



УДК 582.28

## Грибы рода *Cordyceps* (Fr.) Link em. Kabayasi et Mains из экосистем Южного Байкала как продуценты высоких концентраций иммуномодулятора кордицепина

Б. Н. Огарков<sup>1</sup>, О. Б. Огарков<sup>2</sup>, Г. Р. Огаркова<sup>1</sup>, Л. В. Самусенок<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биологии Иркутского государственного университета, Иркутск

<sup>2</sup>ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, Иркутск

E-mail: bornik@bk.ru

**Аннотация.** Приводятся сведения о грибах рода *Cordyceps*, паразитирующих на насекомых из различных отрядов (Lepidoptera, Coleoptera и др.). Представители этого рода *C. sinensis*, *C. militaris*, *C. brongniartii* известны как продуценты лекарственных препаратов. Установлено, что *C. militaris* и *C. brongniartii*, выделенные из природных местообитаний в районе Южного Байкала, являются продуцентами лекарственно ценного кордицепина (3' Deoxyadenosine) в высокой концентрации.

**Ключевые слова:** продуценты препаратов, биологически активные вещества, грибы рода *Cordyceps*, кордицепин (3' Deoxyadenosine).

### Введение

Грибы рода *Cordyceps*, паразитирующие на насекомых из различных отрядов, получили ныне широкую известность в области коммерческой фармацевтики, поскольку на их основе развернуто производство различных лекарственных препаратов и биоактивных пищевых добавок (БАД) [6; 13; 15; 17]. Род *Cordyceps* насчитывает более 200 видов, однако в практике чаще всего используются только два: *C. sinensis* (Berk.) Sass., который собирают в горах Тибета и широко распространён в Голарктике *C. militaris* (Fr.) Link [4; 5; 10–12].

Одним из наиболее ценных в комплексе биологически активных соединений, содержащихся в тканях кордицепсов, является кордицепин (3' Deoxyadenosine) – нуклеозид, оказывающий выраженное иммуномодулирующее и антиоксидантное действие. Аденозин признан одним из важнейших модуляторов тонуса кровеносных сосудов на уровне тканей [6; 10; 11]. Препараты кордицепина, полученные различными разработчиками (преимущественно китайскими, японскими, корейскими), обладают высокой эффективностью в борьбе с опухолями, вирусными и бактериальными инфекциями [1; 6; 12; 15; 17].

В основе технологии получения активных метаболитов грибов рода *Cordyceps* находится способность этих грибов вызывать инфекцион-

ное заболевание у насекомых. Энтомофильные и энтомопатогенные грибы, вирулентные по отношению к насекомым, принадлежащим к разным отрядам, встречаются в нескольких родах, таких как *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Cordyceps*, причём виды последнего рода можно отнести к грибам с умеренной вирулентностью. При заражении насекомых грибами этих родов возникает инфекционное заболевание, которое часто заканчивается гибелью насекомых с признаками мускардиноза (мумифицирования). Таким образом, природное лекарственное сырьё, например *C. sinensis*, представляет собою комплекс «гриб-насекомое».

Целью настоящей работы являлось изучение возможностей получения биотехнологических культур грибов р. *Cordyceps* из различных природных местообитаний Южного Байкала и исследование их продукционных характеристик относительно лекарственно ценного соединения – кордицепина.

### Материалы и методы

Работы по сбору поражённых насекомых, далее использованных для выделения чистых культур грибов р. *Cordyceps* (за исключением *C. sinensis*), проводили в различных природных экосистемах Южного Байкала в июле – августе 2009–2011 гг. (рис. 1, А–Г)

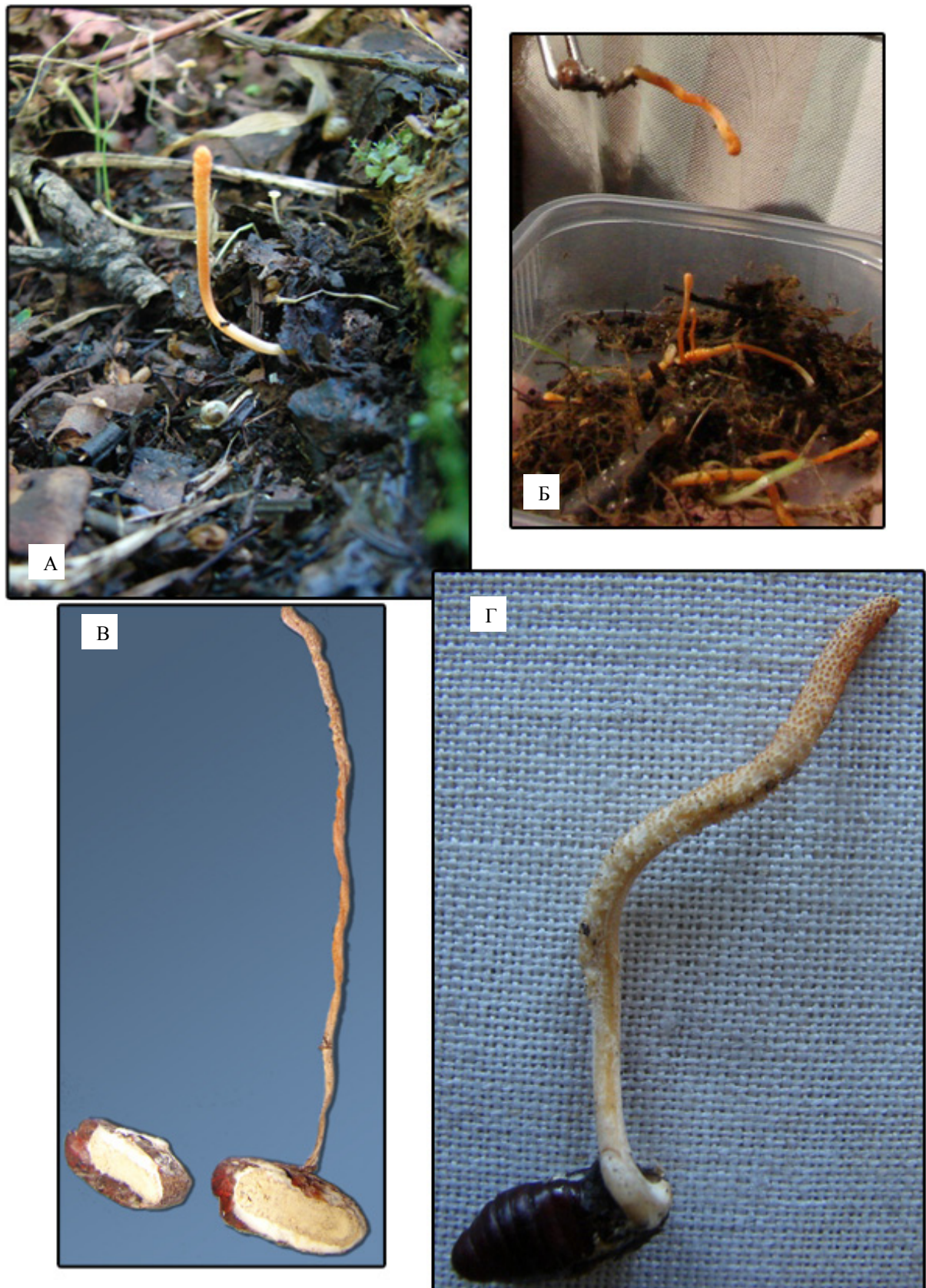


Рис. 1. А – строма гриба *C. militaris* в лесной подстилке; Б – собранные из природных местообитаний насекомые, зараженные *C. militaris*; В – продольный разрез кокона насекомого, заполненного склероцием со стромой *C. militaris*; Г – куколка чешуекрылых со стромой *C. militaris*

Основой для получения биотехнологических культур служили мумифицированные меланизированные личинки большой восковой моли *Galleria mellonella*. Для пассажей через насекомых применялись различные методы заражения: введение в гемоцель 0,01 мл суспензии спор (интрагемоцелярное заражение), погружение личинок в суспензию на 30 с, внесение её в корм. Для заражения использовали различный по составу инфекционный материал: водная суспензия из растёртых в порошок стром, склероций и мицелия *C. militaris* (телеоморфа *C. militaris*), либо водная суспензия конидий и мицелия *B. brongniartii* (телеоморфа *C. brongniartii*).

Заражённые личинки инкубировались в чашках Петри на стерильной влажной фильтровальной бумаге в течение 14 сут. при температуре 22–24 °С. После обрастания личинок мицелием и конидиеносцами производили пересев грибов на стерильные жидкие питательные среды: Чапека, неохмелённое пивное сусло, отвары зерновых культур. Культивирование осуществляли в колбах в стационарных условиях в течение 14 сут. при температуре 22–24 °С. Полученная мицелиальная плёнка высушивалась.

Измельчённые мицелий и трупы личинок *G. mellonella* с проросшими внутри склероциями гриба служили исходным материалом для экстракции, которую проводили 50%-ным этанолом при температуре 22 °С в течение 72 ч.

Для определения концентрации кордицепина в спиртовых экстрактах использовали полученный после центрифугирования супернатант в объёме 20 мкл. Определение проводили на жидкостном хроматографе Agilent G 1322 Series 1200 (Agilent Technologies). Для разделения фракций использована хроматографическая колонка длиной 250 мм, диаметром 4 мм, заполненная сорбентом Nucleosil 100–5–C-18, диаметр гранул 5 мкм. Детекция производилась при длинах волн 254 нм и 300 нм, при температуре 30 °С. Элюция с колонки производилась раствором ацетонитрил/вода в соотношении 70/30 со скоростью 1 мл/мин. Калибровка колонки произведена коммерческим препаратом Corduserin в разных концентрациях, выделенным из *C. militaris* (C3394 SIGMA).

### **Результаты и обсуждение**

Поражённых насекомых с проросшими стромами находят в лесной подстилке, это телеоморфная стадия развития гриба (мейотическое половое спороношение). Как правило, для поражения насекомого и прорастания стромы

необходимо несколько месяцев. Наряду с телеоморфной стадией присутствует и анаморфная (бесполоая) стадия, где размножение гриба происходит митотическим делением, конидиями. Собираемые в природе насекомые со стромами *Cordyceps* встречаются нечасто и являются достаточно дорогим продуктом. Производители препаратов на основе этих грибов (китайские, японские, корейские, индийские компании), чаще используют анаморфную стадию таких видов, как *Paecilomyces hepiali*, *P. lilacinus*, *P. cordyceps* [8].

В соответствии с последними системами сумчатых грибов телеоморфная стадия *C. sinensis* имеет анаморфную – *P. sinensis* и *Chrysosporium sinensis*, а телеоморфа *C. militaris* – анаморфную стадию *P. militaris* [9]. В ряде определителей энтомофильных грибов для *C. militaris* указана конидиальная стадия *Cephalosporium militaris* Y. Kobayasi [4; 5].

Опираясь на биологические и токсикологические показатели, к этим двум видам можно приравнять и анаморфный вид *Beauveria brongniartii* (syn.: *B. tenella* (Delacr.) Siem., *B. densa* (Link) Wuill., *Sporotrichum densium* Link, *Isaria densa* (non Fries), *B. globulifera* Pic. и др.) [2; 4; 5]. Известна также телеоморфная стадия этого гриба – *C. brongniartii* Shimazu [16].

На первом этапе заражения насекомых спорами гриба микозы сопровождаются меланизацией – окислением фенольных соединений, катализируемым ферментом полифенолоксидазой [3]. Одной из предпосылок меланизации следует считать резкий рост количества гемоцитов, содержащих полифенолоксидазу, в крови насекомых непосредственно после попадания микроорганизма в полость тела [16]. Меланизация у насекомых, например, у личинок *G. mellonella*, характеризуется появлением на кутикуле за несколько суток до гибели чёрно-бурых пятен. Форма, размеры, расположение и количество пятен не зависят от вида гриба, однако коррелируют с вирулентностью штамма. Так, при заражении высоковирулентными штаммами *Metarrisium anisopliae* и *B. bassiana* у личинок *G. mellonella* в большом количестве регистрировали мелкие бурые пятна [7; 9]. Бурые пятна кутикулы насекомых представляют собой меланотическую капсулу или меланотический тромб, где, кроме меланина и склеротина, содержатся протеины и аминокислоты [14]. Поскольку лекарственное сырьё используется в виде комплекса «гриб-насекомое», ценность мумифицированных насекомых с большим количеством меланина в кутикуле оказывается значительно выше.

Культуры грибов, пригодные для получения биотехнологического мицелия и склероция, имеют следующую характеристику:

*C. sinensis*. Мицелий на поверхности тела поражённых насекомых мало заметен, внутри полости образует плотный бело-розовый склероций. Стромы одиночные, простые, выходят из передней части головы насекомого, бурохристые или тёмно-коричневые. Плодущая часть верхушечная, цилиндрическая или слегка цилиндрическо-веретеновидная, 2–2,8 см длиной, 3–4 мм шириной.

Перитеции поверхностные или погружённые, скученные, расположены прямо, яйцевидные, 380–450×200–300 мкм, толстостенные, с чётко выраженными слоями. Аски цилиндрические, 200–260×10,2–13,5 мкм. Аскоспоры нитевидные, на концах суженные, 200–240×4–5 мкм, с многочисленными перегородками, с расстоянием между ними 7–12 мкм, распадаются на отдельные клетки. Гриб найден в горах Тибета на гусеницах чешуекрылых.

*C. militaris*. Встречается на многочисленных видах чешуекрылых насекомых. Мицелий на поверхности тела насекомого, часто на участках выхода стром на поверхность, белый, войлочный. Внутри полости гифы плотно прилегают друг к другу, 1,5–6 мкм в толщину, белые или кремовые, образуют склероций. Стромы чаще одиночные или их несколько, выходят из различных частей покровов. Плодущая часть верхушечная, цилиндрическая, веретеновидная или эллиптическая, 0,2–3,5 см. Перитеции вначале полупогруженные, при созревании выступают на поверхность, яйцевидные, 470–690×250–400 мкм. Аскоспоры нитевидные, 1–1,5 мкм толщиной, с многочисленными перегородками, распадаются на цилиндрические клетки 2–5 мкм длиной, закруглённые на обоих концах.

*C. brongniartii*. Встречается на коконах двукрылых. Стромы, 1–2 или 4, выходят из тела кокона в любом месте, грязно-белые, затем желтеющие. Тонкие, на концах зауженные, плодущая часть мало отличается от ножек. Перитеции прямые, полупогруженные, яйцевидные, 180–210×10–130 мкм. Аскоспоры цилиндрические, 30–53×2–2,5 мкм, с заострёнными концами.

Анаморфный гриб *P. sinensis* (телеоморфа *C. sinensis*). Выделен из погибших мумифицированных гусениц чешуекрылых, собранных в Тибете Е. А. Одинцовым.

Анаморфный гриб *P. militaris* (телеоморфа *C. militaris*) выделен из погибших мумифицированных коконов и куколок чешуекрылых, собранных в южных районах Иркутской области.

Анаморфный гриб *Beauveria brongniartii* (телеоморфа *C. brongniartii*) выделен из мумифицированных коконов двукрылых, собранных в районе Южного Байкала.

Для определения концентраций кордицепина взят материал, содержащий наибольшее его количество и соответствующий требованиям биотехнологии при его воспроизводстве.

Зарубежные производители обычно указывают следующее содержание кордицепина в собственной продукции: adenosine > 0,2 % или adenosine > 150 mg/100 g [8].

Результаты проведённого хроматографического определения количества кордицепина в образцах экстракта склероция *C. brongniartii* (рис. 2, А) и сравнения с содержанием в стандартном образце Cordycepin полученном Sigma-Aldrich из *C. militaris* (C3394 SIGMA) (рис. 2, Б), позволили сделать заключение о том, что исходный материал (комплекс «гриб-насекомое»), отобранный из различных экосистем Южного Байкала, является перспективным сырьём для получения препаратов с высокой концентрацией кордицепина.

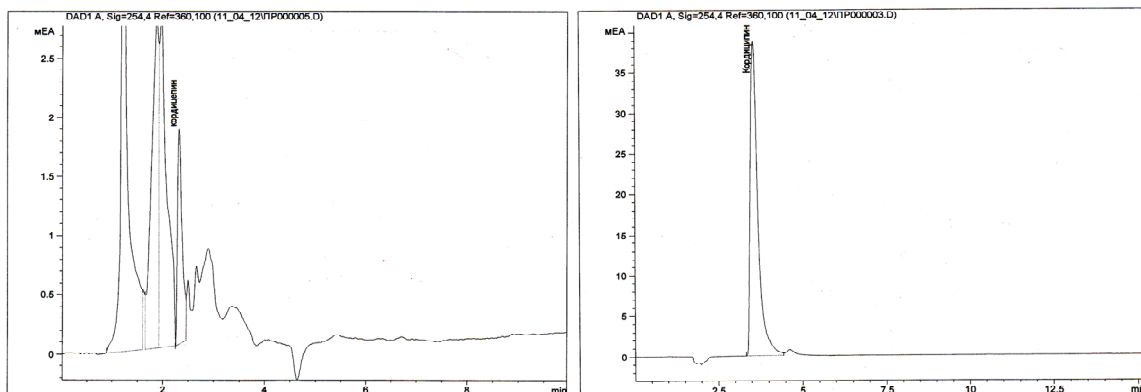


Рис. 2. А – хроматографическое определение содержания кордицепина (3'-Deoxyadenosine) в экстрактах склероция *C. brongniartii* по площади пика; Б – калибровка хроматографической колонки стандартным образцом препарата Cordycepin из *C. militaris* (каталог Sigma-Aldrich) (C3394 SIGMA)

Установлено, что содержание кордицепина зависит от вида биотехнологического сырья грибов. При использовании для выделения мицелия грибов *C. militaris* и *C. brongniartii* оно

составляет около 8–9 %, тогда как из экстрактов склероций этих грибов удаётся получить от 11 до 21 % кордицепина (табл.).

Таблица

Содержание кордицепина (3' Deoxyadenosine) в экстрактах склероция и мицелия *C. militaris* и *C. brongniartii*

№ пробы	Исследуемый экстракт	Содержание кордицепина, %
1	склероций <i>C. militaris</i>	21,17
2	мицелия <i>C. militaris</i>	9,2
3	склероций <i>C. brongniartii</i>	11,0
4	мицелий <i>C. brongniartii</i>	8,3

### Заключение

Можно констатировать, что культуры грибов р. *Cordyceps*, выделенные из экосистем Южного Байкала, по содержанию кордицепина значительно превосходят стандартные его содержащие БАД зарубежных производителей, для которых концентрация действующего вещества указывается в пределах 0,15–0,20 %.

В результате наших исследований к ранее известному продуценту кордицепина *C. militaris* добавлен не менее значимый – *C. brongniartii*, в котором, согласно заключению Института питания РАМН, суммарное содержание полисахаридов составляет 16,3 %, а содержание кордицепина 0,48 г в 100 г.

Значительное содержание уникального комплекса биологических веществ в исследованных аборигенных продуцентах открывает возможности создания новых лекарственных препаратов и биоактивных пищевых добавок.

### Литература

1. Грибы рода *Cordyceps*: физиологически активные соединения, биологическое действие / В. Г. Бабицкая [и др.] // Биотехнология. – 2009. – № 2. – С. 42–48.
2. Евлахова А. А. Энтомопатогенные грибы / А. А. Евлахова. – Л.: Наука, 1974. – 260 с.
3. Евлахова А. А. Механизм защиты у насекомых от грибных патогенов в связи с фактором вирулентности. / А. А. Евлахова, В. А. Павлюшин // Микроорганизмы в защите растений. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1983. – С. 3–22.
4. Коваль Э. З. Определитель энтомофильных грибов СССР / Э. З. Коваль. – Киев: Наукова думка, 1974. – 260 с.
5. Коваль Э. З. Клавидициальные грибы СССР / Э. З. Коваль. – Киев: Наукова думка, 1984. – 287 с.
6. Коренева Н. В. Кордицепс и иммунная система / Н. В. Коренева. – М., 2009. – 60 с.

7. Логинов Е. В. Развитие меланоза и изменения плотности тела при бактериально-грибных смешанных инфекциях личинок большой пчелиной огневки / Е. В. Логинов // Энтомопатогенные микроорганизмы и их использование в народном хозяйстве. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1992. – С. 121.

8. Поисковая система продукции [Электронный ресурс]: сайт. – URL: <http://www.alibaba.com/showroom/raecilomyces.html>

9. Энтомопатогенные ассоциации и дейтеромицеты. Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты / Б. А. Борисов [и др.]; под ред. В. В. Глупова. – М.: Изд. дом «Круглый год», 2001. – С. 352–427.

10. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells / Y. J. Chen [et al.] // Life Sci. – 1997. – Vol. 60, N 25. – P. 2349–2359.

11. Comparison of protective effects between *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage / H. M. Yu [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2006. – Vol. 54, N 8. – P. 3132–3138.

12. *Cordyceps sinensis* as an immunomodulatory agent / Y. C. Kuo [et al.] // Am. J. Chin. Med. – 1996. – Vol. 24, N 2. – P. 111–125.

13. Halpern G. M. Cordyceps: China's Healing Mushroom / G. M. Halpern. – N. Y.: Avery Pub. Gr., 1999. – 116 p.

14. Nappi A. J. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions / A. J. Nappi, E. Vass // Pigment Cell Res., 1993. – N 6. – P. 117–126.

15. Ng T. B. Pharmacological actions of Cordyceps, a prized folk medicine / T. B. Ng., H. X. Wang // J. Pharm. Pharmacol. – 2005. – Vol. 57, N 12. – P. 1509–1519.

16. Pye A. E. Hemocytes containing polyphenoloxidase in Galleria larvae after injections of bacteria / A. E. Pye, W. G. Yendol // J. Invertebr. Pathol. – 1972. – Vol. 19, N 2. – P. 166–170.

17. Won S. Y. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris* / S. Y. Won, E. H. Park // J. of Ethnopharmacology. – 2005. – Vol. 96, N 3. – P. 555–561.

## Some species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link em. Kabayasi et Mains from the ecosystems of the Southern Baikal as producers of high concentrations of cordycepin

B. N. Ogarkov<sup>1</sup>, O. B. Ogarkov<sup>2</sup>, G. R. Ogarkova<sup>1</sup>, L. V. Samusenok<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Institute for Biology, Irkutsk State University, Irkutsk

<sup>2</sup> Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

**Abstract.** The data provided about fungi of the genus *Cordyceps*, which are parasitic on insects from different orders (Lepidoptera, Coleoptera, etc.). Species of this genus *C. sinensis*, *C. militaris*, *C. brongniartii* became known as base for various dietary supplements and drugs. It is found that the *C. militaris* and *C. brongniartii* isolated from different ecosystems of the Southern Baikal are the producers of cordycepin (3 'Deoxyadenosine) in high concentrations.

**Keywords:** producers of drugs and biologically active substances, fungi of the genus *Cordyceps*, cordycepin (3 'Deoxyadenosine)

*Огарков Борис Никитович*  
*Научно-исследовательский институт*  
*биологии при ИГУ*  
 664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3  
 доктор биологических наук, профессор  
 заведующий лабораторией  
 тел (3952) 24–30–77, факс (3952) 34–00–07  
 E-mail: bornik@bk.ru

*Ogarkov Boris Nikitovich*  
*Research Institute for Biology*  
*Irkutsk State University*  
 3 Lenin St., Irkutsk, 664003  
 D. Sc. of Biology, Prof., Head of laboratory  
 phone: (3952) 24–30–77, fax (3952) 34–00–07  
 E-mail: bornik@bk.ru

*Огарков Олег Борисович*  
*Институт эпидемиологии и микробиологии НЦ*  
*ПЗСРЧ СО РАМН*  
 664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3  
 кандидат медицинских наук  
 заведующий лабораторией эпидемиологически  
 и социально-значимых инфекций  
 тел. (3952) 33–34–25  
 E-mail: obogarkov@yandex.ru

*Ogarkov Oleg Borisovich*  
*Institute of Epidemiology and Microbiology,*  
*Scientific Centre of Family Health*  
*and Human Reproduction Problems SB RAMS*  
 3 K. Marx St., Irkutsk, 664025  
 Ph. D. in Medicine, Head of laboratory  
 phone: (3952) 33–34–25  
 E-mail: obogarkov@yandex.ru

*Огаркова Галина Родионовна*  
*Научно-исследовательский институт*  
*биологии при ИГУ*  
 664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3  
 кандидат биологических наук  
 ведущий научный сотрудник  
 тел (3952) 24–30–77, факс (3952) 34–00–07  
 E-mail: bornik@bk.ru

*Ogarkova Galina Rodionovna*  
*Research Institute for Biology*  
*Irkutsk State University*  
 3 Lenin St., Irkutsk, 664003  
 Ph. D. in Biology, leading research  
 scientist  
 phone: (3952) 24–30–77, fax (3952) 34–00–07  
 E-mail: bornik@bk.ru

*Самусенок Любовь Викторовна*  
*Научно-исследовательский институт*  
*биологии при ИГУ*  
 664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3  
 старший научный сотрудник  
 тел (3952) 24–30–77, факс (3952) 34–00–07  
 E-mail: bornik@bk.ru

*Samusenok Lubov' Viktorovna*  
*Research Institute for Biology*  
*Irkutsk State University*  
 3 Lenin St., Irkutsk, 664003  
 senior research scientist  
 phone: (3952) 24–30–77, fax (3952) 34–00–07  
 E-mail: bornik@bk.ru