

Jan Grzybek

Katedra i Zakład
Botaniki Farmaceutycznej
Akademia Medyczna
Kraków

Kultury mycelialne grzybów wyższych źródłem substancji leczniczych

Metabolity wtórne grzybów tzw. wyższych nie były do niedawna przedmiotem zainteresowania fitochemików, a zwłaszcza fitofarmakologów, w takiej mierze, jak substancje biologicznie aktywne roślin naczyniowych. Jest to jedna z przyczyn stosunkowo małej liczby substancji pochodzenia grzybowego, wprowadzonych dotychczas do lecznictwa. Drugim zasadniczym powodem tej sytuacji są trudności w zbiorze owocników grzybów, wynikające z ich rozproszenia w terenie oraz nieregularnych pojawów, co w konsekwencji uniemożliwia uzyskanie substancji biologicznie aktywnych w ilości niezbędnej do badań przed- i klinicznych oraz ewentualnej produkcji leków.

Asortyment leków pochodzenia grzybowego został w ostatnim okresie wzbogacony, dzięki opanowaniu metodyki prowadzenia kultur mycelialnych *in vitro* (w tym również gatunków mikorytycznych), syntetyzujących podobnie jak owocniki, metabolity wtórne, biologicznie aktywne. Metody prowadzenia kultur mycelialnych uniezależniają przemysł farmaceutyczny od kłopotliwego i mało wydajnego zbioru surowca grzybowego ze stanu naturalnego.

Japońscy autorzy wprowadzili do oficjalnej terapii nowotworów złośliwych, dwa leki o charakterze polisacharydów, otrzymane z kultur mycelialnych grzybów wyższych: lentinan i krestin (kurehan, PSK). Lentinan został wyizolowany przez Chiharę i wsp. (1) z *Lentinus edodes*. Jest β -D-glukanem, który w części szkieletowej łańcucha posiada wiązanie (1 \rightarrow 3), natomiast w rozgałęzieniach (1 \rightarrow 6). Jego masa cząsteczkowa wynosi 500 tys. W badaniach przy użyciu eksperymentalnych nowotworów zwierzęcych hamował rozwój i wzrost allogenicznych, syngenicznych i autochtonicznych nowotworów. Stosowany jest w leczeniu złośliwych nowotworów przewodu pokarmowego, piersi i płuc. Hirase i wsp. (2-4) wyodrębnili krestin z *Trametes (Coriolus) versicolor*. Posiada on strukturę β -D-glukanu i masę cząsteczkową ok. 100 tys. W jego szkieletowej części występują wiązania (1 \rightarrow 4), a w łańcuchach bocznych (1 \rightarrow 3) i (1 \rightarrow 6). Produkt ten zawiera również komponent białkowy. W badaniach na zwierzętach hamował rozwój i wzrost nowotworów allogenicznych i syngenicznych. Stosowany jest w leczeniu nowotworów żołądka i macicy. Może być podawany doustnie lub parenteralnie.

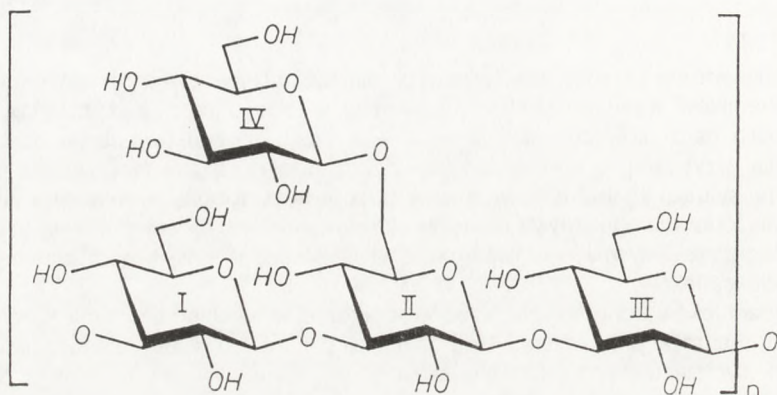
Schizofyfan został wyizolowany przez Komatsu i wsp. (5) z kultur mycelialnych *Schizophyllum commune*. Podobnie jak dwa poprzednie bioprodukty, jest on β -D-glukanem. W łańcuchu szkieletowym posiada wiązania (1 \rightarrow 3), natomiast w odgałęzieniach bocznych (1 \rightarrow 6). Masa cząsteczkowa wynosi 450 tys. Znajduje się on w ostatnim stadium badań klinicznych.

Z potencjalnych leków przeciwnowotworowych, należących do polisacharydów pochodzenia grzybowego można wymienić szereg dalszych wyodrębnionych z kultur mycelialnych głównie przez autorów japońskich, m.in. koriolan, β -D-glukan z wiązaniami (1 \rightarrow 3) oraz w rozgałęzieniach (1 \rightarrow 6), wyodrębniony z *Trametes (Coriolus) versicolor* przez Ito i wsp. (6). Po podaniu dożołądkowym i dootrzewnym hamuje on rozwój mięsaka 180, raka *Shionogi* oraz *Ehrlicha* u myszy.

Skleroglukan, β -D-glukan z wiązaniami jak koriolan, wyizolowany został z *Sclerotium glaucanicum* przez Johnsona i wsp. (7). Wykazuje aktywność przeciwnowotworową w odniesieniu do kilku eksperymentalnych nowotworów zwierzęcych.

Polisacharyd KS-II, α -mannan z komponentem peptydowym, został wyizolowany przez Fujii i wsp. (8) z *Lentinus edodes*. Hamuje rozwój raka Ehrlicha i mięsaka 180 u myszy, po podaniu dożołądkowym lub dootrzewnym, a także pobudza biosyntezę interferonu u zwierząt doświadczalnych.

W Katedrze Botaniki Farmaceutycznej AM w Krakowie wyizolowano z owocników *Tylopilus felleus* (Bull. ex Fr.) P. Karst., β -D-glukan z wiązaniami (1 \rightarrow 3) w części szkieletowej i (1 \rightarrow 6) w rozgałęzieniach (9) (rys. 1). Masa cząsteczkowa 1 300 000.



Rys. 1. Tylopilan, wg Defaya i wsp. (10).

Jego struktura została ustalona przy współpracy z Defayem (10) i nadano mu nazwę tylopilan. Hamuje on wzrost i rozwój mięsaka 180 u myszy (11) oraz wykazuje właściwości cytotoksyczne w odniesieniu do komórek HeLa i KB (9), glejaka mózgu (12), ponadto działa przeciwzapalnie (13). Wykazuje także mitodepresyjną i mitostatyczną aktywność (14) w teście *Allium* wg Levana. W naszej Katedrze otrzymano z kultury mycelialnej omawianego gatunku również inny glukan, wykazujący w teście *Allium* podobne właściwości do tylopilanu (15). Prace nad określeniem jego właściwości chemicznych i biologicznych są w toku.

Dalszymi przykładami polisacharydów pochodzenia mycelialnego o charakterze β -D-glukanów, wykazującymi aktywność przeciwnowotworową, w testach przy użyciu eksperymentalnych nowotworów zwierzęcych, są związki wyodrębnione z następujących gatunków grzybów: *Ganoderma lucidum* (16), *Grifola frondosa* (17), *Fomes fomentarius* (18), *Cochiobolus miyabeanus* (19). Mechanizm przeciwnowotworowej aktywności polisacharydów grzybowych polega na ich właściwości stymulowania określonych składników systemu immunologicznego.

Godną podkreślenia zaletą polisacharydów grzybowych jako leków przeciwnowotworowych jest to, że nie wykazują działania toksycznego. Ze względu na właściwości immunostymulujące, określone polisacharydy działają również przeciwwirusowo (20), przeciwbakteryjnie i przeciw pasożytniczo (20). Znane są także polisacharydy o działaniu przeciwzapalnym (13,21), naczynioochronnym (21) oraz hypoglikemicznym (22,23).

Ponadto z kultur mycelialnych wyizolowano następujące substancje o działaniu przeciwnowotworowym:

- Koriolynę, korioliny B i C, połączenia tricykliczne wyodrębnione przez Glasbye'go (24) z *Coriolus consors*. Koriolina hamuje wzrost i rozwój mięsaka Yoshidy. Podobne działanie wykazuje koriolina C w odniesieniu do formy wysiękowej raka Ehrlicha i białaczki mysiej L-1210.

- Diketokoriolynę B otrzymali Nishimura i wsp. (25) w wyniku utlenienia korioliny B. Omawiany związek posiada aktywność przeciwnowotworową podobną do korioliny C.

– Kwas kalwatynowy, wyodrębniony przez Umezawę i wsp. (26) oraz Okudę i Fugiwarę (27) z *Calvatia craniformis*. Hamuje on wzrost i rozwój mięsaka Yoshidy oraz białaczki mysiej L-1210.

– Aranoflawiny A i B, izolowane przez Mizuno i wsp. (28) z *Arachniotus flavoluteus*. Są aktywne w odniesieniu do mięsaka Yoshidy.

– Bredinę, nukleozyd imidazolowy otrzymany przez Mizuno i wsp. (29) oraz Yoshidę i Nakatsu (30) z *Eupenicillium brefeldianum*. Bredinina hamuje wzrost i rozwój białaczki mysiej L-5178Y.

– Antybiotyk SL-1846, izolowany przez Sigga i Stoola (31) z *Pseudeurotium ovalis* (ATCC 34920). Omawiany antybiotyk hamuje proliferację mastocytoma P-815 u myszy.

Kultury mycelialne grzybów wyższych oprócz polisacharydów i antybiotyków przeciwnowotworowych dostarczają także substancji leczniczych o innych właściwościach. Musilek i wsp. (32) otrzymali macydynę z *Oudemansiella mucida*, związek o charakterze poliketydu, stosowany zewnętrznie jako lek fungistatyczny.

W ostatnim okresie obserwuje się znaczne zainteresowanie badaniami chemiczno-biologicznymi metabolitów wtórnych, izolowanych z kultur mycelialnych grzybów wyższych. Ramy tego artykułu nie pozwalają na omówienie wszystkich najnowszych wyników badań. Do najważniejszych należy zaliczyć wyizolowanie, określenie struktury chemicznej oraz stwierdzenie:

1) przeciwbakteryjnych właściwości takich substancji: jak: pleuromutyliny i 14-acetylomutyliny-seskwiterpenów wyodrębnionych z kilku gatunków rodzaju *Clitopilus* (33); krinipeliny-diterpenu wyodrębnionego z *Crinipellis stipitaria* (34,35); kwasu lentinelowego-seskwiterpenu wyizolowanego z *Lentinellus ursinus* (36) oraz pleurotelolu i kwasu pleurotelinowego-seskwiterpenów otrzymanych z *Pleurotellus hypnophilus* (37);

2) cytostatycznych aktywności kwasu ganoderowego-triterpenu otrzymanego z *Ganoderma lucidum* (38); nematoliny i nematolonu-seskwiterpenów występujących w rodzaju *Hypholoma* (39) oraz pochodnych ergosterolu, wyodrębnionych z *Trametes versicolor* (40);

3) przeciwwirusowych właściwości wcześniej omówionego polisacharydu o nazwie handlowej krestin, wyizolowanego z *Trametes versicolor*, wykazującego działanie przeciwwirusowe w odniesieniu do wirusa cytomegalii (41), hamującego także replikację HIV (42); nadtlenku ergosterolu występującego w wielu gatunkach grzybów. W warunkach *in vitro* hamuje on namnażanie wirusów grypy A i B (43); 6-metylopuryny otrzymanej z *Collybia maculata*, działającej przeciwwirusowo w stosunku do wirusa wywołującego pęcherzykowie zapalenie śluzówki jamy ustnej (44).

Dokonany przegląd wybranych substancji pochodzenia grzybowego wyizolowanych z kultur mycelialnych, wykazujących właściwości lecznicze potwierdza opinię, że omawiane kultury mogą być ważnym źródłem surowców leczniczych i cennych substancji leczniczych, które występują w ich biomacie.

Literatura

1. Chihara G., Hamuro J., Maeda Y. Y., Arai Y., Fukuoka F., (1970). *Cancer Res.*, 30, 2776-2781.
2. Hirase S., Nakae Y., Otsuka S., Ueno S., Yoshi Kumi C., Ohara M., Hirose F., Fujii T., Ohmura Y., (1970), I Proc. Jpn. Cancer Assoc., 29th Ann. Meet., 288.
3. Hirase S., Nakai S., Akatsu T., Kobayashi A., Oohara M., Matsunaga K., Fujii M., Kodaira S., Fujii T., Furusho T., Ohmura Y., Wada T., Yoshikumi C., Veno S., Ohtsuka S., (1976a), *J. Pharm. Soc. Jpn.*, 96, 413-418.
4. Hirase S., Nakai S., Akatsu T., Kobayashi A., Oohara M., Matsunaga K., Fujii M., Kodaira S., Fujii T., Furusho T., Ohmura Y., Wada T., Yoshikumi C., Ueno S., Ohtsuka S., (1976b), *J. Pharm. Soc. Jpn.*, 96, 419-424.
5. Komatsu N., Okubo S., Kikumoto K., Sato G., Sakai S., (1969). *Gann*, 60, 137-144.
6. Ito H., Hidaha H., Sugiura M., (1979), 29, 953-955.
7. Johnson J., Kirkwood S., Misaki A., Nelson T. E., Scaletti J. V., Smith F., (1963), *Chem. Ind., (London)*, 820-822.

8. Fujii T., Maeda H., Suzuki T., Ishida N., (1978), *J. Antibiot.*, 31, 1079-1082.
9. Kohlmünzer S., Grzybek J., Tanaka M., (1980), *Planta Med.*, 3, 231-232.
10. Defaye J., Kohlmünzer S., Sodzawiczny K., Wong E., (1988), *Carbohydr. Res.*, 173, 316-323.
11. Chłap Z., Kohlmünzer S., (1978), *Planta Med.*, 33, 290.
12. Kohlmünzer S., Kałuża J., (1975), *Abstr. Int. Conf. Med. Plants., Marianske Lazne*, 94.
13. Kohlmünzer S., Quinn M. L., Benoit P., Farnsworth N. R., (1977), *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 29, 539-541.
14. Grzybek J., Kohlmünzer S., (1983), *Herba Hung.*, 22, 7-12.
15. Kohlmünzer S., Grzybek J., Węgiel J., *Acta Pol. Pharmac.*, (w druku).
16. Sone Y., Okuda R., Wada N., Kishida E., Misaki A., (1985), *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2641-2653.
17. Ohno N., Iino K., Suzuki I., Oikawa Sh., Sato K., Miazaki T., Yadomae T., (1985), *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 1181-1186.
18. Ito H., Sugiura M., Miazaki T., (1976), *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 2575-2578.
19. Nanba H., Kuroda H., (1987), *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 1285-1288.
20. Hamuro J., Chihara G., (1983), in: *Immune Modulation Agents and Their Mechanism*, M. Dekker Inc., New York and Basel.
21. Grzybek J., Czarnecki R., (1987), *Herba Pol.*, 33, 279-280.
22. Hikino H., Konno C., Mirin Y., Hayashi T., (1985), *Planta Med.*, 339-340.
23. Tomoda M., Gonda R., Kasahara Y., Hikino H., (1986), *Phytochemistry*, 25, 2817-2818.
24. Glasby J. S., (1976), *Encyclopedia of Antibiotics*. Wiley, New York.
25. Nishimura Y., Koyama Y., Umezawa S., Takeuchi T., Ishizuka M., Umezawa H., (1980), *J. Antibiot.*, 33, 404-407.
26. Umezawa H., Takeuchi T., Iinuma H., Ito M., Ishizuka M., Kurakata Y., Umeda Y., Nakanishi Y., Nakamura T., Obayashi A., Tanabe O., (1975), *J. Antibiot.*, 28, 87-90.
27. Okuda T., Fugiwara A., (1982), *Trans. Mycol. Soc. Jpn.*, 23, 235-238.
28. Mizuno K., Ando Z., Abe J., (1970), *J. Antibiot.*, 23, 493-496.
29. Mizuno K., Tsujino M., Takeda M., Hayashi M., Atsumi K., Asano K., Matsuda T., (1974), *J. Antibiot.*, 27, 775-782.
30. Yoshioka H., Nakatsu K., (1975), *Tetrahedron Lett.*, 46, 4031-4034.
31. Sigg H. P., Stool C., (1969), *Antibiotic SL 1846*, U. S. Patent 3, 465, 079.
32. Musilek V., Semerdzieva M., (1977), *Folia Microbiol.*, 298-301.
33. Palma N., Knauxder F., (1984), *Eur. Congr. Biotechnol. Verl. Chemie, Weinheim*.
34. Kupka J., Anke T., Oberwinkler F., Schromm, Steglich W., (1979), *Antibiot.*, 32, 130-135.
35. Anke T., Heim J., Knoch F., Mocek U., Steffan B., Steglich W., (1985), *Angew. Chem.*, 97, 714-716.
36. Stärk A., Anke T., Mocek U., Steglich W., Kirfel A., Will G., (1988), *Z. Naturforsch., C* 43, 177-179.
37. Kupka J., Anke T., Gianetti B. M., Steglich W., (1981), *Arch. Microbiol.*, 130, 223-227.
38. Toth J. O., Luu B., Ourisson G., (1983), *Tetrahedron Lett.*, 24, 1081-1084.
39. Backens S., Steffan B., Steglich W., Zechlin L., Anke T., (1984), *Liebigs Ann. Chem.*, 1332-1342.
40. Valisolalao J., Luu B., Ourisson G., (1983), *Tetrahedron*, 39, 2779-2785.
41. Okada M., Minamishima Y., (1987), *Microbiol. Immunol.*, 31, 45-57.
42. Tochikura T. S., Nahashima H., Ohashi Y., Yamamoto N., (1988), *Med. Microbiol. Immunol.*, 177, 235-244.
43. Lindequist U., Lesman A., Teuscher E., Pilgrim H., (1989), *Pharmazie*, 44, 579-580.
44. Leonhardt K., Anke T., Hillen-Maske E., Steglich W., (1987), *Z. Naturforsch., C* 42, 420-424.

Mycelial cultures of higher fungi as a source of medicinal substances

Summary

Some achievements in the search for biologically active substances derived from mycelial cultures have been selected and reviewed. Special attention has been paid to polysaccharides showing immunostimulating, and antitumor activities. The cytotoxic, antibiotic, and antiviral substances of the same origin have also been discussed.

Adres dla korespondencji:

Jan Grzybek, Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Akademia Medyczna, ul. Krupnicza 16, 31-123 Kraków.