



УДК 577.114.5 + 582.282.123.088.5

© 1991 г.

А. И. Усов, Ф. Ф. Бланко\*, В. С. Иванова\*,  
Е. Н. Бедрина\*, С. А. Фирсова\*, Л. А. Седакова\*\*,  
Н. С. Фунтикова\*\*

## СТРОЕНИЕ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ МИЦЕЛИЯ *ASPERGILLUS ORYZAE*

Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского АН СССР, Москва;

\*Всесоюзный онкологический научный центр АМН СССР, Москва;

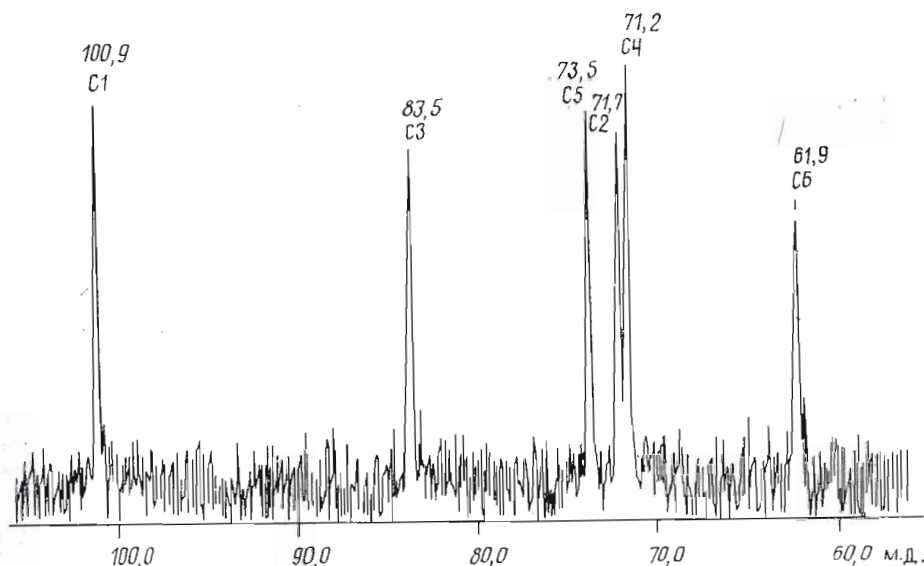
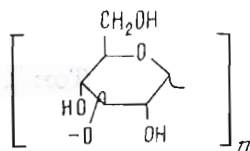
\*\*Институт микробиологии АН СССР, Москва

Из гриба *Aspergillus oryzae* (штамм 5214) выделены три полисахаридные фракции, активные против аденокарциномы молочной железы мышей Са-755, но неактивные против саркомы С-180. Для главной фракции, извлекаемой из мицелия холодной разбавленной щелочью в присутствии боргидрида натрия, по данным спектроскопии  $^{13}\text{C}$ -ЯМР, частичного кислотного гидролиза и периодатного окисления установлена структура линейного (1  $\rightarrow$  3)- $\alpha$ -D-глюкопиранана (псевдониграна).

Клеточные стенки грибов содержат разнообразные полисахариды [1], многие из которых представляют интерес как биологически активные соединения. Это относится в первую очередь к противоопухолевым  $\beta$ -глюканам, выделяемым из высших грибов; наиболее изученным полисахаридом этого класса является лентинан [2, 3]. Недавно было показано, что клеточные стенки ряда низших грибов также содержат противоопухолевые полисахариды [4, 5], причем для наиболее активного компонента, щелочерастворимого полисахарида из *Aspergillus oryzae*, предложена структура линейного (1  $\rightarrow$  3)- $\beta$ -D-глюкана [6]. Целью нашей работы было выделение, структурная характеристика и определение противоопухолевой активности полисахаридных компонентов мицелия другого штамма *A. oryzae*, полученного в Институте микробиологии АН СССР.

В гидролизате обезжиренного мицелия были найдены глюкоза, манноза и галактоза в соотношении около 15 : 1,4 : 1. При экстракции горячей водой с последующим диализом и осаждением этанолом был выделен водорастворимый полисахаридный препарат (I), содержащий те же моносахариды в соотношении 2 : 2 : 1. Дальнейшую обработку мицелия проводили 1 М NaOH при 6° С в присутствии  $\text{NaBH}_4$  для предотвращения возможной деструкции 1  $\rightarrow$  3-связанных полисахаридов. При этом уже за первые 2 ч перемешивания в раствор переходит около 85% материала, суммарно экстрагируемого в течение 20 ч. При подкислении экстрактов щелочерастворимый полисахарид (II) выпадал в осадок; его выделяли диализом и лиофилизацией суспензии. Остаток мицелия обрабатывали 1 М NaOH при нагревании, промывали водой и высушивали. Этот материал все еще давал при гидролизе глюкозу, маннозу и галактозу в соотношении 10 : 1,3 : 1. Его экстрагировали 0,5 М HCl при 100° С в течение 0,5 ч и после нейтрализации экстракта и осаждения этанолом получали полисахаридный препарат (III), содержащий глюкозу, маннозу и галактозу в соотношении 8 : 1,5 : 0,5. По данным гель-хроматографии на сефадексе G-100, этот препарат был существенно деполимеризован по сравнению с полисахаридом (I).

При испытаниях биологической активности оказалось, что все три препарата ингибируют рост аденокарциномы молочной железы мышей Са-755 на 50—80%. Этот эффект наблюдался в диапазоне доз от 50 до 200 мг/кг при ежедневном внутривнутрибрюшинном введении в течение 5 сут.



Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарида (II)

В то же время при испытании на солидной саркоме мышей С-180 все фракции оказались неактивными. Тем самым было показано, что главная фракция — щелочерастворимый препарат (II) — отличается по биологической активности от аналогичного по растворимости вещества, описанного японскими авторами [4, 6].

Одновременно было установлено, что эти вещества различаются и по химическому строению. Полисахарид (II) давал при гидролизе только глюкозу и обладал высоким положительным удельным вращением ( $[\alpha]_D +260^\circ$ ). В его спектре  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (рисунок) имеется шесть хорошо разрешенных сигналов, совпадающих по положению с соответствующими сигналами в спектрах известных  $(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D}$ -глюкопирананов [7—9]. При периодатном окислении суспензии полисахарида в течение нескольких суток какого-либо расхода окислителя не обнаружено. При частичном гидролизе полисахарида [10] кроме глюкозы были получены олигосахариды, которые по хроматографической подвижности на бумаге представляли собой серию олигомергомологов глюкозы. Ди-, три-, тетра- и пентасахариды были выделены из частичного гидролизата с помощью препаративной ВХ (таблица) и охарактеризованы спектрами  $^{13}\text{C}$ -ЯМР. Спектр дисахарида полностью совпал с приведенным в литературе спектром нигерозы (3-О- $\alpha\text{-D}$ -глюкопиранозил- $\text{D}$ -глюкозы) [7]. Спектры высших олигомергомологов также не оставляют сомнения в том, что эти вещества содержат только  $\alpha\text{-}1 \rightarrow 3$ -связи между остатками глюкозы.

Таким образом, в отличие от Сасаки с соавторами [4, 6], работавших с другим штаммом *A. oryzae* и выделивших противоопухолевый линейный  $(1 \rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D}$ -глюкан, мы показали, что изученный нами штамм этого гриба содержит линейный  $(1 \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D}$ -глюкан (псевдонигеран). Полисахариды этого типа обнаружены в клеточных стенках большого числа низших грибов [1]. По противоопухолевой активности они уступают  $\beta$ -глюканам, хотя, как установлено недавно [9], весьма перспективными в этом отношении могут оказаться производные, получаемые химической модификацией этих полисахаридов.

## Характеристика выделенных олигосахаридов

Степень полимеризации	Найдено		Строение	Лит. данные [10]	
	$[\alpha]_D$ , град	$R_{Glc}^*$		$[\alpha]_D$ , град	$R_{Glc}$
2	+130	0,78	$\alpha$ -D-Glcp-(1 → 3)-D-Glc (пигероза)	+133	0,76
3	+180	0,58	$\alpha$ -D-Glcp-(1 → 3)- $\alpha$ -D-Glcp-(1 → 3)-D-Glc	+184	0,59
4	+198	0,45	$\alpha$ -D-Glcp-(1 $\xrightarrow{2}$ 3)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\xrightarrow{2}$ 3)-D-Glc	+205	0,44
5	+219	0,33	$\alpha$ -D-Glcp-(1 $\xrightarrow{3}$ 3)- $\alpha$ -D-Glcp(1 $\xrightarrow{3}$ 3)-D-Glc	+233	0,33

\* Система *n*-бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3.

### Экспериментальная часть

Растворы полисахаридов и олигосахаридов упаривали в вакууме при 40 °С. Аналитическая и препаративная БХ выполнена нисходящим способом с применением бумаги FN-15 Filtrak (ГДР) и системы растворителей бутанол — пиридин — вода, 6 : 4 : 3. Зоны моно- и олигосахаридов обнаруживали анилинфталатом. Приведены подвижности веществ  $R_{Glc}$  относительно D-глюкозы. ГЖХ выполнена на хроматографе Pye-104 (Англия) с пламенно-ионизационным детектором, колонка 0,6 × 120 см с 3% ECNSS-M на хромосорбе Q при 185 °С. Для полного кислотного гидролиза вещества нагревали в 2 н. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 100° С в течение 6 ч, гидролизаты нейтрализовали раствором Ba(OH)<sub>2</sub> и моносахаридный состав определяли с помощью БХ или после восстановления и ацетилирования методом ГЖХ [11]. Количественное определение углеводов в полисахаридах проводили по методике [12]. Оптическое вращение поли- и олигосахаридов измеряли на поляриметре Perkin — Elmer 141. Спектры <sup>13</sup>C-ЯМР получали на спектрометре Bruker WM-250 для растворов полисахаридов в 1 н. NaOD при 20° С, а растворов олигосахаридов — в D<sub>2</sub>O (при 80° С) в условиях подавления спин-спинового взаимодействия с протонами. Химические сдвиги для полисахаридов измеряли относительно диметилсульфоксида как внутреннего стандарта (39,5 м. д.).

Противоопухолевую активность определяли по методике [13].

**Культивирование гриба.** *A. oгуzae*, штамм 5214, выращивали в течение 3 сут в 2-л колбах с перемешиванием при 28—30° С на среде состава (г/л): глюкоза — 30; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,5; NaCl — 0,5; CaCO<sub>3</sub> — 0,1; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O — 0,01; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> — 1. Мицелий отделяли от культуральной жидкости фильтрованием, промывали водой и лиофилизовали. Сухой материал измельчали, экстрагировали 7 сут в аппарате Сокслета смесью хлороформ — метанол (2 : 1) и высушивали в вакууме. По данным кислотного гидролиза, обезжиренная биомасса содержала глюкозу, маннозу и галактозу в соотношении 15 : 1,4 : 1 с небольшими примесями ксилозы и арабинозы. Указанное соотношение практически не изменялось при сравнении разных партий мицелия, полученного в описанных условиях.

**Выделение полисахаридных препаратов.** 10 г обезжиренной биомассы перемешивали с четырьмя порциями по 250 мл воды при нагревании на кипящей водяной бане в течение 6 ч. Водный экстракт отфильтровывали от осадка через двойной слой ткани. Раствор упаривали, фильтровали через плотный стеклянный фильтр и диализовали против дистиллированной воды при 5° С. Содержимое диализного мешка упаривали и поли-

сахарид осаждали 4 объемами этанола. Осадок отфильтровывали, промывали этанолом, ацетоном, эфиром и сушили в вакууме над  $P_2O_5$ . Получали 0,43 г вещества (I) (4,3% от сухого мицелия),  $[\alpha]_D^{20} +72^\circ$  (с 0,5; вода), содержание углеводов 75%, соотношение глюкоза — манноза — галактоза 2 : 2 : 1.

К остатку мицелия приливали 350 мл 1 М NaOH, прибавляли 1 г  $NaBH_4$  и перемешивали 20 ч при 6 °С. Осадок отделяли центрифугированием, еще раз обрабатывали в тех же условиях щелочным боргидридом, полученные растворы объединяли, нейтрализовали уксусной кислотой, выпавший обильный осадок отделяли центрифугированием и тщательно промывали водой. После лиофилизации водной суспензии осадка получали полисахаридный препарат (II), дающий при гидролизе только глюкозу. Выход 1,75 г (17,5% от сухого мицелия), содержание углеводов 96%,  $[\alpha]_D^{20} +260^\circ$  (с 0,5; 1 М NaOH). Найдено, %: С 43,64; Н 6,18; N, зола (следы).  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Вычислено, %: С 44,44; Н 6,22.

Остаток мицелия после холодной щелочной экстракции перемешивали 1 ч с 350 мл 1 М NaOH при 80 °С, промывали водой до нейтральной реакции, затем перемешивали 30 мин с 50 мл 0,5 М HCl при 100 °С. Смесь центрифугировали, обработку осадка кислотой повторяли, объединенные растворы концентрировали, отгоняя соляную кислоту с водой, остаток кислоты нейтрализовали амберлитом IRA-401 ( $HCO_3^-$ -форма), раствор упаривали до 50 мл и выливали в 4 объема этанола. Осадок отделяли центрифугированием и сушили сменой растворителей, получали полисахаридный препарат (III). Выход 0,36 г, содержание углеводов 70%, соотношение глюкоза — манноза — галактоза 8 : 1,5 : 0,5,  $[\alpha]_D^{20} +80^\circ$  (с 0,45; вода).

*Периодатное окисление полисахарида (II).* 50 мг полисахарида (II) суспендировали в 62,2 мл 0,01 или 0,02 М водного  $NaIO_4$  (2- или 4-кратный мольный избыток в расчете на ангидроглюкозное звено) и выдерживали 7 сут в темноте при комнатной температуре. Концентрацию окислителя в аликвотах определяли спектрофотометрическим методом по поглощению при 305 нм и сравнивали с исходным раствором периодата. Заметного расхода окислителя не обнаружили.

*Частичный гидролиз полисахарида (II).* К 1,5 г вещества (II) приливали 22,5 мл HCOOH и суспензию нагревали 60 мин при 100 °С. К полученному гомогенному горячему раствору прибавляли 225 мл кипящего 0,4 н. раствора  $H_2SO_4$ . Нагревание при 100 °С продолжали еще 50 мин. Гидролизат быстро охлаждали холодной водой и прибавляли рассчитанное количество насыщенного  $Ba(OH)_2$ , необходимое для нейтрализации содержащейся в смеси серной кислоты. Осадок отфильтровывали и промывали водой. Раствор и промывные воды объединяли и упаривали, отгоняя HCOOH с водой. Небольшие количества формиата бария и HCOOH, оставшиеся в растворе, удаляли обработкой  $KU-2(H^+)$  и амберлитом IRA-401 ( $HCO_3^-$ ). Олигосахариды, содержащиеся в гидролизате, разделяли препаративной БХ. После повторной очистки получены ди-, три-, тетра- и пентасахариды в количестве 0,11; 0,08; 0,06 и 0,035 г соответственно. Их характеристика представлена в таблице.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gorin P. A. J., Barreto-Bergter E. // The polysaccharides. V. 2 / Ed. Aspinnall G. O. N. Y.: Acad. Press, 1983. P. 365—409.
2. Aoki T. // Immunol. Ser. 1984. V. 25. P. 63—77.
3. Hamuro J., Chihara G. // Immunol. Ser. 1984. V. 25. P. 409—436.
4. Sasaki S., Kodama K., Uchida K., Yoshino H. // Agric. Biol. Chem. 1985. V. 49. № 4. P. 1219—1221.
5. Sasaki S., Kodama K., Uchida K., Yoshino H. // Agric. Biol. Chem. 1985. V. 49. № 9. P. 2807—2808.
6. Sasaki S., Uchida K. // Agric. Biol. Chem. 1987. V. 51. № 9. P. 2595—2596.
7. Colson P., Jennings H. J., Smith I. C. P. // J. Amer. Chem. Soc. 1974. V. 96. № 26. P. 8081—8087.
8. Usui T., Yamaoka N., Matsuda K., Tuzimura K., Sugiyama H., Seto S. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1973. № 20. P. 2425—2432.
9. Kiho T., Yoshida I., Nagai K., Ukai S., Hara C. // Carbohydr. Res. 1989. V. 189. P. 273—279.

10. Johnston I. R. // Biochem. J. 1965. V. 96. № 3. P. 659—664.
11. Слонекер Дж. // Методы исследования углеводов / Ред. Хорлин А. Я. М.: Мир, 1975. С. 22—25.
12. Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 3. P. 350—365.
13. Софьина З. П. Методические указания к первичному отбору. М.: Медицина, 1980.

Поступила в редакцию  
3.I.1990

A. I. USOV, F. F. BLANCO \*, V. S. IVANOVA \*, E. N. BEDRINA \*,  
S. A. FIRSOVA \*, L. A. SEDAKOVA \*, N. S. FUNTIKOVA \*\*

STRUCTURE AND ANTITUMOUR ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES  
FROM THE *ASPERGILLUS ORYZAE* MYCELIUM

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; \* All-Union Oncological Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow; \*\* Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

Three polysaccharide fractions active against mammary gland adenocarcinoma Ca-755 in mice but inactive against sarcoma C-180 were isolated from *Aspergillus oryzae* strain 5214. The main fraction, extracted from the mycelium by cold dilute alkali in the presence of sodium borohydride, was shown to be linear (1 → 3)- $\alpha$ -D-glucopyranan (pseudonigeran) according to  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, partial acid hydrolysis and periodate oxidation data.