

# ***Badanie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną selenowanych polisacharydów pochodzenia grzybowego***

Autor pracy: Sandra Joanna Górska-Jakubowska

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Marzenna Klimaszewska

## **Streszczenie**

Wzrastające potrzeby medyczne związane z terapią nowotworów, chorób o podłożu autoimmunizacyjnym oraz rozwojem transplantologii stwarzają konieczność poszukiwania nowych substancji wykazujących aktywność immunomodulacyjną, które byłyby bezpieczniejsze oraz tańsze od leków obecnie stosowanych.

Polisacharydy pochodzenia grzybowego wykazują zależne od struktury wielokierunkowe działanie farmakologiczne, w tym działanie: przeciwnowotworowe, immunomodulacyjne, antyoksydacyjne, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, hipoglikemiczne, hipolipidemiczne, hipotensyjne i hepatoprotekcyjne. Szczególne zainteresowanie badaczy wywołuje aktywność immunostymulacyjna i po części będąca jej efektem aktywność przeciwnowotworowa. Zależność pomiędzy strukturą polisacharydów a ich aktywnością biologiczną jest słabo poznana, a istniejące doniesienia literaturowe dotyczą prawie wyłącznie polisacharydów pochodzenia grzybowego aktywnych immunomodulacyjnie.

Wiele związków selenu, szczególnie związki organiczne, wykazuje podobne (co do kierunku) do polisacharydów pochodzenia grzybowego działanie biologiczne, w tym antyoksydacyjne, przeciwnowotworowe i immunomodulacyjne. Podobny efekt farmakologiczny wywoływany przez polisacharydy pochodzenia grzybowego i organiczne związki selenu, pomimo różnicy w mechanizmie działania, sugeruje możliwość synergizmu obu komponentów. Stąd wbudowanie selenu do cząsteczek polisacharydów jest jedną z obecnie badanych metod modyfikacji struktury polisacharydów, która może spowodować istotną zmianę ich aktywności biologicznej.

Głównym celem prowadzonych badań było określenie wpływu inkorporacji selenu do struktury egzopolisacharydów wydzielanych do pożywki hodowlanej przez grzybnię

*L.edodes* na ich strukturę i aktywność biologiczną: immunomodulacyjną, cytotoksyczną oraz przeciwutleniającą. Następnym celem było zbadanie różnic w strukturze i aktywności biologicznej pomiędzy Se-egzopolisacharydami a Se-polisacharydami wyizolowanymi z grzybni *L.edodes* opisanych w poprzednich publikacjach.

Badania eksperymentalne pracy doktorskiej koncentrowały się na biosyntezie, izolacji oraz analizie strukturalnej i aktywności biologicznej frakcji EPS zawierających w cząsteczce selen, wyizolowanych z podłoża po hodowli grzybni *L. edodes*. Sprawdzone sposoby włączenia selenu do struktury EPS, ustalono stopień utlenienia selenu w Se-egzopolisacharydach oraz porównano strukturę i aktywność biologiczną otrzymanych selenowanych frakcji egzopolisacharydowych (Le-P-Se) z frakcjami referencyjnymi izolowanymi z hodowli niewzbogaconej w selen (Le-P-0). Budowę i aktywność immunomodulacyjną otrzymanych egzopolisacharydów porównano również z frakcjami Se-polisacharydowymi wyizolowanymi z selenowanego mycelium *L. edodes* (Se-L), będącymi obiektem wieloletnich badań w KTLiBF WUM, stosując analogiczne metody izolacji, oczyszczania, analizy struktury i aktywności biologicznej.

W wyniku przeprowadzonej biosyntezy wyizolowano nowe makromolekuły - frakcje EPS, wzbogacone w selen oraz frakcje referencyjne. Analizy strukturalne umożliwiły zbadanie budowy tych związków, a symulacja *in silico* pozwoliła zaproponować ich hipotetyczne struktury drugorzędowe. Frakcje Se-EPS wyizolowane z podłoża po hodowli kultur mycelialnych *L.edodes* składały się głównie z silnie rozgałęzionych Se-1,2- $\alpha$ -1,4- $\alpha$ -mannanów. Natomiast frakcje Se-polisacharydowe wyodrębnione z grzybni charakteryzowały się zupełnie inną budową i były mieszaniną liniowych: Se-1,4- $\alpha$ -D-glukanów, Se-1,3- $\beta$ -D-glukanów, Se-1,6- $\beta$ -D-glukanów i rozgałęzionych 1,3- $\beta$ - 1,6- $\beta$ -D-glukanów. Selen we frakcji Se-egzopolisacharydowej wiązał się ze strukturą polisacharydów najprawdopodobniej wiązaniami estrowymi i występował na IV stopniu utlenienia, w przeciwieństwie do Se-polisacharydów izolowanych z grzybni, w którym selen występował na -II stopniu utlenienia i był związany we frakcji polisacharydowej wiązaniem selenoglikozydowym lub obecny w pierścieniu Se-piranozowym.

Wyizolowane frakcje Se-EPS miały podobną co do kierunku, niemniej słabszą aktywność immunosupresyjną w stosunku do frakcji wzbogaconych w selen wcześniej wyizolowanych z grzybni *L. edodes*. Se-egzopolisacharydy w teście cytotoksyczności (MTT) wykazywały selektywne zwiększenie przeżywalności komórek prawidłowych (HUVEC), bez wpływu na komórki nowotworowe (HeLa). Se-polisacharydy wyizolowane z grzybni

wyróżniały się w tym teście znacznie silniejszym, ale nieselektywnym efektem. Se-egzopolisacharyd Le-P-Se charakteryzował się wysoką aktywnością przeciwutleniającą, znacznie silniejszą niż frakcja referencyjna, ale słabszą niż frakcja Se-polisacharydowa wyizolowana z grzybni. Se-egzopolisacharyd wykazywał podobny wpływ hamujący na proliferację limfocytów T w teście OKT-3 jak obserwowano dla wcześniej badanego Se-polisacharydu izolowanego z grzybni (Se-L), bez jednoczesnego wpływu na limfocyty B, co sugerowały wyniki testu przy stymulacji *S. aureus* (SAC). Efekt był również bardziej selektywny, ale znacznie słabszy niż dla frakcji wyizolowanej z grzybni. Różnice w aktywności biologicznej badanych frakcji wynikają prawdopodobnie z odmiennej struktury pierwszorzędowej, różnicy sposobu wiązania selenu oraz jego różnych stopni utlenienia w cząsteczkach badanych egzopolisacharydów i polisacharydów izolowanych z grzybni.

Podsumowując, cel niniejszej pracy doktorskiej został w pełni zrealizowany, wyniki badań potwierdziły, że zarówno grzybnia *L. edodes* jak i pożywka pochodzlana stanowią źródło biologicznie czynnych selenopolisacharydów o dużym zróżnicowaniu mas cząsteczkowych oraz zróżnicowanej budowie. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że selen może trwale wiązać się ze strukturą polisacharydów, wpływając na ich budowę przestrzenną oraz aktywność immunomodulacyjną.

Wyniki przeprowadzonych badań dostarczyły nowej wiedzy na temat budowy mało znanych polimerów naturalnych, jakimi są Se-egzopolisacharydy. Wskazały również na pewne zależności pomiędzy ich budową a aktywnością biologiczną ponieważ izolaty z podłoża hodowlanego (polimannany) wykazują zdecydowanie niższą aktywność immunosupresyjną niż izolaty z grzybni (poliglukany), perspektywa zastosowania frakcji EPS jako potencjalnych leków jest słabsza. Jednak brak toksyczności tych makromolekuł przy równoczesnym prawdopodobnym selektywnym działaniu immunosupresyjnym sugeruje sensowność dalszych badań nad ich budową, biosyntezą oraz aktywnością biologiczną.

Ze względu na potencjalne zastosowanie Se-polisacharydów pochodzących z grzybni *L. edodes* jako nowych leków immunosupresyjnych w transplantologii i chorobach autoimmunologicznych, zaplanowane są dalsze badania nad mechanizmami działania i właściwościami farmakokinetycznymi tych związków.