

**МАКРОМИЦЕТЫ:
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СВОЙСТВА И
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ**

**MACROMYCETES:
MEDICINAL PROPERTIES AND
BIOLOGICAL PECULIARITIES**



НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ГУ «ИНСТИТУТ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ЭКОЛОГИИ»

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE
INSTITUTE FOR EVOLUTIONARY ECOLOGY

*К 70 –летию со дня рождения члена-корреспондента НАН Украины,
профессора С.П. Вассера
Devoted to 70th anniversary of Professor Solomon P. Wasser,
Corresponding Member of NAS of Ukraine*

**МАКРОМИЦЕТЫ:
ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СВОЙСТВА
И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ**

**MACROMYCETES:
MEDICINAL PROPERTIES
AND BIOLOGICAL PECULIARITIES**



**КИЕВ - 2016
KYIV - 2016**

УДК 57.082.2:582.282/.284.3:615.322

Макромицеты: лекарственные свойства и биологические особенности. Т.2. / Под ред. проф. И. Габриэля. – К.: Наш формат, 2016. – 261 с.

Macromycetes: medicinal properties and biological peculiarities. T.2./Ed. by Prof. J.Gabriel. – K.: Nash format, 2016. – 261 p.

В монографии представлены основные вопросы и проблемы науки о лекарственных грибах, результаты многолетних исследований биологических, нейротропных, медико-фармакологических, аккумулярующих свойств и культуральных особенностей макромицетов. Издание предназначено для микологов, медиков, экологов, специалистов в области грибоводства и охраны окружающей среды, преподавателей и студентов ВУЗов.

У монографії представлені основні питання та проблеми науки про лікарські гриби, результати багаторічних досліджень біологічних, нейротропних, медико-фармакологічних, акумулюючих властивостей та культуральних особливостей макромицетів. Видання призначене для мікологів, медиків, екологів, спеціалістів у грибівництві і охороні довкілля, викладачів та студентів ВНЗів.

This monograph displays the questions and problems of medicinal mushroom science. These are results of long-term studies of biological, neurotropic, medicinal, pharmaceutical, accumulating, and cultural properties of macromycetes. This edition will be of value to mycologists, physicians, ecologists, and specialists in the field of mushroom cultivation and environmental protection, teachers, and students of high school.

Авторы выражают глубокую благодарность д-ру А.Ф. Григанскому (США) за финансовую поддержку данного издания

Редакционный совет: профессор, д-р биол. наук *И. Габриэль*, АН Чешской Республики
канд. биол. наук *А.А. Гродзинская*, канд. биол. наук *С.А. Сырчин*, НАН Украины

Editorial Board:

Irji Gabriel, Assoc. Prof., Doctor Sciences, Academy of Sciences of Czech Republic,
Anna A. Grodzinskaya, PhD, *Sergey A. Syrchin*, PhD, NAS of Ukraine

Ответственный редактор – Профессор, Доктор наук *И. Габриэль*, Институт микробиологии Академии наук Чешской Республики

Печатается по решению Ученого совета Института эволюционной биологии НАН Украины (протокол № 14 от 27 декабря 2016 г.)

ISBN 978-966-02-8214-8

**С.П. Вассер, С.М. Бойко, К.Х. Вонг, К. Воронин,
А.Ф. Григанский, А.А. Гродзинская, И.А. Дудка, Б. Кирхгоф,
Е.В. Колотушкина, М.Л. Ломберг, М.Г. Молдаван,
П. Педарзани, В. Сабаратнам, А.И. Самчук, Г.Г. Скибо,
С.А. Сырчин, М. Фомина, П.Г.Ченг**

Киев - 2016

Київ-2016



*Член-корреспондент НАН Украины, профессор,
доктор биологических наук Соломон Павлович Вассер*

*Corresponding Member of National Academy of Sciences of Ukraine,
Professor Solomon P. Wasser*

ПОСВЯЩЕНИЕ

Эта книга посвящена 70-летию со дня рождения члена-корреспондента НАН Украины, профессора, доктора биологических наук Соломона Павловича Вассера, нашего дорогого Коллеги, Учителя и Друга.

С.П. Вассер - всемирно известный ученый-энциклопедист, таксономист и исследователь разнообразия и эволюции криптогамных растений и грибов, пионер в области науки о лекарственных грибах и основ их биотехнологии.

Искренне желаем ему крепкого здоровья, неукротимой созидательной энергии, новых творческих свершений, гениальных микологических открытий, замечательных монографий!

Авторы

Professor Solomon P. Wasser

Short Biodata

Professor Solomon P. Wasser, Ph.D., Dr. Sci. (Biol.) is the Head of the International Center for Biotechnology and Biodiversity of Fungi, at the Institute of Evolution, University of Haifa (Israel); and the scientific adviser of the Department of Algology, at the N.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine.

Born and educated in Ukraine, Professor Wasser earned his advanced degrees (PhD & Dr. Sci., Biol.) at the N.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine in Kiev. He was elected a member of the National Academy of Science of Ukraine in 1988, and became Professor of Botany and Mycology in 1991. He founded the International Center for Biotechnology and Biodiversity of Fungi at the Institute of Evolution in Haifa University in 1995 and has directed its work since then. Since 2000, he has been a full Professor of Haifa University and now emeritus Professor (Israel).

Professor Wasser is an author and co-author of 600 scientific publications, including 57 books and 15 patents. Professor Wasser is world leader in medicinal mushrooms study and in fungal taxonomy and biodiversity, especially in higher Basidiomycetes mushrooms. He made pioneering research in anticancer (breast, prostate, CML, and ovarian cancers), antioxidant and radical scavenging activity of medicinal mushrooms, developed of new biotechnology of submerged cultivation of many medicinal mushroom species, including haploid strains of *Tremella mesenterica*, *Ganoderma tsugae* var. *jannieae*, *Pleurotus eryngii* and *P. ostreatus*, *Agaricus brasiliensis*, and *Coprinus comatus*. Developed and patented new for world market dietary supplements with immunomodulating, cholesterol lowering, antidiabetic, antioxidant, and radical scavenging activities. Professor Wasser introduced 226 new scientific names for fungi including he described 42 species of higher Basidiomycetes species and intraspecific taxa new for science and 184 new for science nomenclature and taxonomic combinations.

In addition to his scientific studies, Professor Wasser performs a number of public and social activities. He is a founder and editor-in-chief of three international journals, International Journal of Medicinal Mushrooms (USA), Algologia (Ukraine), and International Journal on Algae (USA). He is organizer together with Professor S-T. Chang and late Professor T. Mizuno of world international medicinal mushrooms conferences (first was held in 2001 in Kiev, Ukraine and forthcoming 9th IMMC will held in September 2017, in Italy).

С.П. ВАССЕР

**Институт эволюции Хайфского университета, Израиль
Институт ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины**

НАУКА О ЛЕКАРСТВЕННЫХ ГРИБАХ: СОВРЕМЕННЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ, ДОСТИЖЕНИЯ И ПРОБЛЕМЫ

Главная цель настоящего обзора сфокусирована на представлении современных перспектив, достижений, фактов, проблем и путей развития науки о лекарственных грибах в 21 веке. В общем, для лекарственных шляпочных и микроскопических грибов известно около 130 фармакологических эффектов, включая противоопухолевый, иммуномодулирующий, антиоксидантный, захватывающий свободные радикалы, кардиоваскулярный, снижающий холестерин, противовирусный, антибактериальный, противопаразитный, противогрибковый, детоксифицирующий, гепатопротекторный, и противодиабетический. Известно, что базидиомицеты являются продуцентами биологически активных веществ, которые содержатся не только в плодовых телах, но и в мицелии, и культуральной жидкости при культивировании.

Особое внимание уделено грибным полисахаридам и различным вторичным метаболитам. Обобщены результаты исследований о полисахаридах около 700 видов высших Hetero- и Homobasidiomycetes. Описаны многочисленные биологически активные полисахариды и полисахаридпротеиновые комплексы из лекарственных грибов, обладающие способностью повышать врожденный и клеточный иммунный ответы, а также выраженной противоопухолевой активностью у животных и людей, в то время как механизм их противоопухолевого действия до сих пор полностью не раскрыт, в центре внимания находятся вопросы стимулирования и модуляции ключевого иммунного ответа на эти грибные соединения. Полисахариды и низкомолекулярные вторичные метаболиты чрезвычайно важны ввиду присущим им противораковым и иммуностимулирующим свойствам. Некоторые из этих грибных веществ, прошедшие I, II и III фазу клинических испытаний, в настоящее время широко и успешно применяются в Азии для лечения различных видов рака и других

заболеваний. Особое внимание уделено многим важным нерешенным вопросам науки о лекарственных грибах.

Ключевые слова: лекарственные грибы, антиоксидантная активность, полисахариды, β -глюканы, противоопухолевая активность, иммуномодулирующее действие, вторичные метаболиты

Использование грибов в традиционной народной медицине датируется, по крайней мере, эрой неолита. В течение тысячелетий сформировался опыт человечества в отношении съедобности и лекарственного использования грибов.

Современные исследования проверили и документально подтвердили большую часть древних знаний о лекарственных шляпочных грибах (ЛШГ). В последние три десятилетия междисциплинарное поле научных исследований, сфокусированное на изучении ЛШГ, развивается и все больше и больше, демонстрируя мощные и уникальные свойства веществ, выделенных из ряда видов грибов. Современная клиническая практика в Японии, Китае, Корее, России и некоторых других странах использует препараты грибного происхождения (Reshetnikov et al., 2001; Van Griensven, 2009; Wasser, 2010; Chang, Wasser, 2012).

Древние восточные традиции подчеркивают важность некоторых видов шляпочных грибов, а именно лингчи или рейши (*Ganoderma lucidum* (W. Curt. : Fr.) P.Karst.) и шиитакэ (*Lentinus edodes* (Berk.) Singer). Шляпочные грибы также играют важную роль в лечении жителей сельской местности восточноевропейских стран. Наиболее важными видами в этих странах являются *Inonotus obliquus* (Pers.: Fr.)Pilát (чага), *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.)Bond. et Singer (трутовик лекарственный), *Piptoporus betulinus* (Bull. :Fr.) P.Karst. (березовый трутовик) и *Fomes fomentarius* Fr.:Fr. (трутовик настоящий) (Chang, Wasser, 2012; Pöder, 2005). Эти виды применяют для лечения желудочно-кишечных заболеваний, различных форм рака, бронхиальной астмы, ночной потливости и пр. Длительная история традиционного использования грибов в качестве лекарственных средств известна в Центральной Америке (особенно видов рода *Psilocybe*), Африке (племенами йоруба в Нигерии и Бенине), Алжире и Египте.

Хорошо известна особая роль Мухомора красного (*Amanita muscaria* (L.: Fr.) Pers.) в сибирском и тибетском шаманизме, буддизме и кельтских

мифак (Reshetnikov et al., 2001; Van Griensven, 2009; Chang, Wasser, 2012; Wasson, 1968).

В настоящее время ЛШГ используются как (А) – диетическая пища (в 2012 г. мировое производство культивируемых грибов составило 30 миллионов тонн); (В) – пищевые добавки (ПД) (быстрорастущий рынок грибных пищевых добавок на современном этапе оценивается более, чем в 18 миллиардов \$ (США) ежегодно; (С) – новый класс лекарств, названных «грибными фармацевтиками»; (D) – природные агенты биоконтроля в защите растений с инсектицидной, фунгицидной, бактерицидной, гербицидной, противонематодной и антифитовирусной активностью; (Е) – космецевтики, ввиду того, что косметические компании широко используют различные вещества ЛШГ, включая полисахариды, в частности водорастворимые β -глюканы, глюкуронооксиломаннаны, сахахитин (полисахарид-хитиновый конъюгат), тирозиназу и другие ферменты для улучшения пленкообразующих свойств, активации эпидермального фактора роста, антиоксидантного, антиаллергического, антибактериального и противовоспалительного действия, стимуляции образования коллагена, ингибирования аутоиммунного витилиго и лечения акне (Wasser, 2010; Chang, Wasser, 2012; Hyde et al., 2010; Lindequist, 2013).

Лекарственные шляпочные грибы сопоставимы с лекарственными растениями и могут быть определены как макроскопические грибы, главным образом, высшие базидиомицеты и некоторые аскомицеты, которые используются в форме экстрактов или порошков для профилактики, облегчения или лечения болезни, и (или) для обеспечения сбалансированной здоровой диеты. Подобно определению «препараты из лекарственных растений» («herbal drugs»), сухие плодовые тела, мицелий, споры могут рассматриваться как «препараты из лекарственных грибов» («mushroom drugs») или грибные препараты («fungal drugs»). Аналогично термину «фитофармацевтики» или «растительные препараты», в данном случае могут использоваться термины «грибные фармацевтики» или «грибные препараты».

Грибы вообще и шляпочные грибы, в частности, чрезвычайно многочисленны, разнообразны и распространены повсеместно. Последние оценки численности грибов на Земле находятся в пределах от 500 000 до более, чем 5 миллионов видов. В общем, принято считать, что их 1,5 миллиона согласно докладу пятнадцатилетней давности (Hawksworth,

2001). До настоящего времени уже предполагают, что их количество, по крайней мере, 3 миллиона видов (Hawksworth, 2012). В то же время лишь по 000 видов грибов были описаны. Эта цифра основана на общем количестве видов, добавленных в каждый род, приведенный в последнем издании Dictionary of Fungi (Kirk et al., 2008), опубликованных в предыдущие годы (Hawksworth, 2012; Blackwell, 2011; Bass, Richards, 2011) и включает организмы, традиционно изучаемые микологами: миксомицеты, хромисты, хитридиомицеты, мицелиальные грибы, лишенообразующие грибы, плесневые грибы и дрожжи. Исходя из этого, шляпочные грибы представлены 16 тыс. видов, вошедшими в издания Dictionary of Fungi предыдущих лет (Kirk et al., 2008). Предполагается, что число видов шляпочных грибов в мире на данный момент насчитывает 150 000 - 160 000; и пока только 10 % от названного количества известно науке (Wasser, 2010; Hawksworth, 2001, 2012; Kirk et al., 2008). Анализ локалитетов, с которых грибы известные науке, были описаны и каталогизированы в Index of Fungi за последние 10 лет показал, что около 60 % всех этих новоописанных грибов являются тропическими видами. Это также касается и шляпочных грибов, особенно видов, образующих эктомикоризу с природными деревьями, хотя новые виды продолжают открывать и в Европе, и в Северной Америке. В различных тропических зонах 22-55 % (в некоторых случаях до 73 %) видов грибов еще не описаны (Hawksworth, 2001, 2012; Bass, Richards, 2011). Приблизительно реальное число видов грибов, существующее на Земле, может быть в пятьдесят раз выше, чем данные, основанные на текущих подсчетах. Современные методы секвенирования делают возможным предположение, что существует, по крайней мере, 5 миллионов видов грибов (Blackwell, 2011). Следовательно, нам потребуется более 4 тысяч лет для описания этого биоразнообразия видов грибов, основанного на современных темпах открытия, составляющих около 1200 новых видов в год (согласно данным за последние 10 лет (Hibbett, Taylor, 2013)). Данные также показывают, что мы хорошо осведомлены приблизительно об 1 % мировой микобиоты и только о 10 % мирового биоразнообразия шляпочных грибов (Wasser, 2010; Chang, Wasser, 2012).

Специалисты по таксономии некоторых групп лекарственных шляпочных грибов хорошо знают «общеизвестные» виды, однако некоторые из их биохимических и фармакологических особенностей остаются до настоящего времени неизвестными. С. П. Вассер представил

обобщенные сведения о фармакологических свойствах около 700 из 2000 хорошо известных и безопасных видов (Wasser, 2010). Это лишь показывает, что уровень современных знаний свидетельствуют об огромном потенциале биоразнообразия лекарственных грибов.

Шляпочные грибы в настоящее время оценивают не только по их питательной ценности и биологической доступности, но и по фармакологическим свойствам. Они представляют собой огромный, и в то же время нереализованный источник новых мощных фармацевтических продуктов. Чрезвычайно важным для современной медицины является то, что ЛШГ представляют собой неисчерпаемый источник полисахаридов (особенно β -глюканов) и полисахаридпротеиновых комплексов, обладающих противораковым и иммуностимулирующими свойствами. Большинство, если не все, высшие Basidiomycetes содержат много различных биологически активных высокомолекулярных и низкомолекулярных соединений (тритерпены, лактоны, алкалоиды и другие метаболиты) в плодовых телах, культуральном мицелии и культуральной жидкости (Wasser, 2010; Chang, Wasser, 2012; Anke, 1989; Zaidman et al., 2005; De Silva et al., 2013).

Современные достижения и перспективы

Установлено, что грибы (ЛШГ и микромицеты) имеют около 130 фармакологических назначений. Недавно изученные лекарственные свойства шляпочных грибов включают противоопухолевый, иммуномодулирующий, антиоксидантный, улавливающий свободные радикалы, кардиоваскулярный, снижающий холестерин, противовирусный, антибактериальный, противопаразитный, противогрибковый, детоксикантный, гепатопротекторный и антидиабетический эффекты. Лучшее применение препаратов из ЛШГ и грибных пищевых добавок заключается в предотвращении и лечении нарушений иммунитета, особенно у иммунодефицитных больных и пациентов с иммунодепрессивными синдромами, ЛШГ-препараты также полезны для онкобольных после курсов химио- или радиотерапии, в случаях различных типов опухолей, хронических вирусных заболеваний крови (гепатитов В, С и D), при различных типах анемий, заболеваниях ВИЧ/СПИД, вирусе герпеса, синдроме хронической усталости, вирусе Эпштейна-Барра, для пациентов с хроническим гастритом и язвой

желудка, вызванной *Helicobacter pylori*, для больных деменцией (особенно в случае болезни Альцгеймера)(Wasser, 2010; Chang, Wasser, 2012; Dai et al., 2009; Lo, Wasser, 2011; Didukh, Wasser, 2003).

Грибные полисахариды предотвращают онкогенез, оказывают прямое противоопухолевое действие на различные синергетические опухоли, предотвращают образование метастазов. Их активность особенно успешна в случае применения их в сочетании с химиотерапией. Для противоопухолевого действия полисахаридов необходимы компоненты интактных Т-клеток, их активность осуществляется посредством тимусзависимого иммунного механизма. Они активируют цитотоксические макрофаги, моноциты, нейтрофилы, природные клеточные киллеры, дендритные клетки и химические мессенджеры (цитокины, интерлейкины, интерфероны, и колониестимулирующие факторы), которые запускают систему комплемента и ответы острой фазы. Кроме того, полисахариды ЛШГ можно рассматривать как мультицитокиновые индукторы, способные индуцировать экспрессию генов различных иммуномодулирующих цитокинов и цитокиновых рецепторов (Wasser, 2010; Chihara et al., 1970; Zhang et al., 2007, 2011, 2013; Lee, Kim, 2014).

Рак, вероятно, всегда существовал в человеческой цивилизации, эта болезнь, вероятно, так же стара, как сама жизнь. О наличии рака свидетельствуют данные анализов черепа неандертальца (35 тыс. лет до н.э.), египетских и инкских мумий (Barillot et al., 2013). Рак – это общий термин, включающий сотни различных типов этих заболеваний, развивающихся в теле. Таким образом, это общее название, используемое для злокачественных новообразований.

Новые цифры и прогнозы глобального бремени рака, представленные в новом издании Мирового доклада по раку (World Cancer Report (Stewart, Wild, 2014)), резко подчеркнули проблему роста случаев заболевания раком от 12,7 млн в 2008 г. до 14,1 млн в 2012 г. Эта тенденция, по прогнозам, продолжится с увеличением в будущем числа новых случаев до 75 %. Для мужчин среди пяти наиболее часто диагностируемых видов болезни в 2012 г. были рак легких (16,7 % от общего количества), простаты (15 %), прямой кишки (10 %), желудка (8,5 %) и печени (7,5 %), заболевание раком легких было наиболее частым (34,2 случая на 100000), раком простаты – 31,1 случай на 100000. У женщин наиболее уязвимыми для рака

являются – молочная железа (25,2 % от общего количества случаев), прямая кишка (9,2 %), легкие (8,7 %), шейка матки (7,9 %) и желудок (4,8 %). При этом рак молочной железы встречается гораздо чаще – 43,3 случая на 100000, чем другие виды рака, следующий пик наблюдается у рака прямой кишки (14,3 на 100000). Среди большинства неинфекционных болезней (четыре основных группы заболеваний – сердечно-сосудистые, хронический диабет, органов дыхания и рак) на национальном, региональном и глобальном уровнях, за последние несколько лет рак становится основной причиной смерти (Stewart, Wild, 2014).

Предполагают, что в этом году общее число новых заболеваний раком составит 40 млн. По оценке ВОЗ 84 млн. людей умрет от рака в период 2005-2015 гг. Рак убивает больше людей, чем СПИД, малярия и туберкулез вместе взятые. Более того, в Китае и Индии (наиболее густонаселенные страны), также возрастает смертность от рака, в большой степени, обусловленная курением, питанием и экологическими проблемами. В глобальных масштабах, по оценке ВОЗ, ожидаемая смертность от рака в 2030 г. достигнет 17 млн. человек в год (Stewart, Wild, 2014).

Препараты из лекарственных грибов и полисахариды ЛШГ показывают положительные результаты в лечении опухолей *in vitro* и *in vivo*. Новый класс противоопухолевых грибных лекарственных препаратов был назван модификаторами биологического ответа (МБО). МБО используются как как сопроводительная терапия в лечении рака в хирургии, химиотерапии и радиотерапии (Wasser, 2010; Chang, Wasser, 2012; Zhang et al. 2011, 2013; Lee, Kim, 2014; Mizuno, 1999). Главная проблема, вызванная лечением онкологических заболеваний, особенно при химиотерапии и радиотерапии, - повреждение или ослабление природных иммунологических реакций пациента. Грибные МБО в лечении онкологических заболеваний сфокусированы на улучшении качества жизни больных, ввиду того, что они уменьшают побочные эффекты и помогают подавить рост опухоли. Большинство из этих препаратов активируют природные иммунные ответы организма и могут использоваться как поддерживающая терапия для профилактики рака и, в некоторых случаях, наравне с основным лечением.

Иммуоцевтики, полученные более чем из 30 видов лекарственных грибов, показали противоопухолевую активность в лечении животных.

Однако, лишь немногие из них были протестированы относительно их противораковой активности для человека. Некоторые из протестированных препаратов представляют собой β -d-глюканы и β -d-глюканы, связанные с протеинами. Более того, последние демонстрируют значительно большую иммунопотенцирующую активность, чем свободные глюканы. Проведено несколько клинических испытаний, подтвердивших ингибирующий эффект на рост опухоли *L. edodes*, (Chihara et al. 1970; Zhang et al., 2011; Hobbs, 2000) *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) Gray, (Zhuang, Wasser, 2004; Boh, Berilivic, 2007) *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. (Zhang et al., 2013; Hobbs, 2005) *Ganoderma lucidum*, (Lin, 2009; Mahajna et al., 2010) *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Lloyd (Hobbs, 2004) *I. obliquus*, (Mizuno et al., 1999; Balandykin, Zmitrovich, 2014) *Phellinus linteus* (Berk. et M.A. Curt.) Teng, (Hsieh et al., 2013) *Flammulina velutipes* (W.Curt.:Fr.) Singer, (Maruyama, Ikekawa, 2007) *Hypsizyguis marmoreus* (Peck) Bigel., (Matsuzawa, 2006) *Ophicordyceps* (=Cordyceps) *sinensis* (Berk.) G. H. Sung et al., (Holliday, Cleaver, 2008) *Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al. (=Agaricus *blazei* sensu Heinem.), (Wasser et al., 2002, 2005) and *Tremella mesenterica* Retz.: Fr. (Lo, Wasser, 2011; Lachter et al., 2012). Грибные иммуноцевтики действуют, главным образом, путем улучшения иммунной системы хозяина. Этот процесс включает активацию дендритных клеток, НК-клеток (Natural Killer), Т-клеток, макрофагов и выработку цитокинов. Некоторые фармакологические продукты (вещества) из лекарственных грибов, главным образом, полисахариды (особенно β -глюканы), были разработаны для клинических и коммерческих целей: Крестин (PSK) и PSP (полисахарид-пептид) из *T.versicolor*; Лентинан, изолированный из *L. edodes*; Шизофиллан (Сонифилан, Шизофиран, или SPG) из *S. commune*; Бифунгин – из *I. obliquus*; D-фракция – из *G. frondosa*; GLPS-полисахаридная фракция из *G. lucidum*; активное соединение, связанное с гексозой (АНСС) и многие другие.

Среди других грибных компонентов, представляющих терапевтический интерес, - вторичные метаболиты, особенно низкомолекулярные компоненты, такие как лактоны, терпеноиды и алкалоиды, антибиотики различных химических групп, металл-хелатирующие агенты, которые также важны для иммунной функции организма. Лекарственные грибы также содержат множество ферментов, таких как лакказа, супероксиддисмутаза, глюкозооксидазы и пероксидазы.

Было показано, что ферментная терапия играет важную роль в лечении рака путем предотвращения окислительного стресса и ингибирования клеточного роста (Wasser, 2010; Zaidman et al., 2005).

Было документально показано, что грибы продуцируют огромное число биологически активных веществ, которые не только стимулируют иммунную систему, но и модулируют специфические клеточные ответы путем вмешательства, в частности, в пути трансдукции. Например, фенетиловый эфир кофейной кислоты (CAPE), который специфически ингибирует связывание ядерного фактора каппа В с ДНК активируя В-клетки (NF- κ B), и демонстрирует многообещающие результаты в лечении MCF-7 клеток рака груди, продуцируется *Agaricus bisporus* (J.Lge) Imbach, *Marasmius oreades* (Bolt.) Fr., *L. edodes* и *Ph. linteus*. Кроме того, стало известно, что метанольный экстракт *Fomes fomentarius* ингибирует экспрессию индуцибельной нитрооксидсинтазы (iNOS) и циклогенезы (COX) путем регуляции активности связывания ядерного фактора каппа В с ДНК. Панопоксидон – вещество, выделенное из видов р. *Rapus* (найденное также у *Lentinus crinitus*) влияет также на опосредованный ядерным фактором каппа В ответ путем ингибирования фосфорилирования ингибиторных белков каппа В. Эти данные показывают, что подобные вещества могут использоваться в качестве молекулярной мишени в злокачественных клетках при лечении рака. Ввиду низкого молекулярного веса (размера), позволяющего этим веществам проникать сквозь клеточные мембраны, они классифицированы как низкомолекулярные компоненты, среди них есть лектины, лактоны, терпеноиды, алкалоиды, антибиотики и металл-хелатирующие вещества. На современном этапе для многих грибов уже известны разнообразные метаболиты, способные модулировать различные внутриклеточные процессы, что играет важнейшую роль в лечении онкологических заболеваний (Wasser, 2010; Chang, Wasser, 2012; Zaidman et al., 2005; Yassin et al., 2008; Petrova et al., 2009; Rouhana-Toubi et al., 2009; Dotan et al., 2011; Ruimi et al., 2010a,b).

В настоящее время известно благоприятное воздействие ЛШГ не только в качестве фармакологических препаратов, но и как продуктов нового класса, имеющих ряд различных названий: диетические, или пищевые добавки (dietary supplements), функциональные продукты, нутрицевтики, микофармацевтики и дизайнерская пища, включающая

пробиотики и пребиотики, оказывающие благоприятное воздействие на здоровье при ежедневном употреблении в пищу.

Грибные пищевые добавки непосредственно не используются как фармацевтические продукты, они производят оздоровительный эффект при ежедневном использовании в составе здоровой диеты.

Сегодня на рынке доступны несколько типов грибных пищевых добавок:

1. Порошок из культивируемых плодовых тел, кипяченые или спиртовые экстракты этих плодовых тел
2. Сушеные и измельченные препараты из сочетания субстрата, мицелия и грибных примордиев
3. Биомасса или экстракты из мицелия, полученного методом глубинного культивирования в погруженной культуре в ферментерах, или биореакторе
4. Дикорастущие высушенные плодовые тела грибов в виде капсул, или таблеток
5. Споры и их экстракты

Возросший интерес к традиционным методам лечения различных физиологических нарушений и признание многочисленных биологических эффектов у грибных продуктов привело к образованию термина «грибные нутрицевтики», который не следует путать с нутрицевтиками, функциональной пищей и фармацевтиками. Грибные нутрицевтики – это очищенный, или частично очищенный экстракт, или сухая биомасса грибного мицелия или плодового тела, который используется в виде капсул или таблеток как пищевая добавка (не пища) и имеет потенциальное терапевтическое применение. Регулярное употребление может повысить иммунный ответ человеческого организма, увеличить сопротивляемость к болезни и, в некоторых случаях, вызвать регрессию болезненного состояния. Таким образом, действуя как иммунопотенциаторы, препараты из ЛШГ способны модифицировать биологические ответы хозяина (также известны как модификаторы биологического ответа).

Нет никакого сомнения, что продукты на основе ЛШГ являются прекрасными диетическими добавками. Быстрорастущий рынок грибных ПД оценивается в 18 млрд долларов США (представляя 10 % всего рынка БАДов). С каждым годом растет количество новых данных о

благоприятных эффектах пищевых добавок из ЛШГ (Chang, Wasser, 2012). В настоящее время на рынке доступен новый продукт из ЛШГ для лечения деменции (особенно болезни Альцгеймера), разработанный на собственных стандартизованных экстрактах, содержащий герициноны и амилобан (оба компонента из гриба *Hericium erinaceus* – «львиная грива»). Стоимость лишь пищевых добавок из *Ganoderma*, *Ophiocordyceps* и *Cordyceps* составляет более 4 млрд долларов США в год.

Очевидные факты, вопросы и нерешенные проблемы

С одной стороны, наука о лекарственных грибах совершила гигантский прорыв за последние тридцать лет. Действительно успешная новая отрасль науки (науки о лекарственных грибах) была признана.

Были разработаны новые классы лекарств и различные типы продуктов из ЛШГ. Был организован единственный в данной отрасли журнал – Международный журнал лекарственных грибов (International Journal of Medicinal Mushrooms, Издательство Begell House, США). Раз в два года проводится Международная конференция по лекарственным грибам, следующая (восьмая по счету) состоится в августе 2015 г. в Колумбии. Новое Международное Общество по лекарственным грибам зарегистрировано в 2013 г. в Канаде.

Опубликованы результаты около 400 клинических испытаний с использованием лекарственных грибов в лечении различных заболеваний. До настоящего времени по данной теме опубликовано более 50 тыс. статей и получено около 15 тысяч патентов, касающихся различных аспектов исследований лекарственных грибов. С 2005 г. ежегодно регистрируется 250-350 патентов для *G.lucidum* (Boh, 2013). Тайванские ученые получили более 100 патентов на один из видов рода *Antrodia*.

С другой стороны, есть ряд нерешенных, очень серьезных проблем в будущем науки о ЛШГ, которые, в свою очередь, могут повлиять на развитие этой науки в 21 веке. Ниже приведены наиболее значимые проблемы в развитии науки о лекарственных грибах.

Таксономия и номенклатура

Отец биологической номенклатуры, профессор К. Линней, 300 лет назад написал: “*Nomina si nescis, perit et cognito rerum*” - “Если не знаешь названия вещи, невозможно познать ее суть».

Многим видам ЛШГ нужна критическая обработка. Без верного научного названия ЛШГ, их будущие исследования не будут законными и, соответственно, не будут иметь никакой ценности. Наряду с классическими таксономическими методами, такой молекулярный метод как определение штрих кода ДНК (DNA barcoding) может быть удобным и полезным для правильной идентификации видов ЛШГ и стандартизованных продуктов из них. Например, в настоящее время стало очевидным, что большинство видов, ранее принятых в качестве лингчи, или рейши (*G. lucidum*) в большинстве фармакологических исследований, были идентифицированы неверно. *G. lucidum* представляет собой таксон-линнеон или комплекс видов, будущее разделение которого нуждается в осторожном подходе (Wasser et al., 2006). Публикации, патенты и продукты также находятся «в группе риска». За все время в мире были описаны, по крайней мере, 166 лаккатов видов рода *Ganoderma* (Moncalvo, Rivarden, 1997). Около сотни видов р. *Ganoderma* известны из Китая (Zhao, 1989). До сих пор, например, не известно таксономическое положение так называемого медицинского голубого лингчи, красного или белого лингчи.

Следует отметить еще один важный момент: Као с коллегами опубликовали данные, согласно которым так называемая *G. lucidum* из Китая представляет собой нечто совершенно иное, чем *G. lucidum*, найденная и описанная в Европе. Поэтому эти авторы вводят новый для микобиоты Китая вид – *Ganoderma lingzhi* Sheng (H.Wu, Y. Cao et Y.C. Dai., 2012). Это привело к еще большим проблемам и путанице. Кто знает, какой именно вид рода *Ganoderma* является лекарственным? Какой вид лингчи является китайским национальным грибом – *G. lucidum* или *G. lingzhi*? Никто не знает...

Янг и Фенг опубликовали специальный мини-обзор, посвященный этой проблеме «Что такое китайский лингчи?» (Yang, Feng 2013). Молекулярно-филогенетические анализы, основанные на анализе последовательностей ITS и 25 S рДНК свидетельствуют о том, что большинство сборов, называемых *G. lucidum* в Восточной Азии не конспецифичны с *G. lucidum*, найденной в Европе (Yang, Feng, 2013).

Кроме того, в 2012 г. в “Nature Communications” группой ученых были опубликованы материалы, посвященные геномной последовательности модельного лекарственного гриба *G. lucidum* (Chen et al., 2012). Авторами было определено, что размер генома *G. lucidum* составляет 43,3 Мб (миллионов пар оснований) и, по анализу нуклеотидных последовательностей, геном содержит 16,133 генов. Данные были получены с использованием нового поколения методов секвенирования и оптических методов анализа. Однако, эта очень важная публикация не решает проблемы комплекса видов *G. lucidum* ввиду того, что авторы изучили один дикариотический штамм CGMCC5.0026, принадлежащий азиатской группе *G. lucidum* из Китая, который был провозглашен новым для науки видом - *G. lingzhi*.

Другой пример ошибочной идентификации был показан для *Agaricus blazei*, хорошо известного по литературным данным лекарственного гриба. *A. blazei* – эндемичный вид Северной Америки, описанный только из трех локалитетов и не существующий в культуре, ввиду чего он не может быть отнесен к лекарственным видам. Имеется две различных точки зрения по поводу этого вида: *Agaricus blazei sensu* Murrill, известен из трех локалитетов США, и *A. blazei sensu* Heinem., известен из Бразилии и культивируемый в Японии (Wasser et al., 2002, 2005). Мы изучили типовой материал *A. blazei sensu* Murrill, *A. blazei sensu* Heinem., *A. subrufescens* из Нью-Йоркского ботанического сада (NY) и другие виды этой группы, как и культивируемые штаммы из разных стран, так и природный материал из Бразилии. *A. blazei sensu* Murrill и *A. blazei sensu* Heinem. представляют собой два разных вида.

A. blazei sensu Murrill отличается от *A. blazei sensu* Heinem. размером и формой плодовых тел, поверхностью шляпки, типом шляпочных покровов, наличием хейлоцистид и размером спор. Было установлено, что широко культивируемый съедобный и лекарственный вид, известный как *A. blazei* не имеет ничего общего с *A. blazei*, описанным Муррилом из США, поэтому он был описан как новый для науки вид *A. brasiliensis* (Wasser et al., 2002, 2005). В настоящее время *A. blazei* не рассматривается среди съедобных лекарственных видов. Позже с помощью морфологических и молекулярно-биологических исследований было подтверждено различие между *A. blazei* и *A. brasiliensis* (Wasser et al., 2005). Результаты П. Керригана (Kerrigan, 2005) и наши данные (Wasser et al.,

2002, 2005; Wasser, 2007), представленные в нескольких публикациях последних лет, прояснили отличия между *A. brasiliensis*, *A. subrufescens*, *A. fiardii*, *A. praemagniceps* и *A. blazei*. В настоящее время эти виды классифицированы по четким морфологическим, молекулярным и биологическим признакам и различному географическому распространению. Таким образом, ошибочная классификация *A. blazei*, создавшая много проблем в науке о лекарственных грибах, к настоящему времени исправлена. Хочу обратить внимание также на неправильное использование названия *A. blazei* для лекарственного и съедобного гриба – королевского шампиньона (*Royal Sun Agaricus*), или гриба гимематсутаке. Следует повторить, что *A. blazei* не является лекарственным грибом, этот вид не культивируется и известен только из трех местообитаний в США. В то же время, к сожалению, во многих публикациях, включая и китайские, ученые продолжают использовать неправильное название *A. blazei* вместо *A. brasiliensis* для королевского шампиньона (*Royal Sun Agaricus*).

Исследование съедобных лекарственных шляпочных грибов в чистой культуре

Следует уделять больше внимания исследованию съедобных ЛШГ в чистой культуре. Изучение культур является необходимым условием для обеспечения стабильности и преемственности научной работы. Телеоморфная стадия является самым главным критерием в идентификации культур, однако довольно часто ЛШГ не образуют плодовые тела в чистой культуре. В специальной микологической литературе слишком мало внимания уделено вегетативной стадии ЛШГ. Много видов ЛШГ невозможно правильно идентифицировать без изучения вегетативной стадии. Вегетативный мицелий культур ЛШГ представляет собой комплекс ветвящихся гиф, отличающихся только в узких пределах шириной, длиной, числом ядер, толщиной клеточной стенки и разветвленностью. Обобщение информации по возрастающему числу исследований вегетативного мицелия обеспечит новый материал для изучения и сравнения морфологических характеристик мицелия для потенциальной оценки его использования в целях таксономии и контроля чистоты в биотехнологических процессах (Wasser, 2010; Chang, Wasser, 2012; Buchalo et al., 2009). Так как нет типовых штаммов ЛШГ, нам необходимо выбрать правильно идентифицированные типовые штаммы

многих видов ЛШГ. Мы должны организовать Всемирную коллекцию съедобных ЛШГ с депозитарной деятельностью, основанной на процедурах патентования согласно Будапештскому Договору. Данную проблему следует обсудить с Всемирной федерацией коллекций культур.

Проблемы пищевых добавок из лекарственных шляпочных грибов

В последние годы возросла популярность производства грибной биомассы или различных экстрактов в виде пищевых добавок, функциональных продуктов и новых пребиотиков (нерастворимых β -D-глюканов). Наиболее важные вопросы, возникающие при создании пищевых добавок и функциональных продуктов, являются их безопасность, стандартизация, регулирование, эффективность и механизм действия.

К сожалению, во всем мире стандартизация пищевых добавок из ЛШГ находится на самых ранних этапах становления, учитывая и недостаточное понимание биоактивных эффектов этих добавок. До настоящего времени у нас нет международно-признанных стандартов и протоколов для производства и тестирования продуктов из ЛШГ. Только соблюдение стандартов и протоколов может гарантировать качество продукта. Без соблюдения необходимого качества продуктов из ЛШГ, доступные коммерческие препараты ЛШГ будут совершенно разными и колоссально отличаться по составу и эффективности. Не известно, вызваны ли биологически активные эффекты каким-либо единственным компонентом, или синергетическим воздействием нескольких составляющих. Недостаточно данных о том, какие компоненты имеют лучший эффект – полученные из плодовых тел, или из культурального мицелия. Являются ли просто высушенные плодовые тела и грибной порошок столь же эффективными, как и водные, спиртовые и спиртоводные экстракты? Каковы различия между сырыми экстрактами и изолированными фракциями, что является более эффективным и имеет большую степень безопасности (некоторые компании продают фракции типа *G. frondosa* майтаке D – фракция, или GLPS фракции *G. lucidum*)? Роль низкомолекулярных соединений экстрактов ЛШГ также до сих пор не ясна.

Что является более эффективным – сочетание компонентов, содержащихся в биомассе или экстрактах из 2-10 различных видов

лекарственных грибов в одной таблетке, или же только один вид ЛШГ в ней? Как оценить эффективность различных грибных компонентов в таком «сборном» грибном продукте (эффект «дробовика»)? Так как грибные продукты могут быть стимуляторами цитокинов возникает вопрос о возрасте ребенка, с которого возможно их безопасное назначение, поскольку иммунная система детей еще не достаточно сформирована.

Данные об используемых дозах достаточно противоречивы. Предлагаемые дозировки очень различны в зависимости от различных форм и составов. Многочисленные клинические исследования подтверждают, что 6 капсул (по 3 два раза в день, или по 2 трижды в день), по 500-1000 мг каждая (биомасса, или сухой порошок), являются принятой дозировкой препаратов ЛШГ. Согласно традиционной китайской медицине (ТКМ), стандартная доза сушеных плодовых тел или биомассы ЛШГ в день в различном виде (таблетки, капсулы, жидкие экстракты) должна быть эквивалентна приблизительно 100-150 г свежего грибного продукта.

Какие дозировки безопасны и эффективны при беременности и грудном вскармливании? Отсутствие и недостаточно разработанные стандарты рекомендаций по использованию грибных добавок из ЛШГ, а также точные дозировки и длительность применения, свидетельствуют о необходимости очень серьезных исследований. Некоторые исследования показали, что передозировка может привести к иммунной супрессии, а слишком низкие дозы могут вообще «не запустить» иммунный ответ.

Более того, самые большие проблемы, связанные с грибными пищевыми добавками, обусловлены их чрезвычайным разнообразием и отсутствием в настоящее время стандартов производства и протоколов тестирования, необходимых для гарантии качества продукции. Активные ингредиенты (действующее начало) многих ныне существующих коммерческих продуктов не идентифицированы.

Из-за отсутствия стандартов для производства и качества коммерчески доступные грибные препараты из одних и тех же видов грибов и штаммов значительно отличаются по составу и эффективности. Фальсификация ЛШГ продуктов за счет подобных или ложных видов (например, различных видов р. *Ganoderma* вместо *G. lucidum*, видами р. *Stereum* вместо *Trametes versicolor*, *Cordyceps* spp. и даже различными

анаморфными видами *Cordyceps* вместо *Ophiocordiceps sinensis*) является достаточно распространенным явлением.

Существуют определенные трудности в производстве чистых β -глюканов для рынка (90-95 % β -глюканов на рынке – контрафактные, или поддельные). Фальсификация может привести к нефропатии, острому гепатиту, лихорадке и коме (Wasser, 2010; Chang, Wasser, 2012; McKenna et al., 2002).

Таким образом, мы до сих пор имеем неразрешенные проблемы, касающиеся безопасности некоторых хорошо известных ЛШГ продуктов. Например, на основе проведенных исследований воздействия полисахаридных фракций *G. frondosa* на больных с I-II стадией рака груди, было показано, что маитакэ обладает сложным комплексным эффектом, которых может как подавлять, так и повышать иммунную функцию (Deng et al., 2009).

Какова роль употребления свежих грибов? Было показано, что употребление свежих грибов может, например, привести к появлению анти- β -глюкановых антител в сыворотке крови человека. Группа Ohno из Японии также подтвердила, что потребление свежих грибов может обеспечить лучшую защиту от патогенных грибов (Ishibashi et al., 2005).

Натуральные продукты из лекарственных шляпочных грибов – не востребовавшийся источник открытия новых лекарств

Разработка существующих иммуномодулирующих и противораковых лекарств из полисахаридов ЛШГ (таких как Лентинан, Шизофиллан и Крестин) была затруднена тем фактом, что использовали высокомолекулярные вещества (Zhang et al., 2011, 2013). Все ЛШГ-препараты были разработаны на основе полисахаридов с высоким молекулярным весом, от 100000 до 0,5 млн Дальтон. Эти вещества невозможно синтезировать, более того, их производство ограничивается экстракцией из плодовых тел, культурального мицелия, или культуральной жидкости. Такой подход диктует высокие рыночные цены. На сегодняшний день науке целесообразно сосредоточиться на исследовании благоприятных эффектов низкомолекулярных веществ, продуцируемых ЛШГ (так называемые низкомолекулярные вторичные метаболиты, воздействие которых – нацелено на процессы апоптоза, ангиогенеза, метастазирования, регуляции клеточного цикла, и каскадной передачи сигнала)(Zaidman et

al., 2005). Западные фармацевтические компании более заинтересованы в относительно легко синтезируемых веществах, которые можно производить для рынка.

Исторически сложилось так, что большинство новых лекарств было получено из натуральных продуктов (вторичных метаболитов). ЛШГ – не востребовавшийся источник для открытия новых лекарств. К 1990 г. около 80 % лекарств были либо природного происхождения, либо их аналогами. «Блокбастеры лекарств», такие как антибиотики (пенициллин, тетрациклин и эритромицин), противопаразитные средства (авермиктин), антималярийные (хинин, артемизин) препараты, а также препараты, регулирующие липидный обмен (ловастатин и его аналоги), иммуносупрессанты для трансплантации органов (циклоsporин, rapамицины), противораковые лекарства (таксол, доксорубицин) совершили переворот в медицине (Li, Vederas, 2009). Многие из вышеперечисленных лекарств были открыты на основе компонентов грибов.

Современные фармацевтические тенденции в профилактике рака включают разработку лекарств со следующими свойствами: (A) – ингибиторы ростового фактора раковых клеток (такие лекарства как герцептин, эрбитукс и терсева), блокирующие связь раковой клетки с критическими протеинами, которые помогают ей делиться и расти; (B) – блокаторы гормонов (такие препараты, как тамоксифен), удерживающие клетку от деления путем связывания с эстрогеновыми рецепторами (сверхподавление в некоторых опухолевых клетках); (C) – внутриклеточные блокаторы сигналов, нарушающие коммуникацию между ферментами, регулирующими рост и развитие; (D) – ингибиторы ангиогенеза (например, авастин был первым препаратом, ингибирующим за счет ограничения их питания образование новых кровеносных сосудов вокруг раковой клетки (Ammerpohl et al., 2010)). Около 860 противораковых лекарств были протестированы на человеке. Это количество дважды превышает число экспериментальных препаратов для лечения болезней сердца и комбинированных (сложных) инсультов, и приблизительно в два раза больше, чем лекарств от СПИДа и всех других сложных инфекционных заболеваний, и почти в два раза больше, чем для лечения болезни Альцгеймера и других неврологических заболеваний (Pollack, 2009). Согласно исследованиям IMS Health, противораковые препараты

составляют наиболее продаваемую категорию лекарств (в мире с 2006 г., а в США – с 2008 г.). На сегодняшний день будущее фармакологических компаний в форсировании лечения рака. Например, одна из крупнейших в мире фармакологических компаний - Пфайзер (США) в последние десятилетия была сфокусирована на разработке и производстве лекарств для сердечно-сосудистой системы, препаратов, снижающего уровень холестерина – липитора (Endo, 2004) и снижающего кровяное давление – норваска (Pollack, 2009). Не так давно, Пфайзер принял на работу около тысячи исследователей для разработки лекарства от рака, болезни, которую долгое время эта фармацевтическая компания игнорировала. Эта компания теперь сократила разработку сердечно-сосудистых препаратов и сконцентрировалась на разработке противораковых лекарств, как на одном из своих шести главных приоритетов. Около 20 % расходов из более, чем 7 миллиардного бюджета компании Пфайзер выделены на исследования и разработку противораковых лекарств, и уже 22 из сотни, находящихся в разработке, были протестированы как антираковые препараты (Pollack, 2009).

Прогресс в ЛШГ-исследованиях должен включать геномику, протеомику, метаболомику и системную фармакологию. Изучение молекулярных механизмов, обуславливающих лечебные свойства грибов, должно быть в фокусе новых исследований, использующих современные методы и вышеуказанные подходы.

Другой важный источник терапевтически важных веществ из ЛШГ может быть выявлен в производимом ими пуле вторичных метаболитов. Эти вещества классифицируют согласно пяти основным метаболическим путям (16). Это производные синтеза аминокислот, путь биосинтеза шикимовой кислоты для образования ароматических аминокислот, ацетатно-малонатный путь биосинтеза из ацетилкоэнзима А, путь биосинтеза мевалоновой кислоты из ацетилкоэнзима А, который обеспечивает основной синтез стеролов, полисахаридов и пептидополисахаридов. Чаще всего вовлекаются пути образования поликетидов и мевалоновой кислоты и они образуют значительно большее разнообразие компонентов, чем в других путях.

Каждое усилие должно быть направлено на поиск новых источников противораковых препаратов, содержащих низкомолекулярные вторичные метаболиты из ЛШГ, которые ингибируют или запускают специфические

триггерные ответы, например путем активации или ингибирования ядерного фактора Каппа В (яф-кВ), ингибируют протеины, особенно тирозинкиназы, аротатазы и сульфатазы, матриксные металлопротеиназы, циклооксигеназы, ДНК-топоизомеразы и ДНК-полимеразы, антиангиогенные вещества и пр. (Zaidman et al., 2005; Yassin et al., 2008; Petrova et al., 2009; Rouhana-Toubi et al., 2009; Dotan et al., 2011; Ruimi et al., 2010, 2010).

Среди грибных низкомолекулярных веществ, непосредственно влияющих на яф-кВ ингибиторные эффекты – фенитиловый эфир кофеиновой кислоты (CAPE), кордиципин, панопоксидон и циклоэпоксидон. Например, низкомолекулярный CAPE, продуцируемый *Ph. linteus* и *M. oreades*, демонстрирует специфическую цитотоксичность против раковых клеток и ингибиторной активности яф-кВ, может быть потенциальным противораковым лекарством, особенно в случае рака груди (Petrova et al., 2009; Ruimi et al., 2010).

Фармацевтические компании, разрабатывающие новые препараты, нуждаются в источниках новых веществ природного происхождения. ЛШГ являются прекрасным неисчерпаемым даром природы, который за короткое время может быть использован для производства новых фармацевтиков.

Далее я представляю путь открытия новых лекарств, разработанных на этапах:

1. Культивирование грибов и производство биомассы
2. Экстракция биомассы
3. Скрининг грибных экстрактов
4. Эффект выбранных экстрактов на цели поиска
5. Химическое фракционирование выбранных экстрактов
6. Определение активных фракций (компонентов), механизма действия и эффективности (силы препарата)
7. Действие на подопытных животных
8. Доклинические испытания препарата
9. Клинические испытания

Нерешенные проблемы в изучении структурных характеристик, процессов выделения, рецептор-опосредованных механизмов и антиопухолевой активности β -глюканов лекарственных грибов

Успешное использование β -глюканов и других углеводных полимеров требует активных исследований, касающихся определения взаимосвязи «структура-активность» грибных углеводородных полимеров, особенно с точки зрения молекулярной конформации и рецептор-опосредованных механизмов (Lee, Kim, 2014; Chen, Seviour, 2007).

Исследование роли водорастворимости, размера молекул и молекулярного веса, структуры и молекулярных механизмов действия β -глюканов, принимая во внимание, что не все β -глюканы, содержащиеся в ЛШГ, проявляют фармакологическую активность (Zhang et al., 2007; Chen, Seviour, 2007; Ohno, 2005).

До настоящего времени остается не ясной зависимость молекулярного веса β -глюканов от проявляемой ими фармацевтической активности. Недостаточно исследована проблема эффективности высокомолекулярных β -глюканов по сравнению с низкомолекулярными. Наиболее эффективными являются препараты высокомолекулярных склероглюканов (Ohno, 2005). Однако, исключением является низкомолекулярный Лентинан, имеющий высокую противораковую активность (Chihara et al., 1970; Zhang et al., 2007). Также нам следует учитывать различную реактивность β -глюканов в каждом конкретном случае (анти- β -глюкановый титр и возрастание титра под влиянием β -глюкана отличается; реактивность лейкоцитов периферической крови по отношению β -глюканов существенно отличаются в каждом конкретном случае; реактивность по отношению к β -глюканам у различных линий мышей значительно варьирует)(Zhang et al., 2007; Chen, Seviour, 2007; Ohno, 2005).

Растворимость в воде является одной из наиболее важных характеристик β -глюканов. До сих пор не известно, что именно является определяющим для растворимости и фармацевтической активности β -глюканов: должны учитываться молекулярный вес, длина цепи, количество боковых цепей; соотношение (1,4), (1,6) и (1,3) – связей; ионизация под воздействием кислоты (Wasser, 2010; Zhang et al., 2007; Chen, Seviour, 2007). Растворимые β -глюканы проявляют значительно более сильную иммуностимулирующую активность, чем нерастворимые. Причины этого полностью не раскрыты. Нам не известны точные механизмы интестинальной абсорбции при оральном введении β -глюканов (неспецифическая интестинальная абсорбция; прохождение их через

просвет кишечника в интеститнальной эпителиальной мембране; абсорбция посредством интестинальных М-клеток; абсорбция после связывания с Toll-подобными рецепторными белками на интестинальном просвете (люмене); и пробы дендрических клеток (Miller et al., 2007; Pamer, 2007). Возможно, что орально применяемые нерастворимые β -глюканы в последствии в процессе переваривания расщепляются на более мелкие биоактивные олигомеры (Lehmann, Kunze, 2000).

Нам необходимо прояснить различие между растительными (Tada et al., 2008; Tiwari, Cummins, 2009), дрожжевыми (Liu et al., 2009) и β -глюканами из ЛШГ (Wasser, 2010; Zhang et al., 2007; Lee, Kim, 2014; Chen, Seviour, 2007; Ohno, 2005). Каковы различия в структуре, растворимости и биологической активности? Например, структура β -глюканов зерновых, главным образом, представлена β -1,3 и β -1,4, но не β -1,6 связями. В дополнение к этому, растительные β -глюканы являются линейными, но не разветвленными.

Обычно молекулярный вес растительных β -глюканов меньше, чем у β -глюканов из ЛШГ. Биологическая активность β -глюканов растений еще не полностью изучена. Обычно дрожжевые β -глюканы лишь частично водорастворимы, но и многие β -глюканы из ЛШГ не растворимы в воде. Почему они обладают различной биологической активностью? В чем состоит главное преимущество β -глюканов из лекарственных шляпочных грибов, по сравнению с таковыми из зерновых, или, например, из дрожжей?

Накоплено достаточно много сведений о функции рецептора дектин-1 β -глюканов (лектин 1 С-типа, ассоциированный с дендритовыми клетками) (Lee, Kim, 2014; Taylor et al., 2007; Nagada, Ohno, 2008). β -глюканы имеют антифунгальную активность, что подобно их противораковой активности также опосредовано связано с дектином-1. Однако до сих пор мы не знаем, каким образом β -глюканы связываются с рецептором дектин-1. Мы знаем о функционировании рецептора дектин-1 под воздействием β -глюканов, в то же время, функции рецептора дектин-2 еще не ясны (Lee, Kim, 2014; Graham, Brown, 2009).

Почему β -глюканы имеют конформацию тройной спирали, и дает ли подобная структура преимущества ЛШГ по сравнению с однопитаевой (Wasser, 2010; Zhang et al., 2007; Chen, Seviour, 2007; Ohno, 2005)? К сожалению, нам не ясно, какие структурные особенности более всего

способны индуцировать специфическую активность и, что даже более важно, как на нее влияет присутствие гидрофильных групп на внешней поверхности спирали. В литературе имеются достаточно противоречивые данные о биологической активности тройной спиральной и односторонней спиральных структур одних и тех же β -глюканов, например, у Шизофилланы (Zhang et al., 2007; Chen, Seviour, 2007; Ohno, 2005). До сих пор мы не знаем, где сильнее биологическая активность – у закрытой, или частично раскрытой тройной спиральной структуры (Mizuno, 1999; Falch et al., 2000). Некоторые виды образуют тройные спирали в водных растворах. Однако в условиях щелочной pH или ДМСО (диметилсульфоксида) она быстро преобразуется в одностороннюю спираль, которая, в свою очередь, при нейтральной кислотности постепенно преобразуется в тройную. Впрочем, не известна до сих пор зависимость формы спирали от иммуномодулирующей и противораковой активности (Lee, Kim, 2014).

Выводы

1. Необходимы дальнейшие исследования роли полисахаридпротеиновых и полисахаридпептидных комплексов в фармакологической активности ЛШГ-препаратов

2. Дополнительные исследования должны продемонстрировать эффективность тех, или иных грибных препаратов в лечении конкретных заболеваний, таких как вирусные и бактериальные инфекции, метаболические синдромы, рак, регуляции уровня холестерина и т.д.

3. Развитие новых методов исследования и разработки должно стать приоритетом в изучении ЛШГ.

Например, в 2009 г. в Южной Корее группой Парка был разработан новый метод экстракции наночастиц водорастворимых β -глюканов (Park, 2009). Был исследован новый процесс экстракции наночастиц Спарана (β -D-глюкан из *Sparassis crispa*) и Феллиана (β -D-глюкан из *Phellinus linteus*) с использованием технологий нерастворимого карбида вольфрама в качестве нано-ножа. Это было первое сообщение, продемонстрировавшее, что этот метод приводит к высокому выходу Спарана - 70,2 %) и Феллиана (65,2 %) со средним размером частиц 150 и 390 нм соответственно. Парк с соавторами (Park, 2009) предложили использование метода нано-ножа для производства β -D-глюканов в пищевой, косметической и фармакологической промышленности. Немецкие исследователи (Nitschke

et al., 2011) разработали новый колориметрический метод определения количества β -1,3-1,6-глюканов по сравнению с общим содержанием β -1,3-глюканов и методом определения количества хитина в съедобных грибах.

4. Нашим приоритетом должно стать открытие новых видов грибов, обладающих лекарственными свойствами, например, у *M. oreades*, *Trametes ochracea*, *Xylaria nigrepes*, *Pseudotrimeres (=Daedalea) gibbosa*, *Geastrum saccata*, *Cyathus striatus* и *C. olla* (Petrova et al., 2009; Khamaisie et al., 2011; Sharvit, 2012).

5. Использование ЛШГ для людей до настоящего времени очень мало продвинулось вперед. Высококачественные, долгосрочные, двойные «слепые», с контролем плацебо, статистически достоверные, выполненные на большой выборке людей клинические исследования ЛШГ, подтверждающие их безопасность и эффективность, определенно нужны. Цели клинических испытаний в течение I-IV стадий должны быть направлены на получение достаточных сведений об эффективности и безопасности лекарств и препаратов из ЛШГ.

6. Больше внимания следует уделить исследованиям влияния ЛШГ на сельскохозяйственных животных в качестве биомедицинских моделей, для изучения ожирения, диабета, старения, сердечно-сосудистых заболеваний, инфекционных болезней, нейробиологии, рака, питания, иммунологии, офтальмологии, репродукции. С другой стороны, мы можем произвести коренной перелом в некоторых отраслях ветеринарии, которые в настоящее время переживают кризис (Roberts et al., 2009), за счет нового типа продуктов и пищевых добавок, предлагаемых вместо антибиотиков и противовирусных средств для животных.

7. Следует уделить внимание исследованиям ЛШГ в качестве сельскохозяйственных инсектицидов и средства против вирусов растений.

8. Проблемой, требующей большого внимания, является защита интеллектуальной собственности (ИС) генетических ресурсов ЛШГ для внедрения и инноваций. Генетические ресурсы грибов используются в настоящее время в фармацевтической, косметической, сельскохозяйственной, пищевой, ферментативной, химической и перерабатывающей промышленности. Тем не менее, значение защиты ИС в современных наукоемких предприятиях часто упускается из виду, несмотря на ее финансово-экономический потенциал. Права на ИС довольно часто принадлежат инвесторам. Задача состоит в том, чтобы

создать защиту и извлечь выгоду из активов ИС для изобретения и инновации (Wasser, 2010; Jong, 2005).

9. Необходимо продолжить информирование общества и потребителей о достижениях науки о лекарственных грибах. Наша обязанность, как ученых, состоит в том, чтобы делать как можно больше для просвещения широких слоев населения о преимуществах для здоровья использования ЛШГ. Для общества не всегда понятен и очевиден интерес к современным исследованиям ЛШГ. Сейчас в 2015 г. тяжело поверить в то, что многие люди во всем мире совершенно не осведомлены о полезности ЛШГ для здоровья.

10. Для пользы человечества мы должны преодолеть разрыв между западной и восточной медициной. В западной и восточной медицине приняты различные регуляторные системы относительно растительных и грибных препаратов. Большинство западных стран руководствуется правилами ВОЗ и правилами (DSHEA) для сертифицированных пищевых добавок, в которых грибные и растительные добавки определены как пищевые добавки (ПД), не нуждающиеся в клинических испытаниях перед внедрением на рынок. Китай и некоторые азиатские страны определяют многие из одних и тех же трав и грибов препараты как лекарства, и таким образом, в данном случае клинические испытания необходимы. Западная медицина слабо использует ЛШГ, в основном, из-за их сложной структуры и отсутствия приемлемой фармакологической чистоты. Нашей основной целью в будущем должно стать принятие таких правил, стандартов и практик из западной и восточной медицины, которые окажутся наиболее ценными для здравоохранения в 21 веке (Wasser, 2010; Chang, Wasser, 2012).

Литература

Ammerpohl O., Tiwari S., Kalthoff H. 2010. Target gene discovery for novel therapeutic agents in cancer treatment. *Methods Mol Biol*, 576:427-45.

Anke T. 1989. Basidiomycetes: A source for new bioactive secondary metabolites. *Prog Ind Microbiol*, 27:51-66.

Balandykin M.E., Zmitrovich I.V. 2014. Review on *Inonotus obliquus* (Basidiomycota). Realm on medicinal applications and approaches on resources estimation. *Int J Med Mushrooms*, 16 (In Press).

- Barillot E., Calzone L., Hupe Ph., Vert J.Ph., Zinovyev A.** 2013. Computation system biology of cancer. USA: CRC Press, Taylor and Francis Group. A Chapman and Hall Book.
- Bass D., Richards T.A.** 2011. Three reasons to re-evaluate fungal diversity 'on Earth and in the ocean'. *Fungal Biol Rev*, 25:159-64.
- Blackwell M.** 2011. The fungi: 1, 2, 3 ...5.1 million species? *Am J Bot*, 98:426-38.
- Boh B., Berivic M.** 2007. *Grifola frondosa* (Diks.:Fr.) S.F. Gray (Maitake mushroom): Medicinal properties, active compounds, and biotechnological cultivation. *Int J Med Mushrooms*, 9:89-108.
- Boh B.** 2013. *Ganoderma lucidum*: A potential for biotechnological production of anti-cancer and immunomodulatory drugs. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 8:255-87.
- Buchalo A.S., Mykchaylova O., Lomborg M., Wasser S.P.** 2009. Microstructures of vegetative mycelium of macromycetes in pure culture. Kiev, Ukraine; AlterPress.
- Cao Y., Wu S.H., Dai Y.C.** 2012. Species clarification of the prize medicinal *Ganoderma* mushroom "Lingzhi". *Fungal Divers*, 56:49-62.
- Chang S.T., Wasser S.P.** 2012. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *Int J Med Mushrooms*, 1:95-134.
- Chen J., Seviour R.** 2007. Medicinal importance of fungal β -(1-3), (1-6)-glucans. *Mycol Res*, 111:635-52.
- Chen Sh., Xu J., Liu C., Zhu Y., Nelson D.R., Zhou S., et al.** 2012. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Nature communications*, 3:913.
- Chihara G., Hamuia J., Maeda Y.Y., Arai Y., Fukuoka F.** 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res*, 30:2776-81.
- Dai Y.C., Yang Z.L., Ui BK, Yu CH., Zhou L.W.** 2009. Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (review). *Int J Med Mushrooms*, 11:287-302.
- De Silva D.D., Rapior S., Sudarman E., Stadler M., Xu J., Alias S.A., et al.** 2013. Bioactive metabolites from macrofungi: Ethnopharmacology, biological activities and chemistry. *Fungal Divers*, 62:1-40.

- Deng G., Lim H., Seidman A., Fornier M., D'Andrea G., Wesa K., et al.** 2009. A phase I/II trial of a polysaccharide extract from *Grifola frondosa* (Maitake mushroom) in breast cancer patients: Immunological effects. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135:1215-21.
- Didukh M.Y., Wasser S.P., Nevo E.** 2003. Medicinal value of species of the family Agaricaceae Cohn (higher Basidiomycetes) current stage of knowledge and future perspectives. *Int J Med Mushrooms*, 5:133-52.
- Dotan N., Wasser S.P., Mahajna J.** 2011. The culinary-medicinal mushroom *Coprinus comatus* as a natural antiandrogenic modulator. *Integr Cancer Ther*, 10:148-59.
- Endo A.** 2004. The origin of the statins. 2004. *Atheroscler Suppl*, 5:125-30.
- Falch B.H., Espevik T., Ryan L., Stokke B.T.** 2000. The cytokine stimulating activity of (1-3)-beta-D-glucans is dependent on the triple helix conformation. *Carbohydr Res*, 329:587-96.
- Graham L.M., Brown G.D.** 2009. The Dectin-2 family of C-type lectins in immunity and homeostasis. *Cytokine*, 48:148-55.
- Harada T., Ohno N.** 2008. Dectin-1 and GM-CSF on immunomodulating activities of fungal 6-branched 1,3-β-glucans. *Int J Med Mushrooms*, 10:101-14.
- Hawksworth D.L.** 2001. Mushrooms: The extent of the unexplored potential. *Int J Med Mushrooms*, 3:333-40.
- Hawksworth D.L.** 2012. Global species number of fungi: Are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? *Biodivers Conserv*, 21:2425-33.
- Hibbett D.S., Taylor J.W.** 2013. Fungal systematics: Is a new age of enlightenment at hand? *Nat Rev Microbiol*, 11:129-33.
- Hobbs C.** 2000. Medicinal value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). A literature review. *Int J Med Mushrooms*, 2:287-302.
- Hobbs C.** 2004. Medicinal value of Turkey Tail fungus *Trametes versicolor* (L.:Fr.) Pilát (Aphyllphoromycetidae). *Int J Med Mushrooms*, 6:195-218.
- Hobbs C.** 2005. The chemistry, nutritional value, immunopharmacology, and safety of the traditional food of medicinal split-gill fungus *Schizophyllum commune* Fr.:Fr. (Aphyllphoromycetidae). A literature review. *Int J Med Mushrooms*, 7:127-40.
- Holliday H., Cleaver M.** 2008. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A review. *Int J Med Mushrooms*, 10:209-18.

- Hsieh P.W, Wu J.B, Wu Y.C.** 2013. Chemistry and biology of *Phellinus linteus*. *BioMed.*,3:106-13.
- Hyde K.D., Bahkali A.H., Moslem M.A.** 2010. Fungi- an unusual source for cosmetics. *Fungal Divers*, 43:1-9.
- Ishibashi K.I., Dogasaki C., Iriki T., Motoi M., Kurone Y.I., Miura N.N., et al.** 2005. Anti- β -glucan antibody in bovine sera. *Int J Med Mushrooms*, 7:513.
- Jong S.C.** 2005. Protecting intellectual property assest of mushroom genetic resources for invention and innovation. *Int J Med Mushrooms*, 7:348-9.
- Kerrigan R.W.** 2005. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. *Mycologia*, 97:12-24.
- Khamaisie H., Sussan S., Tal M., Najajren Y., Rurhardt M., Mahajna J.** 2011. Oleic acid is the active component in the mushroom *Daedalea gibbosa* inhibiting Bcr-Abl kinase autophosphorylation activity. *Anticancer Res*, 31:177-4.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Stalpers J.A.** 2008. Ainsworth and Brisby's Dictionary of the Fungi. 10th ed. Wallingford: CAB International.
- Lachter J., Yampolsky Y., Gafni-Schieber R., Wasser S.P.** 2012. Yellow Brain Culinary-Medicinal Mushroom, *Tremella mesenterica* Ritz.:Fr. (Higher Basidiomycetes), is subjectively but not objectively effective for eradication of *Helicobacter pylori*; a prospective controlled trial. *Int J Med Mushrooms*, 14:55-63.
- Lee D.H., Kim H.W.** 2014. Innate immunity induced by fungal β -glucans via dectin-1 signaling pathway. *Int J Med Mushrooms*, 16:1-16.
- Lehmann J., Kunze R.** 2000. Water-soluble low molecular weight β -glucans for modulating immunological responses in mammalian system. *US Patent*, 6143883.
- Li J.W., Vederas J.C.** 2009. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier. *Science*, 325:161-5.
- Lin Z.B.** 2009. Lingzhi. From mystery to science. Beijing, China: Peking University Press.
- Lindequist U.** 2013. The merit of medicinal mushrooms from a pharmaceutical point of view. *Int J Med Mushrooms*, 15:517-23.
- Liu J.J., Gunn L., Hansen R., Yan J.** 2009. Combined yeast-derived β glucan with anti-tumor monoclonal antibody for cancer immunotherapy. *Exper Mol Pathol*, 86:208-14.

- Lo H.C., Wasser S.P.** 2011. Medicinal mushrooms for glycemic control in diabetes mellitus: History, current status, future perspectives, and unsolved problems (review). *Int J Med Mushrooms*, 13:401-26.
- Mahajna J., Dotan N., Zaidman B.Z., Petrova R.D., Wasser S.P.** 2010. Pharmacological values of medicinal mushrooms for prostate cancer therapy: The case of *Ganoderma lucidum*. *Nutr Cancer*, 61:16-26.
- Maruyama H., Ikekawa T.** 2007. Immunomodulation and antitumor activity of a mushroom product, proflamin, isolated from *Flammulina velutipes* (W.Curt.:Fr.) Singer (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushrooms*, 9:109-22.
- Matsuzawa T.** 2006. Studies on antioxidant effects of culinary-medicinal bunashimeji mushroom *Hypsizygus marmoreus* (Peck) Bigel. (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushrooms*, 8 :245-50.
- McKenna D.J., Jones K., Hughes K., Humphrey S.** 2002. Botanical medicines. The desk reference for major herbal supplements. 2nd ed. NY, London, Oxford: The Haworth Herbal Press.
- Miller H., Zhang J., Kuo Lee R., Patel G.B., Chen W.** 2007. Intestinal M cells: The fallible sentinels? *World J Gastroenterol*, 14:1477-86.
- Mizuno T., Zhuang C., Abe K., Okamoto H., Kiho T., Ukai S., et al.** 1999. Antitumor and hypoglycemic activities of polysaccharides from the sclerotia and mycelia of *Inonotus obliquus* (Pers.:Fr.) Pil.(Aphyllphoromycetidae). *Int J Med Mushrooms*, 1:301-16.
- Mizuno T.** 1999. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review). *Int J Med Mushrooms*, 1:9-29.
- Moncalvo J.M., Rivarden L.** 1997. A nomenclatural study of the Ganodermataeae. Fungiflora A/S Oslo: Norway.
- Nitschke J., Modick H., Busch E., von Rekowski R.W., Albenbach H.J., Mölleken H.** 2011. A new colorimetric method to quantify β -1,3-1,6-glucans in comparison with total β -1,3-glucans in edible mushrooms. *Food Chem*, 127:791-6.
- Ohno N.** 2005. Structural diversity and physiological functions of β -glucans. *Int J Med Mushrooms*, 7:167-73.
- Pamer E.G.** 2007. Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nat Immunol*, 8:1173-8.

- Park H.G., Shim Y.Y., Choi S.O., Park W.M.** 2009. New method development for nanoparticle extraction of water-soluble β -(1-3)-D-glucan from edible mushrooms, *Sparassis crispa* and *Phellinus linteus*. *J Agric Food Chem*, 57:2147-54.
- Petrova R.D., Mahajna J., Wasser S.P., Ruimi N., Denchev C.M., Sussan S., et al.** 2009. *Marasmius oreades* substances block NF-kappaB activity through interference with IKK activation pathway. *Mol Biol Rep*, 36:737-44.
- Pöder R.** 2005. The Ice man's fungi: Facts and mysteries. *Int J Med Mushrooms*, 7:357-9.
- Pollack A.** 2009. Drug firms see fortune in treating cancer. *Int Herald Tribune*, 15-16.
- Reshetnikov S.V., Wasser S.P., Tan K.K.** 2001. Higher Basidiomycota as source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *Int J Med Mushrooms*, 3:361-94.
- Roberts R.M., Smith G.W., Bazer F.W., Cibelli J., Seidel G.E. Jr, Bauman D.E., et al.** 2009. Research priorities. Farm animal research in crisis. *Science*, 324:468-9.
- Rouhana-Toubi A., Wasser S.P., Fares F.** 2009. Ethyl acetate extracts of submerged cultured mycelium of higher Basidiomycetes mushrooms inhibit human ovarian cancer cell growth. *Int J Med Mushrooms*, 11:29-37.
- Ruimi N., Petrova R.D., Agbaria R., Sussan S., Wasser S.P., Reznick A.Z., et al.** 2010. Inhibition of TNF α -induced iNOS expression in HSV-tk transduced 9L glioblastoma cell lines by *Marasmius oreades* substances through NF- κ B- and MAPK-dependent mechanisms. *Mol Biol Rep*, 37:3801-12.
- Ruimi N., Rwashdeh H., Wasser S.P., Konkimalia B, Efferth T., Borgatti M., et al.** 2010. *Daedalea gibbosa* substances inhibit LPS-induced expression of iNOS by suppression of NF- κ B and MAPK activities in RAW 264.7 macrophage cells. *Int J Mol Med*, 25:421-32.
- Sharvit L.E., Wasser S.P., Fares F.** 2012. The effect of culture liquid ethyl acetate mycelium extracts of medicinal mushrooms on the viability of human pancreatic cancer cells. *Int J Med Mushrooms*, 14:169-80.
- Stewart B.W., Wild Ch.P., editors.** 2014. World Cancer Report 2014. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- Tada R., Adachi Y., Ishibashi K.I., Tsubaki K., Ohno N.** 2008. Binding capacity of a barley beta-D-glucan to the beta-glucan recognition molecule Dectin-1. *J Agric Food Chem*, 56:1442-50.

- Taylor P.R., Tsoni S.V., Willment J.A., Dennehy K.M., Rosas M., Findon H., et al.** 2007. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol*, 8:31-8.
- Tiwari U., Cummins E.** 2009. Factors influencing beta-glucan levels and molecular weight in cereal-based products. *Cereal Chem*, 86:290-301.
- Van Griensven L.J.** 2009. Culinary-medicinal mushrooms: Must action be taken. *Int J Med Mushrooms*, 11:281-6.
- Wasser S.P., Didukh M.Y., Amazonas M.A., Nevo E., Stamets P., Eira A.F.** 2005. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun Agaricus (Champignon do Brazil, or the Himematsutake mushroom) *Agaricus brasiliensis* S.Wasser et al. indeed a synonym of *A. subrufescens* Peck? *Int J Med Mushrooms*, 7:507-11.
- Wasser S.P., Didukh M.Y., Amazonas M.A., Nevo E., Stamets P., Eira A.F.** 2002. Is widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? *Int J Med Mushrooms*, 4:267-90.
- Wasser S.P., Zmitrovich I.V., Didukh M.Y., Spirin W.A., Malysheva V.F.** 2006. Morphological traits of *Ganoderma lucidum* complex highlighting *G. tsugae* var. *jannieae*: The current generalization. Ruggell, Liechtenstein: A.R.A. Gantner Verlag K.-G.
- Wasser S.P.** 2007. Molecular identification of species of the genus *Agaricus*. Why should we look at morphology? *Int J Med Mushrooms*, 9:85-8.
- Wasser S.P.** 2010. Medicinal mushroom science: History, current status, future trends, and unsolved problems. *Int J Med Mushrooms*, 12:1-16.
- Wasson R.G.** 1968. Soma. Divine mushroom of immortality. NY, USA: Harcourt Brace Jovanovich, Inc.
- Yang Z.L., Feng B.** 2013. What is the Chinese "Lingzhi"? – a taxonomic mini-review. *Mycology*, 4:1-4.
- Yassin M., Wasser S.P., Mahajna J., Ruimi N., Denchev C.M., Sussan S., et al.** 2008. Substances from the medicinal mushroom *Daedalea gibbosa* inhibit kinase activity of native and T315I mutated Bcr-Abl. *Int J Oncol*, 32:1197-204.
- Zaidman B.Z., Yassin M., Mahajna J., Wasser S.P.** 2005. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67:453-68.

Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C., Wang Q. 2007. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends Food Sci Technol*, 18:4-19.

Zhang Y., Kong H., Fang Y., Nishinan K., Phillips G.O. 2013. Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent development. *Bioact Carbohydr Diet Fiber*, 1:53-71.

Zhang Y., Li S., Wang X., Zhang L., Cheung P.C. 2011. Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocoll*, 25:1996-2006.

Zhao J.D. 1989. The Ganodermataceae of China. *Bibliotheca Mycologica* 132. Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.

Zhuang C., Wasser S.P. 2004. Medicinal value of culinary-medicinal Maitake mushroom *Grifola frondosa* (Dicks.:Fr.) S.F.Gray (Aphyllphoromycetideae). Review. *Int J Med Mushrooms*, 6:287-313.

С.П. ВАССЕР. НАУКА ПРО ЛІКАРСЬКІ ГРИБИ: СУЧАСНІ ПЕРСПЕКТИВИ, ДОСЯГНЕННЯ І ПРОБЛЕМИ

Головна мета цього огляду сфокусована на представленні сучасних перспектив, досягнень, фактів, проблем і шляхів розвитку науки про лікарські грибах в 21 столітті. Загалом, для лікарських шапинкових і мікроскопічних грибів відомо близько 130 фармакологічних застосувань, включаючи протипухлинну, імунomodуючу, антиоксидантну, захоплюючу вільні радикали, кардіоваскулярну, знижує холестерин, протівірусну, антибактеріальну, противопаразитну, протигрибкову, детоксифікуючу, гепатопротекторну, і протидіабетичну дію. Відомо, що базидіоміцети є продуцентами біологічно активних речовин, які містяться не тільки в плодових тілах, але і в міцелії, і культуральної рідини при культивуванні.

Особливу увагу приділено грибним полісахаридів і різним другорядні метаболіти. Узагальнено результати досліджень про полісахаридах близько 700 видів вищих *Hetero-* і *Homobasidiomycetes*. Описано численні біологічно активні полісахариди і полісахарідпротеїнові комплекси з лікарських грибів, що мають здатність підвищувати вроджений і клітинну імунну відповіді, а також вираженою протипухлинну

активність у тварин і людей, в той час як механізм їх протипухлинної дії досі повністю не розкритий, в центрі уваги перебувають питання стимулювання і модуляції ключового імунної відповіді на ці грибні з'єднання. Полісахариди і низькомолекулярні вторинні метаболіти надзвичайно важливі з огляду властивим їм протиракову і імуностимулюючий властивостями. Деякі з цих грибних речовин, що пройшли I, II і III фазу клінічних випробувань, в даний час широко і успішно застосовуються в Азії для лікування різних видів раку та інших захворювань. Особливу увагу приділено багатьох важливих невирішених питань науки про лікарські грибах.

S.P. WASSER. MEDICINAL MUSHROOM SCIENCE: CURRENT PERSPECTIVES, ADVANCES, AND CHALLENGES

The main target of the present review is to draw attention to the current perspectives, advances, evidences, challenges, and future development of medicinal mushroom science in the 21st century. Medicinal mushrooms and fungi are thought to possess approximately 130 medicinal functions, including antitumor, immunomodulating, antioxidant, radical scavenging, cardiovascular, anti-hypercholesterolemic, antiviral, antibacterial, anti-parasitic, antifungal, detoxification, hepatoprotective, and antidiabetic effects. Many, if not all, higher Basidiomycetes mushrooms contain biologically active compounds in fruit bodies, cultured mycelium, and cultured broth. Special attention is paid to mushroom polysaccharides. The data on mushroom polysaccharides and different secondary metabolites are summarized for approximately 700 species of higher hetero- and homobasidiomycetes. Numerous bioactive polysaccharides or polysaccharide-protein complexes from the medicinal mushrooms described appear to enhance innate and cell-mediated immune responses, and exhibit antitumor activities in animals and humans. Whilst the mechanism of their antitumor actions is still not completely understood, stimulation and modulation of key host immune responses by these mushroom compounds appear central. Polysaccharides and low-molecular-weight secondary metabolites are particularly important due to their antitumor and immunostimulating properties. Several of the mushroom compounds have been subjected to Phase I, II, and III clinical trials, and are used extensively and successfully in Asia to

treat various cancers and other diseases. Special attention is given to many important unsolved problems in the study of medicinal mushrooms.

И.А. ДУДКА

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины

ГРИБЫ В НАРОДНОЙ МЕДИЦИНЕ СЛАВЯН И ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СВОЙСТВ ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ В КОНЦЕ XX - НАЧАЛЕ XXI СТ.

В статье подытожен многовековой опыт восточных славян в использовании грибов в народной медицине. Первое упоминание о грибах, известных в древней Руси в качестве лекарства, содержится в одном из рукописных «Вертоградов» Киевского периода XIII ст., где сообщается о применении аскомицета *Claviceps purpurea* Tul. в гинекологической практике. Сведения о лекарственных базидиальных макромицетах *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. и *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) J. Kickx., которые использовались при лечении туберкулеза, обнаружены в одной из монастырских хроник Киевской Руси XIII ст. В статье приводятся данные о таких лекарственных видах макроскопических базидиальных грибов, как *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil., *Calvatia gigantea* (Pers.) Lloyd, *Phallus impudicus* L., *Laricifomes officinalis* (Vill.:Fr.) Kotl. et Pouzar (*Syn Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bondartsev et Singer), *Boletus edulis* Bull., *Suillus grevillei* (Klot.) Singer, *Amanita muscaria* (L.) Hook., *A. phalloides* (Fr.) Secr., *Lactarius piperatus* (Fr.) Gray и других. Для некоторых из этих видов описаны способы изготовления лекарственных препаратов, применявшихся восточными славянами для лечения соответствующих заболеваний и травм. Освещена роль известного украинского миколога, члена-корреспондента НАН Украины С.П. Вассера в возрождении интереса специалистов к лекарственным грибам. На примере двух видов из фармакопеи восточных славян *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. и *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) J. Kickx. продемонстрирован современный уровень исследования лекарственных макромицетов, открывающий новые возможности использования их вторичных метаболитов.

Ключевые слова: лекарственные базидиальные макромицеты, народная медицина

Народная медицина восточных славян, в том числе русского, украинского и белорусского народов, формировалась на основе многовекового опыта лечения растениями. Значительное влияние на её

развитие оказали скифы, кочевые племена которых в VII в. до н. э. – III в. н. э. населяли территорию Северного Причерноморья от Днепра до Дона, земли, впоследствии занятые славянскими племенами антов. Скифы не только использовали лекарственные растения, но разводили их и вывозили в Грецию и Италию. Об этом упоминается в трактате Катона старшего «О земледелии» и в «Естественной истории» Плиния старшего. Разбитые в III в. н. э. готами, скифы смешались с антами и передали им свои знания лекарственных трав. Знатоками трав и способов лечения ими у славян были волхвы – служители дохристианских культов. С конца XI в. сбором и выращиванием трав и врачеванием ими у восточных славян стали заниматься монастыри.

Огромные лесные массивы на территориях, занятых восточными славянами, были настоящими кладовыми не только лекарственных растений, но и грибов. Съедобные грибы являлись важным компонентом пищевого рациона народов древней Руси. Известный российский миколог, специалист по шляпочным грибам Б.П. Васильков (1953) в своей работе «Изучение шляпочных грибов в СССР», описывая пищевые свойства этих грибов, упоминает книгу о России англичанина Самуила Коллинза, который в течение 9 лет был личным врачом царя Алексея Михайловича в Москве. В его книге «The Present State of Russia, in a Letter to a Friend at London», изданной в 1671 г. в Лондоне, есть глава «Различные роды грибов, растущих в России». Автор восторгается количеством и вкусом местных грибов и добавляет, что «нигде нет лучших». Кроме того, в книге С. Коллинза приведены схематические рисунки плодовых тел грибов-макромицетов. За время пребывания в России англичанин стал знатоком и пропагандистом съедобных грибов, используемых для приготовления различных блюд русской кухни. Многие особенности грибов, считавшихся в России съедобными, С. Коллинз испытал на себе. О груздях, например, он писал так: «Русские солят их, а иначе они жгут рот и горло. Однажды я неосторожно отведал жареных груздей и едва не задохнулся» (Васильков, 1942, с. 18). Б.П. Васильков приводит цитату из трёхтомника В. Рихтера «История медицины в России» (1814-1820), которая свидетельствует о доверии к С. Коллинзу как знатоку съедобных грибов русских лесов: «Примечательно особенно то, что доктор Коллинз за полтора года перед сим лет доказывал беспристрастно, сколь неоснователен (владеющий всеми иностранцами и донныне) страх быть жертвою яда, находящегося в грибах»

(Васильков, 1953, с. 38). Естественно, что свои познания С. Коллинз черпал из глубоко укоренившихся в сознании местного населения традиций и навыков использования богатейших даров русского леса.

Познавая питательные качества съедобных грибов, усовершенствуя способы их переработки, славяне одновременно знакомились с целебными свойствами некоторых из них. Наиболее старыми источниками сведений о болезнях человека и лекарственных средствах для их лечения у восточных славян были рукописи, апокрифы, хроники, жития святых, существовавшие на Руси с XI в. Первым сохранившимся до нашего времени литературным памятником славянской культуры XI в., в котором изложена система народной медицины, является «Изборник Святослава», датированный 1073 г. В этой книге приводятся описания многих сосудистых лекарственных растений, применявшихся на Руси. Однако информация о лекарственных грибах в этой, как и в других рукописях XI в. (Радзивилловской, Ипатьевской, Никоновской), отсутствует (Богоявленский, 1960).

Первое упоминание о грибах, использовавшихся в древней Руси в качестве лекарства, находим в древнерусских рукописях XIII ст. В это время появились специальные справочники «Вертограды», аналогичные средневековым европейским «Hortus sanitas», содержавшие описания лекарственных растений, минералов, животных. В одном из таких «Вертоградов» Киевского периода сообщается о применении рожек аскомицета спорыньи (*Claviceps purpurea* Tul.) для лечения рака матки. Славяне использовали рожки спорыньи и для остановки маточных кровотечений. Для этого чайную ложку рожек настаивали в стакане воды и принимали настой 3-4 раза в день по столовой ложке. По другой прописи из рожек готовили порошок, 10-50 гранов (0,65-3,25 г) которого разводили в воде или молоке для одноразового приёма. Хороший эффект оказывали и отвары из рожек. Так, 30-40 гранов (1,94-2,59 г) рожек отваривали в 0,5 л воды. Принимали отвар по столовой ложке через каждые 10 мин до полной остановки маточного кровотечения (Богоявленский, 1952, 1955; Преображенский, 2000). Особое значение во врачевании разных болезней спорыньи (её склероции – рожки, роговица – были очень распространены в завязях ржи на русском Севере) приобрела именно в этом регионе. Здесь её использовали не только в гинекологической практике, но и как гомеопатическое средство при истерии и психозах, глазных заболеваниях,

базедовой болезни (Богоявленский, 1966). Имеются сведения о том, что в народной медицине спорынья применялась также при мигрени, после сотрясения мозга, при повышенном кровяном давлении (Заупе, 1994). Именно в летописях дано описание и миниатюрное изображение симптомов весьма распространённого в Древней Руси заболевания, причиной которого были рожки спорыньи (*C. purpurea*). В Остермановском томе (ч. 2) «Лицевого летописного свода», в котором представлены списки летописей, сделанные в XVI ст., приведена миниатюра, на которой изображена картина мора, вызываемая «болезнью коркотною», или эрготизмом. Эпидемия эрготизма возникала при массовом употреблении в голодные годы хлеба, сильно заражённого спорыньей, и проявлялась в виде интенсивных судорог конечностей («корчей»), разные проявления которых изображены на миниатюре из «Лицевого летописного свода» (Богоявленский, 1960).

В фармации препараты *C. purpurea* в виде порошка фиолетово-серого цвета были известны под названием Pulvis secalis cornuti. Кроме порошка в аптеках изготавливался также густой экстракт спорыньи Extractum Secalis cornuti pissum, который предлагается в виде раствора или таблеток. Исследования химической природы склероциев (рожек) спорыньи были начаты в Юрьевском университете профессором Г. Драгендорфом и Р. Кобертом. Им удалось выделить индольные алкалоиды: в 1906 г. был выделен эрготоксин, в 1918 г. – эрготамин и эрготаминин, в 1935 г. – эргометрин. Эти алкалоиды, компонентом которых является лизергиновая кислота, составили действующее начало ряда медицинских препаратов, в частности таких, как эрготал и эрготамина гидротартат. Эрготал используется для остановки маточных кровотечений, а эрготамина гидротартат входит в состав комплексных препаратов беллоид и беллатаминал, которые применяются при бессоннице, повышенной раздражительности, нейродермитах, вегетативно-сосудистой дистонии (Ловкова и др., 1989). Относительно недавно на основе производных алкалоидов спорыньи создан препарат родергин, хорошо действующий при нарушении мозгового и периферического кровообращения (Минаева, 1991). Кроме перечисленных и других левовращающих эргоалкалоидов, из спорыньи были выделены также многочисленные алкалоиды группы клавины: пенниклавин, костоклавин, ханоклавин, агроклавин и др. При гидратировании эргоалкалоидов они теряют свою токсичность и

сократительную активность по отношению к мускулатуре матки, на чём основано их кровоостанавливающее действие. Но при этом они приобретают сосудорасширяющие и гипотензивные свойства, на которых основаны такие препараты, как дигидроэрготамин и дигидроэрготоксин, применяющиеся для лечения гипертонии и спазмов сосудов (Телятьев, 1991).

Источником других лекарственных средств грибного происхождения являются базидиальные макромицеты. В одной из монастырских хроник XIII ст. были найдены сведения об использовании в медицинской практике берёзового трута дереворазрушающих грибов, позднее ориентировочно идентифицированных по описаниям и рисункам как *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. и *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) J. Kickx. Мягкая сердцевина их плодовых тел использовалась для прижигания участков здоровой кожи больного при туберкулёзе. В частности в упомянутом выше Остермановском томе «Лицевого летописного свода» указывается, что болезнь сухотия (туберкулёз лёгких) великого князя московского Василия Темного лечили жжением – сжиганием кусочков *P. betulinus* на голом теле больного. Такие кусочки «трут-губы» назывались моксами; для усиления лечебного эффекта иногда разожжённые уже моксы присыпали солью или порошком (Богоявленский, 1966). Впоследствии трут настоящий (фармацевтические названия *Agaricus s. fungus chirurgorum*, *Agaricus quercinus praeparatus*, *Boletus igniarius*, *fungus igniarius praeparatus*, врачебная губка, трутовая губка, огневой или огнивый трут) использовали как перевязочный и кровоостанавливающий материал для прекращения кровотечений, особенно после пьявок. Для получения мягкой, бархатистой, упругой и нежной наощупь субстанции плодовые тела *P. betulinus* и *F. fomentarius* очищали от коры и трубчатого слоя, вымачивали несколько недель в ёмкости с горячей водой, щёлоком и селитрой, после чего высушивали, чтобы придать рыхлости, выбивали деревянной колотушкой и нарезали пластинками толщиной в 0,5 дюйма (Рытов, 1918; Энциклопедический словарь лекарственных ..., 1951). Этот хирургический материал на определённом этапе развития медицины заменял вату. Ещё один дереворазрушающий гриб *Trametes suaveolens* (Fr.) Fr., известный в фармации как *fungus salicis* (ивовый гриб), *Anispilze* (анисовый гриб), употреблялся при болезнях лёгких (Рытов, 1918). В народной медицине Польши известно применение дубовой губки

(*Daedalea quercina* L.:Fr.) в качестве средства против насекомых (Grzywnowicz, 2001).

Однако наибольшее распространение в народной медицине восточных славян получил другой дереворазрушающий базидиомицет *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil., развивающийся на берёзе и известный под названием чаги. Это единственный лекарственный макромицет, который сохранил своё значение на протяжении многих веков, начиная с XIII ст. и до наших дней. В XXI в. полученные из него препараты применяются для восстановления организма больных некоторыми формами рака после химиотерапии и облучения, обеспечивая продолжительную ремиссию.

Почерпнутые из старинных рукописей сведения сообщают о том, что берёзовый гриб *I. obliquus*, или чага, использовался для лечения князя киевского Владимира Мономаха, у которого, по мнению современных врачей, был рак. Чага – старинное народное средство, которое с XVI-XVII ст. русское население северо-запада Европейской части России и Сибири регулярно применяло при различных желудочно-кишечных заболеваниях, включая язвы, рак желудка и 12-перстной кишки, при болезни печени и селезёнки (Минаева, 1991).

Плодовые тела чаги в виде наростов неправильной желвакообразной формы до 0,5 м в диаметре. и до 2-5 кг весом развиваются на стволах взрослых деревьев берёзы (реже ольхи, рябины, бука и др.). Снаружи они чёрные, темно-бурые, трещиноватые, внутри тёмно-коричневые, ржаво-бурые, очень твёрдые. Наросты чаги всегда развиваются на повреждённых частях деревьев, на месте обломанных сучков, механических повреждений, солнечных ожогов. В России особенно много чаги было в берёзовых лесах возле Пскова и Вологды, где её запасы даже в 70-х годах XX ст. исчислялись тоннами. Так, имеются данные о том, что в Псковской области её запасы составляли 35-45 т, в Вологодской – 10-15 т. Такой ресурсный потенциал допускал ежегодную заготовку 1,5-2 т (Гаммерман и др., 1968). Приводятся сведения о промышленных заготовках чаги в объёме нескольких тонн ежегодно в лесах из берёзы маньчжурской, произрастающей в северных и восточных районах Приморья, Приамурья и на острове Сахалин (Шретер, 1970). Запасы чаги в лесах Украины намного меньше. Они составляли не более 0,5-1,0 т и были сосредоточены в Украинских Карпатах, при этом на леса Закарпатской, Львовской и Черновицкой областей приходилось по 0,1-0,2 т, в лесах Ивано-

Франковской области – 0,2-0,4 т (Ивашин, 1968). Сбор чаги производился по определённой методике: срезанные со стволов берёзы плодовые тела рубили на куски 3-6 см длиной, сушили в сушилках при температуре до 60°C на печах, под навесами, на чердаках и других хорошо проветриваемых помещениях. К готовому сырью чаги предъявлялись определённые требования: рыхлая, легко крошащаяся часть нарезанных кусков должна была составлять не более ¼ их толщины; влажность должна была быть не более 12 %, количество общей золы – не более 17 %, содержание экстрактивных веществ – не менее 20 % (Шретер, 1970). Анализ анатомической структуры чаги как исходного лекарственного сырья характеризует её двойственную природу. Образование желвакообразных наростов *I. obliquus* происходит не только в результате уплотнения мицелия гриба, но и в процессе разрастания меристемных клеток вторичной коры берёзы. Эти разрастания, возникающие под раздражающим действием мицелия гриба-гемибиотрофа, окружают желваки чаги в виде наплывов, образующих единое целое с плодовым телом гриба. Высказано предположение о том, что метаболиты паразитирующего на стволе берёзы гриба вызывают ответную защитную реакцию камбия питающего растения, результатом чего и является образование желвакоподобных наростов (Якимов, 1959).

На русском севере и в Сибири с незапамятных времён настой чаги пили вместо чая. Очевидно, ещё тогда были отмечены целебные свойства настоя, который обладал тонизирующим, общеукрепляющим и противовоспалительным действием, нормализовал работу желудочно-кишечного тракта, повышал защитные реакции организма. Эти свойства чаги привлекли к ней внимание как к препарату грибного происхождения, перспективному для лечения хронических гастритов, язвы желудка и некоторых форм рака. Для этих целей настой чаги готовили следующим образом: плодовое тело гриба мыли, измельчали и взвешивали из расчёта 40 г кусочков чаги на 200 мл кипячёной воды; далее нужную порцию гриба помещали в соответствующий объём воды, температуру которой доводили до 50-60°C и настаивали в течение 48 часов. После этого настой сливали, остатки гриба отжимали через несколько слоёв марли в сосуд с настоем, который доводили до нужного объёма. Настой принимали по три стакана в сутки дробными порциями (Минаева, 1991). Положительные результаты были получены при лечении настоями *I. obliquus* злокачественных

новообразований желудка, 12-перстной кишки, малого таза. Настой берёзового гриба снимал болевой синдром, диспептические явления, нормализовал функции кишечника ((Балицкий, Воронцова, 1982). Достаточно широко настои *I. obliquus* применяются в отоларингологии при опухолях гортани. Их назначают в виде ингаляций, которые устраняют расстройства глотания, уменьшают осиплость голоса, способствуют улучшению дыхания (Лавренова, 1996).

Естественно, что по мере накопления знаний о действии экстракта берёзового гриба на организм больного возникла потребность установить, какие именно вещества, входящие в состав плодовых тел, являются действующим началом. В 1864 г. профессор Юрьевского университета Г. Драгендорф предпринял попытку выяснить химический состав чаги. Ему не удалось выделить ни глюкозидов, ни алкалоидов, которые в то время занимали лидирующее положение среди лекарственных веществ. Он установил наличие у *I. obliquus* растворимых в воде пигментов, однако не придавал им значения и сделал вывод о том, что «в чаге весьма трудно допустить какие-либо терапевтические свойства» (Гринкевич, Сорокина, 1988). К изучению химического состава чаги вернулись почти 100 лет спустя, в 50-х годах XX ст. Профессора Ленинградского мединститута им. И.П. Павлова и Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН П.К. Булатов, М.П. Березина и П.А. Якимов экспериментально продемонстрировали в составе водорастворимой пигментной фракции наличие веществ полифенолкарбоновой природы (хромогенного комплекса, который способен давать интенсивно окрашенные коллоидные растворы). Чага оказалась богата микроэлементами, среди которых особенно высоким содержанием характеризуется марганец (53,40 мкг/г). По всей видимости, марганец служит активатором ряда ферментов при лечебном действии чаги. Кроме того, в плодовых телах *I. obliquus* обнаружены полисахариды, стероидные и стеринные соединения, агарциновая и щавелевая кислоты, птерины, тритерпеноиды, флавоны, смолы. Высказано предположение, что именно такой неповторимый набор химических соединений делает чагу хорошим биогенным стимулятором, который положительно влияет на центральную нервную систему, улучшает обмен веществ, снимает интоксикацию, усиливает кровообращение, повышая сопротивляемость организма (Якимов, 1959).

В 50-х годах XX ст. в России были проведены клинические испытания препаратов чаги (настоя, экстракта), после чего в 1955 г. было получено официальное разрешение фармкомитета Минздрава СССР на применение водного извлечения, спиртовой настойки и густого экстракта, так называемого бэфунгина (Якимов и др., 1957). Последний используется как симптоматическое средство для лечения дискинезий желудочно-кишечного тракта с явлениями атонии, кожных заболеваний, связанных с воспалительными процессами в желудке и кишечнике, хронических гастритов, язвы желудка и 12-перстной кишки, а также злокачественных опухолей как вспомогательное средство наряду с химиотерапией (Булатов, Мартынова, 1961). Обычно три чайных ложки бэфунгина растворяют в 150 мл воды и пьют по столовой ложке три раза в день за полчаса до еды в течение 3-5 месяцев с перерывами 7-10 дней. Продолжавшееся в Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН изучение химического состава чаги показало наличие в водных экстрактах высокого содержания щавелевой кислоты и сложной смеси ароматических кислот, входящих в полифенольный комплекс гриба (Ширнина и др., 1959, 1960). В дальнейшем появились сообщения о содержании в чаге стероидных птериновых соединений (терри- и аминоптеринов), которым и приписывалось противоопухолевое действие препаратов гриба (Турова, 1974; Телятьев, 1991; Лавренова, 1996).

I. obliquus был известен как противораковое средство не только в народной медицине России, Белоруссии и Украины, но также и Польши, где использовался населением горных местностей и районов, граничащих с Украиной и Белоруссией (Grzywnowicz, 2001). Поэтому польские врачи и физиологи животных в середине XX ст. развернули интенсивные исследования антибластических свойств отваров и экстрактов из *I. obliquus* и *Piptoporus betulinus* в экспериментах на лабораторных животных, доказав их ингибирующее действие на рост опухолей (Wandokanty et al., 1954; Wandokanty 1955; Piaskowski, 1956). Одновременно проводилось изучение особенностей химического состава плодовых тел берёзового гриба и чаги. В базидиомах *P. betulinus* было установлено высокое содержание пятициклических тритерпенов, в частности полипориновой кислоты, тогда как у *I. obliquus* эти тритерпены обнаруживались только в виде следов (Utzig, 1957; Wandokanty, Utzig, 1958).

I. obliquus является лекарственным макромицетом, который, будучи заимствован у народной медицины восточных славян, был включён в официальную фармакопею XX ст. и до сих пор достаточно интенсивно используется в современной медицинской практике. Лекарственные препараты из других макромицетов либо не исследованы соответствующим образом, либо вытеснены синтетическими антибиотическими или гормональными препаратами аналогичного назначения, но более широкого и сильного спектра действия. В настоящее время подтверждается тот факт, что биологически активные вещества растительного и грибного происхождения ближе организму человека по своей природе, чем синтетические препараты, они легче усваиваются и включаются в процесс его жизнедеятельности. Отсюда возникает необходимость обозреть и другие лекарственные макромицеты, использовавшиеся в народной медицине восточных славян.

Один из новгородских «Вертоградов» XIV в. содержит упоминание об использовании плодовых тел дождевиков в качестве перевязочного материала. Н.А. Богоявленский указывает, что в XIV-XV ст. наиболее распространённым на Руси перевязочным материалом была баранья шерсть, но в XV-XVII ст. её заменили высушенные грибы – «губы-дождевки» (Богоявленский, 1952). Впоследствии эти сведения о дождевиках перекочевали в более поздние источники по народной медицине восточных славян. В литературе есть многочисленные указания на то, что в XV-XIX ст. споровая масса дождевиков из родов *Lycoperdon Pers.*, *Bovista Pers.*, *Calvatia Fr.*, плодовые тела которых в народе называли «волчий табак» или «заячья картошка», использовались как кровоостанавливающее и противовоспалительное средство, обладающее антисептическим действием (Землинский, 1958; Богоявленский, 1966; Лекарственные растения ..., 1976; Мурых, Стекольников, 1990). В журнале «Экономический магазин», который издавался как приложение к «Московским ведомостям», в 1780 г. было опубликовано «Замечание о дождевиках», в котором сообщалось, что «пыль» дождевиков, находящаяся под наружную кожицей, при возложении её на «повреждённые пульсовые жилы присасывается к ране, затворяет оную собой» и таким образом унимает кровотечение (Васильков, 1953). Споры этих грибов применялись в гомеопатии в виде настойка, приготовленной на 60%-м спирте (Энциклопедический словарь лекарственных ..., 1951; Землинский, 1958;

Крылов, 1972). Есть сведения и о том, что споровым порошком *Calvatia gigantea* (Pers.) Lloyd лечили рак кожи (Лекарственные растения ..., 1976), некоторые виды дождевиков использовали при заболеваниях почек и мочевого пузыря (Лоевский, 1866; Кондратюк и др., 1967). Вот как описывает Ф. Лоевский применение дождевика для лечения мочекаменной болезни в «Полном настоящем простонародном русском лечебнике»: «Простой народ излечивается от сей болезни, употребляя по ползолотнику порошков внутреннего дождевика, смешав оный с хлебом, четыре раза всякий день» (Лоевский, 1866, с. 89).

Следует отметить, что подобные знания о лечебных свойствах дождевиков были известны и весьма отдалённым географически народам Индии и Китая, в особенности Тибета. Виды рода *Lycoperdon* использовались в индо-тибетской медицине для остановки кровотечений, для очистки крови от яда (Асеева, Баторова, 1983; Базарон, Асеева, 1984), в качестве кровоостанавливающего средства при проведении операций, вяжущего средства при воспалительных процессах в миндалинах, гортани, слизистых оболочках, при кровотечении из носа (Чхве Тхэсоп, 1987). *Calvatia maxima* Morg. применяется в китайской медицине как противовоспалительное средство, обладает резорбционным и кровоостанавливающим свойствами, назначается при кашле и заболеваниях кожи (Ибрагимов, Ибрагимова, 1960).

К гастероидным базидиомицетам, кроме дождевиков, относится также *Phallus impudicus* L. Это одни из немногих макромицетов, сохранивший до наших дней своё значение как лекарственное средство народной медицины. Название этого гриба у восточных славян – веселка, панна, дзябка. Издавна известно о многоплановом применении *Ph. impudicus* в народной медицине. Водные и спиртовые вытяжки из свежих или высушенных плодовых тел, а иногда порошок из мелко истолчённых сухих плодовых тел применяли при разных заболеваниях желудочно-кишечного тракта (Смик, 1970; Лекарственные растения ..., 1976). Настойку плодовых тел гриба на водке считали хорошим средством при болях в желудке, ею промывали раны. Веселкой лечили некоторые кожные заболевания, ревматизм, подагру и болезни почек (Энциклопедический словарь лекарственных ..., 1951; Николаева, 1964; Мурох, Стекольников, 1990). Для лечения мочекаменной болезни больным 4 раза в день давали порошок из плодовых тел, смешанный с хлебной мякотью. Особенно

ценными для приготовления лекарственных средств считались плодовые тела на стадии яйца, которые называли «земляным маслом». Традиции использования *Ph. impudicus* в качестве народного лекарственного средства сохранилась до сих пор. Во время экспедиции в Западное Полесье Украины летом 1998 г. мы наблюдали торговлю плодовыми телами этого гриба на рынке г. Ковеля. Гриб рекламировался как средство от ревматизма и подагры. В народной медицине Польши *Ph. impudicus* применялся как афродизиак (Grzywnowicz, 2001). В России же с давних пор в качестве подобного лекарства от мужского бессилия хорошим средством считался совсем другой вид гриба, так называемый олений трюфель *Elaphomyces granulatus* Fr., относящийся в отличие от *Ph. impudicus* не к базидиомицетам, а к аскомицетам и являющийся гипогейным грибом, т.е. развивающим плодовые тела в земле (Рытов, 1918; Васильков, 1953). Ещё в 1786 г. А.Т. Болотов поместил в вышеупомянутом журнале «Экономический магазин» статью «Об оленьих грибах» с указанием на то, что они «имеют врачебную силу, гонят пот, чистят кровь и подкрепляют ослабевшую мужскую натуру, а с пользой употребляются и от разных женских болезней».

Одним из широко распространённых у восточных славян лекарственных грибов была известная с XIII-XIV ст. лиственничная губка, или трутовик лекарственный (*Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bondartsev et Singer]. В фармакологической практике этот гриб называли *Agaricus albus* или *Fungus laricis*. Гриб развивается на видах лиственницы, реже сосны и пихты как дереворазрушающий. Плодовые тела копытообразные, до 40 см, с шероховатой поверхностью в виде концентрических беловатых, жёлтых и коричнево-бурых зон, с мягкой в свежем состоянии, белой или желтоватой сердцевинной, очень горькой на вкус. В XVI-XIX ст. массовые заготовки *F. officinalis* велись в лесах в окрестностях Архангельска, откуда плодовые тела лиственничной губки под названием «агарик» даже экспортировались в Европу через Гамбург. Н.А. Богоявленский указывает, что плодовые тела этого гриба ещё в период Новгородской феодальной республики с севера России вывозились в Европу, где продавались «франкам», и Азию, где их за высокую цену приобретали «арапьяне» (Богоявленский, 1966). По данным этого автора, в XVI-XVII в. экспорт лиственничной губки достигал нескольких тысяч пудов в год, а промысел, заключавшийся в сборе этого гриба, составлял существенную статью дохода крестьян российского

севера. Небольшие количества лиственничной губки заготавливаются в Российской Федерации и теперь. Заготовки производятся с весны и до середины лета. Рекомендуется собирать молодые, не очень крупные экземпляры плодовых тел белого цвета. Собранные плодовые тела очищают от коры дерева и собственного коркового слоя. Оставшуюся сердцевину режут на куски и сушат в хорошо проветриваемом помещении, в результате сырьё имеет вид лёгких белых или желтоватых кусков без запаха, сладковатого, а затем очень горького вкуса (Фруентов, 1974).

Сбор плодовых тел лиственничной губки производился и в Украине, где запасы её были значительно меньше, т.к. площади лесов из лиственницы были весьма ограничены. В учебнике для сборщиков лекарственного сырья с рисунками и народными названиями растений «Лічнічі рости», написанном Т. Паничем сообщалось: «На дереві модрини росте губка (гриб *Polyporus officinalis* Fries), часто до ваги 5 кг, котру збирається на протязі літа, відкидається кору і сушиться» (Панич, 1924, с. 38-39). В учебнике имеется календарь сроков проведения заготовки определённых видов лекарственных растений. В нём указано, что лиственничная губка может заготавливаться круглогодично. Кроме того, *P.officinalis* обозначен в списке лекарственных растений двумя звёздочками, что, по словам автора, расшифровывается следующим образом: 1) «гриб має в лічниці і торгівлі першорядне значення»; 2) «збирається без обмеження кількості». Такой неограниченный сбор, пропагандируемый ещё в начале XX ст., привёл к тому, что в XXI ст. лиственничная губка, теперь относящаяся к *Laricifomes officinalis* (Vill.:Fr.) Kotl.et Pouzar, в Красной книге Украины (2009) имеет природоохранный статус исчезнувшего вида и сохраняется только в виде чистой культуры в коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины.

Показаниями к применению настоев или пилюль из лиственничной губки являлись сахарный диабет, повышенная функция щитовидной железы, лихорадка, неврастения, желтуха, астма. Примочки из настоев гриба помогали при остановке кровотечения из дёсен, при гнойных воспалениях глаз, у новорождённых и взрослых. Эссенция из свежих плодовых тел иногда находила применение при изготовлении гомеопатических лекарств в виде тинктуры (Мурах, Стекольников, 1990). Препараты из гриба использовались также в качестве слабительного или

кровоостанавливающего средства. В народной медицине Польши препараты из листовничной губки прописывали при кровотечении, гнойных ранах, геморрое, рвотах, спазматическом кашле, ревматизме и как *elixirium ad longam vitam* (Grzynowicz, 2001). Наиболее эффективно настои, порошки или пилюли из гриба действовали как средство для ослабления функции потовых желёз, которое значительно уменьшало изнурительное ночное потоотделение у больных туберкулёзом (Рытов, 1918; Землинский, 1958). Использовались эти препараты также для снижения потоотделения при лихорадках, диабете, неврастении, базедовой болезни (Фруентов, 1974; Телятьев, 1976, 1991). Плодовые тела *F. officinales* содержат различные кислоты: агарициновую, эбуриколовую, фумаровую, рициноловую, лимонную, яблочную, а также глюкозу, маннит, глюкозамин, фитостерин, минеральные соли, в основном фосфаты, и от 30 до 80% смол (Турова, 1974). В процессе подавления функции потовых желёз главным действующим началом является агарициновая кислота (агарицин), содержание которой в плодовых телах гриба достигает 16%. Кроме того, в небольших дозах агарициновая кислота (агарицин) обладает снотворным и успокоительным действием. На Руси существовали разные способы приготовления средств для уменьшения потоотделения у туберкулёзных больных: водный настой, настой на можжевеловой водке, порошки или пилюли. Для приготовления водного настоя мелко нарезанные кусочки сердцевинки плодового тела гриба помещали в воду из расчёта одна столовая ложка на 1,5 стакана воды и кипятили в течение 20 мин, настаивали 4 ч, после чего процеживали через марлю и принимали по столовой ложке 3-4 раза в день (Фруентов, 1974). Порошки готовили так: мелко нарезанные кусочки сердцевинки толкли в ступке с горячей слизью трагаканта [*Astracantha arnacantha* (M. Bieb.) Podlech] в соотношении 1:48; полученную массу высушивали, в результате чего она превращалась в порошок. Этот препарат в фармации был известен как *fungus boletus laricis praeparatus* (Рытов, 1918). Агарициновая кислота в плодовых телах *F. officinalis* находится в смеси со смолами (*resina agaric albi*), которые образуются в плодовом теле гриба вследствие химических изменений стенок грибных гиф. Одна из этих смол (красная смола) оказывает сильное слабительное действие, что нежелательно для больных туберкулёзом. Это и стало одной из главных причин, по которой листовничная губка была заменена другими лекарственными средствами. Уже в начале XIX ст. в

медицинских справочниках, например, «Хозяйственной ботанике» Н. Щеглова 1928 г., посвящённой врачевным и ядовитым растениям, указано, что это «сильное очистительное средство ныне редко употребляется» (с. 233).

Дальнейшее накопление сведений о лекарственных растениях и грибах, способствовало появлению многочисленных справочников, так называемых «Лечебников» или «Травников». В конце XVI ст. (1588 г.) по приказу русского царя Фёдора Иоанновича впервые был составлен «Травник», который стал предшественником будущих фармакопей. Новую информацию о лекарственных грибах находим в рукописных «Лечебниках» XVII ст. В одной из таких рукописях сообщается, что «в бору около пеньков растут белые грибки; их нужно высушить, истолочь, затем настоять в воде». Настой этот рекомендовалось пить больным язвой. В другом «Лечебнике» 1672 г. содержится указание об использовании растущего на древесине гриба иудино ухо *Auricularia auricola* (L.) Underw. как средства, помогающего при некоторых болезнях горла. Рецепт приготовления лекарства из этого гриба содержал следующие рекомендации: «Уши Иудова губа, что гриб, у кого горло болит или кто осипнет. Гриб положить в пресное молоко, поварить немного и тем соком полоскать горло и выплёвывать, пить такое молоко тоже помогает». Ещё в одном, точно не датированном, лечебнике второй половины XVII ст. был приведён способ лечения отмороженных частей тела человека экстрактом из боровых грибов. Рекомендуемое для лечения средство готовилось таким образом: неизвестный автор лечебника советует собрать побольше плодовых тел этих боровых грибов, слегка привялить их (подсушить), затем мелко нарезать и полученные кусочки поместить в стеклянный перегонный аппарат («алембик стекляничный»). В процессе перегонки образуется экстракт, который в соответствии с прописью лечебника следует хранить в стеклянных сосудах, чтобы, как написано в рецепте, «дух не вышел». Расшифровка рукописи, написанной на старославянском языке, позволила установить, как именно применялось это средство. Его использовали как мазь, наносимую на обмороженные места. Рекомендуется подержать поражённый орган возле тепла, после чего смазать его экстрактом. Эту процедуру следует проводить дважды в день (Смик, 1970). Экстракт оказался очень эффективным не только при обморожениях второй степени, при которых обмороженная часть тела постоянно замокает, но и

при обморожениях третьей степени, когда наблюдается некроз обмороженных тканей. Точную идентификацию вида борового гриба, из которого готовили экстракт, удалось осуществить на основании рисунка, помещённого в тексте «Лечебника». По мнению одного из крупнейших знатоков шляпочных грибов России Б.П. Василькова, упоминаемый в «Лечебнике» гриб, несомненно, принадлежит к семейству *Boletaceae* и скорее всего является белым грибом (*Boletus edulis* Bull.). Б.П. Васильков считал этот рисунок первым изображением шляпочного гриба в России. Рецепт мази из белого гриба практически без изменений приводится во всех современных пособиях по народной медицине.

В «Лечебниках» XVII-XVIII ст. находим многократные упоминания о применении в качестве лекарственного средства мухомора красного *Amanita muscaria* (L.) Hook. Скорее всего эти сведения о целебном действии *A. muscaria* были заимствованы славянами из опыта народов Севера. Эскимосы, коряки, чукчи и другие обитатели Чукотки, Камчатки, Аляски использовали мухомор красный как лечебное средство при нервных и психических расстройствах, для снятия физической усталости, поднятия жизненного тонуса (Лавренова, Лавренов, 1999). Русский путешественник академик С.П. Крашенинников в своём сочинении «Описание земли Камчатки» (1775 г.) рассказал об употреблении камчадалами настойки мухомора в кипрейном сусле в качестве веселящего напитка. Давно было известно о культовом значении мухомора у народностей угрской группы ханты и манси. Шаманы этих угров Зауралья вводили себя в состояние транса для общения с богами и духами предков, предварительно приняв настой мухомора (Астахова, 1977). Очевидно, эти сведения о свойствах мухомора красного от северных народностей дошли и до славян, которые применили их в лечебных целях. Так, известно, что в дальнейшем мухомор красный нашёл использование в гомеопатии при приготовлении препарата *Agaricus muscarius*, который применялся при спазмах сосудов, эпилептических и хорееатических состояниях, множественном склерозе, функциональных нарушениях деятельности спинного мозга (Землинский, 1958).

В «Лечебниках» восточных славян мухомор красный фигурирует как наружное средство от ревматизма, подагры, простудных ревматических болей, а также от золотушных опухолей, экзем и некоторых других поражений кожи. Имеются данные о том, что ещё в начале XIX ст. (1811 г.) в

Московской губернии ревматические заболевания лечили соевым раствором мухомора (Орлов, 1953). В Украинском Полесье и Беларуси для этой цели использовали водный или спиртовой раствор этого гриба (Смик, 1970). Солевой настой мухомора, используемый для натираний, готовили так: свежие зрелые плодовые тела (шляпки и ножки) укладывали слоями в глиняный горшок, пересыпая каждый слой солью. Наполнив горшок доверху, замазывали отверстие хлебным тестом и ставили в русскую печь на лёгкий жар. Грибы прели и пускали сок, похожий на медовую патоку, после чего их охлаждали и отжимали через марлю. Полученную жидкость, процедив через марлю, сливали в бутылку. Такой жидкостью дважды в день смазывали больные места ревматических воспалений, предварительно потерев их суконкой. Сок мухомора не терял целебной силы на протяжении долгих лет (Астахова, 1977). С XIX ст. известен и другой рецепт приготовления лекарства из мухомора предлагаемого для лечения простуды ног. Плодовые тела складывали в банку, заливали водой и оставляли на 9 дней. По истечении этого срока на поверхности воды образовывалось масло, которое сливали в стеклянный сосуд и натирали им больные ноги (Лоевский, 1866). Имеются сведения о том, что сок, мазь или отвар мухомора красного хорошо заживляет кожу, поражённую рентгеновским облучением. Так, в литературе описано, что ташкентский врач А.И. Николаев из Института радиологии и онкологии применил 10% мазь из водного экстракта этого гриба для лечения лучевых дерматитов, которые часто возникают у онкобольных при рентгенотерапии (Астахова, 1977; Стекольников, Мурох, 1979).

Мухомор красный у восточных славян входил также в состав различных снадобий для лечения туберкулёза лёгких и некоторых форм раковых опухолей. Впоследствии исследования химического состава плодовых тел этого гриба показали, что, помимо алкалоида мускарин, в их состав входят иботеновая кислота, мусцинол, триметиламин, холин, а также антибиотическое красящее вещество – мускафурин, относящийся к производным коликоровой кислоты, которые обладают противоопухолевым действием (Лавренова, Лавренов, 1999). Однако, более поздние данные свидетельствуют, что лечение туберкулёза и рака препаратами, включающими *A. muscaria*, положительных результатов не даёт.

Amanita muscaria издавна известна как один из компонентов гомеопатических лекарств. В гомеопатии применяется эссенция из свежих плодовых тел этого гриба, действующим началом которой является алкалоид мускарин ($C_8H_{19}O_3N$), имеющая вид прозрачной, без запаха и вкуса сиропообразной массы, которая легко кристаллизуется в виде неправильных кристаллов, легко растворяется в воде и спирте (Энциклопедический словарь лекарственных ..., 1951). Гомеопатические препараты с *A. muscaria* назначаются при заболеваниях центральной нервной системы (Землинский, 1958). До нашего времени дошла информация и об использовании в народной медицине славян ещё одного представителя рода *Amanita* Pers., а именно такого опасного для жизни человека ядовитого гриба, как бледная поганка *Amanita phalloides* (Fr.) Secr. В малых гомеопатических дозах он применялся для лечения холеры (Энциклопедический словарь лекарственных..., 1951; Смик, 1970).

Кроме рассмотренных широко распространённых лекарственных грибов *Claviceps purpurea*, *Inonotus obliquus*, *Laricifomes officinalis* (Syn.*Fomitopsis officinalis*), *Boletus edulis*, *Amanita muscaria*, различные дождевики, в старых руководствах имеются отдельные упоминания и других видов макромицетов, которые также играли определённую роль в восточнославянской народной медицине. Среди них заслуживает упоминания ряд видов съедобных грибов. Так, маслёнок лиственничный *Boletus elegans* Bolton (теперь это синоним *Suillus grevillei* (Klot.) Singer) употреблялся населением Украинского Полесья при подагре и головной боли. При этом действующим началом считалось его смолистое вещество (Кондратюк и др. , 1967). В народной медицине Польши достаточно широко распространены снадобья, приготовленные из различных видов рода *Lactarius* Pers., которые использовались против воспалительных заболеваний мочеполовых путей (Grzypowicz, 2001). У славян, населявших территорию России, Беларуси, Украины, грузди исстари рекомендовали применять в пищу в слегка поджаренном виде как средство для лечения мочекаменной болезни и туберкулёза (Мурох, Стекольников, 1990). Особенно ценным как мочегонное, а также при мочекаменной болезни считался *Lactarius piperatus* (Fr.) Gray. В старых «Лечебниках» даже приводилась одноразовая доза млечника перечного, которую следовало использовать при лечении этого заболевания: 250-300 г слегка поджаренного гриба с небольшим количеством пряностей (Кондратюк и

др., 1967). По данным Н.И. Орлова (1953), В. Драгендорф ещё в 1898 г. установил, что действующим началом *L. piperatus* является его белый, на вкус жгуче-едкий млечный сок, который и используется как diureticum. Другой вид рода *Lactarius* – *L. volemnus* Fr. – на Украинском Полесье в виде вытяжки из молодых плодовых тел применялся для лечения тифа и паратифа (Смик, 1970). Гриб-баран *Sparassis crispa* (Fr.) Fr., который в народе называли также «лесное счастье» или «толстая курица», рекомендовали для лечения некоторых заболеваний печени и жёлчного пузыря (Мурох, Стекольников, 1990).

Однако не только съедобные грибы использовались восточными славянами в медицинской практике. Как было указано выше, в народной медицине восточных славян нашли применение и некоторые виды ядовитых грибов, в частности *Amanita muscaria* и *A. phalloides*. Однако это не единственные виды ядовитых грибов, послужившие источниками различных лекарственных снадобий. Так, на Украинском Полесье опёнок серно-жёлтый ложный *Huipholoma fasciculare* (Huds.) P. Rumm. и опёнок кирпично-красный ложный *H. sublateralium* (Schaeff.) Quel. применялись как слабительное и рвотное (Смик, 1970; Мурох, Стекольников, 1990). Знания человека о средствах, позволяющих оказывать медицинскую помощь больным, практически полностью базировались на лекарствах, которые можно было найти в природе. При этом более 80% всех используемых лечебных средств составляли лекарственные растения, к которым в те и более поздние времена относились и грибы. По мере развития медицины и фармакологии синтетические, антибиотические и гормональные препараты потеснили естественные лекарственные средства. Уже в конце XIX, а особенно в XX ст. синтетические лечебные препараты значительно потеснили народные лекарственные средства, в том числе и изготовляемые из грибов. Однако в настоящее время, несмотря на значительные успехи фармакологической химии в создании соединений для лечения заболеваний различной природы, наблюдается тенденция к пониманию того, что биологически активные вещества растительного и грибного происхождения являются более родственными человеку, чем синтезированные химические препараты. Организм человека в процессе всей его эволюции адаптировался к усвоению продуктов растительного и грибного происхождения, они легче включаются в процесс жизнедеятельности его организма. Лекарственные

препараты из растений и грибов имеют ряд преимуществ перед синтетическими: обычно они характеризуются более широким спектром действия; они активны против штаммов болезнетворных микроорганизмов, которые приобрели резистентность к антибиотикам, гормонам и другим синтезированным химическим препаратам. В связи с этим в конце XX – начале XXI ст. в ряде стран мира, в особенности тех, где с глубокой древности грибы использовали в лечебных целях (Китай, Япония, Индия и др.), возродился интерес биологов, в первую очередь микологов и биохимиков, фармакологов, врачей к грибам как к продуцентам биологически активных веществ. На новом уровне развития науки не только возникла потребность в восстановлении старых утраченных знаний о природных лекарственных средствах грибного происхождения, но и в исследовании грибов современными методами для выявления всего спектра метаболитов грибных организмов, которые могут найти применение в медицинской практике. На фоне активного изучения грибов в Восточной Азии они стали объектом исследования во многих странах мира, включая США, Германию, Нидерланды и др. В Украине пионером изучения лекарственных грибов стал член-корреспондент Национальной Академии наук Украины, профессор С.П. Вассер, один из ведущих агарикологов мира, блестящий знаток базидиальных макромицетов, которые и привлекли внимание ученых как продуценты биологически активных веществ с широким спектром лекарственных свойств. В 90-ых годах XX ст. С.П. Вассер вместе с профессором А.С. Бухало стал в Украине фундатором этой новой, быстро развивающейся отрасли микологии. Им вместе с коллективом сотрудников были выполнены широкомасштабные исследования макромицетов, обладающих лечебным действием, для получения из них пищевых добавок и медицинских препаратов с иммуномоделирующим, противоопухолевым, антивирусным, антидиабетическим, гипогликемическим и другими свойствами. Под его руководством были выполнены важные разработки по использованию и биотехнологическим аспектам культивирования видов из родов *Tremella*, *Pleurotus*, *Coprinus*, *Trametes*, *Agaricus*, *Lepiota*, *Omphalotes* и других съедобных и лекарственных грибов с целью получения противораковых (в том числе полисахаридов и низкомолекулярных соединений), холестеринпонижающих, антидиабетических, антибиотических соединений и других метаболитов, а также пищевых добавок. Многие из

этих веществ прошли проверку и получили защиту их новизны патентами США (US Patents № 6Б 372, 462В2: 6, 383, 799В1; 6, 372,964В1; 6, 362, 397В1 и др.). По материалам этих исследований опубликовано более 80 статей и монография «Impact of the Family Agaricaceae (Fr.) Cohn. on Nutrition and Medicine». В 2009 г. совместно с проф. А.С. Бухало была издана книга «Microstructures of Vegetative Mycelium of Macromycetes on Pure Cultures», которая содержит оригинальные данные о микроструктуре вегетативного мицелия 100 видов съедобных и лекарственных макромицетов.

С.П. Вассер стал инициатором и организатором первых международных конференций по лекарственным грибам, которые объединили лучшие в мире силы ученых, работающих в этой области. Первая конференция, состоявшаяся в 2001 г. в Киеве, стала знаменательным событием для всех микологов Украины, значительно стимулировала их интерес к этому важному направлению в изучении грибов, положила начало регулярным встречам специалистов по сбору, выращиванию в культуре и использованию в медицине лекарственных грибов. Вторая конференция была проведена в 2003 г. в Таиланде. Микологическая общественность высоко оценила вклад С.П. Вассера в развитие такого актуального направления науки о грибах, как исследование лечебных свойств и возможностей их использования во врачебной практике: на обеих этих конференциях он был избран вице-президентом. В дальнейшем С.П. Вассер принимал активное участие практически во всех последующих конференциях по лекарственным грибам, которые проходили в разных странах мира: 3-ья – в г. Порт-Таунсенде (США) в 2005 г., 4-тая – в Словении в 2007 г., 5-тая – в Китае в 2009 г., 6-тая – в Хорватии в 2011 г. Ему принадлежит заслуга публикации тезисов докладов Киевской и Порт-Таунсендской конференций, которые имели огромное значение для популяризации новейших научных данных по лекарственным грибам и для привлечения свежих сил в эту область медицинской микологии. Неменьшую роль в этих процессах сыграл основанный С.П. Вассером в 1999 г. журнал «International Journal of Medicinal Mushrooms» (IJMM). В 2019 г. IJMM исполняется 20 лет и все эти годы С.П. Вассер возглавляет журнал как его главный редактор. За эти годы в журнале опубликовано свыше полутора тысяч статей, представляющих как оригинальные исследования, так и критические обзоры научной литературы по лекарственным грибам. IJMM на своих

страницах освещает весь комплекс вопросов, связанных с лекарственными макромицетами: систематику, таксономию, культуры и коллекции культур макромицетов, биотехнологии культивирования, биохимии, физиологии, химии вторичных метаболитов, генетики, фармакологии, терапевтического применения биомедицинских компонентов, общую характеристику использования лекарственных макромицетов, в частности видов, культивируемых на промышленной основе и др.

Научная и организационная деятельность С.П. Вассера в развитии исследований лекарственных грибов в вышеназванных направлениях во многом способствовала возрождению интереса к видам, использовавшимся в фармакопее восточных славян и других народов. В последние десятилетия данные об изучении различных лечебных свойств этих видов грибов представлены лавиной публикаций в различных научных журналах, среди которых не только *IJMM*, но и «*Mycobiology*», «*Journal of Ethnopharmacology*», «*Frontiers of Microbiology*», «*Journal of Cancer*» и др. Ценная информация о применении в современной фармакологии лечебных свойств грибов-макромицетов, использовавшихся в народной медицине восточных славян, содержится в обзорах литературы типа «*European medicinal polypores – A modern view on traditional uses*» (Grienke et al, 2014), в многочисленных экспериментальных статьях. Подтверждением этого могут служить данные об исследованиях в XXI ст. таких широко применявшихся еще в XIII ст. макромицетов, как *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil., *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst., *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) J. Kickx. и некоторых других видов полипоровых грибов. Из исследований последних лет заслуживает внимания изучение биоактивных веществ, ответственных за противовоспалительное воздействие *F. fomentarius*. Одним из таких веществ был выбран метил 9-оксо-(10*E*,12*E*)-октадекадиеноат (FF-8), выделенный из *F. fomentarius*. Корейскими исследователями проведено изучение противовоспалительной активности FF-8 на макрофагов оболочки клеток, стимулированной липополисахаридом (LPS). FF-8 подавляет секрецию NO и простогландина E₂ путем понижения экспрессии стимулированных NO синтетазы и циклооксигеназы-2, которая индуцируется LPS. Кроме того, установлено, что предварительная обработка клеток FF-8 приводит к уменьшению уровней выделения воспалительных цитокинов, таких, как фактор-α (опухолевого некроза) и интерлейкин-6 у макрофагов. Суммируя эти и

другие дополнительные данные относительно действия FF-8 из *F. fomentarius* выявлено, что он подавляет воспалительную реакцию в макрофагах, стимулированную LPS (Ji-Hyun Choe et al, , 2015). Группа немецких микробиологов изучала биологическую активность экстрактов *F. fomentarius* (5 штаммов) и *P. betulinus* (3 штамма) и проводила скрининг на антибиотическую и антифунгальную активность на наборе из четырех бактериальных (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*) и четырех потенциально патогенных или образующих токсины грибов (*Absidia orchidis*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Candida krusei*). Экстракты всех пяти штаммов *F. fomentarius* с минимальной ингибирующей концентрацией (MICs) 250-500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ были активны против *S. aureus* и с MICs 125-500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ – против *A. fumigatus* и *A. orchidis*. Экстракты *P. betulinus* обладали высокой антибактериальной активностью против *B. subtilis* уже при MIC 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, а против *S. aureus* – при MIC 31 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Рост *A. orchidis* экстракты *P. betulinus* подавляли при 500-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, а у *A. fumigatus* такие же концентрации причиняли аномальный рост гриба (Dresch. et al, 2015).

Эти две публикации рассмотрены детально как пример того, что макромицеты – классические объекты традиционной народной медицины восточных славян в настоящее время подвергаются детальному изучению с применением современных методов, направленных на выявление действующих механизмов их вторичных метаболитов на патогенные организмы.

ЛИТЕРАТУРА

Асеева Т.А., Баторова С.М. Расшифровка тибетских названий растений, описанных в трактатах «Вайдурья-онбо» и «Дзейцхар мигчжан» // Биол. действие веществ природного происхождения.- Улан-Удэ: Бурят. фил. СО АН СССР, 1983.- С. 17-79.

Астахова В.Г. Загадки ядовитых растений.- М.: Лес. пром., 1977.- 176 с.

Базарон Э.Г., Асеева Т.А. «Вайдурья-онбо» – трактат индо-тибетской медицины.- Новосибирск: Наука, 1984.- 117 с.

Балицкий К.П., Воронцова А.Л. Лекарственные растения и рак.- Киев: Наук. думка, 1982.- 375 с.

- Богоявленский Н.А.** О некоторых чертах лекарствоведения в Московской Руси // Сов. медицина.- 1952.- № 2.- С. 45-47.
- Богоявленский Н.А.** К истории происхождения и развития взглядов у русского народа на опухолевые болезни // Вопр. онкологии.- 1955.- 1, № 4.- С. 106-111.
- Богоявленский Н.А.** Древнерусское врачевание в XI-XVII вв. Источники для изучения истории русской медицины.- М.:Медгиз, 1960.- 326 с.
- Богоявленский Н.А.** Медицина у первоселов русского севера. - Л.: Медицина, 1966.- 160 с.
- Булатов П.К., Мартынова Е.Я.** Клинические наблюдения за лечебным действием чаги на больных раком IV стадии // Комплексное изучение физиологически активных веществ низших растений.- М.;Л.: Изд-во АН СССР, 1961.- С. 247-257.
- Васильков Б.П.** Понятие о грузде в русской литературе и в обычной жизни // Сов. ботаника.- 1942.- № 1-3.- С. 18.
- Васильков Б.П.** Изучение шляпочных грибов в СССР.- М.;Л.: Изд-во АН СССР, 1953.- 192 с.
- Гаммерман А.Ф., Макеенко С.Г., Харитонова Н.П.** Ресурсы дикорастущих лекарственных растений Вологодской и Псковской областей // Ресурсы дикорастущих лекарственных растений СССР.- Л.: Наука, 1968.- С. 5-15.
- Гринкевич Н.И., Сорокина А.А.** Легенды и быль о лекарственных растениях. - М.: Наука, 1988.- 175 с.
- Заупе Ю.** Природа - наш доктор. Всё, что нужно знать о лекарственных растениях.- М.: Крон-Пресс, 1994.- 302 с.
- Землинский С.Е.** Лекарственные растения СССР.- М.: Медгиз, 1958.- 610 с.
- Ибрагимов Ф.И., Ибрагимова В.С.** Основные лекарственные средства китайской медицины.- М.: Медгиз, 1960.- 412 с.
- Ивашин Д.С.** Ресурсы лекарственных растений Украинских Карпат и возможности их использования // Ресурсы дикорастущих лекарственных растений СССР.- Л.: Наука, 1968.- С. 90-94.
- Кондратюк Е.Н., Ивченко С.И., Смык Г.К.** Дикорастущие лекарственные и плодовые растения Украины.- Киев: Урожай, 1967.- 180 с.
- Крылов Г.В.** Травы жизни и их искатели. 2-е изд. доп.- Новосибирск: Зап.-Сиб. книж. изд-во, 1972.- 448 с.

- Лавренова Г.В.** Лекарственные травы. Травы, дарующие здоровье.– М.:Тера – Тегга, 1996.– Кн. 1.– 478 с.; Кн. 2.– 474 с.
- Лавренова Г.В., Лавренов В.К.** Энциклопедия лекарственных растений. Т. 1.– Донецк: Донеччина, 1999.– 655 с.
- Лекарственные растения и их применение:** 6-е изд. / Под. ред.И.Д. Юркевича и И.Д. Мишенина.– Минск: Наука и техника, 1976.– 591 с.
- Ловкова М.Я., Рабинович А.М., Пономарева С.М. и др.** Почему растения лечат.– М.: Наука, 1989.– 254 с.
- Лоевский Ф.** Полный настоящий престонародный русский лечебник. – М.: Типография С. Орлова, 1866.– 1064 с.
- Минаева В.Г.** Лекарственные растения Сибири.– Новосибирск: Наука, 1991.– 430 с.
- Мурох В.И., Стекольников Л.И.** Целебные кладовые природы. – Минск: Ураджай, 1990.– 367 с.
- Николаева В.Г.** Материалы к исследованию лекарственных растений народной медицины Белоруссии: Автореф. дис. ...канд. биол. наук.– Минск, 1964.– 17 с.
- Орлов Н.И.** Съедобные и ядовитые грибы, грибные отравления и их профилактика.– М.: Медгиз, 1953.– 271 с.
- Панич Т.** Лічнічі рости́ни. Підручник для збирачів, з відбитками і народними назвами рости́н.– Львів: Спілка укр. кооперативів Галичини, 1924.– 153 с.
- Преображенский В.** Всё о лекарственных растениях. – Донецк: ПКФ «БАО», 2000.– 592 с.
- Рытов М.В.** Русские лекарственные растения. Т. I. Дикорастущие и возделываемые лекарственные растения.– Петроград: Изд-во П.П. Сойкина, 1918.– 234 с.
- Смик Г.К.** Зелена аптека.– Киев: Урожай, 1970.– 239 с.
- Стекольников Л.И., Мурох В.И.** Лечебные кладовые природы.– Минск: Ураджай, 1979.– 242 с.
- Телятьев В.В.** Целебные клады Восточной Сибири.– Иркутск: Вост.-Сиб. книж. изд-во, 1976.– 447 с.
- Телятьев В.В.** Целебные клады. Растения, продукты животного и минерального происхождения Центральной Сибири и их лечебные свойства. – Иркутск: Вост.-Сиб. книж. изд-во, 1991.– 400 с.

- Турова А.Д.** Лекарственные растения СССР и их применение: 2-е изд. перераб. – М.: Медицина, 1974.– 424 с.
- Фруентов Н.К.** Лекарственные растения Дальнего Востока: 2-е изд.– Хабаровск: Хабаровск. книж. изд-во, 1974.– 398 с.
- Червона книга України.** Рослинний світ / Під заг. ред. Я.П. Дідуха.– К.: Глобалконсалтинг, 2009.– 912 с .
- Чхве Тхэсоп.** Лекарственные растения. Лекарственные средства растительного происхождения, применяемые в восточной медицине.– М.: Медицина, 1987.– 606 с.
- Ширнина А.Н., Ловягина Е.В., Платонова Е.Г.** К вопросу о природе и происхождении водорастворимого природного комплекса, образуемого трутовым грибом чаги // Биохимия.– 1959.– 24, № 1.– С. 67-72.
- Ширнина А.Н., Ловягина Е.В., Платонова Е.Г.** Спектрофотометрическая характеристика кристаллического карбонильного соединения, выделенного из пигментного комплекса гриба чага // Докл. АН СССР.– 1960.– 132, № 6.– С. 1444-1447.
- Шретер А.И.** Лекарственные растения Дальнего Востока и их применение.– Владивосток: Дальневост. книж. изд-во, 1970.– 136 с.
- Энциклопедический словарь** лекарственных, эфиромасличных и ядовитых растений.– М.: Гос. изд-во с.-х. лит., 1951.– 487 с.
- Якимов П.А.** Общая биологическая и химическая характеристика чаги как исходного сырья для получения лечебных препаратов // Чага и её лечебное применение при раке IV стадии.– Л.: Медгиз, 1959.– 344 с.
- Якимов П.А., Булатов П.К., Березина М.П.** Препарат «Бин-чага» // Вестн. АН СССР.– 1957.– № 4.– С. 88-91.
- Dresch Ph., D’Aguanno M.N., Rosam K., Grienke U., Rollinger J.M. and Peintner U.** Fungal strain matters: colony growth and bioactivity of the European medicinal polypores *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* and *Piptoporus betulinus* // AMB Express – 2015.–5(1); 4.– P. 1/21-21/21.
- Grienke U., Zöll M., Peintner U., Rollinger J.M.** European medicinal polypores – A modern view on traditional uses // Journal of Ethnopharmacology.– 2014.– 154.– P. 564-583.
- Grzywnowicz K.** Medicinal Mushrooms in Polish Folk Medicine // Intern. J. Med. Mushr.– 2001.–V. 3.– P. 154.
- Ji-Hyun Choe, Young-Joo Yi, Myeong-Seok Lee, Dong-Won Seo, Bong-Sik Yun and Sang-Myeong Lee.** Methyl 9-Oxo-(10E,12E)-oktadecadienoate Isolated

from *Fomes fomentarius* Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Blocking Phosphorylation of STAT3 in Murine Macrophages // Mycobiology.- 2015.-43(3).- P. 319-326.

Piaskowski S. Wplyw wyciagu z guza brzozowego na nowotwory zlosliwe // Farmacia Polska.- 1956. - 12, N 1.- S. 5-6.

Utzig J. Wplyw trojterpenow zawartych w zagwi brzozowej *Polyporus betulinus* na guzy Stickera // Doniesienie Tymczasowe Med. Weteryn.- 1957.- 13., N 8 - S. 481-484.

Wandokanty F. Wplyw zagwi brzozowej i guza brzozowego na nowotwory samorzutne psa z uwzględnieniem raka sutka u psow // Med. Weteryn. - 1955.- 11, N 3.- S. 148-151.

Wandokanty F., Utzig J. Wplyw trojterpenow pieciocyklicznych wyosobnionych z zagwi brzozowej (*Polyporus betulinus*) na nowotwory zlosliwe // Med. Weteryn. - 1958.- 14, N 3.- 148-151.

Wandokanty F., Utzig J., Kotz J. Wplyw gidrolizatow z zagwi brzozowej - *Polyporus betulinus* i guza brzozowego - *Poria obliqua* na komorki nowotworow zlosliwych //Med. Weteryn. - 1954.- 10, N 10.- S. 603-605.

ДУДКА І.О. ГРИБИ В НАРОДНІЙ МЕДИЦИНІ СЛОВ'ЯН ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ОКРЕМИХ ВИДІВ НАПРИКІНЦІ ХХ – НА ПОЧАТКУ ХХІ СТ.

У статті підбитий підсумок багатомікового досвіду східних слов'ян у використанні грибів у народній медицині. Перша згадка про гриби, відомі в древній Русі як ліки, міститься в одному з рукописних «Вертоградів» Київського періоду XIII ст., де повідомляється про застосування аскоміцета *Claviceps purpurea* Tul. в гінекологічній практиці. Відомості про лікарські базидіальні макроміцети *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. і *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) J. Kickx., які використовувались при лікуванні туберкульозу, виявлені в одній з монастирських хронік Київської Русі XIII ст. У статті наведені дані про такі лікарські види макроскопічних базидіальних грибів, як *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil., *Calvatia gigantea* (Pers.) Lloyd, *Phallus impudicus* L., *Laricifomes officinalis* (Vill.:Fr.) Kotl. et Pouzar (Syn *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bondartsev et Singer), *Boletus edulis* Bull., *Suillus grevillei* (Klot.) Singer, *Amanita muscaria* (L.) Hook., *A. phalloides* (Fr.) Secr., *Lactarius piperatus* (Fr.) Gray та ін. Для деяких з цих видів описані способи виготовлення лікарських препаратів, які східні слов'яни використовували

для лікування відповідних захворювань та пошкоджень. Висвітлена роль відомого українського міколога, члена-кореспондента НАН України С.П. Вассера у відродженні інтересу спеціалістів до лікарських грибів. На прикладі двох видів з фармакопеї східних слов'ян *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. і *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) J. Kickx. продемонстрований сучасний рівень дослідження лікарських макроміцетів, який відкриває нові можливості використання їх вторинних метаболітів.

DUDKA I.O. FUNGI IN THE PEOPLE'S MEDICINE OF SLAVS AND STUDY OF THE MEDICINAL PROPERTIES FOR SOME SPECIES AT THE END OF XX - BEGINNING OF XXI CENTURIES.

*The century-old experience of the Eastern Slavs in mushrooms' usage in the people's medicine is summarized in the paper. The first mention about the fungi known in the Ancient Rus as drugs, contains in one of the manuscripts "Vertograds" from Kyiv period of XIII century, where there is an information about the application of ascomycete *Claviceps purpurea* Tul. in gynecological practice. The data on medicinal basidial macromycetes *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. and *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) J. Kickx., which were used at the tuberculosis treatment, are found in one of cloister chronicles in Kyiv Rus of XIII century. In the paper the information on the medicinal species of macroscopic basidial mushrooms *Inonotus obliquus* (Pers.) Pil., *Calvatia gigantea* (Pers.) Lloyd, *Phallus impudicus* L., *Laricifomes officinalis* (Vill.:Fr.) Kotl. et Pouzar (Syn *Fomitopsis officinalis* (Vill.:Fr.) Bondartsev et Singer), *Boletus edulis* Bull., *Suillus grevillei* (Klot.) Singer, *Amanita muscaria* (L.) Hook., *A. phalloides* (Fr.) Secr., *Lactarius piperatus* (Fr.) Gray and others is given. The ways of making for medicinal preparations used by Eastern Slavs for cure of certain disease and damage are described for some of those fungal species. The role of S.P. Wasser, famous Ukrainian mycologist, corresponding member of NASU, in revival of specialists' interest in relation to medicinal fungi is interpreted. Using as an example from Eastern Slavs pharmacopia *Piptoporus betulinus* (Bull.: Fr.) P. Karst. and *Fomes fomentarius* (L.: Fr.) J. Kickx. the modern level in study of medicinal mushrooms, which opens the new possibilities in usage of its secondary metabolites, is demonstrated.*

K.-H. WONG^{1,4}, A.P. GRYGANSKYI^{6,10}, P.-G. CHENG², V. SABARATNAM^{3,4},
O.V. KOLOTUSHKINA^{5,9}, B. KIRCHHOFF⁷, G.G. SKIBO⁵, P. PEDARZANI⁸,
K.Y. VORONIN⁵, A.A. GRODZINSKAYA⁶, M.G. MOLDAVAN^{5,9}

¹ - Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia

² - Ganofarm Sdn. Bhd., Lot 700, Jalan Laut Membiru, Tanjung Sepat, 42800 Selangor Darul Ehsan, Malaysia

³ - Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia

⁴ - Mushroom Research Centre, Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Malaysia

⁵ - A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

⁶ - Institute for Evolutionary Ecology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

⁷ - Company WESER-CHAMPIGNON, Hessisch-Oldendorf, Germany

⁸ - University College London, London, UK

⁹ - Oregon Health & Science University, Oregon Institute of Occupational Health Sciences, Portland, Oregon, USA

¹⁰ - Biology Department, Duke University, Durham, North Carolina, USA

LION'S MANE MUSHROOM – THE NATURAL HEALER FOR NERVE DAMAGE

Hericium erinaceus (Bull.: Fr.) Pers is a cultivated edible and medicinal mushroom. As a part of traditional medicines, it has been used for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. Our *in vivo* and *in vitro* studies demonstrated the neuroprotective effects of *H. erinaceus* on neurons and improvement of functional recovery after nerve injury, together with its neurotropic and neurotrophic effects on neurons. We compared the effects of *H. erinaceus* aqueous extract and mecobalamin (vitamin B₁₂) that has been widely used in the treatment of peripheral nerve disorders. The extract of *H. erinaceus* fresh fruitbodies promoted functional recovery following crush injury to the peripheral nerve in rats. Analysis of walking track indicated that return of hind limb motor function occurred earlier in treated groups than in negative control (non-treated) group. Hot plate test revealed acceleration of sensory recovery of hind limbs in the treated groups compared to negative controls. Further, peripheral nerve injury leads to changes at the remotely located dorsal root ganglia containing cell bodies of sensory neurons. Immunofluorescence studies showed that Akt and p38 MAPK were expressed in DRG and strongly upregulated

in aqueous extract group after peripheral nerve injury. Our findings suggest that aqueous extract of *H. erinaceus* accelerates functional recovery after peripheral nerve injury stimulating kinase signaling pathways. Spike reactions of hippocampal neurons during application of *H. erinaceus* extract was studied on the rat brain slices *in vitro*. In the majority of neurons the *H. erinaceus* extract inhibited neuronal spike activity in a concentration-dependent reversible manner. Depending on the properties of extracts the inhibition was observed in 34-63% and excitation in 5-10% of studied neurons. Whole-cell current- and voltage-clamp recordings showed that the inhibition of spike activity during extract application was caused by hyperpolarization of the neuronal membrane. This hyperpolarization was not induced by increase of inward rectifier K^+ current ($I(ir)$) and was not accompanied by changes of hyperpolarization-activated cationic currents $I(h)$, but apamin-sensitive Ca-activated K^+ current (I_{AHP}) and apamin-insensitive, slow Ca-activated K^+ current (sI_{AHP}) increased. All the effects that were observed using patch-clamp recording did not seem to have a synaptic origin and revealed the effect of extract on a cell membrane. *H. erinaceus* extract did not suppress the cellular respiration. Cell culture was used to study the influence of *H. erinaceus* extract on nerve processes development and myelination process *in vitro*. *H. erinaceus* extract improved the myelination process in the mature myelinating fibres in a concentration that did not affect the nerve cells growth *in vitro*, did not evoke toxic effect or the nerve cells damage.

Key words: *Hericum erinaceus*, mushroom, extract, neurons, brain slices, spike activity, cell cultures, polysaccharide, peripheral nerve regeneration, sensory functional recovery, protein kinases, blood-nerve barrier, dorsal root ganglia.

ABBREVIATIONS:

ACSF: artificial cerebrospinal fluid; **AFSA:** average frequency spike activity of neurons; **BR:** extract prepared on the basis of *H. erinaceus* mushroom broth; **DMSO** - dimethyl sulfoxide; **ETHA:** extract of *H. erinaceus* extracted by ethanol; **ETHE:** extract of *H. erinaceus* extracted by ether; **I_{AHP} :** apamin-sensitive Ca-activated K^+ current; **sI_{AHP} :** apamin-insensitive, slow Ca-activated K^+ current; **$I(h)$:** hyperpolarization-activated cationic currents; **$I(ir)$:** inward rectifier K^+ current; **GABA:** γ -Aminobutyric acid; **GABA_A receptors:** A-type receptors sensitive to GABA; **M-cholinoreceptors:** receptors sensitive to muscarine; **N-cholinoreceptors:** receptors sensitive to nicotine; **NMDA receptor:** N-methyl-D-aspartate receptor; **NGF:** Nerve Growth Factor; **5-HT** : 5-hydroxytryptamine (serotonin); **5-HT_{1A}**, **5-HT₁**: the various types of serotonin receptors; **Akt:** Protein kinase B; **p38 MAPK:** p38 mitogen-activated protein kinase; **ERK1/2:**

extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$; **PI3K**: phosphoinositide-3-kinase; **DRG**: dorsal root ganglia; **BNB**: blood-nerve barrier; **NF-200**: neurofilament 200.

INTRODUCTION

Hericium erinaceus (Bull.: Fr.) Pers. (Hericiaceae, higher Basidiomycetes), also known as Lion's Mane, Monkey's Head, Hedgehog Mushroom, Satyr's Beard, Pom Pom Blanc, Igelstachelbart, and Yamabushitake, is one of the good edible cultivated edible and medicinal mushrooms distributed in Asia, Europe, and North America (Dudka and Wasser, 1987). Since 2000, it has been successfully domesticated via adaptation to tropical climate in Malaysia. This mushroom grows and produces fruitbodies in lowlands of tropical temperature (Fig. 1). It has been shown that cultivation conditions did not affect selected bioactive properties of *H. erinaceus* grown in tropical Malaysia (Wong et al., 2009a).



Figure 1. *Hericium erinaceus* fresh fruitbodies grown in tropical climate of Malaysia.

In China, *H. erinaceus* is the basis of many medicinal preparations (Jiang et al., 2014). According to the source of data presented in “China Mushroom online”, *H. erinaceus* improves digestion and can be used as invigorant, immune

enhancer and a nerve tonic (Zhejiang Fangge Pharmaceutical Co., Ltd, www.extractchina.com). The mushroom contains mainly saccharides, proteins, different amino acids and vitamins, some microelements, and small quantity of lipids (Mizuno, 1995; 1998; 1999; Friedman, 2015). Every 100 grams of dried fungus contain 26.3g protein, 4.2g fat, 44.9g carbohydrate, 6.4g thin fibre, 10.2g water, 850mg P, 18mg Fe, 2mg Ca, 0.89mg VB₁, 1.89mg VB₂, 0.01mg carotene, and 16 amino acids including seven kinds of essential amino acids. It contains unsaturated fatty acids, which are propitious to the circulation of blood and can reduce blood cholesterol content. Thus, *H. erinaceus* is also the ideal functional food for those people who have high blood pressure, heart or blood vessel disease (Wang et al., 2014). *H. erinaceus* can nourish the vital organs, cure chronic gastritis, duodenal ulcer and other enteric diseases. Polysaccharides such as (1→3)-β-D-glucans (T-4-N and T-5-N) isolated from *H. erinaceus* promoted antitumor treatment, due to their regulating influence on immune system (Mizuno et al., 1992; Wasser and Weis, 1999). The polysaccharides significantly inhibited the mice sarcoma 180 and some other types of cancer by strengthening the immune system. Hericipins A, B, C, E, F and hericenones C, D, E and Y-A-8-c extracted from *H. erinaceus* promoted the induction of Nerve Growth Factor (NGF) synthesis that opens new prospects in the treatment of Alzheimer type dementia (Kawagishi et al., 1990; 1991; Furukava and Kawagishi, 1991; Mizuno, 1999). NGF could prolong neuronal axons, maintain the survival of neurons, regulate the formation of neurons as well as promote their regeneration in feeble animals. The activity of Hericipin is much more potent than that of adrenaline. Hericipin is used in curing of intelligence declining, neurasthena and the declining of autonomic nerve. Increased production of NGF may enhance cognitive functions and help to slow the onset of dementia associated with various neurological conditions.

H. erinaceus has been extensively tested in *in vitro* trials in our laboratories using neuronal cell lines, as the neurite outgrowth stimulator in the cultured cells of the neural hybrid clone NG108-15 and rat pheochromocytoma PC12 (Wong et al., 2007; Lai et al., 2013; Phan et al., 2014). Phan et al. (2014) isolated four benzyl alcohol derivatives namely hericenones B–E from the basidiocarps of *H. erinaceus*. Hericenone E exerts neurotrophic activity in PC12 cells, and this activity is mediated by extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathways. The bioactive components in basidiocarps could interact with NGF to

enhance neurite outgrowth by upregulating common pathways linked to the induction of NGF signaling, namely TrkA-associated tyrosine kinase that leads to sustained activation of ERK and PI₃K/Akt that is crucial for neurite outgrowth. The neurotropic and neurotrophic action of *H. erinaceus* was shown (Moldavan et al., 1999; 2007; Kolotushkina, 2000; 2003).

We explored the ability of the mushroom in the enhancement of peripheral nerve regeneration after crush injury *in vivo* (Wong et al., 2009b; 2011; 2012; 2014). The neuroregenerative properties of aqueous extract from locally cultivated *H. erinaceus* on motor and sensory functional recovery following crush injury to the peroneal nerve by behavioral experiment as assessed by walking track analysis and hot plate test, and expression of protein kinase B (Akt) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in the dorsal root ganglia (DRG) were investigated. For better understanding of the physiological mechanisms which determine the medicinal properties of *H. erinaceus*, the action of the extracts on spike activity, receptor activation and ion currents of brain neurons, as well as its effect on growth and development of neuronal cell cultures were studied.

RESULTS AND DISCUSSION

The experimental procedures with animals were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of all Scientific Institutions that contributed to these studies. Animal handling was conducted in accordance with National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and associated guidelines. All efforts were made to minimize pain and the number of animals used.

Extract of *H. erinaceus* accelerates the recovery of hind limb motor function after nerve crush injury.

Peripheral nerve injury is a serious health concern for society, which always results in restricted activity or life-long disability. Traffic crashes induce traumatic nerve injury resulting in the disruption of intraneural circulation. Although microsurgical treatments for nerve injuries have been improved over the past decades, the outcome of peripheral nerve injury repair remains unsatisfactory. Peripheral nervous system has an intrinsic ability for repair and regeneration, therefore making it a well-accepted neuroregeneration research model. Crush injury to the peroneal nerve results in foot drop (Fig. 2). It can be

defined as a significant weakness of ankle and toe dorsiflexion. The foot and ankle dorsiflexors include the tibialis anterior, extensor hallucis longus, and extensor digitorum longus. These muscles help the body clear the foot during swing phase and control plantar flexion of the foot on heel strike. The rats tend to drag the dorsum of their foot until reinnervation of axons into these muscles.

Negative control group received daily oral administration of distilled water (10 ml/kg body weight per day), experimental group received aqueous extract of *H. erinaceus* (10 ml/kg body weight/day) and positive control group received mecobalamin (Natural Factors, 130 µg/kg body weight/day) for 14 days to function as pre-treatment before injury.

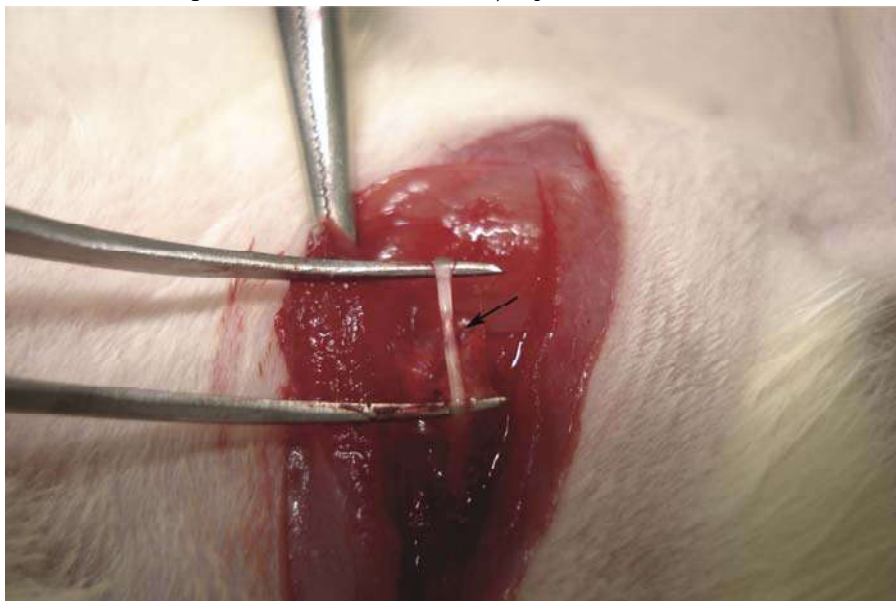


Figure 2. A crush injury was created using a fine watchmaker forceps no. 4 for 10 seconds on the peroneal nerve at 10 mm from extensor digitorum longus muscle and complete crush was confirmed by the presence of a translucent band across the nerve as indicated by an arrow. All operations were performed on right limb and the left limb served as an uninjured control.

Mushrooms have always been prepared for medicinal use by hot water extraction as in brewing of teas or decoctions in traditional Chinese medicine for prevention of oxidative stress-related diseases. In our study, pre-treatment

with aqueous extract for 14 days was employed to build up strength and immune system before peripheral nerve injury.

Analysis of walking track indicated that return of hind limb function and normal toe-spreading occurred earlier in treated groups than in the negative control (non-treated) group (Fig. 3). It was observed that motor functional recovery in the mecobalamin and aqueous extract groups was on day 4, while the crushed limb in the negative control group remained dysfunctional. Rats in the negative control group showed clumping of toes and dragging of the injured foot. On the other hand, the mecobalamin and aqueous extract groups demonstrated toe-spreading and clear footprints on the walking tracks.

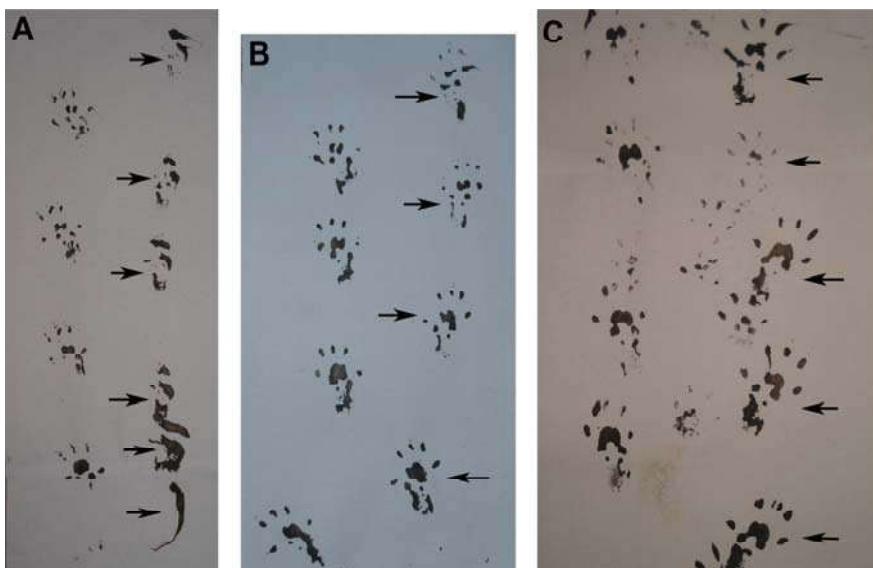


Figure 3. Walking tracks of footprints after 4 days of peroneal nerve crush injury.

Arrows indicate footprints of the operated limb. A. Footprints in negative control group showed absence of toe-spreading reflex and dragging of the operated limb. B. Footprints in positive control group. C. Footprints in aqueous extract group demonstrated toe-spreading and clear footprints of the operated limbs.

Extract of *H. erinaceus* accelerates the recovery of hind limb sensory function after nerve crush injury.

The hot plate test is commonly used for evaluating thermal pain sensitivity. During the experiment, the rats were introduced into an open-ended cylindrical space with a floor consisting of a heated plate (Panlab, S.L. Spain). The plate heated to 50°C produces two behavioural components that can be measured in terms of their reaction times, namely paw licking and jumping (Fig. 4). Aqueous extract from *H. erinaceus* could attenuate thermal hyperalgesia induced by peroneal nerve injury and enhanced the reflex response of the operated limb after 8 days of injury and these significant changes were observed subsequently during the remainder of the time period (Fig. 5). This effect is due to faithful reinnervation of sensory receptors by their original axons. Even when good motor recovery occurs, sensory deficits, particularly in proprioception, may impair the functional outcome. Sensory recovery may continue for a longer period of time than motor recovery as the axons of sensory neurons provide cutaneous sensation to a larger area than it had prior to the injury (Harden et al., 2012).



Figure 4. Hot plate apparatus comprises of an open-ended cylindrical space with a floor of heated plate.

Skin of the plantar surface of the foot was stimulated by gently placing the rat on the heated surface. Thermal nociception was evaluated by observing the withdrawal reflex latency (WRL) of the operated limb in response to heat stimulation (as indicated by an arrow) by a built-in timer activated by an external foot switch.

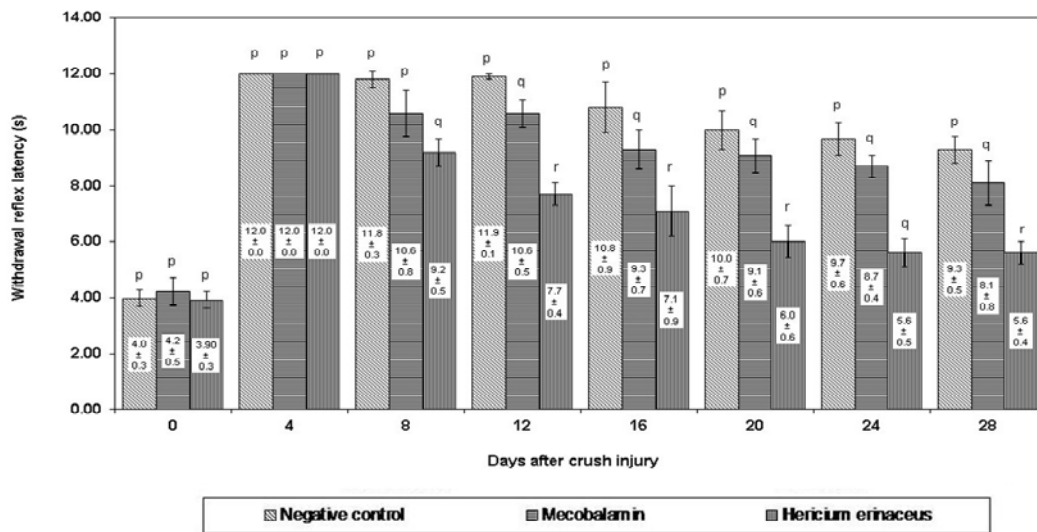


Figure 5. Mean withdrawal reflex latency (WRL) for operated limb induced by thermal and mechanical stimulation.

Values in seconds (s) were obtained by performing WRL test to evaluate the nociceptive function. This test was performed prior to the peroneal nerve crush injury (day 0) and after the crush injury (days 4, 8, 12, 16, 20, 24 and 28). Each bar represents WRL from 6 animals per group. Means with different letters in uninjured/injured category are significantly different ($P < 0.05$).

Figure 5 presents the data for the withdrawal reflex latency (WRL) during the healing period of 4 weeks. As expected, during the first week following peroneal nerve crush, rats were unable to respond to the hot stimulus. This indicates complete loss of thermal and nociceptive sensitivity at the sole of the operated foot. Signs of recovery of foot's withdrawal response began at week 2 after crush injury. Thereafter, the WRL steadily improved during the 4-week recovery time. However, the normal value of 4 seconds was unachievable (Hu et al., 1997).

Negative control rats showed no signs of recovery in WRL response during the healing period of 4 weeks. The WRL at week 4 for the aqueous extract group was almost in the normal value range of 5.6 ± 0.4 s. When the mean WRLs were compared at each time interval, the mean WRLs of the aqueous extract-treated rats were significantly less than the mecobalamin group from day 12 onwards except day 24 ($P < 0.05$). Therefore, WRL in rats treated with aqueous extract recovered faster and better compared to those receiving mecobalamin from day

12 onwards ($P < 0.05$). There was no significant difference in mean WRLs between rats in mecobalamin and negative control groups after 4 and 8 days of injury.

Injury to neurons results in complex sequences of molecular responses that play an important role in the successful regenerative response and the eventual recovery of sensory function. Peripheral sensitization causes activation of Akt, and p38 MAPK in small DRG neurons. These contributed to pain hypersensitivity found at the site of tissue damage and inflammation. In general, DRG neurons can be divided into large ($>1200 \mu\text{m}^2$), medium ($600\text{-}1200 \mu\text{m}^2$) and small ($<600 \mu\text{m}^2$) neurons. Small neurons respond to thermal, mechanical and chemical nociceptive stimulations whereas large neurons transmit touch and proprioceptive sensations (Wen et al., 2009). Akt and p38 MAPK did not co-localize with NF-200 in large DRG neurons. It is possible that aqueous extract from *H. erinaceus* could trigger the expression of protein kinases that regulate nociceptive function and inflammation during with nerve regeneration. Figure 6 shows the *in vivo* expression of Akt within the DRG after crush injury. Double-labeled immunofluorescence demonstrated no co-localization of Akt and NF-200 in large DRG neurons. The population of large neurons is defined by the expression of NF-200 as green fluorescence. Akt staining as orange fluorescence was targeted to small neurons. Immunoreactivity for Akt was not detected in small neurons of contralateral DRG from uninjured nerve (Fig. 6A). Immunoreactivity of ipsilateral DRG in negative control (Fig. 6B) and mecobalamin group (Fig. 6C) were less than that observed in aqueous extract group (Fig. 6D). There was a bright immunofluorescence for Akt in small neurons of ipsilateral DRG from injured nerve in aqueous extract group. Intensity measurement of Akt immunoreactivity in DRG was shown in Figure 6E. In ipsilateral DRG, the intensity recorded followed the order aqueous extract (31.67 ± 1.2) > mecobalamin (30.76 ± 0.9) > negative control (23.41 ± 0.4). The significant increase in intensity was detected in aqueous extract group compared to negative control and mecobalamin groups ($P < 0.05$, $n=6$).

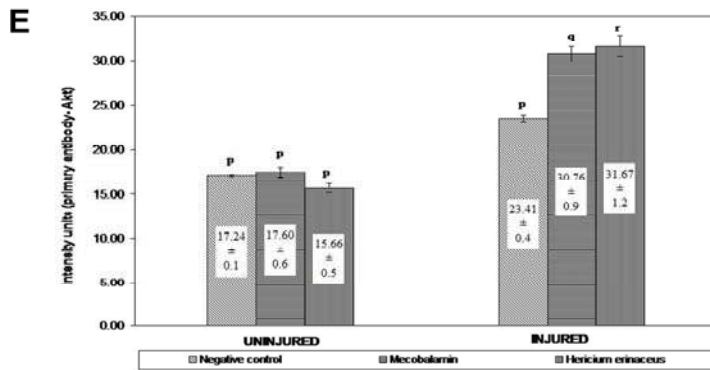
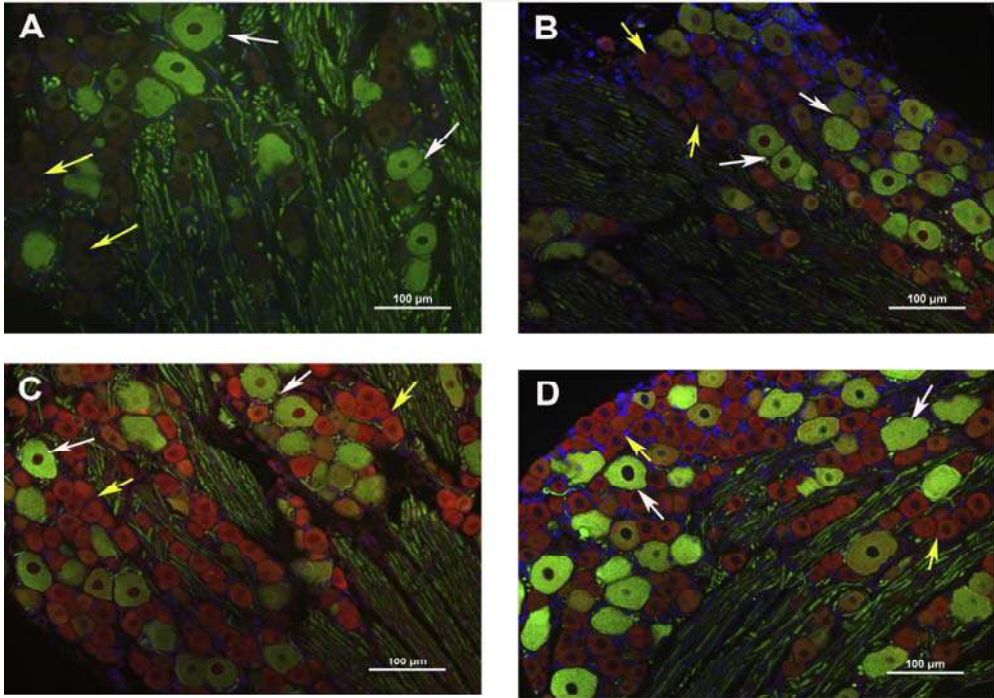


Figure 6. Act activation in DRG neurons after crush injury. A. DRG from uninjured nerve (contralateral side). B. DRG from injured nerve in negative control group. C. DRG from injured nerve in positive control group. D. DRG from injured nerve in aqueous extract group. White arrows indicate large neurons whereas yellow arrows indicate small neurons. Scale bar = 100 μ m. E. Akt levels in the DRG as measured by intensity of immunoreactivity. Each bar represents 24 sections of DRG

from 6 animals per group. Means with different letters in uninjured/injured category are significantly different ($P<0.05$).

Figure 7 shows the expression of p38 MAPK within the DRG after crush injury. Double staining of p38 MAPK with NF-200 showed no co-localization in the DRG. Immunoreactivity for p38 MAPK was not detected in neurons of contralateral DRG (Fig. 7A). In ipsilateral DRG, the intensity recorded followed the order aqueous extract (34.65 ± 0.2) > mecobalamin (29.81 ± 0.4) > negative control (22.31 ± 0.6) (Fig. 7E). Although all small neurons were stained brightly with p38 MAPK (Fig. 7B-7D), higher level of the antigen was detected in ipsilateral DRG of rats treated with aqueous extract compared to negative control and mecobalamin ($P<0.05$, $n=6$).

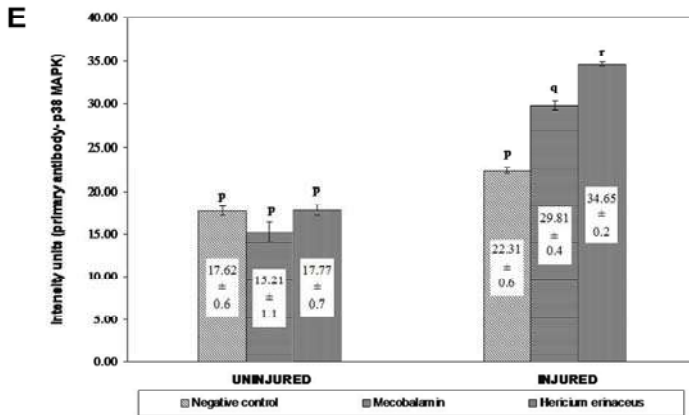
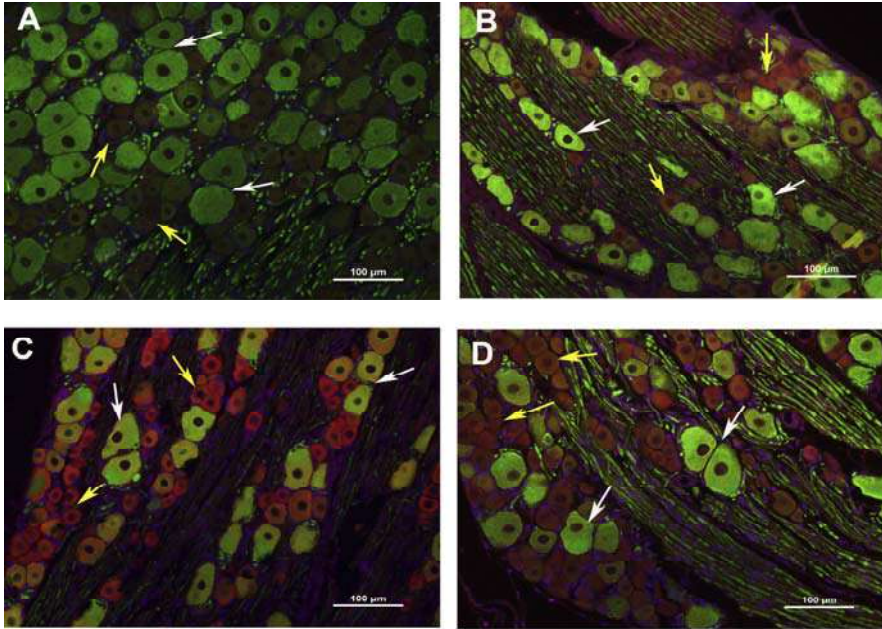


Figure 7. p38 MAPK activation in DRG neurons after crush injury. A. DRG from uninjured nerve (contralateral side). B. DRG from injured nerve in negative control group. C. DRG from injured nerve in positive control group. D. DRG from injured nerve in aqueous extract group. White arrows indicate large neurons whereas yellow arrows indicate small neurons. Scale bar = 100 μ m. E. p38 MAPK levels in the DRG as measured by intensity of immunoreactivity. Each bar represents 24 sections of DRG from 6 animals per group. Means with different letters in uninjured/injured category are significantly different ($P < 0.05$).

Akt promotes cell survival by inhibiting apoptosis through phosphorylation and inactivation of several targets, including Bad, forkhead transcription factors, c-Raf, and caspase-9 (Franke et al., 1997). p38 MAPK is regulated by stress-inducing signals such as osmotic stress, UV radiation, pro-inflammatory cytokines and certain toxins (Okada et al., 2007). Activation of MAPK pathway is essential for neurite outgrowth, regeneration, synaptic plasticity and memory functions in mature neurons (Sweatt, 2001).

Effect of *H. erinaceus* extract on neuronal spike activity

Neuronal spike activity was recorded *in vitro* from the brain slices (hippocampal *stratum pyramidale*, CA1 region) of adult rats. The experimental protocols, procedure of brain slices preparation, and recording techniques were described earlier (Moldavan et al., 2007; Pedarzani et al., 2005). Tight seal whole-cell voltage-clamp recordings were obtained using the “blind method” (Blanton et al., 1989). Cultivation of mushrooms, preparation of the dried up powder of fruiting bodies and *H. erinaceus* extracts were reported earlier (Moldavan et al., 2007).

Spike reactions of 81 pyramidal neurons of hippocampus were studied during application of *H. erinaceus* extracts. The character of neuronal responses was depended on the properties of extracts. Different extracts were made using ethanol (ETHA) or ether (ETHE) extraction, or by preparation of broth (BR) from a dried up mushroom fruiting bodies powder. Neurotropic components of *H. erinaceus* extract were well dissolved in water (pH 5.5), and retained their effectiveness even through one month after preparation being stored at 4°C. Broth stored at -20°C retained its neurotropic activity after defrosting.

ETHA effect

During ETHA application reactions of 63 neurons were studied. 40 (63%) of them showed the inhibitory reaction, six neurons (10%) - excitatory responses and 17 cells (27%) did not respond (Fig. 8A).

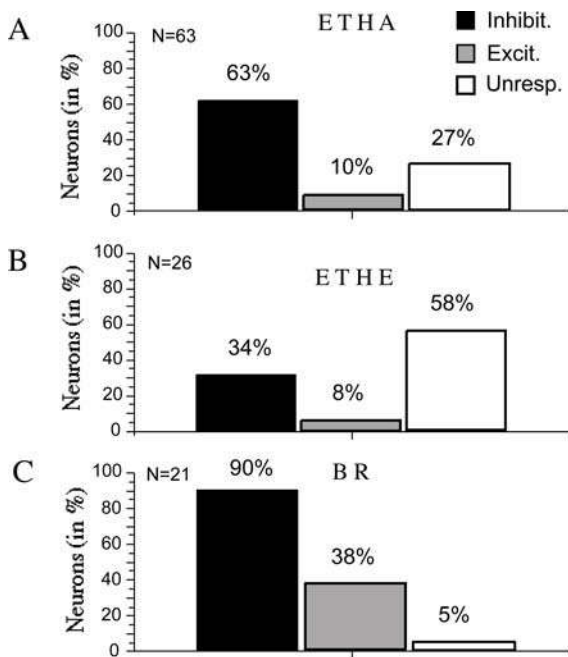


Figure 8. Reactions of neurons on application of different extracts of *H. erinaceus*.

Quantity of neurons (in %) reacted by inhibition and excitation during bath application of Krebs containing broth (BR), and extracts extracted with ethanol (ETHA) and ether (ETHE). A. ETHA. B. ETHE and C. BR. N - quantity of neurons.

After extract was washed out the spike activity completely recovered. The extract inhibited neuronal spike activity in a concentration-dependent reversible manner. The increase of extract concentration from 1% up to 16% enhanced the duration and magnitude of inhibition (Fig. 9A).

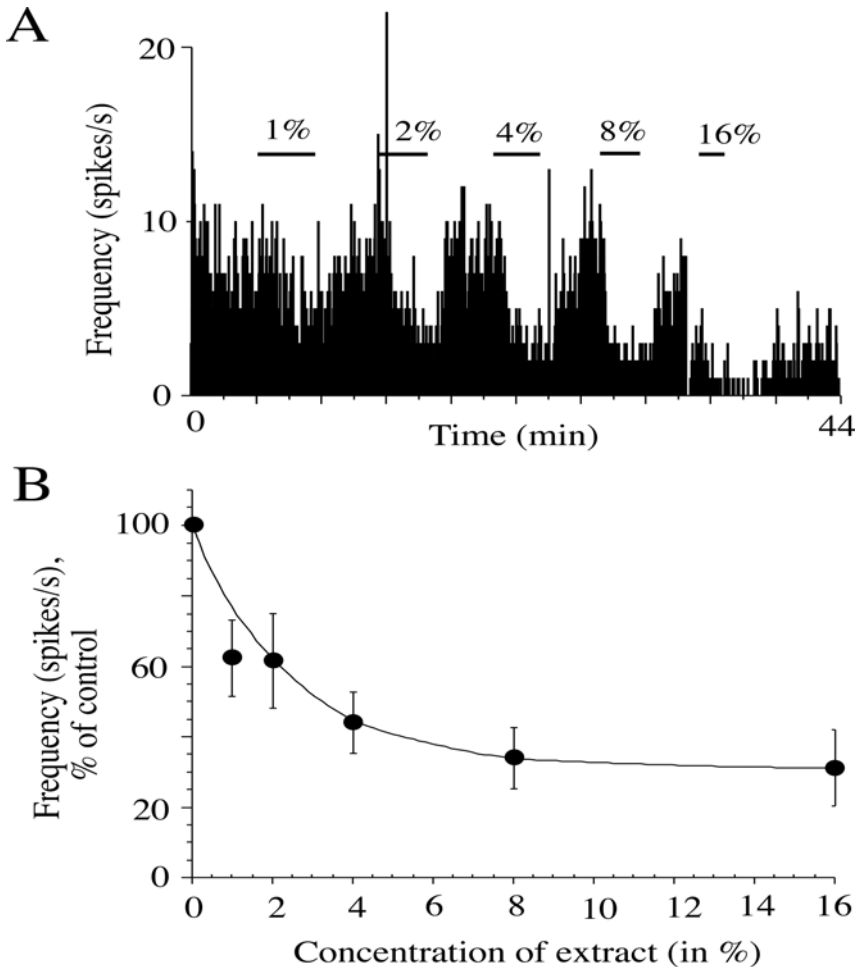


Figure 9. The frequency of neuronal spike activity demonstrated concentration-dependence during *H. erinaceus* extract application.

A. The average frequency spike activity (AFSA) is inhibited in a concentration-dependent manner when concentration of extract increased from 1% to 16%. The lines on the graph show the duration of extract application and concentration in % of stock. **B.** Concentration-dependence of neuronal AFSA. The data were collected from 12 neurons. The background spike activity was taken as 100% (control). $IC_{50} = 3\%$ (IC_{50} -concentration of tested extract, at which the frequency of spike activity was reduced twice).

The concentration-dependence of spike activity is shown on the graph (n = 12 neurons) (Fig. 9B). The average frequency spike activity (AFSA) was plotted against the concentration of extract. The concentration-dependence curve was fit with exponential function, $IC_{50} = 3\%$ extract. The magnitude of AFSA inhibition correlated significantly with extract concentrations ($p < 0.01$; $R = 0.86$; $N = 10$). The duration of inhibition also strongly correlated with extract concentration ($p < 0.01$; $R = 0.85$; $N = 10$).

ETHE effect

During ETHA application reactions of 26 neurons were recorded. 9 neurons (34%) reacted by inhibition, 2 neurons (8%) - by excitation and 15 cells (58%) did not respond (Fig. 8B). Spike reactions of the same neurons (n=17 cells) were compared during application of ETHA and ETHE (Fig. 10).

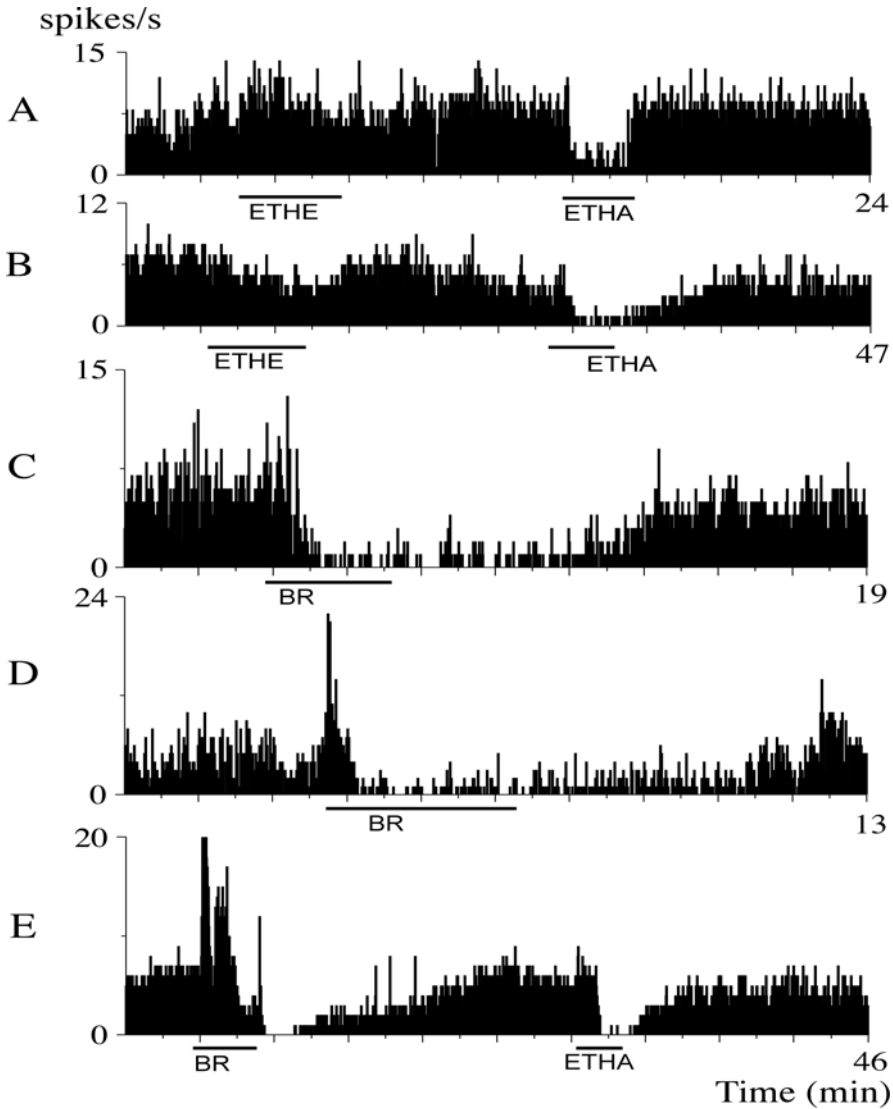


Figure 10. Neuronal reactions on bath solutions containing ethanol (ETHA) and ether (ETHE) extracts.

Histograms demonstrate the average frequency of spike activity recorded from single neurons during extracts application. A, B. Inhibition induced by ETHA and ETHE in the same neuron; C, D. Inhibition and complex reaction consisting of initial excitation with the subsequent inhibition induced by BR application, respectively. E. Different reactions induced by BR and ETHA in the same neuron. The duration of extracts application shown under the graphs. Extracts concentration - 8%.

Usually, the effect of ETHA was stronger than ETHE (Fig. 10A and B). In some cases, ETHA induced inhibition, while ETHE had no effect (Fig. 10A). To compare the magnitude of reactions, the background (control) level was taken as 100%. AFSA was reduced by ETHA and ETHE to $48\pm 9\%$ and $74\pm 7\%$ of control, respectively. In those neurons, which responded by excitation, ETHA and ETHE increased AFSA by $242\pm 32\%$ and $135\pm 19\%$ of control, respectively.

It is known, that the neurons are very sensitive to any pH change in the recording chamber. The question was: whether the distinctions in the neuronal responses are due to the different pH of ETHA and ETHE extracts. As measured, the ETHA and ETHE stocks (100%) have pH 5.5. The recording Krebs solution with final concentrations of extract 1-16% has pH 7.4 for both extracts. Thus, the distinctions in ETHA and ETHE action could be explained by effect of those substances, which were better extracted by ethanol or ether.

BR effect.

During BR application reactions of 21 neurons were recorded. 12 (57%) of them reacted only by inhibition, seven neurons (33%) showed complex reaction: excitation with the subsequent inhibition, one neuron (5%) - reacted only by excitation and one cell (5%) did not respond. Thus, inhibitory component of reaction was observed in 19 neurons (90%), and excitative component - in eight neurons (38%) (Fig. 8C). Reactions of two neurons, one of which reacted by inhibition to BR application (Fig. 10C), and another one - by initial excitation with the subsequent inhibition (Fig. 10D) are shown. The strength of ETHA and BR effect on spike reactions of the same neurons ($n=13$ cells) were compared. Data were averaged separately for group of cells responding by inhibition, and for neurons reacting by excitation. AFSA was reduced by ETHA and BR to $39\pm 7\%$ and $36\pm 7\%$ of control, respectively. When the excitatory reactions were recorded, ETHA and ETHE increased AFSA by 170% and 259% of control, respectively. One and the same neuron can respond by complex excitatory-inhibitory reaction on BR, and by inhibition on ETHA application (Fig. 10E).

Thus, the activity of the extracts was increased in the following order: broth > ETHA > ETHE. The ratio of neurons reacting on these extracts was 9:7:4, respectively. Some distinction in delay and duration of neuronal reactions apparently reflected the differences in the chemical composition of these extracts. The Krebs solution at different extract concentrations has pH 7.4.

Therefore, pH does not contribute to the neuronal reactions which were caused by the components of extract exhibiting neurotrophic activity.

Effect of extract on glutamate receptors.

In comparison with other amino acids, most of all in *H. erinaceus* contains glutamic acid (42.2 mg %) (Mizuno, 1999). Glutamic acid is well dissolves in water, and is not destroyed by boiling. The high concentrated extract of *H. erinaceus* dissolved in water has pH 5.5. The glutamic acid is stable at acidic medium (pH 4.1), therefore the pH 5.5 of high high concentrated water extract of *H. erinaceus* was close to optimal. At this pH glutamic acid may partially turn into glutamate – a carboxylic anion of glutamic acid. I was shown that broth of fungi contains significant amount of glutamate (Kinoshita et al., 2004). It is known that prolonged activation of AMPA and NMDA glutamate receptors could depolarize a cell membrane and decrease the discharge frequency in neurons. Also, the activation of metabotropic glutamate receptors may induce the hyperpolarization of cell membrane and inhibition of spike activity. We checked this possibility by application of L-glutamate. L-glutamate evoked a strong excitation of tested neurons in the same experiments. And what is more, the broth suppressed the neuronal excitation caused by L-glutamate applied in bath (Fig. 11).

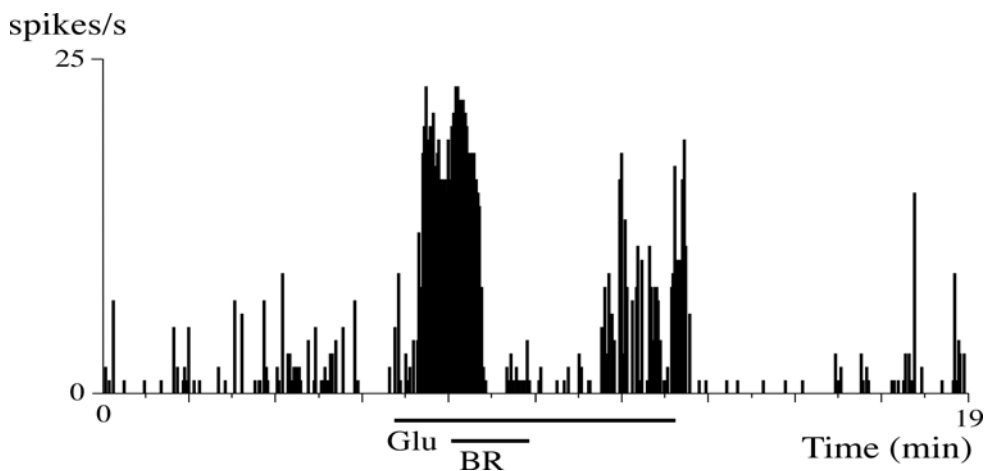


Figure 11. Extract suppressed the excitation caused by L-glutamate application. BR, solution contained broth from *H. erinaceus*; Glu, L-glutamate (L-glutamic acid, 100 μ M). The duration of BR and Glu application is shown under the graph.

We suppose, that glutamate from extract could induce a fast spike spike reactions of studied neurons. However, the inhibitory reactions could not be explained by activation of glutamate receptors. Our further studies of ion currents indicated that inhibition of spike activity was caused by hyperpolarization of cell membrane induced by Ca-activated potassium currents.

Testing the action of extract on receptors located on neuronal cell membrane and activated by different neurotransmitters.

The most common substances that usually evoke inhibitory reactions in the central nervous system are GABA-, serotonin- and M- and N-cholinoreceptor agonists. To investigate, if extract can activate these receptors, we applied agonists and antagonists specific to these receptors. Their effect was tested by 8% ETHA application. To study does the inhibitory reactions are caused by activation of GABAA receptors the bicuculline (GABA_A receptor antagonist) was applied. The effect of bicuculline was investigated in eight neurons demonstrating inhibitory reactions. Bicuculline did not block reaction in seven neurons (Fig. 12A), and in one remaining neuron inhibitory reaction induced by extract was masked by increased background spike activity caused by bicuculline.

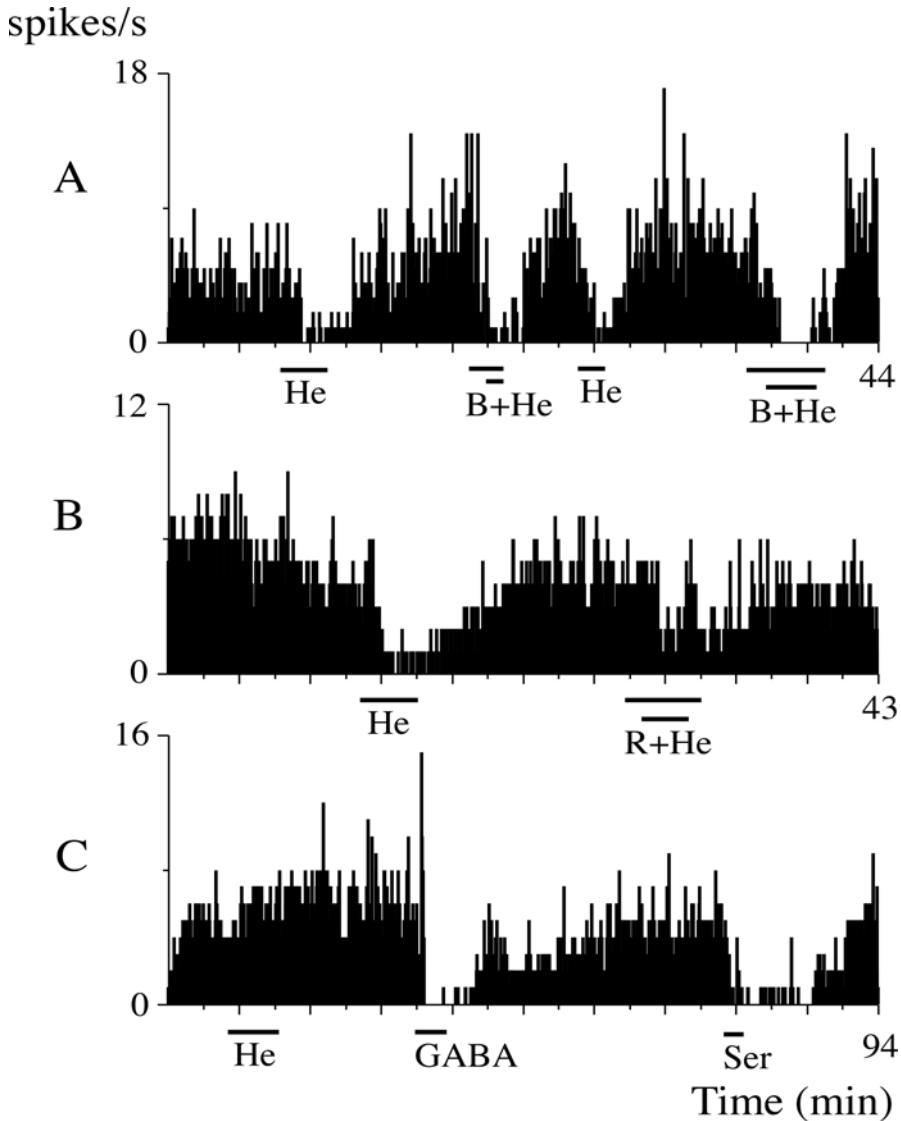


Figure 12. Antagonists of GABA- and serotonin- receptors did not alter neuronal reactions induced by extract.

A-C - reaction of three neurons on application of: He, *H. erinaceus* extract; B, bicuculline (bicuculline, 10 μM , antagonist of GABA_A receptors); R, ritanserin (ritanserin, 100 μM , antagonist of 5-HT₂/5-HT_{1C} serotonin receptors). Effects of agonists of these receptors was also tested on the same neurons: GABA, (GABA, 300 μM); Ser, serotonin (5-HT), 100 μM); B+He, extract application on a background of bicuculline; R+He, extract application on the background of ritanserin.

The action of ritanserin (serotonin 5-HT₂/5-HT_{1C} receptor antagonist) on inhibitory reactions, was investigated in three neurons. In one neuron the reaction did not change, in another one - was blocked partially (Fig. 12B), and in the remained cell - was blocked completely. The neurons (n=10 cells) that did not react or reacted by excitation during application of ETHA and ETHE were tested to application of GABA and serotonin (Fig. 12C). All nine cells showed inhibition, when were affected by serotonin. Four neurons out of seven showed inhibition, and others did not react during GABA action. Such difference of neuronal responses testifies to different mechanisms of action of extracts and specified transmitters. The benzogexonium (N-cholinoreceptors antagonist) (Fig. 13A) and atropine (M-cholinoreceptors antagonists) (Fig. 13B) did not block inhibitory reactions caused by extract application.

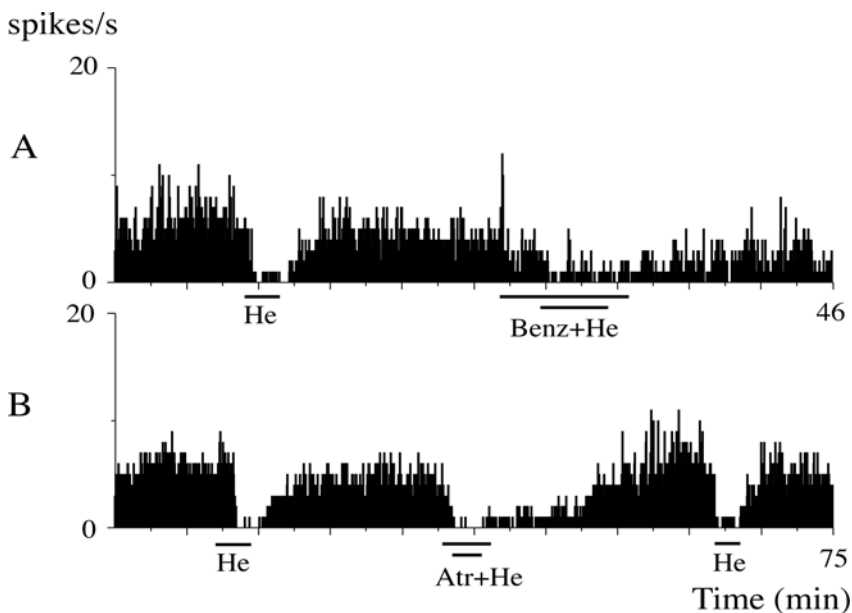


Figure 13. Effect of antagonists of N- and M-cholinoreceptors on neuronal reactions induced by extract.

A, B. responses of two neurons on application: He, *H. erinaceus* extract; Benz+He - extract application on a background of benzogexonium (Benz) (benzogexonium, 1.7 mM, antagonist of N-cholinoreceptors); Atr+He, extract application on a background of atropine (Atr) (atropine, 100 μM, antagonist of M-cholinoreceptors).

GABA was not found in *H. erinaceus* mushroom fruiting bodies (Mizuno, 1999) that is explaining an inefficiency of extract action on GABA receptors. Our data also showed that inhibition evoked by extract was not caused by serotonin- or choline- family receptors activation.

Extract does not suppress the cellular respiration.

All cells use blood sugar (glucose) and oxygen to create adenosine triphosphate (ATP), the energy source that fuels cell function. The temporary termination of ACSF flow in the chamber with brain slices reduced entry of carbogen (95% O₂ and 5% CO₂) and glucose dissolved in ACSF to the cells, and caused the inhibition of spike activity (n=6 neurons, Fig. 14).

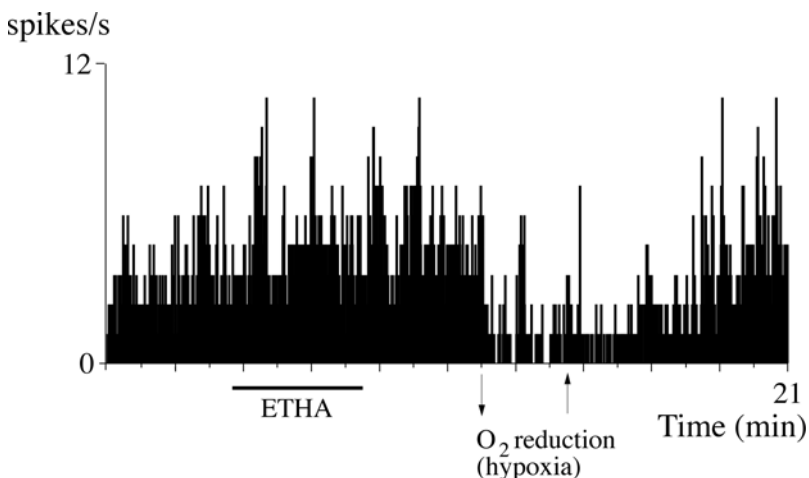


Figure 14. Extract does not suppress the cellular respiration
ETHA (8%) did not change the frequency of spike activity, but the temporary termination of ACSF flow in the chamber with brain slices reduced entry of carbogen (95% O₂ and 5% CO₂) and glucose dissolved in ACSF to the cells, and caused the inhibition of spike activity.

Such phenomenon may occur at ischemic conditions and hypoxia. In contrast, four neurons from this group did not react on extract application. A tolerance of these neurons to the extract on the one hand, and sensitivity to the reduction of oxygen and glucose content in the Krebs solution on the other hand, indicates that the extract did not suppress cellular respiration (metabolic

reactions and processes in the cells to convert biochemical energy from nutrients into adenosine triphosphate (ATP) and then release waste products).

Action of extract on ion currents in neurons

In a first set of experiments, the effect of *H. erinaceus* extracts on the resting membrane potential and firing properties of the neurons was studied using current-clamp technique. It was always observed a hyperpolarization of the membrane potential (-5-7 mV), and a decrease in the number of action potentials generated by prolonged depolarizing current injections in the 6 studied cells. In a second set of experiments, four different currents were studied using voltage-clamp technique: 1) inward rectifier K current (I_{ir}); 2) I_{h} (or I_{Q}); 3) apamin-sensitive Ca-activated K current (I_{AHP}); 4) and apamin-insensitive, slow Ca-activated K current (sI_{AHP}). Also in voltage-clamp, an outward shift in the holding current, corresponding to a hyperpolarization of the membrane potential was always observed. I_{ir} and I_{h} were not apparently affected, whereas both I_{AHP} and sI_{AHP} increased ($n=5$). Both effects on the membrane potential and on the AHP currents were reversible upon wash-out of the extracts. The increase in AHP current amplitudes could explain the reduction in the number of spikes observed in current clamp. All these effects did not seem to have a synaptic origin, because they still were observed in the presence of tetrodotoxin.

Action of extract on growth and development of nerve and glial cells.

The hippocampal and cerebellum cells culture (*in vitro*) cultivation technique was described previously (Skibo and Koval, 1992; Fedoroff and Richardson, 1997). Following mechanical dissociation the resulting cell suspensions of control and treated cultures appeared under phase contrast microscope as rounded cell bodies without processes during first day *in vitro*, although some cells had initial segments of processes. Cell adherence to the surface took place within 5-10 hours after cell plating. During next 48 hours the processes renewal or formation *de novo* was observed. By 4th day *in vitro* neurons (usually of pyramidal or round bodies) and glial cells with well-developed processes made dense interlacing network and have been easily identified due to different refraction under phase contrast microscope. Culture maturation included increase and nerve processes growth.

Comparative morphological analysis of 1st, 2nd, 3rd groups and control cells in both cerebellum and hippocampus 12-day culture did not reveal any significant difference in nerve process growth and nerve cells development (Fig. 15A-B).

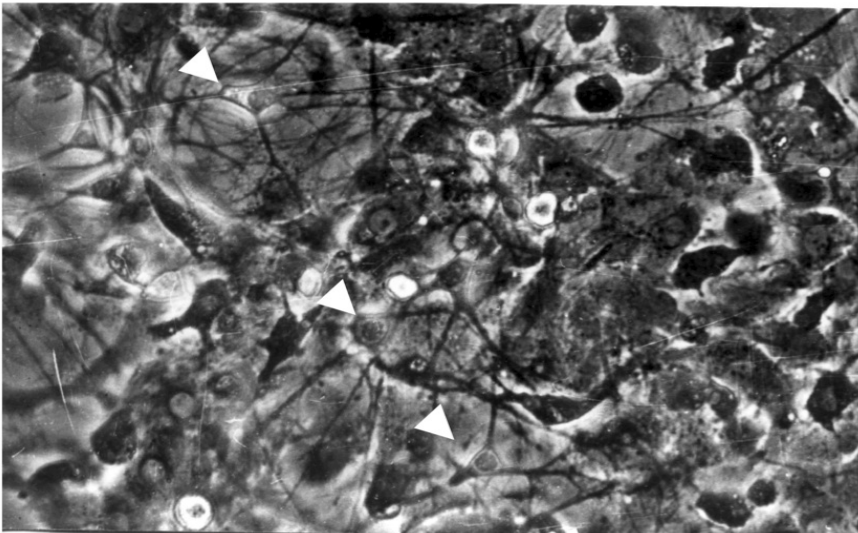
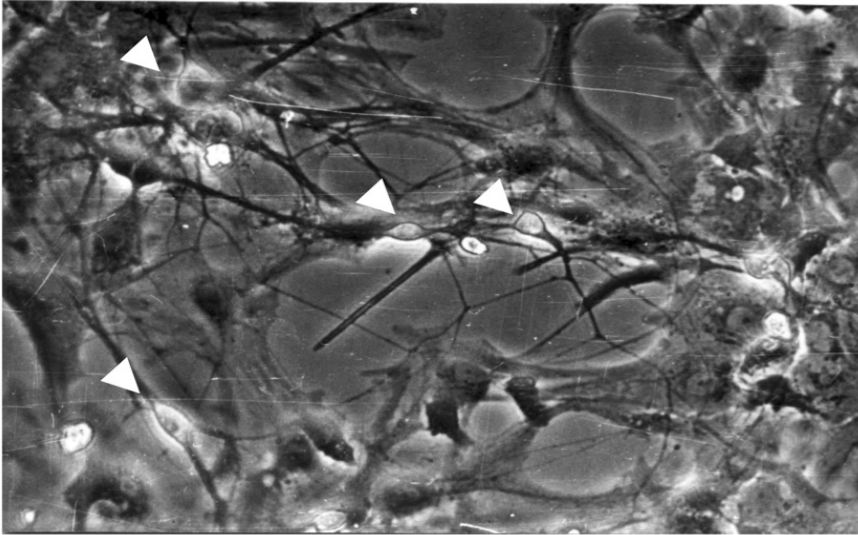


Figure 15. Neurons (arrowheads) and glial cells in 12-day-old cultures of hippocampus (A) and cerebellum (B) in the presence of the extract of *H. erinaceus* (phase contrast microscopy, magnification x20).

Selection of 12-day term is explained by fact that cells *in vitro* mature from processes renewal to formation of intercellular contacts network and synapses during 10-12 days (Skibo and Koval, 1992). Longer cultivation term is necessary for myelogenesis *in vitro* since myelin proteins in culture have been revealed only after 19th day *in vitro* (Notterpek et al., 1993) and mature myelinated fibres have been observed in 26-day culture (Kolotushkina et al., 2000). *In vitro* maturation of all cells had approximately equal time and rate. As we have found previously, 10% *H. erinaceus* extract exhibits potent effect on spike activity of neurons. Therefore, this concentration of extract was used to investigate its effect on cell development and myelination of nerve fibers. Extract did not speed up or slow down culture development as well as it did not show toxic effect or evoked the nerve cells damage. Since there was not any considerable difference in morphology among the control and tested groups of cell culture grew on nutrient medium containing 10% *H. erinaceus* extract, it may suggest that this extract does not affect regenerating abilities of neurons and glial cells of cerebellum and hippocampus during first days *in vitro* and does not show any promoting or destructive influence on cell maturation process during cultivation. 26-day cerebellum culture was observed to analyse myelination process in culture after influence of extract. Destructive influence of *H. erinaceus* extract on myelination process wasn't observed. On the contrary, it speeded up myelogenesis *in vitro* in cerebellum cell culture and these results correspond with data which were obtained before (Kolotushkina et al., 2000; 2003). Light-microscopic analysis of these cultures revealed mature myelinating fibres in stained tissue and showed that myelin sheathes in *H. erinaceus*-treated cultures were thicker as compared to those in control samples (Kolotushkina et al., 2003). Electron microscopic analysis showed that the process of the myelin sheath formation in the presence of *H. erinaceus* extract proceeded faster and was complete by 26th day *in vitro* (in controls, it was finished by 31st day).

Thus, 10% extract of *H. erinaceus* did not affect the nerve cell growth *in vitro*, neither evoke toxic effect or the nerve cell damage, although it improved the myelination process in the mature myelinating fibres.

CONCLUSIONS

Our data convincingly demonstrated a potent neurotropic and neurotrophic properties of *H. erinaceus*. Its use did not cause neither nerve cell damage or toxic effect, nor suppression of cellular respiration, but rather improved the myelination process in the mature myelinating fibres. We also revealed a neuroregenerative role of aqueous extract from *H. erinaceus* fresh fruitbodies in the peripheral nervous system. Given the complexity of nerve regeneration, further studies are needed to fully elucidate molecular mechanisms that *H. erinaceus* utilizes to promote growth and regeneration of axons. We see this as a critical step towards further development of this mushroom in the alternative therapies and practices.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by University of Malaya RG268-13AFR and Ministry of Higher Education Malaysia through High Impact Research Grant UM.C/625/1/HIR/MoE/SC/02. The authors express gratitude to Dr. F. Dohme (WESER-CHAMPIGNON GmbH, Hessisch-Oldendorf, Germany) for assistance in the cultivation of *H. erinaceus*, reception of its fruiting bodies, and for rendering of technical support.

REFERENCES

- Blanton M.G., Lo Turko J.J., Kriegstein A.R.** 1989. Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J Neurosci Meth*, 30: 203-210.
- Dudka I.A., Wasser S.P.** 1987. Mushroom. Handbook of mycologist and mushroomer. Kyiv, Naukova Dumka 535 p.
- Fedoroff S., Richardson A.** 1997. Protocols for neural cell culture. Totowa, New Jersey, Humana Press 278 p.
- Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L.C.** 1997. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 88: 435-437.

- Friedman M.** 2015. Chemistry, Nutrition, and Health-Promoting Properties of *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) Mushroom Fruiting Bodies and Mycelia and Their Bioactive Compounds. *J Agric Food Chem*, 63 (32): 7108-23.
- Furukava S., Kawagishi H.** 1991. Physiological significance and the synthesis-promoting substances of nerve growth factor (NGF). *Kagakuto Seibutsu (Japanese)*, 29: 640-646.
- Harden R.N., Richardson K., Shufelt M., and Revivo G.** 2012. Neuropathic pain: An interdisciplinary approach: In D.M. Simpson, J.C. McArthur, R.H. Dworkin (Ed.), *Neuropathic pain: Mechanisms, diagnosis and treatment* (pp. 472-484). New York: Oxford University Press.
- Hu D., Hu R., Berde C.B.** 1997. Neurologic evaluation of infant and adult rats before and after sciatic nerve blockade. *Anesthesiology*, 86: 957-965.
- Jiang S., Wang S., Sun Y., Zhang Q.** 2014. Medicinal properties of *Hericium erinaceus* and its potential to formulate novel mushroom-based pharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98 (18): 7661-70. Review.
- Kawagishi H., Ando M., Mizuno T.** 1990. Hericenone A and B as cytotoxic principles from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Tetrahedr Lett*, 31: 373-376.
- Kawagishi H., Ando M., Sakamoto H., Yoshida S., Ojima F., Ishiguro Y., Ukai N., Furukava S.** 1991. Hericenones C, D and E, stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis, from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Tetrahedr Lett*, 32: 4561-4564
- Kinoshita S., Udaka S., Shimono M.** 2004. Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms. *J Gen Appl Microbiol*, 50 (6): 331-343.
- Kolotushkina E.V., Moldavan M.G., Voronin K.Yu., Skibo G.G.** 2003. The influence of *Hericium erinaceus* extract on myelination process in vitro, *Fiziol Zh*, 49 (1): 38-45.
- Kolotushkina E.V., Pivneva T.A., Vasilenko D.A., Sokolova L.I., Skibo G.G.** 2000. Modeling of myelination and demyelination processes in cell culture of rat cerebellum, *Neurophysiology/Neirofiziologiya*, 32, (6): 437-444.
- Lai P.-L., Naidu M., Sabaratnam S., Wong K.H., David P., Kuppusamy U.R., Abdullah N., Malek S.R.** 2013. Neurotrophic properties of *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. grown in tropical climate of Malaysia. *Int J Med Mush*, 15: 539-554.

- Mizuno T., Wasa T., Ito H., Suzuki C., Ukai N.** 1992. Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, an edible and medicinal mushroom called Yamabushitake or houtou. *Biosci Biotechnol Biochem*, 56 (2): 347-348.
- Mizuno T.** 1995. Yamabushitake, *Hericium erinaceum*: bioactive substances and medicinal utilization, *Food Rev Intern*, 11 (1): 173-178.
- Mizuno T.** 1998. Bioactive substances in Yamabushitake, the *Hericium erinaceum* fungus, and its medicinal utilization. *Foods and Food Ingred J Jpn*, 167: 69-85.
- Mizuno T.** 1999. Bioactive substances in *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr). Pers. (Yamabushitake), and its medicinal utilization. *Intern J Med Mush*, 1: 105-119.
- Moldavan M.G., Gryganskyi A.P., Kirchhoff B.** 1999. *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. extracts effect on the neurons impulse activity in stratum pyramidale of zone CA₁ hippocampal slices in rats. In: Third International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products and AMGA's 26-th National Mushroom Industry Conference, October 1999, Sydney, Australia, Broderick A. and Nais T., p.133.
- Moldavan M.G., Gryganskyi A.P., Kolotushkina O.V., Kirchhoff B., Skibo G.G., Pedarzani P.** 2007. Neurotropic and Trophic Action of Lion's Mane Mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Aphylophoromycetidae) Extracts on Nerve Cells *In Vitro*. *Intern J Med Mush*, 9 (1): 15-28.
- Notterpek L.M., Bullock P.N., Malek-Hedayat S., Fisher R., Rome L.H.** 1993. Myelination in cerebellar slice cultures: development of a system amenable to biochemical analysis, *J Neurosci Res*, 36 (6): 621-634.
- Okada Y., Ueshin Y., Isotani A., Saito-Fujita T., Nakashima H., Kimura K., Mizoguchi A., Oh-hora M., Mori Y., Ogata M., Oshima R.G., Okabe M., Ikawa M.** 2007. Complementation of placental defects and embryonic lethality by trophoblast-specific lentiviral gene transfer. *Nature Biotechnology*, 25: 233-237.
- Pedarzani P., McCutcheon J.E., Rogge G., Jensen B.S., Christophersen P., Hougaard C., Strøbaek D., Stocker M.** 2005. Specific enhancement of SK channel activity selectively potentiates the afterhyperpolarizing current I(AHP) and modulates the firing properties of hippocampal pyramidal neurons. *J Biol Chem*, 280 (50): 41404-11.

- Phan C.W., Lee G.S., Hong S.L., Wong Y.T., Brkljača R., Urban S., Abdul Malek S.N., Sabaratnam V.** 2014. *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. cultivated under tropical conditions: isolation of hericenones and demonstration of NGF-mediated neurite outgrowth in PC12 cells via MEK/ERK and PI3K-Akt signaling pathways. *Food and Function*, 12: 160-169.
- Skibo G.G., Koval L.M.** 1992. Structural properties of neuron development *in vitro*, Kyiv, Naukova Dumka 152 p.
- Sweatt J.D.** 2001. The neuronal MAP kinase cascade: A biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *Journal of Neurochemistry*, 76: 1–10.
- Wang M., Gao Y., Xu D., Konishi T., Gao Q.** 2014. *Hericium erinaceus* (Yamabushitake): a unique resource for developing functional foods and medicines. *Food Funct.* 5 (12): 3055-64. Review.
- Wasser S.P., Weis A.L.** 1999. Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective. *Critical Reviews in Immunology*, 19: 65-96.
- Wen Y.R., Suter M.R., Ji R.R., Yeh G.C., Wu Y.S., Wang K.C., Kohno T., Sun W.Z., Wang C.C.** (2009). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia. *Anesthesiology*, 110: 155–165.
- Wong K.H., Kanagasabapathy G., Naidu M., David P., Sabaratnam V.** 2014. *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers., a medicinal mushroom, activates peripheral nerve regeneration. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, doi: 10.1007/s11655-014-1624-2.
- Wong K.H., Sabaratnam V., Abdullah N., Kuppusamy U.R., Naidu M.** 2009a. Effects of cultivation techniques and processing on antimicrobial and antioxidant activities of *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. extracts. *Food Technology and Biotechnology*, 47: 47–55.
- Wong K.H., Naidu M., David P., Abdulla M.A., Abdullah N., Kuppusamy U.R., Sabaratnam S.** 2009b. Functional recovery enhancement following Injury to rodent peroneal nerve by lion's mane mushroom, *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Aphyllphoromycetidae). *Int J Med Mush*, 11: 225-236.
- Wong K.H., Naidu M., David P., Abdulla M.A., Abdullah N., Kuppusamy U.R., Sabaratnam S.** 2011. Peripheral nerve regeneration following crush injury to rat peroneal nerve by aqueous extract of medicinal

mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr) Pers. (Aphyllphoromycetidae). *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, doi:10.1093/ecam/neq062

Wong K.H., Naidu M., David P., Bakar R., Sabaratnam V. 2012. Neuroregenerative potential of lion's mane mushroom, *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (higher basidiomycetes), in the treatment of peripheral nerve injury (Review). *Int J Med Mush*, 14: 427–446.

Wong K.H., Sabaratnam V., Abdullah N., Naidu M., Keynes R. 2007. Activity of aqueous extracts of lion's mane mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Aphyllphoromycetidae) on the neural cell line NG108-15. *Int J Med Mush*, 9: 57-65.

К.Х. ВОНГ, А.П. ГРИГАНСЬКИЙ, П.Г. ЧЕНГ, В. САБАРАТАМ, О.В. КОЛОТУШКІНА, Б.КІРХГОФ, Г.Г. СКИБО, П. ПЕДАРЗАНИ, К.І. ВОРОНІН, Г.А. ГРОДЗИНСЬКА, М.Г.МОЛДАВАН. ЛЕВОВА ГРИВА (*HERICIUM ERINACEUS*) – ПРИРОДНИЙ ЗЦІЛЮВАЧ НЕРВОВИХ УШКОДЖЕНЬ

Hericium erinaceus (Bull.: Fr.) Pers. – їстівний і лікарський культивований вид грибів. Серед традиційних лікарських засобів його використовували для лікування онкологічних (раку) і нейродегенеративних захворювань. Наші дослідження, проведені *in vivo* та *in vitro*, продемонстрували нейропротекторний та нейротрофічний ефекти *H. erinaceus*, зокрема поліпшення функціонального відновлення периферійних нервів після ушкоджень. Порівнювали ефекти водних екстрактів *H. erinaceus* та цианокобаламіну (вітамін B12), який широко застосовують для лікування периферичних нервових розладів. Дія екстрактів зі свіжих плодових тіл *H. erinaceus* сприяла відновленню функцій периферичного нерва у щурів після його розчавлення. Аналіз результатів експериментів на тредбані показав, що відновлення рухової функції задньої кінцівки відбувалося раніше в групах, що одержували екстракт, ніж у тих, що його не отримували (негативному контролі). Тест, в якому досліджували відсмикування задньої кінцівки від поверхні, що нагрівалася, показав прискорення відновлення чутливості кінцівки в групах, що отримували екстракт, порівняно з негативним контролем. Крім того, травма периферичного нерва призводить до змін у віддалено розташованих гангліях задніх корінців спинного мозку (ГЗКСМ), які містять тіла клітин сенсорних нейронів. Імунофлуоресцентні

дослідження показали, що після травми периферичного нерву експресія Akt і p38 MAPK в ГЗКСМ значно підвищувалась у групі, що отримувала водний екстракт. Отримані дані свідчать про те, що водний екстракт *H. eginaseus* пришивидшує функціональне відновлення після ушкодження периферичного нерву за рахунок активації кіназо-залежних сигнальних шляхів. Дію екстракту *H. eginaseus* на імпульсні реакції нейронів гіпокампу вивчали *in vitro* на зрізах головного мозку щурів. У більшості нейронів екстракт *H. eginaseus* гальмував імпульсну активність концентраційно-залежним чином, причому активність нейронів відновлювалась після припинення дії екстракта. В залежності від властивостей екстрактів гальмування спостерігалось у 34-63%, а збудження у 5-10% досліджених нейронів. При дослідженні застосовували внутрішньоклітинне відведення за допомогою фіксації струму або напруги на мембрані нейрону. Гальмування імпульсної активності нейрону під час аплікації екстракту було спричинене гіперполяризацією мембрани клітини. Ця гіперполяризація не була викликана зростанням K^+ струму, що демонстрував випрямлення при входженні в середину клітини ($I(ir)$) і не супроводжувалася змінами катіонних струмів $I(h)$, що активуються гіперполяризацією, проте чутливий до апаміну активований кальцієм K^+ струм (I_{AHP}) та апамінонечутливий, повільний активований кальцієм K^+ струм (sI_{AHP}) зростає. Всі ефекти, які реєструвалися за допомогою методу фіксації потенціала, вочевидь не мають синаптичного походження і показують дію екстракту на мембрану клітини. Екстракти *H. eginaseus* не пригнічують клітинне дихання. Вплив екстрактів *H. eginaseus* на розвиток нервових відгалужень та процес мієлінізації *in vitro* досліджували на культурі клітин. Екстракт *H. eginaseus* поліпшував процес мієлінізації у зрілих мієлінізованих волокнах у концентрації, яка не впливала на ріст нервових клітин *in vitro* та не викликала токсичної дії, чи пошкодження нервових клітин.

К.Х. ВОНГ, А.Ф. ГРИГАНСКИЙ, П.Г. ЧЕНГ, В. САБАРАТАМ, О.В. КОЛОТУШКИНА, Б. КИРХГОФ, Г.Г. СКИБО, П. ПЕДАРЗАНИ, К.И. ВОРОНИН, А.А. ГРОДЗИНСКАЯ, М.Г. МОЛДАВАН. ЛЬВИНАЯ ГРИВА (*HERICIUM ERINACEUS*) – ПРИРОДНЫЙ ИСЦЕЛИТЕЛЬ ПОВРЕЖДЕНИЙ НЕРВОВ

Hericium erinaceus (Bull.: Fr.) Pers. – съедобный и лекарственный культивируемый вид грибов. Среди традиционных лекарственных средств его использовали для лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Наши исследования, проведенные *in vivo* и *in vitro*, продемонстрировали нейропротекторный и нейротрофический эффекты *H. erinaceus*, в частности, улучшение функционального восстановления периферических нервов после повреждений. Сравнивали эффекты водных экстрактов *H. erinaceus* и цианокобаламина (витамина B12), широко применяемого для лечения периферических нервных расстройств. Действие экстрактов из свежих плодовых тел *H. erinaceus* способствовало восстановлению функций периферического нерва у крыс после его раздавливания. Анализ результатов экспериментов на тредбане показал, что восстановление двигательной функции задней конечности начиналось раньше в группах, получавших экстракт, чем у не получавших его (негативный контроль). Тест, в котором исследовали отдергивание задней конечности от нагревающейся поверхности, показал ускорение восстановления чувствительности конечности в группах, получавших экстракт по сравнению с негативным контролем. Кроме того, травма периферического нерва приводит к изменениям в отдаленно расположенных ганглиях задних корешков спинного мозга (ГЗКСМ), которые содержат тела клеток сенсорных нейронов. Иммунофлуоресцентные исследования показали, что после травмы периферического нерва экспрессия Akt и p38 MAPK в ГЗКСМ значительно возрастала в группе, получавшей водный экстракт. Полученные данные свидетельствуют о том, что водный экстракт *H. erinaceus* ускоряет функциональное восстановление после повреждения периферического нерва за счет активации киназо-зависимых сигнальных путей. Действие экстракта *H. erinaceus* на импульсные реакции нейронов гиппокампа изучали *in vitro* на срезах головного мозга крыс. У большинства нейронов экстракт *H. erinaceus* тормозил импульсную активность в зависимости от концентрации, причем активность нейронов

восстанавливалась после прекращения действия экстракта. В зависимости от свойств экстрактов торможение наблюдалось у 34-63%, а возбуждение у 5-10% исследованных нейронов. При исследовании применяли внутриклеточное отведение с помощью фиксации тока или напряжения на мембране нейрона. Торможение импульсной активности нейрона в течение аппликации экстракта было вызвано гиперполяризацией мембраны клетки. Эта гиперполяризация не была вызвана возрастанием K^+ тока, который демонстрировал выпрямление при вхождении в середину клетки ($I(ir)$) и не сопровождалась изменениями катионных токов $I(h)$, активируемых гиперполяризацией, однако, чувствительный к апамину, активируемый кальцием K^+ ток ($I_{АНР}$) и апамин-нечувствительный, медленный, активируемый K^+ ток ($sI_{АНР}$) возрастал. Все эффекты, регистрирующиеся при помощи метода фиксации потенциала, очевидно, не синаптического происхождения и показывают действие экстракта на клеточную мембрану. Экстракты *H. erinaceus* не подавляют клеточное дыхание. Влияние экстрактов *H. erinaceus* на развитие нервных ответвлений и процесс миелинизации *in vitro* исследовали на культуре клеток. Экстракт *H. erinaceus* улучшал процесс миелинизации в зрелых миелинизированных волокнах в концентрации, которая не влияла на рост нервных клеток *in vitro* и не вызывала токсического воздействия или повреждения нервных клеток.

С.М. БОЙКО

Институт эволюционной экологии НАН Украины, Киев

Донецкий национальный университет, Винница

E-mail: bsmbio@ukr.net

СПЕКТРЫ ИЗОФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ ЛЕКАРСТВЕННОГО ГРИБА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR. (*BASIDIOMYCETES*)

Проведен анализ внутриклеточных изоферментных спектров лекарственного гриба *Schizophyllum commune* Fr. Установлено, что гистохимические исследования ферментных систем гриба лучше проводить в 15–30 суточном мицелии. Обнаружено шестнадцать аллельных вариантов, находящихся под контролем семи ген-ферментных локусов, ответственных за синтез шести ферментных систем. Установлена стабильно высокая активность супероксиддисмутазы культур *Sch. commune*, в течение всего срока культивирования, подтверждающая перспективность и обоснованность использования гриба при терапии злокачественных образований.

Ключевые слова: изоферменты, локусы, *Schizophyllum commune*, аллели, возраст мицелия, электрофоретическая подвижность

ВВЕДЕНИЕ

Видовой состав макромицетов, населяющих Землю, окончательно ещё не установлен (Hawksworth, 2001), но при этом значительное количество уже известных грибов находят свое применение в народной медицине (Boa, 2004; Wasser, 2011). Перспективными источниками лекарственных веществ являются базидиальные грибы, насчитывающие более 16 тысяч видов. Грибы наравне с растениями используются как в традиционной, так и в официальной медицине. Они продуцируют различные биологически активные вещества со специфическим химическим составом, не имеющим аналогов в растительном и животном мире. При употреблении лекарственных грибов в пищу, их биологически активные вещества способствуют регуляции различных функций

организма, улучшению обмена веществ и стимуляции иммунной системы человека (Boh, Berovic, 2007; Hobbs, 2005; Reshetnikov et al., 2001; Wasser, 2002). В последние годы ведущими научными лабораториями усиленно ведутся поиски новых лекарственных веществ грибного происхождения. Значительных успехов в этой области достигли ученые Японии, Китая, Франции, Израиля, Германии, Англии, США (Yang et al., 1999; Zhang et al., 2007; Wasser, 2011, 2014). Получен ряд лекарственных препаратов из плодовых тел дикорастущих и выращенных в искусственных условиях грибов: "Бефунгин", "Шизофиллан", "Чаговит", "Санавирон", "Микотон", "Крестин", "Кордицепс" и др. (Fisher, Yang, 2002; Kanazawa et al., 2005; Yifeng Zhang et al., 2013). Полисахаридные препараты онкостатического действия представляют собой β -глюканы или β -D-глюкан-протеиновый комплекс молекулярная масса которого колеблется от 100 000 до 500 000.

Поиски биологически активных веществ грибов ведутся в нескольких направлениях: противоопухолевая, противовирусная, антибактериальная активности, адаптогенное действие (аллергические, аутоиммунные заболевания). Поскольку препараты из грибов совместимы с любыми фармакологическими средствами и усваиваются как пища, их можно использовать в составе комплексного лечения, а также применять в профилактических целях для укрепления здоровья. Наиболее часто в научной литературе в качестве источников биологически активных веществ указываются следующие виды грибов: *Inonotus obliquus* (Fr.) Pilat, *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Bond. & Singer, *Auricularia auricula* (L.) Underw., *Ganoderma applanatum* (Pers.), *G. lucidum* (Curtis) P. Karst., *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev & Singer, *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst., *Fomes fomentarius* (L.), *Trametes versicolor* (L.) Pilat, *Irpex lacteus* (Fr.) Fr., *Armillariella mellea* (Vahl) P. Karst., *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Schizophyllum commune* Fr. и другие.

Широкое распространение *Schizophyllum commune* нашло свое отражение в многочисленных научных исследованиях и практических разработках. В результате была установлена способность гриба продуцировать биологически активные вещества с противоопухолевой активностью (Hobbs, 2005). Был получен препарат, получивший название "Шизофиллан", который в настоящее время серийно выпускается несколькими японскими фармацевтическими компаниями, который используется в клиническом лечении пациентов, перенесших

противоопухолевую терапию (Daba, Ezeronye, 2003). Подобные свойства гриба обусловлены не только наличием β -глюканов, но и мощной ферментной системой, характерной для многих грибов (Yu-Ming Liu et al., 2013; Treshalina et al., 2000).

Лекарственным грибам свойственна высокая энзиматическая активность. Лакказы, супероксиддисмутазы, глюкозооксидазы и пероксидазы предотвращают оксидативный стресс и ингибируют рост клеток при терапии злокачественных образований (Zaidman et al., 2005; Jian Cui et al., 2003).

Ферментные системы грибов остается до сих пор малоизученными и представляют научный интерес с нескольких точек зрения. Во-первых, подобные знания позволят оценить перспективность использования видов для различных биотехнологических разработок. Депонирование значительного количества культур с установленными изоферментными спектрами в перспективе может помочь выявить корреляционную зависимость с их высоким противоопухолевым эффектом. Во-вторых, вопрос систематики макромицетов остается одним из актуальных вопросов микологии и установка изоферментных спектров послужит существенным дополнением их характеристики (Wasser, 2011; Zervakis et al., 1994; Shnyreva et al., 2004). Кроме того, ферментные системы часто используются в качестве молекулярно-генетических маркеров при популяционных исследованиях вида (Бойко, 2012; Siddiquee et al., 2007; Hussain, Barz, 1997; Matsumoto et al., 1995; Voiko, 2015). Кодоминантный тип наследования маркеров позволяет достаточно легко изучать генетические особенности гриба, основываясь на сегрегации признаков (аллозимов) (Linde et al., 1990; Siddiquee et al., 2007; Shnyreva et al., 2004). Подобная информация для *Sch. commune* отсутствует, поэтому целью исследования было определение изоферментного спектра и особенностей реализации аллозимов у данного объекта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований были ди- и монокариотические культуры *Sch. commune*. Дикариотические культуры были получены из базидиокарпа грибов, собранных в Ивано-Франковской, Черниговской, Донецкой областях Украины и АР Крым.

Выделение чистых дикариотических культур осуществляли следующим образом: предварительно очищенное плодовое тело гриба разрезали на фрагменты 3×3 мм, которые стерильным микологическим крючком переносили в 8% раствор H_2O_2 и выдерживали 1–2 мин, обработанный фрагмент переносили в пробирку с картофельным агаром, после появления чистого грибного мицелия проводили повторный пересев на чистые питательные среды (Билай, 1980).

Получение монокариотических культур осуществляли методом споровых отпечатков. Полученные изоляты культивировали на жидкой глюкозо-пептонной среде в термостате ТС-80М при температуре 28°C. Начальная кислотность питательной среды составляла pH 5,0.

Мицелий грибов промывали и высушивали при помощи вакуумной фильтрации, далее гомогенизировали в трис-цитратной буферной системе и фильтровали. Количество внесенного белка в каждую лунку колебалось в пределах 40–60 мкг. Электрофоретическое разделение внутриклеточных белков осуществляли в 7,5% и 11,25% полиакриламидном геле (Laemmli, 1970) с использованием трис-глициновой буферной системы (pH 8,3). Гистохимическое проявление зон активности осуществляли для следующих ферментных систем: глутаматдегидрогеназа (GDH) (КФ 1.4.1.2), супероксиддисмутаза (SOD) (КФ 1.15.1.1), глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT) (КФ 2.6.1.1), эстераза (EST) (КФ 3.1.1.1), кислая фосфатаза (ACP) (КФ 3.1.3.2), α -амилаза (AMY) (КФ 3.2.1.1) (Manchenko, 2003). Генетический контроль выявленных электрофоретических вариантов ферментов изучали методом анализа их сегрегации среди монокариотических культур. В соответствии с менделевскими закономерностями, при моногенном наследовании признака, гетерозиготного по какому-либо локусу, аллельные варианты (в нашем случае аллозимы) сегрегируют в соотношении 1:1. Степень соответствия наблюдаемых соотношений аллозимов ожидаемым оценивали с помощью критерия χ^2 (Айала, 1984).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании вопросов генетики гриба требуется установить минимально необходимое количество суток, в течение которых бы в клетках накапливался фермент в концентрациях необходимых для его

определения. Срок культивирования (30 суток) был обусловлен тем, что при данных условиях культура гриба проходит все фазы своего роста (Билай, 1982). Через каждые трое суток проводили исследования внутриклеточных изоферментных систем.

В ходе исследования установлено, что глутаматдегидрогеназа имеет зоны активности изоферментов с относительной электрофоретической подвижностью (ОЭП) 0,13 и 0,15, четко проявляемые в период с 15 по 27 сутки культивирования (рис.1).

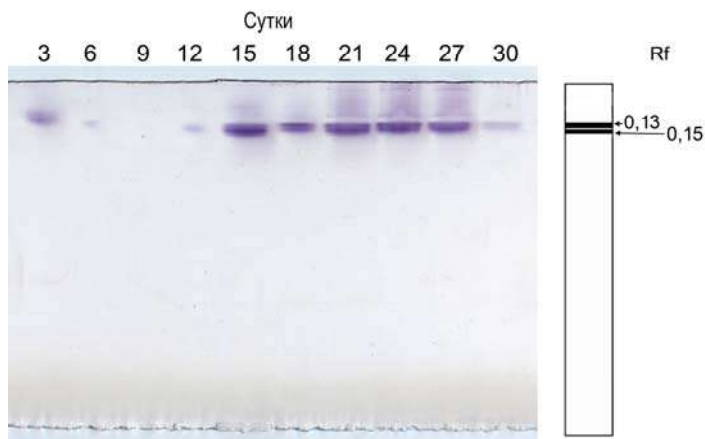


Рис. 1. Влияние возраста мицелия *Schizophyllum commune* на вариабельность внутриклеточных изоферментов глутаматдегидрогеназы

Изоферменты α -амилазы *Sch. commune* проявлялись двумя зонами активности с ОЭП 0,43 и 0,80. На рисунке 2 хорошо видно постепенное накопление изоферментов α -амилазы и начиная с 15-18 суточного возраста мицелия их идентификация не вызывает проблем.

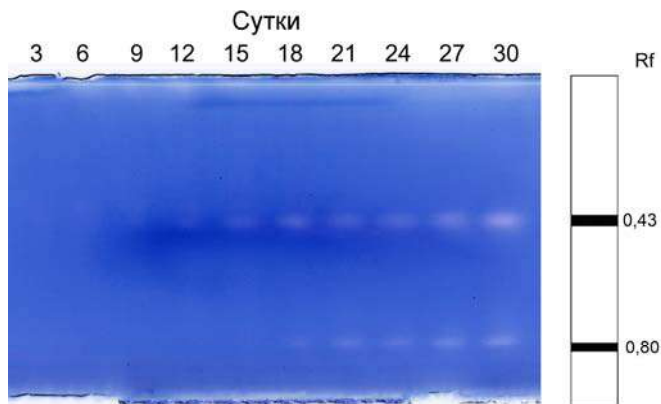


Рис. 2. Влияние возраста мицелия *Schizophyllum commune* на варибельность внутриклеточных изоферментов α -амилазы

Внутриклеточная ферментная система супероксиддисмутазы *Sch. commune* представлена пятью зонами активности с очень компактным размещением (рис.3.). Относительная электрофоретическая подвижность зон находится в пределах 0,11-0,18 (11,25% гель) и визуализируется, начиная с 3 суток культивирования.

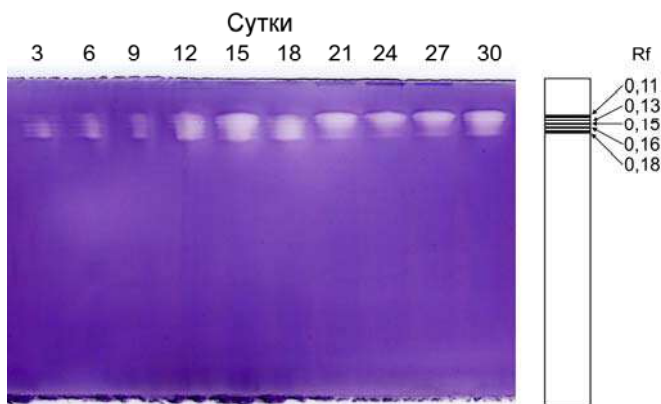


Рис. 3. Влияние возраста мицелия *Schizophyllum commune* на варибельность внутриклеточных изоферментов супероксиддисмутаза

Обращает на себя внимание большое количество изоформ супероксиддисмутазы и их высокая активность с первых суток роста мицелия *Sch. commune*.

Полученные нами данные позволили установить, что часть аллозимов может быть использована при проведении популяционно-генетических исследований *Sch. commune* (Voiko, 2011). Представленные в таблице 1 данные показали, что ни у одного из идентифицированных полиморфных локусов не наблюдалось достоверного отклонения от ожидаемого соотношения 1:1.

Таблица 1.

Сегрегация аллозимов у культур *Schizophyllum commune* Fr.

Генотип	Число культур	Соотношение аллелей	Критерий χ^2
Got ^{82/100}	5	23:26	0,49
Got ^{91/100}	6	31:24	0,89
Got ^{91/109}	3	12:18	1,20
Amy-2 ^{95/100}	5	20:28	1,33
Amy-2 ^{95/106}	2	7:10	0,53
Amy-2 ^{95/110}	2	15:7	2,90
Amy-2 ^{100/106}	3	11:19	2,13
Amy-2 ^{100/110}	3	13:18	0,81
Acp ^{118/108}	2	7:11	0,89
Acp ^{118/100}	2	11:6	1,47
Acp ^{108/100}	4	15:23	1,68

Более подробно удалось установить следующее:

α -амилаза (АМУ). На гелях изоферменты АМУ представлены двумя (иногда тремя) зонами активности, которые, вероятно, кодируются двумя локусами: *Amy-1*, *Amy-2* (рис.4). Локус *Amy-1* имел два аллеля, а локус *Amy-2* был представлен четырьмя аллозимными вариантами (табл. 2).

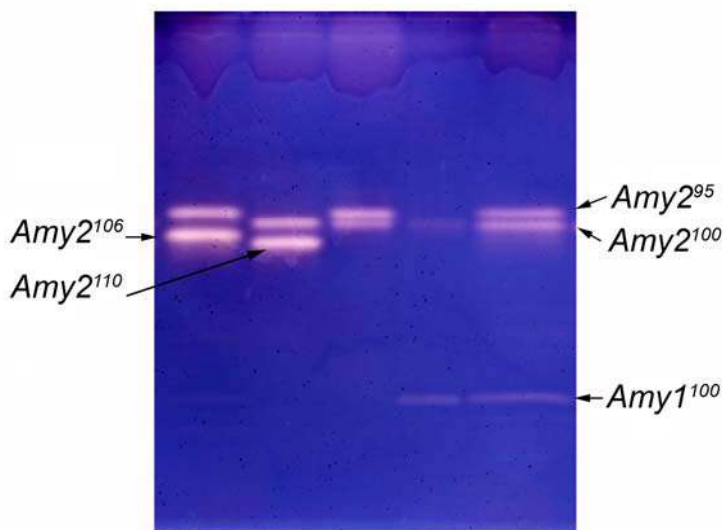


Рис. 4. Электрофореграмма аллозимов α -амилазы *Schizophyllum commune*

Таблица 2

Ферменты, локусы и аллели с их подвижностями, наблюдаемые у представителей *Schizophyllum commune*

Название	Аббревиатура	Локусы	Аллели	Rf
α -амилаза	AMY	Amy-1	105	0,78
			100	0,74
		Amy-2	110	0,45
			106	0,43
			100	0,41
			95	0,39
Глутамат-оксалоацетат-трансаминаза	GOT	Got	109	0,36
				0,30
			100	0,33
				0,30
			91	0,30
Глутамат-дегидрогеназа	GDH	Gdh	82	0,33
				0,27
			100	0,32
			100	0,28

Кислая фосфатаза	ACP	Acp	118	0,46
			108	0,42
			100	0,42 0,39 0,36
Супероксид-дисмутаза	SOD	Sod	100	0,28 0,25 0,22 0,18 0,15
				0,28
				0,25
				0,22
Эстераза	EST	Est	100	0,98

Локус *Amy-1* зачастую не проявлялся у "родительского" дикариотического мицелия и наоборот мог интенсивно визуализироваться у монокариотических культур (рис. 4), поэтому в дальнейших исследованиях его использовать не рекомендуется. Локус *Amy-2* на гелевых пластинах проявлялся довольно четко и стабильно, что делает его перспективным для дальнейшего использования в популяционно-генетических исследованиях *Sch. commune*.

Глутаматоксалоацетаттрансаминаза (GOT). При гистохимическом окрашивании геля выявлено различное количество зон активности фермента (рис. 5).

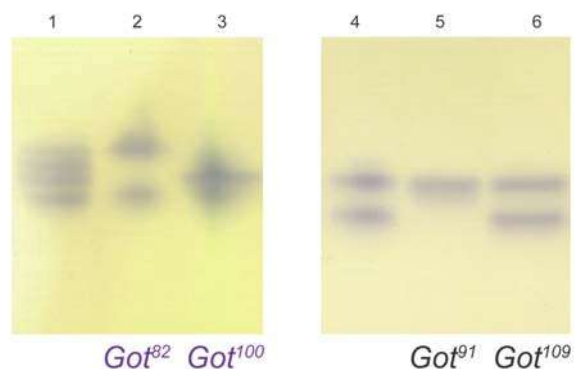


Рис. 5. Электрофореграмма аллозимов глутаматоксалоацетат трансаминазы дикариотических (1, 4) и монокариотических (2, 3, 5, 6) культур *Schizopyllum commune*

Исследуя распределение данного признака у монокариотического потомства, удалось установить присутствие 4 аллелей, кодируемых одним локусом. Аллели Got^{82} , Got^{100} , Got^{109} на электрофореграммах были представлены двухполосными вариантами фермента, а аллель Got^{91} – однополосным. Аллель Got^{109} оказался достаточно редким, частота его встречаемости составила 0,08.

Глутаматдегидрогеназа (GDH). Ряд дегидрогеназ, исследуемых нами у представителей *Sch. commune* (Voiko, 2011), объединяет высокая начальная активность у свежевнесенного в гель материала и быстрая ее потеря по истечении времени. Данный факт значительно затрудняет работу с этой группой ферментов, поскольку достаточно сложно подобрать количество вносимого материала без риска получения избыточной концентрации белка в полиакриламидном геле или потери определенных зон активности фермента как результат его недостатка. В результате проведенных исследований было установлено наличие у всех исследуемых культур мономорфного локуса *Gdh*, который визуализируется на гелевых пластинках в виде двух и более полос активности фермента (рис. 6). Хотя не исключено, что это могут быть два тесно сцепленных локуса, однако имеющихся на сегодняшний день данных пока недостаточно, чтобы подтвердить или опровергнуть данное предположение.

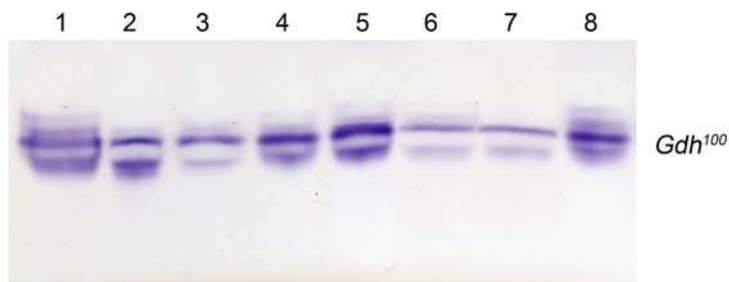


Рис. 6. Электрофореграмма аллозимов глутаматдегидро-геназы дикариотической (1) и монокариотических (2–8) культур *Schizophyllum commune*

Кислая фосфатаза (АСР). Зона активности этого фермента контролируется локусом *Acp*, изменчивость которого определяется тремя аллелями: Acp^{100} , Acp^{108} и Acp^{118} (табл. 2, рис. 7). Исследование сегрегации

признаков позволило установить их моногенное наследование, а сравнение между культурами - кодоминантную реализацию. Незначительные затруднения при интерпретации данных могут представлять, близкое расположение аллельных вариантов и высокая ферментная активность кислой фосфатазы.

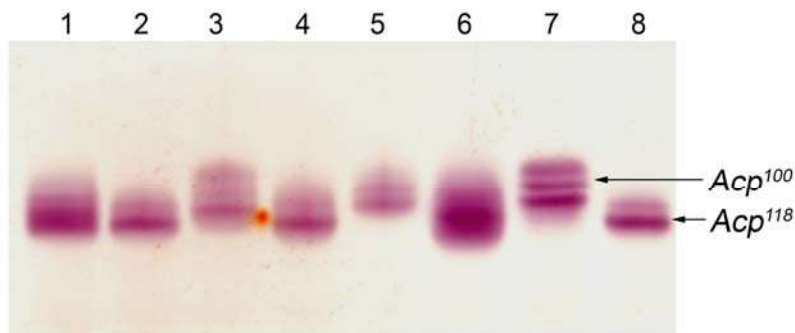


Рис. 7. Электрофореграмма аллозимов кислой фосфатазы дикариотической (1) и монокариотических (2-8) культур *Schizophyllum commune*

В работе W.W. Lilly et I. Charvat (Lilly, Charvat, 1987) приводится информация, которая подтверждает полученные нами данные: при изучении изоферментов кислой фосфатазы на стадии дикариона установлен сходный профиль данного фермента.

Супероксиддисмутаза (SOD). Вне зависимости от ядерного статуса "клетки" SOD проявляется в виде пяти зон активности фермента, кодируемых как мы предполагаем одним локусом с единственным аллелем - *Sod¹⁰⁰* (рис. 8).

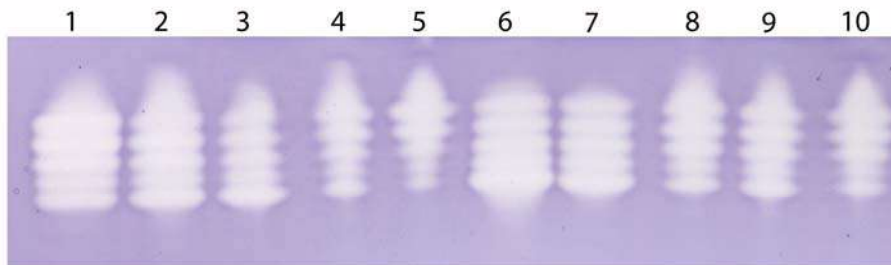


Рис. 8. Электрофореграмма аллозимов супероксиддисмутазы *Schizophyllum commune* (1 – исходная дикариотическая культура; 2-10 – монокариотические культуры, полученные методом споровых отпечатков от исходной дикариотической культуры)

Не исключено, что может идти речь и о пяти тесно сцепленных локусах, по аналогии с ферментом GDH. Данный локус визуализируется на гелях, начиная с самого молодого возраста мицелия (Бойко, 2011), также присутствует у всех изученных культур и имеет своеобразный "профиль" зон активности. Все это указывает на возможность использования ферментной системы SOD как молекулярного маркера вида.

Эстераза (EST). Большая часть изоферментов EST в силу разных причин (быстрая потеря активности фермента, недостаточная их концентрация, посттрансляционная модификация и др.) не показала моногенного наследования и кодоминантный характер реализации признака. Все это делает проблематичным использование изоферментов EST для исследования генетики гриба.

James T.Y. et al. (1999) при изучении генетической структуры *Sch. commune* с использованием 11 ферментных систем установили высокий уровень полиморфизма, составивший, в среднем, 5 аллелей на локус. В наших исследованиях этот уровень оказался ниже – 2,7. По-видимому, это связано с меньшей выборкой и количеством использованных ферментных систем, а также полностью иным качественным составом изоферментов. В то же время, полученные нами данные расширяют набор аллозимов пригодных для исследования генетики гриба.

ВЫВОДЫ

Установлено, что для визуализации внутриклеточных ферментных систем *Sch. commune* методом электрофореза целесообразно использовать 15-30 суточный мицелий.

При изучении шести ферментных систем было обнаружено шестнадцать аллельных вариантов, находящихся под контролем семи ген-ферментных локусов. Для популяционно-генетических исследований рекомендуется использовать локусы *Amy-2*, *Got* и *Asp*, выявившие полиморфность, а локус *Sod*, может служить молекулярным маркером вида.

Высокая активность супероксиддисмутазы представителей *Sch. commune* в течение всего срока культивирования подтверждает

перспективность и обоснованность использования гриба при терапии злокачественных образований.

Литература

- Айала Ф.** Введение в популяционную генетику. – М.: Мир, 1984. – 230 с.
- Билай В. И.** Основы общей микологии. – К.: Вищ. шк., 1980. – 360 с.
- Билай В.И.** Методы экспериментальной микологии. – Киев: Наук. думка, – 1982. – 550 с.
- Бойко С.М.** Зміна ізоферментного складу культури гриба *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*) залежно від віку міцелію // Укр. ботан. журн. – 2011. – 68, №4. – С. 598-603.
- Boa E. R.** Wild Edible Fungi: A Global Overview of Their Use and Importance to People. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food & Agriculture Org., 2004. – 147.
- Boh B., Berovic M.** *Grifola frondosa* (Dicks.: Fr.) S.F. Gray (Maitake mushroom): medicinal properties active compounds, and biotechnological cultivation // Int. J. Med. Mushr. – 2007. –9. – P. 89-108.
- Boiko S. M.** Polymorphism of intracellular isoenzymes of *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*) in the Donetsk region // Cytology and Genetics. – 2011. – Vol. 45, №6. – P. 343-346.
- Boiko S.M.** Allozyme polymorphism in mono- and dikaryotic cultures of fungus *Schizophyllum commune* Fr. (*Basidiomycetes*) // Cytology and Genetics. – 2015. – 49, (1). – P. 27-31.
- Daba, A. S., Ezeronye O. U.** Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms // African Journal of Biotechnology. – 2003. – 2. – P. 672-678.
- Fisher M., Yang L.X.** Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy. Anticancer Res. – 2002. – 22. – P. 1737-1754.
- Hawksworth D.L.** Mushrooms: the extent of the unexplored potential // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – 3. – P. 333-340.
- Hobbs Ch.** The chemistry, nutritional value, immunopharmacology, and safety of the traditional food of medicinal split-gill fungus *Schizophyllum commune* Fr.: Fr. (*Aphyllorphoromycetidae*). A literature review // Int. J. Med. Mushr. – 2005. – 7. – P. 127-140.

- Hussain S., Barz W.** Isozyme polymorphism in *Ascochyta rabiei* isolates from Pakistan // Pak. J. Bot. – 1997. – 29. – P. 207-216.
- James T. Y., Porter D., Hamrick J. L., Vilgalys R.** Evidence for limited intercontinental gene flow in the cosmopolitan mushroom *Schizophyllum commune* // Evolution. – 1999. – 53. – P. 1665-1677.
- Jian Cui, Yusuf Chisti.** Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: physiological activity, uses, and production // Biotechnology Advances. – 2003. – 21. – P. 109-122.
- Kanazawa M, Yoshihara K, Abe H, et al.** Effects of Krestin (PSK)TM on T and dendritic cells differentiation in gastric or colorectal cancer patients // Anticancer Res. – 2005. – 25. – P. 443-449.
- Laemmlli U. K.** Cleavage Of Structural Proteins During Assembly Of Head Of Bacteriophage-T₄ // Nature. – 1970. – 227. – P. 680 – 685.
- Lilly W. W., Charvat I.** Activities and isozymes of acid phosphatase in *Schizophyllum commune*: a re-examination // Mycologia. – 1987. – 79. №2. – P. 314-319.
- Linde D. C., Groth J. V., Roelfs A. P.** The genetic basis of isozyme variation in the bean rust fungus (*Uromyces appendiculatus*) // Journal of Heredity. – 1990. – 81. –P. 134-138.
- Manchenko G. P.** Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. – CRC Press, 2003. – 553 p.
- Matsumoto T., Mimura R., Fukumasa-Nakai Y.** Isozyme variation and genetic relatedness among natural populations of *Pleurotus ostreatus* // J. Gen. Appl. Microbiol. – 1995. – 41. – P. 487-497.
- Reshetnikov S.V., Wasser S.P., Tan K.K.** Higher Basidiomycota as source of antitumor and immunostimulating polysaccharides // Int. J. Med. Mushr. – 2001. – 3. – P. 361-394.
- Siddiquee S., Abdullah F., Soon T., Rohaza E.** Level in allozyme variations of Malaysian isolates of *Trichoderma harzianum* and its taxonomic implications // Research journal of microbiology. – 2007. – 2, №10. – P. 717-726.
- Shnyreva A. V., Belokon Yu. S., Belokon M. M., Altukhov Yu. P.** Interspecific genetic variability of the Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* as revealed by allozyme gene analysis // Russian Journal of Genetics. – 2004. – 40, №8. – P. 871-881.
- Treshalina H. M., Lukasheva E. V., Sedakova L. A., Firsova G. A., Guerassimova G. K., Gogichaeva N. V., Berezov T. T.** Anticancer enzyme L-

lysine α -oxidase // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2000. – 88. – P. 267-273.

Wasser S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – 60. – P. 258-274.

Wasser S.P. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. In: A collection of selected publications. T. 2. Medicinal mushroom. – Kiev. – 2011. – P. 2-17.

Wasser S.P. Medicinal Mushroom Science: Current Perspectives, Advances, Evidences, and Challenges // Biomed. J. – 2014. – 37. – 6. – P. 345-356.

Yang Q.-Y. Advanced research in PSP: Tsim Sha Tsu, Kowloon: The Hong Kong Association for Health Care Ltd. – 1999. – 350 p.

Yifeng Zhang, Huiling Kong, Yapeng Fang, Katsuyoshi Nishinari, Glyn O. Phillips // Schizophyllan: A review on its structure, properties, bioactivities and recent developments. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre. -2013. -1. – P. 53-71.

Yu-Ming Liu, Yu-Kuo Liu, Keng-Li Lan, Yu-Wei Lee, Tung-Hu Tsai, Yu-Jen Chen. Medicinal Fungus *Antrodia cinnamomea* Inhibits Growth and Cancer Stem Cell Characteristics of Hepatocellular Carcinoma. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013. – P. 1-8.

Zaidman B.-Z., Yassin M., Mahajna J., Wasser S.P. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – 67. – P. 453-468.

Zervakis G, Sourdis J, Balis C. Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isoenzyme analysis // Mycol. Res. – 1994. – 98. – P. 329-341.

Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C.K., Wang Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristic and antitumor activity // Trends Food Sci. Technol. – 2007. – 18. – P. 4-19.

С.М. БОЙКО

СПЕКТРИ ІЗОФЕРМЕНТНИХ СИСТЕМ ЛІКАРСЬКОГО ГРИБА *SCHIZOPHYLLUM COMMUNE* FR. (BASIDIOMYCETES)

Проведено аналіз внутрішньоклітинних ізоферментних спектрів лікарського гриба *Schizophyllum commune* Fr. Встановлено, що гістохімічні дослідження ферментних систем гриба краще проводити у 15-30 добовому

міцелії. Виявлено шістнадцять алельних варіантів, що знаходяться під контролем семи ген-ферментних локусів, які відповідають за синтез шести ферментних систем. Встановлена стабільно висока активність супероксиддисмутази культур *Sch. commune*, протягом усього терміну культивування, що підтверджує перспективність і обґрунтованість використання гриба під час терапії злоякісних утворень.

S.M. BOIKO

SPECTRUM OF ISOZYMES SYSTEMS OF MEDICINAL FUNGUS
SCHIZOPHYLLUM COMMUNE FR. (BASIDIOMYCETES)

The intracellular isozyme spectrum of medicinal fungus *Schizophyllum commune* Fr. was analyzed. It has been established that histochemical study of fungus enzyme systems is the best done on 15-30 diurnal mycelium. There are sixteen allelic variants under the control of the seven gene loci enzymes responsible for the synthesis of six enzyme systems. Established consistently high activity of superoxide dismutase cultures of *Sch. commune* for the duration of cultivation confirms prospects and validity of use of the fungus in the therapy malignant tumors.

С.А. СЫРЧИН

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН
Украины, ул. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,
syrchin@gmail.com

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ВЫСШИХ ГРИБОВ

В обзоре освещен современный уровень знаний об антиоксидантах дикорастущих и культивируемых шляпочных грибов, приведены сведения о биологически активных веществах, проявляющих реакции скавенджинга свободных радикалов. Показанные антиоксидантные свойства макромицетов свидетельствуют об их дополнительной ценности в рационе здорового питания. Лекарственные и съедобные виды макромицетов являются неисчерпаемым источником природных антиоксидантов нового поколения и уникальным перспективным объектом биотехнологических разработок.

Ключевые слова: лекарственные грибы, антиоксидантная активность, дикорастущие и культивируемые макромицеты

В последние годы возросла роль науки о лекарственных грибах, основные направления которой состоят в исследовании и использовании широкого спектра разнообразных терапевтических свойств ценных съедобных и лекарственных видов грибов. Среди их биологических свойств особенно важной является антиоксидантная активность ряда соединений, вырабатываемых макромицетами (Asatiani et al., 2010; Вассер, 2012; Сырчин, 2012).

Свободные радикалы являются побочными продуктами клеточного аэробного метаболизма. По сути, свободным радикалом является атом, или молекула с одним или более неспаренными электронами. Молекулярный кислород (O_2 , диоксиген) является бирадикальной формой. Добавление одного электрона к молекулярному кислороду приводит к образованию супероксид анион-радикала $O_2^{\cdot-}$ (Рис. 1).

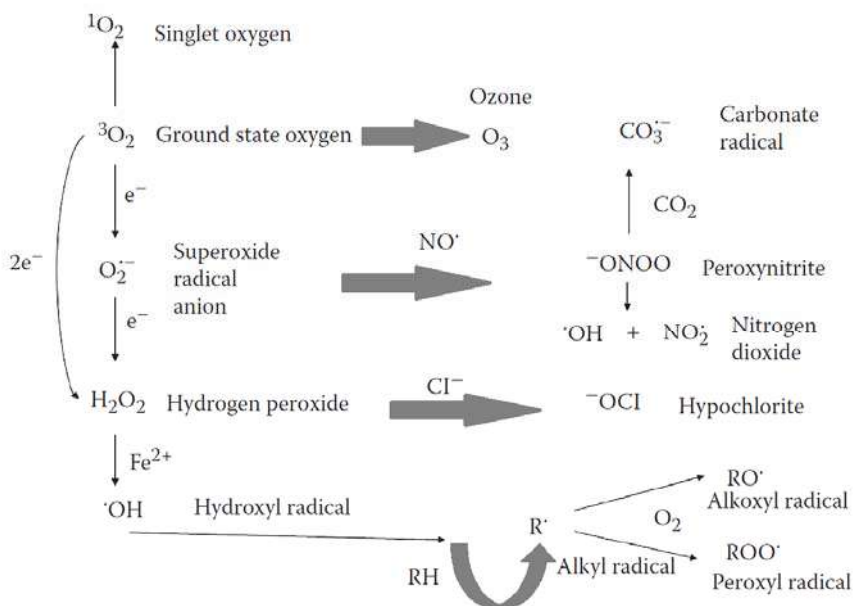


Рис.1. Схема образования свободных радикалов в биологических системах (Mani, 2015): ROS (reactive oxygen species) – активные формы кислорода; RO^\bullet и ROO^\bullet - алкоксил- и пероксилрадикалы

Супероксид радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$) считается "первичной" активной формой кислорода (АФК) и может впоследствии взаимодействовать с другими молекулами, образуя "вторичные" АФК, либо непосредственно, либо опосредованно путем ферментативных или металлкатализируемых процессов (Halliwell, 2007). Дисбаланс электронов является причиной высокой реактивности, вызывая образование других свободных радикалов путем цепных реакций. АФК в клетке образуются постоянно в течение различных физиологических и биохимических процессов, таких как митохондриальное дыхание, активация фагоцитов, биосинтез эндопероксидов циклооксигеназами и липооксигеназами, окисление различных соединений под действием ферментов (например, ксантиноксидаз) и переходных металлов, таких как Fe^{2+} и Cu^{2+} (Halliwell, 2007; Valko et al., 2015).

F.L. Muller с соавторами было показано, что супероксиды, образуемые комплексом I обнаруживаются исключительно в клеточном матриксе (Рис.

2) (Muller, 2004; Sena, 2012; Mailloux, 2015). Образование супероксида происходит в митохондриях клетки, в основном в комплексах I и III цепи переноса электронов (Рис. 3) (Scharira, 2006; Zapico, Ubelaker, 2013).

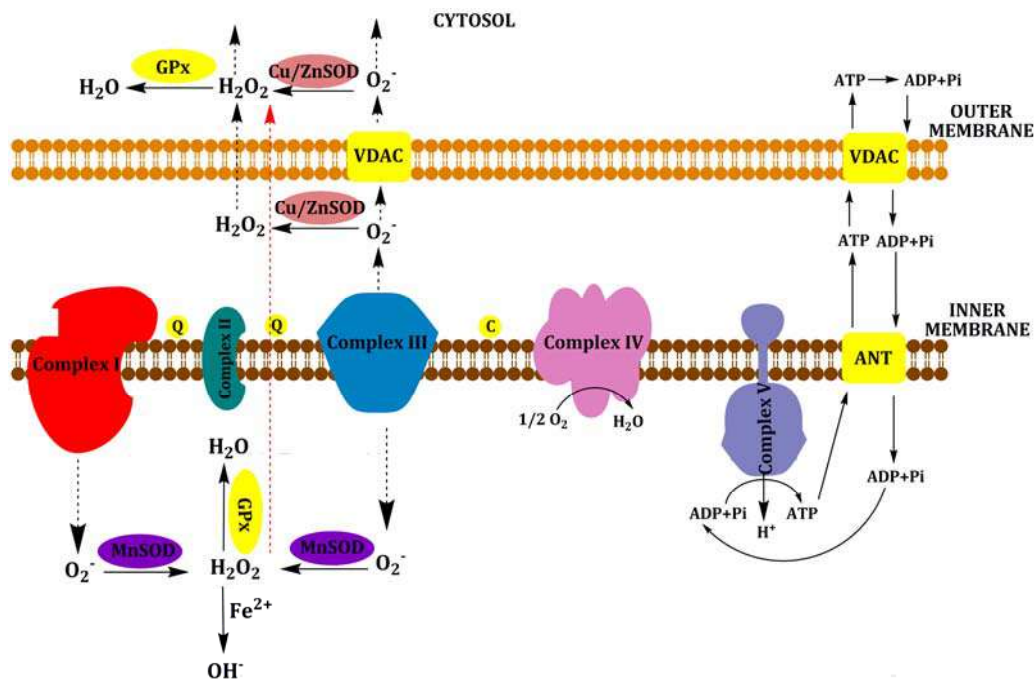


Рис.2. Образование активных форм кислорода в системах переноса электронов в митохондриях: супероксид образуется комплексом I на стороне матрикса внутренней мембраны митохондрий и комплексом III на обеих сторонах внутренней митохондриальной мембраны. Далее супероксид преобразуется в перекись водорода (H_2O_2) ферментом, локализованным на матриксе, - магнийзависимой супероксиддисмутазой (MnSOD или SOD₂) и ферментом, локализованным в межмембранном пространстве митохондрий либо цитозоле - медь и цинк-зависимой супероксиддисмутазой (Cu/ZnSOD или SOD₁). Перекись водорода проникает в цитозоль и ядро, где активирует редокс-чувствительную сигнальную систему. В митохондриях и цитозоле токсичность H_2O_2 удаляется при помощи глутатионпероксидазы (GPx). В присутствии редуцированных металлов-переносчиков (например, Fe^{2+}), H_2O_2 преобразуется в гидроксильный радикал (OH^{\cdot}) в результате реакции Фентона.

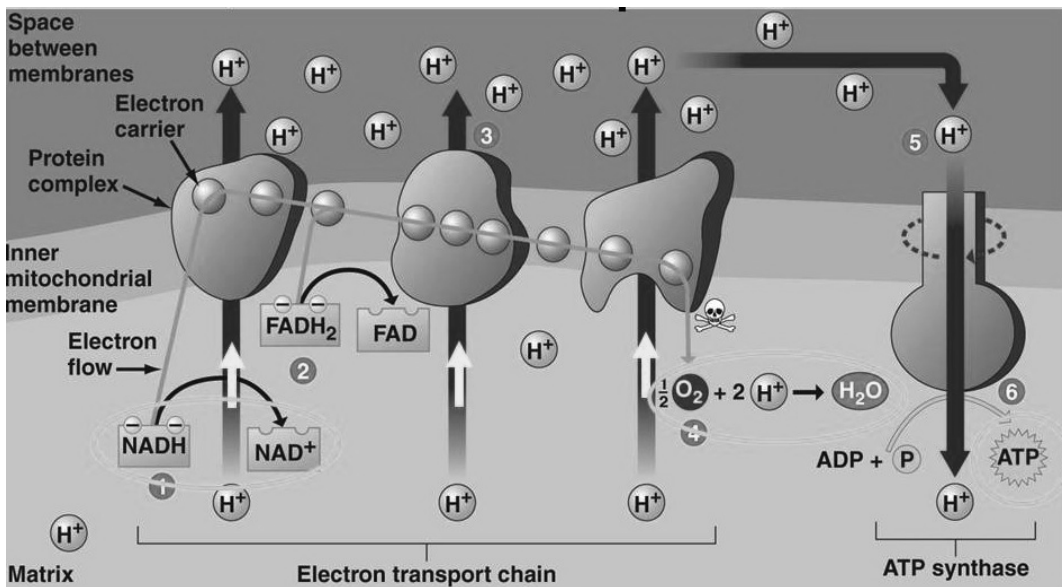


Рис.3. Схема цепи переноса электронов в митохондриях (по Zarico, Ubelaker, 2013).

Свободные радикалы являются медиаторами в процессах сигнальной трансдукции и играют важную роль в регуляции синтеза биологически активных соединений. В то же время, свободные радикалы проявляют ряд токсических эффектов, вызывая окисление липидов, белков, индуцируя перекисное окисление, модификацию оснований и разрывы цепей ДНК. До настоящего времени вопрос о первичной мишени АФК стресса носит дискуссионный характер. По мнению ряда авторов, действие различных стрессоров, таких как ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, сигаретный дым, пестициды и прочих неблагоприятных факторов, интегрируется в клетке таким образом, что вызывает сверхпродукцию АФК и развитие окислительного стресса, провоцируя развитие различных болезней и патологических состояний (Рис. 4) (Полесская, 2007; Прадедова и др., 2011; Mani..., 2015).



Рис. 4. Образование свободных радикалов под действием экзо- и эндогенных факторов.

Одним из главных факторов, обуславливающих негативное влияние активных форм кислорода, образованных как в результате эндогенного окислительного метаболизма, так и в результате действия экзогенных факторов, является нарушения структуры ДНК. К ним относятся: повреждение оснований, возникновение сайтов с потерей оснований (AP - апуриновые/апириимидиновые сайты), возникновение одиночных и двойных разрывов цепи ДНК. Подобные повреждения являются потенциально мутагенными и летальными для клетки, поскольку могут блокировать репликацию и транскрипцию ДНК. В результате, требуется мобилизация эксцизионных систем репарации оснований ДНК, или BER (base excision repair), что может вызывать генетическую нестабильность, а их повреждения приводят к возникновению дегенеративных патологий у человека (Metler, Loft, 2007).

Окислительный стресс участвует в патофизиологии таких распространенных заболеваний, как диабет, гипертония, рак, атеросклероз, преэклампсия, метаболический синдром, ревматоидный артрит, глаукома, острая почечная недостаточность, нейродегенеративные нарушения, болезни Альцгеймера и Паркинсона (Oxidative stress..., 2009).

Именно дисбаланс образования свободных радикалов и процессов их ингибирования антиоксидантными системами клетки является главной причиной возникновения и развития патологий. Так, M. Valko с соавторами сообщают, что при высокие концентрации АФК являются ключевыми медиаторами повреждения клеточных структур, нуклеиновых кислот, липидов и белков (Valko et al., 2007). Гидроксильный радикал, как известно, реагирует со всеми компонентами молекулы ДНК, повреждая как пуриновые, так и пиримидиновые основания, а также дезоксирибозу (Halliwell, 2007). Среди повреждений ДНК наиболее изученным является образование 8-гидроксигуанозина (8-OH-G). Постоянная модификация генетического материала, возникающего в результате подобных «окислительных повреждений» является первым шагом, приводящим к мутагенезу, канцерогенезу и старению. Металл-индуцированное образование АФК приводит не только к повреждениям ДНК, но и наиболее уязвимых к окислению молекул, таких как остатки полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов. Перекисные радикалы претерпевают изменения в ходе циклических реакций до эндопероксидов (предшественников малонового диальдегида), и, образуя в результате перекисного окисления конечный продукт – малоновый диальдегид (МДА), который является маркером перекисного окисления жиров. Помимо МДА, основным продуктом перекисного окисления липидов, является 4-гидрокси-2-ноненал (гидроксиноненал). Установлено, что МДА проявляет мутагенный эффект на бактериальные клетки и клетки млекопитающих, и вызывает канцерогенез у крыс. Второй по значению продукт перекисного окисления липидов – гидроксиноненал, являясь слабым мутагеном, в то же время, проявляет токсические эффекты, очевидно, за счет запуска механизмов сигнальной трансдукции (Finkel, 2011).

Кроме липидов, окислители способны также повреждать и белковые молекулы. Для изучения этих процессов E.R. Stadtman использовал метод ионизирующего облучения аминокислот, простых пептидов и белков в условиях, при которых наблюдалось образование гидроксильных или смеси гидроксильных/супероксидных радикалов (Stadtman, 2004). Было показано, что все аминокислотные остатки белков, особенно цистеин и метионин, чувствительны к окислению под воздействием АФК. Окисление остатков цистеина может приводить к обратимому формированию

смешанных дисульфидов между тиоловыми группами белков (-SH) и низкомолекулярными тиолами. При этом концентрация карбонильных групп, образованных в результате различных механизмов окисления, является одним из критериев АФК--опосредованного повреждения белков.

Однако, известен ряд природных веществ, обладающих защитными свойствами от потенциально вредного воздействия прооксидантов. Эти вещества, называемые антиоксидантами, могут быть определены как простые химические вещества или соединения, которые способны ингибировать процессы окисления. Антиоксидантные соединения должны присутствовать в биологических системах в концентрациях, достаточных для предотвращения накопления молекул прооксидантов, сдвиг баланса между про- и антиоксидантами приводит к состоянию окислительного стресса. Так, ряд белков и ферментов, синтезируемых в организме, выполняют антиоксидантную функцию. Среди них наиболее важными являются такие ферменты как: каталаза, селен-зависимая глутатионпероксидаза, медь- и цинк-зависимая супероксиддисмутаза, а также металл-связывающие белки - трансферрин и церулоплазмин (Halliwell, 2007; Bhattacharya, 2015)(Рис.5).

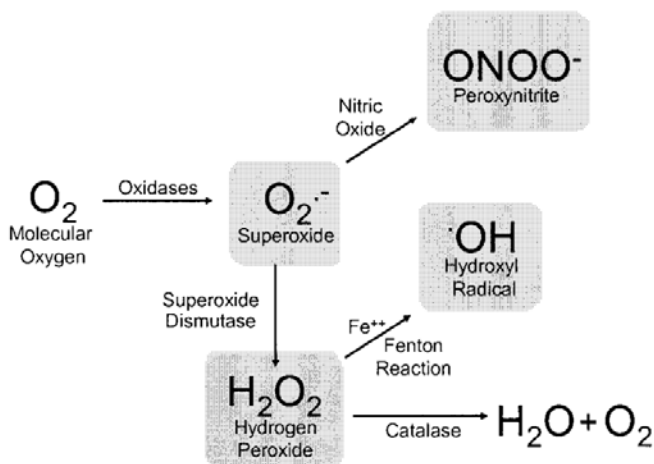


Рис.5. Схема действия антиоксидантных ферментов в клетке (Bhattacharya, 2015)

О.Ю. Янковский, в частности, указывает на то, что кислород является эволюционно приобретенным фактором регулирования жизнедеятельности организма, а его избыток или недостаток является ключевым фактором в реализации онтогенетической программы развития не только млекопитающих, но и всех аэробных организмов. Основным способом выживания организмов в аэробных условиях является использование не столько филогенетически сформированных механизмов борьбы с образующимися АФК (антиоксиданты-ликвидаторы, относящиеся к ферментативной и неферментативной антиоксидантным системам), сколько механизмов, препятствующих их образованию в ходе метаболизма кислорода (Янковский, 2000).

Учитывая то, что за последние десятилетия был накоплен значительный объем информации об антиоксидантах, требующий систематизации, были предприняты определенные попытки создания классификаций антиоксидантной защиты (Sies, 1993, 1997; Прадедова и др., 2011)(Рис.6). G. Sies предложил классификацию, основанную на типе антиоксидантной защиты (профилактика образования активных форм кислорода, перехват и деактивация, репарация ДНК и адаптационные ответы). Е.В. Прадедова с соавторами (2011) предложили более сложную систему классификации, основанную на разных принципах: по каталитической активности, по молекулярным массам антиоксидантов, по локализации АО, по уровням защиты, по механизмам действия, по стратегии АОА, и, наконец, классификацию на основе многоуровневой организации защиты.

Ферменты клетки катализируют реакции биологического окисления, приводящие к образованию промежуточных свободнорадикальных продуктов. Среди биологических объектов высокий уровень АОА известен для зеленого чая, красного винограда, оливкового масла. Известно, что арахис, орехи, и бобовые, семена льна и подсолнечника, хлопковое и рапсовое масло, овощи, фрукты и яйца также содержат различные компоненты, обуславливающие их антиоксидантный потенциал.

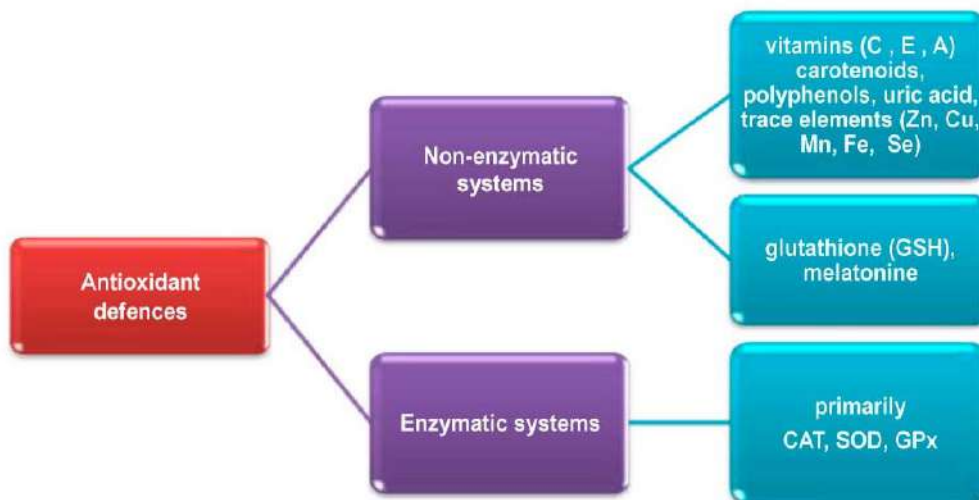


Рис.6. Схема антиоксидантной защиты от действия свободных радикалов в клетке (Kozarski et al., 2015).

Тем не менее, Министерство сельского хозяйства США (USDA) в 2012 году перестало публиковать рейтинги продуктов по АОА, признав их биологически не подтвержденными, так как на сегодняшний день не существует убедительных доказательств их физиологического эффекта *in vivo* (USDA..., 2016). В то же время научные данные последних лет свидетельствуют о достаточно высоком уровне АОА у культивируемых и дикорастущих грибов. Несмотря на большое количество данных по АОА (антиоксидантной активности) экстрактов грибной биомассы *in vitro*, до последнего времени практически отсутствовали сведения об этой активности непосредственно в организме человека. Однако, недавние исследования показали, что фенольные соединения грибного происхождения имеют высокий уровень биодоступности и способны быстро метаболизироваться в организме. Употребление грибов с высокой концентрацией антиоксидантов фенольной природы приводит к появлению в плазме крови биоактивных метаболитов, что, в свою очередь, приводит к повышению ее антиоксидантной активности (Heleno, 2015b).

Следует отметить, что уровень антиоксидантной активности в макромицетах определяется комплексом специфических метаболитов, в первую очередь, органических веществ фенольной природы - поликетидов, терпенов, стероидов, а также провитаминов, ферментов и полисахаридов (Мау, 2002; Kalač, 2013).

Среди антиоксидантов именно полифенолы приобрели особую значимость в связи с широким спектром их биологического действия, которое включает в себя улавливание (scavenging) свободных радикалов, модуляцию активности ферментов путем хелатирования металлов и ингибирования окисления липидов (Selvi, Chinnaswamy, 2007).

Скавенджинг, или способность к поглощению свободных радикалов является одним из механизмов ингибирования окисления липидов и обычно используется для оценки антиоксидантной активности. Полифенолы относятся к сложной группе соединений, содержащих в своей структуре ароматическое кольцо с одной или более гидроксильной группой. Среди них есть как простые фенолы, такие как фенольные кислоты и их производные, так и сложные структуры - флавоны, флавоноиды или антоцианы (Radzki et al., 2014).

В публикациях I.C.F.R. Ferreira с соавторами (2009) и S.A. Heleno с соавторами (2015), посвященных обобщению сведений по антиоксидантной активности дикорастущих грибов, приведены данные о наличии различных фенольных соединений (табл.1).

Таблица 1. Фенольные соединения, обнаруженные в плодовых телах дикорастущих макромицетов (цит. по Ferreira et al., 2009, Heleno et al., 2015)

Фенольное соединение	Вид гриба
Бензойная кислота	<i>Agaricus blazei</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Phellinus linteus</i>
<i>p</i> -гидроксibenзойная кислота	<i>Agaricus arvensis</i> , <i>Agaricus silvicola</i> , <i>Agaricus romagnesii</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> , <i>Lepista nuda</i> , <i>Lycoperdon molle</i> , <i>Sarcodon imbricatus</i> , <i>Ramaria botrytis</i> , <i>Tricholoma acerbum</i> , <i>Sparassis crispa</i> , <i>Phellinus linteus</i> ,

	<i>Inonotus obliquus, Ganoderma lucidum, Coprinopsis atramentaria, Lactarius bertillonii, Lactarius vellereus, Rhodotus palmatus, Xerocomus chrysenteron, Morchella esculenta</i>
Протокатехиновая кислота	<i>Agaricus bisporus (white), Agaricus bisporus (brown), Lentinus edodes, Termitomyces heimii, Termitomyces mummiformis, Boletus edulis, Lactarius deliciosus, Pleurotus sajor-caju, Hydnum repandum, Lentinus squarrulosus, Sparassis crispa, Morchella conica, Russula brevipes, Lactarius sangifluus, Macrolepiota procera, Cantherallus clavatus, Auricularia polytricha, Pleurotus djamor, Lentinus sajor-caju, Termitomyces tylerance, Morchella anguiticeps, Termitomyces microcarpus, Helvella crispa, Termitomyces shimperi Lepista nuda, Ramaria botrytis, Pleurotus ostreatus, Agaricus bisporus, Flammulina velutipes, Pleurotus eryngii, Lentinus edodes, Agaricus blazei, Sparassis crispa, Phellinus linteus, Ganoderma lucidum, Inonotus obliquus, Lactarius bertillonii, Lactarius vellereus, Rhodotus palmatus, Xerocomus chrysenteron, Morchella esculenta</i>
Галловая кислота	<i>Termitomyces heimii, Termitomyces mummiformis, Lactarius deliciosus, Pleurotus sajor-caju, Hydnum</i>

	<p><i>repandum, Lentinus squarulosus, Sparassis crispa, Morchella conica, Russula brevipes, Geastrum arinarius, Cantharellus cibarius, Lactarius sangifluus, Macrolepiota procera, Cantharellus clavatus, Auricularia polytricha, Pleurotus djamor, Lentinus sajor- caju, Termitomyces tylerance, Morchella anguiticeps, Termitomyces microcarpus, Helvella crispa, Termitomyces shimperi, Pleurotus ostreatus, Agaricus bisporus, Flammulina velutipes, Pleurotus eryngii, Lentinus edodes, Agaricus blazei, Sparassis crispa, Phellinus linteus, Ganoderma lucidum, Inonotus obliquus</i></p>
Гентиизиновая кислота	<p><i>Termitomyces heimii, Termitomyces mummiformis, Lactarius deliciosus, Pleurotus sajor-caju, Hydnum repandum, Lentinus squarulosus, Sparassis crispa, Morchella conica, Russula brevipes, Lactarius sangifluus, Macrolepiota procera, Cantharellus clavatus, Auricularia polytricha, Pleurotus djamor, Termitomyces tylerance, Morchella anguiticeps, Termitomyces microcarpus, Helvella crispa, Termitomyces shimperi, Agaricus blazei</i></p>
Гомогентиизиновая кислота	<p><i>Pleurotus ostreatus, Flammulina velutipes, Inonotus obliquus</i></p>
Ванилиновая кислота	<p><i>Termitomyces heimii, Pleurotus sajor-caju, Hydnum repandum,</i></p>

	<i>Lentinus squarrulosus, Morchella conica, Russula brevepis, Lactarius sangifluus, Macrolepiota procera, Cantharellus clavatus, Auricularia polytricha, Pleurotus djamor, Lentinus sajor- caju, Termitomyces microcarpus, Helvella crispa, Termitomyces shimperi Lycoperdon molle, Tricholoma acerbum</i>
5-сульфосалициловая кислота	<i>Flammulina velutipes, Sparassis crispa, Phellinus linteus, Ganoderma lucidum</i>
Сиринговая кислота	<i>Termitomyces mummiformis, Hydnum repandum, Morchella conica, Russula brevepis, Lactarius sangifluus, Macrolepiota procera, Cantharellus clavatus, Pleurotus djamor, Lentinus sajor- caju, Termitomyces tylerance, Morchella anguiticeps, Termitomyces microcarpus, Agaricus blazei, Sparassis crispa</i>
Вератровая кислота	<i>Sparassis crispa</i>
Ванилин	<i>Inonotus obliquus</i>
Коричная кислота	<i>Agaricus bisporus (white), Agaricus bisporus (brown), Lentinus edodes Termitomyces heimii, Termitomyces mummiformis, Pleurotus sajor-caju, Hydnum repandum, Lentinus squarrulosus, Sparassis crispa, Lactarius sangifluus, Cantharellus clavatus, Pleurotus djamor, Termitomyces shimperi, Agaricus arvensis, Agaricus bisporus, Agaricus silvicola, Agaricus</i>

	<p><i>romagnesii, Cantharellus cibarius, Lycoperdon perlatum, Macrolepiota procera</i> <i>Agaricus blazei, Ganoderma lucidum, Coprinopsis atramentaria, Lactarius bertillonii, Lactarius vellereus, Rhodotus palmatus, Xerocomus chrysenteron</i></p>
<p><i>p</i>-Кумаровая кислота</p>	<p><i>Cantharellus cibarius, Termitomyces heimii, Boletus edulis, Sparassis crispa, Geastrum arinarius, Cantharellus cibarius, Lactarius sangifluus, Macrolepiota procera, Pleurotus djamor, Lentinus sajor-caju, Fistulina hepatica</i> <i>Agaricus arvensis, Agaricus silvicola, Lepista nuda, Sparassis crispa, Ganoderma lucidum, Coprinopsis atramentaria, Lactarius bertillonii, Lactarius vellereus, Rhodotus palmatus, Xerocomus chrysenteron, Morchella esculenta</i></p>
<p><i>o</i>-Кумаровая кислота</p>	<p><i>Inonotus obliquus</i></p>
<p>Кофейная кислота</p>	<p><i>Sparassis crispa, Cantharellus cibarius, Termitomyces heimii, Boletus edulis, Lentinus squarrulosus, Morchella conica, Russula brevipes, Cantharellus cibarius, Lactarius sangifluus, Macrolepiota procera, Cantharellus clavatus, Pleurotus djamor, Lentinus sajor-caju, Termitomyces tylerance, Morchella anguiticeps, Termitomyces microcarpus, Termitomyces shimperi, Fistulina hepatica, Flammulina velutipes, Sparassis crispa, Phellinus</i></p>

	<i>linteus</i>
Феруловая кислота	<i>Termitomyces heimii, Lactarius deliciosus, Pleurotus sajor-caju, Lentinus squarrulosus, Sparassis crispa, Morchella conica, Cantharellus cibarius, Lactarius sangifluus, Macrolepiota procera, Cantharellus clavatus, Pleurotus djamor, Termitomyces microcarpus, Termitomyces shimperi, Flammulina velutipes, Inonotus obliquus</i>
Хлорогеновые кислоты	<i>Cantharellus cibarius, Pleurotus ostreatus, Flammulina velutipes, Phellinus linteus</i>
Кверцетин	<i>Suillus luteus, Suillus granulatus, Flammulina velutipes, Agaricus blazei, Sparassis crispa, Ganoderma lucidum, Inonotus obliquus</i>
Рутин	<i>Cantharellus cibarius, Pleurotus ostreatus</i>
Кемпферол	<i>Sparassis crispa, Ganoderma lucidum, Inonotus obliquus</i>
Мирицетин	<i>Pleurotus ostreatus, Agaricus bisporus, Agaricus blazei, Ganoderma lucidum</i>

Хризин	<i>Pleurotus ostreatus</i>
Катехин	<i>Lentinus edodes, Agaricus blazei, Ganoderma lucidum</i>
Гесперидин	<i>Ganoderma lucidum</i>
Нарингенин	<i>Sparassis crispa</i>
Нарингин	<i>Pleurotus ostreatus, Agaricus bisporus, Pleurotus eryngii, Ganoderma lucidum, Inonotus obliquus</i>
Формометин	<i>Ganoderma lucidum</i>
Биоханин	<i>Ganoderma lucidum</i>
Пирогалол	<i>Agaricus bisporus, Flammulina velutipes, Agaricus blazei, Sparassis crispa, Ganoderma lucidum, Phellinus linteus</i>
Ресвератрол	<i>Sparassis crispa, Inonotus obliquus</i>
Эллаговая кислота	<i>Fistulina hepatica</i>
Танниновая кислота	<i>Termitomyces heimii, Termitomyces mummiformis, Boletus edulis, Lactarius deliciosus, Pleurotus sajor-caju, Hydnum repandum, Lentinus squarrulosus, Morchella conica, Russula brevipes, Geastrum arinarius, Cantharellus cibarius, Lactarius sangifluus, Macrolepiota procera, Cantharellus clavatus, Auricularia polytricha, Pleurotus djamor, Termitomyces tylerance, Morchella anguiticeps, Termitomyces microcarpus, Helvella crispa, Termitomyces shimperi</i>

Авторы также подчеркивают, что главными метаболитами с антиоксидантной активностью, являются именно фенольные соединения

(фенольные кислоты и флавоноиды). За ними следуют токоферолы, аскорбиновая кислота и каротиноиды.

S.A. Heleno et al. (2015a) сообщают, что среди трех исследованных съедобных видов – *B. edulis*, *X. badius* (= *Boletus badius*) и *Lentinus edodes*, именно у *B. edulis* был самый высокий уровень соединений фенольной природы – до $1,89 \pm 0,02$ (мг/100 г сухого веса), при этом соответственно он проявлял самый высокий уровень АОА, определенный DPPH- методом. В то же время *X. badius* проявлял наивысшую активность в ингибировании перекисного окисления липидов благодаря высокому содержанию токоферолов.

Проведенные исследования водноспиртовых экстрактов *Suillus luteus* и *Coprinopsis atramentaria* показали синергетический эффект их АОА в случаях использования данных видов в качестве пищевых добавок к матриксу из деревенского творога (cottage cheese). При этом применяли микроинкапсуляцию методом распылительной сушки с мальтодекстрином. Данный метод позволяет не только повысить суммарную антиоксидантную активность, но и сохранять ее в течение длительного времени (Ribeiro et al., 2015). J.A.Vaz с соавторами исследовали антиоксидантные свойства этанольных и водных экстрактов *Armillaria mellea*, *Calocybe gambosa*, *Clitocybe odora* и *Coprinus comatus* (Vaz et al., 2011). Было показано, что значения EC_{50} для DPPH находились в диапазоне $2,56 \div 34,60$ мг/мл, а уровень АОА снижался в последовательности от *Coprinus comatus* > *Clitocybe odora* > *Armillaria mellea* > *Calocybe gambosa*.

При исследовании АОА этанольных экстрактов 6 дикорастущих ценных съедобных и лекарственных видов – *Boletus edulis* Bull., *B. badius* (Fr.) Kühn., *Suillus luteus* (L.) Roussel., *Armillariella mellea* (Vahl.) P.Karst., *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill и *Piptoporus betulinus* (Bull.) P.Karst., собранных в Киевской и Житомирской областях в 2013-2014 гг., было показано, что снижение уровня антиоксидантной активности наблюдается в следующей последовательности: *B. edulis* → *S. luteus* → *B. badius* → *A. mellea* → *L. sulphureus* → *P. betulinus* (Сырчин, Гродзинская, 2015) (табл. 2)

Таблица 2. Антиоксидантная активность дикорастущих съедобных и лекарственных макромицетов

Вид гриба	Антиоксидантная активность, %	EC_{50} (мг/мл)*
-----------	-------------------------------	--------------------

<i>Boletus edulis</i>	30,61±0,62	20,26±1,13
<i>Suillus luteus</i>	27,89±0,57	23,21±0,56
<i>Boletus badius</i>	21,92±0,55	24,71±0,74
<i>Armillariella mellea</i>	14,96±0,42	34,99±0,53
<i>Laetiporus sulphureus</i>	12,08±0,60	42,20±0,80
<i>Piptoporus betulinus</i>	11,19±0,73	48,04±0,75

*Величина EC_{50} соответствует концентрации антиоксиданта, необходимой для снижения общего количества ДФПГ-свободных радикалов на 50%.

Таким образом, этанольные экстракты болетальных видов (*B.edulis*, *S.luteus* и *B.badius*), известных ценных съедобных грибов, обладали максимальными (среди исследованных образцов) уровнями АОА, что свидетельствует о их дополнительной питательной ценности в качестве пищевой добавки к рациону здорового питания. Полученные данные хорошо согласуются с данными, приведенными в публикации А. Keleş с соавт., согласно которых, болетальные виды *B. edulis*, *B. erythropus* var. *erythropus*, *Suillus luteus* (кроме *Leccinum scabrum*) проявляли максимальную скавенджинговую активность среди 24 исследованных дикорастущих съедобных грибов (Keleş et al., 2011). Лигнотрофы *A. mellea*, *L. sulphureus* и *P. betulinus* проявляли более низкую антиоксидантную активность. Полученные данные об АОА исследованных видов также хорошо согласуются с данными по АОА более двадцати дикорастущих, широко распространенных в Польше макромицетов (Nowacka et al., 2014).

Следует отметить, что использование именно этанольных экстрактов рекомендовано рядом авторов. В частности, V. Vieira с соавторами сообщают о достаточно высокой способности к экстракции фенольных соединений этим растворителем (Vieira et al., 2012). В публикации D. Stojković с соавторами было показано, что этанольные экстракты таких видов как *Agaricus bisporus* и *A. brasiliensis* имели более высокие показатели АОА, определенные по методу ДФПГ- радикала, чем метанольные (Stojković, 2014). По литературным данным, лекарственные виды *L. sulphureus* и *Hypsizygus marmoreus* демонстрировали более высокие уровни

АОА при этанольном экстрагировании, чем при использовании других растворителей (Oh, Lee, 2007; Lung, Huang, 2013).

А. Turkoglu с соавт. (2007) исследовали этанольные экстракты в образцах дикорастущего *L. sulphureus* и провели сравнительный анализ АОА гриба с такими известными антиоксидантами, как бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ) и альфа-токоферол. Было показано, что в концентрациях 800 мкг/мл АОА этанольных экстрактов *L. sulphureus* была близка к значениям вышеуказанных синтетических коммерческих антиоксидантов (рис.7). Метод определения АОА по окислению линолевой кислоты показал, что этанольный экстракт (в количестве 320 мкг) имеет значение ингибирования, эквивалентное 40 мкг альфа-токоферола (рис. 8). Авторы делают вывод о том, что АОА этанольных экстрактов зависит от концентрации фенольных веществ.

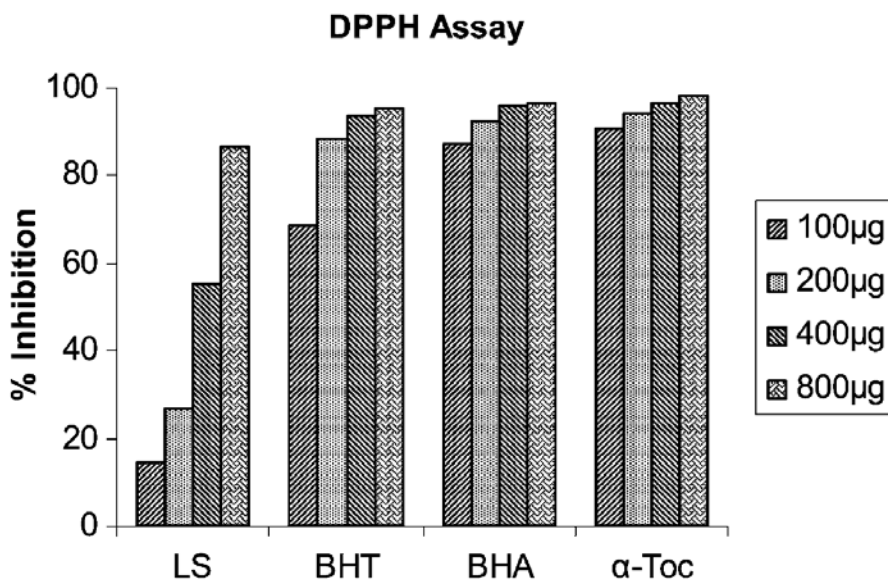


Рис.7. Антиоксидантная активность этанольных экстрактов *Laetiporus sulphureus* (LS) и синтетических антиоксидантов относительно свободных радикалов DPPH (Turkoglu et al., 2007).

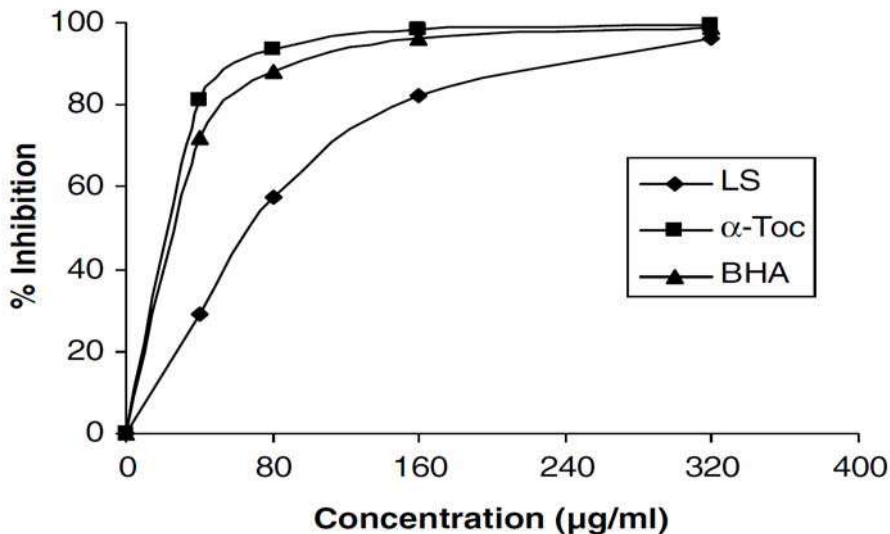


Рис.8. Общая антиоксидантная активность ВНА, α -токоферола и различных концентраций этанольных экстрактов *Laetiporus sulphureus* в эмульсии линолевой кислоты (Turkoglu et al., 2007).

Н.-J. Li с соавт. (2015) в результате исследования метанольных (ME), этанольных (EE) и водных экстрактов (WE) дикорастущего *Agaricus bisporus* показали, что наибольшую эффективность АОА относительно DPPH радикала демонстрировали метанольные экстракты (ME), в то время как скавенжинговая активность относительно $\bullet\text{OH}$ - радикала была у этанольных экстрактов (EE). Авторы указывают на снижение АОА экстрактов в DPPH тесте в следующем порядке ME > ВНА > EE > WE. Также при измерении АОА экстрактов относительно OH радикала была отмечена другая зависимость EE (2.90 ± 0.08 мг/мл) > WE (4.26 ± 0.06 мг/мл) > ME (6.10 ± 0.01 мг/мл). Показано, что различные типы экстрактов из этого гриба проявляли высокие уровни АОА сравнимые с эталонным ВНА (Li et al., 2015).

Е. Alvarez-Parilla с соавторами, в частности, провели сравнительные исследования АОА дикорастущих и культивируемых макромицетов и показали наличие линейной корреляции между содержанием фенольных веществ и уровнем АОА. Авторы установили, что дикорастущий *Agaricus* sp. обладал более высоким содержанием фенольных веществ и соответственно его спиртовые экстракты проявляли более высокие уровни

АОА, чем два коммерческих штамма *A. bisporus* (белый и Portabella) (рис.9). По их мнению, полифенолы являются главным компонентом, ответственным за уровень АОА, однако спектр фенолов является в данном случае определяющим.

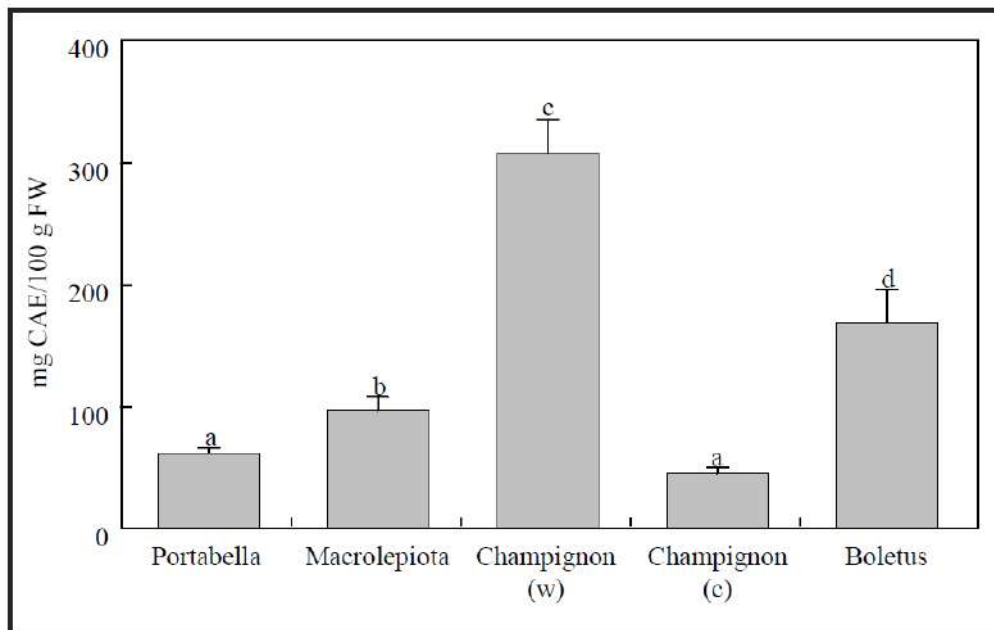


Рис.9. Содержание фенольных веществ (выраженное как эквивалент кофеиновой кислоты, мг /100 г сырого веса) в 80% метанольных экстрактах дикорастущих (w – wild) и культивируемых грибов (c – commercial) (Alvarez-Parilla et al., 2007).

При исследовании двух органических экстрактов дикорастущей вешенки обыкновенной *P. ostreatus* (из двух местообитаний Лагоса, Нигерия) было показано, что, с одной стороны, они проявляли широкий спектр антимикробной и антифунгальной активности, а с другой -высокую антиоксидантную активность, связанную с общим содержанием фенольных веществ (Iwalokun et al., 2007).

М. Kosanić с соавторами (2012) при изучении ацетоновых и метанольных экстрактов трех представителей порядка Boletales показали, что ацетоновые экстракты демонстрируют более высокую АОА, определенную по DPPH-радикалу. При этом у *B. edulis* была максимальная активность -

$EC_{50} = 4,72$ мкг/мл, у *B. aestivalis* – 8,63 и у *Leccinum carpini* – 67,89 мкг/мл. В то же время, опыты с метанольными экстрактами показали обратную зависимость АОА у исследованных грибов, так, соответственно для вышеприведенных грибов $EC_{50} = 212,47$ (*B. edulis*), 187,73 (*B. aestivalis*) и 202,47 (*L. carpini*). Наблюдалась положительная корреляция между уровнем АОА и концентрацией фенольных соединений (по пирокатехолу) и флавоноидных соединений (по рутину) (Kosanić et al., 2012).

М.У. Lung с соавторами сообщает, что АОА *L. sulphureus*, главным образом, зависит от концентрации фенольных соединений и флавоноидов в мицелии (Lung et al., 2013). В той же время, фенольные вещества являются вторичными метаболитами, а их количество определяется, главным образом, условиями роста. Авторы сообщают о существенных вариациях как в качественном, так и в количественном составе веществ - антиоксидантов фенольной природы в зависимости от мест сбора, условий произрастания и возраста плодовых тел (Ferreira et al., 2009; Khatua et al., 2013).

Анализ литературных и полученных нами данных свидетельствует о том, что дикорастущие макромицеты обладают более высоким уровнем АОА, чем культивируемые (Yamanaka et al., 2014, Сирчін, Гродзинська, 2015). Очевидно, можно предположить, что дикорастущим макромицетам доступен более широкий спектр веществ фенольной природы в почвах и древесных субстратах, чем культивируемым, которые при выращивании лимитированы определенным составом предварительно подготовленных питательных сред.

Мировой рынок антиоксидантов указывает на стабильные тенденции к стремительному росту: ожидается его увеличение более, чем вдвое - с \$ 103,6 млн в 2011 году до \$ 246,1 млн в 2018 году (Kozarski et al., 2015). Рынок антиоксидантов по типу продукции сегментирован на синтетические и природные антиоксиданты. Синтетические фенольные антиоксиданты включают бутилированный гидроксанизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ) и другие, например, пропилгаллат, трет-бутилгидрохинон (ТВНҚ), этоксиквин (EQ), которые способны эффективно ингибировать окислительные процессы. Тем не менее, при определенных условиях некоторые синтетические антиоксиданты могут вызывать неблагоприятные токсические эффекты (Yu et al., 1997; Ferreira et al., 2009). ВНА, который очень часто используется в качестве добавки в

пищевой промышленности, в зависимости от дозы может оказывать негативное воздействие путем up-регуляции активности митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК), таким образом, вызывая канцерогенный эффект (Yu et al., 1997; Liu et al., 2013). Использование синтетических антиоксидантов жестко регламентировано в США и в Европейском Союзе (Lundebye et al., 2010). Ограничения на использование синтетических антиоксидантов, таких как ВНА и ВНТ, естественно, вызвало бурный интерес к исследованию и использованию природных антиоксидантов. Как природные антиоксидантные пищевые добавки часто используются токоферолы (витамин Е), аскорбиновая кислота (витамин С), каротиноиды и флавоноиды. Поскольку эти антиоксиданты являются, по сути, пищевыми добавками экзогенного характера, их уровни можно легко контролировать путем модификации.

Природные антиоксиданты по типу происхождения делятся на растительные и грибные экстракты, специи (розмарин, тимьян, майоран, орегано, шалфей, базилик, перец, гвоздика, корица, и мускатный орех), флавоноиды, убихинол (полностью восстановленной формы кофермента Q₁₀), глутатион, цинк (Zn), селен (Se), витамин А (в том числе каротиноиды), витамины С и Е (в том числе и токотриенолы токоферолы) (Brewer, 2011). В последние годы съедобные дикорастущие и культивируемые грибы, как чрезвычайно важный продуцент природных антиоксидантных веществ и потенциальный объект для биотехнологических разработок, привлекают к себе внимание как важнейший источник природных антиоксидантов (Ferreira et al., 2009; Khatua et al., 2013; Smith et al., 2015).

В дополнение к изысканному вкусу и питательной ценности грибы обладают сбалансированным химическим составом с высоким содержанием белков, низким уровнем липидов с преобладанием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), высоким содержанием витаминов (В₁, В₂, В₁₂, С, D, и Е), что делает их уникальным компонентом низкокалорийных диет (Chang, 2003; Finkel, Holbrook, 2000; Chang, Wasser, 2012). Кроме того, грибы имеют низкий гликемический индекс, и высокое содержание маннита, что позволяет их использовать в рационе больных диабетом. Ортомолекулярная медицина рекомендует использовать грибы в рационе больных гипертонической болезнью, поскольку содержание

натрия в мицелии достаточно низкое при высоком содержании калия и фосфора (Guillamon et al., 2010).

В последние годы большое внимание уделяется грибным полисахаридам, которые также имеют выраженное антиоксидантное действие. Было показано, что неочищенная фракция полисахаридов имеет более высокий уровень антиоксидантной активности, чем очищенная (Klaus et al., 2013).

К настоящему времени накоплено значительное количество фактического материала, которое свидетельствует об антиоксидантной активности макромицетов. Шляпочные грибы являются неисчерпаемым источником биологически активных веществ с фармакологическим действием широкого спектра, в том числе антиоксидантов, что делает их важными в здоровом питании (health food).

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что макромицеты, как источник нового поколения природных антиоксидантов, являются уникальным перспективным объектом современных биотехнологий.

В то же время, «классики» антиоксидантных исследований John Gutteridge и Barry Halliwell (2010) утверждают, что сверхвысокие дозы антиоксидантов в пищевых продуктах могут оказывать отрицательное воздействие на организм. Поэтому такие сбалансированные по питательной ценности, антиоксидантной активности и лекарственным свойствам природные продукты как съедобные грибы, являются незаменимыми в рационе человека.

Литература

Вассер С.П. Лекарственные шляпочные грибы: история, современное состояние, тенденции и нерешенные проблемы в их изучении. В кн: Макромицеты: лекарственные свойства и биологические особенности. – К., 2012. – С. 5-45.

Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода // М.: Книжный дом Университет, 2007 140 С. ISBN: 978-5-98227-252-2

Прадедова Е.В., Ишеева О.Д., Салаев Р.К. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений// Физиология растений, 2011, том 58, № 2, С. 177-185.

Сырчин С.А. Антиоксидантная активность макромицетов. В кн: *Макромицеты: лекарственные свойства и биологические особенности.* – К., 2012. – С. 140-149.

Сирчін С.О., Гродзинська Г.А. Оцінка антиоксидантної активності деяких дикорослих макромицетів // *Український ботанічний журнал.* - 2015. - Т. 72, № 3. - С. 257-260.

Янковский О. Ю. Токсичность кислорода и биологические системы Игла – СПб., 2000. – 294 с.

Alvarez-Parrilla, E.; de la Rosa, L. A.; Martínez, N. R.; González Aguilar, G. A. Total Phenols and Antioxidant Activity of Commercial and Wild Mushrooms from Chihuahua, Mexico// *Cienc. Tecnol. Aliment.* - 2007. - 5(5) . - P.329-334

Asatiani M.D., Elisashvili V., Songulashvil G., Reznick A.Z., Wasser S.P. Higher basidiomycetes mushrooms as a source of antioxidants. In: *Progress in Mycology.* (Ed. Mahendra Rai, George Kövics), Springer, 2010. – P.311-326.

Bhattacharya S. Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System.// In:*Free Radicals in Human Health and Disease* (V. Rani, U.C.S.Yadav Eds) Springer 2015 P. 17-30.

Brewer M.S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2011.– V. 10, Issue 4, P. 221-247

Chang, S.T.; Buswell, J.A. Medicinal mushrooms—A prominent source of nutraceuticals for the 21st century. *Curr. Top. Nutr. Res.* 2003, 1, P.257-280.

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.* 2012.–V.14.–№2 P.95-134.

Ferreira I.C.F.R., Barros L., Abreu R.M.V. Antioxidant in wild mushrooms//*Current Medical Chemistry.* – 2009. -16, 12. – P.1543-1560.

Finkel T., Holbrook N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing // *Nature.*– 2000.– V.408.– P.239-247.

Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species // *Cell Biol.*– 2011.– V. 194.– №1 P.7-15.

Guillamon E., Garcia-Lafuente A., Lozano M., D'Arrigo, M., Rostagno M.A., Villares A., Martinez J.A. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases//*Fitoterapia* 2010, V.81.– №7 P.715-723

- Gutteridge J.M.C., Halliwell B.** Antioxidants: Molecules, medicines, and myths//Biochemical and Biophysical Research Communications.– 2010.– V.393.–Nº4.– P. 561–564
- Halliwell B.** Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health?//Cardiovascular Research 2007.– V. 73 P.341–347
- Heleno S.A., Ferreira R.C., Antonio A.L., Queroz M.-J.R.P., Barros L., Ferreira I.C.F.R.** Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland// Food Boiscence. – 2015a. –V. 11.– P.48-55.
- Heleno S.A., Martins A. , Queiroz M-J.R.P. , Ferreira I.C.F.R.** Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review//Food Chemistry 2015b. – V.173. –P. 501–513.
- Iwalokun B.A., Usen U.A., Otunba A.A., Olukoya D.K.** Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*// African Journal of Biotechnology. – 2007. – V.6, 15. – P.1732-1739.
- Kalač P.** A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushroom// J. Sci Food Agric. – 2013. – V.93. – P.209-218.
- Keleş A., Koca I., Gençcelep H.** Antioxidant Properties of Wild Edible Mushrooms // J. Food Process Technol.– 2011.– V.2, Nº6.– 6 p.
- Khatua S., Paul S., Acharya K.** Mushroom as the potential source of new generation of antioxidant: A review// Research Journal of Pharmacy and Technology. – 2013. – 6, 5. - P. 496-505.
- Klaus A., Kozarski M, Niksic M, Jakovljevic D, Todorovic N, Stefanoska I, Van Griensven LJ.** The edible mushroom *Laetiporus sulphureus* as potential source of natural antioxidants//Int. J. Food Sci. Nutr.- 2013.- 64, 5. – P. 599-610.
- Kosanić M., Rancović B., Dašić M.** Mushrooms as Possible Antioxidant and Antimicrobial Agents//Iranian Journal of Pharmaceutical Research. -2012. – 11, 4. – P.1095-1102
- Lewin G., Popov J.** The antioxidant system of the organism. Theoretical basis and practical consequences// medical Hypotheses. – 1994. – 42. – P. 269-275.
- Li H-J., Chen H-Y., Fan L-L., Jiao Zh-H., Chen Q-H., Jiao Y-Ch.** In Vitro Antioxidant Activities and in Vivo Anti-Hypoxic Activity of the Edible

- Mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. Chaidam// *Molecules* 2015, 20, P.17775-17788
- Liu J., Jia L., Kan J., Jin C-H.** *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*)// *Food Chem Toxicol.* – 2013. – 51. – P.310-316.
- Liu J., Hu L., Dong Z-J., Hu Q.** DPPH Radical Scavenging Activity of Ten Natural p-Terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous in China//*Chemistry & Biodiversity.* – 2004. – 1. – P. 602-605.
- Lundebye A.K., Hove H., Måge A., Bohne V.J., Hamre K.** Levels of synthetic antioxidants (ethoxyquin, butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole) in fish feed and commercially farmed fish // *Food Additives & Contaminants: Part A. Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment.*– 2010.– V.27 №12 P.1652-1657
- Lung M.Y., Huang W.Z.** Antioxidant potential and antioxidant compounds of extracts from the medicinal sulphur polypore, *Laetiporus sulphureus* (Higher Basidiomycetes) in submerged cultures // *Int. Journ. Med. Mushrooms.* – 2013. – V.15, №6. – P.569-582.
- Mailloux R. J.** Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species// *Redox Biology* (2015) 4 P.381–398
- Mani S.** Production of Reactive Oxygen Species and Its Implication in Human Diseases./ In:Free Radicals in Human Health and Disease (V. Rani, U.C.S.Yadav Ed) Springer 2015 P. 3-9.
- Mau J.L., Lin H.C., Chen C.C.** Antioxidant properties of several medicinal mushrooms// *J. Agr. Food Chem.* – 2002. – V.50, №21. – P. 6072-6077.
- Metler P., Loft S.** The Role of Antioxidants in the Prevention of Oxidative Damage to Nucleic Acids/ In: *Oxidative Damage To Nucleic Acids* 2007 (Evans M.D., Cooke M.S. Ed.) Springer P.207-220
- Muller, F.L., Liu, Y., and Van Remmen, H.** Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 2004 279, P.49064–49073.
- Nowacka N., Nowak R., Drozd M., Olech M., Los R., Malm A.** Analysis of phenolic constituents, antiradical and antimicrobial activity of edible mushrooms growing wild in Poland// *LWT- Food Science and Technology.* – 2014. – 59. – P.689-694.

- Oh S-I., Lee M-S.** Antioxidative stress and antimutagenic effects of *Lentinus edodes* ethanol extracts// Korean J. Food & Nutr. 2007. V. 20 №4 P.341-348
- Oxidative Stress And Antioxidants: Their Role In Human Disease/** R. Rodrigo Ed.– Nova Biomedical Books.– 2009.– 358 p.
- Radzki W, Sławińska A, Jabłońska-Ryś E, Gustaw W.** Antioxidant capacity and polyphenolic content of dried wild edible mushrooms from Poland // Int. J. Med. Mushrooms. – 2014.-16,1. – P. 65-75.
- Ribeiro A., Ruphuy G., Lopes J.C., Dias M.M., Barros L., Barreiro F., Ferreira I.C.F.R.** Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients// Food Chemistry. – 2015. - 188. – P.612-618.
- Schapira A.H.V.** Mitochondrial disease// The Lancet.– 2006.– V.368.– № 9529, P.70–82
- Selvi S., Chinnaswamy P.** *In vitro* Antioxidant and antilipidperoxidative potential of *Pleurotus florida* //Anc. Sci. Life.– 2007.– V. 26, №4. – P. 11-17.
- Sena L. A. and Navdeep S. Chandel** Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species //Molecular Cell 48, 2012 P.158-167
- Shimada K., Fujikawa K., Yahara K., Nakamura T.** Antioxidative properties of xanthone on the autooxidation of soybean in cyclodextrin emulsion// J. Agr. Food Chem.- 1992.- 40. – P.945-948.
- Sies H.** Strategies of antioxidant defense//Eur J Biochem. 1993 Jul 15;215(2):213-219.
- Sies H.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants.Exp Physiol. 1997 82(2):291-295.
- Smith H., Doyle S., Murphy R.** Filamentous fungi as a source of natural antioxidants//Food Chemistry 2015 V.185 P.389–397
- Stadtman, E. R.** Role of oxidant species in aging. //Curr. Med. Chem., 2004 11, 1105–1112.
- Stojković D, Reis F.S, Glamočlija J., Ćirić A., Barros L., Van Griensven L.J, Ferreira I.C., Soković M.** Cultivated strains of *Agaricus bisporus* and *A. brasiliensis*: chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties for the final healthy product--natural preservatives in yoghurt// Food &Function.- 2014. – 5, 7 - P.1602-1612.
- Turkoglu A., Duru M.E., Mercan N., Kivrak I., Gezer K.** Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.)Murrill//Food Chemistry. – 2007. – 101. – P.267-273.

Valko M., Jomova K., Rhodes Ch.J., Kuča K., Mušilek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease//Archives of Toxicology. – 2015. – P. 1-37.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease // Int J Biochem Cell Biol 2007 V 39, Issue 1, P. 44–84.

Vaz, J. A., Tavares C., Almeida G. M., Martins A., Vasconcelos M. H.,Ferreira I.C.F.R. Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions// Food Chemistry 2011 V. 126, Issue 2, P. 610–616

Vieira V., Marques A., Barros L., Barreira J. C. M., Ferreira I.C.F.R. Insights in the antioxidant synergistic effects of combined edible mushrooms: phenolic and polysaccharidic extracts of *Boletus edulis* and *Marasmius oreades*//J. Food and Nutr. Res. – 2012. - 51, 2. – P. 109–116.

S.C. Zapico, D.H. Ubelaker mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences//Aging and Disease 2013, Vol. 4 Issue (6): P.364-380

USDA (United States Department of Agriculture) Last Modified: 1/22/2016
<http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=15866>

Yu R., Jiao J.J., Duh J.L., Gudehithlu K., Tan T.H., Kong A.N. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression// Carcinogenesis. 1997 .– V.18.– №2 P.451-456.

СИРЧІН С.О.

АНТИОКСИДАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ ВИЩИХ ГРИБІВ

В огляді висвітлено сучасний рівень знань про антиоксиданти шапинкових грибів, наведені відомості про біологічно активні речовини, що забезпечують високий рівень антиоксидантної активності в плодових тілах дикорослих і культивованих видів. Показано, що макроміцети є невичерпним джерелом антиоксидантів, що свідчить про їх додаткової цінності в раціоні здорового харчування. Лікарські і їстівні види макроміцетов є невичерпним джерелом нового покоління природних

антиоксидантів і унікальним перспективним об'єктом біотехнологічних розробок.

SYRCHIN S.O.

ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF HIGHER FUNGI

The review describes the current level of knowledge about antioxidants of wild and cultivated pileate mushrooms, contains information about the active compounds that provide a high level of antioxidant activity in the fruiting bodies of wild and cultivated species. It is shown that macromycetes are an unlimited source of antioxidants, which indicates their added value in the diet of healthy eating. Medicinal and edible species macromycetes are an unlimited source of a new generation of natural antioxidants and a unique perspective object of biotechnology.

M.O. FOMINA

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of National Academy of Sciences of Ukraine

EFFECT OF MYCOBIONT ZINC-TOLERANCE AND PHOSPHORUS AVAILABILITY ON ZINC PHOSPHATE SOLUBILIZATION AND ZINC AND PHOSPHORUS ACCUMULATION BY *PAXILLUS INVOLUTUS* /PINE ECTOMYCORRHIZAL ASSOCIATIONS

The mechanisms by which fungi and plants obtain phosphate in the mycorrhizosphere are of interest since solubilization of inorganic phosphates can result in release of associated metals. We hypothesized that any ectomycorrhizal protection of host plants against toxic metals mobilized from minerals could depend on fungal metal-tolerance and phosphorus status in the matrix.

*Our results showed that both non-mycorrhizal Scots pines (*Pinus sylvestris*) and pines infected with ectomycorrhizal fungi *Paxillus involutus* were able to enhance zinc phosphate dissolution, tolerate metal toxicity and acquire mobilized phosphorus, increasing phosphorus amount in shoots when zinc phosphate was present in matrix. However zinc phosphate solubilization, and uptake of mobilized zinc and phosphorus by non-mycorrhizal pines and ectomycorrhizal symbiotic associations *P. sylvestris*/*P. involutus* were conditional being dependant on (i) ectomycorrhizal infection; (ii) zinc-tolerance of mycobiont; and (iii) phosphorus status of mesocosm.*

*In the presence of a phosphorus source, ectomycorrhiza infected with zinc-tolerant *P. involutus* 23 accumulated much less zinc than the non-mycorrhizal plants and, in general, provided the best protection against zinc toxicity to host plant employing metal-avoidance strategy. Ectomycorrhizal infection caused changes in the proportions of chemical fractions of accumulated zinc, decreasing the ratio of the most bioavailable zinc (water-soluble and salt-extractable) in the root biomass compared to non-mycorrhizal seedlings. However the speciation of zinc within root biomass was very similar in both ectomycorrhizal and non-mycorrhizal seedlings showing octahedral coordination of zinc by oxygen-containing ligands fitting carboxylate coordination and, in part, phosphate coordination.*

*In contrast to high-P mesocosms, under the low-phosphorus conditions a mycorrhizal seedlings infected with zinc-tolerant *P. involutus* 23 considerably increased total dissolution of zinc phosphate, zinc mobilization and accumulation by plant, and, particularly, metal accumulation in shoot, showing the highest values compared to non-mycorrhizal and *P. involutus* 15-ectomycorrhizal pines. Ectomycorrhizal infection with both zinc-tolerant and non-tolerant mycobionts*

maintained a high phosphorus concentration in mycorrhizal roots under both phosphorus-deplete and phosphorus-replete conditions.

Key words: ectomycorrhiza, *Paxillus involutus*, *Pinus sylvestris* (Scots pine), zinc, phosphorus, metal resistance, solubilization, metal speciation

Phosphorus is an essential element for plant and microbial nutrition and can only be assimilated as soluble phosphate species, however in the soil, a large proportion of the phosphorus pool is poorly soluble, meaning that the mechanisms by which fungi and plants obtain phosphate are of major importance (Lapeyrie *et al.*, 1991; Wallander *et al.*, 1997; Whitelaw, 2000). Mycorrhizal fungi are one of the most important ecological groups of soil microorganisms involved in the processes of mineral weathering and dissolution of insoluble metal compounds (Jongmans *et al.*, 1997; Lundstrom *et al.*, 2000). Numerous studies have concluded that an important role of mycorrhizal fungi is to improve plant phosphorus nutrition, emphasizing the phosphate-solubilizing ability of mycorrhizal fungi (Lapeyrie *et al.*, 1991; Wallander *et al.*, 1997). Plant roots and their associated free-living and symbiotic microbial populations significantly alter the physico-chemical characteristics of the rhizosphere by metabolic activities, resulting in a geochemical environment that can be very different from the bulk soil (Wenzel *et al.*, 1994; Olsson and Wallander, 1998; Whitelaw *et al.*, 1999). This will have significant consequences for the biogeochemical mobility of metals and associated elements in such an environment. In the processes of soil exploration and facilitating the mobilization of phosphorus from complex source by extramatricum mycelium the production of protons and organic anions can accelerate processes of chemical weathering (Smith and Read, 1997). The ability of ectomycorrhizal fungi (e.g., *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Laccaria laccata*, *Laccaria bicolor*, *Hebeloma cylindrosporum*, *H. crustuliniforme*, *Cenococcum geophilum*) to dissolve calcium-bearing minerals in pure culture and in mycorrhizal association has been well documented (Lapeyrie *et al.*, 1990; Lapeyrie *et al.* 1991; Ghariieb and Gadd, 1999; Callot *et al.*, 1985). Some ericoid fungi (ericoid mycorrhizal endophytes of *Woollisia pungens* (Epacridaceae) and *Hymenoscyphus ericae*) have also been reported to be able to dissolve hydroxyapatite in axenic culture (Van Leerdam *et al.*, 2001). Mycorrhizal fungi, as well as all other fungi, can dissolve minerals in the course of so called “heterotrophic leaching” employing several mechanisms, including protonation (acydolysis), chelation (complexolysis) and biomass functioning as a metal sink

(metal accumulation) (Burgstaller and Schinner, 1993; Burford et al., 2003; Fomina et al., 2004).

However, the dissolution of inorganic phosphates can result in release of the associated metals, including toxic metals, and therefore a possible increase of metal bioavailability in soil [Leyval and Joner, 2001]. This toxic metal mobilization from insoluble phosphate-containing minerals has received very little attention. There were only few studies on toxic metal phosphates solubilization by axenic cultures of ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal fungi (Leyval and Joner, 2001; Martino et al., 2003; Fomina et al., 2004). The ectomycorrhizal fungi *Suillus granulatus* and *Pisolithus tinctorius* promoted the release of cadmium and phosphorus from rock phosphate [Leyval and Joner, 2001]. From cadmium, copper, zinc and lead phosphates, zinc phosphate was found to be the most easily solubilized compound by ectomycorrhizal fungi *Paxillus involutus*, *Suillus bovinus*, *Suillus luteus* and *Thelephora terrestris* (Fomina et al., 2004). Though axenic cultures of numerous tested ectomycorrhizal fungi produced various organic acids the majority of them did not excrete strong chelators like oxalic or citric acids and the main mechanism of zinc phosphate solubilization was acidification (Fomina et al., 2004). It was also found that the fungal ability to dissolve toxic metal minerals was related to toxic metal tolerance of fungal strains (Fomina et al., 2004). Fungi are known for their remarkable ability to withstand stress induced by toxic metals in their environment employing numerous mechanisms and strategies in detoxification, including enhanced metal efflux, suppressed influx of toxicant, extracellular metal sequestration and precipitation, metal binding to the fungal cell walls, intracellular sequestration and complexation, compartmentation or volatilization (Gadd, 1993, Perotto and Martino, 2001; Meharg, 2003; Fomina et al., 2005). The interactions between mycorrhizas and metal pollution have raised increased interest because the ability of mycorrhizas to enhance plant growth on contaminated soils and the potential of mycorrhizas, particularly ectomycorrhizas, to remediate and remove pollutants from contaminated sites has been highlighted (Meharg and Cairney, 2000; Adriaensen et al. 2003; Meharg, 2003; Colpaert et al., 2004).

However the impact of ectomycorrhiza on the dissolution of toxic metal phosphate minerals and the role of toxic metal tolerance of mycosymbionts in those processes remained unstudied. It was not clear how efficiently fungal symbionts with different metal tolerance could solubilize toxic metal

phosphates, protect host plants from the toxicity of mobilized metals, and provide access to inorganic mineral sources of phosphorus for ectomycorrhizal associations.

The aim of present investigation was to study zinc phosphate transformations by *Paxillus involutus*/pine ectomycorrhizas with zinc-tolerant and non-tolerant strains of mycosymbiont under phosphorus-replete and -deplete conditions.

MATERIALS AND METHODS

(1) Axenic cultures of *P. involutus* strains in solid and liquid media

Mycobionts used were two cultures of ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (common name Brown Roll-rim). Fungal cultures were isolated from habitats with different degrees of toxic metal pollution: *P. involutus* 15 (provided by Dr D. Genney (CEH Merlewood collection)) was isolated from unpolluted site, UK, with host plant *Larix sp.* and *P. involutus* 23 (provided by Dr J. Colpaert) was isolated the Lommel field site, Belgium, with host plant *Pinus sp.*. The Lommel (Campine region in the north-eastern part of Belgium) field site was designed as a test plot for the reforestation of the “zinc desert”, an industrial site polluted with non-ferrous metals emitted by a pyrometallurgical zinc smelter dismantled in 1973 (Colpaert et al., 2000). Toxic metal concentrations in Lommel (Maatheide) soils were (on a dry weight basis): zinc, 1750 µg/g soil; cadmium, 14 µg/g soil, and copper, 76 µg/g soil. Fungal strains were maintained at 25°C on modified Melin-Norkrans (MMN) agar medium comprising: (NH₄)₂HPO₄ (0.5 g/l), KH₂PO₄ (0.3 g/l), MgSO₄·7H₂O (0.14 g/l), CaCl₂·6H₂O (0.05 g/l), NaCl (0.025 g/l), D-glucose (10 g/l), glutamic acid (0.001 g/l), thiamine (0.0001 g/l) and agar No.1 (Lab M, Bury UK)(14 g/l). Before adding the agar and prior to autoclaving, the liquid medium was adjusted to pH 5.5 using HCl. Commercial preparation of Zn₃(PO₄)₂·2H₂O (Alfa) (naturally occurring as hopeite) was used.

Preparation of metal-amended plates and inoculation Fungi were grown on 20 cm³ MMN agar, in 90 mm-diameter Petri dishes with metal compounds added to a final metal concentration of 15 mM (Sayer et al., 1995, 1997). Metal phosphate was added to a 5 mM final concentration (equivalent to 0.22% w/v Zn₃(PO₄)₂). Prior to inoculation, 84 mm diameter discs of sterile cellophane membrane were placed aseptically on the surface of the agar in each Petri dish.

The membrane allowed the passage of nutrients and/or metabolites between the agar and the fungus, and provided a convenient means of removing the mycelium from the agar (Sayer et al., 1997). Inoculations were carried out using 7mm diameter discs of mycelium cut from the leading edge of colonies which had been maintained on MMN at 25° C for at least 14 days. Fungi were incubated at 25° C for two months. Measurements were made of the size of the colonies every 3-4 days and of any clear zones present.

Estimation of solubilizing ability The main criterion of mineral solubilizing ability was the diameter of the solubilization area (clear halo) in agar, used previously in studies of fungal phosphate-solubilizing ability and mineral transformations (Sayer et al., 1995, 1997).

Biomass and metal analysis Colonies were removed from replicate agar plates by peeling the biomass from the dialysis membrane. The mycelia were oven-dried at 80° C until reaching constant weight, and after dry weight measurement, were digested (0.05g) in 3.0 ml concentrated HNO₃ at 115° C for 24 hours in a digestion block (Grant Instruments, UK). After appropriate dilution with ddH₂O, solutions were analyzed for metal ion content using a Pye Unicam SP9 atomic absorption spectrophotometer (AAS) with respect to appropriate standard solutions in acidified ddH₂O.

Metal tolerance Growth of fungi was evaluated by extension of the colony and by the biomass yield of dry weight since extension of the colony alone does not take into account the density of fungal mycelium (Gadd, 1986; Colpaert et al., 2000). Tolerance results were expressed in terms of a tolerance index (TI) based on the dry weights of fungal biomass (DW) (Vodnik et al., 1998; Colpaert et al., 2000):

$$TI_{DW} = (DW \text{ of treated mycelium} / DW \text{ of control mycelium}) \times 100 (\%).$$

Preparation of metal-amended flasks and inoculation. Fungi were grown in liquid static culture in 12 cm³ MMN comprising: (NH₄)₂HPO₄ (0.5 g/l), KH₂PO₄ (0.3 g/l), MgSO₄·7H₂O (0.14 g/l), CaCl₂·6H₂O (0.05 g/l), NaCl (0.025 g/l), FeEDTA (0.0125 g/l), D-glucose (10 g/l), thiamine (0.0001 g/l), in sterile plastic flat flasks with total volume 50 ml and growth area 25 cm² (CellStar Tissue Culture Flasks, Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria). The pH of liquid medium was adjusted to 5.5 using HCl. After oven sterilization, zinc phosphate was added to the medium to give a final concentration equivalent to 1 mM. Inoculations were carried out with 7mm diameter discs of mycelium cut from the leading edge of colonies which had been maintained on MMN at 25° C for at

least 14 days. Fungi were incubated at 25° C for 20 days. Growth and mineral solubilization were observed macro- and microscopically.

Organic acid analysis. After 10, 15 and 20 days of fungal growth, aliquots from the liquid cultures (1ml) were taken for analysis of organic acid (carboxylic acids) production. Analysis was carried out using HPLC system comprising a Waters (Watford, Herts, UK) 600E system controller, a Waters 490E programmable multi-wavelength detector, a Waters U6K pump and a Waters 7171 plus autosampler controlled by Millipore (Waters) Millennium chromatography software. 8 mM sulphuric acid (Aristar, BDH, Poole, UK) was used to elute fractions from an Aminex HPX-87H HPLC organic acid analysis ion-exclusion column (Bio-Rad, USA). To remove free metal species, samples were treated with ion-exchange resin (AG 50W-X8 100-200 hydrogen form resin, Bio-Rad, USA). Both samples and eluant were pre-filtered through 0.45 µm membrane filters (cellulose acetate, 13mm syringe filter, Alltech Associates Ltd, Carnforth, UK), and then 20 µl of triplicate samples were run for 30 min.

pH measurements pH measurements were made, in triplicate, in liquid culture, using a Gelpas combination pH electrode (BDH, UK) and Jenway 3040 Ion Analyser.

Biomass and metal analysis After 20 days of growth, fungal biomass was separated from the liquid medium by filtration through plastic mesh (100 µm mesh size) and washed with cold dH₂O. The mycelia were oven-dried at 80° C until reaching constant weight, and after dry weight measurement and biomass powdering, stepwise extraction of the metal accumulated by the biomass was carried out using a modified Sequential Elution Technique (SET), that has been previously used in studies of metal speciation in soil and plant tissues (Kinzel, 1989; Zhu and Alva, 1993; Kunito et al., 1999; Costas and Lopez, 2000). To evaluate the partitioning of accumulated metal within different chemical fractions, biomass (0.05g) was extracted stepwise (in 2.5ml, twice) using: (1) ddH₂O for 15 min at 80°C, (2) 2M NaCl for 30 min at room temperature, (3) 1M acetic acid overnight at room temperature and (4) 1M HCl overnight at room temperature for zinc, or concentrated HCl at 92-95°C for 2-3 h for lead: zinc and lead were determined in each fraction by atomic absorption spectrophotometry. For zinc, the acetic acid fraction represents zinc phosphate as it is only sparingly-soluble in water but fully soluble in 1M acetic acid, and this fraction was therefore subtracted from the biomass dry weight as initial non-dissolved mineral precipitated on mycelia. Water-, NaCl- and HCl-fractions represent

solubilized $Zn_3(PO_4)_2$, where the NaCl-fraction is regarded as electrostatically adsorbed or ion-exchange fraction and the HCl-fraction mainly represents zinc that has been reprecipitated as zinc oxalate or zinc ions that have been strongly bound to cell components. To evaluate the total metal concentration in biomass, samples were digested (0.05g DW) in 3.0 ml concentrated HNO_3 at $115^\circ C$ for 24 h in a digestion block (Grant Instruments, Cambridge, UK). After appropriate dilution with ddH_2O , solutions were analyzed for metal ion content using a Pye Unicam SP9 atomic adsorption spectrophotometer (AAS) with reference to appropriate standard solutions in acidified ddH_2O . Digested precipitates of metal minerals in flasks and free metals in liquid medium after fungal growth were also analyzed for metal ion content using AAS. Samples of ddH_2O -washed precipitates of metal minerals in flasks as well as of biomass samples were examined using X-ray powder diffraction analysis (XRPD) to confirm their homogeneity and/or the possible appearance of biogenic crystalline precipitates (e.g. metal oxalates).

Estimation of metal tolerance Growth of fungi in liquid medium was evaluated by the biomass yield and tolerance results were also expressed in terms of a tolerance index (TI) as described above.

Estimation of solubilizing ability The main criterion of mineral solubilizing ability in liquid medium was the mobilization index (MI) calculated as the ratio (%) of free metal concentration in the liquid phase to the initial solid phase:

$$MI = (\text{Met}_{\text{liquid}} / \text{Met}_{\text{solid}}) \times 100 (\%),$$

where $\text{Met}_{\text{liquid}}$ is the concentration of mobilized metal in the liquid phase; $\text{Met}_{\text{solid}}$ is the metal concentration in the initial solid phase. (As the concentration of total metal accumulated in fungal biomass was negligible compared to metal concentrations in solid or liquid phases, the values of MI calculated with initial $\text{Met}_{\text{solid}}$ and with final $\text{Met}_{\text{solid}}$, after subtraction of the metal concentration in biomass, did not differ statistically).

Specific metal mobilization by fungal biomass was calculated as a sum of the metal concentration in the liquid phase and biomass per biomass yield.

Synthesis of *Paxillus involutus*/pine ectomycorrhiza was carried out under sterile conditions using test tubes technique (Peterson and Chakravarty, 1991). The seeds of *Pinus sylvestris* L. (Chiltern seeds, Cat No 1014, Ulverston, Cumbria, UK) were surface – sterilized in 30% hydrogen peroxide with one drop of Tween60 for 30 min, then thoroughly washed with sterile water and transferred

into Petri dishes containing MMN agar medium to germinate for at least 14 days. Synthesis of ectomycorrhiza was performed in the autoclaved (120°C, 60 min) glass tubes (culture tubes 25mm×150mm, Sigma-Aldrich Cat C 5916, Dorset, UK) filled with 30 ml vermiculite (Sinclair, Lincoln, UK) and peat (Irish Moss Peat, B&Q plc, Chandlers Ford, UK) mixture 5:1 and 10 ml of Ingestad medium (Ingestad, 1979) comprising: K₂SO₄ (12.25 mg/l); KH₂PO₄ (8.58 mg/l); K₂HPO₄ (10.11mg/l); KNO₃ (9.71mg/l); NH₄NO₃ (58.56 mg/l); Ca(NO₃)₂ (8.61 mg/l); Mg(NO₃)₂ (15.84 mg/l); HNO₃ (13.7 µg/l); H₃BO₃ (0.57 µg/l); Mn(NO₃)₂ (0.913 µg/l); Zn(NO₃)₂ (0.07 µg/l); CuCl₂ (0.04 µg/l); Na₂MoO₄ (0.009 µg/l); FeNaEDTA (1.149 µg/l) (Ingestad, 1979). D-glucose (0.5 g/l) was also added to medium to initiate fungal growth in matrix. Germinating pine seeds were planted into vermiculite/peat matrix together with 4 discs of 7mm diameter discs of mycelium cut from the leading edge of colonies which had been maintained on MMN at 25° C for at least 14 days. Seedlings were cultivated for 3-4 months in the growth chamber (Fisons Fi-totron 600 Growth Cabinet, Suffolk, UK) with 200 µmol×m⁻²×s⁻¹ PAR, at least 60% relative air humidity and at day/night regime of 18/6 h and a temperature of 23/15°C. Mycorrhizal colonisation of the roots was nearly 85-90%. After mycorrhization uniform pine seedlings were carefully taken out from tubes, washed with sterile water and transferred into mason jars (Peterson and Chakravarty, 1991) to be used in the mesocosms experiments.

(2) Mesocosm experiment I: low zinc phosphate and high phosphorus status.

Mesocosm experiment I was aimed to study the role of ectomycorrhization and Zn-tolerance of ectomycorrhizal mycosymbiont in Zn accumulation, chemical fractionation and coordination in pine roots.

Vessels for plant tissue culture (Sigma-Aldrich 175ml “baby food jars”, Cat V 0633 with clear Magenta B-caps Cat No B 8648) were used as modified mason jars in mesocosm experiment I (Fig. 1A). Prior to autoclaving (120°C, 60 min) the jars were filled with 130ml vermiculite (Sinclair, Lincoln, UK) and 75 ml of Ingestad medium comprising: K₂SO₄ (12.25 mg/l); KH₂PO₄ (8.58 mg/l); K₂HPO₄ (10.11mg/l); KNO₃ (9.71mg/l); NH₄NO₃ (58.56 mg/l); Ca(NO₃)₂ (8.61 mg/l); Mg(NO₃)₂ (15.84 mg/l); HNO₃ (13.7 µg/l); H₃BO₃ (0.57 µg/l); Mn(NO₃)₂ (0.913 µg/l); Zn(NO₃)₂ (0.07 µg/l); CuCl₂ (0.04 µg/l); Na₂MoO₄ (0.009 µg/l); FeNaEDTA (1.149 µg/l). 10mm holes were punched in the middle of caps to pull shoots out

and plug the hole with autoclaved foam surrounding stems. Autoclaved bags made from dialyzing tubing (Visking Code DTV12000.10.000, Size 10, Medicell International Ltd, London, UK) were filled with 0.157g of oven-sterilized $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 2H_2O$ (Alfa) and buried into vermiculite matrix one bag per jar. Seedlings were watered with 25ml sterile water after planting. Mycorrhizal and non-mycorrhizal pine seedlings were grown for 5 months in jars keeping the root system sterile in the growth chamber (Fisons Fi-totron 600 Growth Cabinet, Suffolk, UK) with $200 \mu mol \times m^{-2} \times s^{-1}$ PAR, at least 60% relative air humidity and at day/night regime of 18/6 h and a temperature of 23/15°C. Every month pine seedlings were watered with 25ml sterile half-Ingstad solution. At least four replicas of each treatment were used.



Fig. 1. Pine seedlings grown in mason jars mesocosm systems containing cellophane bags with zinc phosphate in matrix (as indicated in figures) using (A) Sigma “baby food” jars (Mesocosm experiment I) or (B) Tesco “olives” jars (Mesocosm experiment II).

Organic acid analysis in matrix. After 5 months of pine seedlings growth in the mesocosm prior to harvesting the vermiculite matrix was filled with 75ml of

ddH₂O, left for a couple of hours and liquid samples were taken for analysis of organic acid. Analysis was carried out using HPLC system comprising a Waters (Watford, Herts, UK) 600E system controller, a Waters 490E programmable multi-wavelength detector, a Waters U6K pump and a Waters 7171 plus autosampler controlled by Millipore (Waters) Millennium chromatography software. 8 mM sulphuric acid (Aristar, BDH, Poole, UK) was used to elute fractions from an Aminex HPX-87H HPLC organic acid analysis ion-exclusion column (Bio-Rad, USA). To remove free metal species, samples were treated with ion-exchange resin (AG 50W-X8 100-200 hydrogen form resin, Bio-Rad, USA). Both samples and eluant were pre-filtered through 0.45 µm membrane filters (cellulose acetate, 13mm syringe filter, Alltech Associates Ltd, Carnforth, UK), and then 20 µl of triplicate samples were run for 30 min. Succinic acid production by ericoid mycorrhizal fungi was previously confirmed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Martino et al., 2003). Oxalic acid production was also analyzed enzymatically using a commercial kit (Sigma Diagnostics Catalog No. 591-D, Sigma-Aldrich Company Ltd, Poole, Dorset, UK).

Roots were harvested, washed with dH₂O, and analyzed for zinc content. The roots were oven-dried at 80° C until reaching constant weight, and after dry weight measurement and biomass powdering, stepwise extraction of the metal accumulated by the biomass was carried out using a modified Sequential Elution Technique (SET) as described above.

Following light microscopic observations scanning electron microscopy (SEM)-based techniques, including environmental SEM (ESEM) and Cryo-SEM, have been used in the present study to analyze any zinc phosphate transformations by ectomycorrhizal and non-mycorrhizal roots.

Cryo-SEM study Cryo-preparation of fungal specimens proved to be the one of the best ways to preserve fragile mycelium for SEM study providing observation of both interior and exterior structures of cryo-fractured samples. A specimen was held within the jaws of the sample holder and “Tissue-Tek” – which acts as a glue when frozen – was smeared around the base of the sample. Liquid N₂ was placed under vacuum in the freezing chamber (Alto2500) until it became solid (slush). The chamber was then brought back to atmospheric pressure and the sample immediately plunged into the chamber and a vacuum reapplied. The sample was withdrawn from the chamber just prior to the N₂ re-solidifying. The sample was then transferred under vacuum to the preparation chamber. After fracturing, the sample was warmed to -95°C for 5 mins to remove surface water.

After sublimation, the sample was cooled to -115°C prior to coating with approx 5nm of Au/Pd. Samples were examined using an Hitachi S-4700 field emission gun scanning electron microscope (FEG SEM) operating at an accelerating voltage of 5Kv.

EDXA Ectomycorrhizal roots and mycelium were analysed using EDXA at Philips XL30 environmental scanning electron microscope (ESEM) field emission gun (FEG) to find any crystalline mycogenic precipitates.

XRPD analysis All the products of mineral transformations by fungus in the media and in mycelium were analysed by XRPD. The samples were sprinkled onto low background silicon crystal holders and scanned from $2-75^{\circ} 2\theta$ on a Siemens D5000 diffractometer using cobalt $K\alpha$ radiation selected with a diffracted beam monochromator. Each sample was counted for 1 sec per step using a step size of 0.02° . Slits used were 1° divergence, 1° antiscatter, and 0.6mm receiving slit. The broad peak centred at around 7\AA is diffraction from the plastic sample holder surround. Phases were identified by reference to patterns in the Powder Diffraction File (PDF).

X-ray absorption spectra at the Zn K-edge were collected on Station 7.1 at the CLRC Daresbury SRS operating at 2 GeV with an average current of 140 mA, using a vertically collimating plane mirror and a sagittally bent focussing Si(111) double crystal monochromator detuned to 80% transmission to minimise harmonic contamination. Sample data were collected with the station operating in fluorescence mode using a 9-element solid state Ge diode detector with high count-rate XPRESS processing electronics; spectra of model compounds were collected in transmission mode. Experiments were performed using a liquid nitrogen cooled cryostat. Single scans were collected for the model compounds, and 3-4 scans were collected and summed for each sample.

Background subtracted EXAFS spectra were analysed in EXCURV98 using full curved wave theory (Binsted, 1998; Gurman *et al.*, 1984). Phaseshifts were derived in the program from *ab initio* calculations using Hedin-Lundqvist potentials and von Barth ground states (Hedin & Lundqvist, 1969). Fourier transforms of the EXAFS spectra were used to obtain an approximate radial distribution function around the central arsenic atom (the absorber atom); the peaks of the Fourier transform can be related to “shells” of surrounding back scattering atoms characterised by atom type, number of atoms in the shell, the absorber-scatterer distance, and the Debye-Waller factor, $2\sigma^2$ (a measure of both the thermal motion between the absorber and scatterer and of the static

disorder or range of absorber-scatterer distances). The data were fitted for each sample by defining a theoretical model and comparing the calculated EXAFS spectrum with the experimental data. Shells of backscatterers were added around the arsenic and by refining an energy correction E_f (the Fermi energy), the absorber-scatterer distance, and Debye-Waller factor for each shell, a least squares residual (the R -factor (Binsted *et al.*, 1992)) was minimised. Where appropriate multiple scattering effects were included in the fits (Gurman *et al.*, 1986). Data were collected for three models, Zn(oxalate), $Zn_3(PO_4)_2$ and ZnS, and for samples of non-mycorrhizal roots and roots of ectomycorrhizas with zinc-tolerant and non-tolerant mycobiont.

(3) Mesocosm experiment II: high zinc phosphate and high/low phosphorus status.

The mesocosm experiment II was aimed to investigate the role of phosphorus deficiency, ectomycorrhization and Zn-tolerance of ectomycorrhizal mycosymbiont in P and Zn accumulation by pine seedlings.

The 60x150mm glass jars (350ml Tesco “olives” jars) were used as modified mason jars in mesocosm experiment II (Fig. 1B). Prior to autoclaving (120°C, 60 min) the jars were filled with 100ml 10:1 vermiculite/peat mixture and 75 ml of Ingestad medium comprising: K_2SO_4 (12.25 mg/l); KNO_3 (9.71mg/l); NH_4NO_3 (58.56 mg/l); $Ca(NO_3)_2$ (8.61 mg/l); $Mg(NO_3)_2$ (15.84 mg/l); HNO_3 (13.7 µg/l); H_3BO_3 (0.57 µg/l); $Mn(NO_3)_2$ (0.913 µg/l); $Zn(NO_3)_2$ (0.07 µg/l); $CuCl_2$ (0.04 µg/l); Na_2MoO_4 (0.009 µg/l); FeNaEDTA (1.149 µg/l) with or without KH_2PO_4 (8.58 mg/l) and K_2HPO_4 (10.11mg/l) as phosphorus sources. 10mm holes were punched in the caps and plugged by autoclaved foam to provide gas-exchange for pine seedlings. Caps were fixed on the jars using autoclaved lanolin (Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich Company Ltd, Poole, Dorset, UK). Autoclaved bags made from dialyzing tubing (Visking Code DTV12000.10.000, Size 10, Medicell International Ltd, London, UK) were filled with 0.5g of oven-sterilized $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 2H_2O$ (Alfa) and buried into vermiculite matrix one bag per jar. Seedlings were watered with 25ml sterile water after planting. Mycorrhizal and non-mycorrhizal pine seedlings were grown for 5 months in jars keeping the both shoot and root systems sterile in the growth chamber (Fisons Fi-totron 600 Growth Cabinet, Suffolk, UK) with $200 \mu mol \times m^{-2} \times s^{-1}$ PAR, at least 60% relative air humidity and at day/night regime of 18/6 h and a temperature of 23/15°C. Jars non-inoculated with pine seedlings were used as abiotic control, and jars

without zinc phosphate bags were used as non-mineral control. Every second month pine seedlings were watered with 25ml sterile water. At least three replicas of each treatment were used.

After 5 months of pine seedlings growth in the mesocosm prior to harvesting the vermiculite matrix was filled with 60ml of ddH₂O, left overnight and liquid samples were taken for analysis of water-soluble zinc content in liquid fraction of mesocosm. It was also analyzed zinc content in hot-water fraction of vermiculite matrix by heating 1.5g (DW) vermiculite in 5ml ddH₂O at 80°C 30 min. To estimate zinc accumulation by whole plants, pine seedlings were harvested, thoroughly washed with water and dried with paper towels. Shoots and roots were separated, chopped, oven-dried at 80° C until reaching constant weight. After dry weight measurement and biomass powdering samples were digested (0.05g DW) in 3.0 ml concentrated HNO₃ at 115° C for 24 h in a digestion block (Grant Instruments, Cambridge, UK) to evaluate the total zinc concentration in biomass. After appropriate dilution with ddH₂O, solutions were analyzed for metal ion content using a Pye Unicam SP9 atomic adsorption spectrophotometer (AAS) with reference to appropriate standard solutions in acidified ddH₂O.

Liquid fraction of mesocosm and digested shoots and roots were also analyzed for labile phosphorus and total phosphorus contents using manual Mo-blue colorimetric procedure (Olsen and Sommers, 1982). The antimony-phosphomolybdate complex is reduced to an intensely blue-colored complex by ascorbic acid proportionally to the phosphorus concentration. 1 ml of sample was added to 7ml of the reagent 4:3 mixture comprising 1% ascorbic acid solution and solution of ammonium molybdate (4.3g/l), antimony sodium tartrate (0.4g/l), cH₂SO₄ (54 ml/l), and after 20min the absorbance was read on the colorimeter (Gallenkamp Visi Spec spectrophotometer) at 800 nm. Solution concentrations were determined by reference to absorbance of appropriate known standard solutions.

Statistical analysis

Minitab for Windows (Release 12.1) was used for statistical analysis. At least three replicate determinations were made.

RESULTS

(1) Zinc phosphate tolerance and transforming ability of two *Paxillus involutus* isolates from environment differently polluted with zinc.

Zinc phosphate tolerance and transforming ability were compared for two *P. involutus* strains isolated from environment highly contaminated with zinc (*P. involutus* 23) and uncontaminated environment (*P. involutus* 15). The ability to grow of two cultures in the presence of zinc phosphate was different (Fig. 2A). *P. involutus* 23 yielded more biomass and showed much higher values of tolerance index on both liquid and solid media-containing zinc phosphate than *P. involutus* 15. So *P. involutus* 23 and *P. involutus* 15 are referred in text as zinc-tolerant and non-tolerant strains.

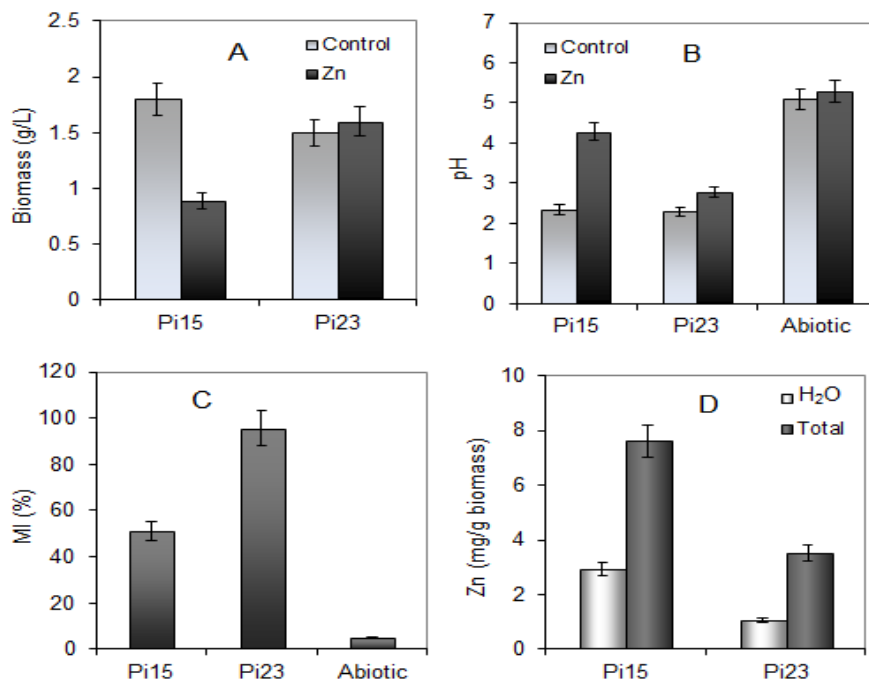


Fig. 2. Axenic cultures of *P. involutus* 15 (Pi15) and *P. involutus* 23 (Pi23): (A) tolerance index (TI) for zinc phosphate on liquid and solid media; (B) final pH values after growth on liquid mineral-free (control) medium and medium containing zinc phosphate (Zn); (C) zinc phosphate solubilization expressed as mobilization index (MI) for liquid medium; (D) chemical fractionation (H₂O-extractable and total) of zinc accumulated in fungal biomass grown on liquid medium containing zinc phosphate. Bars indicate \pm SEM.

As the strains grew different way they acidified zinc phosphate-containing liquid medium differently with *P. involutus* 23 acidifying medium significantly

more than *P. involutus* 15 (Fig. 2B). The two strains also showed different zinc phosphate solubilizing ability: zinc-tolerant strain solubilized mineral considerably more in both liquid and solid media than non-tolerant (Fig. 2C). When grown in liquid medium containing zinc phosphate, zinc-tolerant strain accumulated considerably less zinc in its mycelium than non-tolerant strain (Fig. 2D). Non-tolerant strain accumulated much more water-soluble and cation-exchangeable zinc but less zinc in HCl-fraction than metal-tolerant strain (Fig. 2D).

In the presence of zinc phosphate both cultures excreted into liquid medium mainly gluconic acid (Fig. 3A) (see also Fomina et al., 2004). However this excretion cannot explain the difference in solubilization as both cultures produced similar concentrations of gluconic acid. Both strains were not able to excrete substantial amount of strong chelators. The difference in solubilization correlated with pH values suggesting the main role in zinc phosphate dissolution to be played by acidification under studied conditions as it has been previously reported (Fomina et al., 2004).

Thus, the two strains of *P. involutus* differed in their ability to tolerate and solubilize zinc phosphate.

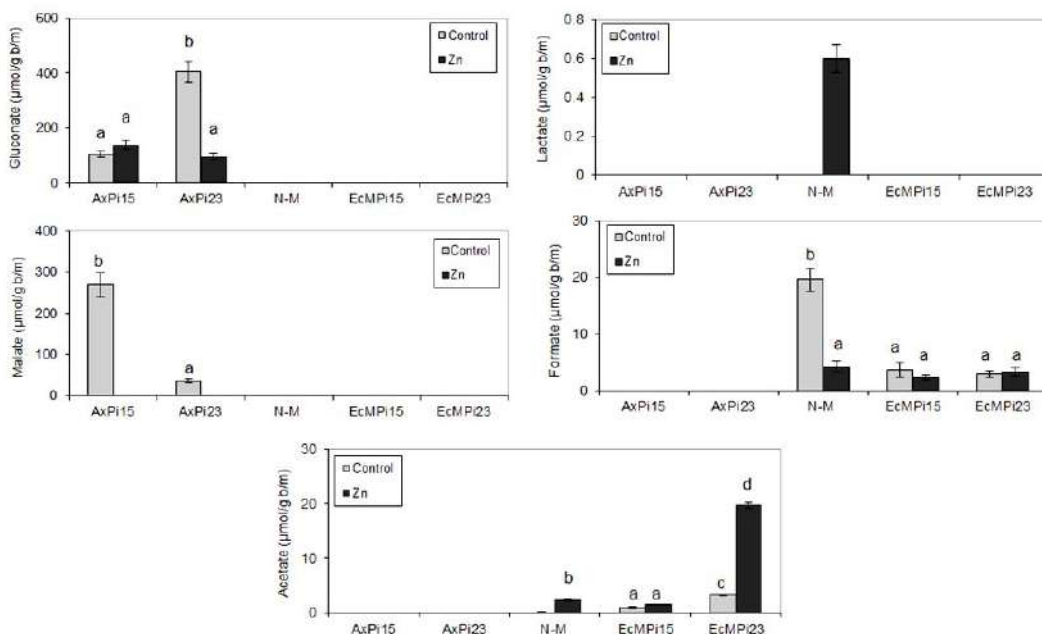


Fig. 3. Specific exudation of some organic acids (A) gluconic acid, (B) malic acid, (C) lactic acid, (D) formic acid, and (E) acetic acid in the

absence (grey columns) and presence of zinc phosphate (black columns) by axenic cultures of fungi *P. involutus* 15 (AxPi15) and *P. involutus* 23 (AxPi23), and by roots of non-mycorrhizal pine seedlings (N-M) and ectomycorrhizas infected with *P. involutus* 15 (EcMPi15) or *P. involutus* 23 (EcMPi23). Values are means derived from at least three replicate determinations, bars indicate \pm SEM. The different letters denote significant differences at the 5% level using Fisher's LSD test (one-way ANOVA).

(2) Mesocosm experiment I

The zinc tolerant and non-tolerant *P. involutus* strains were used in the synthesis of monoaxenic ectomycorrhizas with pine seedlings for mesocosm experiments with relatively low amount of zinc phosphate and high phosphorus amount in the medium aimed to compare zinc phosphate dissolution, and accumulation and speciation of mobilized zinc in the roots of non-mycorrhizal and ectomycorrhizal plants. The analysis of liquid fraction of mesocosm matrix showed similar nearly neutral pH values being a result of buffering by vermiculite. Excretion of some organic acids (mainly, lactate, formic and acetic acids) into matrix was detected (Fig. 3B-D). Zinc phosphate presence in mesocosm induced lactate and acetate production by non-mycorrhizal roots but reduced its formate production (Fig. 3B-D). Non-mycorrhizal roots and *P. involutus* 23- and *P. involutus* 15- ectomycorrhizas excreted similar μ molar amount of formic acid. The highest amount of acetic acid (around 20 μ mol/g biomass) produced by *P. involutus* 23-ectomycorrhiza was at least ten times more than those found for non-mycorrhizal or *P. involutus* 15-ectomycorrhiza and seemed to be zinc phosphate-stimulated (Fig. 3B-D). The range of organic acids excreted by *P. involutus* ectomycorrhizas in mesocosm was different from that found for liquid axenic cultures of mycobionts only (Fig. 3).

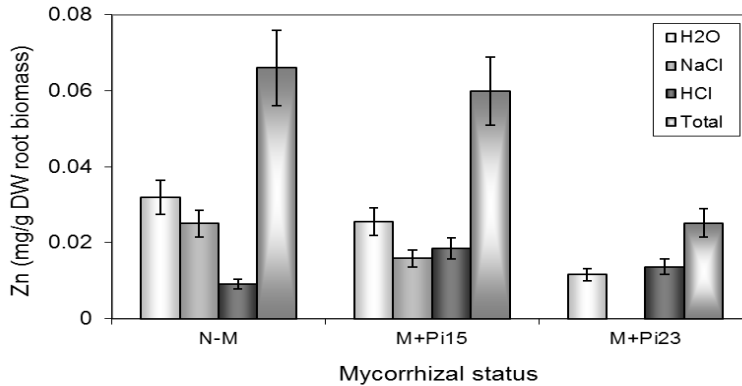


Fig. 4. Chemical fractionation (as H₂O-, NaCl-, HCl- extractable and total) of zinc accumulated in roots of non-mycorrhizal (N-M) pine seedlings and ectomycorrhizas infected with *P. involutus* 15 (M+Pi15) or *P. involutus* 23 (M+Pi23) grown in mesocosm containing zinc phosphate (Experiment I). Bars indicate ±SEM. The different letters denote significant differences at the 5% level using Fisher's LSD test (one-way ANOVA).

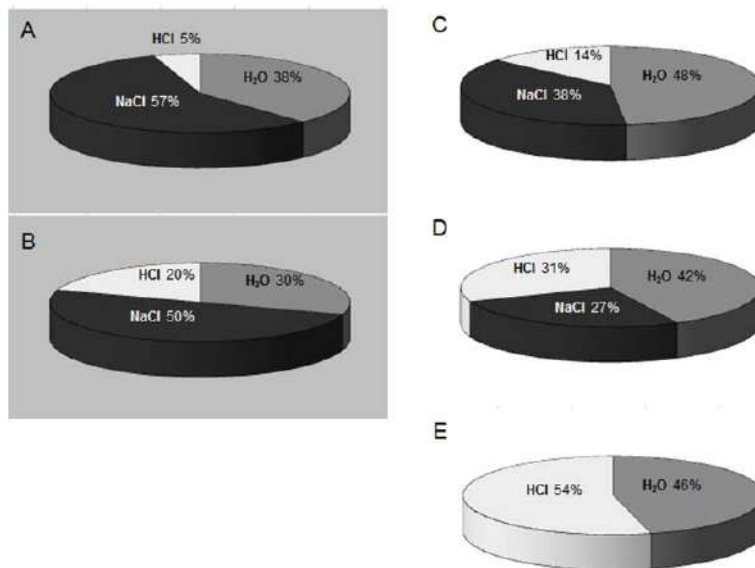


Fig. 5. The proportions of different chemical fractions of zinc (H₂O-, NaCl-, and HCl- extractable) in biomass of axenic cultures of (A) *P. involutus* 15, (B) *P. involutus* 23, grown on zinc phosphate-containing liquid medium, and in roots of (C) non-mycorrhizal pine seedlings, and ectomycorrhizas infected with (D) *P. involutus* 15 or (E) *P. involutus* 23 grown in mesocosm containing zinc phosphate. Percentage is shown in the plot area.

The organic acid exudation found in mesocosm experiment did not correlate anyhow with the accumulation of mobilized zinc within root biomass (Figs. 3, 4). Roots of non-mycorrhizal and *P. involutus* 15-ectomycorrhizal pine seedlings accumulated significantly higher concentration of water-soluble and cation-exchangeable zinc in their biomass than those in *P. involutus* 23-ectomycorrhiza (Fig. 4). The amount of HCl-extractable zinc in *P. involutus* 23-ectomycorrhizal roots did not differ significantly from those in non-mycorrhizal and *P. involutus* 15-ectomycorrhizal roots. *P. involutus* 15-ectomycorrhiza demonstrated higher concentration of HCl-extractable zinc than non-mycorrhizal roots. Total zinc concentration in roots was the least for ectomycorrhiza with zinc-tolerant mycobiont *P. involutus* 23, and did not differ significantly in non-mycorrhizal and *P. involutus* 15-ectomycorrhizal roots. In general, the difference in zinc accumulation and chemical fractionation in ectomycorrhizal roots with zinc-tolerant and non-tolerant mycobionts was consistent with data observed for these fungal strains in liquid axenic culture. The analysis of proportions of different zinc fractions showed the main tendency to be a decrease of sum of water- and salt- extractable and an increase of the ratio of acid-extractable zinc from non-tolerant to zinc-tolerant fungal strains in both axenic culture and ectomycorrhizal state (Fig. 5). Non-mycorrhizal roots demonstrated the least ratio of acid-extractable zinc and the highest ratio of water-soluble and NaCl-extractable zinc together manifesting the highest proportion of the most bioavailable zinc compared to ectomycorrhizal roots. Zinc accumulation and chemical fractionation data for axenic fungal mycelium differed from ectomycorrhizal roots, and it should be taken into account the difference between conditions and impact of root cells of host plant here.

Analysis of zinc coordination within biomass showed no difference between non-mycorrhizal and ectomycorrhizal roots (Table 1). The X-ray absorption near edge structure (XANES) of the models and the samples of non-mycorrhizal, *P. involutus* 23- and *P. involutus* 15- ectomycorrhizal roots showed a close similarity between the sample edges and the oxalate model. This implies that the likely coordination of the zinc is to six oxygen ligands, rather than four as in zinc phosphate. The parameters derived from the EXAFS fitting are presented in Table 1. The spectra of all samples were very similar, and could all be fitted with a single shell of 6 oxygen atoms. In all Fourier transforms there appear to be outer shells, but these could not be fitted satisfactorily with further shells of scatterers. However, by assuming octahedral coordination and modelling the

effects of multiple scattering the fits for all the spectra could be improved (Table 1 showed the fits with multiple scattering). The residuals in brackets in the final column are the residuals without multiple scattering). Attempts to fit those parts of the EXAFS spectra giving rise to small peaks in the Fourier transforms at ca. 3 Å, using carbon scatterers, did not significantly improve the fits.

Roots were also examined for any crystalline precipitates and any obvious changes in morphology using scanning electron microscopy SEM, EDAX and XRPD. However, neither crystalline precipitates nor profound morphological changes were observed. Because of perfect preservation results and the possibility to observe both external and internal structures, the Cryo-SEM was found to be one of the best for imaging and study the morphology of ectomycorrhiza and, potentially, for any metal mineral transformations into crystalline secondary minerals in ectomycorrhizal system (e.g. if it is able to over-produce such strong chelators as oxalate) (Fig. 6).

Table 1. Zn K-edge EXAFS parameters.

r is the zinc-scatterer distance, ± 0.02 Å inner shells, ± 0.05 Å outer shells. $2\sigma^2$ is the Debye-Waller type factor, $\pm 15\%$ inner shells, $\pm 30\%$ outer shells

Sample	Scatterers	$r / \text{Å}$	$2\sigma^2 / \text{Å}^2$	Residual
STANDARDS				
Zn(oxalate)	6 x O	2.09	0.012	22.2
	4 x C	2.82	0.026	
	12 x O	3.83	0.034	
Zn ₃ (PO ₄) ₂	4 x O	1.96	0.015	23.3
	2 x P	3.12	0.032	
	2 x Zn	3.33	0.015	
ZnS	4 x S	2.33	0.010	26.1
	12 x Zn	3.81	0.016	
	12 x S	4.46	0.020	
	6 x Zn	5.41	0.023	
	12 x S	5.89	0.013	
	24 x Zn	6.64	0.021	
SAMPLES				
Non-mycorrhizal roots	6 x O	2.06	0.014	37.0 (38.4)
<i>P. involutus</i> 15-ectomycorrhizal roots	6 x O	2.05	0.016	37.1 (39.5)
<i>P. involutus</i> 23-ectomycorrhizal roots	6 x O	2.06	0.015	41.6 (42.3)

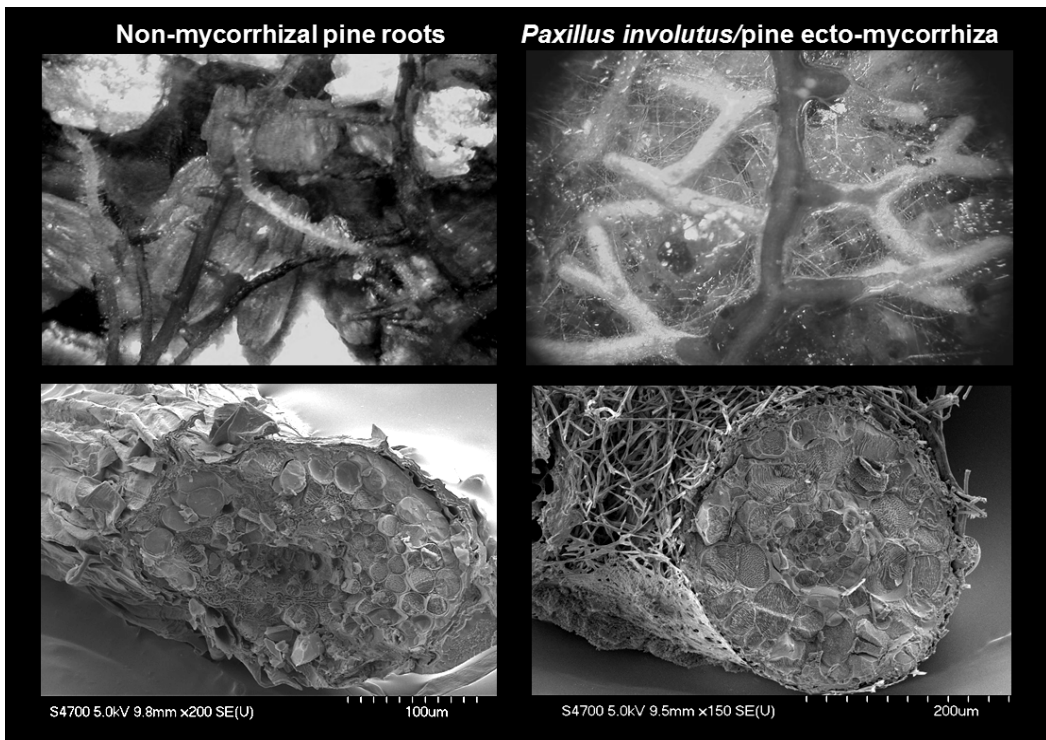


Fig. 6. Typical Cryo-SEM images of cryo-preserved and cryo-fractured Scots pine roots (A) non-mycorrhizal and (B) infected with either *P. involutus* 23 or *P. involutus* 15.

(3) Mesocosm experiment II

In the mesocosm experiments with high amount of zinc phosphate in matrix and the absence and the presence of phosphorus in media it was found that phosphorus deficiency can alter shoot biomass and dramatically change zinc accumulation by ectomycorrhizal and non-mycorrhizal pine roots (Fig. 7, 8).

In mineral-free mesocosms with phosphorus-rich medium the highest shoot biomass was observed for ectomycorrhizal pine seedlings and the least for non-mycorrhizal seedlings (Fig. 7). The shoot biomass of ectomycorrhizal pines decreased with decreasing phosphorus concentration in the medium. The presence of zinc phosphate in matrix under both phosphorus -replete and -deplete conditions led to a significant decrease of shoot biomass in non-mycorrhizal and *P. involutus* 15-ectomycorrhizal seedlings compared to their

mineral-free controls. However, shoot biomass of ectomycorrhizal seedlings with zinc-tolerant mycobiont was not reduced significantly by zinc phosphate, suggesting the protective role of zinc tolerance in *P. involutus* 23, comprising 84-106% of metal-free control values for shoot biomass (Fig. 7). The root:shoot (R:S) ratios for mycorrhizal plants varied from 1.2 to 1.6 and were lower than those for non-mycorrhizal plants varying from 1.8 to 2.9. In non-mycorrhizal plants, phosphorus deficiency significantly increased roots biomass (1.3 times for mineral-free mesocosm and 1.7 times for zinc phosphate treatment) and R:S ratios (1.2 times for mineral-free mesocosm and 1.6 times for zinc phosphate treatment).

Under phosphorus-replete conditions, the least zinc accumulation was found in the roots of ectomycorrhiza with zinc-tolerant mycobiont *P. involutus* 23 and the most in non-mycorrhizal roots, confirming data from the previous experiment with lower zinc phosphate concentration in mesocosms with the specific zinc accumulation order non-mycorrhizal roots>*P. involutus* 15 ectomycorrhiza>*P. involutus* 23 ectomycorrhiza (Figs. 4, 8). In contrast, under phosphorus-deplete conditions the highest zinc accumulation in roots was observed in ectomycorrhiza with zinc-tolerant mycobiont and the least one in ectomycorrhiza with non-tolerant mycobiont, with zinc accumulation order being *P. involutus* 23 ectomycorrhiza > non-mycorrhizal roots>*P. involutus* 15 ectomycorrhiza (Fig. 8). Zinc accumulation in shoots was also different under phosphorus- deplete and replete conditions. In the presence of phosphorus the highest concentration of zinc was accumulated in the shoots of *P. involutus* 15 ectomycorrhizal pines, with order being *P. involutus* 15 ectomycorrhiza>*P. involutus* 23 ectomycorrhiza>non-mycorrhizal shoots (Fig. 8). In the absence of phosphorus in medium the highest zinc accumulation was observed in shoots of *P. involutus* 23-ectomycorrhizal pines, with zinc accumulations order being *P. involutus* 23-ectomycorrhiza>*P. involutus* 15-ectomycorrhiza=non-mycorrhizal shoots. However, in most cases, roots accumulated much higher proportion of zinc compared to shoots.

As a result, in phosphorus-replete conditions, the highest total zinc accumulation by whole pine seedlings was observed in mesocosms with non-mycorrhizal plants with order being non-mycorrhizal pines>*P. involutus* 15-ectomycorrhizal>*P. involutus* 23-ectomycorrhizal pines(Fig. 9A).

The highest amount of mobile water-soluble zinc was found in non-mycorrhizal and *P. involutus* 23-ectomycorrhizal pine seedlings and the least in

P. involutus 15-ectomycorrhizal pines (Fig. 9A). It can be explained by high zinc influx in non-tolerant to zinc mycobiont and, in contrast, enhanced toxicant efflux in zinc-tolerant mycobiont, that have been demonstrated previously in axenic culture.

Vermiculite fraction of hot-water extractable zinc did not differ significantly for all cases and comprised only 6-17% of zinc accumulated in pine seedlings and 22-34% of water-soluble mobile zinc in mesocosm (Fig. 9A).

Because the highest zinc proportion was accumulated by plant/fungal biomass, the total mobilized zinc in mesocosms, which comprises water-soluble in matrix in liquid and vermiculite fractions and zinc accumulated by plant roots and shoots, demonstrated the same order as found for whole plant seedlings non-mycorrhizal pines>*P. involutus* 15-ectomycorrhizal>*P. involutus* 23-ectomycorrhizal pines (Fig. 9A).

In the absence of phosphorus in the medium, the order for total zinc accumulated by whole pine seedlings reflected the order observed for the specific zinc accumulation by roots, being *P. involutus* 23-ectomycorrhizal pines> non-mycorrhizal pines>*P. involutus* 15-ectomycorrhizal pines (Fig. 11B). Mobile water-soluble zinc in liquid fraction of matrix was the highest for non-mycorrhizal seedlings and *P. involutus* 15-ectomycorrhizal pines and the least for *P. involutus* 23-ectomycorrhizal pines. The least zinc amount in water fraction together with the highest zinc accumulation in both shoots and roots in mesocosms with *P. involutus* 23-ectomycorrhizal pine seedlings could reflect the changes in enhanced efflux of toxic metal and therefore in avoidance strategy of zinc tolerant mycobiont in mycorrhizal association under conditions of phosphorus deficiency.

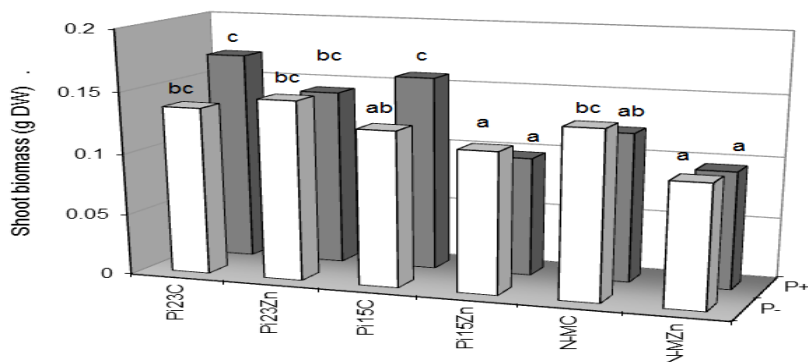


Fig. 7. Shoot biomass for non-mycorrhizal (N-M) and infected with ectomycorrhizal fungi *P. involutus* 15 (Pi15) or *P. involutus* 23 (Pi23) pine seedlings grown in the zinc phosphate presence (Zn) or absence (C - control) under high (P+ dark columns) or low (P- light columns) phosphorus conditions. The different letters denote significant differences at the 5% level using Fisher's LSD test (one-way ANOVA).

The total mobilized zinc in mesocosms as a sum of total zinc accumulated in whole pine seedlings, and zinc in liquid and vermiculite fractions repeated the order obtained for zinc accumulation by the whole pine seedlings: *P. involutus* 23-ectomycorrhizal pines > non-mycorrhizal pines > *P. involutus* 15-ectomycorrhizal pines.

Under both phosphorus-deplete and -replete conditions, mycorrhizal roots accumulated considerably more (3-10 times) phosphorus than non-mycorrhizal roots (Fig. 12). Generally, phosphorus accumulation in ectomycorrhizal roots did not differ significantly. In all cases, phosphorus accumulation by non-mycorrhizal roots grown in the presence of zinc phosphate was significantly higher than that for non-mycorrhizal grown in the mineral absence. In mineral-containing mesocosms, non-mycorrhizal roots grown under phosphorus-deplete conditions accumulated considerably more (twice) phosphorus than those grown under phosphorus-replete conditions.

Mycorrhizal pine seedlings grown under phosphorus-replete conditions accumulated more phosphorus in their shoots than non-mycorrhizal pines grown in the presence of phosphorus, on the one hand, and mycorrhizal pines grown under phosphorus deficiency, on the other hand (Fig. 10). Phosphorus accumulation by shoots for both *P. involutus* 23 and *P. involutus* 15-ectomycorrhizal plants grown on phosphorus-containing media was similar manifesting higher values if zinc phosphate was present in the mesocosms. In contrast, under phosphorus-deplete conditions, the addition of zinc phosphate in mesocosms led to a decrease of phosphorus accumulation by *P. involutus* 23-ectomycorrhizal shoots and an increase of phosphorus accumulation by *P. involutus* 15-ectomycorrhizal shoots compared to mineral-free mesocosms.

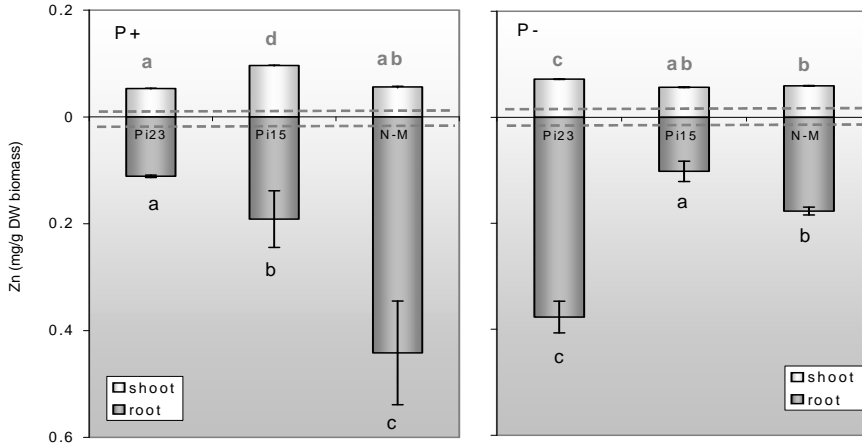


Fig. 8. Specific zinc accumulation by biomass of shoots (dark up-columns) and roots (light down-columns) in non-mycorrhizal pine seedlings (N-M) and ectomycorrhizal pines infected with *P. involutus* 15 (Pi15) or *P. involutus* 23 (Pi23) grown in mesocosms containing zinc phosphate (Experiment II). The actual values for zinc accumulated by root biomass are negative values indicated in plot multiplied by -1, “minus” means only the position of root system within matrix below aerial part of pines. Lines crossing columns for shoots and roots indicate the approx. level of zinc accumulation in pines grown in mineral-free control mesocosms. Bars indicate \pm SEM. The different letters denote significant differences at the 5% level using Fisher’s LSD test (one-way ANOVA) for shoot and root biomass separately.

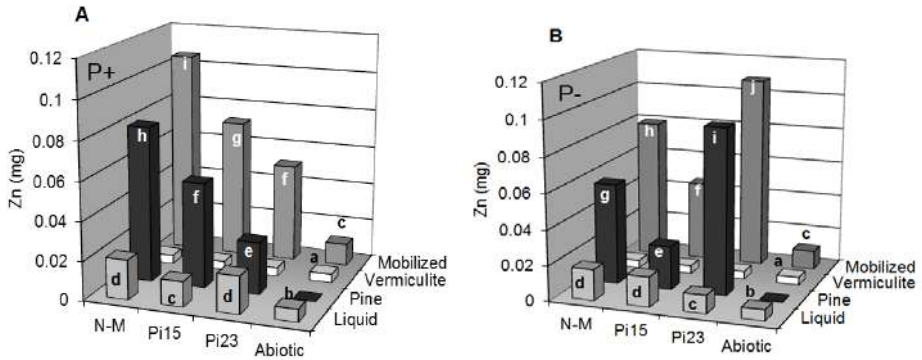


Fig. 9. Total zinc amount per mesocosm: in liquid fraction, in pine seedlings, in vermiculite fraction and total zinc mobilized from zinc phosphate as a sum of all previous fractions for non-mycorrhizal pines (N-M), ectomycorrhizal pines infected with with *P. involutus* 15 (Pi15) or *P. involutus* 23 (Pi23), and pine-free abiotic control mesocosms. The different letters denote significant differences at the 5% level using Fisher's LSD test (one-way ANOVA).

Similarly to phosphorus accumulation by non-mycorrhizal roots, it was found that non-mycorrhizal plants accumulated more phosphorus in shoots biomass when zinc phosphate was present in mesocosms (Fig. 10).

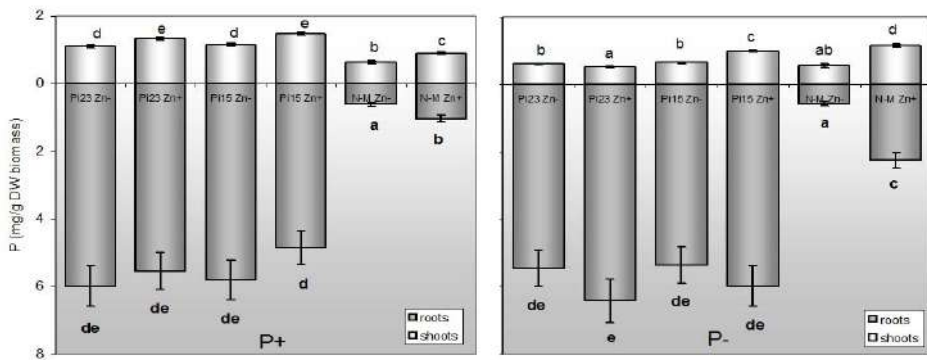


Fig. 10. Specific phosphorus accumulation by biomass of shoots (dark up-columns) and roots (light down-columns) in non-mycorrhizal pine seedlings (N-M) and ectomycorrhizal pines infected with *P. involutus* 15 (Pi15) or *P. involutus* 23 (Pi23) grown in mesocosms containing zinc phosphate (Zn⁺) or in mineral-free mesocosms (Zn⁻) (Experiment II). The actual values for phosphorus accumulated by root biomass are negative values indicated in plot multiplied by -1, “minus” means only the position of root system within matrix below aerial part of pines. Bars indicate

±SEM. The different letters denote significant differences at the 5% level using Fisher's LSD test (one-way ANOVA).

The highest phosphorus accumulation in shoots under phosphorus-deplete conditions was found for non-mycorrhizal pines grown in the presence of zinc phosphate in mesocosms.

Analysis of total phosphorus accumulation by whole pine seedlings also demonstrated that mycorrhizal plants accumulated significantly more phosphorus than non-mycorrhizal (Fig. 11). The phosphorus deficiency increased phosphorus accumulation by non-mycorrhizal plants being twice more for plants grown in zinc phosphate-containing mesocosm compared to control plants.

In the phosphorus presence in the medium, zinc phosphate added into mesocosms significantly decreased total phosphorus accumulation by mycorrhizal plants due to decreased biomass of ectomycorrhizal roots (Fig. 10). However, zinc phosphate presence did not affect phosphorus accumulation by mycorrhizal plants under phosphorus-deplete conditions with only exclusion being the increased phosphorus accumulation in *P. involutus* 23-ectomycorrhizal plants grown in mesocosms containing zinc phosphate, which reflected the highest specific phosphorus accumulation by *P. involutus* 23-ectomycorrhizal roots (Fig. 10, 11).

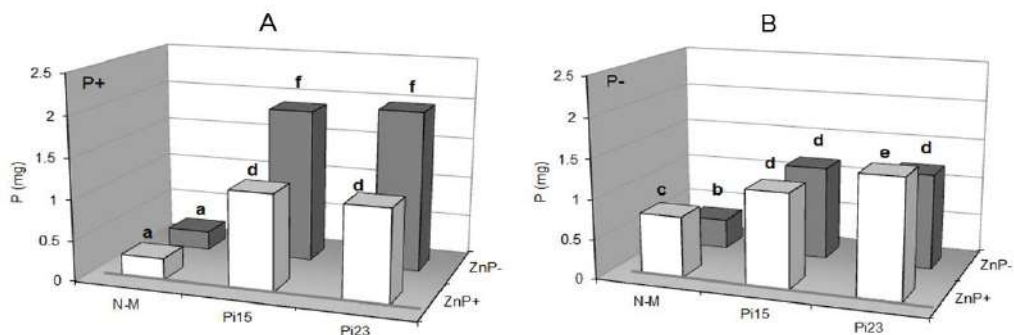


Fig. 11. Total phosphorus accumulated by whole non-mycorrhizal (N-M), and ectomycorrhizal plants infected with *P. involutus* 15 (Pi15) or *P. involutus* 23 (Pi23) in mesocosms containing zinc phosphate (ZnP+) or mineral-free control (ZnP-) under (A) phosphorus -replete (P+) and (B) -deplete (P-) conditions. Lines crossing columns show the approx. amount of phosphorus in liquid fraction of mesocosms. The different

letters denote significant differences at the 5% level using Fisher's LSD test (one-way ANOVA) for shoot and root biomass separately

DISCUSSION

An increasing number of studies demonstrate the variable and context-dependent nature of mutualistic interactions, the outcome of which may vary in space and time in response to abiotic and biotic factors (Setälä et al., 1997). The results of present study showed that zinc phosphate solubilization, and uptake of mobilized zinc and phosphorus by ectomycorrhizal symbiotic association between *Pinus sylvestris* and *P. involutus* were conditional being dependant on (i) ectomycorrhizal infection; (ii) zinc-tolerance of mycobiont; and (iii) phosphorus status of mesocosm.

Studies of P cycling and availability have posed a challenge to agronomists and ecologists for many years because P exists in soils and sediments in many different physico-chemical forms, is involved in a myriad of biological processes, and soil solution P is usually quite low due to complex interactions of phosphate with various soil components (Vance et al., 2003). Plants have evolved two broad strategies for P acquisition and use in nutrient-limiting environments: (1) those aimed at conservation of use; and (2) those directed toward enhanced acquisition or uptake (Lajtha & Harrison, 1995; Horst et al., 2001; Vance, 2001). Processes that lead to enhanced uptake include increased production and secretion of phosphatases, exudation of organic acids, greater root growth (increased root:shoot ratio) along with modified root architecture, expansion of root surface area by prolific development of root hairs and enhanced expression of P_i transporters (Marschener et al., 1986; Duff et al., 1994; Schachtman et al., 1998; Gilroy & Jones, 2000; Lynch & Brown, 2001). The increased root:shoot ratio as a reaction to phosphorus deficient environment observed in our experiments with non-mycorrhizal pine seedlings has been also reported in previous studies on pine (Topa and Cheeseman, 1992; Ahonen-Jonnarth and Finlay, 2001). Plant root exudation includes a wide variety of organic compounds: simple sugars, organic acids, amino acids, phenolics, quinines, (iso)-flavonoids, growth hormones, proteins, and polysaccharides (Curl & Truelove, 1986; Marschener, 1995). Current knowledge shows that organic acids exudation by roots acts as a key component in mechanisms that some plants use to cope with nutrient deficiencies, metal tolerance and plant-microbe interactions operating at the root-soil interface (Marschener, 1995; Ryan et al., 2001; Neumann & Martinoia,

2002; Lopez-Bucio J. et al., 2000). Phosphorus deficiency induces exudation of carboxylic acids and protons in roots with protons release often coincided with increased exudation of carboxylic acids (Raven & Smith, 1976; Neumann and Römheld, 1999). Convincing evidence now exists for exudation of malate and citrate as a principal mechanism in alleviating the adaptive stress of P-deficiency and Al-toxicity allowing the chelation of Al^{3+} , Fe^{3+} and Ca^{2+} , and subsequent displacement of P_i from bound or precipitated form (Vance et al., 2003).

However the most prevalent evolutionary adaptation by land plants (80% of all species) for acquiring P is through mycorrhizal symbioses (Koide & Kabir, 200; Smith et al., 2000; Burleigh et al., 2002; Tibbett & Sanders, 2002; Vance et al., 2003). Mycorrhizal hyphae increase the soil volume that is exploited by roots and alter rhizosphere chemistry through the exudation of organic acids and protons (Lapeyrie et al., 1991; Wallander et al., 1997; Smith and Read, 1997; Vance et al., 2003). Different mycorrhizal types or species may have differing abilities to scavenge P from soils (Wallander et al., 1997) The results of our study demonstrated that in all cases ectomycorrhizal plants accumulated considerably more phosphorus than non-mycorrhizal, which is consistent with previously reported observations (Macfall J., Slack S.A., Iyer J. 1991; Shetty et al., 1995; Wallander et al., 1997; Ahonen-Jonnarth et al., 2003).

In metal contaminated soils, some proportion of phosphorus may exist as toxic metal phosphate minerals with very low solubility, e.g. hopeite, $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$, with $K_{sp}=10^{-35.5}$. It was reported that, in some contaminated soils, e.g. in highly organic soils at moderately pH, most of zinc is organically bound (~45%) and Zn-sorbed phosphate comprises only ~10% (Sarret et al., 2004).

However, as the formation of metal phosphates in metal-contaminated soils (Phosphate-Induced Metal Stabilization (PIMS)) is increasingly recognized as a potentially cost effective in situ remediation technology, it will lead to an increased proportion in soils of reaction products such as hopeite and mixed-metal hopeites (Conca, 1997; Chen et al., 1997; Brown et al., 2004). The reaction products of PIMS-remediation (e.g., hopeite and pyromorphite), in their turn, can be solubilized and transformed by some saprotrophic and mycorrhizal fungi in axenic culture, increasing mobility and therefore bioavailability of toxic metals (Sayer et al., 1995, 1999; Leyval and Joner, 2001; Fomina et al., 2004). Elevated concentrations of such essential for normal plant growth heavy metal as zinc can result in growth inhibition and toxicity symptoms (Hall, 2002).

Plants alone possess a range of potential cellular mechanisms involved in the metal detoxification and tolerance, including metal binding to cell wall and extracellular exudates; reduced uptake or efflux pumping of metals at the plasma membrane; chelation of metals in the cytosol by peptides such as phytochelatins; the repair of stress-damaged proteins; and the compartmentation of metals in the vacuole by tonoplast-located transporters and, finally, they can employ mycorrhiza (Hall, 2002). It is evident that mutualistic fungi can contribute to plant adaptation to extreme environment (Adriaensen et al., 2003). Most studies on ectomycorrhizal associations demonstrated host amelioration of metal toxicity by mycorrhizal fungi, being the most efficient when mycobiont was resistant to toxic metal (Brown and Wilkins, 1985; Jones and Hutchinson, 1986; Colpaert and Van Assche, 1992; Hartley-Whitaker et al., 2000; Jentschke and Godbold, 2000; Van Tichelen et al., 2001; Adriaensen et al., 2003). Mycobionts can filter toxic metals in the hyphal sheath or Hartig net by adsorption, restrict metal mobility in the fungal apoplast due to hydrophobicity of fungal sheath, chelate metals by released organic acids and other substances, and adsorb metal on the external mycelium (Jentschke and Godbold, 2000).

Plant and fungal cell walls act as a cation exchanger due to their negative charges, originating from chemical functional groups, like carboxylic, phosphate, amine or sulphhydryl, in different wall substances (hemicelluloses, pectin, lignin, chitin, various pigments, etc.) (Gadd, 1993; Sjöström, 1993; Sarret et al., 1998; Sunden et al., 2000). Mechanisms for metal immobilization within plant and fungal biomass also include intracellular uptake with complexation to ligands such as S-containing peptides (metallothioneins) (carboxylic acids (citrate, malate, oxalate), and phenolic acids which is thought to occur in plants within vacuoles (Gadd, 1993; Sarret et al., 1998; 2002; Fomina et al., 2005). Because of amorphous state or poor crystallization of such complexes and relatively low metal concentrations, determining the metal speciation in biological systems remains challenging, and unprecedented in the case of ectomycorrhizal roots. Synchrotron-based X-ray microfluorescence and microEXAFS studies on zinc speciation in hyperaccumulating plants *Arabidopsis halleri* grown in contaminated soil showed that zinc was distributed in Zn-malate, Zn-citrate and Zn-phosphate (Sarret et al., 2002). Zn-phosphate was reported to be present in both roots and aerial parts. In aerial parts, Zn was predominantly octahedrally coordinated and complexed to malate (Sarret et al.,

2002). Our EXAFS data on zinc speciation within root biomass of both ectomycorrhizal and non-mycorrhizal pine seedlings showed zinc coordination with six oxygens being complexed by carboxylic groups and, presumably, partly by phosphate groups.

Generally, as the concentration of metal ions in the external solution increases, the uptake by biomass increases too (Greger, 1999), which was also observed for increased concentration of zinc phosphate in mesocosms in our study. However, it has been reported for plants, including mycorrhizal, the existence of ecotype-specific threshold of external Zn concentrations, surpassing which leads to the strong increase of zinc concentration in all plant tissues (Buching and Heyser, 1994; Ernst et al., 2000). All previous studies on zinc toxicity to mycorrhizal plants used soluble zinc salts. In contrast, sparsely soluble zinc phosphate was used in the present study. In the phosphorus-rich mesocosm containing increasing concentrations of zinc-bearing mineral (Experiments I and II) the highest accumulation of zinc in roots and the highest amount of total mobilized zinc in mesocosm were found in non-mycorrhizal seedlings, whereas the least amount of zinc accumulated in roots and mobilized in mesocosm was observed in ectomycorrhiza infected with zinc-tolerant mycobiont.

The changes in the proportions of chemical fractions of accumulated zinc and concentrations of total zinc in roots can suggest the role of ectomycorrhization in the protection of host plant against zinc toxicity by filtration of toxic metal within biomass of fungal mycobiont. This protection can include the specific adsorption or chelation, reflected in the increased proportion of acid-extractable zinc fraction, and in the case of zinc-tolerant strain, by employment of avoidance strategy (e.g. enhanced metal efflux) (Gadd, 1993; Meharg, 2003) reflected in the significant reduction of the mobile zinc.

No clear relationship between exudation of organic acids and uptake of P in mycorrhizal pines growing on apatite has been reported (Wallander et al., 1997). Similarly, no correlation was found between exudation of organic acids into mesocosm and zinc and phosphorus uptake by seedlings in our experiments. However, in our case, organic acids were sampled only in the end of experimental course and ultrafiltration was not used in the study, presumably, some organic acid exudates remained undetected because of low concentrations and decomposition. Besides, if to take into account that the majority of mycogenic mineral dissolution and transformation processes occur in the

microenvironment (Burford et al., 2003), even very small amounts of organic acids and minor changes in pH in mesocosm scale can turn to the significant weathering factor if concentrated in microscale. No obvious mycogenic or phytogenic secondary minerals precipitated, particularly, in crystalline form were observed in our experiments which can be explained by the fact that neither mycobionts nor host plant produced substantial or even detectable amounts of metabolite with strong chelating and mineral-transforming potential (e.g. oxalate).

That roots contain much higher levels of metal than shoots is a common for higher plants (Greger, 1999) and it was, in general, observed in our experiments. The metal translocation from the roots to the shoots is not a simple, uncontrolled process in which affixed proportion of metals taken by the roots is delivered to the shoots (Vodnik et al., 1999; Jentschke and Gobold, 2000). Our data showed that, under phosphorus-replete conditions, infection with zinc-tolerant mycobiont *P. involutus* 15 led to the significantly higher zinc concentration in shoots and $\text{zinc}_{\text{shoot}}:\text{zinc}_{\text{root}}$ ratio in pine seedlings than for non-mycorrhizal pines. Meanwhile zinc concentration in shoots of seedlings infected with zinc-tolerant mycobiont *P. involutus* 23 did not differ considerably from that of non-mycorrhizal pines. In general, under high-phosphorus conditions, in terms of metal accumulation zinc-tolerant *P. involutus* 23-ectomycorrhiza provided the best protection against zinc toxicity to host plant.

Arbuscular mycorrhizal fungi from Zn contaminated site were also found to be more effective in increasing plant biomass at higher levels of Zn in the soil, whereas plant growth at lower levels of soil Zn was greater with mycorrhizal fungi from a non-contaminated site (Shetty et al., 1995).

As it was shown in our Experiment II non-mycorrhizal pine seedlings responded to low phosphorus conditions with increased root biomass and R:S ratio in contrast to ectomycorrhizal pines. It could indicate that ectomycorrhizal infection changed strategies aimed at P acquisition in nutrient-limiting environments and, probably, smoothed P-deficiency stress for host plant in both presence and absence of zinc phosphate.

There is not much known about the effects of zinc interference in phosphorus-deficiency on plants and, particularly, mycorrhizal plants. Zinc ions play a specific role in the regulation of genes encoding high-affinity P transporters in plant roots (Huang et al., 2000; Andriansen et al., 2003). It is thought that in soils containing elevated levels of zinc, plant growth may be

impaired because of Zn interference with P uptake by plants and because of detrimental effects of Zn toxicity itself (Shetty et al., 1995). The study on arbuscular mycorrhizal plants, *Andropogon gerardii* Vitm., showed that in the absence of P amendment, mycorrhizal fungi stimulated plant growth, but the degree of benefit depended on the inoculum source and the soil Zn level (Shetty et al., 1995). It has been reported that phosphorus deficiency could enhance some metals (molybdenum) uptake by plants (Schwamberger and Sims, 1991; Heuwinkel et al., 1992). However, it was not observed for zinc in our study for non-mycorrhizal pines in mineral-free mesocosms and also in previous studies on arbuscular mycorrhizas where P amendment resulted in increased shoot Zn uptake by *A. gerardii* (Shetty et al., 1995). The same authors demonstrated that mycorrhizal fungus inoculation had no effect on shoot Zn concentration, however, inoculation significantly improved the plant P nutrition and therefore resulted in a high shoot P/Zn concentration ratio at all the soil Zn levels.

Our study on zinc phosphate solubilization and zinc and phosphorus uptake by mycorrhizal and non-mycorrhizal pines under low phosphorus conditions showed quite different results from those obtained under phosphorus-replete conditions. In contrast to high-P mesocosms, under the low-phosphorus conditions a mycorrhizal seedlings infected with zinc-tolerant *P. involutus* 23 considerably increased total dissolution of zinc phosphate, zinc mobilization and accumulation by plant, and, particularly, metal accumulation in shoot, showing the highest values compared to non-mycorrhizal and *P. involutus* 15-ectomycorrhizal pines. So, under phosphorus-deplete conditions, *P. involutus* 23 ectomycorrhiza failed to function as the best protector for pine in terms of toxic metal translocation from roots to shoots and employing avoidance strategy in metal uptake by roots. Meanwhile, in the presence of zinc phosphate in low-phosphorus mesocosm, *P. involutus* 23 ectomycorrhiza accumulated the highest phosphorus amount in roots and as a result in whole plant biomass however demonstrated decreased P translocation from roots to shoots compared to mineral-free control. It is not clear yet how significant the role of host plant was in those failures. But it can be concluded that the host plant protection against toxic metals provided by metal-tolerant ectomycorrhizal mycobiont is circumstantial.

All types of pine seedlings considerably enhanced (4-9 times) zinc mobilization from zinc phosphate compared to abiotic controls. The presence of phosphorus-bearing mineral led to the significant increase of P accumulation by

non-mycorrhizal plants under both phosphorus deficiency and high-phosphorus in medium. Plant alone could solubilize zinc phosphate, protect against zinc toxicity and acquire mobilized from mineral zinc in both roots and shoots to cope with P-deficiency stress. Zinc phosphate addition to the mesocosms also increased P accumulation in the shoots of ectomycorrhizal seedlings under both phosphorus-replete and -deplete conditions (with only exclusion for *P. involutus* 23 ectomycorrhiza in low-P mesocosm).

For ectomycorrhizal pines the sufficient uptake of P_i is essential for the productivity of both symbiotic partners, and polyphosphates are thought to contribute to the cellular homeostasis of Zn in fungal cells (Bücking and Heyser, 1999). Polyphosphate vacuolar granules were found in different ectomycorrhizal fungi, including *P. involutus*, suggesting that in a mycorrhizal association higher proportions of absorbed phosphate were translocated into the metabolically inactive polyphosphate pool important for the nutrition of the ectomycorrhizal host plant (Bücking and Heyser, 1999). Polyphosphate pool could be reflected in much higher amounts of phosphorus in ectomycorrhizal roots observed in our study.

As, in general, both non-mycorrhizal and ectomycorrhizal seedlings gained increased phosphorus amount in shoots when zinc phosphate was present in matrix, it can be suggested that they used phosphorus mobilized from mineral. So both infected with ectomycorrhizal mycobiont and non-mycorrhizal pine trees are able to dissolve zinc phosphate, tolerate metal toxicity and acquire mobilized phosphorus.

Acknowledgements

Author would like to acknowledge the funding of BBSRC/BIRE programme (94/BRE13640), CCLRC Daresbury Synchrotron Radiation Source, UK (SRS user grant 40107, 43079) and personally Prof Geoffrey M. Gadd (University of Dundee) for the opportunity to do this work and Dr John Charnock (University of Manchester) for his valuable help with EXAFS spectra analysis.

REFERENCES

Ahonen-Jonnarth U., Finlay R.D. Effects of elevated nickel and cadmium concentrations on growth and nutrient uptake of mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings // Plant and Soil. - 2001. - 236, N2. - P. 129-138.

- Ahonen-Jonnarth U., Goransson A., Finlay R.D.** Growth and nutrient uptake of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings in a natural substrate treated with elevated Al concentrations // *Tree Physiology*. - 2003. - **23**, N3. - P. 157-167.
- Andriaensen K., Van der Lelie D., Van Laere A., Vangrosveld J. and Colpaert J.V.** A zinc-adapted fungus protects pines from zinc stress // *New Phytol.* - 2003. - **161**. - P. 549-555.
- Binsted N.** Daresbury Laboratory EXCURV98 Program, 1998.
- Binsted, N., Strange R.W. and Hasnain S.S.** Constrained and restrained refinement in EXAFS data analysis with curved wave theory // *Biochem.* - 1992. - **31**. - P. 12117-12125.
- Brown M.T., Wilkins D.A.** Zinc tolerance of mycorrhizal *Betula* // *New Phytol.* - 1985. - **99**. - P. 101-106.
- Brown S., Chaney R., Hallfrisch J., Ryan J.A. and Berti W.R.** In Situ Soil Treatments to Reduce the Phyto- and Bioavailability of Lead, Zinc, and Cadmium // *J. Environ. Qual.* - **2004**. - **33**. - P. 522-531.
- Bücking H., Heyser W.** The effect of ectomycorrhizal fungi on Zn uptake and distribution in seedlings of *Pinus sylvestris* L. // *Plant and Soil*. - 1994. - **167**, N2. - P. 203-212.
- Bücking H., Heyser W.** Elemental composition and function of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi - an X-ray microanalytical study // *Mycological Research*. - 1999. - **103**. - P. 31-39
- Burford, E.P., Fomina M. and Gadd G.M.** Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals // *Mineralogical Magazine* - 2003. - **67**. - P. 1127-1155.
- Burgstaller W. and Schinner F.** Leaching of metals with fungi // *Journal of Biotechnology*. - 1993. - **27**. - P. 91 - 116.
- Burleigh S.H., Cavagnaro T. and Jakobsen I.** Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition // *Journal of Experimental Botany*. - 2002. - **53**. - P. 1593-1601.
- Callot G, Mousain D, Plassard C.** Concentration of calcium carbonate on the walls of fungal hyphae // *Agronomie*. - 1985. - **5**. - P. 143-150.
- Chen X.-B., Wright J.V., Conca J.L. and Peurrung L.M.** Evaluation of heavy metal remediation using mineral apatite // *Water, Air and Soil Pollution*. 1997. - **98**. - P. 57-78.
- Colpaert, J.V., Van Assche, J.A.** Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* // *Plant and Soil* 1992. - **143**. - P. 201-211.

- Colpaert JV, Vandenkoornhuysen P, Adriaensen K, Vangronsveld J.** Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus* // *New Phytol.* - 2000. - **147**. - P. 367-379.
- Colpaert J.V., Muller L.A.H., Lambaerts M., Andriaensen K. and Vangronsveld J.** Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi // *New Phytol.* - 2004. - **162**. - P. 549-559.
- Conca J.L.** Phosphate-Induced Metal Stabilization (PIMS). Final report to the U.S. Environmental Protection Agency 68D60023, Res. Triangle Park, NC. - 1997.
- Curl E.A., Truelove B.** *The Rhizosphere.* Berlin, Germany: Springer-Verlag - 1986.
- Duff S.M.G., Sarath G. and Plaxton W.C.** The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism // *Physiologia Plantarum.* - 1994. - **90**. - P. 791-800.
- Ernst W.H.O., Nelissen H.J.M., Ten Bookum W.M.** Combination toxicology of metal-enriched soils: physiological responses of Zn- and Cd-resistant ecotypes of *Silene vulgaris* on polymetallic soils // *Environmental and Experimental Botany.* - 2000. - **43**, N1. - P. 55-71.
- Fomina M., Alexander I.J., Hillier S. and Gadd G.M.** Zinc phosphate and pyromorphite solubilization by soil plant-symbiotic fungi. *Geomicrobiological Journal.* - 2004. - **21**, N5. - P. 351-366.
- Fomina M., Burford E.P. and Gadd G.M.** Toxic metals and fungal communities. In: *The Fungal Community*, 3rd edition (eds. J. Dighton, P. Oudemans and J. White), CRC Press, New York. - 2005. -pp. 733-758.
- Gadd, G.M.** Interactions of fungi with toxic metals // *New Phytol.* - 1993. - **124**. - P. 25-60.
- Gharieb M.M., Gadd G.M.** Influence of nitrogen source on the solubilization of natural gypsum // *Mycol. Res.* - 1999. - **103**. - P. 473-481.
- Gilroy S., Jones D.L.** Through form to function: root hair development and nutrient uptake // *Trends in Plant Science.* - 2000. - **5**. -P. 56-60.
- Greger M.** Metal availability and bioconcentration in plants. In: *Heavy metal stress in plants from molecules to ecosystem*, (eds. M.N.V.Prasad, J. Hagemeyer), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, - 1999. - pp. 1-27.
- Gurman, S. J., Binsted N., Ross I.** A rapid, exact, curved-wave theory for EXAFS calculations // *J. Phys. C.* - 1984. - **17**. - P. 143-151.

- Gurman, S. J., Binsted N., Ross I.** A rapid, exact, curved-wave theory for EXAFS calculations. 2. The multiple-scattering contributions // J. Phys. C. -1986. - **19**. - P. 1845-1861.
- Hall J.L.** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // J. Exp. Bot. -2002. - **53**, N1. P. 1-11.
- Hartley-Whitaker J., Cairney J.W.G., Meharg A.A.** Sensitivity to Cd and Zn of host and symbiont of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* L. (Scots pine) seedlings // Plant and Soil. - 2000. - **218**, N1-2. - P. 31-42.
- Hedin L., Lundqvist S.** Effects of electron-electron and electron-phonon interactions on the one-electron states of solids // Solid State Phys. - 1969. - **23**. - P. 1-181.
- Heuwinkel H., Kirkby E.A., Le Bot J., Marschner H.** Phosphorus deficiency enhances molybdenum uptake by tomato plants // J. Plant Nutr. - 1992. - **15**, N5. - P. 549 - 568.
- Horst W.J., Kamh M., Jibrin J.M. and Chude V.A.** Agronomic measures for increasing P availability to crops // Plant and Soil. - 2001. - **237**. - P. 211-233.
- Ingestad T.** Mineral nutrient requirements of *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings // *Physiol. Plant Pathol.* - 1979. - **45**. - P. 373-380.
- Jentschke G., Godbold D.L.** Metal toxicity and ectomycorrhizas // *Physiologia Plantarum* 2000. - **109**. -P. 107-116.
- Jones M.D., Hutchinson T.C.** Nickel toxicity in mycorrhizal birch seedlings infected with *Lactarius rufus* or *Scleroderma flavidum*. II Uptake of nickel, calcium, magnesium, phosphorus and iron // *New Phytol.* - 1988. - **108**. - P. 461-470.
- Jongmans AG, Van Breemen N, Lundstrom U, Van Hees PAW, Finlay RD, Srinivasan M, Unestam T, Giesler R, Melkerud PA, Olsson M.** Rock-eating fungi // *Nature* - 1997. - **389**. - P. 682-683
- Koide R.T., Kabir Z.** Nutrient economy of red pine affected by interactions between *Pisolithus tinctorius* and other forest-floor microbes // *New Phytol.* - 2001. - **105**, N1. - P. 179-188.
- Lajtha K., Harrison A.F.** Strategies of phosphorus acquisition and conservation by plant species and communities. In: *Phosphorus in the global environment*, (ed. Tiessen H), Chichester, UK: John Wiley Sons Ltd, -1995. - pp. 140-147.

- Lapeyrie F, Picatto C, Gerard J, Dexheimer J.** TEM study of intracellular and extracellular calcium oxalate accumulation by ectomycorrhizal fungi in pure culture or in association with *Eucalyptus* seedlings // *Symbiosis*. - 1990. - **9**. - P. 163-166.
- Lapeyrie, F., Ranger, J., Vairelles, D.** Phosphate-solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi *in vitro* // *Canadian Journal of Botany*. - 1991. - **69**. - P. 342-346.
- Van Leerdam D.M., Williams P.A., Cairney J.W.G.** 2001. Phosphate-solubilizing abilities of ericoid mycorrhizal endophytes of *Woollisia pungens* (Epacridaceae) // *Aust. J. Botany*. - 2001. - **49**. - P. 75-80.
- Leyval C, Joner EJ.** Bioavailability of heavy metals in the mycorrhizosphere. In: *Trace Elements in the Rhizosphere*, (eds Gobran G.R., Wenzel W.W., Lombi E.), CRC Press, Boca Raton, Florida. - 2001. - pp. 165-185.
- Lopez-Bucio J., Nieto-Jacobo M.F., Ramirez-Rodriguez V., Herrera-Estrella L.** Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils // *Plant Science*. - 2000. - **160**, N1. - P. 1-13.
- Lundstrom U.S., Van Breemen N., Bain D.** The podzolization process. A review // *Geoderma*, 2000. - **94**. - P. 91-107.
- Lynch J.P. and Brown K.M.** Topsoil foraging – an architectural adaptation of plants to low phosphorus // *Plant and Soil*. -2001. - **237**. - P. 225-237.
- Macfall J., Slack S.A., Iyer J.** Effects of *Hebeloma arenosa* and phosphorus fertility on growth of red pine (*Pinus resinosa*) seedlings // *Canadian Journal of Botany*. - 1991. - **69**, N2. - P. 372-379.
- Marschener H.** Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. Boston, MA, USA: Academic Press. - 1995.
- Marschener H., Römheld V., Horst W.J. and Martin P.** Root induced changes in the rhizosphere: importance for mineral nutrition of plants // *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* - 1986. - **149**. - P. 441-456.
- Martino E., Perotto S., Parsons R., Gadd G.M.** Solubilization of insoluble inorganic zinc compounds by ericoid mycorrhizal fungi derived from heavy metal polluted sites // *Soil. Biol. Biochem.* - 2003. - **35**. - P. 133-141.
- Meharg A.A.** The mechanistic basis of interactions between mycorrhizal associations and toxic metal cations // *Mycol. Res.* 2003. - **107**, N11. - P. 1253-1265.

- Meharg A.A., Cairney J.W.G.** Co-evolution of mycorrhizal symbionts and their hosts to metal-contaminated environments // *Adv. Ecol. Res.* - 2000. - **30**. - P. 69-112.
- Neumann G., Martinoia E.** Cluster roots – an underground adaptation for survival in extreme environments // *Trends in Plant Science.* - 2002. - **7**. - P. 162-167.
- Neumann G. and Römheld V.** Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus deficient plants // *Plant and Soil.* - 1999. - **211**. - P. 121-130.
- Olsen S.R. and Sommers L.E.** Phosphorus, In: *Methods of Soil Analysis. Part 2*, (eds. A.L Page, Miller R.H., Keeney D.R.) Chemical and Microbiological Properties, American Society of Agronomy, Madison, USA, - 1982. - pp. 403-429.
- Olsson P.A., Wallander H.** Interactions between ectomycorrhizal fungi and the bacterial community in soils amended with various primary minerals // *FEMS Microbiology Ecology.* -1998. - **27**. - P. 195-205.
- Perotto S., Martino E.** Molecular and cellular mechanisms of heavy metal tolerance in mycorrhizal fungi: what perspectives for bioremediation? // *Minerva Biotechnologica.* - 2001. - **13**. - P. 55-63.
- Peterson R.L., Chakravarty P.** Techniques for mycorrhizal research (eds. Norris J.R., Read D.J., Varma A.K.), Academic Press, London. - 1991. - pp.75-105.
- Raghothama K.G.** Phosphate acquisition // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* - 1999. - **50**. - P. 665-693.
- Raven J.A., Smith F.A.** Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation // *New Phytol.* - 1976. - **76**. - P. 415-431.
- Ryan P.R., Delhaize E., Jones D.L.** Function and mechanism of organic anion exudation from plants // *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* - 2001. - **52**. - P. 527-560.
- Sarret G., Manceau A., Cuny D., Van Haluwyn C., Deruelle S., Hazemann J.-L., Soldo Y., Eybert-Berard L., Menthonnex J.-J.** Mechanisms of lichen resistance to metallic pollution // *Envir. Sc. Technol.* -1998. - **32**. - P. 3325-3330.
- Sarret G., Saumitou-Laprade P., Bert V., Proux O., Hazemann J.-L., Traverse A., Marcus M.A. and Manceau A.** Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* // *Plant Physiology* 2002. - **130**. - P. 1815-1826.
- Sarret G., Balesdent J., Bouziri L., Garnier J.-M., Marcus M.A., Geoffroy N., Panfili F., Manceau A.** Zn speciation in the organic horizon of a contaminated

- soil by micro-X-ray fluorescence, micro- and powder-EXAFS spectroscopy, and isotopic dilution // Environ. Sci. Technol. - 2004. - **38**, N10. - P. 2792-2801
- Sayer, J.A., Raggett, S.L., Gadd, G.M.** Solubilization of insoluble compounds by soil fungi: development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance // Mycol. Res. - 1995. - **99**. - P. 987-993.
- Sayer, J.A., Gadd, G.M.** Solubilisation and transformation of insoluble metal compounds to insoluble metal oxalates by *Aspergillus niger* // Mycol. Res. - 1997. - **101**. - P. 653-661.
- Sayer, J.A. Cotter-Howells, J.D., Watson, C., Hillier, S., Gadd, G.M.** Lead mineral transformation by fungi // Current Biology - 1999. - **9**. - P. 691-694.
- Setälä H., Rissanen J., Markkola A.M.** Conditional outcomes in the relationship between pine and ectomycorrhizal fungi in relation to biotic and abiotic environment // Oikos - 1997. - **80**, N1. - P. 112-122.
- Schwamberger E.C., Sims J.L.** Effect of soil pH, nitrogen source, phosphorus, and molybdenum on early growth and mineral nutrition of burley tobacco // Communications in Soil Science and Plant Analysis. - 1991. - **22**, N7-8. - P. 641-657
- Schachtman D.P., Reid R.J. and Ayling S.M.** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell // Plant Physiology 1998. - **116**. - P. 447-453.
- Shetty K.G., Hetrick B.A.D., Schwab A.P.** Effects of mycorrhizae and fertilizer amendments on zinc tolerants of plants // Environ. Pollution. - 1995. - **88**, N3. - P. 307-314.
- Sjöström E.** The origin of charge on cellulosic fibers // Nordic Pulp and Paper Research Journal. - 1989. - **4**, N2. - P. 90-93.
- Sjöström E.** Wood chemistry, Fundamentals and Applications. 2nd ed., Academic press, Inc. Orlando, Florida, USA. -1993.
- Smith F.W., Rae A.L., Hawkesford M.J.** Molecular mechanisms of phosphate and sulfate transport in plants // Biochimica et Biophysica Acta. - 2000. - **1465**. - P. 236-245.
- Smith S.E. and Read D.J.** Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, UK - 1997.
- Sundén A., Brelid H., Rindby A., Engström P.** Spatial distribution and modes of chemical attachment of metal ions in spruce wood // Journal of Pulp and Paper Science. - 2000. - **26**, N10. - P. 352-357.

- Tibbett M. and Sanders F.E.** Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality // *Annals of Botany*. - 2002. - **89**. - P. 783-789.
- Van Tichelen K.K., Colpaert J.V., Vangronsveld J.** Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity // *New Phytol.* - 2001. - **150**. - P. 203-213.
- Topa M.A., Cheeseman J.M.** Carbon and phosphorus partitioning in *Pinus serotina* seedlings growing under hypoxic and low-phosphorus conditions // *Tree Physiology* 1992. - **10**. - P. 195-207.
- Vance C.P.** Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition: plant nutrition in a world of declining renewable resources // *Plant Physiology*. - 2001. - **127**. - P. 390-397.
- Vance C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L.** Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a non-renewable resource // *New Phytol.* - 2003. - **157**. - P. 423-447.
- Vodnik D., Byrne A.R., Gogala N.** The uptake and transport of lead in some ectomycorrhizal fungi in culture // *Mycol. Res.* - 1998. - **102**. - P. 953-958.
- Vodnik D., Jentschke G., Fritz E., Gogala N., Godbold D.L.** Root-applied cytokinin reduces lead uptake and affects its distribution in Norway spruce seedlings // *Physiol. Plant.* - 1999. - **106**. - P. 75-81.
- Wallander H., Wickman T., Jacks G.** Apatite as a source in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings // *Plant and Soil*. - 1997. - **196**. - P. 123-131.
- Wenzel C.L., Ashford A.E., Summerell B.A.** Phosphate-solubilizing bacteria associated with proteoid roots of seedlings of warratah [*Telopea speciosissima* (Sm.) R. Br.] // *New Phytol.* - 1994. - **128**. - P. 487-496.
- Whitelaw MA.** Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi // *Adv. Agron.* - 2000. - **69**. - P. 99-151.
- Whitelaw, M.A., Harden, T.J., Helyar, K.R.** Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum* // *Soil Biol. Biochem.* - 1999. - **31**. - P. 655-665.

М.О. ФОМІНА

ВПЛИВ СТІЙКОСТІ МІКОБІОНТУ ДО ЦИНКУ І ДОСТУПНОСТІ
ФОСФОРУ НА РОЗЧИННІСТЬ ФОСФАТУ ЦИНКА ТА НАКОПИЧЕННЯ
ЦИНКУ І ФОСФОРУ ЕКТОМІКОРИЗНИМИ АСОЦІАЦІЯМИ
RAHILLUS INVOLUTUS З СОСНОЮ

Механізми, за допомогою яких гриби і рослини поглинають фосфати у мікоризосфері, представляють інтерес, оскільки солюбілізація неорганічних фосфатів може призвести до вивільнення зв'язаних в них металів. Ми припустили, що будь-який ектомікоризний захист рослин-хазяїв від токсичних металів, мобілізованих з мінералів, може залежати від стійкості грибів до металів і доступності фосфору у довкіллі.

Наші результати показали, що у присутності фосфата цинку у матриці як немікоризні рослини сосни звичайної (*Pinus sylvestris*), так і заражені ектомікоризними грибами *Rhizillus involutus* сосни, могли посилювати розчинення фосфата цинку, проявляти толерантність до токсичного металу і поглинати мобілізований фосфор, збільшуючи кількість фосфору в пагонах. Проте солюбілізація фосфата цинку і поглинання мобілізованих цинку й фосфору немікоризними соснами і ектомікоризними симбіотичними асоціаціями *P. sylvestris* / *P. involutus* залежали від ряду умов, серед яких - (i) наявність ектомікоризної інфекції; (ii) стійкість мікобійнта до цинку; і (iii) фосфорний статус мезокоосма.

У присутності джерела фосфору ектомікориза, інфікована цинкостійким *P. involutus* 23, накопичувала значно менше, ніж немікоризні рослини, і в цілому забезпечувала найкращий захист від токсичності цинку для рослини-хазяїна, використовуючи стратегію «уникнення металу». Ектомікоризна інфекція викликала зміни у пропорціях хімічних фракцій накопиченого цинку, зменшуючи співвідношення найбільш біодоступного цинку (водорозчинного і екстрагованого сіллю) у кореневій біомасі у порівнянні з немікоризними проростками. Однак природа хімічного зв'язування цинку у кореневій біомасі була дуже подібною як в ектомікоризних, так і в немікоризних проростках, демонструючи октаедричну координацію цинку кисень-вмісними лігандами, що відповідає карбоксилатній і, частково, фосфатній координації.

На відміну від мезокоосмів з високим вмістом фосфору, в умовах низького вмісту фосфору мікоризні проростки, інфіковані цинкостійким *P. involutus* 23, суттєво збільшували загальне розчинення

фосфата цинку, мобілізацію і накопичення цинку рослинами, і, зокрема, накопичення металу у пагоні, показуючи найвищі значення порівняно з ектомікоризними соснами з *P. involutus* 15 і немікоризними соснами. Ектомікоризна інфекція як цинко-толерантними, так і нетолерантними до цинку мікобіонтами підтримувала високу концентрацію фосфора в мікоризних коренях як в умовах фосфорного дефіциту, так і в умовах достатнього забезпечення фосфором.

М.А. ФОМИНА

ВЛИЯНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ МИКОБИОНТА К ЦИНКУ И ДОСТУПНОСТИ ФОСФОРА НА РАСТВОРЕНИЕ ФОСФАТА ЦИНКА И НАКОПЛЕНИЕ ЦИНКА И ФОСФОРА ЭКТОМИКОРИЗНЫМИ АССОЦИАЦИЯМИ *RAHILLUS INVOLUTUS* С СОСНОЙ

Механизмы, с помощью которых грибы и растения поглощают фосфаты в микоризосфере, представляют интерес, поскольку солюбилизация неорганических фосфатов может привести к высвобождению связанных в них металлов. Мы предположили, что любая эктомикоризная защита растений-хозяев от токсичных металлов, мобилизованных из минералов, может зависеть от устойчивости грибов к металлам и доступности фосфора в окружающей среде.

Наши результаты показали, что в присутствии фосфата цинка в матриксе как немикоризные растения сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*), так и зараженные эктомикоризными грибами *Rhizoglyphus melleus* сосны могли усиливать растворение фосфата цинка, проявлять толерантность к токсичному металлу и поглощать мобилизованный фосфор, увеличивая количество фосфора в побегах. Однако солюбилизация фосфата цинка и поглощение мобилизованных цинка и фосфора немикоризными соснами и эктомикоризными симбиотическими ассоциациями *P. sylvestris* / *P. involutus* зависели от ряда условий, включая (i) наличие эктомикоризной инфекции; (ii) устойчивость микобионта к цинку; и (iii) фосфорный статус мезокосма.

В присутствии источника фосфора эктомикориза, инфицированная цинкоустойчивым *P. involutus* 23, накапливала гораздо меньше цинка, чем немикоризные растения, и в целом обеспечивала наилучшую защиту от токсичности цинка для растения-хозяина, используя стратегию «избегания металла». Эктомикоризная инфекция вызывала изменения в

пропорциях химических фракций накопленного цинка, уменьшая соотношение наиболее биодоступного цинка (водорастворимого и экстрагируемого солью) в корневой биомассе по сравнению с немикоризными проростками. Однако природа химического связывания цинка в корневой биомассе была очень сходной как в эктомикоризных, так и в немикоризных проростках, демонстрируя октаэдрическую координацию цинка кислородсодержащими лигандами, соответствующую карбоксилатной и, частично, фосфатной координации.

В отличие от мезокосмов с высоким содержанием фосфора, в условиях низкого содержания фосфора микоризные проростки, инфицированные цинкоустойчивым *P. involutus* 23, значительно увеличивали общее растворение фосфата цинка, мобилизацию и накопление цинка растениями и, в частности, накопление металла в побегах, показывая наивысшие значения по сравнению с эктомикоризными соснами с *P. involutus* 15 и немикоризными соснами. Эктомикоризная инфекция как цинко-толерантными, так и нетолерантными к цинку микобионтами поддерживала высокую концентрацию фосфора в микоризных корнях как в условиях фосфорного дефицита, так и в условиях достаточной обеспеченности фосфором.

А.А. ГРОДЗИНСКАЯ

Институт эволюционной экологии НАН Украины
agrodz@ukr.net

БИОАККУМУЛЯЦИЯ РАДИОНУКЛИДОВ ПЛОДОВЫМИ ТЕЛАМИ МАКРОМИЦЕТОВ

В обзоре представлены литературные и оригинальные сведения о биоаккумуляции природных и техногенных радионуклидов в плодовых телах макромицетов. Несмотря на то, что с момента аварии прошло уже более 30 лет и радиоэкологическая ситуация в Украине улучшилась, до настоящего времени дикорастущие макромицеты из регионов, загрязненных в результате Чернобыльской катастрофы, представляют опасность для здоровья населения в результате их употребления в пищевых и лекарственных целях. Учитывая комплексный характер радионуклидного загрязнения дикорастущих макромицетов на территории Украины и сопредельных государств, подчеркнута необходимость долгосрочного радиоэкологического мониторинга с использованием биоиндикаторных видов.

Ключевые слова: радионуклиды, грибы, биоиндикаторы

Глобальные последствия ядерных аварий обуславливают необходимость длительного радиоэкологического мониторинга окружающей среды. Ключевая роль микобиоты заключается не только в процессах биогенной миграции радионуклидов в почвах, но и в иммобилизации и удержании значительного их количества почвенной мицелиальной биомассой (Dighton et al., 1991; Steiner et al., 2002; Gadd, 1996; Grodzinskaya et al., 2007; Гродзинская и др., 2013).

Обширные литературные данные последних десятилетий посвящены высоким накопительным свойствам макромицетов по отношению к тяжелым металлам, радионуклидам природного и техногенного происхождения (Guillite et al., 1986; Haselwandter et al., 1988, 1994; Ногына, Randa, 1988; Вурне et al., 1988; Dietl, Breitig, 1988; Teherani, 1988; Haselwandter, Berreck, 1989, 1994; Bakken, Olsen, 1990; Bem et al., 1990; Fraiture et al., 1990; Borio et al., 1991; Dighton et al., 1991; Вассер та ін., 1991, 1992, 1995; Smith et al., 1993; Mietelski et al., 1993, 1994a, b, 2010; Федоров,

Елиашевич, 2000; Kalač, 2001, 2012; Yoshida, Muramatsu, 1994, 1998; Щеглов, 1999; Skwarzec, Jakusik, 2003; Baeza et al., 2004; Ban-nai et al., 2004; Dvořák et al., 2006; Dementyev, Bolsunovsky, 2009; Falandysz, Borovicka, 2013; Lehto et al., 2013; Falandysz et al., 2016,2017).

Впервые Г. Грейтер в 1963 г. обнаружил аккумуляцию радионуклидов макромицетами из глобальных осадков в результате надземных испытаний ядерного оружия. В образцах шляпочных грибов из Западной Германии было показано наличие избирательного накопления не только ^{137}Cs , но и других продуктов распада, а именно ^{144}Ce , ^{106}Ru , ^{90}Rh и ^{90}Sr (Grüter, 1971).

В дочернобыльский период самая высокая активность ^{137}Cs (до 25,2 кБк/кг сухой массы) была обнаружена австрийским ученым К. Хазельвандтером у *Cortinarius armillatus* (Haselwandter, 1977).

Исследования биоаккумуляции и переноса радионуклидов из почвы в плодовые тела макромицетов после Чернобыльской катастрофы были сосредоточены преимущественно на главных дозообразующих радионуклидах - ^{137}Cs (а в первые послеаварийные годы в сочетании с ^{134}Cs) и лишь отчасти ^{90}Sr . Этим объясняется недостаточная изученность аккумуляции макромицетами других радионуклидов как природного, так и техногенного происхождения, интерес к которым усилился лишь в последние годы.

Из ряда природных радионуклидов в грибах наблюдаются наибольшие уровни ^{40}K , который, в свою очередь, распределяется в плодовых телах неравномерно, его активность снижается в последовательности - шляпка > ножка > пластинки, или трубочки гименофора > споры. Активность ^{40}K , определенная в многочисленных видах дикорастущих макромицетов Центральной Европы в период между 1984 и 1992 гг., была в пределах 800-1500 Бк/кг с.м. (Kalač, 2001, 2012). В образцах грибов Украинского Полесья в течение периода наших исследований в 1990-2010 гг. активность этого радионуклида была на таком же уровне, лишь у некоторых видов была отмечена повышенная активность, в частности, у *Boletus chrysenteron* - до 11000, представителей рода *Amanita* до 7000, в то время как уровень ^{40}K в почвах с местообитаний грибов составлял всего 100-700 Бк / кг с.м. (Рис.1) (Вассер и др., 1995; Гродзинская, и др., 2013).

Максимальный уровень активности ^{40}K был обнаружен в плодовых телах *Laccaria laccata* - до 12000 Бк/кг с.м. (Mietelski et al., 2010). Минимальные коэффициенты накопления ^{40}K (K_n - равен соотношению активности радионуклида в плодовом теле гриба к его активности в почве/субстрате в точке сбора) - около 2,0 были установлены нами у *Macrolepiota procera*, *M. rhacodes*, *Tricholomopsis rutilans*, максимальные коэффициенты накопления были отмечены у *B. chrysenteron* (98), *Amanita citrina* (63), *Coltricia perennis* (48), *Agaricus sylvaticus* и *A. rubescens* (20).

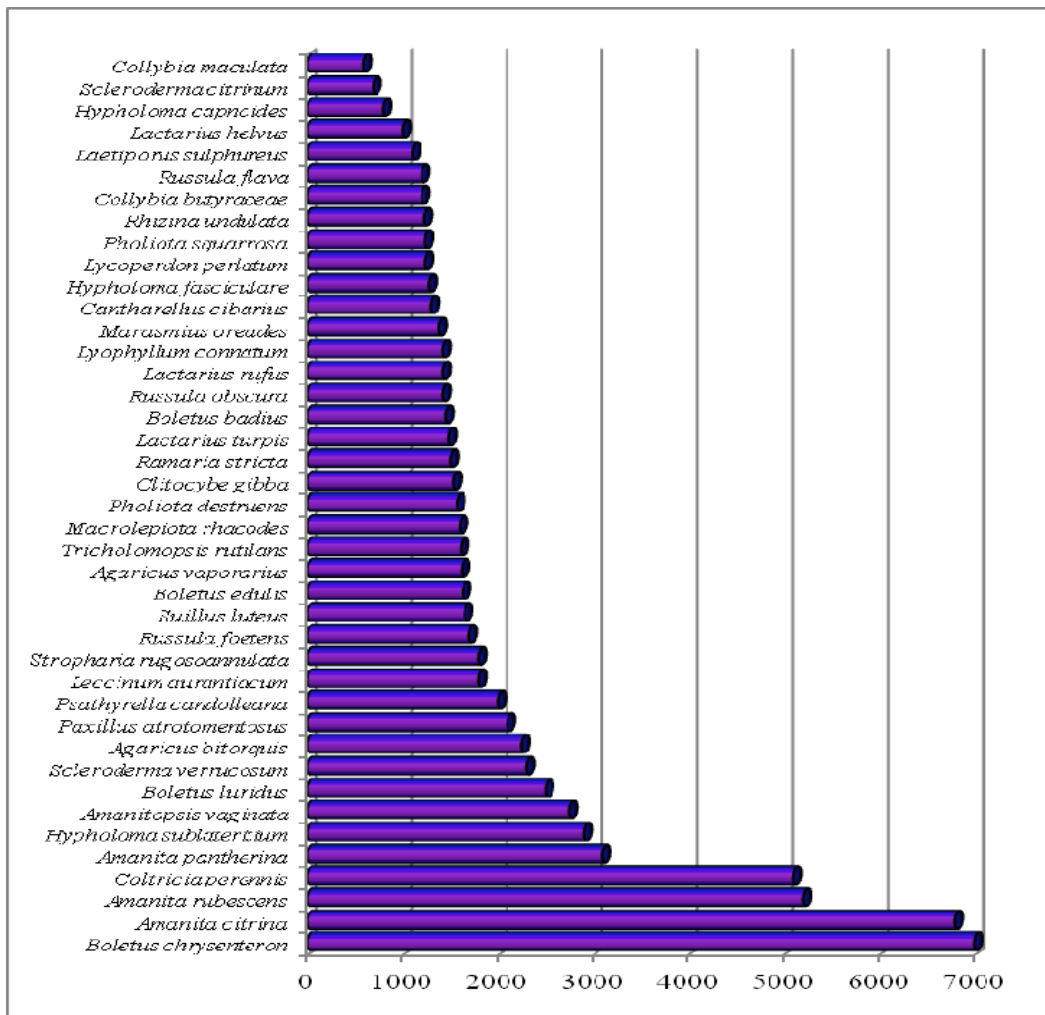


Рис.1. Активность ^{40}K (Бк/кг с.м.) в плодовых телах макромицетов в 199г. (образцы из Киевской, Черниговской и Житомирской областей)

В минеральном составе макромицетов калий является макроэлементом, поэтому его поглощение (в том числе и ^{40}K) из субстратов/почв неизбежно. Ввиду того, что ^{40}K , в отличие от ^{137}Cs из радиоактивных осадков, равномерно распределен по вертикальному профилю лесных почв, предполагают, что на уровень его аккумуляции плодовыми телами, не влияет уровень расположения мицелия (Krolak et al., 2010).

Активность ^{210}Pb (продукт распада природных изотопов ^{238}U , ^{226}Ra или ^{222}Rn) в грибах обычно на два порядка ниже, чем ^{40}K (Kalač, 2012). Максимальная активность ^{210}Pb была обнаружена в шляпках и целых плодовых телах *Boletus edulis*, соответственно 58,9 и 36,6 Бк/кг с.м. (Malinowska et al., 2006). Также в грибах из Польши был обнаружен природный изотоп ^{210}Po (продукт распада ^{238}U) (Skwarzec, Jakusik, 2003). Следует отметить, что в исследованных образцах двадцати съедобных и несъедобных видов грибов, максимальные уровни активности были обнаружены у болетальных грибов - *B. edulis*, *Leccinum scabrum* - до 40 Бк, а минимальные - 2,1 - 4,3 Бк/кг с.м. у *Xerocomus badius* (*Boletus badius*) и *X. subtomentosus* (*B. subtomentosus*) (оба из которых, кстати, являются типичными аккумуляторами радиоцезия). Более высокие уровни ^{210}Po наблюдались в шляпках, чем в ножках грибов. При условии годового потребления 5 кг свежих плодовых тел *B. edulis*, полученная эффективная доза от этого радионуклида достигает 37 $\mu\text{Зв}$.

Авторы отмечают, что уровни ^{210}Po в грибах были существенно выше, чем в продуктах питания растительного и животного происхождения. K. Vaaramaa с соавторами также обнаружили самые высокие уровни ^{210}Po у болетальных грибов (а именно, у *Leccinum vulpinum*), и самые низкие – у представителей семейства *Russulaceae*. При этом рассчитанная годовая доза от ^{210}Po за счет употребления грибов в условиях Финляндии составляет около 4 $\mu\text{Зв}$ (Vaaramaa et al., 2009). Результаты исследований, проведенных в национальном парке Øvre Dividalen на севере Норвегии свидетельствуют о том, что съедобные дикорастущие ягоды и грибы накапливали сходные уровни ^{210}Pb , однако уровень аккумуляции ^{210}Po и ^{40}K в грибах был выше, чем в ягодах. Средние концентрации активности ^{210}Po достигали у *L. scabrum* – 94 и *L. versipelle* – 198 Бк/кг с.м., что многократно превышало активность этого радионуклида в плодовых телах других исследованных микосимбиотрофных видов – *Russula*

paludosa (4,7) и *R. decolorans* (7,4 Бк/кг с.м.). Поскольку болетальные виды являются известными накопителями селена (аналога полония), Gwynn с соавторами (2013) высказали предположение о том, что существенное превышение уровней аккумуляции ^{210}Po у видов р. *Leccinum* по сравнению с *Russula* spp., объясняется именно этим фактом. Соотношение активностей $^{210}\text{Po}/^{210}\text{Pb}$ во всех исследованных образцах грибов было всегда > 1 . При этом авторы подчеркивают, что в данном регионе вклад ^{137}Cs чернобыльского происхождения не столь весом, как в центральной части Норвегии, поэтому доза при условии высокого уровня потребления данной лесной продукции, обусловленная, главным образом, сочетанием ^{210}Po , ^{210}Pb и ^{40}K , достигает 0,05мЗв/год (за счет ягод) и 0,50 мЗв/год (за счет грибов) (Gwynn et al., 2013).

Немногочисленные литературные данные свидетельствуют о достаточно низкой активности ^{226}Ra в макромицетах европейских стран (Kirchner, Daillant, 1998; Pora et al., 2010). В Украине ^{226}Ra и ^{228}Ra были обнаружены нами в 1991 г. в некоторых образцах грибов, в частности, ^{226}Ra у *Pholiota destruens* – 22 Бк/кг с.м. (г. Киев), ^{226}Ra и ^{228}Ra у *Marasmius oreades* – соответственно – 22 и 15 Бк/кг с.м. (Киевская обл., Обуховский р-н), и ^{228}Ra у *A. campestris* – 71 Бк/кг с.м. (Черниговская обл., Бобровицкий р-н) (Вассер та ін., 1995).

Способность макромицетов к биоаккумуляции природных изотопов $^{234,238}\text{U}$ и $^{228,230,232}\text{Th}$ привлекает особое внимание. Исследования, проведенные в двух географически удаленных (более, чем на 250 км), но экологически подобных экосистемах Испании с высокой продуктивностью макромицетов показали, что TF (transfer factor, или коэффициент переноса) урана находился в пределах 0,043–0,049, а TF тория – соответственно 0,030 – 0,62. Самыми высокими коэффициенты биодоступности* ^{234}U и ^{238}U были у *Hebeloma cylindrosporum* (8,2 и 6,3), *Amanita muscaria* (6,0 и 4,5), *Tricholoma terreum* (4,0 и 3,8) и *T. pessandatum* (4,0 и 3,1)(*Коэффициент биодоступности в данной работе определяется так же, как и Кн).

В то же время самые высокие коэффициенты биодоступности $^{228,230,232}\text{Th}$ были выявлены у *T. terreum* (соответственно 64, 316 и 272), *H. cylindrosporum* (62, 371 и 360) и *A. muscaria* (38, 195 и 188). Сравнение коэффициентов переноса исследованных природных радионуклидов с

техногенными показало, что биодоступность тория подобна биодоступности цезия, а урана – выше, чем у ^{90}Sr , $^{239+240}\text{Pu}$ и ^{241}Am .

Таким образом, не смотря на общую, довольно низкую доступность тория и урана в почвах, макромицеты, тем не менее, способны к переносу и накоплению этих элементов. А. Baeza и J. Guillén (2006), учитывая эти результаты и полученные ранее данные о высоких уровнях аккумуляции радиоцезия *H. cylindrosporum* и другими представителями р. *Hebeloma*, полагают, что они являются надежными биоиндикаторами радионуклидного загрязнения окружающей среды.

^7Be (радиоизотоп, генерирующийся в атмосфере в результате ее взаимодействия с космическим излучением высокой энергии) до настоящего времени был обнаружен только в некоторых образцах грибов из Испании и Финляндии (Baeza et al., 2004, Lonnroth et al., 2011, Guillen, Baeza, 2014). Попадание его в плодовые тела связывают с атмосферными осадками, при этом уровень аккумуляции определяется типом питания, а именно сапротрофные виды накапливают высокие и средние уровни ^7Be , что связано с расположением их мицелия в богатом гумусом подстилочном слое почвы (Baeza et al., 2004). Однако, по данным Lonnroth с соавторами, именно микоризные виды (*Hygrophorus hypothejus*, *Russula paludosa*, *Hydnum rufescens*, *Lactarius rufus*) являются аккумуляторами ^7Be (Lonnroth et al., 2011).

Авария на Чернобыльской АЭС в апреле 1986 г. привела к значительному распространению целого ряда радиоактивных элементов в Северном полушарии. Активная эмиссия радионуклидов из разрушенного реактора в течение более 10 дней в сочетании с изменяющимися метеорологическими условиями и разнообразием ландшафтов, обусловили чрезвычайно неоднородный состав радиоактивных выпадений на территории Украины и сопредельных государств. В результате аварии зафиксировано достоверное многократно увеличенное содержание радионуклидов в дикорастущих макромицетах (Gans, 1986; 1987; Teherani, 1988; Haselwandter, Berreck, 1989; Bem et al., 1990; Вассер та ін., 1991; 1992; 1995; Нифонтова, Алексащенко, 1992; Wasser, Grodzinskaya, 1993; Mietelski et al., 1994; Grodzinskaya et al., 1995; 2003; Гродзинская и др., 2013; Rühm et al. 1998; Kalač, 2001, 2012; Tsvetnova et al., 2001). Авторы сообщали, что уровень природного изотопа ^{40}K в плодовых телах оставался достаточно стабильным (700-1000 Бк/кг с.м.), в то время,

как уровень $^{137}\text{Cs}+^{134}\text{Cs}$, обычно был выше и значительно варьировал (Eckl et al., 1986; Dighton, Horrill, 1988; Battiston et al., 1989). В первый послераврийный период именно по наличию ^{134}Cs в сочетании с ^{137}Cs (в соотношении 1:2) можно было судить о чернобыльском происхождении радиоцезия в грибах, поскольку активность ^{137}Cs в плодовых телах также может быть связана с глобальными выпадениями после испытаний ядерного оружия в 50-60-х годах прошлого века (Rückert et al., 1990; Haselwandter, Berreck, 1994, Lehto et al., 2013).

J. Dighton с соавторами показали, что более 40% аккумулярованного радиоцезия связано с грибами, что определенно свидетельствует о том, что в почвах грибная биомасса может иммобилизовать значительное количество радиоцезия на неопределенно длительный период (Dighton et al., 1991). По данным M. Vinichuk и K. Johanson (2003), мицелий в верхнем органическом слое почвы может содержать до 50% ^{137}Cs , локализованного в 0-10 см слое лесных почв Швеции и Украины. Согласно G. Gadd, грибы способны не только непосредственно связывать или фиксировать радионуклиды, но и опосредованно влиять на форму нахождения и их подвижность в лесных почвах (Gadd, 1996). M. Steiner с соавторами, в свою очередь, подытоживают вышеизложенное: грибы играют ключевую роль в мобилизации, поглощении и переносе питательных веществ и, очевидно, являются важным фактором долговременного удержания радиоцезия в органическом слое почвы (Steiner et al., 2002). P. Kalač (2012) придерживается подобных воззрений: грибы (как мицелиальные, так и образующие плодовые тела) очень эффективны в абсорбции радионуклидов и являются чрезвычайно важным компонентом в долгосрочной аккумуляции благодаря долгоживущей и огромной сети гиф и грибной биомассы в верхних слоях лесных почв.

Действительно, по оценке Л.Г. Буровой (1986), биомасса макромицетов с учетом мицелия в пять раз превышает напочвенный покров. В зависимости от биологических особенностей, в частности глубины залегания мицелия, макромицеты могут «захватывать» ^{137}Cs как с поверхности почв, подстилки, так и более глубоких почвенных слоев. Макромицеты несомненно вовлечены в биогеохимический круговорот ^{137}Cs , с разложением плодовых тел, как и в случае других минеральных элементов, грибы способны рециркулировать радиоцезий из глубоких

почвенных слоев на поверхность лесной подстилки (Falandysz, Bogovička, 2013).

Уровень накопления радионуклидов макромицетами определяется комплексом факторов, среди которых, безусловно, наиболее важным является количественный и качественный состав аварийных выбросов, уровень загрязнения почв и древесных субстратов из мест их произрастания. Важны также физико-химический состав и структура загрязненных почв. G. Heinrich полагает, что накопление радиоцезия грибом главным образом зависит от содержания глины, ила, песка и обменных катионов, состава глинистых минералов и распределения частиц разного размера (Heinrich, 1992). N.I. Bulko с соавторами (2014) сообщают о влиянии типа леса на уровень аккумуляции радиоцезия, в частности, одни и те же виды грибов в сосновых лесах были более загрязнены, чем в смешанных лесах. Установлена положительная корреляция между степенью гидроморфности почв и величиной содержания радионуклидов в грибах. Виды, произрастающие на гидроморфных лесных почвах аккумулятивных ландшафтов накапливают ^{137}Cs на порядок выше, чем те же виды, произрастающие на автоморфных почвах элювиальных ландшафтов (Щеглов, 1999; Tsvetnova et al., 2001).

Решающую роль в уровнях биоаккумуляции радионуклидов играет глубина расположения мицелия конкретных видов в почве. Виды, мицелий которых находится в верхнем слое почвы (в частности, представители рр. *Collybia* и *Clitocybe*), наиболее загрязнены в первые послеаварийные годы, пик загрязнения видов с глубоким залеганием мицелия (а именно *B. edulis*) наблюдается лишь спустя несколько лет (Oolbekkink, Kuiper, 1989; Fraiture et al., 1990; Guillitte et al., 1990; Rühm, 1998; Gillet, Crout, 2000; Mietelski et al., 2010).

Определение коэффициентов накопления (K_n) из почв в плодовые тела макромицетов показало, что они могут достигать 4 порядков величин (Klan et al., 1988). В наших исследованиях максимальные K_n были зафиксированы у *Paxillus sp.* – до 1180, *Lactarius helvus* – до 855, *Suillus luteus* – 766 и *H. crustuliniforme* – 514 (Киевская обл., 1996, 1998 гг., при среднем уровне поверхностного загрязнения почв ^{137}Cs – 37-185 кБк/м²). При засушливых условиях и малом количестве осадков наблюдается снижение коэффициентов накопления радиоцезия. И, напротив, повышенные K_n – до 500 (при относительно низком уровне активности

радиоцезия в почве) наблюдаются у макромицетов, произрастающих на заболоченных, торфянистых, с низким содержанием гумуса почвах (Волынская обл., Черемский заповедник).

Чрезвычайно высокие, достигающие миллионов Бк/кг с.м. уровни аккумуляции радиоцезия наблюдались в плодовых телах некоторых микосимбиотрофных видов из зоны отчуждения ЧАЭС: *Gomphidius glutinosus* – 3,78 МБк/кг с.м. (Старые Шепеличи, лесничество, 1992 г.), *Lactarius turpis* – 13 и *V. edulis* – 1,56 МБк/кг с.м. (с. Новошепеличи, 1993 г.), *Paxillus involutus* – 15,71, *Lactarius rufus* – 12,58, *Cantharellus cibarius* – до 12,13, *Boletus badius* – до 11,83, *V. edulis* – до 5,11 МБк/кг с.м. (г. Припять, «Рыжий» лес», 1996 г.), *Pluteus cervinus* – 34,59, *Leccinum scabrum* – 5,46 МБк/кг с.м. (с. Новошепеличи, 1996 г.). *Boletus subtomentosus* – 20, *P. involutus* – 17 МБк/кг с.м. (Старые Шепеличи, лесничество, 2004 г.), *L. turpis* – 18,71 и *Suillus luteus* – 14,88 МБк/кг с.м. (с. Копачи). В то же время, коэффициенты накопления у макромицетов, собранных в таких сильно загрязненных локалитетах, находились в пределах 1-50 (Grodzinskaya et al., 1995; 2003; Гродзинська та ін., 2008; Гродзинская и др., 2013). По нашим данным, до последнего времени активность радиоцезия примерно у 60% образцов плодовых тел ценных съедобных видов грибов (*Boletus* spp., *Suillus* spp., *Leccinum scabrum*, *Cantharellus cibarius*, *Lactarius* spp., *Tricholoma flavovirens* и пр.), собранных на территории Украинского Полесья (при уровнях поверхностного загрязнения почв $^{137}\text{Cs} \geq 37$ кБк/м²), превышали предельно допустимые уровни, принятые в Украине (2500 Бк/кг с.м.).

Для Беларуси N.I. Bulko с соавторами сообщают, что активность у 20-30% грибов и ягод в Гомельской области выше, чем допустимые уровни, которые составляют 370 и 185 Бк/кг сырого веса соответственно (Bulko et al., 2014).

На аккумуляцию радиоцезия макромицетами существенно влияет экологическая приуроченность видов, и, в частности, стратегия питания – уменьшение наблюдается в последовательности от микоризных → сапротрофных → лигнотрофных видов (Wasser, Grodzinskaya, 1993; Grodzinskaya et al., 1995; 2008, 2013; Gillet, Crout, 2000). До последнего времени подобной специфической тенденции в отношении накопления радиостронция не обнаружено.

В среднем уровни радиостронция в плодовых телах макромицетов в сотни раз меньше, чем радиоцезия. По нашим данным, в 2004 г. в образцах грибов из 30-километровой зоны ЧАЭС соотношение $^{137}\text{Cs}/^{90}\text{Sr}$ находилось в пределах $10\text{-}10^4$, при среднем значении 10^3 . У микосимбиотрофа *Cantharellus cibarius* («Рыжий» лес, 1996 г.) активность ^{90}Sr достигала 10240 Бк/кг с.м. Самая высокая активность радиостронция обнаружена нами у сапротрофа *Stropharia aeruginosa* - 13000 и микосимбиотрофа *Lactarius turpis* - 11000 Бк/кг с.м (с. Старые Шепеличи, 2004 г.).

Как живые, так и мертвые гифы способны к быстрому, независимому от метаболизма связыванию радионуклидов клеточной стенкой, экстрацеллюлярными полисахаридами, или другими компонентами, обладающими биосорбционными свойствами (Haselwandter, Bergeck, 1994). Авторы подчеркивают, что значительные отличия в строении клеточной стенки определяют существующую значительную вариабельность в аккумулирующей способности грибов.

Известно, что у большинства макромицетов способность к накоплению стабильного цезия весьма ограничена. Методом атомно-абсорбционной спектроскопии было исследовано его содержание в плодовых телах 433 видов дикорастущих грибов Европы и показано, что среднее содержание этого элемента составляет 7 мг/кг с.м., при этом чрезвычайно высокие концентрации наблюдались у представителей семейства *Cortinariaceae* (особенно у *Cortinarius albobviolaceus*), высокие - у *Clavariaceae*, *Rhodophyllaceae*, *Strophariaceae*, а у представителей семейств *Helvellaceae* та *Lycoperdaceae* – низкие (Seeger, Schweinshaut, 1981). Исходя из этого можно предположить, что в определенной степени процессы аккумуляции радионуклидов должны происходить аналогично накоплению стабильных элементов. Действительно, Bakken и Olsen (1990), изучая накопление радиоцезия макромицетами Норвегии установили положительную корреляцию между концентрациями радиоцезия и нерадиоактивного цезия и отрицательную – с уровнем pH почвы. Проверка гипотезы о механизме поступления цезия в плодовые тела, которая основывалась на предполагаемой способности транспортных энзимов клеточных мембран распознавать ионы Cs^+ и K^+ , показала отсутствие этого распознавания. Межвидовые отличия в поглощении радио- и стабильного цезия авторы объясняют прежде всего пространственным расположением этих

элементов в почвенных слоях и уровнем сродства с Cs. Они также высказали интересное предположение о том, что грибы, изменяя рН среды, способны высвобождать радиоцезий, находящийся до этого в связанном состоянии.

В то же время исследования возможного влияния стабильного цезия, находящегося в лесной подстилке, на уровень переноса радиоцезия в плодовые тела, не подтвердили существование такой корреляции в образцах из местообитаний с разной степенью промышленного загрязнения Польши (Zagrodzki et al., 2005).

Культуральные эксперименты с *Pleurotus ostreatus*, проведенные С. Kuwahara с соавторами показали, что ^{137}Cs и стабильный Cs активно поглощаются грибом в зависимости от концентрации ^{137}Cs или Cs в питательной среде. Они обнаружили, что накопление ^{137}Cs плодовыми телами подавляется K и/или Cs, что подтверждает способность грибов к поглощению ^{137}Cs через K-транспортные системы (Kuwahara et al., 2002).

Р. Kalač (2001) отмечает, что уровни аккумуляции стабильного цезия грибами подобны наблюдающимся у сосудистых растений. Однако в случае радиоцезия, фиксируемые величины, как минимум, на порядок выше. Различное поведение стабильного и радиоактивного цезия связано с их неравновесным состоянием в экосистеме и различной степенью их биодоступности (Ногына, Randa, 1988; Kalač, 2001).

М. Vinichuk с соавторами (2011) в результате экспериментальных исследований поведения изотопов цезия (^{137}Cs и ^{133}Cs) и их «двойников» - калия и рубидия в системе переноса «почва-грибы-растения», проведенных в лесных экосистемах Швеции, показали, что грибы накапливают значительно больше K и Ru, чем стабильного ^{133}Cs , причем в плодовых телах концентрация этих элементов в среднем была выше на порядок, чем в мицелии. Сродство к этим элементам у грибов (плодовых телах и мицелии) снижалась в ряду $\text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$, с относительным соотношением 100:57:32. Эти результаты подобны более ранним данным японских исследователей – 100:88:50 (Yoshida, Muramatsu, 1998).

Хотя широкомасштабная ремедиация территорий, загрязненных радионуклидами и особенно ^{137}Cs , является проблематичной, К. Rosén с соавторами показали, что однократная обработка лесной почвы калийным удобрением (KCl) в 1992 г. долговременно (даже спустя 17 лет после воздействия) влияла на биоаккумуляцию ^{137}Cs видами *Cortinarius*

semisanguineus, *Lactarius rufus*, *C. caperatus* и *Suillus variegatus*, радиоактивность в которых сокращалась от 21 до 58% (Rosén et al., 2011).

G. Heinrich (1993) описал неравномерность распределения ^{137}Cs в плодовых телах грибов в виде следующий последовательности – пластинки > шляпка > ножка. Исследования биоаккумуляции ряда природных и антропогенных радионуклидов в серии культуральных экспериментов с *Pleurotus eryngii*, выращенными в контролируемых лабораторных условиях, и *Tricholoma equestre*, собранными в полуприродной экосистеме показали, что степень зрелости играет важную роль в поглощении и распределении радионуклидов в плодовых телах данных видов (Baeza et al., 2006). Максимальная инкорпорация ^{134}Cs и ^{85}Sr наблюдалась в зрелых плодовых телах, затем снижалась в процессе их старения.

В процессе дозревания общая активность ^{85}Sr , ^{134}Cs и ^{60}Co возрастает в шляпке+пластинках с соответствующим снижением в ножке гриба. Для обоих исследованных видов было показано, что радиоцезий и калий преимущественно локализованы в шляпке с пластинками, а ^{226}Ra главным образом – в пластинках. Так как распределение $^{239,240}\text{Pu}$, $^{234,238}\text{U}$ и $^{230,232}\text{Th}$ было различным у исследованных макромицетов, авторы предполагают, что оно является видоспецифичным (Baeza et al., 2006).

Многочисленные данные о содержании радиоцезия в грибах Европы, несмотря на некоторые противоречия свидетельствуют о видоспецифичности накопления. Самые высокие уровни активности и коэффициентов переноса (Tf – transfer factors) были обнаружены у микосимбиотрофных видов, в частности представителей семейств *Cortinariaceae* и *Boletaceae* (Eckl et al., 1986; Haselwandter, Berreck, 1989, 1994; Bem et al., 1990; Wasser, Grodzinskaya, 1993; Guillitte et al., 1994; Mietelsky et al., 1994; 2010; Grodzinskaya et al., 1995, 2007, 2011; Malinowska et al., 2006).

K. Haselwandter (1978) первым высказал предположение о том, что грибы аккумулируют ^{137}Cs видоспецифическим образом. Несмотря на значительную вариабельность данных, именно эта особенность макромицетов может быть использована для мониторинга радиоактивности окружающей среды (Haselwandter, Berreck, 1994, Grodzinskaya et al., 2008; Guillén, Baeza, 2014). Фиксируемое у некоторых микосимбиотрофных макромицетов существенное превышение уровней загрязнения по сравнению с уровнями, наблюдаемыми в лесной подстилке

(являющейся основным депо радионуклидов) и других компонентов экосистем, придает им особый статус в системе биоиндикации. Среди видов-гипераккумуляторов радиоцезия, информативными индикаторами в течение всего послечернобыльского периода продолжают оставаться рекомендованные нами ранее, широко распространенные в лесных экосистемах Украины *Boletus badius*, *Lactarius rufus* и *Paxillus involutus* (Гродзинська та ін., 2008, Grodzinskaya et al., 2003; 2011; Гродзинская и др., 2013).

Межвидовые отличия в аккумуляции ^{137}Cs образцами макромицетов, собранных из одних и тех же локалитетов, могут достигать двух порядков величин. Интересным является пример р. *Leccinum*, собранных в локалитетах с разным уровнем радионуклидного загрязнения. Активность радиоцезия в плодовых телах *Leccinum scabrum* всегда в среднем в несколько раз выше, чем у *L. aurantiacum* (Гродзинская и др., 2013). Видоспецифичность накопления может быть связана, в первую очередь, с химическим составом плодовых тел. Так, повышенные уровни ^{137}Cs , обычно наблюдаемые у *B. badius*, ряд авторов объясняет образованием комплекса этого радионуклида с двумя коричневыми пигментами кутикулы шляпок - бадием А и норбадием А (Steffan, Steglich, 1984). D. Aumann с соавторами утверждают, что подобный механизм отвечает за аккумуляцию радиоцезия также и у других болетальных грибов - *Boletus erythropus* и *B. mirabilis* (Aumann et al., 1989).

У *B. edulis* из Народичского р-на Житомирской области (окр. отселенного с. Христиновка) в плодовых телах с темноокрашенными шляпками активность ^{137}Cs была 95800 Бк/кг с.м., что почти в 3,25 раза превышало активность радиоцезия, обнаруженную в плодовых телах со светлой окраской шляпок (соответственно - 29400 Бк/кг с.м.). Это достаточно убедительно свидетельствует о роли пигментной составляющей в процессах биоаккумуляции радионуклидов (Grodzinskaya et al., 2017 in press).

Кроме радиоцезия и радиостронция в плодовых телах макромицетов из 30-км зоны ЧАЭС в 1995 г. мы также обнаружили ^{144}Ce - 1071 (*Leccinum scabrum*, с. Старая Красница), ^{144}Ce и ^{154}Eu соответственно - 310,1 и 31,3 кБк/кг с.м. (*Lactarius turpis*, с. Новошепеличи) (Гродзинская и др., 2013).

Испытания ядерного оружия и Чернобыльская катастрофа являются основными источниками высокотоксичного ^{241}Am в окружающей среде.

По данным J. Lehto (2009), активность ^{241}Am в грибах из загрязненных регионов Финляндии в среднем составляет 7,5 мБк/кг, однако коэффициент переноса этого радионуклида значительно выше, чем у Рс, что свидетельствует о его большей биодоступности. Плутоний в макромицетах Украины был обнаружен в пределах 2,96–82,8 Бк/кг с.м., при этом самые высокие концентрации выявлены у *Paxillus involutus* и *Cantharellus cibarius*, в других странах (Финляндии, Японии, Польше и Испании) активность этого радионуклида была гораздо ниже - 0,0009–0,164 Бк/кг с.м., при этом самые высокие уровни ^{241}Am обнаружены в плодовых телах *Clitocybe* sp., *Hebeloma cylindrosporum* и *Lycoperdon perlatum* (Outola, 2003; Baeza et al., 2004; Baeza et al., 2006; Guillen, Baeza, 2014). Следует отметить, что в первый послеаварийный период в макромицетах также обнаруживали другие антропогенные короткоживущие радионуклиды, такие как ^{110}Ag , ^{125}Sb , ^{103}Ru и ^{131}I (Guillén, Baeza, 2014).

Интересный методический подход для решения проблемы очистки технологических и природных вод от радионуклидов был предложен Дементьевым с соавторами (2015). В представляемой ими работе было установлено, что биомасса живого мицелия *Pleurotus ostreatus* способна эффективно (>70%) сорбировать растворенный ^{241}Am . Основная доля (90%) накопленного в мицелии ^{241}Am связана со структурными полисахаридами клеточных стенок. Показано, что удельная активность радионуклида в полисахаридах клеточных стенок была в 3,5 раза выше, чем в исходной биомассе мицелия *P. ostreatus*.

До настоящего времени в открытом доступе имеются лишь немногочисленные сведения о биосорбции радионуклидов макромицетами в результате ядерной аварии на Фукусиме. После этого события (в марте 2011 г.) до конца 2014 г. с целью минимизировать дозу внутреннего облучения был проведен национальный широкомасштабный мониторинг образцов пищевых продуктов из различных префектур Японии, который подтвердил превышение допустимых уровней ^{137}Cs , в первую очередь, в грибах (максимальная обнаруженная активность достигала 28000 Бк/кг) и сушеных овощах. Авторы сообщают, что пик загрязнения у сушеных шиитакэ (*Lentinus edodes*) наблюдался с сентября 2011 г. до конца марта 2012 г. (Merz et al., 2015).

К. Nakashima с соавторами (2015) показали, что у 36,4% дикорастущих грибов, собранных в окрестностях с. Каваучи (30 км от станции), наблюдалась активность 1000 Бк/кг, максимальная активность ^{134}Cs - 5432,7 и ^{137}Cs - 11616,2 Бк/кг с.м. была обнаружена у *Cortinarius salor* Fr. При этом эффективная доза для взрослых, рассчитанная на среднегодовое употребление грибов, находилась в пределах 0,11-1,6 мЗв.

Анализ литературных и авторских данных позволил сгруппировать факторы, определяющих степень радиационного загрязнения макромицетов в следующую схему (Рис. 2).



Рис.2. Факторы, определяющие уровни аккумуляции радионуклидов макромицетами

В общем, уровень биоаккумуляции радионуклидов макромицетами зависит от конкретной радиоэкологической ситуации в месте сбора, видоспецифичности и экологической приуроченности вида. В то же время, высокий уровень вариабельности, наблюдаемый в полученных данных свидетельствует о комплексном результирующем воздействии определенных (учитываемых) и неконтролируемых факторов, что усложняет прогнозную оценку уровней загрязнения.

Несмотря на то, что с момента аварии на Чернобыльской АЭС прошло уже более 30 лет, до настоящего времени сохраняется опасность для населения, связанная с внутренним облучением за счет употребления продуктов, загрязненных радионуклидами, в частности дикорастущих грибов и ягод. Известно, что в странах Европы ежегодное потребление дикорастущих грибов может достигать нескольких килограммов на душу населения (Kalač, 2012), в то время, как для жителей Украины (особенно Украинского Полесья) лесные грибы не только составляют существенную часть пищевого рациона, но и обеспечивают дополнительный заработок сельскому населению. Единственно верным решением в создавшейся ситуации должен был бы стать рост промышленного культивирования ценных съедобных и лекарственных видов грибов на предварительно проверенных субстратах. Однако, падение уровня жизни в последние годы неотвратимо вынуждает наших сограждан пренебрегать вполне обоснованной опасностью и увеличивать употребление именно «бесплатных» лесных грибов. Исходя из вышеизложенного необходимость длительного радиационного мониторинга (с привлечением видов-биоиндикаторов) и учетом существенного вклада микобиоты в процессы миграции и перераспределения радионуклидов для комплексной оценки радиоэкологической ситуации и минимизации негативных последствий не вызывает сомнения.

Современному подходу оценки экологического состояния окружающей среды свойственна антропоцентрическая концепция. Качество жизни и здоровье человека в условиях возрастающего техногенного, в том числе радиационного пресса, - должны быть приоритетными направлениями научных исследований.

Литература

- Бурова Л.Г. Экология грибов макромицетов. – М.: Наука, 1986. – 224 с.
- Вассер С.П., Болюх В.О., Брунь Г.О., Вірченко В.М., Гродзинська Г.А., Кондратюк С.Я., Навроцька І.Л., Ступіна В.В., Царенко П.М. Накопичення радіонуклідів споровими рослинами і вищими грибами України // під.заг.ред. С.П.Вассера, Київ, 1995. – 131 с.
- Вассер С.П., Гродзинська Г.А., Люгін В.О. Вміст Cs-134 і Cs-137 в вищих Basidiomycetes Українського Полісся// Укр.ботан.журн., 1991, 48, 5, с. 14-19.
- Вассер С.П., Гродзинська Г.А., Люгін В.О. Накопичення радіоактивних елементів макроміцетами Українського Полісся// Укр.ботан.журн. – 1992. – 49, 5. – с.79-86.
- Гродзинська Г.А., Сирчін С.О., Кучма М.Д., Коніщук В.В. Макроміцети-біоіндикатори забруднення радіоцезієм лісових екосистем України // Вісник Національної академії наук України, 2008, № 9, с. 26-37.
- Гродзинская А.А., Сырчин С.А., Вассер С.П., Кучма Н.Д. Аккумулятивная активность макромицетов в условиях радионуклидного загрязнения Украины. В кн.: Микобиота Украинского Полесья: последствия Чернобыльской катастрофы/под. общ. ред. проф. Н.Н. Ждановой, Киев, Наукова думка. – 2013, с.217-260, с.368-373.
- Дементьев Д.В., Зотина Т.А., Мануковский М.С., Калачева Г.С., Болсуновский А.Я. Биосорбция ^{241}Am из водного раствора и его биохимическое фракционирование в мицелии *Pleurotus ostreatus*// Доклады академии наук. Биохимия, биофизика, молекулярная биология. – 2015. – 460, 4. – С.472-474.
- ДР-2006. Допустимі рівні вмісту радіонуклідів ^{137}Cs та ^{90}Sr у продуктах харчування та питній воді. Державні гігієнічні нормативи. Затверджені наказом МОЗ України від 03.05.2006 №256. Зареєстр. Мінюст. України 17.07.2006 р. за № 845/12719.
- Нифонтова М.Г., Алексашенко В.Н. Содержание Sr-90 и Cs-134,137 в грибах, лишайниках и мхах из ближней зоны Чернобыльской АЭС//Экология. – 1992. – №3. – С.26-30.
- Федоров В.Н., Елиашевич Н.В. Аккумуляция радионуклидов в плодовых телах макромицетов//Радиац.биология.Радиоэкология. – 2000. – 40, №6. – С. 702-709.

- Щеглов А.И.** Биогеохимия техногенных радионуклидов в лесных экосистемах. – М.: Наука, 1999. – 268 с.
- Aumann D.C., Clooth G., Steffan B., Steiglich W.** Complexation of Cesium 137 by the Cap Pigments of the Bay Boletus (*Xerocomus badius*)//Angewandte Chemie. – 1989. – 28, 4, S. 453-454.
- Baeza A., Guillén J.** Influence of the soil bioavailability of radionuclides on the transfer of uranium and thorium to mushrooms//Applied Radiation and Isotopes. – 2006. – 64. – P. 1020-1026.
- Baeza A., Guillén F.J., Salas A., Manjón J.L.** Distribution of radionuclides in different parts of a mushroom: Influence of the degree of maturity//Science of the Total Environment. – 2006. – 359. – P.255-266.
- Baeza A., Hernandez S., Guillen F., Moreno G., Manjón J.L., Pascual R.** Radiocaesium and natural gamma emitters in mushrooms collected in Spain// The Science of the Total Environment. – 2004. – 318. – P. 59-71.
- Bakken L.R., Olsen R.A.** Accumulation of radiocaesium in fungi// Can. J. Microbiol. - 1990. – 36. – P. 704-710.
- Ban-Nai T., Muramatsu Y., Yoshida S.** Concentrations of ^{137}Cs and ^{40}K in mushrooms consumed in Japan and radiation dose as a result of their dietary intake// J.Radiat.Res., 2004, 45, 2, pp.325-332.
- Battiston G.A., Degetto S., Gerbasi R., Sbrignadello G.** Radioactivity in mushrooms in Northeast Italy following the Chernobyl accident// J. Environ. Radioactivity. - 1989. - 9. - P. 53-60.
- Baeza, A., & Guillén, F. J.** Dose due to mushroom ingestion in Spain// Radiation Protection Dosimetry. - 2004. – 111,1. – P. 97-100.
- Baeza, A., Guillén, J., & Mietelski, J. W.** Uptake of alpha and beta emitters by mushrooms collected and cultured in Spain// Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. - 2004.- 261, 2. – P. 375-380.
- Baeza, A., Guillén, J., Mietelski, J. W., & Gaca, P.** Soil-to-fungi transfer of ^{90}Sr , $^{239+240}\text{Pu}$, and ^{241}Am //Radiochimica Acta. -2006. – 94. – P. 75-80.
- Bem H., Lasota W., Kuśmierk E., Witusik M.** Accumulation of ^{137}Cs by mushrooms from Rogozno area of Poland over the period 1984-1988 // J. Rad. Nucl. Chem. Lett. - 1990. - 145, N 1. – P. 39-46.
- Borio R., Chiocchini S., Cicioni R., Degli Esposti P., Rongoni A., Sabatini P., Scampoli P., Antonini A., Salvadori P.** Uptake of radiocesium by mushrooms//Sci.Total.Environment., 1991, 106, 3, pp.183-190.

- Bulko N.I., Shabaleva M.A., Kozlov A.K., Tolkacheva N.V., Mashkov I.A.** The ^{137}Cs accumulation by forest-derived products in the Gomel region//Journsl of Environmental radioactivity. – 2014. – 127. – P.150-154.
- Byrne A.R.** Radioactivity in fungi in Slovenia, Yugoslavia, following the Chernobyl accident//J. Environm. Radioactivity. – 1988. – 6. – P.177-183.
- Dementyev D.V., Bolsunovsky A.Ya.** Accumulation of artificial radionuclides by edible wild mushrooms and berries in the forests of the central part of the Krasnoyarskii Krai// Radioprotection. – 2009. – 44, N 5 - P. 115-120.
- Dietl G., Breitig D.** Radioaktives Caesium in Pilzen aus dem Raume Schwabisch Gmund // Z. Mykol. - 1988. - 54, N 1. – S. 109-112.
- Dighton J., Clint G.M., Poskitt J.** Uptake and accumulation of ^{137}Cs by upland grassland soil fungi: a potential pool of Cs immobilization// Mycol.Res. - 1991.- 95, N 9. - P. 1052-1056.
- Dighton J., Horrill A.D.** Radiocaesium accumulation in the mycorrhizal fungi *Lactarius rufus* and *Inocybe longicystis*, in upland Britain, following the Chernobyl accident// Trans. Br. Mycol. Soc. - 1988. - 91, N 2. – P. 335-337.
- Dvořák P., Kunová V., Beňová K., Ohera M.** Radiocesium in mushrooms from selected locations in the Czech Republic and the Slovak Republic// Radiation and Environmental Biophysics. - 2006. - 45, N 2. - P. 145-151.
- Eckl P., Hofmann W., Türk R.** Uptake of natural and man-made radionuclides by lichens and mushrooms// Radiat. Environm. Biophysics. – 1986. – 25. – P. 43-45.
- Falandysz J., Borovička J.** Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks//Appl. Microbiol. Biotechnol.- 2013. - 97, P.477-501.
- Falandysz J., Zalewska T., Apanel A., Drewnowska M., Kluza K.** Evaluation of the activity concentrations of ^{137}Cs and ^{40}K in some Chanterelle mushrooms from Poland and China// Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23,N 19, P. 20039-20048.
- Falandysz J., Zhang J., Zalewska T.** Radioactive artificial ^{137}Cs and natural ^{40}K activity in 21 edible mushrooms of the genus *Boletus* species from SW China//Environmental Science and Pollution Research. – 2017. – doi:10.1007/s11356-017-8994-7
- Fraiture A., Guillite O., Lambinon J.** Interest of fungi as bioindicators of the contamination in forest ecosystems. In: Transfer of radionuclides in

natural and semi-natural environments/ Eds.G. Desmet, P. Nassimbeni and M. Belli. - London and New York: Elsevier applied Science, 1990. – P. 477-484.

Gadd G.M. Influence of microorganisms on the environmental fate of radionuclides// Endeavour. - 1996. - 20. - P. 150-156.

Gans I. Radionuklidkonzentrationen in Berliner Pilzen//Z. Mykol. - 1986. - 52. - S. 446-453.

Gans I. Radionuklidkonzentrationen in Berliner Pilzen (Teil 4) // Z. Mykol. - 1987. - 53. - S. 151-154.

Gillet A.G., Crout N.M.G. A review of ¹³⁷Cs transfer to fungi and consequences for modeling environmental transfer// Journal of Environmental Radioactivity. – 2000. – 48. – P.95-121.

Grodzinskaya A.A., Berreck M., Wasser S.P., Haselwandter K. Radiocesium in fungi: Accumulation pattern in the Kiev district of Ukraine including the Chernobyl zone// Sydowia. – 1995. – 10. – P. 88-96.

Grodzinskaya A.A., Berreck M., Haselwandter K., Wasser S.P. Radiocaesium Contamination of Wild-Growing Medicinal Mushrooms in Ukraine//Int. Journ. Med. Mushr. - 2003. - 5, 1. – P. 61-86.

Grodzinskaya A.A., Syrchin S.A., Kuchma N.D. Higher Basidiomycetes as bioindicators for radiocaesium contamination of territory of Ukraine. In: Botany and Mycology: modern horizons. To memory of Academician A.M.Grodzinsky (1926-1988), K.: Academperiodika, 2007. - P. 263-275.

Grodzinskaya A.A., Syrchin S.A., Kuchma N.D., Bilay V.T. Radioactive contamination of Ukrainian wild-growing mushrooms. In: Proceedings of the 7th Intern.Conf. on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7). - 2011. – Arcachon, P.566-572

Grodzinskaya A.A., Syrchin S.A., Kuchma N.D. Mushrooms as bioindicators of radiocesium contaminated territories // Abstr.Proceed. Intern.Conf.Twenty-five Years after Chernobyl Accident. Safety for the Future, 2011. - P. 36-37.

Grüter, H. Radioactive fission product ¹³⁷Cs in mushrooms in W.Germany during 1963-1970 // Health Physics. - 1971. - 20. - P. 655-656.

Guillén J., Baeza A. Radioactivity in mushrooms: A health hazard?// Food Chemistry. – 2014. – 154. – P. 14-25.

Guillite O., Fraiture A., Lambinon J. Soil-fungi radiocaesium transfers in forest ecosystems. In: Transfer of radionuclides in natural and semi-natural

- environments. Eds. G. Desmet, P. Nassimbeni and M. Belli. London and New York: Elsevier appl. Sci., 1990. - P. 468-476.
- Guillite O., Gasia M.C., Lambinon J., Fraiture A., Colard J., Kirchmann R.** La radiocontamination des champignons sauvages en Belgique et au Grand-Duché de Luxembourg après l'accident nucléaire de Tchernobyl. - Memoires de la Société Royale de Botanique, Mycologia belgica. - 1986. - 9. - P.79-93
- Guillite O., Melin J., Wallberg L.** Biological pathways of radionuclides originating from the Chernobyl fallout in a boreal forest ecosystem // Sci Total Environ. - 1994. - 157, N 1-3. - P. 207-215.
- Gwynn J.P., Nalbadyan A., Rudolfsen G.** ^{210}Po , ^{210}Pb , ^{40}K and ^{137}Cs in edible wild berries and mushrooms and ingestion doses to man from high consumption rates of these wild foods//Journal of Environmental Radioactivity. - 2013. - 116. - P.34-41.
- Haselwandter K.** Radioactives Cäsium (Cs-137) in Fruchtkörpern verschiedener Basidiomycetes // Z Pilzkunde. - 1977. - 43. - S. 323-326.
- Haselwandter K.** Accumulation of the radioactive nuclide ^{137}Cs in fruitbodies of Basidiomycetes//Health Physics. - 1978. - 34. - P.713-715.
- Haselwandter K., Berreck M.** Radiocesium accumulation in fruitbodies of Basidiomycetes collected in the province of Parma Italy // Fungi atque loci Natura, Atti del IV Convegno Intern. micol. del 27-30 IX 1987, Borgo Val di Taro, Italy, 1989. - P. 89-92.
- Haselwandter K., Berreck M.** Accumulation of radiocesium in fungi. In: Metal ions in fungi. Eds. G. Winkelmann and D.R. Winge. New York; Basel; Hong Kong: Marcel Dekker. - 1994. - P. 259-277.
- Haselwandter K., Berreck M., Brunner P.** Fungi as bioindicators of radiocesium contamination: pre- and post-Chernobyl activities//Trans. Brit. Mycol. Soc. - 1988. - 90. - P. 171-174.
- Haselwandter K., Leyval C., Sanders F.E.** Impact of arbuscular mycorrhizal fungi upon plant uptake of heavy metals and radionuclides from soil. In: Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. /Eds. S. Gianianazzi and Schuepp, Basel: Birkhauser, 1994. - P. 179-189.
- Heinrich G.** Distribution of radiocaesium in the different parts of mushrooms//J. Env. Radioact. - 1993. - 18, N 3. - P. 229-245.

- Horyna J., Randa Z.** Uptake of radiocesium and alkali metals by mushrooms// J. Radioanal. Nucl. Chem. Letters. - 1988. - 127, N 2. - P. 107-120.
- Johanson K.J., Nikolova I.** The role of fungi in the transfer ^{137}Cs in the forest ecosystem// Mitt. d. Österr. Bodenkundl. Ges. - 1996. - H. 53. - S. 259-265.
- Kalač P.** A review of edible mushroom radioactivity // Food Chemistry. - 2001. - 75. - P. 29-35.
- Kalač P.** Radioactivity of European wild growing edible mushrooms. In: Andres, S. & Baumann, N. (Eds): Mushrooms: Types, Properties and Nutrition. New York, Nova Sci. Publ., 2012, P. 215-230.
- Kirchner G., Daillant O.** Accumulation of ^{210}Pb , ^{226}Ra and radioactive cesium by fungi// The Science of the total Environment. - 1998. - 222. - P.63-70.
- Klán J., Řanda Z., Benada J., Horyna J.** Investigation of non-radioactive Rb, Cs, and radiocaesium in higher fungi//Czech Mycol. -1988. - 42. - P.158-169.
- Krolak E., Kwapulinski J., Fischer A.** ^{137}Cs and ^{40}K isotopes in forest and wasteland soils in a selected region of eastern Poland 20 years after the Chernobyl accident//Radiat. Environ. Bioph. 2010. - 49, P.229-237.
- Kuwahara C., Sugiyama H., Kato F.** Cesium uptake by edible mushrooms and microorganisms isolated from mushroom substrata//Radioprotection-Colloques. - 2002. - 37, C1 - P. 347-352.
- Lehto J.** Americium in the Finnish environment//Boreal environment research. - 2009. - 14. - P.427-437. ISSN 1239-6095 (print), ISSN 1797-2469 (online).
- Lehto J., Vaaramaa K., Leskinen A.** ^{137}Cs , $^{233,240}\text{Pu}$ and ^{241}Am in boreal forest soil and their transfer into wild mushrooms and berries//Journal of Environmental Radioactivity. - 2013. - 116. - P.124-132.
- Lonnroth, T., Lill, J.-O., Bjorkholm, A., Haavisto, T., & Slotte, J. M. K.** (2011). Activities of the ^7Be and ^{137}Cs nuclides in mushrooms from Southern and Western Finland//Proceedings Radiochimica Acta. -2011. - 1. - P. 233-235.
- Malinowska E., Szefer P., Bojanowski R.** Radionuclide content in *Xerocomus badius* and the other commercial mushrooms from several regions of Poland // Food Chemistry. - 2006 - 97, N 1. - P.19-24

- Merz S., Shozugawa K., Steinhäuser G.** Analysis of Japanese Radionuclide Monitoring Data of Food Before and After the Fukushima Nuclear Accident//Environ. Sci. Technol. 2015. – 49. – P.2875-2885.
DOI: 10.1021/es5057648
- Mietelski J.W., Jasinska M., Kubicka B., Kozak K., Macharski P.** Radioactive contamination of Polish mushrooms//The Science of the Total Environment. – 1994. – 157. – P. 217-226.
- Mietelski J.W., La Rosa J.L., Ghods A.** ^{90}Sr and $^{239+240}\text{Pu}$, ^{238}Pu , ^{241}Am in some samples of mushrooms and forest soils from Poland // J. Radioanalyt. Nucl. Chem. - 1993. - N 179. - P. 243-258.
- Mietelski J.W., Macharski P., Jasinska M., Broda R.** Radioactive contamination of forests in Poland // Biol. Trace Elem. Res. - 1994. - 43-45. - P. 715-723.
- Mietelski J.W., Dubchak S., Błażej S., Anielska T., Turnau K.** ^{137}Cs and ^{40}K in fruiting bodies of different fungal species collected in a single forest in southern Poland // J. Environ. Radioact. – 2010. - 101, N 9. - P. 706-711.
- Nakashima K., Orita M., Fukuda N., Taira Y., Hayashida N., Matsuda N., Takamura N.** Radiocesium concentrations in wild mushrooms collected in Kawauchi Village after the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant//Peer J. 2015. -3:e1427; DOI 10.7717/peerj.1427
- Oolbekkink G.T., Kuyper T.W.** Radioactive caesium from Chernobyl in fungi//Mycologist. – 1989. – 3. – P.3-6.
- Outola I.** Effect of industrial pollution on the distribution of Pu and Am in soil and on soil-to-plant transfer of Pu and Am in a pine forest in SW Finland// Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. – 2003. - 257, 2. – P. 267–274.
- Popa K., Pui A., Tanase C., Irimia R.** Monitoring of ^{226}Ra and ^{137}Cs radioisotopes on Bistria Valley and their translocation in spontaneous macromycetes// Revista de Chimie (Bucharest) – 2010. – 61. – P.894-896.
- Rosén K., Vinichuk M., Nikolova I., Johanson K.** Long-term effects of single potassium fertilization on ^{137}Cs levels in plants and fungi in a boreal forest ecosystem//J. Environ. Radioact. – 2011. – 102. – P.178-184.
- Rückert G., Diehl J.F., Heilgeist M.** Radioaktivitätsgehalte von 1987 und 1988 im Raum Karlsruhe gesammelten pilzen // Z. Lebensm. Untersforrsch. - 1990. - 190. - S. 496-500.

- Rühm W., Kammerer L., Hiersche L., Wirth E.** Estimation of future radiocaesium contamination of fungi on the basis of behavior patterns derived from past instances of contamination // J. Environ. Radioactivity. - 1998. - 39, N 2. - P. 129-147.
- Seeger R. and Schweinshaut P.** Vorkommen von Caesium in höheren Pilzen // The Science of the Total Environment. - 1981. - 19, S. 253-276.
- Skwarzec B., Jakusik A.** ^{210}Po bioaccumulation by mushrooms from Poland // J. Environ. Monit. - 2003. - 5. - P. 791-794.
- Smith M.L., Taylor H.W., Sharma H.D.** Comparison of the Post-Chernobyl ^{137}Cs contamination of mushrooms from Eastern Europe, Sweden, and North America // Appl. Environm. Microbiol. - 1993. - 59, N 1. - P. 134-139.
- Steiner M., Linkov I., Yoshida S.** The role of fungi in the transfer and cycling of radionuclides in forest ecosystems // J. Environm. Radioactivity. - 2002. - 58, N 2-3. - P. 217-241.
- Steffan B., Steglich W.** Die Hutfarbstoffe des Maronenrohrings (*Xerocomus badius*)//Angew. Chem. - 1984. - 96. - S. 435.
- Teherani D.K.** Determination of ^{134}Cs and ^{137}Cs radioisotopes in various mushrooms from Austria one year after the Chernobyl incident // J. Radioanal. and Nucl.Chem.Lett. - 1988. - 6, N 6. - P. 401-406.
- Tsvetnova O.B., Shatrova N.E., Shcheglov A.I.** The accumulation of radionuclides and heavy metals by mushroom's complex in forestry ecosystems. In: Coll. Res.Contrib. of Research Institute for Nuclear studies. - 2001. - 3,5. - P. 171-176.
- Tyler G.** Metals in sporophores of Basidiomycetes// Trans. Brit.Mycol.Soc. - 1980. - 74. - P. 41-49.
- Vaaramaa K., Solatie D., Aro L.** Distribution of ^{210}Pb and ^{210}Po concentrations in wild berries and mushrooms in boreal forest ecosystems//Sci total Environ. - 2009. - 408. - P. 84-91.
- Vinichuk M., Dahlberg A., Rosén K.** Cesium (^{137}Cs and ^{133}Cs), Potassium and Rubidium in macromycete fungi and Sphagnum Plants// Radioisotopes - Applications in Physical Sciences, 2011, Prof. Nirmal Singh (Ed.), P.279-310. ISBN: 978-953-307-510-5, InTech, available from: <http://www.intechopen.com/books/radioisotopes-applications-in-physical-sciences/cesium-137cs-and-133cs-potassium-and-rubidium-in-macromycete-fungi-and-sphagnum-plants>

Vinichuk M., Johanson K. Accumulation of ^{137}Cs by fungal mycelium in forest ecosystems of Ukraine // Journal of Environmental Radioactivity. - 2003. - 64. - P. 27-43.

Wasser S.P., Grodzinskaya A.A. Content of Radionuclides in Macromycetes of the Ukraine in 1990-1991. In: Fungi of Europe: Investigation, Recording and Conservation, Royal Botanic Gardens, Kew. - 1993. - P. 189-210.

Yoshida S., Muramatsu Y. Concentrations of radiocesium and potassium in Japanese mushrooms // Environ. Sci. - 1994. - 7, N 1. - P. 63-70.

Yoshida S., Muramatsu Y. Concentrations of Alkali and Alkaline Earth Elements in mushrooms and plants collected in a Japanese pine forest, and their relationship with ^{137}Cs // J. Environ. Radioact. - 1998. - 41, N 2. - P. 183-205.

Zagrodzki P., Mietelski J.W., Krośniak M., Petelenz B. Accumulation of cesium and radiocesium in forest litter in selected regions of Poland and its influence on litter-to-mushroom transfer factor / Biological Trace Element Research. Editor: G.N. Schrauzer. Humana Press Inc. - 1994, P. 273-277.

ГРОДЗИНСЬКА Г.А.

БІОАККУМУЛЯЦІЯ РАДІОНУКЛІДІВ У ПЛОДОВИХ ТІЛАХ МАКРОМІЦЕТІВ

В огляді наведені літературні та оригінальні відомості щодо біоаккумуляції природних і техногенних радіонуклідів у плодових тілах макроміцетів. Не зважаючи на те, що з моменту аварії пройшло вже понад 30 років і радіоекологічна ситуація в Україні змінилась на краще, до цього часу дикорослі макроміцети з регіонів, забруднених у результаті Чорнобильської катастрофи, є небезпечними для здоров'я населення внаслідок їх споживання у харчових та лікарських цілях. Враховуючи комплексний характер радіонуклідного забруднення дикорослих макроміцетів на території України та суміжних держав, підкреслена необхідність довгострокового радіоекологічного моніторингу із залученням біоіндикаторних видів.

GRODZINSKAYA A.A. (Grodzyska G.A.). BIOACCUMULATION OF RADIONUCLIDES BY FRUIT BODIES OF MACROMYCETES

This article reviews literature and original data on bioaccumulation of natural and technogenous radionuclides in fruit bodies of wild-grown macromycetes. Despite the fact that since accident have passed more than 30 years, and the radio-ecological situation in Ukraine has improved, until now, wild macromycetes from regions contaminated as a result of the Chornobyl disaster remain dangerous for the health of the population in the case of using for food and medicinal purposes. Taking into account the complex nature of radionuclides contamination of wild macromycetes, emphasizes the need for long-term radioecological monitoring with the involvement of bioindicative species.

М.Л. ЛОМБЕРГ

Институт ботаники им.Н.Г. Холодного НАН Украины

e-mail: margarita@lomborg.kiev.ua

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НАВОЗНИКА КОСМАТОГО- COPRINUS COMATUS (O.F. MÜLL.) PERS.

Исследованы биологические свойства съедобного деликатесного гриба *C. comatus*, известного своими лекарственными свойствами. Получены новые сведения о микроморфологических характеристиках данного вида: зафиксированы аллоцисты, гифальные кольца и конидиальное спороношение, а также подтверждено образование пряжек, анастомозов, дендроидных гиф, кристаллов разной формы, в том числе волосовидных. Показано, что для подавляющего большинства штаммов оптимальный рост обеспечивал компостный агар, на котором наблюдали образование белых перистых колоний с выраженными мицелиальными тяжами. Также характерным было образование ватных колоний на питательных средах различного состава. Для отдельных быстрорастущих штаммов нами подобрана селективная среда - мальц-экстракт-пептон-дрожжевой агар, при выращивании на которой срок приготовления посевного мицелия составлял три дня. Максимальная скорость роста вегетативного мицелия *C. comatus* при установленной для исследованных штаммов оптимальной температуре 27°C на селективной среде составила 12,9 мм/сутки. Найдены критические для мицелиального роста температуры (4°C и 34-37°C). При температуре 4°C наблюдали опущение инокулюма, при 34-37°C рост большинства культур отсутствовал. Исследованные штаммы *C. comatus* начинали расти при значениях pH среды от 5,0 и выше, за исключением штамма 2238, слабый мицелиальный рост которого наблюдали при pH 4,0. Оптимальное значение кислотности среды для исследованных штаммов составило - pH 6,5 и 6,7. Особое внимание уделено штаммам с высокой активностью ферментов: лакказы, амилазы и карбоксиметилцеллюлазы. Полученные результаты свидетельствуют о штаммовой специфичности исследованных культур по отношению к источникам углеродного и азотного питания. В условиях эксперимента наилучший рост и накопление биомассы обеспечивала среда, содержащая в качестве источника углерода - крахмал, а источника азота - пептон. Наиболее перспективные штаммы были проверены на способность к плодоношению. В результате отобран штамм ИВК 2238 в качестве потенциального продуцента новых грибных биотехнологий, а также для дальнейшей разработки технологии промышленного культивирования вида *C. comatus*.

Ключевые слова: навозник, *Coprinus comatus*, биологические свойства, СЭМ, скорость вегетативного роста, рН, температура, ферменты, биомасса, плодоношение

ВВЕДЕНИЕ

Съедобный и лекарственный гриб *C. comatus* – навозник косматый, лохматый или чернильный гриб белый, за рубежом он также известен как «парик адвоката» (lawyer's wig), или «косматая грива» (shaggy mane). В природных условиях произрастает с мая по октябрь одиночно или группами на почве в природных (леса, луга, степи) и антропогенных (парки, сады, лесополосы, газоны) сообществах. Встречается на всех континентах, кроме Антарктиды. Широко распространен на всей территории Украины (Придюк, 2015). Высоко ценится и считается деликатесом в Китае, Японии, на Тайване, а также других азиатских и некоторых европейских странах, где его выращивают в промышленных масштабах (Stamets, 2000; Sabo et al., 2010). Плодовые тела и мицелий *C. comatus* содержат полисахариды, протеины, энзимы, триглицериды и другие вещества, обладающие противоопухолевым и иммуностимулирующим действием, что особенно важно для современной медицины. Биологически активные соединения, полученные из данного гриба, оказывают общий иммуномодулирующий эффект, помогают преодолеть негативные последствия химиотерапии, восстанавливают гормональный баланс, улучшают состояние нервной системы (Cui et al., 2002; Sabo et al., 2010; Dotan et al., 2011; Ding et al., 2012; Ren et al., 2012; Jiang et al., 2013). Представляет интерес использование данного гриба в качестве источника сырья для разработки новых лекарственных препаратов.

Член-корреспондент НАН Украины, профессор, д.б.н. С.П. Вассер совместно с израильскими коллегами много лет занимается изучением лекарственных свойств грибов. Сфера его интересов включает изучение влияния экстрактов различных грибов, в частности *C. comatus*, на развитие раковых клеток. Полученные результаты свидетельствуют об эффективной терапии злокачественного эстроген-независимого рака молочной железы (Asatiani et al., 2011). В недавних исследованиях было показано, что этилацетатный экстракт из плодовых тел *C. comatus* проявляет ингибирующее влияние на клетки рака яичников, а этанольный и

этилацетатный экстракты из плодовых тел и мицелия навозника косматого также селективно ингибируют развитие клеток рака предстательной железы (Rouhana-Toubi et al., 2009, 2013). Сообщается, что водорастворимый полисахарид (ССРА-1), выделенный из плодового тела *S. comatus*, показал высокую ингибирующую активность в отношении опухолевых клеток саркомы 180 (S180) у мышей. Показано, что потребление данного полисахарида не только тормозило развитие саркомы у мышей с транспортированной опухолью, но и повышало относительные индексы селезенки/тимуса, вес тела больного животного также увеличивался. Все данные показали, что ССРА-1 имел потенциальное применение в качестве природного противоопухолевого средства с иммуномодулирующей активностью (Jiang et al., 2013). Полученные результаты также свидетельствуют о терапевтическом механизме экстрактов *S. comatus* в качестве андрогенного рецептора (Zaidman et al., 2008). Многие исследователи отмечают связь противоопухолевой и противовирусной активностей грибных экстрактов и соединений. Так, С. Жао с соавторами (Zhao et al., 2014) продемонстрировали перспективность выделенного из мицелия *S. comatus* фермента лакказы в борьбе с ВИЧ инфекцией *in vitro*. Многочисленные публикации последних лет указывают на наличие в плодовых телах, культуральном мицелии и культуральной жидкости навозника косматого веществ, снижающих содержание сахара и холестерина в крови, обладающих антиоксидантными, антибактериальными, противовоспалительными и противоболевыми свойствами (Ершова и др., 2001; Yang et al., 2002; Badalyan et al., 2003; Бадалян и др., 2005; Han et al., 2006; Han, 2009; Lv et al., 2009; Tsai et al., 2009; Ding et al., 2010; Popovic et al., 2010; Li et al., 2010; Liu et al., 2012; Ren et al., 2012; Yuan, Wang, 2012; Bao et al., 2013; Wang et al., 2013; Zhou et al., 2015). Кроме того, изучались нематофаговые свойства данного вида, что может быть очень перспективным для биологического контроля популяций нематод (Luo et al., 2004, 2007).

Учитывая приведенные выше данные, поиск и выделение новых штаммов лекарственного гриба *S. comatus* из природных местообитаний в культуру открывает возможности пополнения коллекции ИВК активными продуцентами, а изучение биологии данного вида и разработка условий его культивирования являются перспективными для получения

биопрепаратов или пищевых добавок на основе плодовых тел, мицелия и культуральной жидкости *C. comatus*.

Целью нашей работы было изучение биологических особенностей штаммов *C. comatus*, условий их вегетативного роста и плодоношения для обоснованного отбора штаммов-продуцентов, перспективных для создания новых грибных биотехнологий. Для этого исследовали динамику скорости роста мицелия навозника косматого на агаризованных средах различного состава, изучали влияние температуры на рост и жизнеспособность вегетативного мицелия, изучали микроморфологические характеристики, ферментативную активность. Для отобранных перспективных штаммов были определены оптимальные температуры роста и значения pH, подобраны источники углерода и азота для наилучшего мицелиального роста, а также проверена их способность к плодоношению.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объектов исследования были использованы чистые культуры вида *C. comatus** (рода *Coprinus*, семейства *Agaricaceae*, порядка *Agaricales*, класса *Agaricomycetes*), хранящиеся в Коллекции культур шляпочных грибов Института ботаники имени Н.Г. Холодного НАН Украины (ІВК). Всего были исследованы 12 штаммов *C. comatus* разного географического происхождения, поступивших в коллекцию в различные годы (табл. 1) (Бисько и др., 2016).

Микробиологические методы, использованные в данной работе, являются общепринятыми при работе с чистыми культурами непатогенных микроорганизмов, в том числе и мицелиальных грибов (Билай, 1980).

*Здесь и далее приведены современные названия видов в соответствии с *Index fungorum* (Index Fungorum - электронный ресурс, 2016).

Таблица 1. Список исследованных штаммов *Coprinus comatus*.

Штамм IBK	Страна происхождения	Год поступления
137	Россия	1969
138	Украина	1989
173	Россия	1969
1544	Украина	1997
1687	Украина	2000
1727	Израиль	2000
1930	Израиль	2000
2000	Россия	2009
2141	США	2011
2237	США	2012
2238	Китай	2012
2278	Украина	2012

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микроморфологическая характеристика вегетативного мицелия *C. comatus*

Микроструктуры вегетативного мицелия штаммов *C. comatus* были исследованы с применением световой и сканирующей электронной микроскопии. Образцы вегетативного мицелия штаммов 2237, 2238 и 2278 были подготовлены для СЕМ по модифицированному методу Квательбаума и Карнера (Бухало, 1988).

Показано, что для всех исследованных штаммов характерным было наличие таких микроморфологических признаков как пряжки (рис. 1 а, б), анастомозы (рис. 1 в), дендроидные гифы (рис. 2 а-в), кристаллы разной формы (рис. 2 в, 3 а-в), описанные для этого вида ранее (Buchalo et al., 2009, 2011; Бухало и др., 2011). Нами впервые на мицелии *C. comatus* были зафиксированы аллоцисты (рис. 3 а, б), гифальные кольца (рис. 4 а, б) и конидиальное спороношение (рис. 4 в), что является важным признаком вегетативной стадии развития этого гриба и следует учитывать при дополнении видового диагноза.

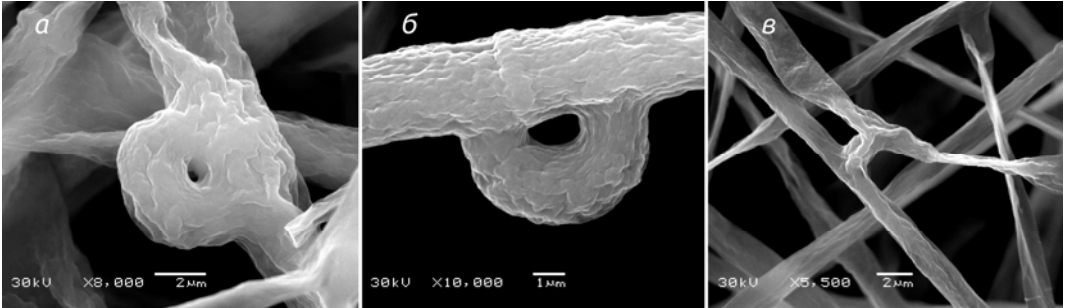


Рис. 1. Морфология *Coprinus comatus* (СЭМ): а – пряжка на мицелии штамма 2278; б – пряжка на мицелии штамма 2238; в – анастомозы на мицелии штамма 2238.

Наличие пряжек является характерным признаком дикариотического мицелия многих *Basidiomycetes*. Присутствие и расположение пряжек на гифах – существенная таксономическая характеристика для некоторых видов базидиальных грибов. Кроме того, при идентификации культур высших *Basidiomycetes* как таксономический признак рассматривают форму пряжек, их размер и частоту появления (Бухало, 1988). У исследованных штаммов мы наблюдали единичные пряжки по типу медальона, реже без просвета между гифами (рис. 1 а, б). Их форма была достаточно постоянной, как было описано у А.С. Бухало с соавторами (Buchalo et al., 2009, 2011; Бухало и др., 2011). В то же время в литературе встречаются сведения об отсутствии пряжек на дикариотическом мицелии *C. comatus* и о наличии псевдопряжек, что может быть обусловлено штаммовой вариабельностью исследованных культур (Dyakov et al., 2011; Придюк, 2015).

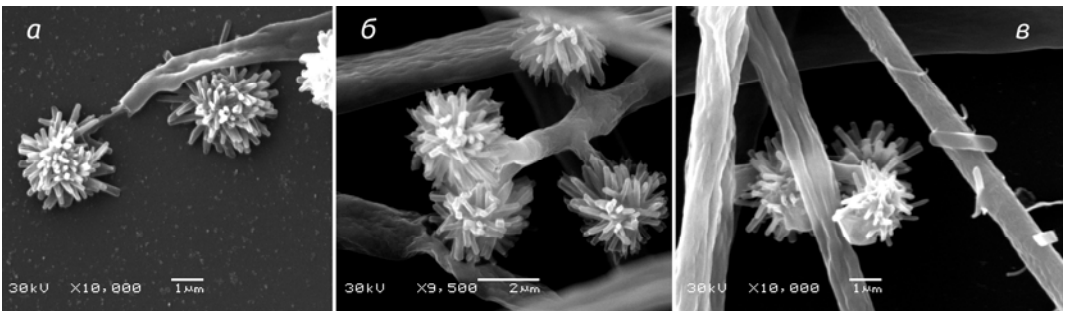


Рис. 2. Морфология *Coprinus comatus* (СЭМ): а, б – дендроидные гифы штаммов 2237 и 2238; в – дендроидные гифы и кристаллы штамма 2278.

Ранее у культур *S. comatus* были описаны ветвящиеся конидиеносцы с конидиями (Orton, Watling, 1979). А.С. Бухало с соавторами исследовали в СЭМ структуру конидий и показали, что верхушки так называемых конидиальных веточек заканчиваются не конидиями, а пучками тонких, радиально расположенных ворсинок, которые при небольшом увеличении создают впечатление округлых конидий (Buchalo, Mitropolskaya, 2002). В исследованиях последних лет сообщается о формировании на мицелии *S. comatus* специфических сферических образований с шипами, обладающими нематофаговой активностью. Китайские исследователи отмечают, что именно эти структуры могут быть ответственными за гибель нематод (Luo et al., 2004). Дендроидные гифы авторы обозначают как «колючие шары» или «spiny ball». Многие грибы образуют хламидоспоры в культуре, и вначале «колючие шары» считали терминальными хламидоспорами, но дальнейшие исследования, а именно отсутствие ядер и быстрое образование данных структур, показали ошибочность этого утверждения (Luo et al., 2004, 2007). В общей сложности Луо с соавторами (Luo et al., 2007) выделили семь токсинов из мицелия *S. comatus*, которые показали способность иммобилизовывать нематоды, и являются гетероциклическими соединениями. В нашем исследовании мы наблюдали аналогичные структуры у всех исследованных штаммов (рис. 2 а-в). Похожие сферические образования были впервые обнаружены нами у другого вида семейства – *Coprinopsis atramentaria* (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo. В литературе похожая функция описана для видов рода *Pleurotus*, которые парализуют нематоды при помощи капель токсина, производимых крошечными секреторными клетками на вегетативных гифах (Barron, Thorn, 1987).

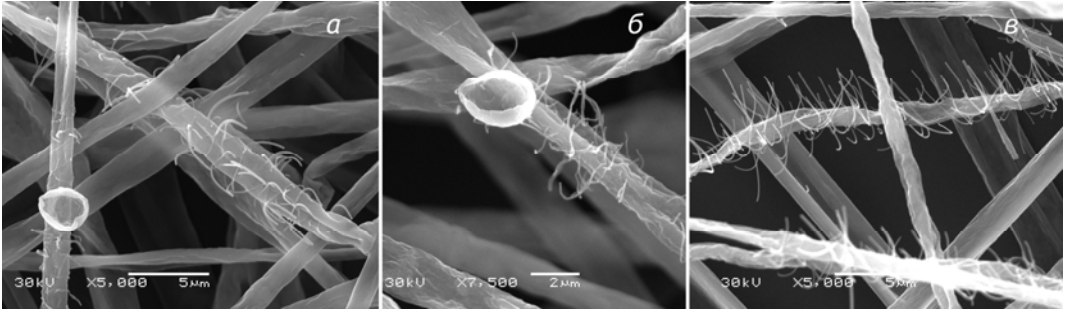


Рис. 3. Морфология *Coprinus comatus* 2238 (СЭМ): а, б – аллоцисты на гифах штаммов 2237 и 2238 соответственно; а-в – волосовидные кристаллы.

В литературе сообщалось о наличии кристаллов разного типа на гифах грибных культур (Бухало, 1988; Stalpers, 1978; Buchalo et al., 2009, 2011). На гифах всех исследованных штаммов *C. comatus* наблюдали редкие волосовидные кристаллы (рис. 3 а-в), что может служить дополнительным таксономическим признаком данной культуры. Подобные образования кристаллов, как на гифах *C. comatus*, которые растворялись при добавлении в препарат 0,1% HCl, наблюдались у видов *Armillaria mellea* (Vahl.) P. Kumm., *Agaricus arvensis* Schaeff., *A. subfloccosus* (J.E. Lange) Hlaváček и *Montagnea arenaria* (DC.) Zeiler (Buchalo et al., 2009; Бухало и др., 2012). В то же время, наряду с волосовидными, у штамма 2278 были зафиксированы кристаллы цилиндрической формы (рис. 2 в). В работе Дьякова с соавторами (Дьяков и др., 2010; Dyakov et al., 2011) у выделенного авторами штамма *C. comatus* кристаллы вообще отсутствовали, что может быть связано с возрастными отличиями исследуемых культур.

Нами впервые были отмечены аллоцисты на гифах *C. comatus* (рис. 3 а, б), что может быть важным при верификации вида. Подобные структуры были замечены у других видов коприноидных грибов, в частности *Coprinellus radians* (Fr.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson (Clémençon, 2004) и *Coprinellus aff. radians* (Badalyan et al., 2011). Правда, функция данных структур авторами прямо не объясняется. Клеменсон (2004) указывает на накопление в аллоцистах гликогена, что позволяет предположить выполнение ими функций, морфологически соответствующих хламидоспорам.

Также на мицелии *C. comatus* мы наблюдали образование специфических гифальных колец. В литературе встречаются упоминания о подобных толстых гифах, образующих лентоподобные петли на мицелии

Mucidula brunneomarginata (Lj.N. Vassiljeva) R.H. Petersen, *Mucidula mucida* (Schrad.) Pat., *Leucocalocybe mongolica* (S. Imai) X.D. Yu & Y.J. Yao, а также *Coprinopsis strossmayeri* (Schulzer) Redhead, Vilgalys & Moncalvo и *Coprinellus aff. radians* (Badalyan et al., 2011; Бухало и др., 2012). Возможные функции этих структур пока не установлены, но то, что петли встречаются на мицелии определенных видов, позволяет рассматривать их как таксономическую характеристику вида *C. comatus*, которая ранее не была описана в литературе. Возможно, подобные структуры будут найдены и в культурах других грибов.

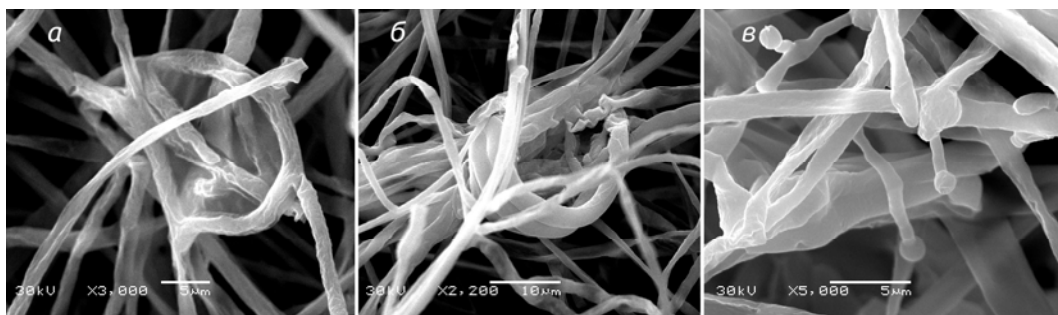


Рис. 4. Морфология *Coprinus comatus* (СЭМ): а – гифальные кольца на мицелии штамма 2237; б – гифальные кольца на мицелии штамма 2238; в – конидиальное спороношение штамма 2238.

Виды макромицетов формируют различные структуры бесполого размножения (анаморфы), которые также могут служить таксономическим критерием (Buchalo et al., 2009). В СЭМ нами были получены новые данные о наличии и морфологии анаморф у культур *C. comatus* (рис. 4 в).

Таким образом, проведенное комплексное исследование с использованием СЭМ позволило установить таксономические признаки, по которым можно проводить идентификацию и верификацию культур навозника косматого.

Рост и морфология колоний *C. comatus* на агаризованных питательных средах разного состава

Данные литературы свидетельствуют о том, что отдельные культуральные и морфологические признаки, а также характер роста вегетативного мицелия могут служить существенной таксономической

характеристикой определенных видов (Stalpers, 1978; Бухало, 1988). Исследование культурально-морфологических признаков проводили на разных агаризованных средах, используя критерии, описанные А.С. Бухало (1988). Учитывали тип колонии, ее цвет и плотность, край и характер внешней линии, цвет реверзума и наличие или отсутствие концентрических кругов.

Всего в работе было исследовано девять натуральных и комплексных агаризованных сред, которые готовили и стерилизовали по общепринятым методикам (Билай, 1980; Бухало, 1988). Натуральные среды: агаризованное пивное сусло (СА) - рН 6,0; овсяный агар (ОА) - рН 6,2; пшеничный агар (ПА) - рН 6,2 и компостный агар (КА) - рН 7,2. Комплексные – картофельно-глюкозный агар (КГА) - рН 6,5; глюкоза-пептон-дрожжевой агар (ГПДА) - рН 6,0; мальц-экстракт агар (МЕА) - рН 5,4; мальц-экстракт-пептон-дрожжевой агар (МУРА) - рН 6,0 и мальц-экстракт-пептонный агар (МРА) - рН 5,4. Подготовку посевного инокулюма и эксперимент проводили по методике, описанной нами ранее (Ломберг, Соломко, 2012). Инкубацию проводили в термостате при температуре $26 \pm 1^\circ\text{C}$. В фазе линейной зависимости прироста радиуса от времени определяли среднюю скорость роста по формуле (Соломко и др., 2000; Ломберг, Соломко, 2012). За критерий для определения сроков получения физиологически активного посевного материала на агаризованной среде принимали время, необходимое для достижения радиуса колоний 40 мм на среде соответствующего состава.

Линейная (радиальная) скорость роста штаммов *S. comatus* представлена в таблице 4. Показано, что для 67% штаммов оптимальный рост обеспечивала натуральная среда КА на основе высушенного грибного компоста, на которой почти все культуры, даже медленнорастущие на других средах, росли со скоростью, превышающей 7 мм/сутки. Наиболее четко данная закономерность прослеживается на примере штамма 2000, который очень плохо рос на всех исследованных средах (рис. 5). Это можно объяснить тем, что по своему составу компостный агар максимально приближен к естественной среде обитания данного вида. В наших исследованиях быстрорастущими себя показали только 33% исследованных штаммов на подобранной селективной для них комплексной среде МУРА. Среди них следует особо отметить штаммы 1687, 2141, 2238, 2278 со скоростью радиального роста более 13 мм/сутки.

Полученные данные подтверждают результаты, полученные ранее А.С. Бухало (1988), о том, что сапротроф *C. comatus* относится к быстрорастущим видам.

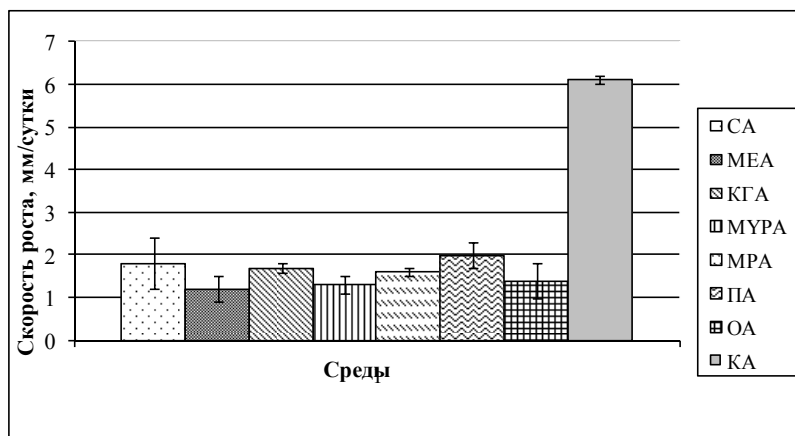


Рис. 5. Скорость радиального роста *Coprinus comatus* 2000 на различных питательных средах.

В тоже время, анализируя полученные результаты, следует отметить тот факт, что культуры навозника косматого на большинстве исследованных сред растут достаточно медленно. Более половины штаммов оказались медленнорастущими и росли со скоростью менее 4 мм/сутки на преобладающем большинстве питательных сред, за исключением МУРА, ПА, ОА и КА, что подтверждает и дополняет наши предыдущие результаты, полученные для трех штаммов *C. comatus* (Соломко и др., 2000; Ломберг, Соломко, 2012).

Таблица 4. Скорость радиального роста вегетативного мицелия штаммов *Coprinus comatus* на питательных средах разного состава, мм/сутки.

Штамм ИВК	Питательные среды								
	СА	МЕА	КГА	ГПДА	МУРА	МРА	ПА	ОА	КА
137	1,7±0,1	1,6±0,1	2,1±0,1	-	1,1±0,2	1,7±0,1	5,3±0,1	5,4±0,3	6,8±0,7
138	1,6±0,1	1,7±0,1	2,1±0,2	-	0,9±0,1	1,6±0,1	7,1±1,1	5,5±0,2	6,7±0,7
173	3,5±0,1	3,5±0,5	5,1±0,3	-	4,1±0,3	2,1±0,4	5,1±0,0	5,3±0,1	6,7±0,2
1544	2,6±0,1	1,7±0,4	1,5±0,1	-	4,6±0,1	1,7±0,3	5,5±0,2	2,3±0,3	7,6±0,4
1687	4,1±0,1	2,2±0,1	3,6±0,2	-	12,5±0,1	3,6±0,3	5,3±0,1	3,2±0,3	7,9±0,2
1727	2,2±0,1	2,1±0,1	2,9±0,2	-	3,5±0,4	2,1±0,2	4,8±0,1	3,2±0,1	8,3±0,2
1930	1,6±0,2	3,3±0,1	3,7±0,1	-	4,1±0,4	2,4±0,1	3,1±0,5	4,9±0,2	7,4±0,5
2000	1,8±0,6	1,2±0,3	1,7±0,1	-	1,3±0,2	1,6±0,1	2,0±0,3	1,4±0,4	6,1±0,7
2141	3,4±0,5	5,1±0,1	4,7±0,1	5,7±0,2	13,4±0,2	2,7±0,6	7,4±0,5	8,0±0,7	8,9±0,6
2237	1,4±0,1	1,7±0,1	3,7±0,2	2,5±0,1	3,9±0,3	2,3±0,1	4,9±0,2	5,5±0,1	7,7±0,3
2238	7,8±0,2	4,9±0,1	4,9±0,1	6,4±0,9	12,6±0,5	3,0±0,1	6,9±0,8	5,1±0,2	9,0±0,8
2278	3,7±0,1	5,3±0,1	4,9±0,1	1,5±0,1	13,3±0,4	2,1±0,1	5,1±0,2	3,2±0,1	10,2±0,8

0,6914
3

Примечание: “-“ данные отсутствуют; полужирным шрифтом отмечена максимальная скорость роста для каждого штамма.

Интересно отметить, что для штамма 138 оптимальными оказались сразу несколько сред натурального состава (ПА и КА), в то время, как другие штаммы отдавали четкое предпочтение какой-то одной питательной среде. Таким образом, для вида с широким ареалом распространения в природе, представленного в нашем исследовании штаммами разного географического происхождения, отмечается достаточно широкий диапазон колебания значений скорости роста у разных штаммов на одной и той же среде.

Отобранные для дальнейших исследований быстрорастущие штаммы и благоприятные для их роста питательные среды приведены в таблице 5.

Как мы видим, наиболее селективной средой для них оказалась МУРА, при выращивании на которой срок приготовления посевного мицелия составил всего три дня.

Ниже приведены макроморфологические особенности коллекционных штаммов *S. comatus* (табл. 6). Анализируя полученные данные, следует отметить, что состав питательных сред существенно влияет не только на скорость, но и на характер роста мицелия, как было отмечено нами ранее (Соломко и др., 2000; Ломберг, Соломко, 2012).

Таблица 5. Минимальный срок для получения физиологически активной маточной культуры *Coprinus comatus* на благоприятных агаризованных средах.

Штамм ИБК	Время культивирования, сутки			
	КА	ПА	ОА	МУРА
1687	5	8	13	3
2141	5	6	5	3
2238	5	6	8	3
2278	4	8	13	3

Наиболее характерным для исследованных культур *S. comatus* было образование ватных колоний на питательных средах различного состава (рис. 6). Данный тип колоний наблюдали у всех культур на СА, а в зависимости от физиологических особенностей каждого конкретного штамма – на МРА, МУРА, ОА, ПА, КГА и даже КА (рис. 7). Отличительной чертой навозника было образование перистых колоний с выраженными мицелиальными тяжами на КА. Среди прочих, наблюдали бархатистые, мучнистые, хлопьевидные колонии, но четкой закономерности их образования не выявлено, прежде всего имела место штаммовая вариабельность культур. Необходимо отметить, что первоначально колонии на всех исследованных средах были белого цвета. С возрастом на отдельных средах наблюдали пожелтение колоний (коричневатый оттенок) и изменение цвета реверзума. В большинстве случаев реверзум приобретал желтую окраску, но иногда изменял цвет на светло или темно-коричневый, или даже черный (рис. 6). Интересно отметить, что интенсивность изменения окраски не зависела от какой-то конкретной среды, но была более выраженной на комплексных средах. Окрашенность

колоний зависела прежде всего от штаммовой специфичности. Зато плотность колоний сильно варьировала в зависимости от состава питательной среды. Наиболее плотные колонии образовывались на СА, МРА, а у части исследованных культур – на КГА, ОА, ПА. На КА у всех штаммов образовывались колонии средней плотности, за исключением штамма 2000, колонии которого на компостном агаре были максимально плотными.

Ценным критерием для идентификации штаммов в культуре является концентрическая зональность. В нашем исследовании четкая зональность за счет разной плотности мицелия была отмечена у штаммов 138, 173, 1544, 1687, 2000 – на СА, у штаммов 1544, 1930, 2141, 2237 – на КГА, у штаммов 137, 1930, 2000 – на МРА и у штамма 1727 – на КА соответственно.

Таким образом, поскольку состав агаризованных сред существенно влияет на скорость роста вегетативного мицелия, полученные нами данные позволяют для каждого из исследованных штаммов отметить условия, обеспечивающие максимальную скорость роста. Результаты исследования значительно обогащают банк данных о культурах, которые хранятся в ИВК коллекции, характеризуя их таким количественным физиологическим показателем, как скорость роста мицелия на ряде агаризованных сред, которые используются в отечественной практике. Эта информация, полученная при стандартных условиях культивирования, дает представление о достаточно большом разнообразии физиологических свойств отдельных штаммов в пределах одного вида, что, в свою очередь, может быть использовано для исследований внутривидового биоразнообразия по другим физиологическим признакам, а также рассмотрена в разных аспектах. Также полученные в ходе исследования данные важны и для возможного практического использования культур коллекции, поскольку могут быть использованы в качестве критерия для отбора отдельных наиболее перспективных штаммов. Быстрорастущие штаммы, как известно, более конкурентноспособны и имеют серьёзные технологические и экономические преимущества на всех этапах технологического процесса (Ломберг, Соломко, 2006).

Таблица 6. Морфологическая характеристика колоний исследованных штаммов *Coprinus comatus* на агаризованных питательных средах разного состава.

Питательная среда	Тип, цвет, плотность колонии, концентрическая зональность, реверзум	Штаммы
СА	Ватные*, белые, средней плотности, с концентрической зональностью, РВ желтеет	137(-), 138, 173, 1544, 1687, 1930(-), 2141(-), 2000, 2278(-)
	Колонии плотные, зональность отсутствует	1727, 2237, 2238
МЕА	Ватные, белые, средней плотности, зональность отсутствует, РВ желтеет	1727, 1930, 2141, 2237, 2238, 2278
	Мучнистые, порошковидные, средней плотности	173, 1687, 2000
	Хлопьевидные, средней плотности	137, 138
	Бархатистые, прозрачные (неплотные)	1544
КГА	Ватные, белые, плотные и средней плотности, с концентрической зональностью, РВ с возрастом не изменяется или желтеет (коричневает)	1544, 1727, 1930, 2000, 2141, 2237, 2238(-), 2278
	Мучнистые, порошковидные, средней плотности и прозрачные, зональность отсутствует	137, 138, 173, 1687
МУРА	Ватные, белые, средней плотности, зональность отсутствует, РВ желтеет (коричневает, чернеет)	1727, 1930, 2141, 2237, 2238, 2278
	Мучнистые, порошковидные, средней плотности, зональность отсутствует	137, 138, 173, 1544, 1687, 2000
МРА	Ватные, белые, очень плотные, зональность отсутствует, РВ желтеет (чернеет)	137(+), 138, 173, 1544, 1687, 1727, 1930(+), 2000(+), 2141, 2237, 2238
	Бархатистые, белые, средней плотности, зональность отсутствует	2278
ВА	Ватные, белые, плотные и средней плотности, зональность отсутствует, РВ не изменяется или желтеет	137, 173, 1687, 1930
	Бархатистые, белые, зональность отсутствует, средней плотности, край прижат к субстрату	138, 1544, 1727, 2141, 2000, 2237, 2238, 2278
ПА	Ватные, белые, плотные и средней плотности, зональность отсутствует, РВ с возрастом не изменяется, реже желтеет	137, 138, 173, 1687, 1930, 2141, 2278

	Бархатистые, белые, прозрачные, зональность отсутствует, РВ не изменяется	1544, 1727, 2000, 2237, 2238
КА	Перистые, с мицелиальными пучками гиф, радиально отходящими от центральной оси, белые, с возрастом коричневеют, средней плотности или прозрачные, зональность отсутствует, РВ желтеет	137, 138, 173, 1544, 1687, 1727(+), 1930, 2141, 2237, 2238 2278
	Ватные, белые, плотные, зональность отсутствует, РВ не изменяется	2000

Примечание: «*» - у ватных колоний наблюдали высокий воздушный мицелий, отдельные гифы были переплетены во всех направлениях; РВ – реверзум; (+) или (-) – наличие или отсутствие концентрической зональности в случае отличия от большинства штаммов на данной среде.

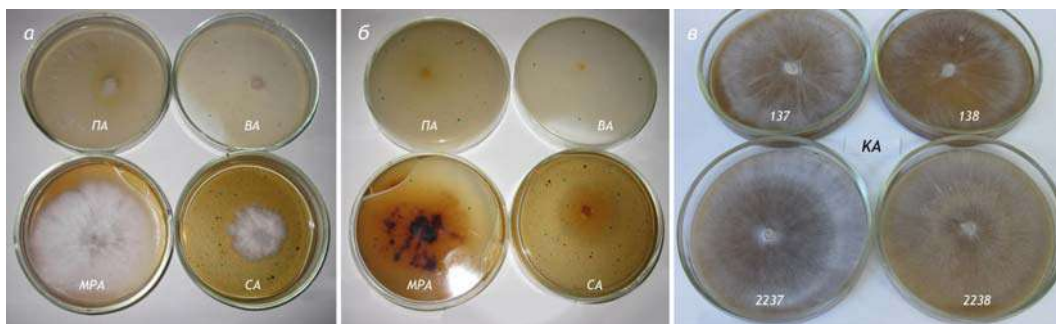


Рис. 6. *Coprinus comatus*: колонии грибов на натуральных и комплексных питательных средах: а – колонии штамма 2238 и б - их реверзум, в – колонии штаммов на КА.

Влияние температуры инкубации на рост и морфологию культур *Coprinus comatus*

Температура является важным фактором при выращивании грибов, особенно промышленно культивируемых видов. Граничные температуры являются биологической особенностью каждого конкретного штамма и зачастую зависят от географического происхождения культуры (Бухало, 1988; Ломберг, 2002, 2012).

Зависимость роста и морфогенеза культур вида *C. comatus* от температурного фактора остается недостаточно изученной. В связи с этим определение оптимальных и граничных значений температур для

мицелиального роста исследованных штаммов было актуальным. Эксперименты проводили на комплексной среде КГА. Расчет средней скорости роста культур проводили по общепринятой методике (Соломко и др., 2000; Ломберг, Соломко, 2012). Оптимальной для культивирования была температура, при которой культура росла с максимальной скоростью. Нами исследован рост и морфология культур при температуре 4°C, которая является нижним пределом развития большинства грибов, 21°C, 24°C, 27°C, 30°C, т.е. в пределах оптимума мицелиального роста, а также при максимальных для большинства высших грибов температурных границах: 34°C, 35°C, 37°C и 40°C.

Все исследованные штаммы вида *S. comatus* можно отнести к группе мезофильных грибов с оптимумом роста в пределах 20-30°C. Согласно литературным данным, оптимальная температура для представителей данного вида колеблется в пределах 23-26°C (Бухало, 1988; Jang et al., 2009). На предыдущем этапе исследования, исходя из скорости радиального роста, были отобраны наиболее быстрорастущие штаммы навозника косматого – 2141, 2237, 2238, 2278. Для данных штаммов экспериментально определены оптимальные температуры мицелиального роста (рис. 7). Показано, что температура 27°C обеспечивала максимальную скорость роста мицелия большинства исследованных культур. Дальнейшее повышение температуры приводило к значительному торможению роста мицелия у всех штаммов, кроме 2238. Следует отметить, что мицелий данного штамма одинаково хорошо рос в температурном диапазоне от 21°C до 30°C с максимумом при 24°C. Широкий температурный оптимум наряду с высокой скоростью мицелиального роста делает этот штамм чрезвычайно привлекательным для его использования в промышленном грибоводстве. Наши данные полностью согласуются с результатами исследований Джанг с соавторами (Jang et al., 2009), в работе которых оптимальной для роста культур навозника косматого отмечена температура 26°C, а также с данными Наварро-Гонзалез (Navarro-Gonzalez, 2008) с оптимумом 25°C для мицелиального роста культур *S. comatus*.

В зависимости от температуры нами были отмечены различия в морфологии колоний. Большинство штаммов образовывали белые, ватные, плотные мицелиальные колонии без концентрической зональности, с возрастом колонии и их реверзум желтели и коричневели, причем при повышении температуры наблюдалась большая пигментация (рис. 8).

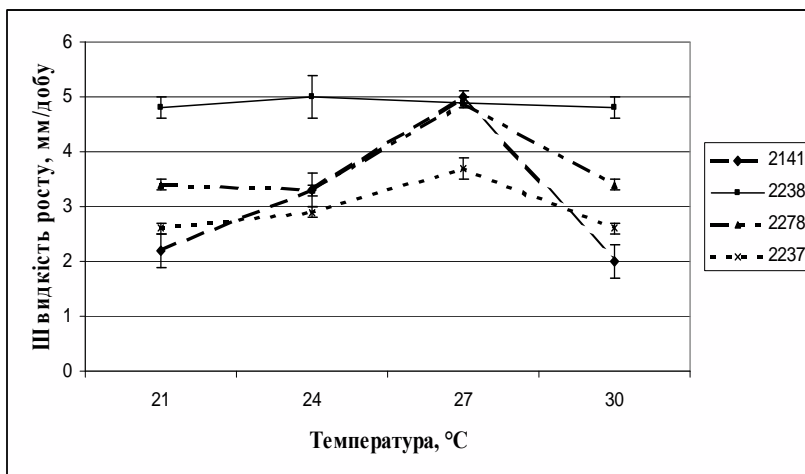


Рис. 7. Зависимость роста мицелия штаммов *Coprinus comatus* от температуры.



Рис. 8. *Coprinus comatus* 2238: морфология колоний при разных температурах.

У всех исследованных культур *C. comatus* рост мицелия при температуре $4 \pm 1^\circ\text{C}$ отсутствовал (табл. 7). Однако у всех штаммов наблюдали опущение инокулюма, за исключением штамма 173. Культуры сохраняли жизнеспособность и возобновляли рост при переносе в благоприятные температурные условия. Полученные нами результаты полностью совпадают с данными, приведенными в литературе, где

отмечается отсутствие роста у штаммов *C. comatus* при +4°C (Бухало, 1988; Kües, 2000; Navarro-González, 2008).

Отношение к верхним граничным температурам в нашем исследовании было более разноплановым. Так, 8 из 12 исследованных культур не росли уже при температуре +34°C, причем данная температура, указываемая в литературе как критичная для многих видов грибов (Бухало, 1988), оказалась критичной только для штамма 2141, остальные культуры возобновляли свой рост при переносе в благоприятные условия. При температуре +35°C не росло 10 культур, но жизнеспособность при этом сохраняли все штаммы, кроме 2141. Именно по этой причине данный штамм, показавший себя быстрорастущим на селективной среде, не включали в опыты по плодоношению, так как в производственных условиях очень часто невозможно избежать кратковременного перегрева субстрата, который в случае использования данного штамма приведет к гибели мицелия. При температуре +37°C, которая отмечается некоторыми авторами как критическая для видов коприноидных грибов (Бухало, 1988; Kües, 2000; Navarro-González, 2008) не росли все исследованные штаммы. Однако оказалось, что отдельные штаммы навозника косматого – 173, 1930 и 2238, сохраняли жизнеспособность и возобновляли свой рост при переносе в благоприятные температурные условия. Таким образом их мицелий оказался более жизнеспособным по сравнению с другими исследованными штаммами. В дальнейшем рост данных штаммов проверялся при температуре +40°C, при которой мы отметили отсутствие какого-либо роста и потерю жизнеспособности. Возможно, верхняя температурная граница для этих штаммов находится ниже 40°C, что требует дополнительных исследований. Полученные данные свидетельствуют о большом разнообразии исследованных штаммов навозника по отношению к предельным значениям температурного режима. В результате исследования установлена зависимость радиальной скорости роста от температуры инкубации. Таким образом, наиболее благоприятной температурой, обеспечивающей максимальную скорость роста вегетативного мицелия у всех исследованных штаммов, была температура 26±1°C. Полученные температурные характеристики важны для первичного скрининга штаммов, которые в дальнейшем могут быть использованы для испытаний и внедрения в различные сферы биотехнологии.

Таблица 7. Жизнеспособность мицелия штаммов *Coprinus comatus* при разных температурах.

Штамм ИВК	Температура инкубации, °С										
	4		27		34		35		37		40
137	±	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
138	±	+	±	+	-	+	-	-	-	-	-
173	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
1544	±	+	+	+	-	±	-	-	-	-	-
1687	±	+	±	+	-	+	-	-	-	-	-
1727	±	+	-	+	-	±	-	-	-	-	-
1930	±	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
2000	±	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
2141	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2237	±	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
2238	±	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
2278	±	+	±	+	±	+	-	-	-	-	-

Примечание: "±" опущение инокулюма, «+» наличие роста культур при данной температуре инкубации, "-" отсутствие роста культур.

Наличие ферментов различных классов у культур *Coprinus comatus*

Грибы, растущие в природе на различных субстратах, способны утилизировать их и использовать для своих ростовых и энергетических потребностей. Направленный поиск активных штаммов грибов – продуцентов ферментов в природе позволяет уточнить место и роль отдельных видов грибов в круговоротах веществ, отобрать наиболее активные продуценты для биотехнологических целей (Михайлова и др., 2010). Навозник косматый относится к группе гумусовых сапротрофов и как все гетерогенные организмы получает необходимые питательные вещества из субстрата. В биоценозах данный вид является деструктором различных биополимеров. В зависимости от субстрата, на котором развивается гриб, активность различных штаммов одного вида может сильно варьировать. В литературе имеются лишь фрагментарные сведения о ферментах *C. comatus*. Так, сообщается о получении из жидкой культуры навозника косматого фибрин-специфического фибринолитического

фермента (Liu et al., 2012), а также клонировании лакказы-изоферментного гена, полученного из *S. comatus* в геноме дрожжей вида *Pichia pastoris* (Bao et al., 2013). Предварительные исследования показали, что экстракт рекомбинантной лакказы продемонстрировал различные ферментативные свойства.

Наличие или отсутствие определенных ферментов устанавливали с помощью качественных цветовых реакций, предложенных Г.П. Молиторисом для морских грибов (Molitoris, 2000). Проводили прямые и косвенные ферментативные тесты, хорошо зарекомендовавшие себя при изучении сумчатых грибов рода *Morchella* (Михайлова, 2012; Полюх, Ломберг, 2013). Нами исследовано 12 штаммов *S. comatus* на наличие внеклеточных ферментов, характеризующих окислительно-восстановительные процессы - оксидазы (лакказы), обмен углеводов (амилаза, целлюлаза), липидов (липаза) и метаболизм азотистых соединений (протеаза, нитрат-редуктаза).

Лакказа – медь-содержащий фермент, который катализирует окисление фенолов. У всех исследованных штаммов *S. comatus* была отмечена положительная реакция на лакказу от умеренной до сильной (табл. 8). На рисунке 9 а показана культура *S. comatus* 1687 с сильной положительной реакцией на лакказу, о чем свидетельствует появление интенсивной фиолетовой окраски. У других исследованных штаммов также была отмечена разная по интенсивности (от сильной к умеренной) положительная реакция, что свидетельствует о различных показателях лакказной активности. Таким образом данные штаммы способны окислять молекулярным кислородом орто- и пара-дифенолы, моно-, три- и полифенолы с образованием соответствующих хинонов.

Таблица 8. Ферментативная активность штаммов *Coprinus comatus*.

Штамм	Фермент					
	Лакказа	Амилаза	КМЦ- целлюлаза	Липаза	Протеаза	Нитрат- редуктаза
137	3	3	3	-	-	-
138	2	3	1	-	-	-
173	2	1	1	-	-	-
1544	3	3	1	-	-	-
1687	3	1	3	-	-	-

1727	3	2	1	-	-	-
1930	3	1	3	-	-	-
2000	3	3	3	-	-	-
2141	2	1	1	-	-	-
2237	3	3	1	-	-	-
2238	3	3	3	-	-	-
2278	2	1	1	-	-	-

Примечание: «-» реакция отсутствует; «1» – слабая реакция; «2» – умеренная реакция; «3» – сильная реакция

У всех исследованных культур отмечена четкая положительная реакция на наличие внеклеточной амилазы (табл. 8). Она проявлялась в появлении прозрачной зоны вокруг или непосредственно под мицелиальной колонией после нанесения реагента.



Рис. 9. *Coprinus comatus*: положительная реакция на лакказу (а), амилазу (б), карбоксиметилцеллюлазу (в).

Наиболее высокая активность данного фермента отмечена у штаммов 137, 138, 1544, 2000, 2237, 2238 на 3-и сутки культивирования. Максимальная зона активности фермента в пределах 10-15 мм отмечена нами у штамма 2000, отличающегося очень низкой скоростью мицелиального роста. У остальных штаммов зона активности амилазы зарегистрирована непосредственно под мицелиальной колонией и только на третий день культивирования (рис. 9 б). Таким образом, полученные положительные реакции свидетельствуют о способности исследованных штаммов гидролитически расщеплять крахмал до более простых соединений.

Исследование наличия целлюлазной активности штаммов проводили с помощью качественной цветовой реакции на карбоксиметилцеллюлазу (КМЦ). Все исследованные виды дали четкую позитивную реакцию на

данный фермент. На рисунке 9 в изображена сильная положительная реакция на наличие КМЦ у штамма *S. comatus* 1687. Еще у нескольких штаммов - 137, 1930, 2000, нами отмечена сильная положительная реакция на КМЦ, которая выражалась в образовании бесцветных зон вокруг и под колониями культур, причем с возрастом она становилась более выраженной. У остальных исследованных штаммов нами отмечена довольно слабая реакция на этот фермент. В результате полученных данных, можно сделать вывод, что отдельные представители *S. comatus* способны разлагать целлюлозу до глюкозы или дисахарида целобиозы.

В результате проведенной проверки наличия фермента липазы, у всех исследованных штаммов *S. comatus* липазной активности обнаружено не было. Об этом свидетельствовало то, что в процессе роста данных штаммов не происходило образования осадка омыленных соединений. Таким образом, данные штаммы не подтвердили способность гидролизовать триглицериды до высших жирных кислот и глицерина.

При выращивании чистых культур навозника косматого на среде, содержащей желатин, все исследованные штаммы показали отрицательную реакцию на фермент протеазу (табл. 8). Поэтому, можно предположить, что исследованные штаммы *S. comatus* не способны гидролизовать пептидные связи между аминокислотами, поскольку протеазная активность у них отсутствовала.

Нитратредуктаза - молибденсодержащий фермент, который катализирует восстановление нитратов до нитритов в процессе ассимиляции нитрата. Исследование наличия нитратредуктазной активности проводили с использованием NaNO_3 в качестве источника азота. Принцип действия реакции заключался в том, что нитрат под действием выше приведенного фермента превращался в нитрит. При этом индикатором реакции служили растворы сульфаниловой кислоты и α -нафтиламина, при положительной реакции на нитратредуктазу среда должна приобретать характерную ярко-розовую окраску. У исследованных штаммов *S. comatus* нитратредуктазной активности обнаружено не было (рис. 10). Вполне вероятно, что они не способны к ассимиляции нитратов.

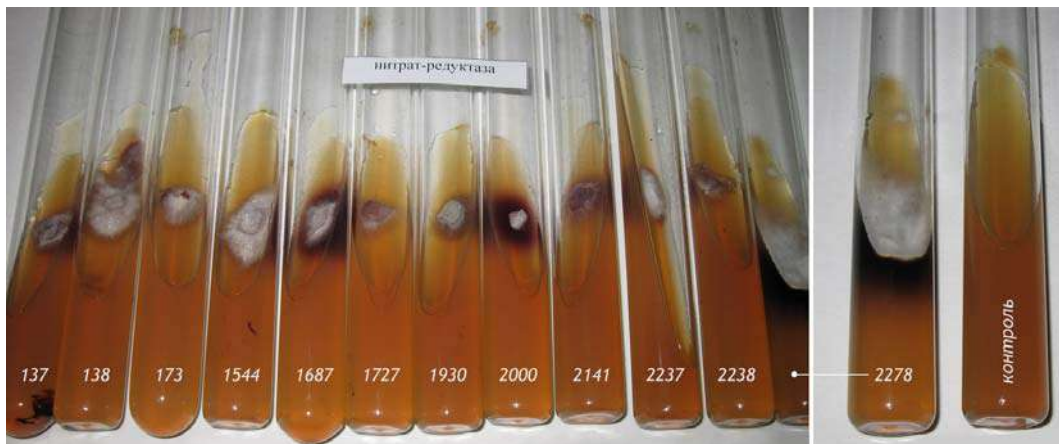


Рисунок 10. *Coprinus comatus*: отрицательная реакция на нитратредуктазу

Интересно отметить, что мы наблюдали потемнение, разной степени интенсивности, вокруг и непосредственно под инокулюмом, что может указывать на различную физиологическую активность исследованных штаммов.

Таким образом, с помощью качественных цветных реакций установлено наличие шести ферментов в культурах навозника косматого, которые достаточно полно характеризуют метаболизм липидов, углеводных, азотистых соединений и окислительно-восстановительные процессы. В результате проведенного скрининга особое внимание уделено штаммам, у которых при наличии активности ферментов целлюлазного комплекса была высокая активность ферментов окислительно-восстановительных процессов – в первую очередь следует отметить штамм 2238.

Влияние кислотности среды на рост вегетативного мицелия

Культивирование макромицетов на жидких средах лежит в основе многих современных биотехнологий. Одним из важнейших и постоянно действующих физико-химических факторов, регулирующих рост и метаболизм грибов в культуре, является концентрация водородных ионов (рН). Данные литературы свидетельствуют о том, что базидиомицеты способны расти в довольно широком диапазоне рН, хотя считается, что для большинства из них оптимальные значения находятся в пределах 5,0-

6,5. В литературе приводятся данные о том, что грибы, принадлежащие к одной экологической или систематической группе, могут значительно отличаться между собой по отношению к исходному рН среды, изменяя его в процессе роста в ту или иную сторону в зависимости от состава среды (Бухало, 1988).

Рост вегетативного мицелия штаммов *C. comatus* 2238 и 2278, отобранных на предыдущих этапах исследования по данным скорости мицелиального роста на агаризованных питательных средах, изучали в поверхностной культуре на жидкой питательной среде, хорошо зарекомендовавшей себя при исследовании высших базидиальных грибов в поверхностной и глубинной культуре (Lomberh et al., 2002; Ломберг, 2012). При определении оптимальной для роста культур *C. comatus* рН среды в диапазоне от 3,0 до 7,8 было установлено, что кислотность среды является важным фактором, регулирующим рост мицелия. Все исследованные штаммы *C. comatus* начинали расти при значениях рН среды от 5,0 и выше (рис. 11). Исключением оказался штамм *C. comatus* 2238, слабый мицелиальный рост которого мы наблюдали при рН 4,0 (Ломберг и др., 2014).

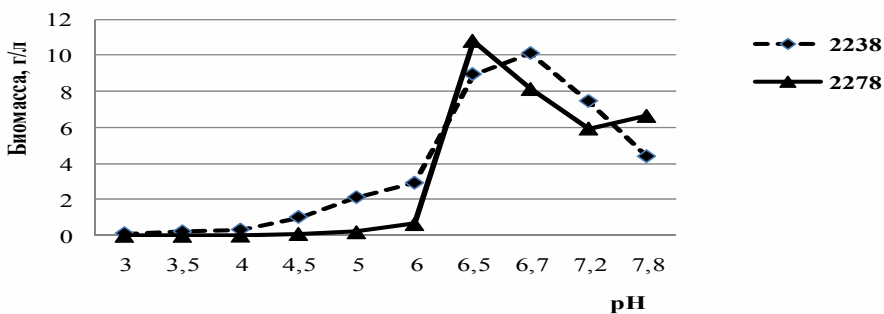


Рис. 11. *Coprinus comatus*: зависимость роста штаммов 2238, 2278 от рН среды.

Наиболее благоприятными для активного роста мицелия штаммов *C. comatus* 2278 и 2238 оказались значения рН 6,5 и 6,7 соответственно. При этих значениях выход биомассы исследованных штаммов *C. comatus* составил более 10,0 г/л на 14-е сутки культивирования в стационарных условиях. Из литературных источников известно, что культуры *C. comatus* растут в диапазоне рН 5,0-12,0 (Navarro-González, 2008; Jang et al., 2009), что

подтверждают и полученные нами данные о влиянии pH среды на рост мицелия *S. comatus*. В ходе исследования нами впервые установлены оптимальные значения этого параметра для мицелиального роста исследованных штаммов, а также отмечено, что штамм 2238 менее требователен к кислотности среды.

Влияние источников углерода и азота на на рост вегетативного мицелия

На сегодняшний день актуальным направлением современных микологических исследований является создание биотехнологий получения грибной биомассы и метаболитов. В связи с этим использование штаммов съедобного и лекарственного гриба *S. comatus* в качестве продуцентов пищевой биомассы и источника биологически-активных веществ является достаточно перспективным.

Общеизвестно, что углерод является единственным источником энергии, который грибы получают при расщеплении углеродсодержащих субстратов, он необходим для синтеза веществ и участия в окислительных процессах. Также, для получения хорошего роста мицелия в культуре и высокого содержания в нем протеина очень важен правильный выбор источника азота. Общеизвестно, что грибы могут использовать как органические, так и неорганические формы азота (Бухало, 1988; Михайлова, Бухало, 2012). Было проведено исследование влияния различных источников углеродного и азотного питания на рост штаммов навозника косматого. Потребности культур в источниках питания определяли на синтетической среде следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,005; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,003; ZnCl_2 – 0,005. Кислотность среды изменяли в соответствии с оптимальным для каждого штамма значением pH, найденным экспериментально. В качестве источников углерода были использованы моносахариды (глюкоза, ксилоза), дисахариды (сахароза, лактоза) и полисахариды (крахмал), которые добавляли в количестве, эквивалентном 20, 25, 30, 35 и 40 г глюкозы по углероду. В качестве источников азота мы использовали нитратные – KNO_3 и аммонийные соли – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, а также органические соединения азота – аспарагин, пептон, которые вносили в среды в количестве, эквивалентном 3,0; 4,0 4,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ по азоту. Исследования проводили в колбах Эрленмейера объемом 100 мл,

содержащих 30 мл питательной среды. Инокулюмом служили 7-ми суточные культуры грибов, предварительно выращенные на СА. В каждую колбу с жидкой средой вносили по три мицелиальных диска диаметром 5 мм. Культуры инкубировали в стационарных условиях при $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Биомассу мицелия определяли на момент, когда в одном из вариантов мицелий полностью покрывал поверхность среды. Биомассу отфильтровывали и высушивали при температуре $105 \pm 1^\circ\text{C}$ до постоянной массы. Также определяли конечное значение рН культуральной жидкости.

Данные по накоплению биомассы и конечного значения рН во время роста культур на различных источниках углеродного и азотного питания приведены в таблицах 9 и 10. Анализируя полученные данные, можно констатировать тот факт, что для штамма *C. comatus* 2238 наилучший рост и накопление биомассы обеспечивала среда, содержащая в качестве источника углерода - крахмал, а для *C. comatus* 2278 - ксилозу, однако выход биомассы последнего был незначительный. Значение рН культуральной жидкости исследованных штаммов в процессе роста существенно не изменялось. Наименьший рост у обоих штаммов наблюдали на средах с лактозой и сахарозой, а также неорганическими источниками азота. Полученные данные частично подтверждают результаты исследований китайских ученых (Jang et al., 2009), показавших перспективность использования крахмала в качестве источника углерода.

Таблица 9. Влияние источников углерода на рост *Coprinus comatus* (10 сутки стационарного культивирования).

Источник углерода	рН среды начальное	Штамм 2238		Штамм 2278	
		рН конечное	Биомасса, г/л	рН конечное	Биомасса, г/л
Глюкоза	6,5	6,4	$1,7 \pm 0,3$	6,4	$1,4 \pm 0,2$
Ксилоза	5,5	5,5	$3,7 \pm 0,4$	5,9	$2,8 \pm 0,2$
Сахароза	6,7	6,4	$0,7 \pm 0,1$	6,4	$0,8 \pm 0,3$
Лактоза	6,7	6,6	$0,8 \pm 0,1$	6,5	$0,7 \pm 0,1$
Крахмал	6,6	6,4	$10,2 \pm 0,3$	6,5	$1,3 \pm 0,1$

Примечание: базовая среда в качестве источника азота содержала 4 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Таблица 10. Влияние источников азота на рост *Coprinus comatus* (10 сутки стационарного культивирования).

Источник азота	рН среды начальное	Штамм 2238		Штамм 2278	
		рН конечное	Биомасса, г/л	рН конечное	Биомасса, г/л
KNO ₃	6,5	6,3	2,3±0,1	6,5	2,6 ±0,0
NH ₄ NO ₃	5,1	3,7	0,4±0,0	3,3	0,3±0,0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	6,5	6,5	1,4±0,6	6,1	1,5±0,2
Аспарагин	6,5	6,3	4,0±0,1	6,1	4,3±0,0
Пептон	6,3	6,5	12,6±0,2	6,5	12,5±0,1

Примечание: базовая среда в качестве источника углерода содержала 20 г/л глюкозы

Однако данные авторы также рекомендуют добавлять в среду мальтозу и сахарозу, а также триптон – в качестве источника азота. В исследованиях других авторов (Chaiyama et al., 2007) для выращивания культур *C. comatus* показана целесообразность применения в качестве источника углерода маннозы и мальтозы. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой штаммовой специфичности культур *C. comatus* по отношению к источникам углеродного питания.

Максимальный рост исследованных нами штаммов отмечен на среде с органическим источником азота - пептоном (табл. 10). Значительно хуже оба штамма росли на среде с аспарагином. При добавлении в среду нитрата аммония наблюдали существенное изменение значений рН среды в кислую сторону, что отрицательно отражалось на приросте биомассы исследованных штаммов. Изучение отобранных штаммов навозника косматого на минеральной среде с различными источниками азота показало, что все исследованные штаммы используют как нитратные, так и аммонийные, а также органические соединения азота. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о штаммовой специфичности исследованных штаммов по отношению к источникам азотного питания.

В дальнейшем, увеличивая концентрации установленных оптимальных для мицелиального роста источников углерода и азота, было выяснено, что максимальный рост биомассы штамма *C. comatus* 2238

обеспечивали крахмал и пептон в соотношении С : N= 29,7 с выходом биомассы 18,3 г/л (табл. 11). Для штамма 2278 оптимальное соотношение концентраций ксилозы и пептона составило С : N= 16,7, обеспечивавшее выход биомассы 5,2 г/л. Дальнейшее увеличение концентрации ксилозы приводило к существенному ингибированию роста мицелия обеих культур, которые практически не росли при концентрации ксилозы 30 г/л. Существенно уменьшался выход биомассы исследованных штаммов *S. comatus* при и при увеличении концентрации пептона до 4,5 г/л. На среде с крахмалом и ксилозой образовывались очень плотные пушистые колонии гриба. Цвет культуральной жидкости не изменялся при использовании ксилозы и существенно темнел при культивировании на среде с крахмалом.

Таблица 11. Влияние различных концентраций источников углерода и азота на выход биомассы штаммов *Coprinus comatus* при стационарном культивировании.

Штамм	Источник углерода	С:N	Концентрация биомассы, г/л
2238	крахмал	19,7	10,2±0,3
		24,7	6,0±0,8
		18,5	4,7±0,5
		29,6	5,4±0,6
		22,2	5,7±0,4
		34,6	5,7±0,3
		25,8	7,8±0,5
		23,0	8,5±0,8
		39,5	9,7±0,9
2278	ксилоза	29,7	18,9±0,3
		17,8	2,8±0,2
		22,2	4,1±0,4
		16,7	5,3±0,8
		14,8	4,5±0,0
		26,7	0,6±0,0

Исследование роста штаммов *S. comatus* на питательных средах с различными источниками углерода и азота показало, что они способны усваивать широкий спектр субстратов, однако накопление максимальной биомассы происходило на отдельных подобранных для каждого штамма источниках углерода и азота.

Таким образом, анализируя полученные данные, нами установлено, что наилучший рост и накопление биомассы штаммов *S. comatus* обеспечивала среда, содержащая в качестве источников углерода – крахмал и ксилозу, в качестве источника азота – пептон.

Плодоношение штаммов *Coprinus comatus*

Значение сапротрофных макромицетов обусловлено тем, что они обеспечивают высшие растения источниками углеродного питания, превращая в доступные растениям соединения нерастворимые целлюлозу и лигнин, поддерживая экологическое равновесие. Сообщается, что навозник косматый способен утилизировать целлюлозу и лигнин соломы, древесные остатки растений (Mohamed, Dix, 1988), хорошо адаптирован к широкому разнообразию субстратов для интенсивного и экстенсивного культивирования (Stamets, 2000).

В природных условиях урожайность *S. comatus* напрямую зависит от питательных свойств и физической структуры субстрата, природных условий. Используя подготовленный компост, мы создаем элективные условия для роста и плодоношения культур навозника косматого. Целью данного этапа было провести оценку способности к плодоношению, отобранных по скорости радиального роста, отношению к температурам, ферментативной активности, потенциально перспективных штаммов *S. comatus* 2278 и 2238. В качестве субстрата был использован незасеянный компост фазы II(ООО«Валентина», г. Васильков, Киевская обл.) со следующими параметрами: общий азот – 2,3%, соотношение C/N - 17/1, зольность – 24%, влажность – 68-72 %, рН – 7,4. Посевной инокулюм готовили на подобранной наиболее благоприятной для обоих штаммов питательной среде МУРА и зерне овса. Компост засеивали посевным мицелием (2% от веса субстрата), раскладывали в стеклянные 0,5 л банки и пластиковые поддоны, и накрывали металлической пищевой фольгой. Посевы инкубировали при температуре 26±1°C. Через 3 недели, после полного обрастания, компост накрывали покровной почвой, слоем 4–5 мм (торф, увлажненный до 80% влажности, рН 7,4), и оставляли при той же температуре для прорастания покровного грунта и выхода мицелия на поверхность. После этого (через 3–4 суток) банки освобождали от фольги, увлажняли поверхность почвы, накрывали полиэтиленовыми колпаками и переносили на подоконник при температуре 15–17°C. Через 7–10 дней наблюдали появление первых плодовых тел (рис. 12).

Плодовые тела обоих штаммов образовывались на свету (дневное освещение). Покровный грунт постоянно увлажняли, не допуская его пересушивания и попадания воды в компост. Следует отметить, что оба штамма легко завязывали плодовые тела. Однако штамм 2278 оказался более чувствительным к перепадам температуры. Вследствие сложности поддержания оптимальной для его роста температуры, мы не получили ожидаемого выхода плодовых тел. В свою очередь, штамм 2238 одинаково хорошо плодоносил в широком диапазоне температур от 19 до 25°C (рис. 13).



Рис. 12. *Coprinus comatus* 2278: компост с мицелием и образование плодовых тел.



Рис. 13. *Coprinus comatus* 2238: первая волна плодоношения.

Урожайность штамма 2238 только за первую волну плодоношения составила около 20% от веса субстрата. Срок хранения полученных грибов не превышал несколько суток из-за быстрого автолиза плодовых тел, что является критическим моментом при выращивании данного вида гриба.

В результате наших исследований был отобран штамм 2238, который отличался высокой урожайностью, быстрой скоростью роста мицелия на различных по составу питательных средах в широком диапазоне рН (начиная с рН 4,0 и выше, с оптимумом - 6,7), отличался высокой ферментативной активностью и максимальным приростом биомассы при культивировании на жидких питательных средах, имел широкий температурный оптимум (24-27°C) и был устойчив к перепадам температуры при образовании плодовых тел. Таким образом, по результатам проведенного скрининга рекомендуется для практического применения штамм сапротрофного макромицета *S. comatus* 2238, перспективный для дальнейшей разработки его биотехнологического использования и промышленного культивирования.

Литература

- Бадалян С.М., Кьюз У., Аветисян Г.К.** Скрининг антиоксидантной активности некоторых коприноидных грибов // Успехи медицинской микологии. – 2005. – 5: 176–178.
- Билай В.И.** Основы общей микологии. – Киев: Вища шк., 1980. – 360 с.
- Бухало А.С.** Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – Киев: Наук. думка, 1988. – 144 с.
- Бухало А.С., Вассер С.П., Михайлова О.Б.** Микроморфологическая характеристика съедобных и лекарственных макромицетов в чистой культуре // В кн.: «Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре» / Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – Киев: Альтерпрес. – 2011. – Т. 1: 105–132.
- Бисько Н.А., Ломберг М.Л., Митропольська Н.Ю., Михайлова О.Б.** Колекція культур шапинкових грибів (ІВК). - Київ: Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного Національна Академія наук України, «Альтерпрес», 2016.– 117 с.
- Дьяков М.Ю., Камзолкина О.В., Штаер О.В., Бисько Н.А, Поединок Н.Л., Михайлова О.Б., Тихонова О.В., Толстихина Т.Е., Васильева Б.Ф., Ефременкова О.В.** Описание морфологических и антимикробных свойств у представителей некоторых базидиомицетов, выделенных из природной среды // Грибные биотехнологии. – 2010. – С. 248–250.

- Ершова Е.Ю., Ефременкова О.В., Зенкова В.А., Толстых И.В., Дудник Ю.В.** Выявление антимикробной активности у представителей рода *Coprinus* // Микология и фитопатология. – 2001. – 6. – 32 с.
- Ломберг М.Л.** Биологические свойства букового гриба *Hypsizyugus tarmoreus* (Peck) H.E.Bigelow // В кн.: Макромицеты: лекарственные свойства и биологические особенности. – Киев: – 2012: 151–180.
- Ломберг М.Л.** Дослідження *Hypsizyugus tarmoreus* (Peck) Bigelow (*Agaricales*) у культурі // Укр. бот. журн. – 2002. – 59 (3): 292–298.
- Ломберг М.Л., Соломко Э.Ф.** Научные основы интродукции новых видов ценных съедобных и лекарственных грибов в грибоводство Украины // Мат. I междун. спец. науч.-практ. конф. “Грибная индустрия”. – Киев. – 2006: 34–37 (на украинском).
- Ломберг М.Л., Соломко Э.Ф.** Рост культур макромицетов на агаризованных питательных средах и плотных субстратах // Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах. / Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – Киев: Альтерпрес. – 2012. – Т.2: 345–371.
- Ломберг М.Л., Бухало А.С., Полюх Н.П.** Рост культур *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers. на жидких питательных средах // Шестой Всероссийский конгресс по медицинской микологии (6ВКММ) (8-10 апреля 2014, Москва, Россия). – Успехи медицинской микологии. – М.: Национальная академия микологии. – 2014. – XII: 239–241.
- Михайлова О.Б., Бухало А.С.** Сумчатые грибы рода *Morchella* Dill. // Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре: Сборник научных трудов в двух томах // Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – Киев: Альтерпрес. – 2012. – Т. 2: 3–75.
- Михайлова О.Б., Поединок Н.Л., Дьяков М.Ю., Камзолкина О.В.** Ферментативная активность новых интродуцированных штаммов базидиомицетов // Иммунопатология, аллергология, инфектология: Междисциплинарный микологический форум, Москва, Россия. – 2010. – 1. – С. 34.
- Полюх Н.П., Ломберг М.Л.** Ферментативная активность штаммов *Coprinus comatus* (O.F.Mull.)Pers.//Мат. Науч.-практ.конф.молодых ученых «Биосистема: от теории к практике» (24-25 октября 2013 г., Пушкино, Россия). – 2013:30-31.

- Придюк Н.П.** Флора грибов Украины. Больбитиевые и коприновые грибы. – 2015. – 598 с.
- Соломко Э.Ф., Ломберг М.Л., Митропольская Н.Ю., Чоловская О.В.** Рост отдельных видов лекарственных макромицетов на питательных средах различного состава // Укр. ботан. журн. – 2000. – 57 (2): 119–126.
- Asatiani M.D., Wasser S.P., Nevo E., Ruimi N., Mahajna L., Reznick A.Z.** The Shaggy Inc Cap Medicinal Mushroom, *Coprinus comatus* (O.F.Müll.: Fr.) Pers. (Agaricomycetidae) Substances Interfere with H₂O₂ Induction of the NF- κ B Pathway through Inhibition of I κ B α Phosphorylation in MCF7 Breast Cancer Cells // Intern. J. Med. Mushr. – 2011. – 13(1): 19–25.
- Badalyan C.M., Gasparyan A.V., Garibyan N.G.** Investigation of the antioxidant activity of some basidial macromycetes // Mikol. Fitopatol. – 2003. – 37: 63–68.
- Badalyan S.M., Szafranski K., Hoegger P.J., Navarro-González M., Majcherczyk A., Kües U.** New Armenian Wood-Associated Coprinoid Mushrooms: *Coprinopsis strossmayeri* and *Coprinellus aff. radians* // Diversity. – 2011. – 3 (1): 136–154; doi:10.3390/d3010136
- Bao S., Teng Z., Ding S.** Heterologous expression and characterization of a novel laccase isoenzyme with dyes decolorization potential from *Coprinus comatus* // Molecular Biology Reports. – 2013. – 40 (2): 1927–1936.
- Barron G.L., Thorn R.G.** Destruction of nematodes by species of *Pleurotus* // Can. J. Bot. – 1987. – 65: 774–778.
- Buchalo A.S., Mitropolskaya N.Yu.** Investigations at the Ukrainian culture collection of edible and medicinal mushrooms // Intern. J. Med. Mushr. – 2002. – 4 (2): 245–254.
- Buchalo A., Mykchaylova O., Lomberg M., Wasser S.** Microstructures of vegetative mycelium of macromycetes in pure cultures / Eds. P.A. Volz and E. Nevo. M.G. Kholodny Institute of Botany National Academy of Sciences of the Ukraine. - Kiev: Alterpress, 2009. – 224 p.
- Buchalo A.S., Wasser S.P., Mykhaylova O.B., Bilay V.T., Lomberg M.L.** Taxonomical significance of microstructures in pure cultures of macromycetes // Proc. of the 7th Intern. Conf. on Mushr. Biol. and Mushr. Products (ICMBMP7, 4–7 October 2011, Arcachon, France). – 2011: 50–57.
- Cléménçon H.** Cytology and Plectology of the Hymenomycetes; J. Cramer: Berlin/Stuttgart, Germany, 2004. [Google Scholar]

- Cui M., Zhang H., An L.** Tumor growth inhibition by polysaccharide from *Coprinus comatus* // World Chin. J. Digestol. – 2002. – 10: 287–290.
- Chaiyama V., Petcharat V., Kritsaneepaiboon P.** Some morphological and physiological aspects and cultivation of *Coprinus comatus* (O.F.Mull.) Gray. // Songklanakarin J. Sci. Technol. – 2007. – 29: 261–274.
- Ding Z.Y., Lu Y.J., Lu Z.X., Lv F.X., Wang Y.H., Bei X.M., Wang F., Zhang K.C.** Hypoglycemic effect of comatin, an antidiabetic substance separated from *Coprinus comatus* broth, on alloxan-induced-diabetic rats // Food Chem. – 2010: 121–139.
- Ding Zh., Wang W., Wang F., Wang Q., Zhang K.** Polysaccharides production by submerged fermentation of *Coprinus comatus* and their inhibitory effects on non-enzymatic glycosylation // J. Med. Plants Research – 2012. – 6 (7): 1375–1381.
- Dotan N., Wasser S.P., Mahajna J.** The culinary-medicinal mushroom *Coprinus comatus* as a natural antiandrogenic modulator // Integr. Cancer Ther. – 2011. – 10 (2): 148–159.
- Dyakov M.Yu., Kamzolkina O.V., Shtaer O.V., Bis'ko N.A., Poyedinok N.L., Mykchaylova O.B., Tikhonova O.V., Tolstikhina T.E., Vasil'eva B.F., and Efremenkova O.V.** Morphological characteristics of natural strains of certain species of Basidiomycetes and biological analysis of antimicrobial activity under submerged cultural conditions // Microbiology. – 2011. – 80 (2): 274–285.
- Han C., Yuan J., Wang Y., Li L.** Hypoglycemic activity of fermented mushroom of *Coprinus comatus* rich in vanadium // J. Trace Elem. Med. Biol. – 2006. – 20 (3): 191–196.
- Han C.** A comparison of antinociceptive activity of mycelial extract from three species of fungi of basidiomycetes // Open Complement Med. J. – 2009. – 1: 73–77.
- Jang M-J, Lee Y-H, Liu J-J, Ju Y-C.** Optimal conditions for the mycelial growth of *Coprinus comatus* strains // Mycobiology. – 2009. – 37 (2): 103–108.
- Jiang X.G., Lian M.X., Han Y., Lv S.M.** Antitumor and immunomodulatory activity of a polysaccharide from fungus *Coprinus comatus* (Mull.: Fr.) Gray // Intern. J. Biological Macromolecules. – 2013. – 58: 349–353.
- Index Fungorum [Электронный ресурс]:** the global fungal nomenclatur. 2016. - Режим доступа к базе данных: <http://www.indexfungorum.org/>
- Kües U., Liu Y.** Fruiting body production in basidiomycetes // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – 54: 141–152.
- Li B., Lu F., Suo X., Nan H.** Antioxidant properties of cap and stipe from *Coprinus comatus* // Molecules. – 2010. – 15 (3): 1473–1486.

- Liu X., Zheng X., Zhang J.-K.** Production of a fibrinolytic enzyme from *Coprinus comatus* YY-20 // Applied Mechanics and Materials. – 2012. – 138–19: 1195–1201.
- Lomberh M.L., Solomko E.F., Buchalo A.S., Kirchhoff B.** Studies of medicinal mushrooms in submerged cultures // Proceedings of the Fourth International Conference of Mushroom Biology and Mushroom Products (February 20-23, 2002; Cuernavaca, Mexico). UAEM. – 2002: 367–377.
- Lomberh M.L., Solomko E.F., Buchalo A.S., Kirchhoff B.** Studies of medicinal mushrooms in submerged culture // 4th Intern. Conf. Mushr. Biology and Mushr. Products: Proc. – Cuernavaca (Mexico), – 2002: 367–378.
- Luo H., Mo M., Huang X., Li X., Zhang K.** *Coprinus comatus*: A basidiomycete fungus forms novel spiny structures and infects nematode // Mycologia. – 2004. – 96 (6): 1218–1224.
- Luo H., Liu Y., Fang L., Li X., Tang N., Zhang K.** *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – 73 (12): 3916–3923.
- Lv Y., Han L, Yuan C., Guo J.** Comparison of hypoglycemic activity of trace elements absorbed in fermented mushroom of *Coprinus comatus* // Intern. J. Med. Mushr. – 2009: 177–185.
- Mohamed S.H., Dix N.J.** Resource utilization and distribution of *Coprinus comatus*, *Coprinus atramentarius*, *Lacrimaria velutina* and *Melanoleuca grammopodia* // Trans. Br. Mycol. Soc. – 1988. – 90: 255–263.
- Molitoris H.P.** Methods for determination of enzymatic activities of marine fungi // Czech Mycol. – 2000. – 52 (2): 97–124.
- Navarro González M.** Growth, fruiting body development and laccase production of selected coprini. Diploma thesis. Georg-August-Universität, Göttingen, Germany, 2008. – 314 p. [Google Scholar]
- Orton P.D., Watling R.** British fungus flora. Agaricus and Boleti. 2. Coprinaceae. Pt. 1. *Coprinus*. – Edinburgh: Majesty, 1979. – 149 p.
- Popovic M., Vukmirovic S., Stilinovic N., Capo I., Jakovljevic V.** Antioxidative activity of an aqueous suspension of commercial preparation of the mushroom *Coprinus comatus* // Molecules. – 2010. – 15: 4564–4571.
- Ren J., Shi J.L., Han C., Liu Z.Q., Guo J.** Isolation and biological activity of triglycerides of the fermented mushroom of *Coprinus comatus* // BMC Complement. Altern. Med. – 2012. – 12 (1): 52

Rouhana-Toubi A., Wasser S.P., Fares F. Ethyl acetate extracts of submerged cultured mycelium of higher basidiomycetes mushrooms inhibit human cancer cell growth // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2009. – 11 (1): 29–37.

Rouhana-Toubi A., Wasser SP, Agbarya A, Fares F. Inhibitory effect of ethyl acetate extract of the shaggy inc cap medicinal mushroom, *Coprinus comatus* (Higher Basidiomycetes) fruit bodies on cell growth of human ovarian cancer // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2013. – 15 (5): 457–470.

Sabo A., Stilinovic N., Vukmirovic S., Bukumiric Z., Capo I., Jakovljevic V. Pharmacodynamic action of a commercial preparation of the mushroom *Coprinus comatus* in rats // *Phytother Res.* – 2010. – 24: 1532–1537.

Stalpers J.A. Identification of wood-inhabiting Aphyllophorales in pure culture // *Stud. Mycol.* – 1978.– 248 p.

Stamets P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. 3 ed. – Ten Speed Press, 2000. – 554 p.

Tsai Sh., Tsai H., Mau J. Antioxidant properties of *Coprinus comatus* // *J. Food Biochemistry* – 2009. – 33 (3): 368–389.

Wang G., Wang J., Fu Y., Bai L., He M., Li B., Fu Q. Systemic treatment with vanadium absorbed by *Coprinus comatus* promotes femoral fracture healing in streptozotocin-diabetic rats // *Biological Trace Element Research.* – 2013. – 151 (3): 424–433.

Yang J.H., Lin H.C., Mau J.L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms // *Food Chem.* – 2002. – P. 229–235.

Yuan J, Wang Y. Medicinal mushroom *Coprinus comatus* against metabolic syndrome and diabetes type 2 // *Intern. J. Med. Mushr.* – 2012. – 8 (1): 121–132.

Zaidman B., Wasser S., Nevo E., Mahajna J. *Coprinus comatus* and *Ganoderma lucidum* interfere with androgen receptor function in LNCaP prostate cancer cells // *Institute of Evolution, University of Haifa, Mount Carmel, Haifa.* – 2008: 107–117.

Zhao S., Rong C.B., Kong C., Liu Y., Xu F., Miao Q.J., Wang S.X., Wang H.X., Zhang G.Q.

A novel laccase with potent antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from mycelia of mushroom *Coprinus comatus* // *BioMed Res. Intern.* – 2014: 417–461.

Zhou S., Liu Y., Yang Y., Tang Q., Zhang J. Hypoglycemic activity of polysaccharide from fruiting bodies of the shaggy ink cap medicinal mushroom,

Coprinus comatus (Higher Basidiomycetes), on mice induced by alloxan and its potential mechanism // Intern. J. Med. Mushr. – 2015. – 17 (10): 957–964.

М.Л. ЛОМБЕРГ

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ГНОЙОВИКА КУДЛАТОГО -
COPRINUS COMATUS (O.F. MÜLL.) PERS.

Досліджено біологічні властивості їстівного делікатесного гриба *C. comatus*, відомого своїми лікарськими властивостями. Отримано нові відомості щодо мікроморфологічних характеристик даного виду: зафіксовано алоцисти, гіфальні кільця і конідіальне спороношення, а також підтверджено утворення пряжок, анастомоз, дендроїдних гіф, кристалів різної форми, в тому числі волосоподібних. Показано, що для переважної більшості штамів оптимальний ріст забезпечував компостний агар, на якому спостерігали утворення білих перистих колоній з вираженими міцеліальними тяжами. Також характерним було утворення ватних колоній на поживних середовищах різного складу. Для окремих швидкозростаючих штамів нами відмічено селективне поживне середовище - мальць-екстракт-пептон-дріжджовий агар, при вирощуванні на якому час культивування посівного міцелію становив три дні. Максимальна швидкість росту вегетативного міцелію *C. comatus* при встановленій для досліджених штамів оптимальній температурі 27°C на селективному середовищі становила 12,9 мм/добу. Знайдено критичні температури (4°C і 34-37°C) для росту міцелію. При температурі 4°C спостерігали опушення інокулюму, при 34-37°C ріст у більшості культур був відсутній. Досліджені штами *C. comatus* починали рости при значеннях рН середовища від 5,0 і вище, за винятком штаму 2238, слабкий міцеліальний ріст якого спостерігали при рН 4,0. Оптимальне значення кислотності середовища для досліджених штамів становило - рН 6,5 і 6,7. Особливу увагу було приділено штамам із високою активністю ферментів: лакази, амілази і карбоксіметилцелюлази. Отримані результати свідчать про штамову специфічність досліджених культур щодо джерел вуглеводного і азотного живлення. В умовах експерименту найкращий ріст і накопичення біомаси забезпечувало середовище, що містило крохмаль в якості джерела вуглецю і пептон як джерело азоту. Найбільш перспективні штами були перевірені на здатність до плодоношення. В

результаті відібрано штам IBK 2238 як потенційний продуцент нових грибних біотехнологій, а також для подальшої розробки промислової технології культивування виду *C. comatus*.

M.L. LOMBERG

BIOLOGICAL PROPERTIES OF SHAGGY MANE - *COPRINUS COMATUS* (O.F. MÜLL.) PERS.

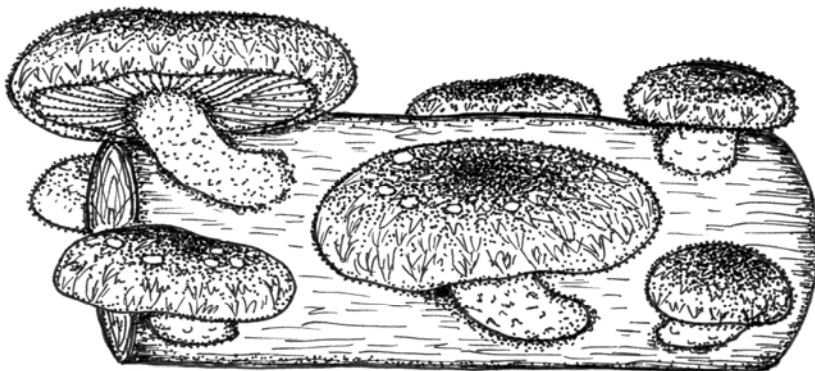
Biological characteristics of Coprinus comatus, an edible gourmet mushroom known for its medicinal properties, were studied. The new data on micromorphological characters are reported, such as typical allocysts, hyphal loops and conidial sporulation. In addition, clamp connections, anastomoses, dendroid hyphae, crystals of different shapes, including hair-like ones, were often observed on the mycelium. Mycelial growth and morphological features of the mushroom on various media are described. It is shown that for majority of strains, the compost agar provided optimal growth conditions. In this case, white-pinnate colonies characterized by mycelial strands were observed. Formation of white-cottony colonies on various agar media was also typical. For several fast-growing strains, a selective medium, malt extract-yeast-peptone agar, was detected. On this medium, mother spawn was prepared within three days. The selected strains showed growth optima at the temperature of 27°C. The maximum growth rate of vegetative mycelium of C. comatus on selective medium was 12.9 mm/day. The critical temperatures for mycelial growth were found at 4°C and 34-37°C. At the temperature 4°C the inoculum pubescence was observed while at 34-37°C for the of most strains mycelial growth was absent. Selected strains demonstrated growth at pHs of 5.0 and higher, except for the strain 2238 with weak mycelial growth at pH 4.0. The growth optima were registered at pH 6.5 and 6.7. Particular attention was paid to the strains which demonstrated high enzymes activity - laccase, amylase and carboxymethylcellulase. The results indicated the strain specificity of the cultures in relation to the sources of carbohydrate and nitrogen. During the experiment, the best growth rate and biomass accumulation values were obtained on a medium containing starch as a carbon source, and peptone as a nitrogen source. The most promising strains have been tested for fruiting ability. As a result, the strain IBK 2238 has been selected as a potential producer for new fungal biotechnologies and industrial technology of C. comatus cultivation.

СОДЕРЖАНИЕ

ПОСВЯЩЕНИЕ	4
Professor Solomon P.Wasser. Short Biodata.....	5
С.П. Вассер. Наука о лекарственных шляпочных грибах: современные перспективы, достижения, доказательства и вызовы.....	7
И.А. Дудка. Грибы в народной медицине славян и исследование лекарственных свойств отдельных видов в конце XX - начале XXI ст.	40
К-Н. Wong, А.Р. Gryganski, P-G. Cheng, V. Sabaratham, O.V. Kolotushkina, B.Kirchhoff, G.G. Skibo, P.Pederzani, K.Y. Voronin, А.А. Grodzinskaya, M.G. Moldavan. Lion's mane mushroom – the natural healer for nerve damage.....	69
С.М. Бойко. Спектры изоферментных систем лекарственного гриба <i>Schizophyllum commune</i> Fr. (Basidiomycetes).....	105
С.А. Сырчин. Антиоксидантные свойства высших грибов.....	121
М.О. Fomina. Effect of mycobiont zinc-tolerance and phosphorus availability on zinc phosphate solubilization and zinc and phosphorus accumulation by <i>Paxillus involutus</i> /pine ectomycorrhizal associations.....	151
А.А. Гродзинская. Биоаккумуляция радионуклидов плодовыми телами макромицетов.....	195
М.Л. Ломберг. Биологические свойства навозника косматого <i>Coprinus comatus</i> (O.F. Müll.) Pers.....	221

Наукове видання

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДУ «ІНСТИТУТ ЕВОЛЮЦІЙНОЇ ЕКОЛОГІЇ»



Російською і англійською мовами

Науковий редактор - доктор біологічних наук, професор,
Іржі Габріель, Академія наук Чеської Республіки

Дизайн видання С.А. Сирчін, Г.А. Гродзинська, І.К. Тесленко

Підп. до друку 27.12.2016. Формат 70 x 100 /16.

Папір офс. Ум.-друк. арк. Наклад 300 прим. Зам. №

Київ 2016