

Efekat kisele i bazne hidrolize na imunomodulatorska svojstva glukana viših gljiva, *in vitro*

- Originalan naučni rad -

Dragica ZORIĆ, Miomir NIKŠIĆ, Maja KOZARSKI i Anita KLAUS
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun

Izvod: Imunomodulatorska aktivnost glukana viših gljiva u funkciji je od njihovih hemijskih karakteristika, kao što su molekulska masa, stepen grananja, rastvorljivost u vodi i tercijska struktura. Cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj veličine i konformacije mikroglukana na njihova imunomodulatorska svojstva, *in vitro*.

Merenjem imunomodulatorskog kapaciteta *Agaricus blazei* i *Phellinus linteus* nativnih glukana pokazano je da *A. blazei* glukani imaju izraženo imunostimulativno dejstvo na aktivirane mononuklearne ćelije krvi iz perifernog krvotoka (PBMC-*Peripheral Blood Mononuclear Cell*) i stimulaciju sinteze interferona-gama (IFN- γ). *P. linteus* glukani su ispoljili izraženo imunosupresivno dejstvo. Stimulacijom ćelija glukanima koji su prethodno hidrolizovani 1M H₂SO₄ i 1M NaOH zaključeno je da su veličina i konformacija molekula bitne hemijske karakteristike od kojih zavisi njihova imunomodulatorska aktivnost. Glukani manjih molekulske mase, nastali nakon kisele hidrolize, pokazali su se kao efikasni imunostimulatori PBMC ćelija. Ukazano je da je za imunostimulativnu aktivnost ovih molekula bitna primarna struktura, a ne konformacija trostrukog heliksa nativnih molekula. Ispitivanjem imunosupresivnog efekta *P. linteus* glukana na sintezu IFN- γ pokazano je da su za ovaj efekat bitna veličina molekula kao i konformacija nativnih molekula.

Ključne reči: IFN- γ , imunomodulatorska aktivnost, *in vitro*, glukani, glukano-proteinski kompleksi.

Uvod

U poslednjih 50 godina polisaharidi i polisaharidno-proteinski kompleksi izolovani iz ćelijskog zida viših gljiva iz klase *Basidiomycetes* privlače sve veću pažnju. Jedna od najistraženijih osobina ovih molekula je njihovo dejstvo na imunološki sistem. Od 1980. godine za ove supstance je u upotrebi izraz "biomodulatori", odnosno modifikatori biološkog odgovora. Mikro polisaharidi velikih

molekulskih masa imaju sposobnost da specifično aktiviraju celularne i humoralne komponente imunog sistema domaćina, **Gao i sar.**, 1996, **Lull i sar.**, 2005.

Po svojoj hemijskoj strukturi ovi molekuli su β -D-glukani koji zajedno sa molekulima hitina, celuloze i glikoproteina izgrađuju ćelijski zid viših gljiva. U ćelijskom zidu viših gljiva najzastupljeniji su glukani na čijem se glavnom lancu, izgrađenom od molekula glukoze koji su međusobno vezani β -(1 \rightarrow 3)- ili β -(1 \rightarrow 4)-vezom ili sa oba tipa veze, nalaze razmešteni bočni lanci povezani β -(1 \rightarrow 6) glikozidnim vezama. Za molekule glukana mogu biti vezani i drugi molekuli šećera kao što su manozna, ksiloza, galaktoza, arabinoza, glukuronska kiselina, a takođe i peptidi i proteinski molekuli, **Boldizsar i sar.**, 1998. Ispitivanjem njihove strukture pokazano je da ovi molekuli imaju konformaciju trostrukog heliksa, **Blum i Sarco**, 1977; **Bohn i Be Miller**, 1995.

Biomodulatorska aktivnost miko-D-glukana u funkciji je od njihovih hemijskih karakteristika, kao što su molekulska masa, stepen grananja, rastvorljivost u vodi i terciarna struktura, **Wasser i sar.**, 2005.

Cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj konformacije i veličine molekula glukana na imunomodulatorska svojstva ovih molekula u *in vitro* uslovima. Ispitano je da li je za imunomodulatorsku aktivnost bitna konformacija trostrukog heliksa ili primarna struktura molekula i da li glukani manjih molekulskih masa imaju sposobnost modulacije imunog odgovora.

Materijal i metode

U vodi rastvorni glukani ekstrahovani su iz praha plodonosnih tela gljiva, *Agaricus blazei* (Holandija) i *Phellinus linteus* (Amazing Grace Health Food Products Ltd., Bangkok, Tajland), postupkom ekstrakcije vrelom vodom i alkoholne precipitacije. Suspenzija praha plodonosnog tela u destilovanoj vodi, dobijenoj pomoću MiLLipore sistema za prečišćavanje (MiliQ) sterilisan je u autoklavu na 121°C, 20 minuta. Ekstrakt je ohlađen i centrifugiran na 12325 xg. Dobijeni supernatant je koncentrisan zagrevanjem na 10% od početne zapremine, a zatim su dodate dve zapremine 96% etanola. Ekstrakt je ostavljen preko noći na 4°C, nakon čega je supernatant dekantovan, a talog je ispran 70% etanolom. Nakon centrifugiranja talog je sušen na 42°C, 12 časova.

Polazni ekstrakt glukana i njihovih proteinskih kompleksa prečišćen je dijalizom u odnosu na MiliQ vodu, pri čemu je semipermeabilna membrana bila nepropustljiva za molekule molekulskih masa većih od 10 kDa.

Od polaznih ekstrakta napravljeni su rastvori glukana u 1M fosfatnom slanom puferu (PBS-phosphat buffer saline) pH 7,2-7,4, 1M H₂SO₄ i 1M NaOH. Svi rastvori su inkubirani na 37°C, 16 časova, a zatim su neutralisani 10M H₂SO₄ ili 10M NaOH. Glukani u PBS-u su zadržali nativnu strukturu, **Freimund i sar.**, 2003. 1M rastvorom NaOH je postignuta promena terciarne strukture trostrukog heliksa u primarnu strukturu, **Maeda i sar.**, 1988. 1M H₂SO₄ je izvršena parcijalna hidroliza glukana velikih molekulskih masa (MM > 80 kDa), **Dia i sar.**, 2003. Kao kontrola

korišćena je suspenzija aktiviranih PBMC ćelija u PBS-u. Promena molekulskih masa praćena je metodom gel hromatografije, pri čemu je korišćena Sephacryl S 200 kolona (1,5 x 90 cm). Eluiranje je izvršeno degasiranom vodom MiliQ čistoće 18,2 MOhms provodljivosti, pomoću sistema tečne hromatografije visokog stepena razdvajanja (FPLC), Pharmacia. Eluenti su sakupljeni u plastičnim kivetama zapremine 5 mL, pomoću frakcionog kolektora, Pharmacia. Zapremina tečnosti van matrice gela iznosila je 60 mL.

Koncentracija polisaharida u eluiranim frakcijama je određena fenol-sumpornom metodom, prema **Duboisu i sar.**, 1956, u odnosu na glukozu kao standard. Absorbanca je očitana na 415 nm na Bio-Rad Microplate, Benchmark spektrofotometru. Za određivanje koncentracija proteina korišćena je metoda prema **Bradfordu i sar.**, 1976. Kao standarad je korišćen albumin iz seruma govečeta (BSA-bovine serum albumin). Absorbanca je merena na 595 nm na Bio-Rad Microplate, Benchmark spektrofotometru.

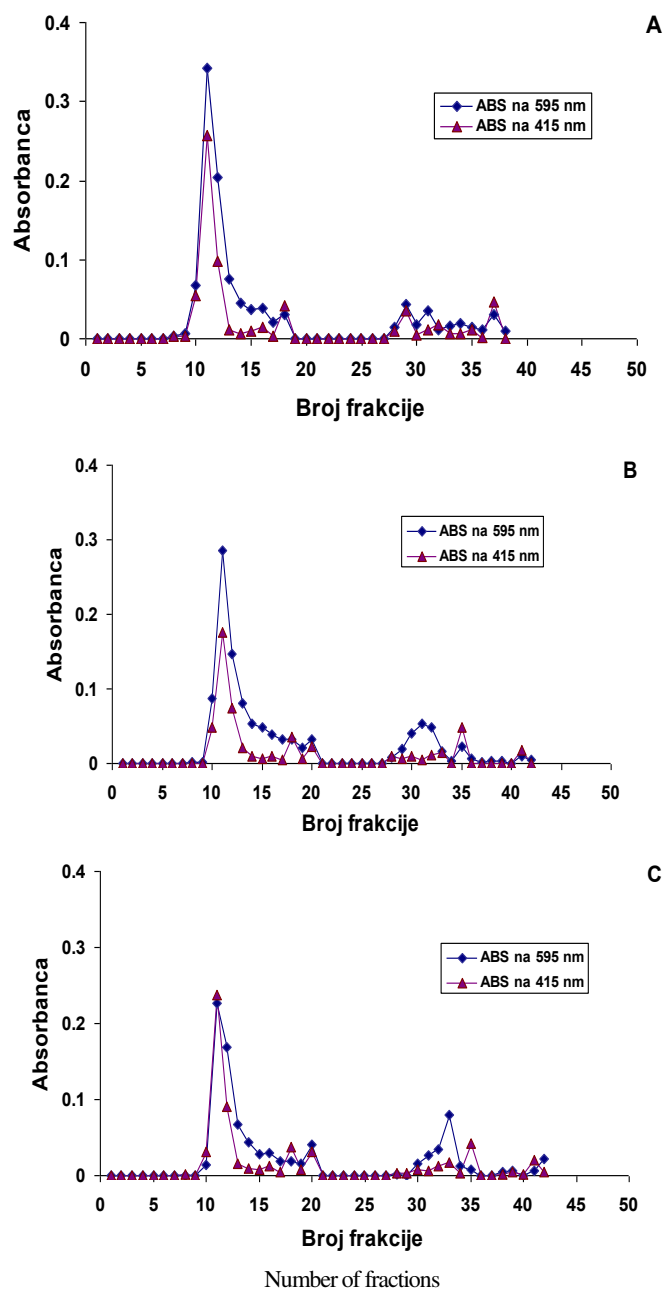
Imunomodulatorski kapacitet glukana testiran je u *in vitro* uslovima stimulacijom PBMC ćelija molekulima glukana i merenjem količine sintetisanog IFN- γ od strane stimulisanih ćelija enzimoimunotestom (ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

PBMC ćelije su izolovane iz krvi zdravih donora, dobijene posredstvom banke krvi Crvenog Krsta, centrifugiranjem u gradijentu fikola. Nakon izolovanja ćelije su izbrojane pomoću hemocitometra. Napravljena je njihova suspenzija u RPMI 1640 medijumu (Bio Whittaker), kome je dodat fetalni teleći serum, penicilin i streptomycin. Analizirani rastvori glukana su inkubirani 24 časa na 37°C u atmosferi 5% CO₂ sa PBMC ćelijama kojima su prethodno dodati transkripcioni aktivatori, forbol 12-miristat 13-acetat i Ca-jonofore. Za inkubaciju je korišćen Forma Scientific inkubator, serija II. ELISA je rađena na Nunc Maxisorp mikrotitarskim pločicama visokog afiniteta. Korišćen je Duo Set® ELISA Development System protokol, R&D sistem katalog broj DY 285.

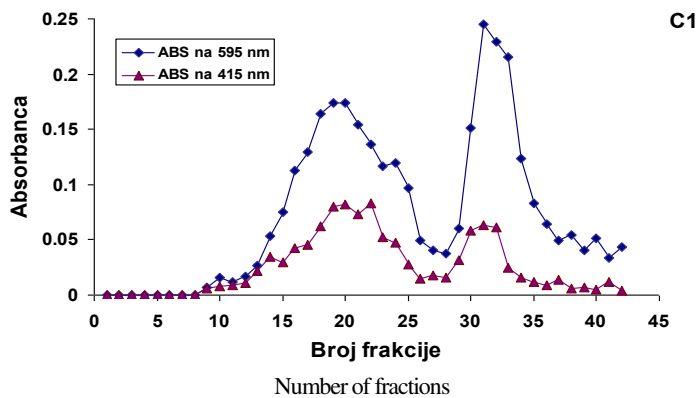
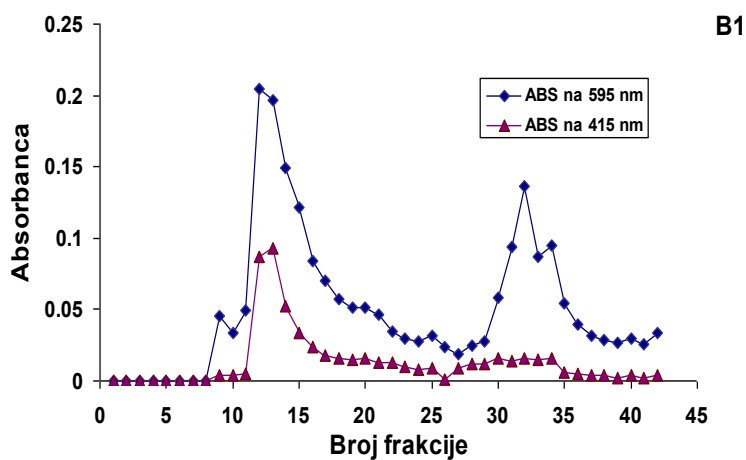
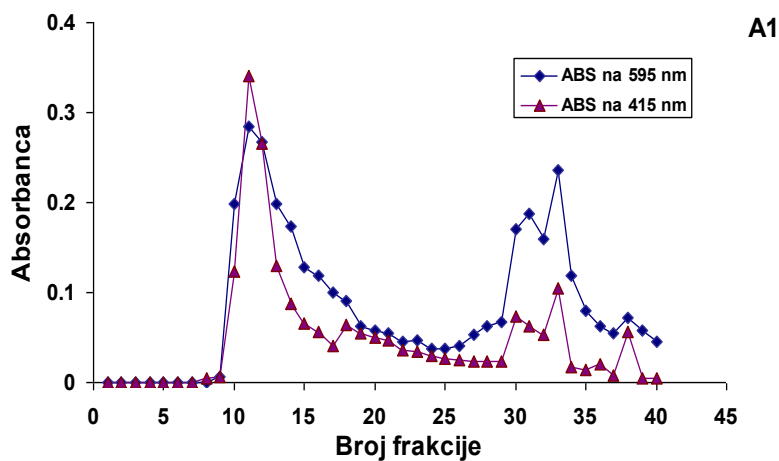
Rezultati i diskusija

Nakon razdvajanja na Sephacryl S 200 koloni *Agaricus blazei* i *Phellinus linteus* nativnih i sa 1M H₂SO₄ i 1M NaOH hidrolizovanih glukana potvrđena je njihova strukturna raznolikost. Nativni *A. blazei* i *P. linteus* glukani (Slika 1, grafikoni A, A1) su se u najvećoj meri eluirali sa zapreminom tečnosti koja odgovara zapremini tečnosti van matrice gela na osnovu čega je pokazano da u obe vrste dominiraju glukani velikih molekulskih masa, preko 80 kDa. U svakoj analiziranoj frakciji potvrđeno je prisustvo proteina što ukazuje da bi se molekuli glukana u analiziranim vrstama mogli naći u kompleksu sa proteinskim molekulima. 1M H₂SO₄ i 1M NaOH su u većoj meri modifikovali strukturu *P. linteus* glukana u odnosu na glukane *A. blazei* (Slika1, Grafikoni B, B1, C, C1).

Rezultati testiranja imunomodulatorskog kapaciteta analiziranih glukana su pokazali da nativni *A. blazei* glukani (Slika 2) imaju izraženo imunostimulativno



Slika 1. Razdvajanje nativnih i hidrolizovanih glukana iz praha plodonosnog tela *Agaricus blazei* (grafici **A**, **B**, **C**) i *Phellinus linteus* (grafici **A1**, **B1**, **C1**) na Sephacryl S 200 koloni. Glukani u PBS-u, **A** i **A1**; hidrolizovani sa 1M H_2SO_4 , **B** i **B1**; i sa 1M NaOH, **C** i **C1**.

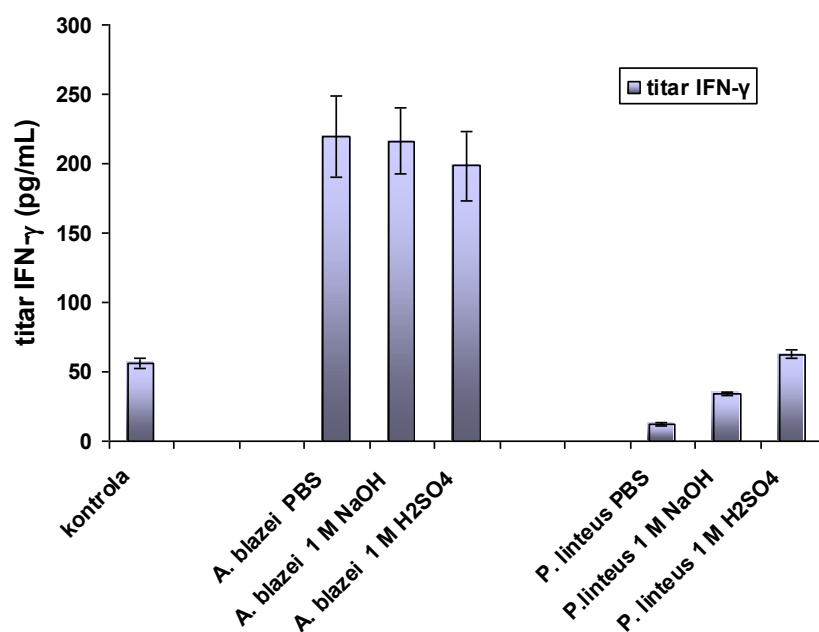


Separation of native and hydrolyzed *Agaricus blazei* (graphs **A**, **B,C**) and *Phellinus linteus* (graphs **A1**, **B1**, **C1**) fruiting body glucans on Sephacryl S 200. Glucans in PBS, **A** and **A1**; with 1M H₂SO₄ treated, **B** and **B1**; and with 1M NaOH, **C** and **C1**.

Tabela 1. Vrednosti ELISA merenja IFN- γ nastalog nakon stimulacije aktiviranih PBMC ćelija sa nativnim glukanim, u PBS-u i glukanim hidrolizovanim 1M NaOH i 1M H₂SO₄.

ELISA Measurements of IFN- γ Titer Obtained after Stimulation of PBMCs with Native (in PBS) and 1M NaOH and 1M H₂SO₄ Treated Glucans

Uzorak glukana - Glucans sample	Titar IFN- γ (pg/mL) Titer of IFN- γ (pg/mL)
Kontrola - Control	56,09 \pm 4,11
A. blazei u PBS-u - A. blazei in PBS	219,26 \pm 29,45
A. blazei u 1M NaOH - A. blazei in 1M NaOH	215,95 \pm 23,72
A. blazei u 1M H ₂ SO ₄ - A. blazei in 1M H ₂ SO ₄	198,31 \pm 25,02
P. linteus u PBS - P. linteus in PBS	12 \pm 0,92
P. linteus u 1M NaOH - P. linteus in 1M NaOH	34,04 \pm 0,92
P. linteus u 1M H ₂ SO ₄ - P. linteus in 1M H ₂ SO ₄	62,71 \pm 3,24



Slika 2. Titar IFN- γ nastao nakon inkubacije aktiviranih PBMC ćelija sa nativnim glukanim (u PBS-u) i glukanim koji su prethodno hidrolizovani 1M NaOH i 1M H₂SO₄.

IFN- γ titer obtained after stimulation of PBMC's with native (in PBS) and 1M NaOH and 1M H₂SO₄ treated glucans

dejtstvena aktivirane PBMC ćelije, *in vitro*. P. linteus glukani su ispoljili imunosupresivno dejstvo u odnosu na kontrolu (Slika 2).

Titar IFN- γ izmeren nakon stimulacije PBMC ćelija sa *A. blazei* i *P. linteus* glukanima koji su nastali nakon parcijalne hidrolize sumpornom kiselinom, pokazao je da su glukani manjih molekularnih masa ($MM < 80$ kDa) efikasni imunostimulatori u *in vitro* uslovima (Slika 2). Količina sintetisanog IFN- γ u slučaju *A. blazei* glukana nije se značajno promenila (Tabela 1). *P. linteus* fragmenti glukana manjih molekularnih masa izgubili su karakterističan imunosupresivni efekat na PBMC ćelije i sintezu IFN- γ (Slika 2).

Stimulacijom ćelija glukanima koji su prethodno bili hidrolizovani 1M NaOH ukazano je da je primarna struktura molekula, a ne tercijarna struktura trostrukog heliksa, bitna za imunostimulativnu aktivnost i sintezu IFN- γ *in vitro*. Titar IFN- γ nastao nakon stimulacije ćelija sa *A. blazei* glukanima nije se promenio. U slučaju *P. linteus* glukana sinteza se povećala u odnosu na kontrolu, ali je i dalje zadržano imunosupresivno dejstvo na ćelije i sintezu IFN- γ (Tabela 1, Slika 2).

Analizirajući rezultate imunomodulatorske aktivnosti *P. linteus* nativnih i sa 1M NaOH i 1M H₂SO₄ modifikovanih glukana, zaključeno je da je za imunosupresivan efekat ovih molekula *in vitro* bitna konformacija i veličina molekula.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je imunomodulatorska aktivnost glukana karakteristična za svaku ispitivanu vrstu i da zavisi od strukture nativnih molekula. *A. blazei* glukani su ispoljili izraženo imunostimulativno dejstvo, *in vitro*. *P. linteus* glukani okarakterisani su izraženom imunosupresivnom aktivnošću.

Testiranjem imunomodulatorske aktivnosti glukana koji su prethodno hidrolizovani 1M NaOH i 1M H₂SO₄ zaključeno je da su veličina i konformacija molekula bitne hemijske karakteristike od kojih zavisi njihova imunomodulatorska aktivnost. Glukani manjih molekularnih masa, ispod 80 kDa, pokazali su se kao efikasni imunostimulatori PBMC ćelija i sinteze IFN- γ . Ukazano je da je za imunostimulativnu aktivnost ovih molekula bitna primarna struktura, a ne konformacija trostrukog heliksa nativnih glukana. Ispitivanjem imunosupresivnog efekta *P. linteus* glukana na sintezu IFN- γ pokazano je da je za ovaj efekat bitna veličina i konformacija nativnih molekula

Literatura

- Blum, T.L.** and **A. Sarco** (1977): The triple helical structure of lentinan, a β -(1-3)-D-glucan. *Can. J. Chem.* 55: 293-299.
- Bohn, J.A.** and **J.N. Be Miller** (1995): (1-3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationship. *Carbohydrate Polymers* 28: 3-14.

- Boldizsar, I., K. Horvath, G. Szedlay and I. Molnar-Perl** (1998): Simultaneous GC-MS quantitation of acids and sugars in the hydrolyzates of immunostimulans, water soluble polysaccharides of Basidiomycetes. *Chromatographia* 47: 413-419.
- Bradford, M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Dia, X., K.K.C. Chanb, H.W. Leunbg and C.W. Huie** (2003): Fingerprinting profiling of acid hydrolyzates of polysaccharides extracted from the fruiting bodies and spores of Lingzhi by high-performances thin layer chromatography. *J. Chroma. A* **1018** (1): 85-95.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Reders and F. Smith** (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Freimund, S., M.Sauter, O. Kappeli, and H. Dulter** (2003): A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers* **54** (2): 159-171.
- Gao, Q.P., R.Z. Jiang, H.Q. Chen, E. Jersen and R. Seljelid** (1996): Characterization and cytokine stimulating activities of heteroglycans from *Tremella fuciformis*. *Planta Medica* 62: 297-302.
- Lull, Ch., H.J. Wichers and H.F.J. Savelkoul** (2005): Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm.* **2005** (2): 63-80.
- Maeda, Y.Y., S.T. Watanabe, C. Chicara and M. Rokutanda** (1988): Denaturation and renaturation of a β -1,6; 1,3-glucan, lentinan, associated with expression of T-cell-mediated responses. *Cancer Res.* 48: 671-675.
- Wasser, S.P., M.Y. Didukh and E. Nevo** (2005): Antitumor and immunomodulatory activities of medicinal mushrooms polysaccharides and polysaccharide-protein complexes in animals and humans (Review). *Mycologia Balcanica* 2: 221-250.

Primljeno: 17.10.2007.

Odobreno: 13.03.2008.

* *
*

The Effect of Acid and Base Hydrolysis on Immunomodulatory Activities of Higher Mushroom Glucans, *in vitro*

- Original scientific paper -

Dragica ZORIĆ, Miomir NIKŠIĆ, Maja KOZARSKI and Anita KLAUS
University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Beograd-Zemun

Summary

Immunomodulatory activities of higher mushroom glucans depend on such chemical properties as their molecular weight, branching patterns, water solubility and tertiary structure. The aim of the study was to examine how glucans size and conformation affect their *in vitro* immunomodulatory properties.

Measurements of the immunomodulatory capacity of *Agaricus blazei* and *Phellinus linteus* native glucans showed that *A. blazei* glucans expressed an immunostimulating effect on activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and the synthesis of interferon-gamma (IFN- γ). *P. linteus* glucans showed a characteristic immunosuppressive effect. The results obtained after the stimulation of cells with 1M H₂SO₄ and 1M NaOH treated glucans confirmed that the immunomodulatory activity of glucans was due to the size and conformation. Glucans of a lower molecular weight obtained after acid hydrolysis appeared to be effective immunostimulators of PBMCs. Obtained results indicated that the primary structure of glucans was of more importance than the tertiary structure of the triple helix for their immunostimulating activity. The study confirmed that the size and conformation of native *P. linteus* glucans were of a primary importance for their immunosuppressive effect.

Received: 17/10/2007

Accepted: 13/03/2008

Adresa autora:

Dragica ZORIĆ

Poljoprivredni fakultet

Nemanjina 6

11080 Beograd-Zemun

Srbija

E-mail: zoricd@agrifaculty.bg.ac.yu