

Влияние полисахаридов *Hericium erinaceus* БП 16 на фагоцитарную активность нейтрофилов крови человека

© 2020. Т. В. Полежаева^{1,4}, д. б. н., зав. лабораторией,
И. Г. Широких^{2,3}, д. б. н., зав. лабораторией, М. И. Сергушкина¹, м. н. с.,
Я. И. Назарова², н. с., А. А. Широких^{2,3}, д. б. н., в. н. с.,
А. Н. Худяков¹, к. б. н., с. н. с., О. О. Зайцева¹, к. б. н., с. н. с.,
О. Н. Соломина¹, к. б. н., н. с., И. Г. Патурова⁴, к. б. н., доцент,

¹Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук, ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,
167982, Россия, г. Сыктывкар, ул. Первомайская, д. 50,

²Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока им. Н. В. Рудницкого,
610007, Россия, г. Киров, ул. Ленина, д. 166 а,

³Вятский государственный университет,

610000, Россия, г. Киров, ул. Московская, д. 36,

⁴Кировский государственный медицинский университет,
610027, Россия, г. Киров, ул. Карла Маркса, д. 112,

e-mail: ddic@yandex.ru, irgenal@mail.ru

Ксилотрофный гриб *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. – ежевик гребенчатый – известен как источник полисахаридов, обладающих широким спектром биологического действия. Из отобранного в природе плодового тела гриба, фенотипически сходного с *Hericium erinaceus*, выделена мицелиальная культура БП 16. На основе анализа фрагмента, включающего ITS1, ген 5.8S рРНК и ITS2, установлено тесное (99,68%) сходство штамма БП 16 с депонированным в NCBI штаммом *H. erinaceus* CBS 202.31_MH855186.1. При лабораторном культивировании *H. erinaceus* БП 16 отличался повышенной способностью к плодообразованию. Из замороженных и высушенных плодовых тел гриба экстракцией 5% раствором горячей щёлочи получены четыре полисахаридных фракции (ПФ). В зависимости от способа предобработки плодовых тел (высушивание или замораживание) и агрегатного состояния (осадок и супернатант) ПФ различались сочетанием и количественным соотношением в их составе отдельных моносахаров (глюкозы, галактозы, ксилозы, арабинозы, маннозы, фукозы и рамнозы), содержанием белка и галактуроновой кислоты. С помощью метода световой микроскопии установлено, что наличие в клеточной среде каждой из четырёх использованных в работе ПФ *H. erinaceus* БП 16 в концентрации 1,2% достоверно ($p < 0,05$) и в равной степени повышает способность нейтрофилов фагоцитировать частицы латекса, а фракция № 3, наиболее обогащённая ксилозой, оказывает подобный эффект и в концентрации 0,6%. Низкая токсичность, высокая биологическая совместимость и физиологическая активность полисахаридов *H. erinaceus* имеют неоспоримые преимущества перед другими классами химических веществ.

Ключевые слова: *Hericium erinaceus*, ITS1_5.8S ITS2, грибные полисахариды, моносахаридный состав, нейтрофилы, фагоцитоз.

Influence of polysaccharides from *Hericium erinaceus* BP 16 on phagocytic activity of human blood neutrophils

© 2020. T. V. Polezhaeva^{1,4}, ORCID: 0000-0003-4999-3077

I. G. Shirokikh^{2,3}, ORCID: 0000-0002-3319-2729

M. I. Sergushkina¹, ORCID: 0000-0002-3113-527X, Y. I. Nazarova², ORCID: 0000-0002-2945-5282

A. A. Shirokikh^{2,3}, ORCID: 0000-0002-7808-0376, A. N. Khudyakov¹, ORCID: 0000-0003-3757-8263

O. O. Zaytseva¹, ORCID: 0000-0001-9427-0420, O. N. Solomina¹, ORCID: 0000-0001-5187-8698

I. G. Paturova⁴, ORCID: 0000-0002-8555-4525

¹Institute of Physiology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences, FRC Komi SC UB RAS,
50, Pervomayskaya St., Syktyvkar, Russia, 167982,

²Federal Agricultural Research Center of the North-East named N.V. Rudnitsky, 166a, Lenina St., Kirov, Russia, 610007,
³Vyatka State University, 36, Moskovskaya St., Kirov, Russia, 610000,
⁴Kirov State Medical University, 112, Karl Marx St., Kirov, Russia, 610027,
 e-mail: ddic@yandex.ru, irgenal@mail.ru

An important condition for obtaining new pharmacological drugs with immunomodulatory effect is the search for active producers in natural habitats. The identification and isolation of new species and strains of fungi from the natural environment opens up prospects for the replenishment of collections of active producers and using them to develop new biotechnological products. The mushroom *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. has long been known as a source of polysaccharides with a wide spectrum of biological action. The purpose of this work is to assess the ability of polysaccharides from frozen and dried fruitbodies of the artificially cultivated mushroom *H. erinaceus* to influence the phagocytic activity of human neutrophils.

From the fungus fruitbody selected in nature, which is similar in phenotypic characters to *Hericium erinaceus*, mycelial culture BP 16 was isolated. Based on the analysis of the fragment including the internal transcribed spacer (ITS1), the 5.8S rRNA gene and ITS2 found close (99.68%) resemblance of the BP 16 strain to the *H. erinaceus* CBS 202.31 MH855186.1 strain which is deposited in the NCBI.

The isolated strain (BP 16) during laboratory cultivation was distinguished by an increased ability to produce fruits. Four polysaccharide fractions (PF) were obtained from the frozen and dried fruitbodies of this fungus by extraction with a 5% solution of hot alkali.

Depending on the method of pretreatment of fruitbodies (drying or freezing) and the aggregate state (sediment and supernatant), the polysaccharide fractions differed in combination and quantitative ratio in their composition of individual monosaccharides (glucose, galactose, xylose, arabinose, mannose, fucose and rhamnose), protein content and galacturonic acid.

It was established by light microscopy that the polysaccharides of each fraction of *H. erinaceus* BP 16 (at a concentration of 1.2%) equally increase the phagocytic activity of neutrophils, and fraction 3 (the most enriched in xylose) has a similar effect at a concentration of 0.6%.

Low toxicity, high biological compatibility and physiology activity of polysaccharides from *H. erinaceus* have undeniable advantages over other classes of chemicals. In the context of the search for new natural immunomodulators, further structural and functional study of *H. erinaceus* polysaccharides is very promising.

Keywords: *Hericium erinaceus*, ITS1_5.8S ITS2, mushroom polysaccharides, monosaccharide composition, neutrophils, phagocytosis.

В последние годы для получения новых лекарственных субстанций используют базидиальные макромицеты, различные лечебные эффекты которых обусловлены, в первую очередь, полисахаридными компонентами. Полисахариды являются не только субстратами для биосинтетических и энергетических процессов, но и важнейшими регуляторами физиологических функций, включая модуляцию иммунного ответа.

Ксилотрофный гриб *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. – ежовик гребенчатый – известен, как источник полисахаридов, обладающих широким спектром биологического действия. На сегодняшний день из плодовых тел и культивируемого мицелия *H. erinaceus* выделено, в общей сложности, тридцать пять полисахаридов [1]. Препараты, получаемые на основе полисахаридного комплекса гериция, обладают антиоксидантным [2, 3], гиполипидемическим [4], гепатопротективным [5], антимикробным [6, 7], противоопухолевым [8–10], а также иммуностимулирующим [11, 12] действием.

Важным условием получения новых фармакологических препаратов является поиск активных продуцентов в природных местообитаниях. Выявление и выделение в культуру новых видов и штаммов грибов из природной среды открывает перспективы пополнения коллекций активными продуцентами и служит основой для разработки новых биотехнологических продуктов. Авторами из отобранного в грабово-кисличной дубраве на территории Национального парка «Беловежская пуща» (Беларусь) плодового тела гриба, сходного по фенотипическим признакам с *H. erinaceus*, выделена мицелиальная культура БП 16. Задачи настоящего исследования включали: 1) уточнение таксономического положения выделенного штамма, 2) получение плодовых тел гриба при искусственном культивировании, 3) выделение полисахаридсодержащих фракций (ПФ) из замороженных и высушенных плодовых тел и определение их моносахаридного состава, 4) изучение *in vitro* способности полисахаридов оказы-

вать влияние на фагоцитарную активность нейтрофилов крови человека.

Объекты и методы

Таксономическое положение исследуемого штамма определяли на основе анализа фрагмента, включающего внутренний транскрибируемый спейсер (Internal transcribed spacer) ITS1, ген 5.8S рРНК и ITS2 (НПК «Синтол» (г. Москва)). Идентификацию секвенированной последовательности проводили с применением геномной и программной базы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Мицелиальную культуру гриба выращивали на суслоагаре (4° Баллинга). Посевной мицелий получали на стерильном зерне овса. Для выращивания плодовых тел использовали субстрат из соломы, зерна и дубовых опилок в объёмном соотношении 6:3:1. В стерильных условиях субстрат инокулировали посевным зерновым мицелием в количестве 5% от массы субстрата. Ёмкости с инокулированным субстратом инкубировали при комнатной температуре (20 ± 1 °C) в течение 30 сут. После сбора плодовых тел одну часть подвергали замораживанию при -20 °C в электроморозильнике «Derby» (Дания), другую высушивали при 60 °C.

Для извлечения полисахаридов сухие (41,0 г) и замороженные (17,67 г) плодовые тела гриба измельчали по отдельности и подвергали экстракции, последовательно заливая сырьё водой при 20 и 70 °C, а затем 5%-ным водным раствором NaOH при 20 и 80 °C. На всех этапах осуществляли непрерывное перемешивание в течение 3 час. Остаток сырья отделяли центрифугированием.

Контроль экстракции полисахаридов осуществляли фенол-серноокислотным методом [13]. При положительной реакции на углеводы экстракт сливали, а остаток сырья повторно заливали экстрагентом (водой или 5% раствором NaOH), повторяя манипуляцию до отрицательной реакции на углеводы в экстракте. Горячие щелочные экстракты после нейтрализации уксусной кислотой осаждали добавлением 96% этанола (1:3, V/V), диализовали, концентрировали. Полученные осадки отделяли центрифугированием (13 000 об./мин, в течение 40 мин), растворяли в дистиллированной воде (1:1, V/V), диализовали против дистиллированной воды, растворы лиофилизировали.

Количественное определение нейтральных моносахаридов в виде соответствующих ацетатов полиолов после полного (в течение 3-х час)

кислотного гидролиза 2М трифторуксусной кислотой проводили газо-жидкостной хроматографией (ГЖХ) на хроматографе «Varian 450-GC» (США) с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой VF-5 ms «Varian» (США), 0,25 мм, 30 м, гелием в качестве газа-носителя. ГЖХ ацетатов полиолов проводили в программе: от 175 °C (1 мин) до 250 °C (2 мин) со скоростью 3 °C/мин. Процентное содержание моносахаридов от суммарного препарата вычисляли из площадей пиков, используя коэффициенты отклика детектора [14]. В качестве внутреннего стандарта использовали мио-инозит «Sigma» (США). В ПФ также определяли содержание (весовые %) гликуроновых кислот по реакции с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты [15] и содержание белка по Лоури [16].

Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали с использованием инертных частиц латекса диаметром 0,08 мкм «Sigma-Aldrich» (Германия), которые в соотношении 1:10 разводили средой Хенкса «Биолот» (Россия). Разведённый латекс (0,05 мл) смешивали с 0,1 мл крови, помещали смесь в термостат при +37 °C на 30 мин и через каждые 10 мин встряхивали. Затем готовили мазки, которые последовательно окрашивали красителями эозин-метиленовым синим по Май-Грюнвальду «Минимед-стандарт» (Россия) и азур-эозином по Романовскому «Минимед-стандарт» (Россия) в течение 40 с и 30 мин соответственно. При микроскопировании (увеличение $\times 1000$) подсчитывали 100 нейтрофилов, определяли долю клеток с поглощёнными частицами латекса.

В работе использована венозная кровь беременных женщин-добровольцев с нормальным течением беременности с их информированного согласия. Забор крови проводили в вакуумные пробирки с Na-гепарином «Ningbo Greetmed Medical Instruments Co., Ltd.» (Китай).

При статистической обработке данных для каждого показателя вычисляли среднее арифметическое значение и среднее квадратичное отклонение ($M \pm \delta$). Для выявления статистически значимых различий между группами применяли непараметрический критерий Уилкоксона с использованием компьютерной программы «BIOSTAT».

Результаты и обсуждение

Для идентификации природного изолята БП 16 выбран универсальный для всех так-

**Т. В. Полежаева, И. Г. Широких, М. И. Сергушкина,
Я. И. Назарова, А. А. Широких, А. Н. Худяков,
О. О. Зайцева, О. Н. Соломина, И. Г. Патурова**
**«Влияние полисахаридов *Hericium erinaceus* БП 16
на фагоцитарную активность
нейтрофилов крови человека». С. 166**

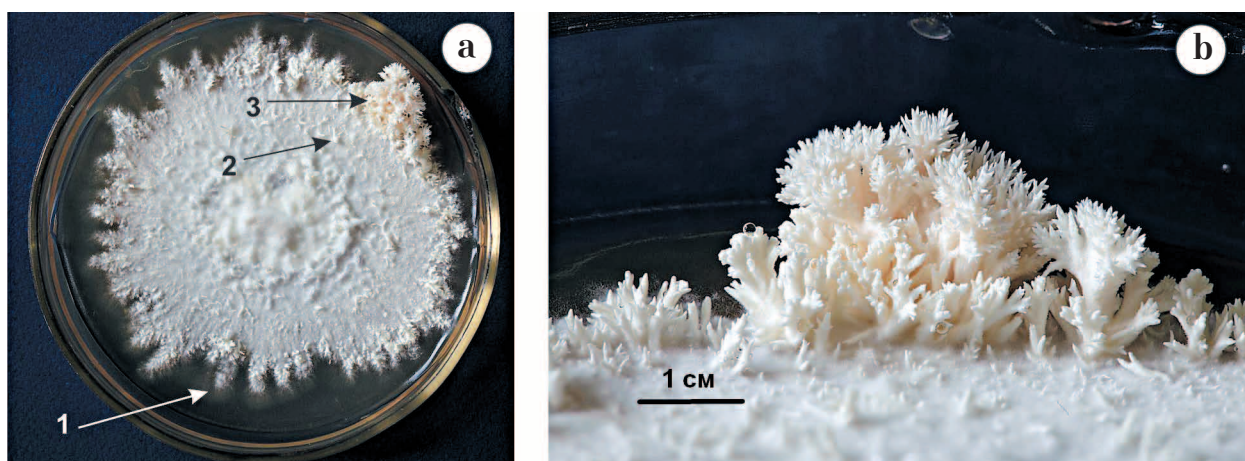


Рис. 1. Рост гриба *H. erinaceus* БП 16 в лабораторных условиях:
а – колония на сусло-агаре: 1 – мицелий, 2 – примордии,
3 – формирование плодового тела; б – плодовое тело, 21 сут культивирования
Fig. 1. The growth of the mushroom *H. erinaceus* BP 16 in the laboratory:
а – colony on malt-agar: 1 – mycelium, 2 – primordias,
3 – formation of the fruiting body; б – fruit body, 21 days of cultivation



Рис. 2. Выращивание плодовых тел
H. erinaceus БП 16 на питательном субстрате
Fig. 2. Growing *H. erinaceus* BP 16
fruit bodies on a nutrient substrate

сонов царства Fungi оперон рибосомальной РНК. Полученную нуклеотидную последовательность фрагмента оперона рРНК – ITS1_5.8S ITS2 сопоставляли с материалом, депонированным в генбанке NCBI. Сопоставление показало, что штамм является представителем рода *Hericium*, семейства *Hericiaceae*, порядка *Russulales*, класса *Agaricomycetes*, отдела *Basidiomycota*. Поисковым сервисом BLAST в качестве наиболее близкого (99,68% сходства) по последовательности ITS1_5.8S ITS2 к исследуемому грибу БП 16 предложен депонированный в NCBI штамм *H. erinaceus* CBS 202.31_MH855186.1.

При лабораторном культивировании *H. erinaceus* БП 16 отличался повышенной способностью к плодообразованию: уже через 18–20 сут роста на суслоагаре по периферии колоний начинали появляться примордии, а затем формировались небольшие плодовые тела – базидиомы (рис. 1). Посевным мицелием гериция инокулировали стерильный питательный субстрат, на котором через 36 сут роста появлялись зачаточные примордии, а ещё через 9–12 сут сформировались технически зрелые плодовые тела (рис. 2). Вторую волну плодоношения наблюдали через 20, третью – через 15 сут культивирования. Собранные за три волны плодоношения грибы для сохранения ценных свойств подвергали частично замораживанию, частично – высушиванию.

Из замороженных плодовых тел, в результате экстракции горячим 5% раствором NaOH с последующим осаждением этанолом, выделены фракции ПФ № 1 (супернатант) с выходом

1,25% и ПФ № 2 (осадок) с выходом 1,24% от в.-с. массы сырья. Из высушенных плодовых тел выделены фракции ПФ № 3 (супернатант) с выходом 1,65% и ПФ № 4 (осадок) с выходом 1,07% от в.-с. массы сырья. Суммарный выход полисахаридов из замороженных плодовых тел составил 10,01%, из высушенных – 14,95% (в пересчёте на сухое сырьё).

По данным ГЖХ, в состав углеводных цепей полисахаридов *H. erinaceus*, экстрагируемых горячей щёлочью, входят остатки следующих нейтральных моносахаридов: глюкозы, галактозы, ксилозы, арабинозы, маннозы, фукозы и рамнозы. В зависимости от способа предобработки плодовых тел (высушивание или замораживание) и агрегатного состояния (осадок и супернатант) ПФ характеризовались различным сочетанием и количественным соотношением в их составе отдельных моносахаров (табл. 1).

Сопоставление полученных данных с данными, ранее известными из литературы, в целом указывает на явное сходство штамма БП 16 с другими представителями вида. Так, ранее в моносахаридном составе углеводных цепей ежевика гребенчатого обнаружены остатки рамнозы, галактозы и глюкозы в соотношении 1,19 : 3,18 : 1,00 [17], глюкозы, галактозы и фукозы в соотношениях 1,00 : 2,11 : 0,42 [18], фукозы, галактозы и глюкозы в соотношении 1,00 : 4,00 : 1,00 [19].

Полисахаридсодержащие фракции, выделенные из *H. erinaceus* БП 16 горячей щёлочью, по существу, представляют собой гетерополисахаридные пептиды, о чём свидетельствует обнаружение в их составе белка – от 1,5

Таблица 1 / Table 1
Характеристика химического состава различных ПФ *H. erinaceus*
Characteristics of the chemical composition of different PF *H. erinaceus*

ПФ № PF No.	Галактуроновая кислота, % Galacturonic acid, %	Нейтральные моносахариды, мг/г Neutral monosaccharides, mg/g							Всего сахаров, % Total sugars, %	Белок, % Protein, %
		Rhamnose	Fucose	Arabinose	Glucose	Galactose	Xylose	Manose		
1	8,0	2,59	15,5	12,59	0	27,07	21,71	920,54	9,22	1,5
2	3,9	5,23	6,59	13,78	882,18	20,33	41,27	30,62	17,15	5,8
3	7,8	0	6,53	6,21	744,15	20,23	214,95	7,95	96,28	2,1
4	2,2	0	0	9,04	954,76	10,77	11,7	13,73	17,05	3,7

Влияние различных концентраций ПФ *H. erinaceus* БП 16 на фагоцитарную активность нейтрофилов крови человека ($n = 10, M \pm \sigma$)
Effect of different concentrations of PF *H. erinaceus* BP 16 on phagocytic activity of human blood neutrophils ($n = 10, M \pm \sigma$)

Нейтрофилы / Neutrophils	Концентрация ПФ / Concentration PF		
	0,3%	0,6%	1,2%
Контроль / Control	87±8,2		
С ПФ № 1 / With PF No. 1	92±9,5	92±10,6	96±2,9*
С ПФ № 2 / With PF No. 2	92±8,7	91±10,2	96±2,8*
С ПФ № 3 / With PF No. 3	92±6,3	94±6,9*	96±2,2*
С ПФ № 4 / With PF No. 4	91±6,5	89±9,9	94±4,8*

Примечание: * – различие с контролем значимо при $p < 0,05$.
Note: * – the difference with the control is significant at $p < 0.05$.

до 5,8% в зависимости от фракции. В каждой фракции, по результатам спектрофотометрии, содержалось также от 2,2 до 8,0 весовых % галактуроновой кислоты. Таким образом, состав ПФ *H. erinaceus* значительно изменялся в зависимости от способа предварительной обработки сырья и способа экстракции полисахаридов.

Характеристика фагоцитарной активности нейтрофилов. В контроле фагоцитарная активность нейтрофилов человеческой крови составила 87±8%. Наличие в клеточной среде каждой из четырёх исследуемых в работе ПФ *H. erinaceus* в концентрации 1,2% повышало фагоцитарную активность нейтрофилов достоверно и в равной степени (табл. 2).

Необходимо отметить, что ПФ № 3 оказывала данный эффект также в концентрации 0,6%, что может быть обусловлено более высоким содержанием в ней сахаров (96,28%) по сравнению с другими фракциями (9,22–17,15%) (табл. 1). Отличительной особенностью ПФ № 3 является также большее, по сравнению с другими фракциями (11,7–41,27 мг/г), содержание в ней ксилозы (214,95 мг/г). Возможно, этим обусловлен высокий фагоцитарный показатель данной фракции, известно, что полисахариды ксилан и гликоксилян, выделенные из *H. erinaceus*, характеризуются как противоопухолевые агенты [20].

Полисахариды ежевика гребенчатого способны повышать активность макрофагов [21, 22], что объясняют, в основном, наличием в их составе β-глюканов [23]. Наши результаты, подтверждающие способность полисахаридов из плодовых тел *H. erinaceus* БП 16 стимулировать фагоцитарную активность клеток, хорошо согласуются с этими представлениями, хотя вопрос о природе иммуномодулирующих компонентов *H. erinaceus* до настоящего времени остаётся открытым. Низкая токсич-

ность, высокая биологическая совместимость и метаболическая активность полисахаридов *H. erinaceus* имеют неоспоримые преимущества перед многими другими классами химических веществ.

Работа выполнена в рамках НИР Программы ФНИ государственных академий наук на 2013–2020 гг. № 0767-2019-0090 «Изучить потенциал полифункционального действия мицелиальных грибов и бактерий с целью создания новых препаратов для повышения адаптивности и экологической безопасности растениеводства и защиты окружающей среды от загрязнений» и № 0415-2016-003 «Влияние пектинов на функциональную сохранность клеток при замораживании».

References

1. He X., Wang X., Fang J., Chang Y., Ning N., Guo H., Zhao Z. Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: a review // International journal of biological macromolecules. 2017. V. 97. P. 228–237. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.01.040
2. Han Z.H., Ye J.M., Wang G.F. Evaluation of in vivo antioxidant activity of *Hericium erinaceus* polysaccharides // International journal of biological macromolecules. 2013. V. 52. P. 66–71. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.09.009
3. Li X.Y., Wang Z.Y., Wang L., Walid E., Zhang H. In vitro antioxidant and anti-proliferation activities of polysaccharides from various extracts of different mushrooms // International Journal of Molecular Sciences. 2012. V. 13. No. 5. P. 5801–5817. doi: 10.3390/ijms13055801
4. Byung K.Y., Jun B.P., Chi H.S. Hypolipidemic effect of an exo-biopolymer produced from a submerged mycelial culture of *Hericium erinaceus* // Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 2003. V. 67. No. 6. P. 1292–1298. doi: 10.1271/bbb.67.1292
5. Zhang Z., Lva G., Pana H., Pandeyb A., Hec W. Antioxidant and hepatoprotective potential of endo-poly-

- saccharides from *Hericiium erinaceus* grown on tofu whey // Journal Biological Macromolecules. 2012. V. 51. No. 5. P. 1140–1146. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.09.002
6. Kim D.M., Pyun C.W., Ko H.G., Park W.M. Isolation of antimicrobial substances from *Hericiium erinaceum* // Mycobiology. 2000. V. 28. P. 33–38. doi: 10.1080/12298093.2000.12015719
7. Kim S.P., Moon E., Nam S.H., Friedman M. *Hericiium erinaceus* mushroom extracts protect infected mice against *Salmonella typhimurium* – induced liver damage and mortality by stimulation of innate immune cells // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012. V. 60. No. 22. P. 5590–5596. doi: 10.1021/jf300897w
8. Wang J.C., Hu S.H., Lee T.M. Antitumor and immunoenhancing activities of polysaccharide from culture broth of *Hericiium* spp. // Kaohsiung Journal of Medical Sciences. 2001. V. 17. No. 9. P. 461–467.
9. Kim S.P., Kang M.Y., Kim J.H., Nam S.H., Friedman M. Composition and mechanism of antitumor effects of *Hericiium erinaceus* mushroom extracts in tumor-bearing mice // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. V. 59. No. 18. P. 9861–9869. doi: 10.1021/jf201944n
10. Li G., Yu K., Li F., Xu K., Li J., He S., Cao S., Tan G. Anticancer potential of *Hericiium erinaceus* extracts against human gastrointestinal cancers // Journal of Ethnopharmacology. 2014. V. 153. No. 2. P. 521–530. doi: 10.1016/j.jep.2014.03.003
11. Choi Y.I., Lee J.S., Lee U.Y., Lee T.S. Immunostimulating and antitumor effects on mouse sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Hericiium erinaceus* // Journal of Life Science. 2010. V. 20. P. 623–631. doi: 10.5352/jls.2010.20.4.623
12. Sheu S.C., Lyu Y., Lee M.S., Cheng J.H. Immunomodulatory effects of polysaccharides isolated from *Hericiium erinaceus* on dendritic cells // Process Biochemistry. 2013. V. 48. No. 9. P. 1402–1408. doi: 10.1016/j.procbio.2013.06.012
13. Dubois M., Gillies K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Calorimetric method for the determination of sugars and related substances // Analytical Chemistry. 1956. V. 28. P. 350–356. doi: 10.1021/ac60111a017
14. York W.S., Darvil A.G., McNeil M., Stevenson T.T. Isolation and characterization of plant cell walls and cell-wall components // Methods in Enzymology. 1986. V. 118. P. 3–40.
15. Usov A.I., Bilan M.I., Klochkova N.G. Polysaccharides of Algae, 48. Polysaccharide composition of several Calcareous Red Algae: Isolation of alginate from *Corallina pilulitera* // Botanica Marina. 1995. V. 38. P. 43–51. doi: 10.1515/botm.1995.38.1-6.43
16. Lowry B.O., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // Journal of Biological Chemistry. 1951. V. 193. P. 265–275.
17. Jia L.M., Liu L., Dong Q., Fang J.N. Structural investigation of a novel rhamnoglucogalactan isolated from the fruiting bodies of the fungus *Hericiium erinaceus* // Carbohydrate Research. 2004. V. 339. P. 2667–2671. doi: 10.1016/j.carres.2004.07.027
18. Wang Z., Luo D., Liang Z. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericiium erinaceus* Pers. // Carbohydrate polymers. 2004. V. 57. No. 3. P. 241–247. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.04.018
19. Zhang P., Sun J., Zhang C., Tang J., Fan X., Shi C. Structural investigation of a novel fucoglucogalactan isolated from the fruiting bodies of the fungus *Hericiium erinaceus* // Food Chemistry. 2007. V. 104. No. 2. P. 451–456. doi: 10.1016/j.carres.2004.07.027
20. Mizuno T. Bioactive substances in *Hericiium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Yamabushitake), and its medicinal utilization // International Journal of Medicinal Mushrooms. 1999. V. 1. P. 105–119. doi: 10.1615/intjmedmushrooms.v1.i2.10
21. Wang J.C., Hu S.H., Lee T.M. Antitumor and immunoenhancing activities of polysaccharide from culture broth of *Hericiium* spp. // Kaohsiung Journal of Medical Sciences. 2001. V. 17. No. 9. P. 461–467. doi: 10.1016/j.carbpol.2004.04.018
22. Kim S.P., Kang M.Y., Kim J.H., Nam S.H., Friedman M. Composition and mechanism of antitumor effects of *Hericiium erinaceus* mushroom extracts in tumor-bearing mice // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. V. 59. P. 9861–9869. doi: 10.1021/jf201944n
23. Dong Q., Jia L.M., Fang J.N. A beta-D-glucan isolated from the fruiting bodies of *Hericiium erinaceus* and its aqueous conformation // Carbohydrate Research. 2006. V. 341. No. 6. P. 791–795. doi: 10.1016/j.carres.2006.01.022