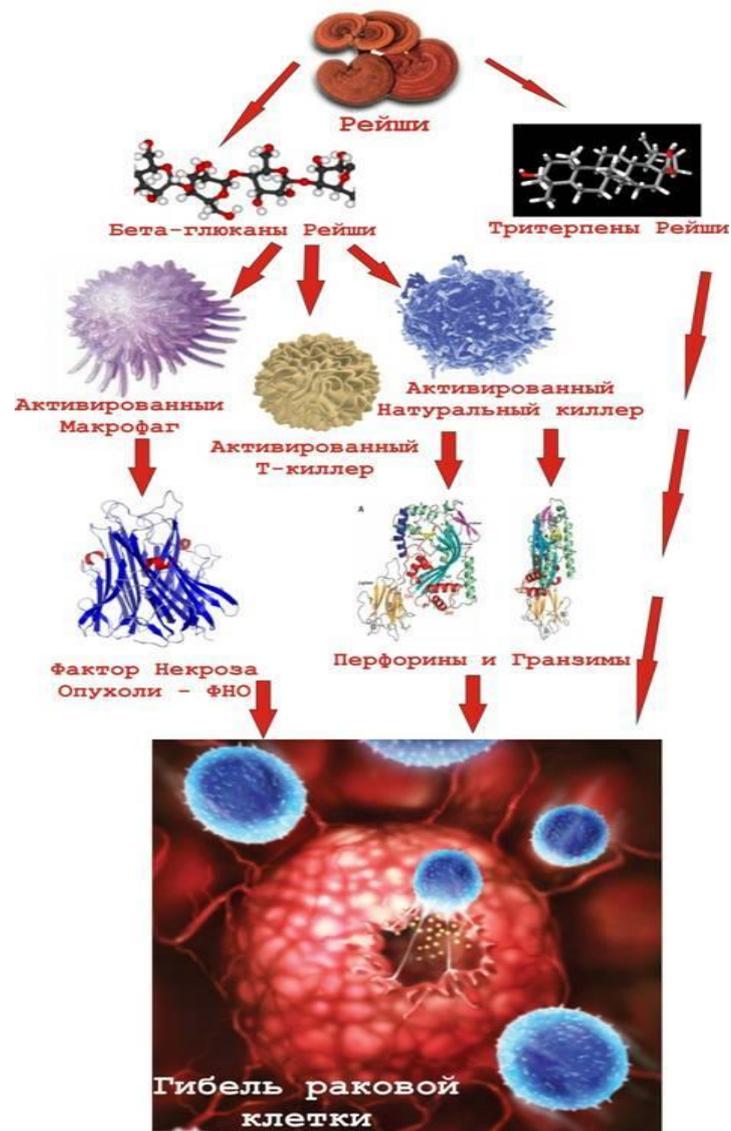


Рис. 8. Предполагаемый механизм воздействия биологически активных соединений экстрактов из лакированного трутовика. (интернет-ресурс: <http://ganoderma.in.ua/lyubimoe-lekarstvo-mao-czeduna/> ).

В Армении, впервые на кафедре ботаники и микологии Ереванского государственного университета, с целью выявления новых источников кормового и пищевого белка с 1996-1997 г.г. были начаты специальные исследования вешенки обыкновенной (Нанагюлян и др., 1996; Нанагюлян, Таслахчян, 1997). В дальнейшем, было исследовано изменение метаболической активности культуры гриба вешенки обыкновенной при модуляции условий роста (Minasbekyan, Nanagulyan et al., 2005), изменение содержания и активности некоторых ферментов внутриклеточного экстракта культуры (Minasbekyan, Nanagulyan et al., 2005; Nanagulyan et al., 2006; Ավագյան, 2009), в частности, возрастания активности фермента пероксидазы (Нанагюлян и др. 2008; Минасбекян, Нанагюлян, Неркарарян, Авагян 2009; Минасбекян, Неркарарян, Нанагюлян, Авагян 2010) и изменения активности фермента целлюлолитической системы –  $\beta$ -глюкозидазы (Минасбекян, Нанагюлян, Авагян, 2009; Авагян и др., 2009; Avagyan, 2016). Обнаружив достаточно интенсивное влияние мм-волн на ферментативную систему мицелиальной культуры вешенки обыкновенной, нами были начаты исследования совместно с сотрудниками Ереванского государственного медицинского университета им. Гераци по изучению противовоспалительной активности мицелиальных экстрактов на модели “воспаленного уха” крыс (Авагян и др., 2009; Авагян и др., 2010; Avagyan, Zhamgaryan, 2010; Avagyan et al., 2011, 2012). Были проведены также сравнительные исследования по изучению воздействия мм-волн на метаболическую активность и терапевтические свойства дереворазрушающих грибов – трутовика лакированного и шиитаке (Avagyan et al. 2013c). Исследована антиканцерогенная активность вешенки обыкновенной по отношению к некоторым опухолевым тканям *in vitro* (Avagyan et al., 2013 a,b). В результате экспериментов был накоплен огромный материал, позволивший изучить особенности вешенки обыкновенной и возможности использования экстрактов мицелиальной культуры этого гриба как противовоспалительное средство (Авагян, 2014).

## ГЛАВА II

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований служили базидиальные грибы – свежесобранные плодовые тела вешенки обыкновенной – *Pleurotus ostreatus* P. Kumm. и трутовика лакированного – *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst., собранные в лиственных лесах Иджеванского флористического района Армении, а также коммерческий гриб *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. Свежесобранные плодовые тела использовали для получения чистых мицелиальных культур.

**Вешенка обыкновенная или устричная** (*Pleurotus ostreatus* P. Kumm.) в Армении растет во всех флористических районах на высоте от 500 до 2800 м над уровнем моря, обильно, группами (Нанагюлян, 1997). В естественных условиях встречается в лиственных и смешанных лесах на живых и отмерших стволах, пнях, валежной древесине лиственных, реже хвойных пород, вызывает белую гниль (рис.9).



Рис. 9. Вешенка обыкновенная или устричная в природе и искусственно выращенная на древесных опилках.

Вешенка обыкновенная относится к группе ксилосапротрофов, развивающихся группами на мертвой, реже на старой древесине разных пород лиственных деревьев: тополь,

ива, граб, бук и дуб. Шляпка гриба вешенки обыкновенной 3-17 см, выпуклая эксцентрично-воронковидная или вдавленная, иногда уховидная или языковидная, с матовым налетом, светлая, буровато-сероватая, затем выцветающая до беловато-сизовой. Мякоть мягкая, затем волокнистая, белая, с приятным вкусом и мучным запахом. Пластинки нисходящие, средней частоты, белые, иногда с розово-серым оттенком. Споры 7-12x3-5 мкм, яйцевидные или округленно-цилиндрические, гладкие, бесцветные, в массе с фиолетовым оттенком. Ножка 2-4x2-3см, цилиндрическая, сплошная, эксцентрическая, белая. Гриб съедобен и широко культивируется во всем мире (Мелик-Хачатрян, 1980; Нанагюлян, 2008).

Вешенка обыкновенная искусственно выращивается на древесных опилках, соломе, подсолнечной лузге, кукурузных початках, льняной и конопляной костре и других отходах. В плодовых телах данного гриба обнаружено значительное количество жирных кислот, витаминов (группы В, РР, D<sub>2</sub>, Е и др.), полисахаридов (бетта-глюкан – лентинан) и аминокислот (в том числе и незаменимых), которые не могут синтезироваться в человеческом организме и должны поступать с пищей (Дудка, Вассер, 1987; Нанагюлян Таслахчян, 1997.).

**Трутовик лакированный** – (*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. ) в Армении растет в лиственных и смешанных лесах- Иджеванского, Апаранского, Лорийского, флористических районах, на высоте от 1100м до 2500м (Нанагюлян, 1997). Трутовик лакированный — сапротроф, разрушитель древесины (вызывает белую гниль). Встречается у основания ослабленных и погибающих деревьев, а также на мертвой древесине лиственных пород (тополь, дуб, бук, каштан, орех, ясень), очень редко на древесине хвойных (ель, лиственница).

Плодовые тела трутовика лакированного однолетние, изредка 2-3 летние, шляпконожечные (рис. 10). Шляпка 3×10×2 см, почковидная или почти яйцевидная, плоская. Кожица гладкая, блестящая, неровная, волнистая, разделённая на множество концентрических колец роста, имеющих различные оттенки. Мякоть очень плотная и деревянистая, охристого цвета, без запаха и вкуса. Гименофор трубчатый с мелкими и округлыми порами по 4-5 на 1 мм<sup>2</sup>. Трубочки короткие, охряные. Ножка 5-25 см в высоту, 1-3 см в диаметре,

боковая, длинная, цилиндрическая, неровная и очень плотная. Споровый порошок коричневый. Гриб съедобен, но культивирование *G.lucidum* проводят исключительно для медицинских целей.



Рис. 10 Трутовик лакированный в природе и искусственно выращенный на древесных опилках.

Плодовые тела и мицелий *Ganoderma lucidum* содержат углеводы (восстанавливающие сахара и полисахариды), аминокислоты, пептиды, белки, тритерпены, включая стероиды, липиды, алкалоиды, гликозиды, летучие эфирные масла, витамины, микроэлементы, такие как магний, марганец, молибден, кальций, цинк, калий, натрий, железо, медь, сера, германий. Наиболее важными биологически активными соединениями, выделенными из этого гриба, являются полисахариды, тритерпены и ганодермовые кислоты (Вишневский, 2014).

**Гриб шиитаке или пилолистник съедобный** – *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler в природных условиях растет как сапротроф на мертвой древесине широколиственных пород таких деревьев, как бук, дуб, каштан, граб, береза, карликовый каштан и др., вызывает образование белой гнили. Ареал распространения шиитаке охватывает Дальний Восток, Японию,

Китай, Корею и некоторые другие страны Юго-Восточной Азии. Шиитаке – первый гриб, который на Востоке начали культивировать, вместо того чтобы собирать.

Грибы шиитаке растут одиночно. Шляпка гриба достигает 5-12 см в диаметре (рис.11). Ножка 3-10 x 0.5-1.5см, центральная или эксцентрическая, белая, плотная, нередко изогнутая, часто покрыта небольшими волокнистыми чешуйками ниже кольца. Окраска шляпки варьируется от желто-коричневой до темно-бурой, при созревании желтеет. Края шляпки ровные, затем загибаются и уплощаются, у зрелых грибов часто волнистые, бархатистые. Пластинки частые, свободные, вначале ровные и белые, затем - зубчатые и буроватые.



Рис. 11 Гриб шиитаке – *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler в природе (интернет ресурс) и коммерческий гриб в упаковке.

При повреждении пластинки становятся коричневыми. Споры белые, мелкие 3x6 мкм, яйцевидные или эллипсоидные. Гриб шиитаке, или пилолистник съедобен, широко культивируется как в кулинарных, так для медицинских целей. Мякоть шиитаке богата белками: из 18 аминокислот, входящих в состав белков, 8 аминокислот являются незаменимыми для человека. Гриб отличается высоким содержанием жиров, ненасыщенных жирных кислот, полинуклеотидов, полисахаридов, минеральных веществ и витаминов, содержит эргостерол, фунгостерол и лентинан, имеющий высокую противоопухолевую активность (Вишневский, 2014).

### Получение чистых культур дереворазрушающих грибов

Чистые культуры выделены как из зернового мицелия, так и из плодовых тел. Выделение грибных штаммов в культуру проводили двумя методами: споровым и тканевым. Споры суспендировали в стерильной воде и высевали в чашки Петри на сусловый агар. В течение 3 суток культивирования наблюдали под микроскопом проросшие споры и формирование микроколоний. На 7 сутки отдельные грибные колонии, проросшие из нескольких спор, пересеивали в чашки Петри (Методы эксперим. микол., 1982).

Тканевым методом выделение культур проводили из фрагмента карпофора плодового тела, которые помещали в центр чашки Петри с сусло-агаром. Для предотвращения грибных культур от сопутствующей бактериальной микрофлоры проводили пересев мицелиальной культуры на агаризованные питательные среды с добавлением 200 единиц пенициллина или 100 единиц другого антибиотика в пересчете на 1 л среды. В исследованиях были использованы общепринятые микробиологические методы для выделения и культивирования мицелия (Методы эксперим. микол., 1982). Чашки Петри с инокулятом помещали в термостат для культивирования, где поддерживалась температура 24-26<sup>0</sup>С (Muller et al., 2004).

В качестве питательной среды для получения мицелиальных культур использовали агаризованное пивное сусло (2<sup>0</sup>, 4<sup>0</sup>, 8<sup>0</sup> по Баллингу), рН 4.5-5. Культуры хранились в холодильнике при 4-10<sup>0</sup> С в пробирках с агаризованной средой объемом 20 см<sup>3</sup>. Полученные штаммы чистых культур вешенки обыкновенной №19 и трутовика лакированного №12, далее пересеивали на чашки Петри, получали мицелий грибов для исследования воздействия мм-волн на метаболические и фармацевтические характеристики. Нами также были получена чистая культура штамм №7 из капрофора коммерческого гриба шиитаке, полученного из Китая. Регулярно проводилась проверка чистоты мицелиальных культур исследуемых грибов (Нанагюлян, 1997). Все эксперименты по получению чистых культур и определению культурально-морфологических признаков штаммов исследуемых грибов проводили на кафедре ботаники и микологии, факультета биологии ЕГУ.

### Облучение грибного мицелия мм-волнами

Культуры грибов обрабатывали низкоинтенсивными когерентными крайне высокими частотами электромагнитного излучения (КВЧ ЭМИ) длительностью 20 и 40 минут на 7-й день роста мицелиальных культур грибов *P. ostreatus*, *G. lucidum*, *L. edodes*. Источником облучения служил высокочастотный генератор сигналов ЭМИ Г4-141 (Россия) в диапазоне 45 ГГц – 53 ГГц, предоставленный сотрудниками факультета радиофизики ЕГУ. Облучение проводили в течение 20 и 40 мин мощностью излучения 0.64 мВ/см<sup>2</sup>. После однократного облучения культуры продолжали выращивать в термостате при 25<sup>0</sup>С. На 3-е (10-дневный мицелий) и 4-е сутки после облучения культур получали внутриклеточные экстракты гриба для дальнейшего их исследования. В качестве контроля использовали экстракт необлученной культуры гриба.

### Определение ростового коэффициента

Для каждого штамма проводили учет культурально морфологических признаков на агаризованных средах до и после обработки мм-волнами. Учет результатов проводили в течение всего срока наблюдений по следующим показателям: диаметр разрастания колоний, текстура и форма колоний, пигментация мицелия, плотность и высота воздушного мицелия, суточная линейная скорость. Описаны воздушные мицелии колонии, строение гифальной системы, клеточное дифференцирование гифов, а также рассчитывали ростовой коэффициент (Бухало, 1988). Ростовой коэффициент (РК) вычислялся по формуле:

$$PK = \frac{d h g}{t},$$

где d – диаметр колонии в мм, h – высота колонии в мм, g – плотность колонии, в соответствии с 3-балльной системой (1– редкая, 2– средняя, 3– плотная), t – возраст колонии в сутках.

### Получение мицелиальных экстрактов

Для получения внутриклеточного экстракта, мицелий осторожно соскабливали с поверхности агара на чашках Петри, отмывали бидистиллятом на сите, тщательно просушивали на фильтровальной бумаге. Подобным образом подготовленный мицелий взвешивали и перетирали в предварительно охлажденной ступке (для предотвращения инактивации пероксидаз) со стеклянными бусами, добавляя 0.15 М трис–HCl буфера, pH = 8,0 (Reanal, Hungary) (Методы эксперим. микол., 1982). Буфер добавляли из расчета 0.2 мл буфера на 100 мг мицелия. Экстракт разделяли центрифугированием на холоду в течение 20 мин при скорости 18.000 об/мин на высокоскоростной центрифуге типа 310b (“Mechanika Pręsujująca”, Польша). Для последующего анализа количества белка и ферментативных активностей экстрактов грибов использовали надосадочную жидкость.

### Количественное определение белка

Количество белка в мицелиальных экстрактах определяли на кафедре биофизики ЕГУ по методу Лоури (Lowry et al., 1951). Все процедуры проводились при комнатной температуре. В качестве стандарта использовали лиофилизированный альбумин человеческой сыворотки (Reanal, Hungary) по методике, принятой на кафедре биофизики (Минасбекян и др., 2002). Измерения проводились на спектрофотометре Genesys10s (ThermoScientific, USA), через 30-40 мин после приготовления реакционной смеси при длине волны 750 нм.

### Определение активности пероксидаз

Анализ пероксидазной активности проводился на кафедре биофизики по стандартной общепринятой методике, с использованием пирагаллола в качестве субстрата в тканевых экстрактах по методу Бадена (Baden et al., 1979) с некоторыми модификациями: в реакционную смесь вносили 6 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 6.8, добавляли 3мМ пирагаллола.

Оптическую плотность определяли спектрофотометрически при длине волны 430 нм на спектрофотометре Genesys10s (ThermoScientific, USA) в течение 2-2.5 мин. Реакция инициировалась добавлением 0,15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и проводилась при комнатной температуре. Расчет активности фермента проводили по формуле:

$$U = \frac{\Delta D}{\varepsilon \cdot c \cdot t}$$

где  $\Delta D$  – разность оптических плотностей,  $\varepsilon$ – коэффициент экстинкции,  $c$ – концентрация белка в экстракте (мг/мл),  $t$ – время протекания реакции окисления пирогаллола.

#### Определение активности $\beta$ -глюкозидазы

Активность фермента в экстрактах культур грибов определяли в реакционной смеси, содержащей 1мл культуральной жидкости и 2 мл 5 мМ карбоксиметилцеллюлозы (Sigma-Aldrich, USA), приготовленной на 100 мМ ацетатном буфере pH = 5.0. Реакцию инициировали инкубацией гомогената в течение 15 мин при температуре 50<sup>0</sup> C, а останавливали охлаждением на льду или добавлением 1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Riou et al., 1998). В качестве стандарта использовали раствор  $\beta$ -глюкозидазы *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, USA) в концентрации 1мг/мл. За реакцией следили спектрофотометрически при  $\lambda = 400$  нм. Единица активности  $\beta$ -глюкозидазы соответствует усвоению 1  $\mu$ мол карбоксиметилцеллюлозы в мин<sup>-1</sup> при данных условиях. Эксперименты проводили на кафедре биофизики.

#### Электрофоретическое разделение тотального белка из экстрактов

Электрофоретическая подвижность белков в геле зависит как от размера молекулы, так и от заряда. Нами был использован диск-электрофорез в 10 % полиакриламидном геле, что позволяет проводить разделение белков из грибных экстрактов, не проводя предварительно их концентрирования (Практикум по биохимии, 1979). Для определения молекулярного веса фракций из белка мицелиальных экстрактов был проведен диск-

электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) на аналитическом вертикальном аппарате фирмы “Reanal” (Венгрия). Аппарат при проведении электрофореза подключали к источнику постоянного тока ПЭФА-1 (СССР). В качестве стандартного белкового раствора использовали бычий сывороточный альбумин (2мг/мл), далее в стандартный и опытный растворы добавляли 10 % ДСН и 10% β-меркаптоэтанол до конечной концентрации 1%, электрофоретическое разделение тотального белка в экстрактах мицелиальных культур проводили диск-электрофорезом в ПААГ в трис-глициновом буфере (0,05 М трис и 28,8 г глицина в 1 л дистиллированной H<sub>2</sub>O). Перед употреблением буферную смесь разбавляли в 10 раз и проводили разделение белков в системе ПААГ по стандартной методике (Hames et al., 1981), принятой на кафедре биофизики. В качестве метки использовали раствор бромтимолового синего. Разгонка белков велась от катода к аноду. На каждую трубку наносили 0,2 мл образца, содержащего 200 мкг белка. Электрофорез проводили при силе тока 4 мА на трубку при 300-500 В при комнатной температуре в темноте. Для визуализации результатов электрофореза гели окрашивали раствором 0.1% красителя Кумасси бриллиантовый синий (Coomassie Brilliant blue 5D) с 0.1% амидочерным. Окрашенные гели фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата. Определение молекулярных масс отдельных фракций белка проводили денситометрированием программой FUGIFILM Science Lab.2001 Image Gauge v.4.0.

#### ВЭЖХ смеси белков из грибных экстрактов

Анализ аминокислот мицелиальных экстрактов грибов был проведен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимическим детектированием по методу (Pearson et al., 1991; Rowley H.L. et al., 1995) на изократическом ВЭЖХ приборе “Биохром” (Москва, РФ). Хроматографическая система включала стандартную аналитическую колонку 150 × 4.6 мм, содержащую носитель “Nucleosil 100-5 C 18”, электрохимический детектор ДЭ-108 (Россия), насос для ВЭЖХ “Марафон” серии II,

инжектор для ввода образца “Rheodyne” модель 7725J и систему обработки хроматографических данных “Мультихром” (ЗАО Амперсэнд). Потенциал рабочего электрода против электрода сравнения составлял 850 мВ. Скорость элюции – 1 мл/мин. В качестве подвижной фазы служила смесь – фосфатный буфер (рН 5.6) : метанол в объемном соотношении 25 : 1. В качестве стандартов были использованы аспарагиновая кислота, глицин, таурин, гамма-аминомасляная кислота и глютаминовая кислота (Sigma, Germany) в 0.1N HClO<sub>4</sub>.

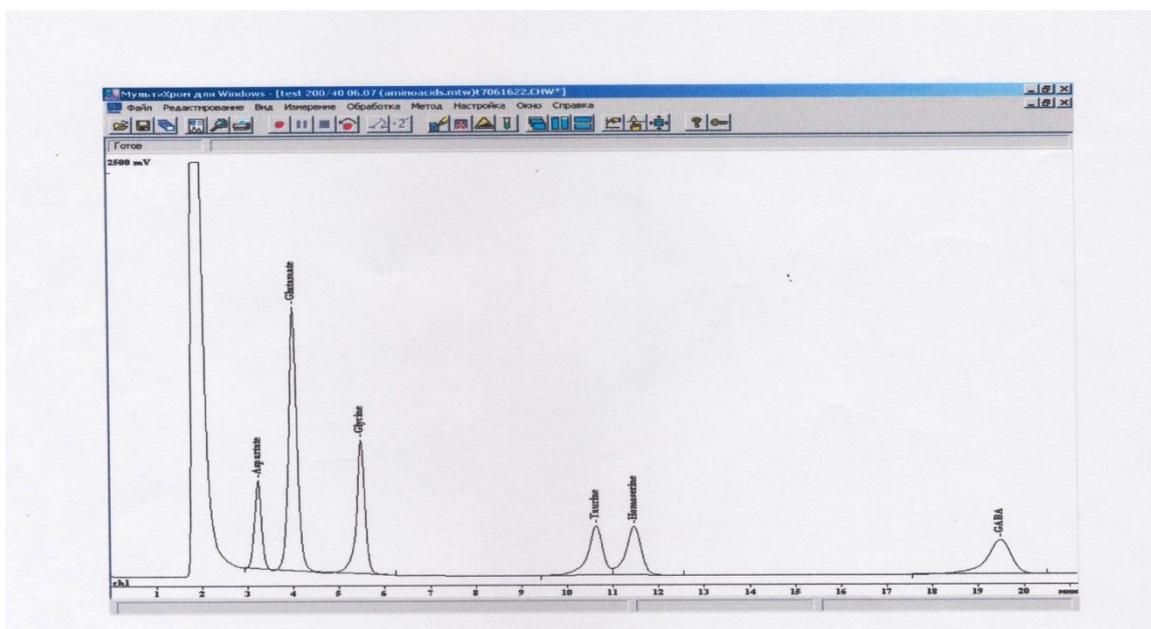


Рис 12. ВЭЖХ смеси стандартных аминокислот

В качестве “внутреннего” стандарта был использован раствор L-гомосерин 1 мг/мл ( в хлорной кислоте) и 0.25 N NaOH в объемном соотношении 1:9. Реагенты дериватизации: к 54 мг ортофталальдегида, растворенного в 1 мл этанола (95-96 %), добавляли 1 мл 1M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> и 18мл 0.1M боратного буфера рН 5. Дериватизацию проводили при комнатной температуре в течение 20 мин. После дериватизации раствор стандартов разбавляли в 20 раз бидистиллятом, из которого 20 мкл вводили систему ВЭЖХ. Полученные данные для стандартных растворов приведены на рисунке 12.

Для анализа мицелиальных экстрактов к 50 мкл экстракта добавляли 50 мкл разбавленного раствора “внутреннего стандарта” и 50 мкл раствора ортофталальдегида. Все

пики, соответствующие значениям аминокислот автоматически подвергались спектральному анализу путем сравнения со спектрами поглощения коммерческих препаратов и производились посредством программы Мультихром совместно с сотрудниками ЕГМУ (Avagyan, Zhamgaryan, Minasbekyan, 2013).

#### Определение противовоспалительной активности грибных экстрактов

Все эксперименты по оценке противовоспалительных свойств экстрактов мицелиальных грибов проводились на белых крысах- самцах породы Wistar весом 200-220г. За 12 часов до опыта крыс не кормили, хотя доступ к воде оставался свободным. Противовоспалительные свойства экстрактов были осуществлены на модели острого воспаления уха крыс, которое может индуцироваться различными соединениями. Эта модель считается наиболее эффективной и подходящей для оценки применения как местного, так и систематического введения синтетических агентов, соединений растительного и грибного происхождения, растительных и грибных экстрактов, морских продуктов и т.п. (Gabor, 2003; Bralley et al., 2008; Adami et al., 2012; Pranaya et al., 2015). Модель основана на разности веса между воспаленным и невоспаленным ушами крыс. Модель используется на кафедре Фармации, фармакологического факультета ЕГМУ для выявления противовоспалительных свойств различных препаратов (Жамгарян и др., 2006). В наших исследованиях, проводимых совместно с сотрудниками кафедры Фармации ЕГМУ, воспаление индуцировалось ксилолом. Крыс разделяли на несколько групп. Во всех группах крысам внутрибрюшинно вводили 1 мл наркотического вещества в пересчете на 250 гр веса крысы, через 20 мин обрабатывали одно ухо крысы 0.15 мл ксилолом, индуцируя острый воспалительный оттек относительно здорового уха.

В контрольной группе крысам через 1.5 часа после обработки ксилолом отсекали оба уха, взвешивали и вычисляли разность между ними. Значение разности веса между воспаленным и здоровым ушами в контрольной группе крыс принимали за контроль.

В опытных группах крысам через 30 минут после индуцированного ксилолом острого отека, производили внутрибрюшинную инъекцию экстракта из облученной или необлученной мицелиальной культуры гриба, приготовленного на основе 0.15 М трис-буфера в дозе 5 мг/кг веса крысы. Через час после внутрибрюшинной инъекции отсекали кончики обеих ушей. Введение экстракта гриба сопровождалось уменьшением индуцированного ксилолом отека, что проявляется в относительно малой разности весов между воспаленным ухом по отношению к здоровому уху крысы.

#### Гистологическое исследование срезов тканей уха крыс

Для более объективной оценки противовоспалительного эффекта экстракта культуры гриба было проведено также гистологическое исследование тканей воспаленного и здорового уха крысы. С этой целью ткани воспаленного уха животных фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина; депарафинированные гистологические срезы, полученные на санном микротоме, окрашивали гематоксилин-эозином (Кисилева, 1982). Гистологические исследования воспаленного уха крыс под воздействием экстрактов гриба были проведены совместно с сотрудниками ЕГМУ по методу, описанному в работе (Жамгарян и др., 2006).

#### Определение антиканцерогенной активности экстрактов

Исследование влияния экстрактов грибных культур на линии раковых клеток *in vitro* может пролить свет на их лечебные свойства. Системы визуализации способны количественно оценить несколько ядерных морфометрических дескрипторов, которые полезны для обнаружения уровня преобразования в клеточной популяции. Ядерные морфологические изменения, связанные с потерей дифференциации, коррелируют с трансформациями в тканях. Как показано некоторыми исследователями трансформированные клетки обычно характеризуются анеуплоидными ядрами, что проявляется в высокой степени

вариабельности по размерам и форме, а также возрастании количества увеличенных ядрышек (Derenzini et al., 2000; Gimenez et al., 2000).

Рост тканей проводили в соответствующих средах:

Клетки тканей НЕРG-2 культивировали в среде Игла с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки пересевали однократно в дозе  $10^5$  клеток / мл. Клетки тканей НЕК 293 клетки выдерживали в DMEM, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку. Клетки пересевали однократно в дозе  $10^5$  клеток / мл.

Клетки тканей RD,Нер-2 иHeLa культивировали в среде Игла с добавлением 10% бычьей сыворотки. Клетки пересевали однократно в дозе  $10^5$  клеток / мл.

Каждая среда содержала также 2 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 100 ед пенициллина /мл и 0,1 мг/мл стрептомицина. Исследования проводились совместно с сотрудниками ИМБ НАН РА по методике, разработанной Каралыном З.А. (Karalyan et al., 2011). Монослои неповрежденных клеток рассматривались под микроскопом, подключенным к компьютеру, по истечению 48 и 72 ч после посева.

#### Статистическая обработка данных.

В диаграммах представлены средние арифметические величины и их стандартные отклонения из 4 биологических повторностей экспериментов и 2 аналитических повторностей для каждого из них. При обработке данных по методу *t*-критерия по Стьюденту определяли доверительные интервалы для среднего воздействия ЭМИ КВЧ при 5%-м уровне значимости. Данные, которые не попали в доверительный интервал в таблицах 5 и 6 отмечены звездочками. Проведен также дисперсионный анализ двухфакторного комплекса, который подтвердил достоверность полученных изменений как по частоте и длительности воздействия мм-волн, так и их совместному влиянию ( $F_{\phi}= 6.24$  и  $F_{\phi}=4.84$  соответственно). Математическую обработку результатов исследований проводили с использованием функций Microsoft Excel.

## ГЛАВА III

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С развитием цивилизации человечество приходит к предпочтительному использованию лекарственных препаратов несинтетической природы. Фармакологические препараты, полученные из натуральных продуктов, обходятся дороже, однако экологически чисты и оказывают сравнительно меньшее побочное действие. Грибы богаты белками и соединениями, обладающими различными биологическими активностями, включая антиоксидантные (Yang et al., 2002; Badalyan, 2003; Jayakumar et al., 2006; Kamiyama et al., 2013; Saltarelli et al., 2015), антиканцерогенные (Harhaji et al., 2008; Wu et al., 2011; Cheng, Sliva, 2015), антимикробные (Wolf et al., 2008; Li et al., 2012), антигликемические (Liu et al., 2012), антихолестеразные (Vobek et al., 1995; Osturk et al., 2011), иммуностимулирующие (Takeda, Okumura, 2004; Sarangi et al., 2006) и антимуtagenные (Sugui et al., 2003) свойства.

В условиях глобального изменения канцерогенез во многих случаях сопряжен с такими экологическими факторами, как загрязнение воды, пищи, космическими и искусственными излучениями и т.п. (Minasbekyan et al., 2005; Nicolaz et al., 2009). Исходя из вышесказанного, мы исследовали воздействие низкоинтенсивных электромагнитных волн (мм-диапазона) на метаболическую активность, биомассу, активность ферментов, белковый и аминокислотный состав мицелиальной культуры дереворазрушающих грибов – *Pleurotus ostreatus* и *Ganoderma lucidum*, широко распространенных в лиственных лесах Армении, которые к тому же успешно выращиваются искусственно на различных сельскохозяйственных и производственных отходах. Также исследована ферментативная активность мицелиальной культуры коммерческого гриба *Lentinula edodes*, который наиболее изучен среди всех грибов, обладающих противоопухолевой активностью, и является патриархом среди искусственно выращиваемых съедобных грибов в странах Азии. Проведено сравнительное исследование противовоспалительного действия мицелиальных экстрактов указанных трех видов дереворазрушающих грибов в коррелятивной зависимости

от активности ферментов пероксидазы и  $\beta$ -глюкозидазы – ферментов лигнолитической и целлюлолитической систем соответственно. Также показано антипролиферативное действие мицелиального экстракта вешенки обыкновенной на клеточных линиях некоторых онкогенных тканей.

### 3.1. Изменение метаболической активности культур исследуемых дереворазрушающих грибов под воздействием КВЧ ЭМИ

Проблема недостаточного обеспечения рациона человека белком из года в год становится все более острой. На фоне роста стоимости зерновых культур недостаточно полно используется потенциал вовлечения лигноцеллюлозных отходов в производство дополнительной продукции. Одним из эффективных методов переработки растительных отходов является их биоконверсия при выращивании базидиальных грибов. Среди промышленно культивируемых грибов вешенка занимает одно из ведущих мест по объему производства грибной продукции в России (Копыльцов, 2009). Промышленное культивирование плодовых тел высших съедобных базидиомицетов по экономической эффективности может успешно конкурировать с традиционными методами получения пищевых продуктов (Бисько, 2011).

Вешенка обыкновенная является одним из перспективных компонентов экологически чистых пищевых продуктов, обладающих высокой биологической ценностью и лечебно-профилактическими свойствами. Белки плодовых тел и мицелия вешенки обыкновенной, содержат все 18 аминокислот, входящих в формулу сбалансированного питания, из которых особую ценность представляют незаменимые аминокислоты: лизин, треонин, валин, триптофан, тирозин и др. Содержание незаменимых аминокислот в плодовых телах различных видов культивируемых съедобных грибов может быть достаточно высоким, превышая 40% общей суммы аминокислот.

Интенсивное культивирование вешенки на разнообразных целлюлозо- и лигнинсодержащих отходах сельского и лесного хозяйства, а также перерабатывающей промышленности, с последующим использованием субстратов после плодоношения в качестве кормовых добавок в животноводстве или удобрений в тепличном хозяйстве, позволяет сделать производство съедобного гриба вешенки обыкновенной безотходным (Нанагюлян, Таслахчян, 1997; Поединок и др., 2004; Бухало и др., 2011).

В связи с этим нами было начато изучение влияния мм-волн на рост мицелиальных культур трех видов грибов. Проведенные исследования позволили определить влияние низкоинтенсивного излучения крайне высоких частот, полученного от искусственного источника когерентных волн мм-диапазона, на линейный рост и накопление биомассы вегетативного мицелия различными видами базидиомицетов *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*. Полученные нами культуры были исследованы под микроскопом и описаны особенности строения мицелия.

Отдел *Basidiomycota*, класс *Agaricomycetes*, порядок *Agaricales*, семейство *Pleurotaceae*, вид *Pleurotus ostreatus* **P. Kumm.** или вешенка обыкновенная. Вешенка обыкновенная образует белые, ватные колонии грибов «белой гнили» с хорошо развитым пушистым, высоким, воздушным мицелием. Реверзум неизменный. Генеративные гифы 3-4 мкм толщиной, ветвление простое. Скелетные гифы малочисленные, толстостенные. Дифференциация клеточных структур переплетенная. Пряжки редкие, прижатые, мелкие, короткие. Образуются артроконидии, плодовые тела.

В таблице 2 представлены данные об изменениях биомассы и ростовых коэффициентов (РК) культуры гриба *P. ostreatus*, при соответствующих обработках крайне высоких частот электромагнитных излучений (КВЧ ЭМИ) семидневной мицелиальной культуры (рис. 13, 14). Согласно полученным данным, самый высокий ростовой коэффициент (РК) относительно контроля был отмечен в мицелиальной культуре гриба, обработанной частотами 53ГГц, 40 мин и 45ГГц, 40 мин. В остальных случаях РК неизменен, либо

Таблица 2.

Изменение параметров роста мицелиальной культуры гриба *Pleurotus ostreatus*– вешенка обыкновенная в зависимости от обработки КВЧ ЭМИ\*

№	Обработка КВЧ ЭМИ*	Диаметр культуры (в мм)	Коэффициент роста	Биомасса (в г сырого веса)
1	контроль	57 × 50	103.6	1.33
2	45 ГГц, 20'	45 × 45	81.8	0.59
3	45 ГГц, 40'	52 × 52	94.5	1.60
4	46 ГГц, 40'	52 × 50	94.4	1.31
5	49 ГГц, 40'	47 × 48	86.36	0.9
6	50.3 ГГц, 20'	50 × 43	88.6	1.09
7	50.3 ГГц, 40'	50 × 48	89.09	1.35
8	51.8 ГГц, 40'	50 × 45	86.36	0.9
9	53 ГГц, 20'	50 × 49	90	1.31
10	53 ГГц, 40'	58 × 52	101.1	2.06

\*КВЧ ЭМИ – крайне высокие частоты электромагнитного излучения в интервале 45-53 ГГц длительностью 20 и 40 минут.



Рис. 13. Культура гриба *P. ostreatus* на 7 день роста в контроле (1) и после соответствующих обработок КВЧ ЭМИ (цифры 2, 3, 4 соответствуют таковым в таблице 2)

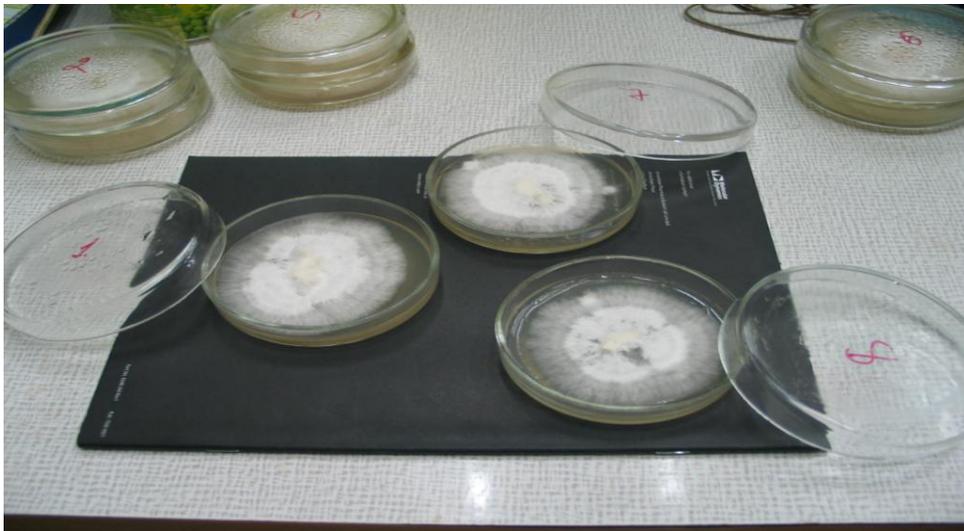
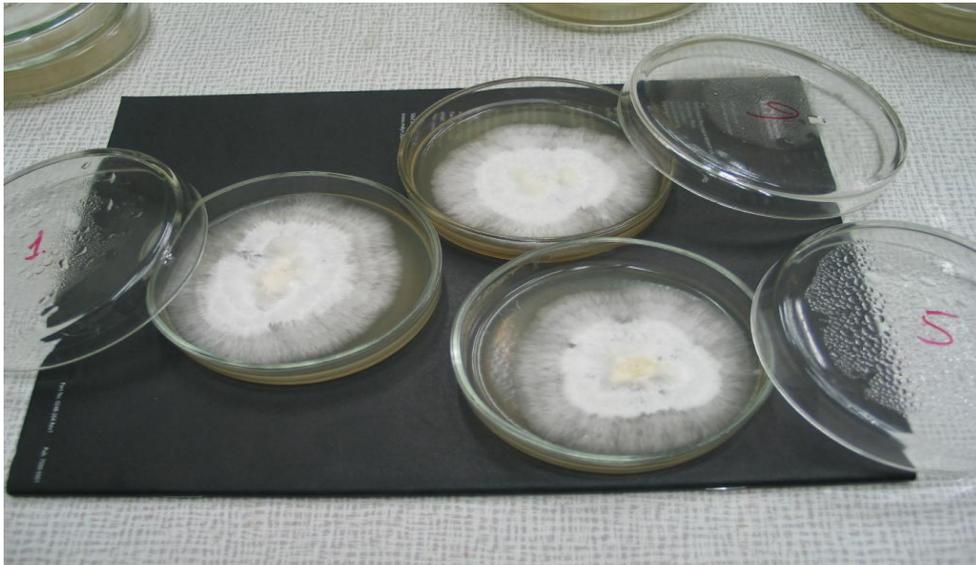


Рис.14. Культура гриба *P. ostreatus* на 7 день роста в контроле (1) и после соответствующих обработок КВЧ ЭМИ (цифры 5, 6, 7, 8, 9, 10 соответствуют таковым в таблице 2).

несколько ниже, как в случае обработки частотой в 49ГГц в течение 40 мин. В соответствии с ростовым коэффициентом изменяется также вес культуры и ее биомасса, что свидетельствует о возрастании метаболической активности культуры под воздействием низкоинтенсивных мм-волн. При частотах 53 ГГц, 40 мин и 45ГГц, 40 мин наблюдался наибольший вес мицелиальной культуры гриба и, соответственно, высокие значения РК.

Судя по полученным данным, изменения РК и биомассы культуры носят дифференцированный характер в ответ на внешнее физическое воздействие. Наши данные согласуются с результатами исследований, приведенных в работах некоторых авторов по изучению изменений биомассы и скорости роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, актиномицетов *Streptomyces xanthochromogenes* шт. №8 и цианобактерии *Anabaena variabilis* под действием низкоинтенсивных микроволн плотностью мощности 0,5 мВт/см<sup>2</sup> в диапазоне 42ГГц ±10МГц, где изменения также носили разнонаправленный характер и зависели от частоты и экспозиции обработок (Тамбиев и др, 2000; Лукьянов, 2007, 2013).

Отдел *Basidiomycota*, класс *Agaricomycetes*, порядок *Polyporales*, семейство *Ganodermaceae*, вид *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. Трутовик лакированный. Мицелиальная колония ватообразная, пушится в центре вокруг инокулюма, концентрически зональная, со временем становится кожистой и на колонии образуются участки, окрашенные в темно коричневый цвет, на которых формируются зачатки плодовых тел (примордии). Реверзум не окрашенный. На гифах изредка наблюдаются пряжки, разветвленные, кораллообразные гифы, хламидоспоры, скопление экзометаболитов, возможно полисахаридов, что соответствует описанию (Бухало и др., 2011).

Данные о влиянии мм-волн на скорость роста и изменений биомассы культуры гриба трутовика лакированного, приведенные в таблице 3, свидетельствуют об исключительно положительном воздействии мм-волн на культуру этого гриба. Согласно данным наиболее высокий РК наблюдался при частотах в 46 ГГц, 20 мин и 45 ГГц, 40 мин, при этих же экспозициях получены и высокие значения РК.

Изменение параметров роста мицелиальной культуры гриба *Ganoderma lucidum*- трутовик лакированный в зависимости от обработки КВЧ ЭМИ\*

№	Обработка КВЧ ЭМИ*	Диаметр культуры (в мм)	Коэффициент роста	Биомасса (в г сырого веса)
1	Контроль	10x11	65	0.85
2	45 ГГц, 20'	9x10.5	94.5	0.92
3	45 ГГц, 40'	8.5x9.5	114	0.98
4	46 ГГц, 20'	8.5x9.5	142.5	1.84
5	46 ГГц, 40'	8.5x9.5	95	1.05
6	53 ГГц, 20'	11x11	105	1.9
7	53 ГГц, 40'	11x11	109	1.95

\*КВЧ ЭМИ – крайне высокие частоты электромагнитного излучения в интервале 45-53 ГГц длительностью 20 и 40 минут.

Отдел *Basidiomycota*, класс *Agaricomycetes*, порядок *Omphalotaceae*, семейство *Lentinula*, вид *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler – шиитаке. Мицелиальная колония вначале ватно-пушистая, плотная, с большим количеством воздушного мицелия, белого цвета. Край ровный, приподнятый над субстратом. Реверзум не окрашенный. На гифах дикариотического имеются многочисленные пряжки, стабильной формы с отверстием между основной гифой и пряжкой, анастомозы образуются как между гифами, так и между пряжками. На гифах мицелия наблюдалось образование капель жира и кристаллов.

Воздействие мм-волн на культуру гриба шиитаке (табл.4) имело преимущественно положительный характер и приводило к приросту биомассы культуры при всех экспозициях. Эти данные свидетельствуют об исключительно положительном воздействии мм-волн на мицелиальную культуру этого гриба, также как и на мицелиальную культуру гриба трутовика лакированного, в то время, как ответ на внешнее воздействие мицелиальной культуры гриба вешенки обыкновенной имел разнонаправленный характер (по значениям РК и биомассы).

Так, наибольшее увеличение веса наблюдалось при обработке мицелиальной культуры гриба шиитаке мм-волнами при частотах 49ГГц, 40мин и 53ГГц, 20мин и соответственно возрастание значений РК до 50%. Относительно слабое воздействие на рост культуры шиитаке оказали мм-волны частотой 45 ГГц и 49 ГГц в течении 20 мин, что еще раз подтверждает наше предположение о том, что нет определенной универсальной частоты для всех видов клеток: для каждой клетки имеются свои определенные частоты, повышающие метаболическую активность.

Согласно литературным данным, некоторыми авторами отмечалось образование нанокколичеств перекиси и других активных форм кислорода (АФК) под воздействием мм-волн в культурах грибов, микроводорослей и бактерий (Поцелуева и др., 1999; Капич, 2011; Гудков, 2012; Kreslavski et al., 2012).

Изменение параметров роста чистой культуры гриба *Lentinula edodes* - шиитаке  
в зависимости от обработки КВЧ ЭМИ \*

№	Обработка КВЧ ЭМИ *	Диаметр культуры (в мм)	Коэффициент роста	Биомасса (в г сырого веса)
1	Контроль	11x11	133.1	0.89
2	45 ГГц 20'	8.5x8.5	102	0.92
3	45 ГГц 40'	10x10.5	157.5	1.22
4	49 ГГц 20'	8x10	120	0.9
5	49 ГГц 40'	10x10.5	157.5	1.34
6	50.3 ГГц 20'	10x10.5	126	1.06
7	50.3 ГГц 40'	9x10.5	157.5	1.01
8	51.8 ГГц 20'	9.5x10	150	0.92
9	53 ГГц 20'	9.5x10.5	157.5	1.37
10	53 ГГц 40'	9.5x10.5	126	0.96

\*КВЧ ЭМИ – крайне высокие частоты электромагнитного излучения в интервале 45-53 ГГц длительностью 20 и 40 минут.

Нами предполагается, что разнонаправленный характер изменений биомассы и значений РК в культурах гриба вешенки обыкновенной обусловлен высоким содержанием как внеклеточных, так и внутриклеточных пероксидаз, а воздействие мм-волн, вызывает образование нанокolicеств перекисей и других АФК, что в свою очередь может приводить к подавлению роста культуры как отмечалось выше, а с другой стороны – приводить к еще более повышенной активности ферментов антиоксидантной системы (Minasbekyan et al., 2005; Nanagulyan et al., 2006; Нанагюлян и др., 2008; Авагян и др., 2011).

### 3.2. Изменение содержания белка в экстрактах мицелиальных культур изученных грибов

О действии мм-волн ЭМИ на рост и биомассу мицелиальной культуры гриба можно судить и по изменению количества белка. Наши исследования показали, что изменение количества белка в мицелиальной культуре гриба вешенки обыкновенной на 3-е сутки после облучения ЭМИ частотой 45 ГГц при длительности обработки в 20 мин и 40 мин уменьшается приблизительно на 50% по сравнению с контролем (табл. 5).

При облучении КВЧ ЭМИ частотами 46 ГГц и 50,3 ГГц в течение 20 мин также наблюдается уменьшение количества белка на 3-е сутки после обработки (рис.15 а), в то время как облучение ЭМИ частотами в 49 ГГц, 51.8 ГГц и 53 ГГц стимулируют синтез белка, как представлено в таблице 5. При этих частотах наблюдается повышение количества белка приблизительно на 20-50%, что также согласуется с результатами, полученными различными авторами при исследовании влияния данного физического фактора на растения и микроорганизмы (Диденко и др., 1983; Реброва, 1992; Tambiev, 2000; Неркарарян и др., 2005).

Дальнейшее увеличение длительности обработки до 40 мин приводит к подавлению роста грибной культуры на 3-е сутки во всех опытных вариантах, кроме одного: при облучении частотой 53 ГГц в течение 40 мин количество белка больше контрольного на 30% (рис. 15 б).

Таблица 5.

Изменение количества белка (мкг/мг сырого веса) в экстракте культуры гриба *Pleurotus ostreatus* в зависимости от частоты и длительности обработки мм-волнами

Частота, ГГц	20 минут обработки		40 минут обработки	
	3-и сутки	4-е сутки	3 сутки	4 сутки
контроль	0.61 ± 0.02	1.70 ± 0.02	0.61 ± 0.02	1.70 ± 0.03
45 ГГц	0.33 ± 0.01	1.13 ± 0.03	0.24 ± 0.01	1.09 ± 0.04
46 ГГц	0.46 ± 0.02	1.42 ± 0.02	0.34 ± 0.02	1.28 ± 0.03
49 ГГц	0.78 ± 0.01	1.33 ± 0.01	0.58 ± 0.02*	1.37 ± 0.02
50.3 ГГц	0.51 ± 0.01	1.31 ± 0.02	0.46 ± 0.01	1.28 ± 0.01
51.8 ГГц	0.85 ± 0.01	1.11 ± 0.03	0.46 ± 0.03	1.41 ± 0.03
53 ГГц	0.93 ± 0.02	1.01 ± 0.03	0.81 ± 0.02	1.35 ± 0.02

Примечание: \*значения достоверны при  $p < 0.05$

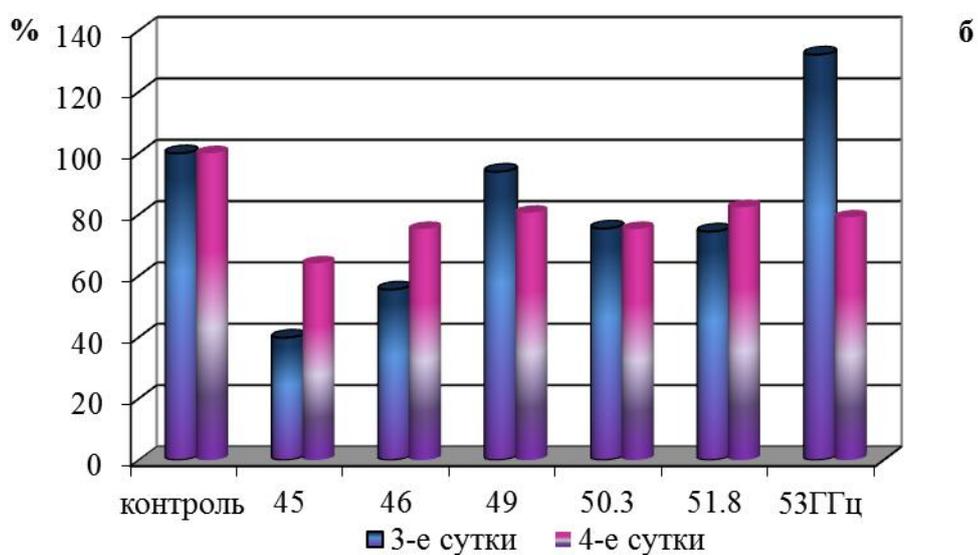
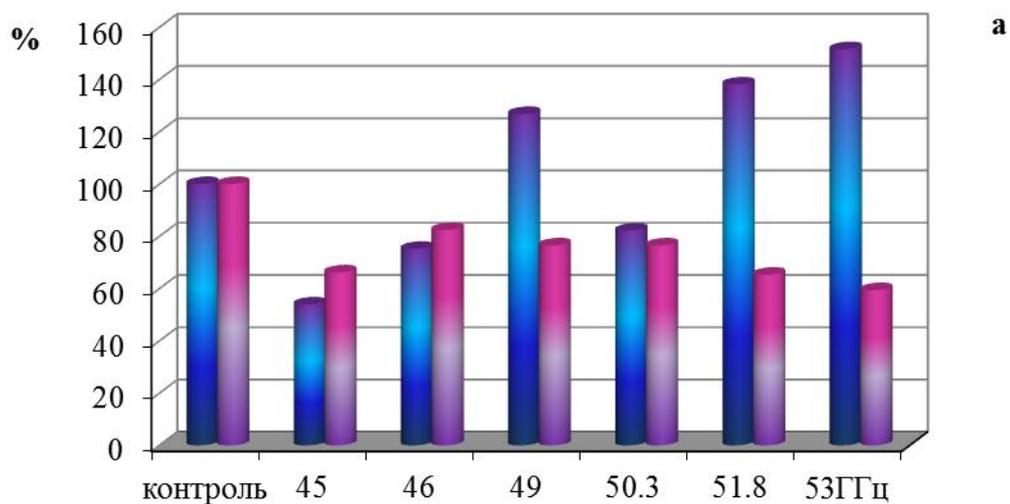


Рис.15. Содержание белка в обработанных мм-волнами в течение 20 мин (а) и 40 мин (б) мицелиальных культурах гриба *Pleurotus ostreatus* на 3-ие и 4-ые сутки, выраженное в процентах, относительно величины содержания белка в контрольной культуре, принятую за 100%

Для сравнительных исследований мы облучали также мицелиальные культуры грибов шиитаке и трютовика лакированного. Исходя из вышеприведенных данных, для вешенки обыкновенной наиболее существенные изменения происходят на 3 сутки после облучения (рис.15), поэтому для сравнения содержание белка в мицелиальных культурах гриба трютовика лакированного и шиитаке определялось на 3 сутки после облучения (рис.16).

Данные об изменениях содержания белков в культуре шиитаке представлены в виде диаграммы на рисунке 16 б. Из приведенных данных следует, что несмотря на то, что биомасса гриба при всех частотах увеличилась (см. табл.4), содержание белка уменьшилось во всех экспозициях, кроме обработки частотой 45 ГГц в течение 20 мин. Эта обработка приводит к возрастанию белка на 20% относительно контроля. Наименьшее значение содержания белка наблюдалось при значениях частот 53 ГГц с понижением содержания белка в культуре гриба шиитаке на 25% относительно контроля (рис.16, б).

Изменения содержания белка в экстрактах культуры трютовика лакированного после обработки электромагнитными мм-волнами представлены на рис.16, в. Как свидетельствуют данные таблицы 3 и рисунка 16 в, возрастание биомассы культуры коррелирует с увеличением содержания белка в культуре при обработках гриба в 50.3 ГГц 20 мин: содержание увеличивается до 260%.

Как следует из полученных данных, наблюдался дифференцированный ответ различных культур грибов на внешнее физическое воздействие (рис. 16 а,б,в). Эти изменения могут быть обусловлены ограниченностью времени в первые дни стимулирования роста культуры и синтеза белка, однако уже через некоторое время, в результате адаптационных процессов, организм приходит к равновесию благодаря саморегуляции. В результате рост культуры замедляется, а контрольные культуры опережают рост облученных культур (на примере вешенки обыкновенной на рис.15). Возможно, более длительное воздействие КВЧ может вызвать более стойкие изменения.

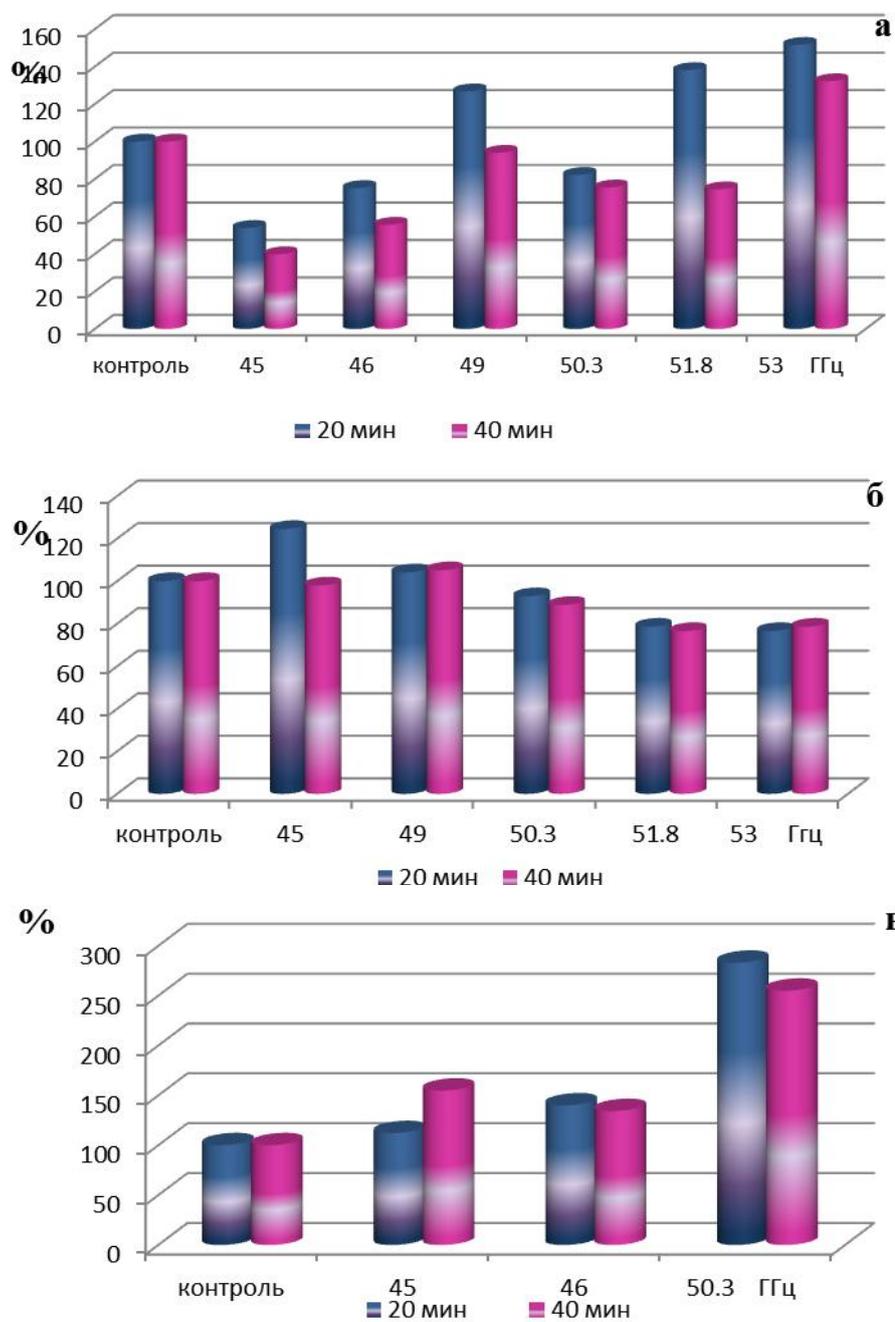


Рис. 16. Содержание белка в экстрактах мицелиальных культур вешенки обыкновенной (а), шиитаке (б) и трутовика лакированного (в) на 3-ие сутки после обработки КВЧ ЭМИ в течение 20 мин и 40 мин, выраженное в процентах относительно величины содержания белка в экстракте контрольной культуры, принятую за 100%.

Как известно, стресс сопровождается не только чрезмерной генерацией активных форм кислорода (Гудков, 2012), в результате которых происходит экспрессия генов, контролирующих синтез компонентов защитных систем и возрастание содержания мРНК (Breusengem et al., 2001), но и увеличением биосинтеза белка *de novo* и изменением активности ферментов-антиоксидантов (Реброва, 1992; Тамбиев и др., 2000; Неркарарян и др., 2005; Минасбежян и др., 2009).

Для наглядности о происходящих в культурах изменениях мы приводим фотографии 4 экспериментов мицелиальной культуры вешенки обыкновенной на 3-е сутки после обработки 7-дневного мицелия, на которых видны различия в росте колонии. На рисунке 17 представлены фотографии контрольной и обработанных культур гриба. Как видно из рисунка 17, рост культуры под действием обработки мм-волнами частотой 53 ГГц в течение 20 мин (чашка Петри №5) приводит к увеличению биомассы культуры, четко проявляется радиальный рост и наблюдается относительное уплотнение культуры по сравнению с контролем. Такое ускорение роста и увеличение биомассы несомненно отражается и на возрастании количества белка в экстракте культуры гриба вешенки обыкновенной, как свидетельствуют данные, приведенные в таблице 5 и на рис. 15 а.

Однако обработка мм-волнами частотами 45 ГГц и 46 ГГц в течение 20 мин на 3 сутки приводит к подавлению роста (рис.17, №4 и №6 соответственно) по сравнению с контрольной культурой (№8), что также соответствует полученным нами данным об уменьшении содержания белка в экстрактах соответствующих культур гриба вешенки обыкновенной (табл. 5). Более того, в чашках Петри № 4 и № 6 в некоторых местах наблюдаются нарушения радиального роста мицелиальной культуры, она рыхлая и неоднородная. По-видимому, под воздействием КВЧ в водной среде в присутствии кислорода образуется наноконцентрация перекиси, “съедающей” в некоторых местах культуру. Это предположение подкрепилось в дальнейшем полученными нами данными о возрастании



Рис.16. Культуру гриба *Pleurotus ostreatus* на третьи сутки после обработки мм-волнами при различных частотах (4– 50.3 ГГц , 5– 49 ГГц, 6– 46 ГГц,) в течение 20 мин и в контроле (8).

активности пероксидаз при отмеченных частотах мм-волн. Наши данные согласуются с результатами ряда авторов (Поцелуева и др., 1999; Тамбиев и др., 2000; Гудков, 2012; Kreslavski et al., 2012) о взаимодействии и стимулировании роста организмов мм-волнами, и подкрепляют предположение о возникновении активных форм кислорода и нанокочисств перекиси под действием КВЧ ЭМИ.

На основании полученных данных следует, что 20 мин экспозиция на 3 сутки роста вызывает биологический отклик, величина которого зависит от частоты ЭМИ, выражающийся в увеличении выхода биомассы и синтеза белка. Увеличение экспозиции усиливает действие физического фактора и, вместе с тем, выравнивает ответную реакцию биологической системы, вызывает стресс, подавление синтеза белка и приводит к активации ПО, что в свою очередь свидетельствует об увеличении АФК в клетках мицелиальных культур изученных грибов (Нанагюлян и др. 2008; Авагян и др., 2011).

### 3.3. Изменение активности пероксидаз в мицелиальных экстрактах культур изученных грибов под воздействием КВЧ ЭМИ

Нами исследовано воздействие низкоинтенсивных крайне высоких частот электромагнитных излучений в диапазоне 45-53 ГГц на активность фермента пероксидазы, принадлежащего к лигнолитической ферментативной системе культур дереворазрушающих грибов –вешенки обыкновенной, трутовика лакированного и шиитаке. Также выявлены такие экспозиции обработки культур грибов, которые позволяют повысить выход биомассы с повышенной ферментативной активностью для их использования в качестве дешевого фармакологического сырья.

Пероксидаза грибов имеет широкое практическое применение в разных отраслях промышленности и медицины. В медицине пероксидаза применяется для диагностики острых и хронических, бактериальных и вирусных (в том числе СПИД), эндокринологических заболеваний, а также злокачественных новообразований методом иммуноло-

гического анализа. Она успешно применяется в промышленности для очистки от фенолов при производстве бензина, каучука и т.д. (Давыдова и др., 1998; Gunde-Cimerman et al., 1999; Rad et al., 2007).

Большинство дереворазрушающих грибов “белой” гнили на пептонной среде вырабатывают как марганец-зависимые пероксидазы, так и универсальные пероксидазы (Даниляк и др., 1989; Cohen et al., 2001). Более того, универсальные (или как их называют полифункциональные) пероксидазы обладают каталитической активностью лигнин-пероксидаз и марганец-пероксидаз (Gomez-Toribio et al., 2001; Куликова и др., 2011). Благодаря высокому содержанию широкого спектра пероксидаз (ЕС 1.11.1.9) грибы «белой» гнили деградируют лигно-целлюлозные остатки окружающей среды до двуокиси углерода и воды. Получение культуры гриба с повышенной активностью пероксидаз имеет большое прикладное значение. Модулируя условия выращивания культуры грибов посредством обработки мм-волнами ЭМИ, можно решить проблему получения культур грибов с повышенной активностью пероксидаз. Такие высокопродуктивные культуры грибов могут быть использованы в качестве дешевого фармакологического сырья.

В нормально функционирующей клетке уровень образования активных форм кислорода (АФК) в клетке и их расщепление ферментативными системами находятся в динамическом равновесии. Стресс сопровождается не только чрезмерной генерацией АФК и продуктов перекисного окисления липидов – сигнальных молекул, участвующих в трансдукции стрессовых сигналов из хлоропластов к ядерному геному, но и изменением активности ферментов–антиоксидантов (Kreslavski, 2012). Скорость формирования ответа выражается увеличением активности ферментов, что определяет устойчивость растений к стрессу (Алехина и др., 2005). С другой стороны – АФК выступают как участники сигнальных каскадов, в результате которых происходит экспрессия генов, контролирующих синтез компонентов защитных систем, и возрастание содержания мРНК, что может сопровождаться увеличением синтеза белка *de novo* (Breusengem et al., 2001), как нами было

получено при некоторых экспозициях (рис.16 а, б, в). Теперь рассмотрим, как изменяется активность пероксидаз в экстрактах культур грибов в ответ на внешнее физическое воздействие, что может косвенно подтвердить наше предположение о возникновении нанокочеств перекиси в культурах.

Облучение культуры гриба вешенки обыкновенной ЭМИ мм-диапазона вызывает изменение общей активности пероксидаз (ПО), которая имеет резонансный характер, и поэтому ЭМИ с близкими частотами вызывают разные по величине и направлению отклонения от контрольного уровня. Нами также определялась активность лактат дегидрогеназы в культуре гриба вешенки обыкновенной, однако, ни в контроле, ни в обработанных культурах не была обнаружена активность этого фермента, что свидетельствует об ограниченном углеводном метаболизме в этих грибах при исследованных условиях. Аналогичные данные были получены и для гриба *Ganoderma lucidum*, что согласуется с исследованиями, проведенными на китайских и итальянских штаммах *Ganoderma lucidum* (Saltarelli et al., 2009).

Как свидетельствуют данные таблицы 6, на 3 сутки после обработки культуры гриба вешенки обыкновенной в течение 20 мин в диапазоне 45-53 ГГц, наблюдалось как резкое снижение (при частоте 45 ГГц), так и незначительное повышение ферментативной активности, практически не превышающих уровень активности ПО в контрольных препаратах. Исключение составляет культура гриба, облученная частотой в 53 ГГц в течение 20 мин, в экстракте которой возрастание ПО активности составляет 138% (рис.18 а).

Обработка культуры гриба в том же диапазоне в течение 40 мин на 3 сутки роста приводит к ощутимым изменениям активности ПО. Начиная с 48 ГГц по 51.8 ГГц частоты приводят к возрастанию ПО. Максимальное значение достигается при частоте в 50.3 ГГц и наблюдалось возрастание ПО активности в 3 раза (табл. 6), что превышает контрольные препараты на 200% (рис. 18 б). Такое значительное увеличение ПО активности можно будет

Таблица 6.

Изменения активности пероксидазы (в ед. а.) в культуре гриба *Pleurotus ostreatus* в зависимости от частоты и длительности обработки мм-волнами

Частота	Время обработки			
	20 минут		40 минут	
	3 сутки	4 сутки	3 сутки	4 сутки
контроль	0.711 ± 0.01	0.974 ± 0.02	0.713 ± 0.01	0.974 ± 0.02
45 ГГц	0.372 ± 0.05	1.539 ± 0.04	0.189 ± 0.02	0.967 ± 0.01*
46 ГГц	0.775 ± 0.01	1.359 ± 0.01	0.699 ± 0.04*	1.289 ± 0.03
49 ГГц	0.477 ± 0.03	0.873 ± 0.02	0.883 ± 0.02	1.451 ± 0.03
50.3 ГГц	0.790 ± 0.01	0,996 ± 0.03*	2.361 ± 0.04	1.472 ± 0.02
51.8 ГГц	0.662 ± 0.04*	1.580 ± 0.02	1.075 ± 0.03	1.675 ± 0.01
53 ГГц	0.975 ± 0.01	0.972 ± 0.03*	0.661 ± 0.02*	1.638 ± 0.02

Примечание: \*достоверно при значениях  $p < 0.05$

использовать для получения фармацевтических препаратов из активированных таким образом мицелиальных культур вешенки обыкновенной (Авагян и др., 2011).

На 4 сутки после облучения практически во всех препаратах экстрактов из облученных культур гриба *P. ostreatus* обнаруживается возрастание активности ПО (табл. 6). Практически во всех вариантах на 4-е сутки после облучения активность ПО выше, чем в контрольных вариантах примерно на 40-60% (рис. 18). Возрастание ПО активности свидетельствует о стимулировании окислительных процессов в грибной культуре вешенки обыкновенной, об устойчивом формировании ответа на внешнее воздействие смещением метаболического равновесия.

Сравнение уровня ПО активности культуры гриба на 3-е и 4-е сутки после облучения также выявило дифференцированный ответ биологической системы. Если при обработке ЭМИ волнами частотой 45 ГГц в течение 20 мин на 3-е сутки после облучения активность ПО ниже контрольной, то на 4-е сутки – активность ПО резко возрастает и становится выше контроля на 58%. Такая же закономерность наблюдалась при облучении частотами в 46 ГГц, 49 ГГц и 51.8 ГГц, как представлено в таблице 6.

При облучении культуры вешенки обыкновенной частотой 49 ГГц активность ПО на 4-е сутки остается ниже контрольной величины, но выше значения ПО активности на 3-е сутки. При облучении частотами 45 ГГц, 46 ГГц, 49 ГГц и 51.8 ГГц отклик биологической системы, по-видимому, формируется медленнее, однако более выражен, чем при облучении 50.3 ГГц и 53 ГГц 20 мин. Ответ биологической системы увеличением ПО активности уже на 3-е сутки после облучения при частотах в 50.3 ГГц, 40мин (более чем в три раза), 51.8 ГГц, 40 мин и 53 ГГц 20 мин объясняется нами изменением структуры самой воды при этих частотах.

Исходя из полученных нами данных, пероксидазная активность в культуре вешенки обыкновенной была наиболее выражена на 3 сутки после обработки ЭМИ частотой 50.3 ГГц длительностью 40 мин (рис.18), поэтому мы сочли целесообразным провести сравнительные

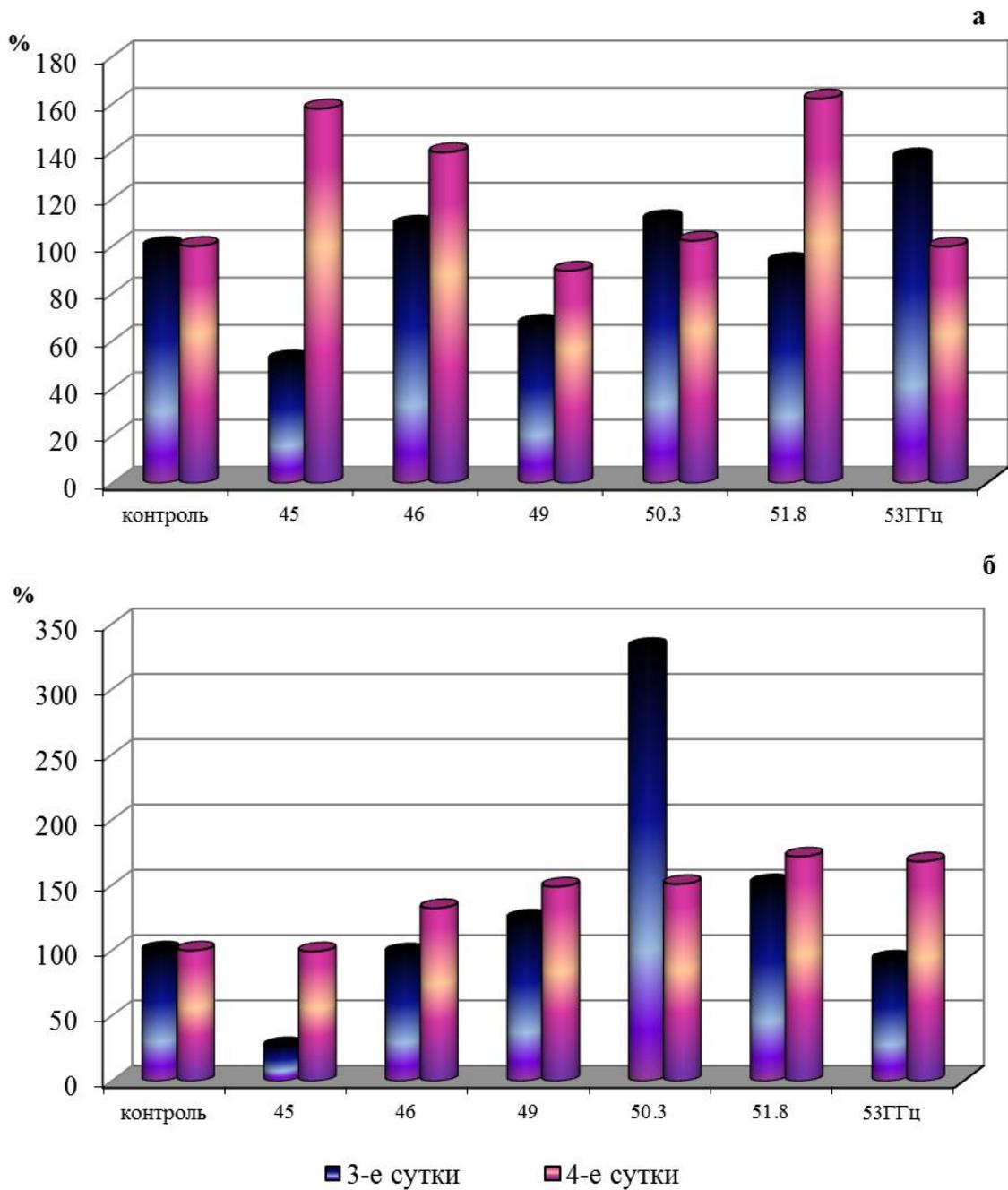


Рис. 18. Активность пероксидазы в экстрактах обработанных мм-волнами в течение 20 мин (а) и 40 мин (б) культур гриба *Pleurotus ostreatus*, выраженная в процентах относительно величины активности ПО в контрольной культуре, принятой за 100%.

исследования активности пероксидаз в экстрактах культур грибов шиитаке и трутовика лакированного в нескольких обработках на 3 сутки, при длительности экспозиции в 20 и 40 мин (рис. 19 а, б, в).

Так, данные о зависимости активности пероксидаз от частоты и длительности обработки мм-волнами в экстрактах культуры грибов шиитаке, приведенные на диаграмме (рис.19 б) свидетельствуют, что наиболее высокие значения ПО активности наблюдаются при обработках частотами в 50.3 ГГц и 51.8 ГГц в течение 20 мин, а наименьшие – при 45 ГГц. Воздействие различными частотами КВЧ ЭМИ в течение 20 мин на культуры гриба шиитаке может привести к возрастанию ПО активности во внутриклеточном экстракте на 20%. Увеличение же длительности обработки культуры гриба шиитаке до 40 мин приводит к падению ПО активности при всех изученных нами частотах мм-волн. Наименьшее значение ПО активности при данной экспозиции наблюдалось при частоте мм-волн в 50.3 ГГц.

Таким образом, обработка культуры шиитаке мм-волнами повышает ПО активность только при частоте 51.8 ГГц, длительностью 20 мин. Остальные экспозиции оказались неэффективными. Эти данные подтверждают наше предположение о том, что под действием мм-волн могут образовываться нанокочества перекиси, которые активируют антиоксидантную активность собственно культуры гриба, как было отмечено о грибах “белой гнили” в первой главе (стр.19). Если культура гриба обладает антиоксидантной активностью, то внешнее воздействие еще более стимулирует эту активность. Образующиеся при этом нанокочества перекиси могут в то же время подавлять рост культуры, тем самым приводить к понижению синтеза белка относительно контроля, как это нами было получено (табл. 3 и рис.16 б) и, даже, местами “разъедать” культуру, как это было показано на примере вешенки обыкновенной на рис.17, №б. В то же время, наименьшая активность пероксидазы при обработках культуры гриба шиитаке мм-волнами в 45ГГц в течение 20 мин (рис.19 б) соответствует максимальному значению белка в культуре (рис.16 б).

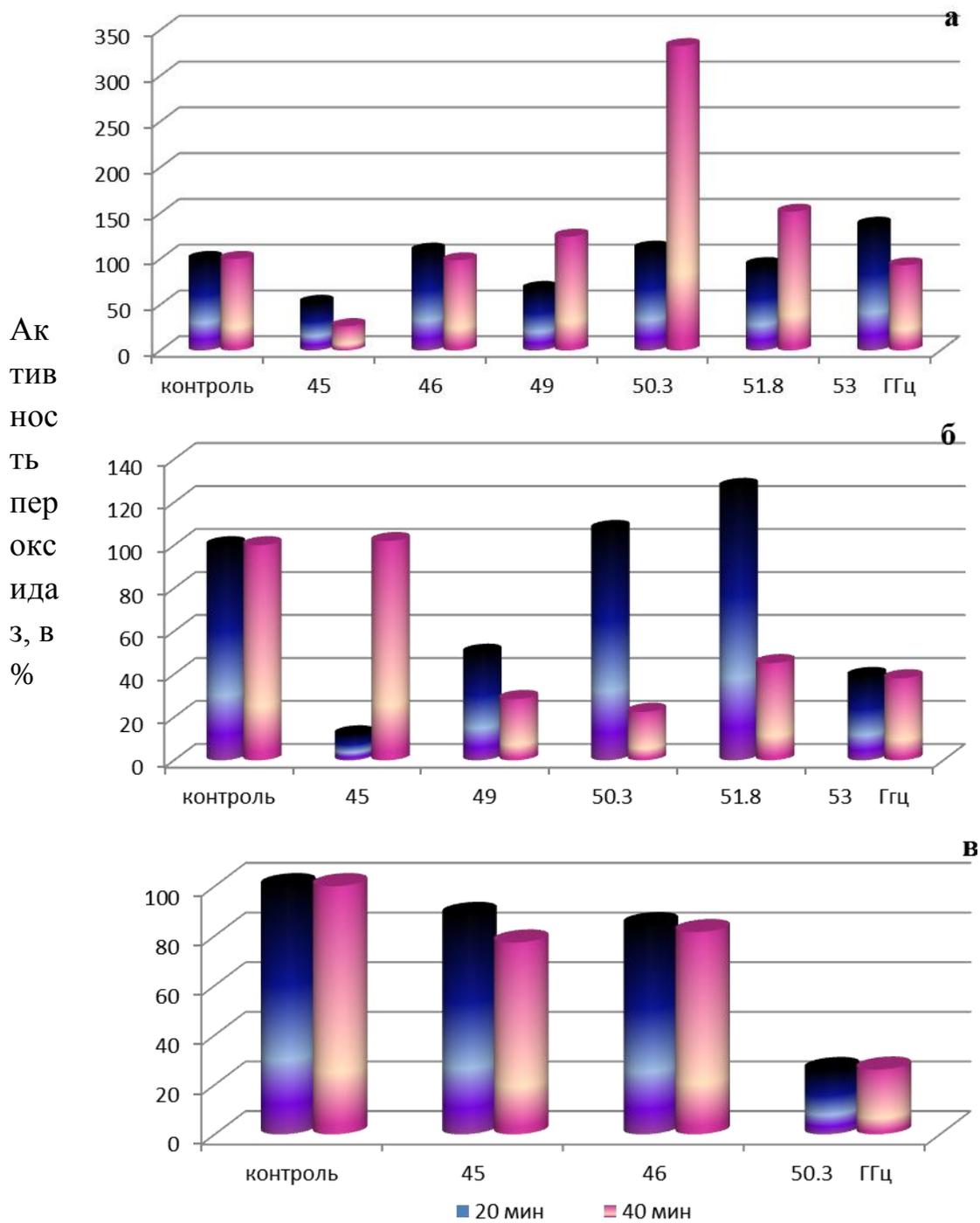


Рис.19. Изменения активности пероксидазы в экстрактах культур грибов вешенки обыкновенной (а), шиитаке (б) и трютовика лакированного (в) на 3 суток после облучения мм-волнами, в зависимости от частоты и длительности обработки мм-волнами.

Данные о зависимости активности пероксидаз мицелиальных экстрактов культуры гриба трутовика лакированного от частоты и времени экспозиции КВЧ ЭМИ приведены на рис. 19 в. Как свидетельствуют наши данные, воздействие КВЧ ЭМИ на культуру трутовика лакированного, в основном, не приводит к возрастанию ПО активности во внутриклеточном экстракте, и, соответственно, приводит к увеличению биомассы и повышению содержания белка в культуре гриба, как это было приведено на рис. 16 б.

Ряд исследований по изучению влияния КВЧ ЭМИ на метаболизм фотосинтезирующих организмов (актиномицетов *Streptomyces xanthochromogenes* и цианобактерии *Anabaena variabilis*) также выявили его стимулирующее действие на важные физиологические процессы (Tambiev et al., 2000; Лукьянов, 2007). Наши данные согласуются с работами этих исследователей по воздействию мм-волн на содержание белка, активность ферментов, однако данных о воздействии КВЧ ЭМИ на базидиомицеты и мицелиальные культуры не имеются. И с этой точки зрения работы по изучению влияния КВЧ ЭМИ на активность пероксидаз культур исследуемых дереворазрушающих грибов проведены нами впервые (Нанагюлян и др., 2008; Минасбекян, Нанагюлян, Неркарарян, Авагян, 2009; Минасбекян и др., 2010).

Несмотря на то, что проблемой биоконверсии лигнина в последние 20-25 лет активно занимаются многие научные коллективы, окончательного решения по данному вопросу пока еще не найдено. Это связано со значительной сложностью строения лигноцеллюлозного субстрата, а также с недостаточной изученностью метаболизма грибов-лигнолитиков, в том числе механизма действия разлагающих лигнин ферментов ( Suzuki et al., 2006; Valaskova, Baldrian, 2006; Liers et al., 2011). Для эффективного использования биотехнологических подходов весьма актуальным представляется изучение лигнолитического потенциала грибов “белой” гнили и физиологических функций основных лигнолитических ферментов (Явметдинов, 2002; Куликова и др., 2011; Ferenandez-Fueyo et al., 2014; Rencoret et al., 2015).

Таким образом, выявленные нами оптимальные частоты, повышающие активность ПО, имеют большой практический интерес с учетом того, что исследуемые грибы выращиваются в искусственных условиях и могут быть использованы в качестве экологически чистого дешевого сырья в фармакологии, а также открывают возможности их широкого использования в биоконверсии лигнина в природе. Избирательное же стимулирование синтеза некоторых и подавление других ферментов при различных частотах мм-волн могут быть использованы в биотехнологии, поскольку базидиальные грибы, возбудители “белой” гнили древесины, принадлежат к немногочисленной группе организмов, способных разрушать лигнин и обладающих уникальной системой лигнолитических ферментов: лигнинпероксидазы, лакказы и Mn-пероксидазы, полифункциональной пероксидазы.

Как показали наши исследования, используемый нами фактор модуляции условий роста культур изученных грибов оказал положительное воздействие при определенных частотах ЭМИ и позволил получить экстракты культур грибов, в которых отмечается повышение ферментативной активности и имеет практическую значимость (Нанагюлян и др., 2008; Минасбемян и др., 2010; Авагян и др., 2011).

#### 3.4. Изменение активности $\beta$ -глюкозидаз в экстрактах культур исследованных дереворазрушающих грибов под воздействием КВЧ ЭМИ

Базидиомицеты являются самыми мощными деструкторами целлюлозы, поскольку многие из них растут на мертвой древесине – в среде, богатой клетчаткой. Классический спектр грибных целлюлолитических ферментов состоит из эндо- и экзолитических ферментов, действующих на целлюлозу. Полученная целлобиоза далее обрабатывается  $\beta$ -глюкозидазами до получения глюкозы.

Как уже было отмечено ранее (гл. 1), в базидиомицетах содержится фермент  $\beta$ -глюкозидаза, широко используемый в различных биотехнологических процессах для

производства горючего этанола из целлюлозных сельскохозяйственных остатков, а также для улучшения органолептических свойств сырья в пищевой промышленности, поскольку является ключевым ферментом в ферментативном высвобождении ароматических соединений из глюкозидных предшественников, представленных в фруктах и различных ферментативных продуктах (Roitner et al., 1984; Bothast et al., 1997; Gunata et al., 1997; Riou et al., 1998).

Фермент  $\beta$ -глюкозидаза нами был обнаружен в дереворазрушающем грибе *Pleurotus ostreatus* (Минасбекян, Нангюлян, Авагян 2009), что является важным признаком при определении систематической принадлежности дереворазрушающих базидиомицетов (Даниляк и др., 1989; Михайлова и др., 2001).

Нами были использованы КВЧ ЭМИ различных частот для модуляции условий роста культуры гриба вешенки обыкновенной с целью получения оптимально высоких ферментативных активностей организма в ответ на стрессовые воздействия внешних абиотических факторов. Была получена культура вешенки обыкновенной с высокой активностью фермента  $\beta$ -глюкозидазы, посредством изменений условия роста.

Так, из диаграммы, представленной на рис. 20 а, видно, что при обработке частотами 49 ГГц длительностью 20 мин активность фермента  $\beta$ -глюкозидазы максимально увеличивается – возрастая в 2 раза относительно контрольной культуры. К повышению активности фермента приводит также обработка частотой в 51,8 ГГц, с экспозицией в 20 мин (в 1.2 раза) и частотой 46 ГГц, 40 мин (1.5 раза) относительно контроля. Наименьшего значения активность  $\beta$ -глюкозидазы достигает при 53 ГГц в течение 20 мин и 45 ГГц в течение 40 мин, из всех изученных нами экспозиций.

Данные об изменениях активности  $\beta$ -глюкозидазы в экстрактах культуры шиитаке представлены на рис. 20 б. Исследования свидетельствуют о положительном воздействии на культуру этого гриба при частотах мм-волн в 53 ГГц в течение 20 мин, увеличивая актив-

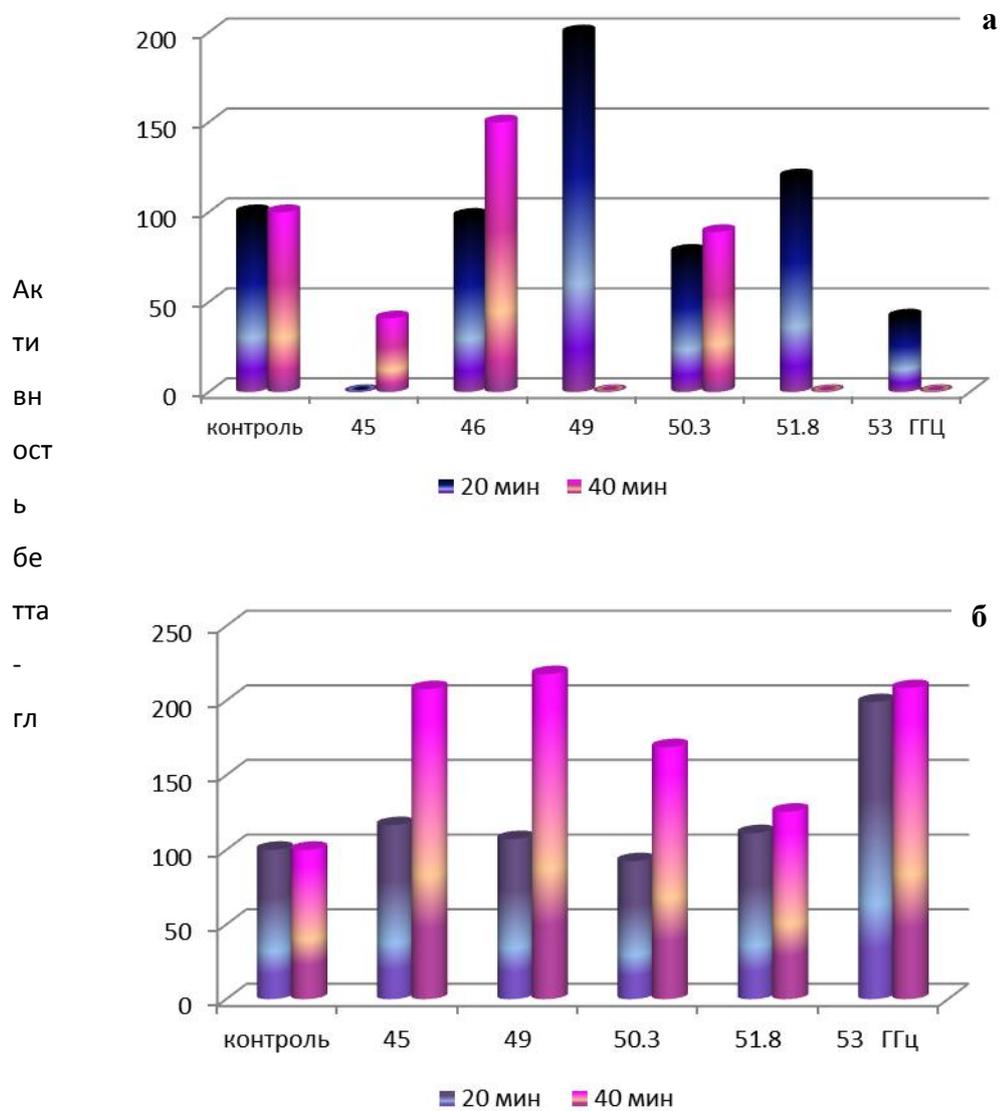


Рис. 20. Зависимость активности  $\beta$ -глюкозидаз в мицелиальных экстрактах культур грибов *Pleurotus ostreatus*(а) и *Lentinula edodes* (б) от частоты и времени экспозиции мм-волн.

ность данного фермента почти в 2 раза. Увеличение длительности воздействия до 40 мин приводит к еще более устойчивому положительному эффекту: при частотах 45 ГГц, 49 ГГц и 53 ГГц длительностью 40 мин наблюдалось возрастание активности фермента более чем в два раза. Обработка частотами мм-волн в 50.3 ГГц и 51.8 ГГц в течение 40 мин также приводят к увеличению активности фермента приблизительно в 1,5 и 1,2 раза, соответственно.

Исследования и поиск других растительных и грибных источников  $\beta$ -глюкозидаз, толерантных к ингибированию глюкозой, продолжают многими исследователями. Возможно, подобные модификации условий выращивания культуры дереворазрушающих грибов также могут стать хорошим источником для получения устойчивых форм данного фермента. Однако эти исследования требуют продолжения для выявления оптимальных условий обработки мм-волнами с целью получения высокоактивных  $\beta$ -глюкозидаз, толерантных к ингибированию глюкозой.

Таким образом, получены изменения в метаболической активности культур в изученных нами дереворазрушающих грибах под воздействием внешнего абиотического фактора, которые выражаются как в изменении биомассы, так и в повышении ферментативной активности двух изученных ферментативных комплексов – лигнолитического и целлюлолитического. Данные наших исследований могут быть использованы как в целях решения проблемы биоконверсии – для утилизации труднодеградируемых полимеров клеточных стенок древесины, так и в качестве богатого ферментами сырья для решения фармакологических проблем (Нанагюлян и др., 2008; Авагян, Минасбекян, Нанагюлян, 2009; Минасбекян, Нанагюлян, Авагян, 2009; Минасбекян, Неркарарян и др., 2010).

### 3.5. Противовоспалительная активность экстрактов культур исследуемых дереворазрушающих грибов.

В данном разделе мы продемонстрируем применение, полученных нами мицелиальных экстрактов в качестве противовоспалительного средства на крысах. В

медикаментозной терапии хронических воспалительных заболеваний ведущее место занимают противовоспалительные препараты нестероидной природы. Они зарекомендовали себя как высокоэффективные средства, обладающие заметными противовоспалительными, жаропонижающими и анальгетическими свойствами. Однако применение таких препаратов в течение длительного времени сопряжено с развитием побочных эффектов: гастропатий, гепатитов, нефропатий, аллергических реакций, повышения артериального давления и др. (Ферубко, 2009).

На сегодняшний день арсенал средств фармакотерапии хронических патологий, сопровождающихся воспалением и болью, эффективность лечения этих заболеваний недостаточна. Это обусловлено, во-первых, тем, что этиология и механизмы развития хронических воспалений изучены не полностью. Во-вторых, при наличии разнонаправленных по механизму индукторов развития воспаления, воздействие на одно из звеньев является недостаточным для полноценного лечения. В связи с этим, большое значение приобретает поиск лекарственных препаратов, содержащих комплекс активных соединений, способных воздействовать на различные звенья развития хронических воспалительных заболеваний. Этим обусловлен наблюдающийся повышенный интерес к природным источникам лекарственных веществ, которые, обладая богатым составом биологически активных соединений, являются потенциальным и относительно безопасным источником для создания новых противовоспалительных средств (Жамгарян, 2006).

Фитопрепараты в отличие от синтетических, как правило, обладают малой токсичностью и лучшей переносимостью, при этом проявляют заметную фармакологическую активность, что позволяет гораздо шире использовать фитопрепараты для симптоматического, профилактического и восстановительного лечения, а также противорецидивной терапии воспалительных заболеваний (Кукес, 1999).

Лекарственное сырье растительного происхождения отличается богатым содержанием биологически активных соединений, среди которых особого внимания

заслуживают фенольные соединения, сапонины, терпеноиды и жирные кислоты. Спектр биологической активности фенольных соединений очень широк. Благодаря способности образовывать комплексные соединения с тяжелыми металлами и уменьшать всасывание токсичных веществ, фенольные соединения широко применяются как антидоты. Они также оказывают выраженное гепатопротекторное действие и способствуют кумуляции гликогена в печени. Данные последних лет показывают, что фенольные соединения проявляют выраженную антибактериальную, противовирусную и антиоксидантную активности, а также обладают нейропротекторными противоопухолевым действием (Mujic et al., 2010; Sulkowska-Ziaja et al., 2012; Alves et al., 2013; Salame et al., 2013; Saltarelli et al., 2015).

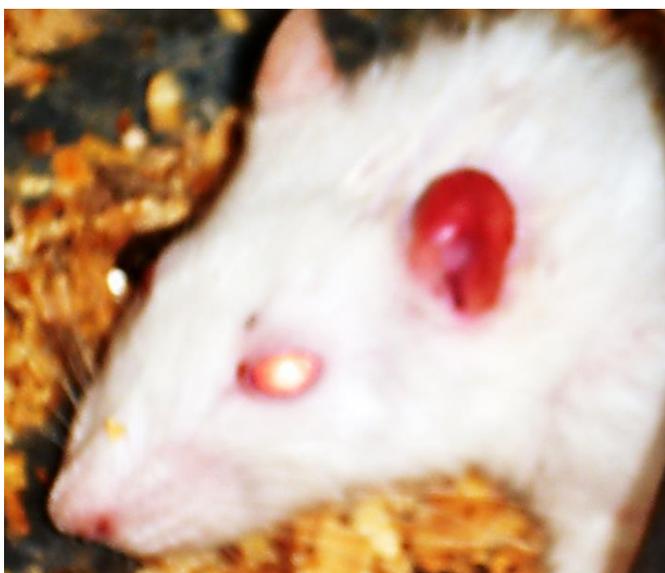
Поскольку исследуемые нами грибы–вешенка обыкновенная, шиитакэ и трютовик лакированный являются дереворазрушающими, то в составе вторичной клеточной оболочки содержатся хитин (поли-глюканы), целлюлоза, большое количество низкомолекулярных соединений: фенольные кислоты, флавоноиды и т.д. (Alves et al., 2013). Грибы также богаты  $\beta$  – глюкозидазами и различными пероксидазами, необходимыми для синтеза и расщепления лигнина и целлюлозы и их производных. Поэтому предполагалось, что экстракты из культур грибов, обработанных мм-волнами, будут эффективны в использовании их в качестве противовоспалительных средств.

Как было отмечено нами, при определенных частотах КВЧ ЭМИ некоторые из ферментов в экстрактах культур базидиомицетов активируются (рис. 18, 19, 20). Все вышеуказанное явилось основанием для исследования противовоспалительной активности мицелиальных культур базидиомицетов с модулированной ферментативной активностью. Исследования по определению противовоспалительной активности экстрактов грибов проводились на модели индуцированного ксилолом острого воспаления уха крыс.

Индуцированное ксилолом воспаленное ухо по весу превосходит невоспаленное ухо у той же крысы (рис. 21 а, б). В качестве контроля служила контрольная группа крыс, у которых одно ухо (левое) индуцировали воспаление ксилолом, а другое (правое) не

индуцировали. Разность масс ушей контрольной крысы и является тем значением, относительно которого сравниваются опытные данные. Разность масс отсеченных ушей в контрольных крысах мы приняли за 100 %. По изменению (уменьшению) разности масс между ушами у крыс в опытных группах и судят о влиянии экстракта на воспалительный процесс относительно разности масс ушей контрольных крыс.

По полученным данным внутрибрюшинное введение экстракта гриба *Pleurotus ostreatus* в дозе 5 мг/кг за 30 мин до отсечения кончиков обеих ушей, сопровождается уменьшением острого отека уха, индуцированного ксилолом, что проявлялось в уменьшении разности масс ушей крыс в разной степени.



**а**



**б**

Рис. 21. Воспаление левого уха крысы, индуцированное ксилолом (а). Отсеченные уши крысы (б): одно из которых воспаленное (1), а другое-невоспаленное (2).

Если разность масс ушей при воздействии контрольного экстракта принять за 100%, то экстракт из культуры гриба, предварительно облученной частотой в 50.3 ГГц в течение 40 мин, уменьшает эксудативную отечность уха приблизительно на 40% (рис. 22). Полученные различия в воздействии экстрактов из облученной культуры, относительно необлученной, на

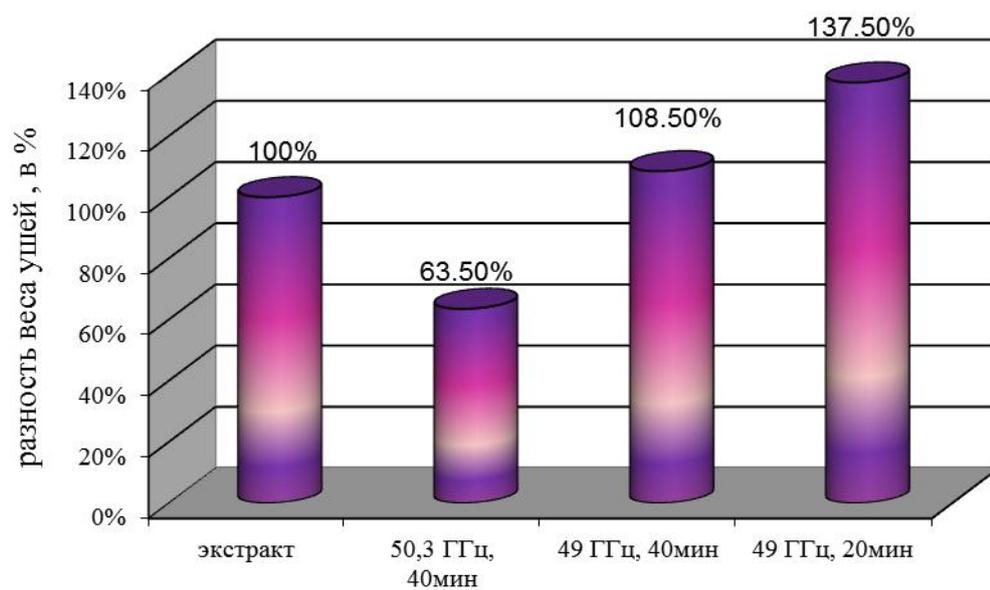


Рис. 22. Изменение противовоспалительной активности экстракта культуры гриба *P. ostreatus* в зависимости от частоты и времени обработки мм-волнами относительно экстракта из необработанной культуры.

острый отек воспаленного уха зависел от частоты и длительности облучения мм-волнами мицелиальной культуры гриба вешенки обыкновенной. Такое возрастание эффективности воздействия связано с повышением антиоксидантной активности мицелиальных культур вешенки обыкновенной под действием мм-волн (Avagyan, Zhamgaryan, 2010; Avagyan et al., 2011, 2012; Avagyan, Minasbekyan, Nanagulyan, 2013; Авагян, 2014).

Далее мы сравнивали наши данные относительно разности веса ушей у контрольных крыс. Если разность веса воспаленного и невоспаленного уха в контрольных крысах, которым предварительно внутрибрюшинно не был введен экстракт из культуры вешенки обыкновенной принять за 100%, тогда внутрибрюшинное введение экстрактов как из необлученной, так и облученной культуры гриба вешенки подавляет воспалительный процесс уха в опытных вариантах крыс в той или иной мере как представлено на диаграмме (рис.23).

Представленные на рис.23, данные свидетельствуют об эффективности воздействия экстрактов культур гриба вешенки обыкновенной на экссудативный отек уха крыс. Так, экстракт из необлученной культуры вешенки обыкновенной подавляет воспалительный процесс на 80%. Наибольшее подавление воспалительного процесса достигалось при внутрибрюшинном введении экстракта мицелиальной культуры гриба, облученной КВЧ ЭМИ частотой 50.3ГГц в течение 40 мин, который подавлял острый воспалительный отек уха на 87.5%. Эффективность воздействия экстракта из облученной мицелиальной культуры превосходит действие диклофенака в количестве 10 мг/кг. Такое эффективное воздействие согласуется с повышением пероксидазной активности экстракта мицелиальной культуры вешенки обыкновенной на 3-ие сутки после облучения мм-волнами частотой 50.3 ГГц в течение 40 мин, представленными в главе 3.3, где наибольшая активность ПО в культуре гриба также достигала именно при этой частоте (рис.18 б), которая, как известно из литературы, соответствует резонансной частоте воды, что подтверждает роль воды как первичное звено эффекта. (Девятков и др., 1991; Бецкий и др., 1996).

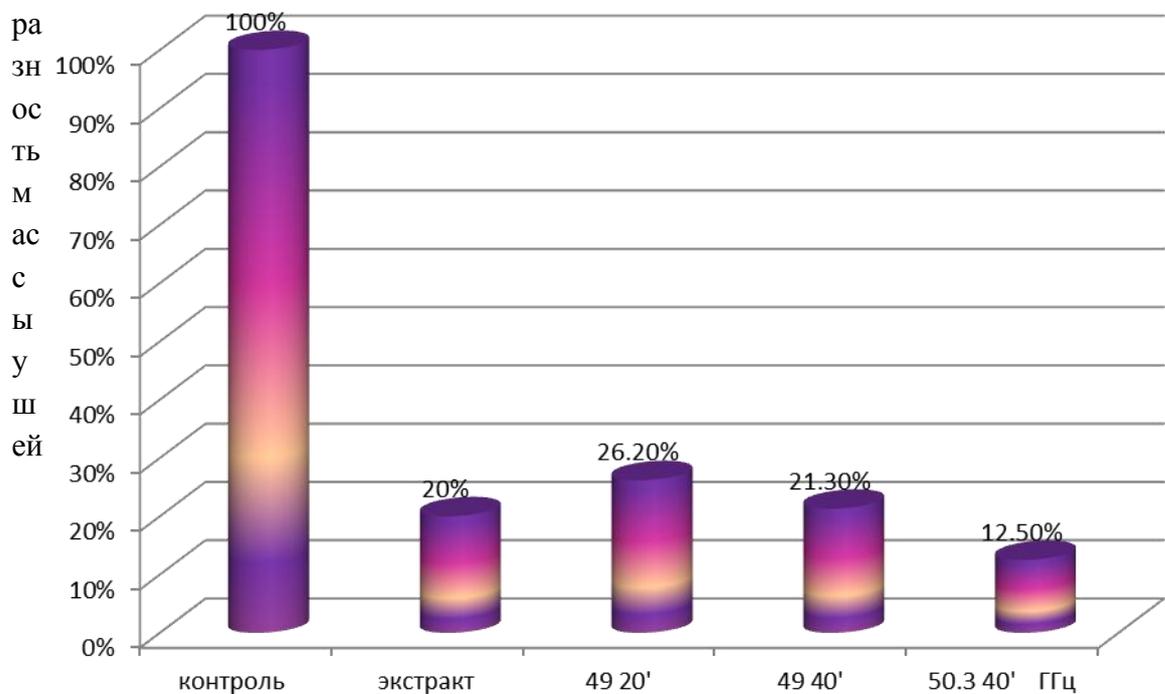


Рис. 23. Уменьшение разности масс ушей у опытных крыс после внутрибрюшинного введения экстрактов из мицелиальных культур гриба *P. ostreatus* по сравнению с контрольными крысами.

Экстракты из гриба, облученного 49ГГц в течение 20 и 40 мин, приводят к уменьшению воспаления, но, как и ожидалось, менее эффективно, чем экстракт из необлученной мицелиальной культуры *P. ostreatus*, что коррелирует с данными по ПО активности экстрактов культуры гриба вешенки при этих частотах (рис.18). Надо отметить, что экстракты мицелиальной культуры вешенки обыкновенной при этих экспозициях обладают максимальной активностью  $\beta$ -глюкозидазы (сравни с рис.20). Исходя из этих данных можно предположить, что за противовоспалительную активность экстрактов вешенки обыкновенной несет ответственность в первую очередь пероксидаза, фермент относящийся к лигнолитической ферментативной системе, а не фермент целлюлолитической системы –  $\beta$ -глюкозидаза.

В серии экспериментов были проведены сравнительные исследования противовоспалительной активности экстрактов, полученных из культур других видов дереворазрушающих грибов – *Lentinula edodes* и *Ganoderma lucidum*, данные которых представлены на диаграммах (рис. 24 а,б). Результаты экспериментов свидетельствуют, что именно при частоте 50.3 ГГц достигается максимальная противовоспалительная активность экстрактов из мицелиальных культур грибов. Результаты этих экспериментов еще раз подтверждают наше предположение о взаимосвязи между противовоспалительной активностью и активностью грибных пероксидаз. Результаты особенно четко были получены на примере вешенки обыкновенной, поскольку именно этот гриб обладает высокой антиоксидантной активностью (Куликова и др., 2011; Капич, 2011). Воздействие мм-волнами, вызывает повышение активности пероксидаз, что позволило нам выявить и подтвердить взаимосвязь между противовоспалительной и пероксидазной активностями в экстракте мицелиальных культур вешенки обыкновенной, что в некоторой мере правомерно для экстрактов культур трех исследованных видов дереворазрушающих грибов (Avagyan, Zhamgaryan, 2010; Avagyan, Zhamgaryan, Minasbekyan, 2013; Авагян, 2014).

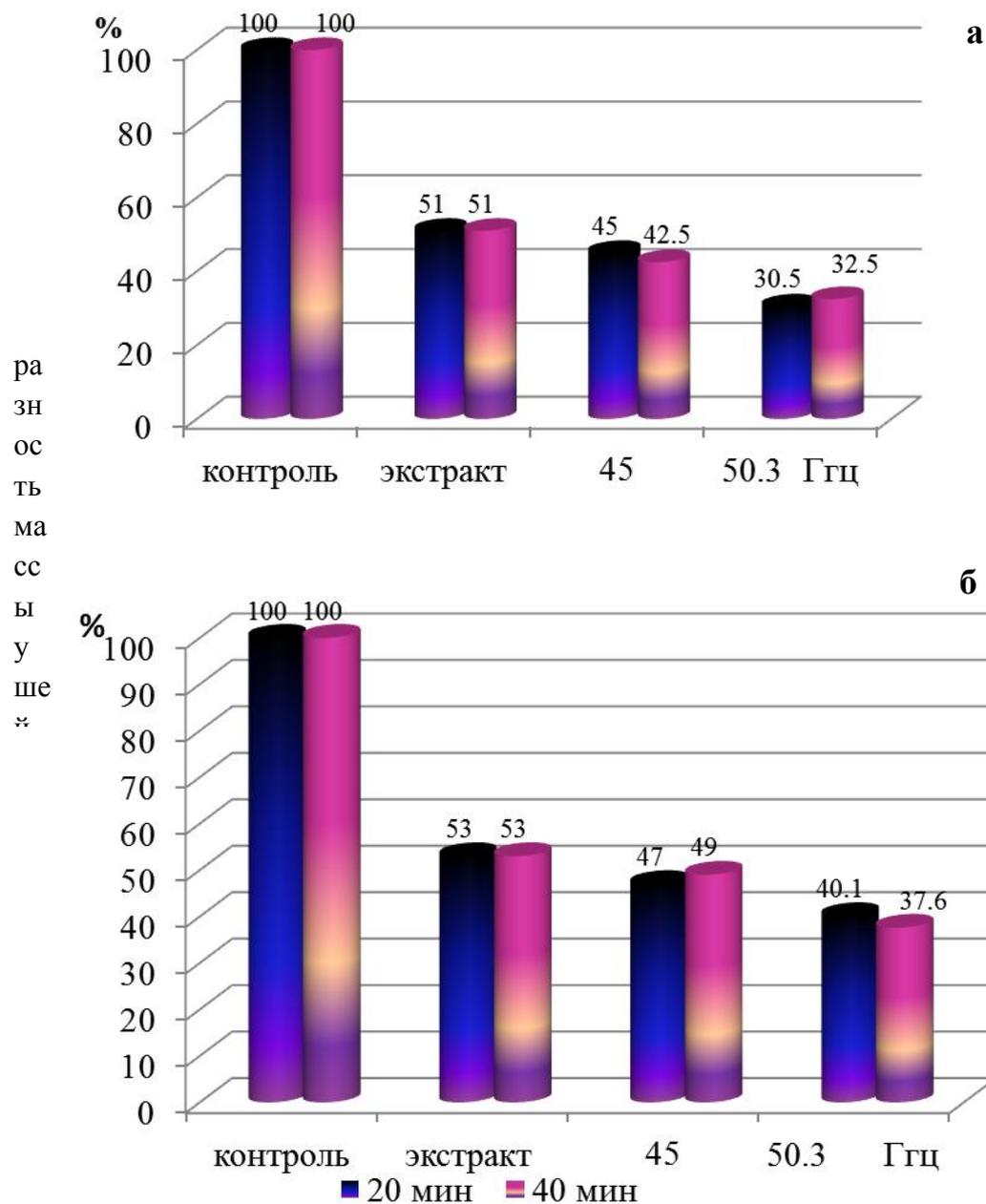


Рис. 24. Уменьшение массы воспаленных ушей крыс после внутрибрюшинного введения экстрактов культур грибов трутовика лакированного (а) и шиитаке (б) - контрольных и обработанных мм-волнами

Для подтверждения полученных данных по противовоспалительной активности экстракта культуры вешенки обыкновенной провели микроскопические исследования по гистологической оценке срезов тканей воспаленного ксилолом уха крысы в контрольной и опытной группах крыс. На рис. 25 а, б представлены данные гистологического исследования воспаленных тканей уха, индуцированного ксилолом, отсеченных через 1 час после индуцирования у контрольной и опытной крыс.

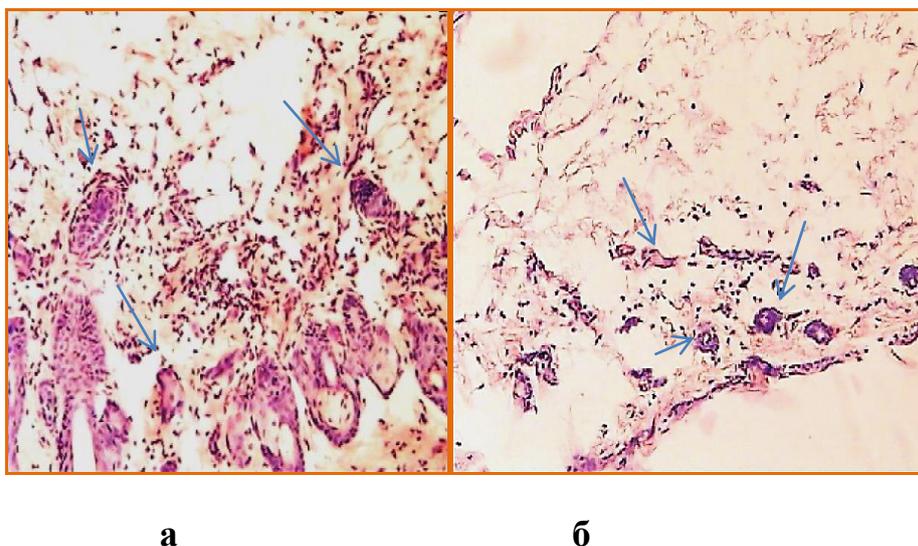


Рис. 25. Морфологические изменения в тканях уха крыс после индуцированного ксилолом воспаления в контроле (а) и при предварительном введении мицелиального экстракта гриба *Pleurotus ostreatus* (б).

На рис. 25 а представлен срез ткани воспаленного уха, индуцированного ксилолом, который исследовался через час у контрольной крысы. В срезах воспаленных тканей контрольных крыс в основном наблюдались очаговые инфильтраты (рис. 25 а). В ткани воспаленного уха опытных крыс, которым предварительно была проведена внутрибрюшинная инъекция экстракта мицелиальной культуры гриба вешенки обыкновенной в дозе 5 мг/кг (ткань на фоне воспаления, индуцированного ксилолом через 1 час), также

обнаруживаются диффузные клеточные инфильтраты, которые в основном очень разбросаны (рис. 25 б), в отличие от воспаленных тканей уха у контрольной группы крыс (рис. 25 а).

Как свидетельствуют данные гистологического исследования, представленного на рис. 25 б после предварительного введения экстракта отмечается наличие слабо выраженного отека уха экссудативных тканей. Различается отечная соединительная ткань дермы, где наблюдается разволокнение коллагеновых волокон (рис. 25 б).

Количество клеточных инфильтратов по сравнению с контролем меньше (рис. 25 б). На фоне разволокнения соединительной ткани наблюдается также некоторое количество лейкоцитарных и макрофагальных инфильтратов. В околососудистой ткани дермы отмечается накопление лимфомакрофагальных клеточных элементов, наблюдается гиперемия сосудов. Сосуды уже не расширены, однако все еще гиперемичны (1:100).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что экстракт гриба вешенки обыкновенной обладает выраженной противовоспалительной активностью, которая по-видимому обусловлена наличием выявленных в экстракте лигнолитических ферментативных систем (Avagyan et al., 2012; Avagyan, Minasbekyan, Nanagulyan, 2013; Авагян, 2014).

### 3.6. Антиканцерогенная активность грибных экстрактов

На сегодняшний день описаны многочисленные биологически активные полисахариды или полисахарид-белковые комплексы из лекарственных грибов, которые повышают врожденные и клеточные иммунные ответы и проявляют противоопухолевую активность у животных и человека (Li et al., 2008; Maiti et al., 2011; Patel et al., 2012; Wu et al., 2015; Chiu et al., 2015). Нами также было проведено исследование антипролиферативной активности мицелиального экстракта *P. ostreatus in vitro*, что было осуществлено при поддержке ANSEF проекта, хотя заранее не планировалось. Однако, дополнение диссертации этим разделом

добавляет весомости в пользу использования мицелиального экстракта вешенки обыкновенной в качестве фармацевтического сырья.

Стимуляция иммунной защитной системы биологически активными полимерами, входящих в состав лекарственных грибов, оказывает существенное воздействие на созревание, дифференцировку и пролиферацию многих видов иммунных клеток человека (Lull et al., 2005; Borchers et al., 2004, 2008; Chiu et al., 2015). Как сообщалось ранее (см. Глава1), многие из этих грибных полимеров имеют иммунотерапевтические свойства, облегчая ингибирование роста и разрушение опухолевых клеток. Стимулирование и модуляция ключевых иммунных реакций человека, вызываемая этими грибными полимерами является значительной, в то время как механизм их противоопухолевого воздействия до сих пор не до конца изучен (Choi et al., 2004; Borchers et al., 2008; Venkatakrisnana et al., 2010; Wasser, 2011; Maiti et al., 2011; Patel et al., 2012; Cheng, Sliva, 2015, Feitelson et al., 2015).

В человеческом организме за противоопухолевый иммунный отвечают три вида клеток: макрофаги, натуральные киллеры (НК-клетки) и цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ). У онкологических пациентов все три вида клеток находятся в угнетённом состоянии, жизненный срок этих клеток мал, а главное - их противоопухолевая активность находится на низком уровне. По всей вероятности, сочетание этих факторов и приводит к разрушению противоопухолевого щита организма (Cheng, Sliva, 2015, Feitelson et al., 2015).

Основным иммуномодулирующим воздействием биологически активных компонентов грибов является митогенность и активация иммунных эффекторных клеток, таких как: лимфоцитов, макрофагов и НК-клетки, Т-клетки и синтезируемых ими цитокинов (Borchers et al., 2008). Терапевтическое воздействие грибов – антиканцерогенная активность, подавление аутоиммунных заболеваний и аллергия ассоциируются с их иммуномодулирующим воздействием (Lull et al., 2005; Maiti et al., 2011; Wu et al., 2011).

Терапевтическое воздействие грибов – антиканцерогенная активность, подавление аутоиммунных заболеваний и аллергия ассоциируются с их иммуномодулирующим

воздействием (Lull et al., 2005; Maiti et al., 2011; Wu et al., 2011). Морфологические изменения ядер в клетке, связанные с потерей дифференциации, коррелируют с неопластическим преобразованием тканей. Трансформированные клетки обычно характеризуются анеуплоидными ядрами, которые обладают высокой степенью изменчивости по размеру и форме, увеличением числа увеличенных ядрышек (Buhmeida et al., 2000; Derenzini et al., 2000).

Экспрессия белков в зонах ядрышковых организаторов связана с рядом специализированных особенностей трансформированных клеток: метаболической активностью, содержанием ДНК, степенью гистологической дифференцировки и, особенно, скоростью клеточной пролиферации. Как показано некоторыми исследователями, прирост тканевого пролиферативного индекса может быть показателем ранней геномной нестабильности, которая, со временем, будет развиваться в анеуплоидию (Gimenez et al., 2000; Karalyan et al., 2011). Пloidность ДНК также является важным показателем опухолевой трансформации (Maraki et al., 2006). Системы визуализации способны выявить ploидность ДНК и количественно определить несколько ядерных морфометрических дескрипторов, которые полезны для обнаружения уровня преобразования в клеточной популяции.

В наших исследованиях по изучению антиканцерогенной активности экстракта вешенки обыкновенной, были использованы данные о характере пролиферации и транскрипции известных линий злокачественных тканей для изучения воздействия экстракта грибной культуры на цито-фотометрические и морфометрические индексы каждой исследуемой ткани.

Ниже приведены количественные данные исследования клеточных культур (табл.7), демонстрирующих переменное увеличение количества клеток на единицу площади поверхности монослоя для контрольных культур и в культурах тканей, обработанных экстрактами культуры гриба *P.ostreatus*.

Таблица 7.

Изменение пролиферативной способности культуры разных типов онкологических тканей\*  
под воздействием экстракта культуры гриба *P.ostreatus*.

время инкуба ции Типы онкоткани	Количество клеток на 0.01 мм <sup>2</sup>		Митозы			
			контроль		обработаны экстрактом	
	48	72	48	72	48	72
RD	12.5 ± 0.6	12.9 ± 1.0	1.8 ± 0.02	3.3 ± 0.02	0.6 ± 0.03	0.01 ± 0.001
HeLa	33.8 ± 0.8	24.0 ± 0.9	1.82 ± 0.02	0.91 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0
HEp-2	14.1 ± 0.3	18.3 ± 0.4	4.7 ± 0.03	3.3 ± 0.06	1.1 ± 0.01	0
HEpG-2	28.4 ± 1.2	28.1 ± 1.8	2.8 ± 0.02	1.2 ± 0.03	0.9 ± 0.08	0
HEK293	23.4 ± 0.6	21.9 ± 0.5	3.6 ± 0.04	2.4 ± 0.04	2.0 ± 0.06	0.1 ± 0.001

\*RD – эмбриональная рабдомиосаркома, HeLa –эпителиальные клетки рака шейки матки,  
HEp-2 – карцинома гортани, HEpG-2 – гепатокарцинома, HEK293 – гепатокарцинома.

Как свидетельствуют наши данные, экстракты культуры гриба *P.ostreatus* достаточно чувствительно подавляют рост культуры опухолевых тканей человека: оказывают подавляющее воздействие уже на 48-й час культивирования и почти полностью подавляли митотическую активность всех исследованных опухолевых культур человека к 3-им суткам (табл.7).

Как известно, грибы уже давно привлекают интерес исследователей, поскольку могут и уже применяются как БАД и добавки в продуктах питания (в качестве добавок в чай, кофе, майонез), так и в качестве биофармацевтических препаратов (Tan et al., 2011; Thyagarajan et al., 2007; Jiang et al., 2015). О фармацевтических свойствах вешенки – *P. ostreatus* известно мало, и за последние два десятилетия проведено небольшое количество исследований, обобщенных в обзорах (Maiti et al., 2011; Patel et al., 2012), в то время как другим грибам, таким как: трутовик лакированный, шиитаке, майтаке и чага посвящены множество исследований по выяснению возможных функциональных свойств, которые могли бы оказаться эффективными в лечении заболеваний (Lull et al., 2005; Chan et al., 2008; Joseph et al., 2009; Wu et al., 2011; Cheng, Sliva, 2015; Jiang et al., 2015).

В отличие от других дереворазрушающих и исследуемых нами грибов-трутовика лакированного и шиитаке, в вешенке отмечено высокое содержание белков, витаминов и минералов, низкое содержание углеводов и сахаров, и практически отсутствует холестерол (Wasser, Weis, 1999), поэтому высокие терапевтические свойства, которые нами получены в этой работе, мы интерпретируем не только содержанием полисахаридов, а в первую очередь белков и ферментов-лигнолитиков. В последних работах некоторых исследований отмечается также, что возможно терапевтические свойства грибов обусловлены не присутствием полисахаридов и тритерпенов, а содержанием гликопротеидов (Lin et al., 2010; Saltarelli et al., 2015).

Помимо антипролиферативного действия, как наблюдалось в наших экспериментах, экстракты вешенки воздействовали на мембраны клеток онкологических культур приводя к

кластогенезу клеток, что возможно благодаря активному действию перфоринов, цитолитически воздействующих на мембраны онкологических клеток (Hersperger et al., 2008).

Тест на степень соответствия токсичности микроядер определялся корректно: это критическая точка мульти-целевой генотоксичности, где оценивается не только кластогенные, но и негенетические события, а также некоторые эпигенетические эффекты, что является очень точным методом, применимым для различных типов клеток (Karalyan et al., 2011; Lu et al, 2009). Кроме того, он позволяет прогнозировать развитие рака, поддается автоматизации и позволяет хорошо экстраполировать в рамках для потенциальных воздействий или порогов, и легко измеряется в экспериментальных как *in vitro*, так и *in vivo* системах (Kirsch-Volders et al., 2011).

Существуют индексы, которые могут обеспечить нас информацией о воздействии на геном или на мембрану клеток. Мутагенность мы оценивали по частоте хромосомных aberrаций, данные не представлены, поскольку почти все препараты не оказали достаточно ощутимой чувствительности, для определения количественных изменений. Однако, по представленным снимкам видно (Рис. 26), как в ядре клеток, обработанных экстрактом вешенки обыкновенной (рис. 26 б) образуются кластеры в виде сгущения хромосом - относительно HeLa клеток, не обработанных экстрактом (а), наблюдалась компактизация хроматина в виде островков – кластогенез, образование aberrаций хромосом под действием кластогенов.

Помимо антипролиферативного действия, как наблюдалось в наших экспериментах, экстракты вешенки воздействовали на мембраны клеток онкологических культур приводя к кластогенезу клеток, что возможно благодаря активному действию перфоринов, цитолитически воздействующих на мембраны онкологических клеток Сочетание таких ответов на воздействие грибных экстрактов, во взаимосвязи с различными подмножествами клеток организма может обеспечить более сильное ингибирование опухоли, чем можно было

бы ожидать от воздействия только одним полисахаридом, что согласуется также с литературными данными (Borchers et al., 2008; Lull et al., 2005).

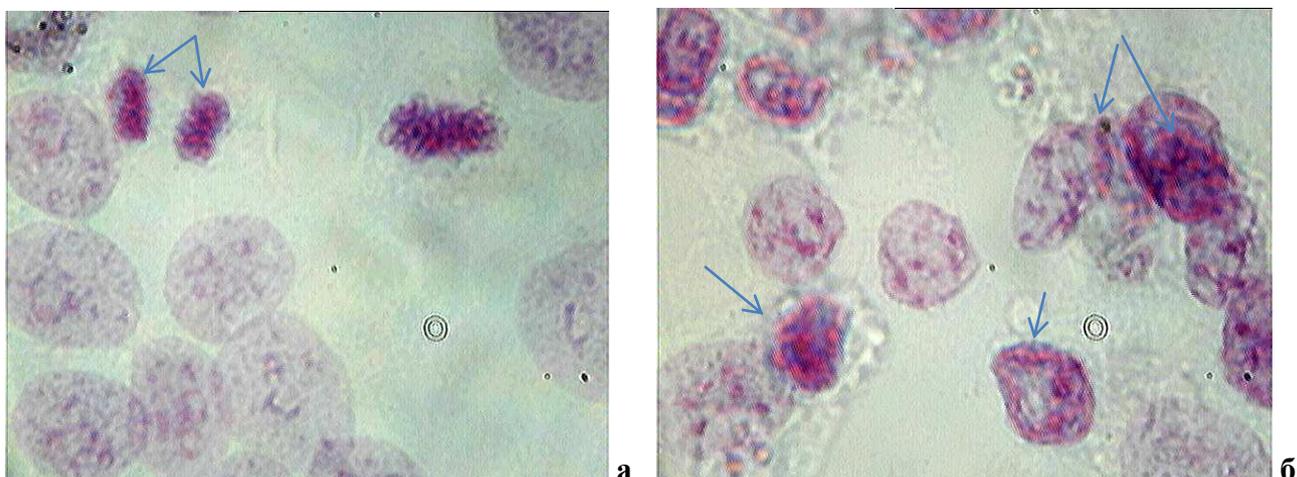


Рис. 26. Контрольный препарат HeLa клеток (**а**), где видна митотическая клетка в фазе разделения и (**б**) –онкологическая ткань HeLa клеток, обработанных внутриклеточным экстрактом культуры гриба вешенки обыкновенной.

Наши данные подтверждают предположение о том, что водные экстракты вешенки могут воздействовать как ингибиторы пролиферации некоторых типов культур тканей опухолевых клеток *in vitro* и поэтому, возможно, являются потенциальными натуральными агентами индуцирующими апоптоз опухолевых клеток (см. Табл.8).

Учитывая тот факт, что вешенка обыкновенная содержит полисахариды в малых количествах по сравнению с шиитаке и трютовиком, по видимому, здесь имеется активная фракция белков и витаминов, которые могут оказывать антипролиферативное воздействие, и, возможно, как промежуточное вещество синтезируются активные формы кислорода, которые могут оказывать на чужеродные клетки цитотоксический эффект, так как клетки вешенки обыкновенной содержат огромное количество антиоксидантов, в том числе

универсальные пероксидазы широкого профиля (Ferreira et al., 2010; Минасбемян и др., 2010; Fernandez –Fueyo et al., 2014; Saltarelli et al., 2015).

### 3.7. Определение фракций и аминокислотного состава белков мицелиальных экстрактов вешенки обыкновенной.

Поскольку при сравнительном исследовании противовоспалительной активности мицелиальных экстрактов трех дереворазрушающих грибов было выявлено наиболее сильное воздействие вешенки, а также усиление этого воздействия под действием мм-волн частотой 50.3 ГГц, 40 мин, нашей задачей было выявить какой белок или фракция белка при соответствующих частотах изменяется.

Как было отмечено, открытие и идентификация новых лекарственных средств, не оказывающих побочные действия, является главной задачей биомедицинских исследований. Грибы содержат огромный и пока неиспользованный источник мощных новых фармацевтических продуктов. В частности, и что наиболее важно для современной медицины, они представляют собой неограниченный источник соединений с потенциальными противоопухолевыми и иммуностимулирующими свойствами (Wasser, 2002; Choi et al., 2004), как соединений с низкой молекулярной массой (например хиноны, цереброзиды, изофлавоны, катехины, амины, триглицериды, сесквитерпены, стероиды, органический германий и селен), так и с высокой молекулярной массой, например: гомо и гетерополисахариды, гликопротеины, гликопептиды, протеины, РНК-белковые комплексы (Ferreira et al., 2010).

Как показывают исследования плодовые тела вешенки обыкновенной обладают более высокой концентрацией антиоксидантов по сравнению с другими коммерческими грибами (Mau et al., 2002; Yang et al., 2002), и мощной антиоксидантной активностью (Venkatakrishtna et al., 2010). В то же время известно, что активные формы кислорода это такие радикалы, как супероксид ( $\bullet\text{OO}^-$ ), нитроксид ( $\bullet\text{NO}$ ), убихинон ( $\bullet\text{Q}$ ), гидроксила ( $\bullet\text{OH}$ ). Формирование свободных радикалов—важный защитный механизм, лежащий в основе неспецифического

иммунитета, но с другой стороны АФК являются основой патогенеза многих патологических процессов, обладают антигенными свойствами, запускают аутоиммунные процессы повреждения тканей (Нагорная, 2010; Гудков, 2012). Во многих обзорах обсуждается роль того или иного соединения из различных грибов в антиканцерогенной активности (Sarangi et al., 2006; Gu et al., 2006; Li et al., 2008; Wasser, 2011; Wu et al., 2011; Maiti et al., 2011; Patel et al., 2012). Как нами и предполагалось, именно высокая антиоксидантная активность вешенки коррелировала с более эффективной противовоспалительной активностью, по отношению к трутовику лакированному и шиитаке, и именно она способна осуществлять антиканцерогенное воздействие экстракта на клетки опухолевых тканей (Avagyan, Minasbekyan, Nanagulyan, 2013a).

По полученным данным, экстракт культуры гриба вешенки обыкновенной, обработанный мм-волнами при частоте 50.3 ГГц подавляет воспалительный процесс на 87.5% в течение 1-2 часов, причем обработка этой частотой соответствует наиболее высокой антиоксидантной – пероксидазной активности (Авагян и др., 2011, Avagyan et al., 2013 a, b). Согласно предположению Вирхова, препараты обладающие высокой противовоспалительной активностью должны иметь также антиканцерогенное воздействие (Balkwill, Mantovani, 2001). Как свидетельствуют данные наших исследований на клетках культур опухолевых тканей, это предположение подтвердилось в случае экстрактов вешенки обыкновенной.

Для выявления количественных изменений в отдельных фракциях белка нами было проведено электрофоретическое разделение тотального белка экстрактов из контрольной и облученных культур гриба вешенки в ПААГ. Электрофоретическое разделение показало, что облучение приводит к изменению как числа, так и количественного содержания отдельных фракций. В контрольном экстракте визуализировано было 8 основных фракций белков с молекулярными массами в 90, 76, 58, 40, 26, 18, 13 и 12 кДа.

Как видно на рис. 27, облучение культуры гриба КВЧ ЭМИ частотой 45 ГГц длительностью экспозиции 20 мин приводит к уменьшению числа фракций по сравнению с

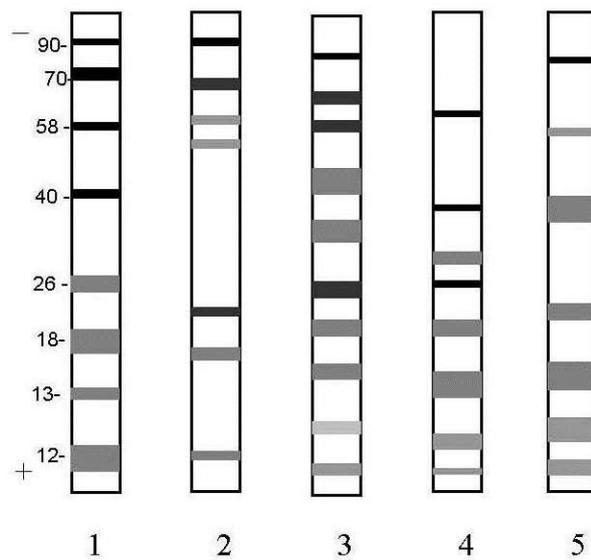


Рис. 27. Схематическое изображение электрофоретического разделения тотального белка в контрольных (1) и обработанных мм-волнами ЭМИ (2 – 45 ГГц, 20 мин; 3 – 49 ГГц 20 мин; 4 – 50.3 ГГц, 20 мин; 5 – 50.3 ГГц, 40 мин) экстрактах культуры гриба *Pleurotus ostreatus*.

контролем. Исчезла одна быстро-мигрирующая фракция, а также уменьшилась интенсивность окрашивания отдельных полос (рис. 27), что может свидетельствовать о подавлении синтеза белка в облученных культурах при этих частотах, что отмечалось в результатах исследований по количественному определению белков (рис.14 а) (Минасбекян и др, 2010; Авагян и др., 2011). При облучении частотой 50.3 ГГц длительностью 20 мин изменения количества фракций не наблюдается (рис. 27), однако увеличивается подвижность медленно мигрирующих и уменьшается интенсивность окрашивания отдельных фракций, что также согласуется с данными по изменению количества тотального белка, представленных на диаграмме (см. рис. 14). Анализ полученных данных по изменению содержания белка и электрофоретического разделения тотального белка свидетельствует о корреляции между количеством белка в культуре и числом фракций (Минасбекян и др., 2010).

Надо также отметить, что данные исследований авторов (Wu et al., 2011) по количественному и качественному изучению белковых экстрактов *Pleurotus ostreatus* и их антиканцерогенной активности соответствует нашим данным в контрольном экстракте по количеству и молекулярным массам белковых электрофоретических фракций в ПААГ (Минасбекян и др, 2010). Как известно молекулярные масса полифункциональных пероксидаз соответствует 42-45 кДа, а МнП – 38-62.5 кДа, в зависимости от вида гриба (Куликова и др., 2011).

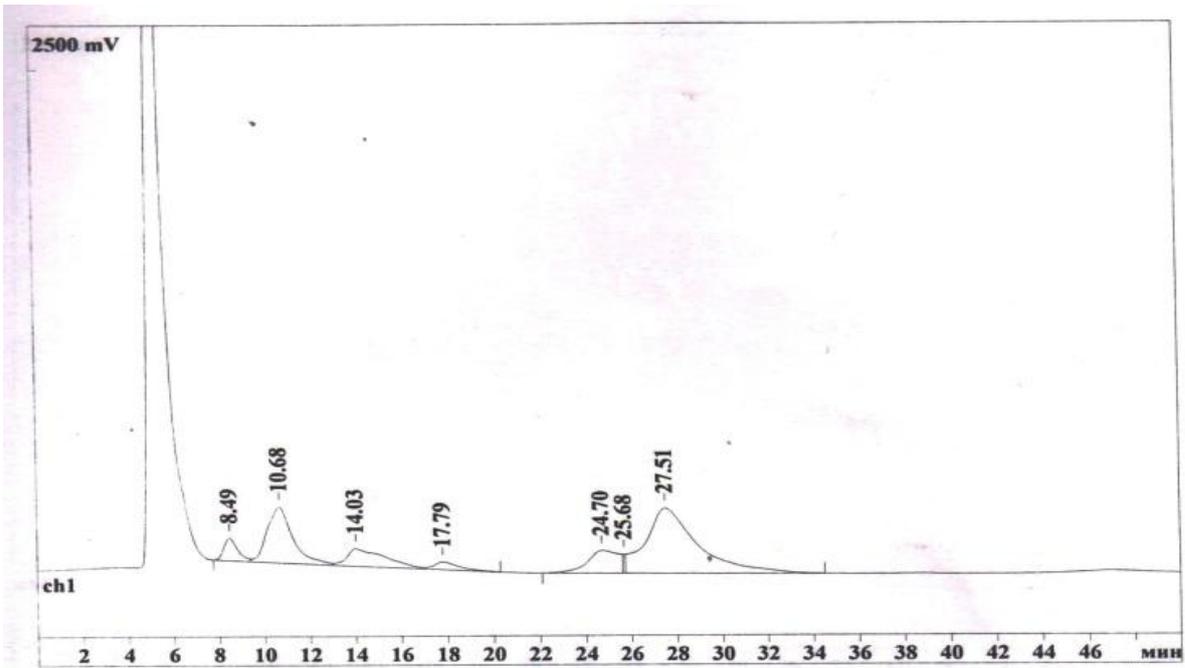
Данные свидетельствуют, что быстро-мигрирующие, высокоподвижные фракции увеличиваются. Нами предполагается, что фракции соответствующие молекулярным массам в 40 КДа и 13 КДа могут быть ответственны за противовоспалительную и противоопухолевую активности, так как именно эти фракции повышаются при обработке частотой 50,3 ГГц, которой соответствует наиболее высокая противовоспалительная активность (Avagyan, Minasbekyan, Nanagulyan, 2013; Avagyan Zhamgaryan, Nanagulyan, 2013; Минасбекян и др., 2010, Авагян, 2014).

Далее был проведен анализ аминокислотного состава кислоторастворимых белков в экстракте культуры гриба, обработанных этой частотой с применением высокоразрешающей жидкостной хроматографии (HPLC). Судя по данным хроматограмм (рис. 28, 29), в экстракте гриба присутствуют в большом количестве аспарагиновая и глутаминовая кислоты, глицин и другие аминокислоты, о чем свидетельствуют данные, суммированные в таблице 8.

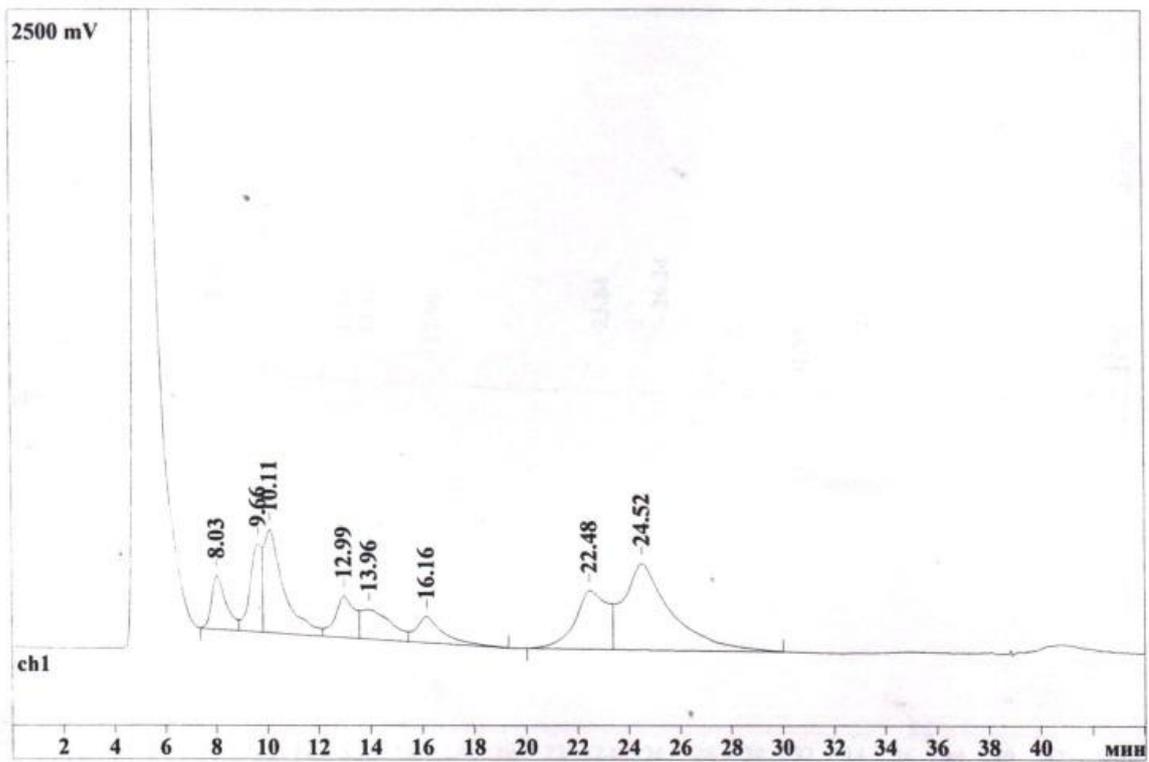
Таблица 8.

Аминокислотный состав кислоторастворимых белков экстракта гриба  
*P. ostreatus*, в мг/мл

Аминокислоты	Контроль	Обработанные	
		50.3 ГГц 40'	50.3 ГГц 20'
Аспарагин.к-та	0.04	0.08	0.11
Глутамин. к-та	0.01	0.15	0.25
Глицин	0.01	0.02	0.02
Аланин	0.05	0.09	0.1
Гомосерин	0.1	0.1	0.1

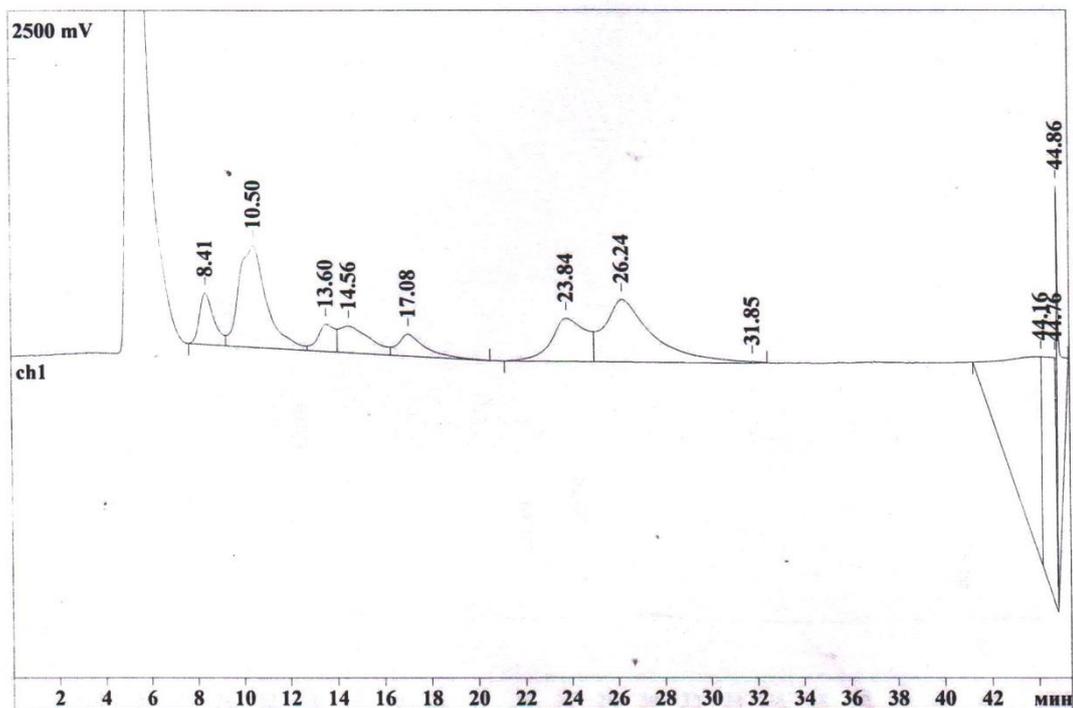


а

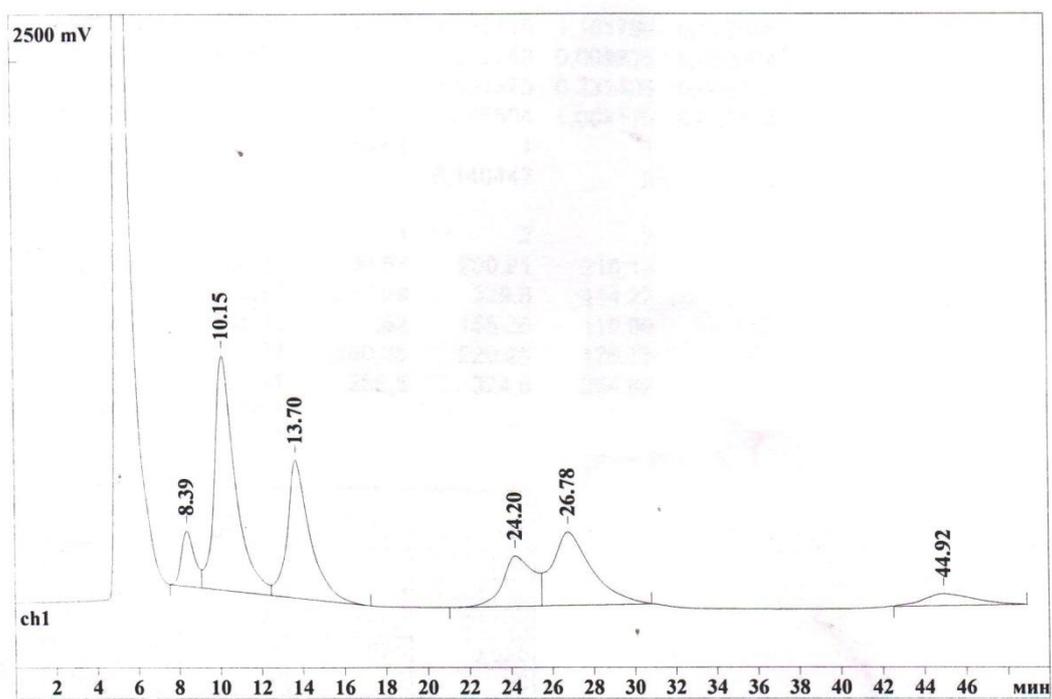


б

Рис. 28. Хроматограммы мицелиальных экстрактов контрольной (а) и обработанной мм-волнами (б) культуры *Pleurotus ostreatus*.



а



б

Рис. 29. Хроматограммы мицелиальных экстрактов, выделенных из культур *Pleurotus ostreatus*, обработанных мм-волнами (а, б).

Поскольку наиболее интересные данные в предыдущих исследованиях были получены при обработке культуры вешенки обыкновенной мм-волнами частотой в 50.3 ГГц, то, соответственно, нами определен аминокислотный состав экстрактов из культур гриба, обработанных именно этой частотой длительностью 20 мин и 40 мин. Поскольку нами в Главе 1 было указано на особую роль глутаминовой кислоты в составе полифункциональных пероксидаз (ПП), то увеличение ее содержания может указывать на возрастание количества ПП в содержании экстракта под действием мм-волн.

Как свидетельствуют данные таблицы 8, в экстрактах из обработанных культур гриба наблюдаются значительное повышение глутамата×25 (или глутаминовой аминокислоты), количество гомосерина остается неизменным, а количество аспартата, глицина и аланина увеличивается в два раза (Avagyan et al., 2012). Свободная глутаминовая кислота (ГК) в виде моносульфата глутамата наиболее широко применяется в качестве добавки к пище для усиления вкуса. Глутаминовая кислота является также основным возбуждающим нейротрансмиттером в ЦНС млекопитающих. Она вовлечена в многочисленное число нейрональных и глиальных процессов. Благодаря действию глутамат-дегидрогеназы глутамат конвертируется в гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК) (Lee et al., 2013). В дополнение к признанной роли этого медиатора в головном мозге, в высших когнитивных процессах обучения и запоминания, можно также отметить участие этого лиганда в качестве нейротоксического агента в развитии многих нейродегенеративных заболеваний. Некоторые работы отмечают индуцируемую ГК хемотаксис нейтрофилов и ранозаживляющую активность (Gupta et al., 2009). Глутамат может активировать фосфолипазу C (PLC), что приводит к образованию инозитолфосфата и диацилглицерола в нейронах, как это происходит при активации некоторых рецепторов, сопряженных с G-белками.

Данные, представленные в таблице 8, свидетельствуют о значительных изменениях в аминокислотном составе белковых экстрактов вешенки обыкновенной. Значительность этих изменений увеличивается еще и потому, что в человеческом организме глутаминовая

кислота обнаружена в ЦНС повсюду, весьма вероятно, что она не только является предшественником гамма-аминомасляной кислоты (Lee et al., 2013), но, кроме того, сама действует как медиатор.

Обработка мм-волнами культуры гриба вешенки обыкновенной частотой в 50.3 ГГц в течение 20 мин приводит к повышению пексидазной активности в три раза по отношению к контролю (рис 18); к повышению противовоспалительной активности экстракта (рис. 24); к возрастанию определенных фракций белка (рис.27, 4) и увеличению глютаминовой кислоты в составе белков в 25 раз, как свидетельствуют данные, представленные на диаграмме (рис. 30). На рисунке 30 видно, что обработка культуры вешенки обыкновенной мм-волнами при обеих экспозициях приводит к увеличению аминокислот – аспарагиновой к-ты, глютаминовой к-ты, глицина и аланина.

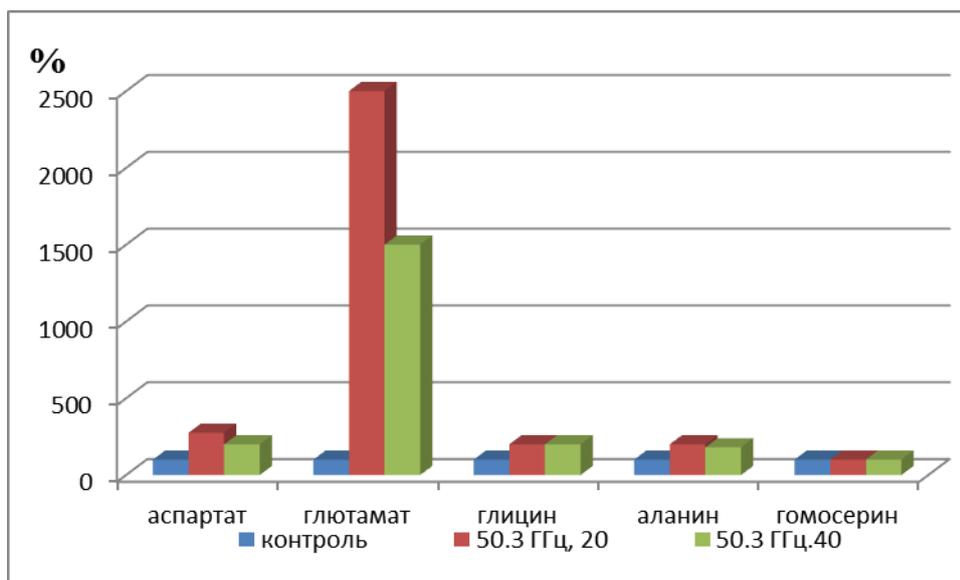


Рис. 30. Аминокислотный состав кислоторастворимых белков экстракта вешенки обыкновенной в контроле и после обработки культуры гриба мм-волнами, выраженные в % относительно контроля, принятого за 100%.

Однако, содержание гомосерина в составе белков остается неизменным. Надо отметить, что аспарагиновая и глутаминовая кислота являются ключевыми аминокислотами в составе обеих активных центров универсальной пероксидазы (см. Глава 1, стр.23) и наши данные, таким образом, подтверждают нашу гипотезу о важной роли универсальных пероксидаз в проявлении терапевтических свойств вешенки обыкновенной, что еще более усиливается посредством воздействия мм-волн в течение роста культуры гриба.

Таким образом, из полученных данных следует, что водные экстракты вешенки обыкновенной богаты белками, в составе которых находится глутаминовая кислота. При воздействии мм-волн на культуру гриба вешенки обыкновенной происходит, по всей вероятности, перекисное окисление липидов, образование нанокolicеств перекисей и других активных форм кислорода, что вызывает активацию ферментов антиоксидантной защитной системы организма – пероксидаз. Повышение активности пероксидаз, в свою очередь, приводит к расщеплению лигнина с выбросом фенилпропаноидов и полифенолов, играющих важную ключевую роль в иммунномодулирующем воздействии внутриклеточных белковых экстрактов грибов, особенно в экстрактах культур вешенки обыкновенной. В результате комплекс белков и ферментов в экстракте вешенки обыкновенной, обогащенный аминокислотами-нейромодуляторами становится мощным средством в борьбе против неопластических преобразований в клетках человека (Avagyan et al., 2013, Авагян, 2014).

Основываясь на полученных данных, можно рекомендовать использование изученных дереворазрушающих грибов не только в качестве биологически активных добавок, но и разработать лекарственные препараты для инъекций на основе обработанных мм-волнами мицелиальных культур вешенки обыкновенной, с целью лечения воспалительных процессов и неопластических изменений клеток человеческого организма.

## ВЫВОДЫ

1. Показано, что при модуляции условий роста мицелиальных культур грибов *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Ganoderma lucidum* КВЧ ЭМИ изменяется метаболическая активность. Изменяется скорость роста культур грибов, ростовой коэффициент, отмечается прирост биомассы и наблюдаются изменения в формировании плодового тела.
2. Получены данные о содержании белка и ферментативной активности культуры гриба *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* и *Ganoderma lucidum*. Отмечаются разнонаправленные изменения в содержании белка и ферментативной активности в мицелиальных экстрактах грибов под воздействием мм-волн. Отмечено увеличение количества белка в мицелиальных экстрактах в 1.5-2 раза при определенных частотах КВЧ ЭМИ.
3. Под воздействием обработки мм-волнами культуры гриба *P. ostreatus* наблюдались изменения в активности эндолитических ферментов лигнолитической системы – гибридных пероксидаз: активность возрастала в 3 раза по сравнению с контролем при обработках мм-волнами с частотой 50.3 ГГц в течение 40 мин. Обнаружена обратная корреляция между содержанием белка и активностью пероксидаз, что подтвердилось и на культурах грибов *Lentinula edodes* и *Ganoderma lucidum*. Отмечено, что облучение грибных культур *P. ostreatus* и *L. edodes* мм-волнами приводит к возрастанию активности фермента  $\beta$ -глюкозидазы в 2 раза.
4. Обнаружено возрастание противовоспалительной активности экстрактов 3-х видов изученных грибов при предварительной обработке мицелиальных культур КВЧ ЭМИ. Наибольшее подавление воспалительного процесса коррелирует с максимальной активностью пероксидазы, а не  $\beta$ -глюкозидазы в культурах гриба вешенки обыкновенной. Данные гистологических исследований также подтверждают эффективное противовоспалительное действие экстракта культуры *P. ostreatus* на острый воспалительный процесс уха крыс.

5. Получены данные по подавлению пролиферации культур некоторых канцерогенных тканей на вторые сутки после обработки их экстрактом гриба вешенки обыкновенной.
6. Анализ полученных данных по изменению содержания белка и электрофоретическому разделению тотального белка в экстрактах из облученных мицелиальных культур *P. ostreatus* свидетельствуют о четкой корреляции между увеличением количества белка в культуре и увеличением числа быстромигрирующих высокоподвижных фракций.
7. Получено возрастание глютаминовой кислоты в 25 раз в составе кислоторастворимых белков экстрактов культуры гриба вешенки обыкновенной под воздействием обработки культуры гриба КВЧ ЭМИ.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

БАД – биологически активные добавки

КВЧ – крайне высокие частоты

ЛиП (LiP)– лигнин пероксидаза

МнП – марганец пероксидаза

НК – клетки – клетки натуральных киллеров

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

ПО – пероксидаза

ПП- полифункциональная пероксидаза

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РНаза – рибонуклеаза

УП– универсальная пероксидаза

ЭМИ – электромагнитное излучение

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ավագյան Ի.Ա. Բնափայտ քայքայող սնկի՝ *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. ֆերմենտային համակարգի ուսումնասիրությունը // Միջ. ուսանողական կենսաբանական գիտածոյով. – Երևան. – 2009. – Էջ 19:
2. Авагян И.А., Минасбемян Л.А., Нанагулян С.Г. Возрастание активности β-глюкозидазы культуры *Pl.ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. в ответ на стрессовое воздействие // 13-я Пущинская межд. школа-конференция молодых ученых. – “Биология – наука XXI века”. – Пущино (Россия). – Сентябрь, 2009. – С.155.
3. Авагян И.А., Нанагулян С.Г., Баласанян М.Г., Жамгарян А.Г., Григорян С.А. Противовоспалительная активность экстракта из культуры гриба *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. // 13-я Пущинская межд. школа-конференция молодых ученых. – “Биология –наука XXI века”. – Пущино (Россия). – Сентябрь, 2009. – С.155-156.
4. Авагян И.А., Нанагулян С.Г., Баласанян М.Г., Жамгарян А.Г. Противовоспалительная активность экстракта культуры гриба *Pleurotus ostreatus* // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – №1.– С. 236.
5. Авагян И.А., Неркарарян А.В., Минасбемян Л.А., Нанагулян С.Г. Изменение метаболической активности культуры *Pleurotus ostreatus* под воздействием электромагнитных излучений // Микология и фитопатология.– 2011.– Т. 45, №6. – С.541-547.
6. Авагян И.А. Возможности применения грибных экстрактов в терапевтических целях // Фарма. – 2014. – № 9. – С. 100-104.
7. Айзенштадт М.А., Боголицын К.Г. Пероксидазное окисление лигнина и его модельных соединений // Химия растительного сырья.– 2009.– №2. – С. 5-18.
8. Алехина Н.Д., Балнокин Ю.В., Гавриленко В.Ф и др. Физиология растений. М.: Академия. – 2005. – 640с.

9. Бадалян С.М. Основные группы и терапевтическая значимость биоактивных метаболитов, образуемых макромицетами // Проблемы мед. микологии. – 2001. – Т. 3, №1. – С. 16-23.
10. Бецкий О.В. Миллиметровые волны в биологии и медицине // Радиотехника и электроника. – 1993. – Т. 38, №10. – С. 1760-1781.
11. Бецкий О.В., Девятков Н.Д. Электромагнитные миллиметровые волны и живые организмы // Биомедицинская радиоэлектроника. Радиотехника. – 1996. – №3. – С. 4-11.
12. Бисько Н.А. Микрофлора субстрата *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. в частично замкнутой искусственной экосистеме // Микология и фитопатология. – 2011. – Т. 30, № 5-6.– С. 7-12.
13. Болобова А.В., Аскадский А.А., Кондращенко В.И., Рабинович М.Л. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов.– Ферменты, модели, процессы. М.: Наука, 2002.– Т. 2 – 343 с.
14. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии. – 1985. – Т. 54, № 9. – С. 1540–1558.
15. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – Киев: Наукова думка, 1988. – 144 с.
16. Бухало А.С., Бабицкая В.Г., Бисько Н.А., Вассер С.П., Дудка И.А., Митропольская Н.Ю., Михайлова О.Б., Негрейко А.М., Поединок Н.Л., Соломко Э.Ф. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре // Сборник научных трудов в двух томах. Т. 1 / Под ред. чл.-корр. НАН Украины С.П. Вассера.– Киев: Альтерпресс. – 2011.– 212 с.
17. Вишневский М.В. Лекарственные грибы. Большая энциклопедия. – Москва: ЭКСМО, 2014. – 400 с.
18. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука. – 1972. – 252с.

19. Газарян И.Г., Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. – 2006. – Т.46. – С. 303-322.
20. Гарибова Л.В., Лекомцева С.Н. Основы микологии: Морфология и систематика грибов и грибоподобных организмов. – М.: Товарищество научных изданий КМК.– 2005. – 224 с.
21. Гарибова Л.В., Сидорова И.И. Грибы. Энциклопедия природы – М.: АВФ. – 1997. – 352с.
22. Гелес И.С. Древесное сырье – стратегическая основа и резерв цивилизации. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. – 2007. – 499 с.
23. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. – М.: Мир. – 2002. – 589 с.
24. Гудков С.В. Механизмы образования активных форм кислорода под влиянием физических факторов и их генотоксическое действие // Автореф. дисс. ... д.б.н. – Пушино – 2012. – 36 с.
25. Давыдова Г.Ф., Ермаков О.А., Панасенко А.И., Тищенко А.М. Лекарственные препараты из растительного сырья. Пероксидаза // Химия растительного сырья.– 1998. – Т. 2, №1.– С. 15-18.
26. Даниляк Н.И., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г., Трутнева И.А. Ферментные системы высших базидиомицетов. – Киев.: Наукова думка. – 1989. – 280 с.
27. Девятков Х.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. – М.: Радио и связь. – 1991. – 149 с.
28. Диденко Н.П., Зеленцов В.Т., Ча В.А. О конформационных изменениях биомолекул при взаимодействии с электромагнитным излучением. Эффекты нетеплового воздействия миллиметрового излучения на биологические объекты. – М.: ИРЭ АН СССР. – 1983. – С. 63–77.

29. Дудка И.А., Вассер С.П. Грибы. Справочник миколога и грибника. – Киев: Наукова думка. – 1987. – 536 с.
30. Жамгарян А.Г. Противовоспалительная активность экстракта семян лоха узколистного // Медицинская наука Армении. – Ереван. – 2006.– Т. XLVI, №4. – С. 41-44.
31. Капич А.Н. Сопряжение перекисного окисления липидов с деградацией лигнина у доразрушающих базидиомицетов // Сборник научных трудов «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». – Минск.– 2011.– Т.3.– С. 316-335.
32. Киселева А.Ф., Житников А.Н., Кейсевич Л.В. Морфофункциональные методы исследования в норме и патологии. – Киев: Наукова думка. – 1982. – 161 с.
33. Комарова А.С., Лихачева А.А., Лапыгина Е.В., Максимова И.А., Поздняков А.И. Влияние электромагнитных микроволн на прорастание спор *Streptomyces xanthochromogenes* в торфяной почве и в жидкой питательной среде // Почвоведение.– 2010. – №1. – С. 83-86.
34. Копыльцов С.В. Создание исходного материала для селекции гибридных штаммов *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. на основе метода отбора гаплотипов с повышенной активностью лакказ // Автореф. дисс. ...к.б.н. – Краснодар. – 2009. – 26 с.
35. Кукес В.Г. Фитотерапия с основами клинической фармакологии. – М.: Медицина.– 1999. – 192 с.
36. Куликова Н.А., Кляйн О.И., Степанова Е.В., Королёва О.В. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47, № 6. – С. 619–634.
37. Лукаткин А.С., Ручин А.Б., Силаев Т.Б. Биология с основами экологии. – М.: Академия. – 2008. – 398 с.
38. Лукьянов Л.В. Взаимодействие физических и биологических объектов с электромагнитным излучением КВЧ-диапазона // Биомедицинская радиоэлектроника.– 2001.–Т.5.

– С. 256-257.

39. Лукьянов А.А. Влияние СВЧ- и КВЧ-излучения на гетеротрофных и фототрофных партнеров смешанных культур микроорганизмов. – Автореф. дисс.... к. б. н. – Москва.– 2007. – 25 с.
40. Лукьянов А.А., Тамбиев А.Х. Влияние КВЧ-излучения низкой интенсивности на образование устойчивых конгломератов в смешанной культуре фототрофных и гетеротрофных микроорганизмов // Биомедицинская радиоэлектроника. – М.: Радиотехника. – 2013. – Т. 5. – С. 42-45.
41. Мелик-Хачатрян Дж.Г. Микофлора Армянской ССР. Агариковые грибы: В 7 т. – Ереван: Изд-во ЕГУ, 1980. – Т. 5. – С. 543.
42. Методы экспериментальной микологии. Справочник. – Киев: Наукова думка.– 1982. – 550 с.
43. Минасбемян Л.А., Парсаданян М.А., Гонян С.А., Вардеванян П.О. РНК-экспорт и электрокинетический потенциал ядер прорастающих зародышей злаковых // Физиология растений. – 2002. – Т. 49, №2. – С. 280-285.
44. Минасбемян Л.А., Нанагюлян С.Г., Авагян И.А. Возрастание активности  $\beta$ -глюкозидазы культуры *Pleurotus ostreatus* в ответ на стрессовое воздействие // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – №1. – С. 26-27.
45. Минасбемян Л.А., Нанагюлян С.Г., Неркарарян А.В., Авагян И.А. Изменение пероксидазной активности культуры *P. ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. в ответ на стрессовое воздействие мм-волн ЭМИ // Материалы межд. конф. “Актуальные вопросы генетики, радиобиологии и радиоэкологии”. – Дубна-Москва. – январь 2009. – С. 89.
46. Минасбемян Л.А., Неркарарян А.В., Нанагюлян С.Г., Авагян И.А. Изменение активности пероксидазы в культуре гриба *Pleurotus ostreatus* под воздействием мм-волн ЭМИ // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. – №3. – С. 47-54.

47. Михайлова О.Б., Поединок Н.Л., Дьяков М.Ю., Камзолкина О.В. Ферментативная активность новых интродуцированных штаммов базидиомицетов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2001. – №1. – С. 259-260.
48. Нагорная Н.В., Четверик Н.А. Оксидативный стресс: влияние на организм человека, методы оценки // Здоровье ребенка. – 2010. – Т.2, № 23.– С. 20-25.
49. Нанагюлян С.Г. Макромицеты республики Армения (видовая, пространственная и функциональная структура). – Дисс...д.б.н.. – Ереван. – 1997. – 325 с.
50. Нанагюлян С.Г., Таслахчян М.Г., Киракосян Н.Дж. Безотходная технология выращивания вешенки обыкновенной в Армении // сб. Наука и грибоводство: Тез. III Межд. конгресса. – Кашира. – 1996. – С. 31-32.
51. Нанагюлян С.Г., Таслахчян М.Г. Технология выращивания ценного съедобного гриба вешенки обыкновенной // Агронаука. – 1997. – Т.2, №1. – С. 32-37.
52. Нанагюлян С.Г. Шляпочные грибы Армении (Агарикоидные Базидиомицеты). – Ереван: Изд-во ЕГУ, 2008. – 121 с.
53. Нанагюлян С.Г., Неркарарян А.В., Авагян И.А., Минасбекян Л.А. Возрастание пероксидазной активности культуры *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kuntt. в ответ на стрессовое воздействие // 2-ой Съезд микологов России «Современная микология в России». – Москва. – 2008.– С. 135-136.
54. Неркарарян А.В., Парсаданян М.А., Минасбекян Л.А., Дарбинян М.Р., Калантарян В.Г., Вардеванян П.О. Влияние низкоинтенсивного нетеплового когерентного ЭМИ мм-диапазона на рост проростков // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. М.: Изд-во РУДН. – 2005. – Т.3. – 518 с.
55. Никифорова С.В., Позднякова Н.Н., Макарова О.Е., Чернышова М.П., Турковская О.В. Биоконверсия хризена грибом белой гнили *Pleurotus ostreatus* D1 // Микробиология. – 2010. – Т. 79, №4. – С. 481-485.

56. Поединок Н.Л., Бисько Н.А., Михайлова О.Б., Потемкина Ж.В., Негрийко А.М. Повышение эффективности промышленного культивирования съедобного гриба вешенки обыкновенной // Биотехнология.– 2004. – №5. – С. 64-66.
57. Полесскова Е.В., Лапко А.Г. Выделение и физико-химическая характеристика белкового компонента клеточных стенок грибов *Ganoderma lucidum* // Межд. микол. конф.– Минск. – 2006. – С. 56-60.
58. Поляков В.Ю., Кирьянов Г.И., Герасименя В.П., Орлов А.Е., Лазарева Е.М., Мурашева М.И., Ченцов Ю.С. Синергизм действия экстракта мицелия гриба *Pleurotus ostreatus* и медицинских цитостатиков на пролиферацию и апоптоз трансформированных клеток // Биологические мембраны. – 2007. – Т. 24, № 5. – С. 379-388.
59. Поцелуева М.М., Пустовидко А.В., Евтодиенко Ю.В., Храмов Р.Н., Чайлахян Л.М. Образование реактивных форм кислорода в водных растворах под действием ЭМИ КВЧ // Доклады АН РАН.– 1999. – Т. 359, № 3. – С.415-418.
60. Практикум по биохимии, под ред. Мешковой Н.П. и акад. Северина С.Е. – М.: изд. МГУ – 1979. – 429 с.
61. Пучкова Т.А., Черноок Т.В., Осадчая О.В., Иконникова Н.В., Капич А.Н. Перспективы использования новых штаммов макромицетов для создания функциональных продуктов питания // Сборник научных трудов «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». Минск: Беларуская навука. – 2011.– Т.3.– С. 284-302.
62. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И. Теоретические основы биотехнологии древесных композитов. – М.: Наука.– 2001. – Т.1.– 264 с.
63. Реброва Т.В. Воздействие электромагнитных излучений мм-диапазона на жизнеспособность организмов // Миллиметровые волны в биологии и медицине. – 1992.– Т.1.– С. 37-47.
64. Русинова Т.В. Разработка технологий биосинтеза фермента лакказы базидиальными грибами *Trametes* // Дисс. .... к. т. н – М. – 2007. – 191 с.

65. Родионова Н.А., Тиунова Н.А. Определение активности отдельных ферментов целлюлазного комплекса. – В кн.: “Ферментативное расщепление целлюлозы”. – М.: Наука. – 1967.– С. 46-57.
66. Семенкова И.Г. Фитопатология. Дереворазрушающие грибы, гнили и патологические окраски древесины (определятельные таблицы). – М.: ГОУВПОМГУЛ.– 2008. – 72 с.
67. Стороженко В.Г., Крутов В.И., Селочник Н.Н. Грибные сообщества лесных экосистем. – Петрозаводск: Карельский науч. центр РАН – 2000. – 320 с.
68. Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н. Некоторые новые представления о причинах формирования стимулирующих эффектов КВЧ–излучения // Биомедицинская радиоэлектроника. – 2000.– № 4. – С. 23-34.
69. Ферубко Е.В. Исследование фармакологических свойств сабельника болотного экстракта сухого // Автореф. дисс. ... к.м.н.– Улан-Удэ – 2009.– 21с.
70. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Источники образования свободных радикалов и их значение в биологических системах в условиях нормы // Современные наукоемкие технологии.– 2006. – № 6. – С. 28-34.
71. Явметдинов И.С. Лакказа и Мп-пероксидаза базидиомицета *Cerrena maxima*: Характеристика и роль в биосинтезе гуминоподобных веществ // Дисс. .. к.б.н. – Москва. – 2002. – 131 с.
72. Adami M., Predunte A.S., Mendes D.A., Horinouchi C.D., Cabrini D.A., Otuki M.E. Simvastatin ointment, a new treatment for skin inflammatory conditions // J. Dermatol. Sci. – 2012. – V.66, №2. – P. 127-135.
73. Alves M.J., Fereira I.C.F.R., Froufe H.J.C., Abreu P.M.V., Martins A., Pintado M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies // J. of Appl. Microbiology. – 2013. – V.115, №2. – P.346-357.
74. Avagyan I.A., Zhamgaryan A. Anti-inflammatory activity of *P.ostreatus* (Jack.:Fr.) Kumm. extracts // Proceedings of FEBS & EFIS Workshop “Inflammatory diseases and immune

- response: basic aspects, novel approaches and experimental models”. – Vienna, Austria. – September, 2010. – P.14.
75. Avagyan I.A., Minasbekyan L.A., Zhamharyan A.G., Nanagulyan S.G. Treatment of mushrooms cultures promotes antiinflammatory & immunity activity extracts // Abstract book of FEBS & EFIS Workshop “Cell biology & Pharmacology on Mendelian Disorders”. – Vico Equense, Italy. – October, 2011. – P. 32.
  76. Avagyan I.A., Minasbekyan L.A., Zhamgaryan A.G., Nanagulyan S.G. Activation mushrooms culture by EHF EMI enhanced anti-inflammatory & immunity activity of extracts // Abstract book of Elsevier conference “Colloids and Nanomedicine 2012”. – Amsterdam, The Netherlands. – July, 2012. – P. 1.4.
  77. Avagyan I., Minasbekyan L., Nanagulyan S. Study of mushroom`s intracellular extracts antiinflammatory and anticancer activity // Young scientist conf. ”New aspects in molecular biotechnology and biochemistry”. – June, 2013 a. – Yerevan, Armenia. – P.10.
  78. Avagyan I., Zhamgaryan A., Minasbekyan L. Study of protein content of mushrooms` intracellular extracts having anti-inflammatory and anticancer activity // FEBS Congress ”Mechanisms in Biology”. – St. Petersburg. – July, 2013b . – P.307.
  79. Avagyan I.A., Minasbekyan L.A., Nanagulyan S.G. Increasing of fermentative and anti-inflammatory activity of the *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. culture by modification of growth conditions by mm-waves // PIERS-2013.– Stockholm (Sweedeen). –August, 2013c. – P.1658-1660.
  80. Avagyan I.A. Modification of growth conditions by mm-waves of wood-decaying mushroom`s cultures // Biol.J.of Armenia. – 2016. – 68, № 1. – P. 64-69.
  81. Badalyan S.M. Edible and medicinal higher basidiomycetes mushrooms as a source of natural antioxidanats // Int.J.Med.Mushr. – 2003. – V.5. – P.153-162.
  82. Baden D.G., Corbet M.D. Peroxidases produced by the marine sponge *Iotrochota birotulata* // Comp. Biochem. Physiol. – 1979. – Vol. 64 B, № 3. – P. 279-283.

83. Baldrian P., Valaskova V. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi // FEMS Microbiol. Rev.– 2008. – V. 32. – P.501-521.
84. Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties // FEMS Microbiol. Rev. – 2006. – V. 30. – P. 215-242.
85. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow // The Lancet. – 2001. – V. 357. – P. 539-545.
86. Bao W., Fukushima Y., Jensenjr K., Moen M., Hammel K. Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase // FEBS Letters.– 1994.– V. 354, №3.– P. 297-300.
87. Bobek P., Nosalova V., Cerna S. Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) in diet or drinking fluid on colitis in rats // Nahrung. – 2001. – V.45. – P. 360-363.
88. Bobek P., Ozdin O., Mikus M. Dietary oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) accelerates plasma cholesterol turnover in hypercholesterolaemic rat // Physiol. Res. – 1995.– V.44, №5.– P. 287-291.
89. Borchers A.T., Krishnamurthy A., Keen C.L., Meyers F.J., Gershwin M.E. The immunobiology of mushrooms // Experimental Biology and Medicine. – 2008. – V. 233. – P. 259-276.
90. Borchers A.T., Keen C.L., Gershwin M.E. Mushrooms, tumors, and immunity: an update // Exp. Biol. Med. (Maywood). –2004. – V. 229, №5.– P. 393-406.
91. Bothast R.J., Saha B.C. Ethanol production from agricultural biomass substrates // Adv. Appl. Microbiol. – 1997. – V.44. – P. 261-286.
92. Bralley E., Greenspan Ph., Hargrove J.L., Wicker L., Hartle D.K. Topical anti-inflammatory activity of *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model of mouse ear inflammation // Journal of Inflammation. – 2008. – V.5. – P.1-12.
93. Breusengem van F., Vranova E., Dat J.F., Inze D. The role of active oxygen species in plant signal transduction // Plant Sci. – 2001. – V.161. – P.405-414.

94. Buhmeida A., Kuopio T., Collan Y. Nuclear size and shape in fine needle aspiration biopsy-samples of prostate // *Anal.Quant.Cytol.Hystol.* – 2000. – V. 22, №4. – P. 291-298.
95. Cai Y.J., Buswell J.A., Chang S.T.  $\beta$  - glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom *Volvariella volvacea* // *Enzyme Microb.Technol.*– 1998.– V. 22.– P.122-129.
96. Camarero L., Martinez M.J., Martinez A.T. A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving alpha-keto-gamma-thiomethylbutyric acid and lignin model dimers // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1999. – V. 65. – P. 916-922.
97. Chan W.K., Cheung C.C., Law H.K., Lau Y.L., Chan G.C. *Ganoderma lucidum* polysaccharides can induce human monocytic leukemia cells into dendritic cells with immuno-stimulatory function // *J. Hematol. Oncol.* – 2008. – July 21 – V. 1 – P. 9-25.
98. Chang S.T., Wasser S.P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health // *Int. J. Med. Mushrooms.* – 2011. – V.14, №2. – P. 95-134.
99. Cheng S., Sliva D. *Ganoderma lucidum* for cancer treatment: we are close but still not there // *Integr. Cancer Ther.* – 2015. – V.14, №3. – P. 249-257.
100. Chisti Y. Biodiesel from microalgae // *Biotechnol. Adv.* – 2007. – V. 25 – P. 294-306.
101. Chiu L.Y., Hu M.E., Yang T.Y., Hsin I.L., Ko J.L., Tsai K.J., Sheu G.T. Immunomodulatory protein from *Ganoderma microsporum* induces pro-death autophagy through Akt-m TOR-p70S6K pathway inhibition in multidrug resistant lung cancer cells // *PLOS ONE* – 2015.– May 6, 23 p.
102. Choi D.B., Cha W.S., Kang S.H., Lee B.R. Effect of *Pleurotus ferulae* Extracts on Viability of Human Lung Cancer and Cervical Cancer Cell Lines // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* – 2004. – V. 9. – P. 356-361.
103. Cohen R., Suzuki M.R., Hammel K.E. Processive endoglucanase active in crystalline cellulose hydrolysis by the brown rot basidiomycete *Gloeophyllum trabeum* // *Appl. Environ.*

- Microbiol. – 2005. – V.71. – P. 2412-2417.
104. Cohen R., Hadar Y, Yarden O. Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn<sup>2+</sup>// Environmental Microbiology, 2001.– V. 3, №5. – P. 312-322.
  105. Cojocaru S., Radu M., Bodea L.G., Cimpeanu M.M., Gheorghita G., Stoian G., Dinischiotu A. Water soluble *Pleurotus ostreatus* polysaccharide down-regulates the expression of MMP-2 and MMP-9 in Caco-2 cells // Not. Bot. Horti. Agrobo. – 2013. – V. 41, №2. – P. 553-559.
  106. Copa-Patino J.L., Broda P.A. *Phanerochaete chrysosporium* beta-D-glucosidase/beta-D-xylosidase with specificity for (1 - 3)-beta-D-glucan linkages // Carbohydr. Res. – 1994. – V. 253. – P. 265–275.
  107. Croan S.C. Conversion of conifer wastes into edible and medicinal mushrooms // Forest products journal – 2004. – V.54, №2. – P. 68-76.
  108. Cullen D. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi // J.Biotechnol. – 1997. – V. 53. – P. 273-289.
  109. Derenzini M., Trere D., Pession A., Govoni M. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues // J.Pathol. – 2000. – V.191, №2. – P. 181-186.
  110. Duran N., Esposito E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in waste water and soil treatment // Appl. Catal. B-Environ. – 2000. –V. 28.– P. 83-99.
  111. Evans C.S. Properties of the beta-D-glucosidase (cellobiase) from the wood-rotting fungus, *Coriolus versicolor*//Appl.Microbiol.Biotechnol. – 1985. – V. 22. – P. 128-131.
  112. Feitelson M.A., Arzumanyan A., Kulathinal R.J., Blain S.W., Holcombe R.F., Mahajna J., Marino M., Martinez-Chantar M.L., Nawroth R., Sanchez-Garcia I., Sharma D., Saxena N. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets // Seminars in Cancer Biology. – 2015.– Suppl. S25-54-S54

113. Fernández-Fueyo E., Ruiz-Dueñas F.J., Martínez M.J., Romero A., Hammel K.E., Medrano F.J., Martínez A.T. Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability // *Biotechnology for Biofuels*. – 2014. – V. 7. – P. 2-23.
114. Ferreira I.C.F.R., Vaz J.A., Vasconcelos H.M., Martins A. Compounds from wild mushrooms with antitumor potential // *Anticancer agents Med.Chem.* – 2010. – V. 10, №5. – P. 424-436.
115. Froufe H.J., Abreu R.M., Ferreira I.C. Using molecular docking to investigate the anti-breast cancer activity of low molecular weight compounds present on wild mushrooms // *SAR QSAR Environ. Res.* – 2011. – V.22, №3. – P.315-328.
116. Gabor M. Models of acute inflammation in the ear. *Methods in molecular biology*. In: «Inflammation Protocols», edited by P.G. Winyard and D.A. Willoughby.–Totewa, NJ: Human Press Inc. – 2003. – V.225. – P. 129-137.
117. Gimenez A., Minguela A., Haro L.M. DNA ploidy status and proliferation activity as markers of malignant potential in Barrett`s esophagus: flow cytometric study using routinely paraffin-embedded tissue // *World J. Surg.* – 2000. – V. 24, №1. – P. 72-77.
118. Gold M.H., Alic M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* // *Microbiol. Rev.* – 1993. –V. 57. – P. 605-622.
119. Gómez-Toribio V., Martínez A.T., Martínez M.J., Guillén F. Oxidation of hydroquinones by the versatile ligninolytic peroxidase from *Pleurotus eryngii* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and the influence of Mn<sup>2+</sup> // *European Journal of Biochemistry*. – 2001. – V. 268, №17. – P. 4787-4793.
120. Gu Y.H., Sivam G. Cytotoxic effect of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on human androgen independent prostate cancer PC-3 cells // *J. Med. Food*. – 2006. – V. 9. – P. 196-204.
121. Günata Z., Dugelay I., Vallier M.J., Sapis J.C., Bayonove C. Multiple forms of glucosidases in an enzyme preparation from *Aspergillus niger*: partial characterization of an apiosidase // *Enzyme Microb. Technol.* – 1997. – V. 21. – P.305-312.

122. Gunde-Cimerman N., Cimerman A. *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3 methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin // *Exp.Mycol.* – 1995. – V. 19, №1. – P. 1-6.
123. Gunde-Cimerman N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* // *Int. J. Med. Mushrooms.* – 1999. – P. 69-80.
124. Gupta R., Chattopadhyay D. Glutamate is the chemotaxis-inducing factor in placental extracts // *Amino. Acids.* – 2009. – V. 37, №2. – P. 359-366.
125. Ha H-C., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M. Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus* // *Appl.Microbial Biotechnol.* – 2001. – V. 55. – P. 704-711.
126. Hames B.D., Rickwood D. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach.* –London: IRL Press. – 1981. – 376 p.
127. Hammel K. E., Cullen D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis // *Curr. Opin.Plant Biol.* – 2008. – V. 11, №3. – P. 349-355.
128. Harhaji L., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stojanovic I., Momcilovic M., Maksimovic V., Tufegdžic S., Marjanovic Z., Mostarica-Stojkovic M., Vucinic Z., Stosic-Grujicic S. Anti-tumor effect of *Coriolus versicolor* methanol extract against mouse B16 melanoma cells: In vitro and in vivo study // *Food Chem.Toxicol.* –2008. – V. 46. – P. 1825-1833.
129. Hatakka A. Biodegradation of lignin // *Biopolymers. Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications.* In: *Lignin, Humic Substances and Coal*; eds. M. Hofrichter, A. Steinbüchel. – Weinheim: Wiley-VCH. – 2001. V. 1, – P. 129-180.
130. Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation // *FEMS Microbiol.Rev.* – 1994. – V. 13, № 2–3. – P. 125-135.
131. Henrissat B., Davies G. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases // *Structure.* – 1995. – V.3, №9. – P. 853–859.

132. Hersperger A.R., Makedonas G., Betts M.R. Flow cytometric detection of perforin upregulation in human CD8 T cells // Wiley InterScience. Cytometry Part A. – 2008. – 73 A. – P. 1050-1057.
133. Hildén K., Martínez A., Hatakka A., Lundell T. The two manganese peroxidases Pr-MnP2 and Pr-MnP3 of *Phlebia radiata*, a lignin-degrading basidiomycete, are phylogenetically and structurally divergent // Fungal Genet.Biol. – 2005. – V. 42. – P. 403-419.
134. Hofrichter M., Ullrich R., Pecyna M., Liers C., Lundell T. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases // Appl.Microbiol.Biotechnol. – 2010. – V. 87. – P. 871-897.
135. Hon D.N.S. Cellulose: a random walk along its historical path // Cellulose. – 1994. – V. 1. – P. 1–25.
136. Hunt R.W., Zavalin A., Bhatnagar A., Chinnasamy S., Das K.C. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications // Int. J. Mol. Sci. – 2009. – V. 10. – P. 4515-4558.
137. Iwalokun B.A., Usen U.A., Otunba A.A., Olukoya D.K. Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* // Afr. J. Biotechnol. – 2007. – V. 6, №15. – P. 1732-1739.
138. Jayakumar T., Ramesh E., Geraldine P. Antioxidant activity of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on C14-induced liver injury in rats // Food Chem. Toxicol. – 2006. – V. 44. – P. 1989-1996.
139. Jedinak A., Dudhgaonkar Sh., Wu Q.-li, Simon J., Sliva D. Anti-inflammatory activity of edible oyster mushroom is mediated through the inhibition of NF-B and AP-1 signaling // Nutrition Journal . – 2011. – V. 10. – P. 52-62.
140. Jiang W.G., Sanders A.J., Katoh M., Ungefroren H., Gieseler F., Prince M., Thompson S.K., Zollo M., Spano D., Dhawan P., Sliva D., Subbarayan P.R., Sarkar M., Honoki K., Fujii H., Georgakilas A.G., Amedei A., E. Niccolaim, Amin A., Ashraf S.S., Ye L., Helferich W.G.,

- Yang X., Boosani C.S., et al. Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives // *Semin. Cancer Biol.* – 2015. – 32p.
141. Joseph S., Sabulal B., George V., Smina Th.P., Janardhana K.K. Antioxidative and anti-inflammatory activities of the chloroform extract of *Ganoderma lucidum* found in South India // *Sci. Pharm.* – 2009. – V. 77. – P. 111–121.
142. Kamitsuji H., Watanabe T., Honda Y., Kuwahara M. Direct oxidation of polymeric substrates by multifunctional manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus* without redox mediators // *Biochem. J.* – 2005. – V. 386. – P. 387-393.
143. Kamiyama M., Horiuchi M., Umano K., Kondo K., Otsuka Y., Shibamoto T. Antioxidant/anti-inflammatory activities and chemical composition of extracts from the mushroom *Trametes versicolor* // *Int. Journal of Nutrition and Food Sciences.* – 2013. – V. 2, №2. – P. 85-91.
144. Karalyan Z.A., Ter-Pogossyan Z.R., Djaghatspanyan N.G., Hakobyan L.H., Zakaryan H.S., Abroyan L.O., Arakelyan A.A., Semerjyan Z.B., Voskanyan H.E., Karalova E.M. Main biological determinants of continuous cell lines elucidated by a principal component analysis // *Caryologia.* – 2011. – V. 64, № 3. – P. 309-319.
145. Kawagishi H., Mitsunaga S.I., Yamawaki M. A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum* // *Phytochemistry.* – 1997. – V. 44. – P. 7-10.
146. Kersten P., Cullen D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* // *Fungal Genet. Biol.* – 2007. – V. 44. – P. 77–87.
147. Kim J.H., Kim S.J., Park H.R., Choi J.I., Yu Y.C., Nam K.C., Kim S.J., Lee S.C. The different antioxidant and anticancer activities depending on the color of oyster mushrooms// *J. Med. Plant Res.* – 2009. – V.3, №12. – P.1016-1020.
148. Kirk T.K., Farrell R.L. Enzymatic “combustion” the microbial degradation of lignin // *Annual Rev. Microbiol.* – 1987. – V. 41. – P. 465-505.

149. Kirsch-Volders M., Decordier I., Elhajouji A., Plas G., Aardema M.J., Fenech M. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models // *Mutagenesis*. – 2011. – V. 26, №1. – P.177-184.
150. Kodama K., Suzuki M., Toyosawa T., Araki S. Inhibitory mechanisms of highly purified vitamin B2 on the productions of proinflammatory cytokine and NO in endotoxin-induced shock in mice // *Life Sci*. – 2005. – V. 78. – P.134-139.
151. Kreslavski V.D., Los D.A., Allakhverdiev S.I., Kuznetsov V.V. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress // *Rus. J. of Plant Physiol*. – 2012. – V.59, №2. – P.141-154.
152. Kubicek C.P., Messner R., Gruber F., Mandels M., Kubicekpranz E.M. Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei* – Involvement of a constitutive, sophorose-inducible, glucose-inhibited beta-diglycoside permease // *J.Biol.Chem*. – 1993. – V. 268. – P. 19364-19368.
153. Lebo S.E.Jr., Gargulak J.D., McNally T.J. "Lignin". Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 2001.: John Wiley & Sons, Inc. Retrieved 2007-10-14.
154. Lee S., Ahn J., Kim Y.-G., Jung J.K., Lee H., Lee E.G. Gamma-aminobutyric acid production using immobilized glutamate decarboxylase followed by downstream processing with cation exchange chromatography // *Int. J. Mol. Sci*. – 2013. – V. 14, №1. – P.1728-1739.
155. Li W.J., Nie S.P., Liu X.Z., Zhang H., Yang Y., Yu Q., Xie M.Y. Antimicrobial properties, antioxidant activity and cytotoxicity of ethanol-soluble acidic components from *Ganoderma atrum* // *Food Chem.Toxicol*. – 2012. – V. 50. – P. 689-694.
156. Li Y.R., Liu Q.H., Wang H.X., Ng T.B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* – 2008. – V. 1780, №1. – P. 51-57.

157. Liers C., Arnstadt T., Ullrich R., Hofrichter M. Patterns of lignin degradation and oxidative enzyme secretion by different wood and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2011. – V. 78. – P. 91-102.
158. Lin C.Y., Chen Y.H., Lin C.Y. Ganoderma lucidum polysaccharides attenuate endotoxin-induced intercellular cell adhesion molecule-1 expression in cultured smooth muscle cells and in the neointima in mice // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – V. 58, №17. – P. 9563-9571.
159. Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Julich W.-D. The Pharmacological Potential of Mushrooms // *Evidence-based Compl. Alt. Med.* – 2005. – V. 2, №3. – P. 285-299.
160. Liu Y.T., Sun J., Luo Z.Y., Rao S.Q., Su Y.J., Xu R.R., Yang Y.J. Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity // *Food Chem. Toxicol.* – 2012. – V. 50. – P. 1238-1244.
161. Lowry O.H., Rosenbrough N.Y. Protein measurement with pholin-phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193, № 1. – P. 265-275.
162. Lu W., Li Q., Li J., Liu F., Yang X. Polysaccharide from *Patrinia heterophylla* Bunge inhibits HeLa cell proliferation through induction of apoptosis and cell cycle arrest // *LabMedicine.* – 2009. – V. 40, №3. – P. 161-166.
163. Lull C., Wichers H., Savelkoul H. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites // *Mediators of Inflammation.* – 2005. – P. 63-80.
164. Lymar E.S., Li B., Renganathan V. Purification and characterization of a cellulose-binding beta-glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – V. 61. – P. 2976-2980.
165. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2002. – V. 66. – P. 506-577.
166. Maiti S., Mallick S.K., Bhutia S.K., Behera B., Mandal M., Maiti T.K. Antitumor effect of culinary-medicinal oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm., derived protein fraction on tumor-bearing mice models // *Int. J. Med. Mush.* – 2011. – V. 13. – P. 427-440.

167. Maraki D., Hengge U., Becker J., Bocking A. Very early cytological and DNA–cytometric diagnosis of *in situ* carcinoma in an immunosuppressed liver transplant recipient // J.Oral Pathol. Med. – 2006. – V. 35. –№ 1. – P. 58-60.
168. Martinez D., Larrondo L.F., Putnam N.,Gelpke M.D., Huang K., Chapman J., Helfenbein K.G., Ramaiya P., Detter J.C., Larimer F., Coutinho P.M., Henrissat B., Berka R., Cullen D., Rokhsar D. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78 // Nature Biotechnol.–2004. – V.22. – P.695-700.
169. Martinez A.T., Ruiz-Duenas F.J., MartinezM.J., del Rio J.C.,Gutierrez A. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill // Curr.Opin.Biotechnol. – 2009. – V. 20. – P. 348-357.
170. Martone P., Estevez J., Lu F., Ruel K., Denny M., Somerville C., Ralph J. Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture // Current biology. – 2009. – V.19. – P. 169-175.
171. Mattila P., Salo-Vaananen P., Konko K., Aro H., Jalava T. Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland // J. Agric. Food.Chem. – 2002. – V.50, № 22. – P. 6419-6422.
172. Mau J.L., Lin H.C., Song S.F. Antioxidant properties of several speciality mushrooms // Food Res.Int. – 2002. – V.35. – P.519-526.
173. Mester T., Field J.A. Characterization of a novel manganese peroxidase – lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese // J. Biol.Chem. – 1998. –V. 273. – P. 15412-15417.
174. Minasbekyan L.A., Nanagulyan S.G., Nerkararyan A.V., Kalantaryan V.G., Amiryan A.A., Avagyan I.A., Vardevanyan P.O. Modification of Growth Parameters and Conditions of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.)Kumm // Proc. of Int. Conf. “Endophytes and biocontrol agents”. – April, 2005. –Saarisielka (Finland). – P. 46.

175. Morreel K., Dima O., Kim H., Lu F., Niculaes C., Vanholme R., et al. Mass spectrometry-based sequencing of lignin oligomers // *Plant Physiology*. – 2010. – V.153. – P.1464-1478.
176. Mujic I., Zekovic Z., Lepojevic Z., Vidovic S., Zivkovic J. Antioxidant properties of selected edible mushroom species // *Journal of Central European Agriculture*. – 2010. – V. 11, №4. – P.387-392
177. Muller G.M., Bills G.F., Foster M.S. Biodiversity of fungi inventory and monitoring methods. – Elsevier Acad. Press. – 2004. – 777 p.
178. Nanagulyan S.G., Nerkararyan A.V., Avagyan I.A., Karapetyan A.A. Minasbekyan L.A. Increasing of fermentative activity in the mycelial culture *Pleurotus ostreatus* (Jack.: Fr) Kumm. under modulation of growth condition // Int. Conf. “Advanced biotechnology: perspectives of development in Armenia”. – Tsakhkadzor, Armenia. – July 2006. – P. 219.
179. Neilsen K.L., Indiani G., Henriksen A. Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidases A2 and HPR A2 // *Biochemistry*. – 2001. – V.40. – P.11013-11021.
180. Nicolaz Ch. N., Zhadobov M., Desmots F., Ansart A., Sauleau R., Thouroude D., Michel D., Le Drean Y. Study of narrow band millimeter-wave potential interactions with endoplasmic reticulum stress sensor genes // *Bioelectromagnetics*. – 2009. – V. 30. – P.365-373.
181. Ohm R.A., Riley R., Salamov A., Min B., Choi In-G., Grigoriev I.V. Genomics of wood-degrading fungi // *Fungal Genetics and Biology*. – 2014. – V.72. – P.82–90.
182. Osturk M., Duru M.E., Kivrak S., Mercan-Dogan N., Turkoglu A., Ozler M.A. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms // *Food Chem.Toxicol.* – 2011. – V.49. – P. 1353-1360.

183. Pacheco-Sanchez M., Boutin Y., Angers P., Gosselin A., Tweddell R.J. A bioactive (1→3)-, (1→4)-beta-D-glucan from *Collybia dryophila* and other mushrooms // *Mycologia*. – 2006. – V. 98. – P.180-185.
184. Padilha M.M., Avila A.A., Sousa P.J., Cardoso L.G., Perazzo F.F., Carvalho J.C. Anti-inflammatory activity of aqueous and alkaline extracts from mushrooms: *Agaricus blazei Murill* // *J.Med. Food*. – 2009. – V. 12. – P. 59-364.
185. Palmer J.M., Harvey P.J., Schoemaker H.E. The role of peroxidases, radical cations and oxygen in the degradation of lignin // *Phil. Trans. Roy. Soc. London*. – 1987. – Vol. A321, №1561. – P. 495-505.
186. Patel Y., Naraian R., Singh V.K. Medicinal Properties of *Pleurotus* species: oyster mushroom // *World J. Fungal & Plant Biol*. – 2012. – V. 3, №1. – P. 1-12
187. Pearson S.S., Crudek C., Mercer K., Reynolds G.P. // *J Neural Transmi*. - 1991. – V. 86. – P. 151 - 157.
188. Pranaya G., Smitha P.V., Reddy N.S., Vinaya R., Mohan Ch.M., Raju A.B. Evaluation of analgesis and anti-inflammatory activity of *Ventilago calyculata* // *International Journal of Life Sciences*. – 2015. – V. 9, №1. – P.43-46.
189. Rad M.A, Ghourchian H., Moosavi-Movahadi A.A., Hong J., Nazari K. Spectrophotometric assay for horseradish peroxidase activity based on pyrocatechol–aniline coupling hydrogen donor // *Analytical Biochemistry*. – 2007. –V. 362. – P. 38-43.
190. Reese E.T., Levinson H.S. A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms // *Physiolog. Plantar*. –1952. – V. 5. – P. 345-366.
191. Rencoret J., Prinsen P., Gutierrez A., Martinez A.T., del Rio J.C. Isolation and structural characterization of the milled wood lignin, dioxane lignin, and cellulolytic lignin preparations from brewer's spent grain // *J. Agric. Food Chem*. – 2015.– V. 63 – P.603–613.

192. Riou C., Salmon L.M., Vallier M.J., Günata Z., Barre P. Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus oryzae* // Appl. Env. Microbiol. – 1998. – V.64, №10. – P. 3607-3614.
193. Roitner M.T., Schalkhammer T., Pittner F. Characterization of naringinase from *Aspergillus niger* // Monatsch. Chem., 1984, 115, P.1255-1267.
194. Rowley H. L., Martin K. F., Marsden C. A. Decreased GABA release following tonic-clonic seizures is associated with an increase in extracellular glutamate in rat hippocampus *in vivo* // Neuroscience. – 1995. – V. 68, №. 2. – P. 415-422.
195. Salame T.M., Knop D., Levinson D., Yarden O., Hadar Y. Redundancy among manganese peroxidases in *Pleurotus ostreatus* // Appl. Env. Microbiol. – 2013. – V. 79, №7. – P. 2405-2415.
196. Saltarelli R., Ceccaroli P., Buffalini M., Vallorani L., Casadei L., Zambonelli A., Lotti M., Badalyan S., Stocchi V. Biochemical characterization and antioxidant and antiproliferative activities of different *Ganoderma* collections // J Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – V. 25. – P. 16-25.
197. Saltarelli R., Ceccaroli P., Lotti M., Zambonelli A., Buffalini M., Casadei L., Vallorani L., Stocchi V. Biochemical characterization and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy // Food.Chem. – 2009. – V.116. – P. 143-151.
198. Salvachúa D., Prieto A., Martínez Á. T., Martínez M.J. Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – V. 79, №14. – P. 4316-4324.
199. Sanz E., Quintana A., Battaglia V., Toninello A., Hidalgo J., Ambrosio S., Valoti M., Tipton K., Unzeta M. Anti-apoptotic effect of Mao-B inhibitor PF9601N [*N*-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxy-indolyl)methylamine] is mediated by p53 pathway inhibition in MPP<sup>+</sup>-treated SH-SY5Y human dopaminergic cell // J. Neurochemistry. – 2008. – V.105. – P. 2404-2417.

200. Saparrat M.C.N., Guillen F., Arambarri A.M., Martinez A.T., Martinez M.J. Induction , isolation, and characterization of two laccases from the white rot Basidiomycetes *Coriolopsis rigida* // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – V. 68, № 4. – P. 1534-1540.
201. Sarangi I., Ghosh D., Bhutia S.K., Mallick S.K., Maiti T.K. Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans // Int. Immunopharmacol. – 2006. – V.6. – P. 1287-1297.
202. Sato S., Liu F.H.K., Tien M. Expression analysis of extracellular proteins from *Phanerochaete chrysosporium* grown on different liquid and solid substrates // Microbiology. – 2007. – V. 153. – P. 3023–3033.
203. Saxena R.N., Pendse V.K., Khanna N.K. Anti-inflammatory and analgesic properties of four amino-acids // Indian J. Physiol. Pharmacol. – 1984. – V. 28. – P. 299-305.
204. Smiderle F.R., Olsen L.M., Carbonero E.R., Baggio C.H., Freitas C.S., Marcon R., Santos A.R.S., Gorin P.A.J., Iacomini M. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1→3),(1→6)-linked beta-glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius* // Eur. J. Pharmacol. – 2008. – V. 597. – P. 6-91.
205. Smith M.H., Gold M.H. *Phanerochaete chrysosporium* b-glucosidases: induction, cellular localization and physical characterization // Appl. Environ. Microbiol. – 1979. – V.37. – P. 938–942.
206. Sugui M.M., Alves de Lima P.L., Delmanto R.D., da Eira A.F., Salvadori D.M.F., Ribeiro L.R. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler mushroom and possible variation among lineages // Food Chem. Toxicol. – 2003. – V. 41. – P. 555–560.
207. Sulkowska-Ziaja K., Muszynska B., Motyl P., Pasko P. Phenolic compounds and antioxidant activity in some species of polyporoid mushrooms from Poland // Int. J. Med. Mush. – 2012. – V.14, №4. – P. 385-393.

208. Sullivan R., Smith J.E., Rowan N.J. Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into Western medicine // *Perspectives in Biology and Medicine*. – 2006. – V. 49, №2. – P. 159–170.
209. Suzuki M.R., Hunt C.G., Houtman C.J., Dalebroux Z.D., Hammel K.E. Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood // *Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 8. – P. 2214–2223.
210. Takeda K., Okumura K. CAM and NK cells // *ECAM*. – 2004. – V.1. – P. 17–27.
211. Tambiev A.Kh., Kirikova N.N. Novel concepts of the causes of EHR-radiation-induced stimulating effects // *Crit. Rev. Biomed.Engin.* – 2000. – V. 28. – P. 5-6.
212. Tambiev A.Kh., Kirikova N.N. Rhythmic processes in cells microalgae and effects of EHR radiation // *Biotechnologiya*. – 1997. – №7-8. – P.79-95.
213. Tan N.Z., Chiang B.L. Thyarajan A., Sliva D., Zhao C., Zhang Y., Zhu J.S. Immune modulation functions of ReishiMax and its synergistic anti-cancer effects with Tegreen // *Int. Meet.Ganoderma Res.* – 2011, August, Beijing, China, P.44-45.
214. Teplyakova T., Kosogova T. Fungal Bioactive Compounds with Antiviral Effect // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2015. – V. 3. – P. 357-371.
215. Thyagarajan A., Zhu J. , Sliva D. Combined effect of green tea and *Ganoderma lucidum* on invasive behavior of breast cancer cells // *Int.J.Oncol.* – 2007. – V. 30. – P. 963-969.
216. Toyosawa T., Suzuki M., Kodama K., Araki S. Effects of intravenous infusion of highly purified vitamin B2 on lipopolysaccharide-induced shock and bacterial infection in mice // *Eur.J.Pharmacol.* – 2004. – V. 492. – P. 273-280.
217. Tsukira T., Honda Y., Watanabe T., Watanabe T. Molecular breeding of white rot fungus *Pleurotus ostreatus* by homologous expression of its versatile peroxidase MnP // *Appl. Microbiol. Biotechnology*. – 2006. – V. 71. – P.114-120.

218. Valaskova V., Baldrian P. Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus* // Res.Microbiol. – 2006. – V.157. – P. 119–124.
219. Vamanu E. Biological activities of the polysaccharides produced in submerged culture of two edible *Pleurotus ostreatus* mushrooms// J. Biomed.Biotechnol. – 2012. – P. 1-8.
220. Van den Wymelenberg A., Minges P., Sabat G. et al. Computational analysis of the *Phanerochaete chrysosporium* v 2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins // Fungal Genet. Biol. – 2006. – V. 43. – P. 343–356.
221. Van den Wymelenberg A., Sabat G., Martinez D. The *Phanerochaete chrysosporium* secretome: database predictions and initial mass spectrometry peptide identifications in cellulose-grown medium // J. Biotechnol. – 2005. – V. 118. – P. 17- 34.
222. Velizarov S. Electric and magnetic fields in microbial biotechnology: Possibilities, limitations, and perspectives // Electro- Magnetobiol. – 1999. – V. 18. – P. 185–212.
223. Venkatakrishnana V., Shenbhagaramanb R., Kaviyarananb V., Gunasundaric D., Radhikad K., Dandapania R., Loganathan L., Jagadishb K. Antioxidant and antiproliferative effect of *Pleurotus ostreatus* // J. Phytol. – 2010. – V. 2. – P. 22-28.
224. Wang W., Water S.J., MacDonald J.R., Roth C., Shentu S., Freeman J., Von Hoff D.D., Miller A.R. Irofulvene (6-hydroxymethylacylfulvene)-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells is mediated by ERK and JNK kinases // Anticancer Res. – 2002. – V. 22. – P. 559-564.
225. Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives // Int. J. Med.Mushrooms. – 1999. – V. 1. – P. 31-62.
226. Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides // Appl. Microbiol.Biotechnol. – 2002. – V. 60. – P. 258-274.

227. Wasser S.P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems // Intern. J. Med. Mushr. – 2010. – V. 12, № 1. – P. 1-16.
228. Wasser S.P. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms //Appl.Microbiol.Biotechnol. – 2011. – V. 89, № 5. – P. 1323-1332.
229. Wolff E.R., Wisbeck E., Silveira M.L., Gern R.M., Pinho M.S., Furlan S.A. Antimicrobial and antineoplastic activity of *Pleurotus ostreatus* //Appl.Biochem.Biotechnol. – 2008. – V.151. – P. 402-412.
230. Wu C.C., Hu C.T., Lee M.C., Chang Y.J., Pan S.M., Wu J.R., Lin S.C, Wu W.S. Prevention of Hepatocellular carcinoma progression by the Chinese herb derived peptide Lingzhi-8 // Journal of Nature and Science. – 2015. – V.1, №.3, 50p.
231. Wu J.Y., Chen C.H., Chang W.H., Chung K.T., Liu Y., Lu F.J., Chen Ch.H. Anti-cancer effects of protein extracts from *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea* // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. – 2011, P. 1-10.
232. Yang J.H., Lin H.C., Mau J.L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms // Food Chem. –2002. – V.77. – P. 229-235.
233. Yoon J.J., Cha C.J., Kim Y.S., Son D.W., Kim Y.K. The brown rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose // J. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 17. – P. 800–805.
234. использованные интернет ресурсы: [http://ganoderma\\_in.ua/lyubimoe-lekarstvo-mao-czeduna/](http://ganoderma_in.ua/lyubimoe-lekarstvo-mao-czeduna/) ; <https://www.google.ru/search?q=pictures+of+shiitake>