

**Виявлено імуномодулювальні властивості біомаси *Coriolus versicolor* 353 на експериментальній моделі мишей *in vivo*. Препарат біомаси *C. versicolor* 353 підвищував здатність макрофагів черевної порожнини інтактних мишей до накопичення реактогенних метаболітів кисню та їх фагоцитарну активність**

**Ключові слова:** базидіальний гриб, *Coriolus versicolor*, інтерферон

**Обнаружено иммуномодулирующие свойства биомассы *Coriolus versicolor* 353 на экспериментальной модели мышей *in vivo*. Препарат биомассы *C.versicolor* 353 повышал способность макрофагов брюшной полости интактных мышей к накоплению реактогенных метаболитов кислорода и их фагоцитарную активность**

**Ключевые слова:** базидиальные грибы, *Coriolus versicolor*, интерферон

***Immunomodulating properties of the biomass *Coriolus versicolor* 353 was found in an experimental model in mice in vivo. Preparation of the biomass *C.versicolor* 353 enhances the ability of macrophages of the abdominal cavity of mice to the accumulation of intact reactogenic metabolites of oxygen and their phagocytic activity***

**Keywords:** basidiomyceteous mushroom, *Coriolus versicolor*, interferon

# ВПЛИВ БІОМАСИ CORIOLUS VERSICOLOR 353 НА ПОКАЗНИКИ ІМУНОРЕАКТИВНОСТІ ОРГАНІЗМУ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ

**Л.О. Антоненко**

Асистент\*

Контактний тел.: (044) 406-83-12, 066-784-94-17

E-mail: lora.a@bigmir.net

**Л.М. Лазаренко**

Доктор біологічних наук, професор\*

E-mail: LazarenkoLM@gmail.com

**І.Р. Клечак**

Кандидат технічних наук, доцент кафедри\*

Контактний телефон: роб. (044) 454-98-51

E-mail: prombt@ukr.net

\*Кафедра промислової біотехнології

Національний технічний університет України

«Київський політехнічний інститут»

просп. Перемоги, 37, корпус 4, м. Київ, 03056

## 1. Вступ

За останні роки інфекційно-запальні та онкологічні захворювання людини, перебіг яких супроводжується формуванням вторинних імунодефіцитних станів, характеризуються тенденцією до зростання. Лікування та профілактика, що засновані на вакцинації, діють при обмеженому числі інфекцій. Застосування сироватки або імунних лімфоцитів є ефективним лише на ранніх стадіях інфекційного процесу. У зв'язку зі швидким збільшенням числа збудників, що характеризуються множинною стійкістю, антибіотична терапія стає менш ефективною [1]. Все це робить актуальним та перспективним пошук нових безпечних високоефективних імуномодуляторів з вибірковою дією на окремі ланки імунітету. До таких імуномодуляторів можуть бути віднесені біологічні речовини вищих базидіальних грибів, насамперед їх полісахариди та білки.

Основним механізмом імуномодулювальних ефектів полісахаридів гліканів базидіальних грибів є їх стимулююча дія на клітини фагоцитарної системи. Ця дія проявляється в активації фагоцитозу, внутрішньоклітинної бактерицидності, переварювання, цитотоксичності та секреції імунорегуляторних цитокінів [2].

На сучасному ринку лікувально-профілактичних препаратів збільшується попит на препарати, створені на основі міцелію вищих базидіальних грибів. Зауважимо, що такі препарати містять природні біологічно активні комплекси, а не окремі біологічно активні речовини, виділені з міцелію або культуральної рідини. Зокрема, серед таких біологічно активних добавок: "Мікосвіт" [3], "Трамелан" [4], "Coriolus-MLR" [5] та ряд інших.

У зв'язку з цим перспективним є дослідження імуномодулювальних властивостей міцелію штамів базидіальних грибів з вітчизняних Колекцій чистих культур, які продемонстрували високі показники росту та наявність біологічно активних речовин на етапі скринінгу [6, 7].

Базидіальні гриби роду *Coriolus* Quel. (*Trametes* Fr.) є перспективними продуцентами для промислової біотехнології завдяки наявності в міцелії та культуральному фільтраті речовин (полісахариди, ферменти, білки, ліпіди та інші) з широким спектром лікувальних властивостей – від антибактеріальних до протипухлинних. Імуномодулювальні властивості встановлено для полісахаридів PSK і PSP, виділених з *Coriolus versicolor* [8–10], що у вигляді комерційних препаратів широко використовуються у лікувальній практиці як імуномодулятори та про-

типухлинні засоби в поєднанні з хіміо- та радіотерапією. Імуномодулювальний потенціал глибокого міцелію не досліджувався.

Тому, метою роботи було встановлення імуномодулювальних властивостей препарату біомаси базидіального гриба *Coriolus versicolor* 353 шляхом дослідження його впливу на функціональну активність клітин фагоцитарної системи, інтерферогенез та продукцію фактору некрозу пухлини- $\alpha$  на експериментальній моделі інтактних мишей в системі *in vivo*.

## 2. Матеріали та методи дослідження

У роботі використовували ліофілізовану біомасу штаму базидіального гриба *Coriolus versicolor* 353. Біомасу отримували методом глибокого культивування при температурі 30°C при перемішуванні зі швидкістю 120 об/хв протягом 4 діб. Культивування проводили на оптимізованому середовищі ОКС (г/дм<sup>3</sup>): глюкоза – 20; дріжджовий екстракт – 3,0; пептон – 3,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,0; MgSO<sub>4</sub> – 0,25; пивне сусло – 20 см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>. рН вихідного середовища встановлювали за допомогою 0,1 N HCl на рівні 5,0. Біомасу ліофілічно висушували за допомогою приладу Freeze Dryer 4.5 USA при попередньому заморожуванні до – 50°C.

Експериментальні дослідження імуномодулювальних властивостей біомаси проводили на мишах лінії BALB/c (18–20 г), самиць віком 6–8 тижнів, які отримували із розплідника Інституту молекулярної біології та генетики НАН України. Усі дослідження проводились із урахуванням норм Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей від 20.09.1985 та закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [11].

Мишам перорально вводили суспензію препарату біомаси базидіального гриба *C.versicolor* 353 у фізіологічному розчині (50 мкг на тварину) щодоби протягом 9 діб. У контрольну групу увійшло 10 умовно-здорових мишей, які перорально отримували фізіологічний розчин. На 1, 3, 6 та 9 добу від декапітованих мишей, які попередньо отримували повну анестезію, відбирали перитонеальний ексудат та периферійну кров. Функціональну активність макрофагів перитонеального ексудату (МФПЕ) досліджували за їх здатністю до накопичення реактогенних метаболітів кисню в тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) спектрофотометричним методом, а також до поглинання латексу загальноприйнятим методом дослідження [12]. Визначали кількість НСТ-позитивних макрофагів у спонтанному та стимульованому НСТ-тестах. За різницею між показниками спонтанного та стимульованого НСТ-тесту визначали функціональний резерв (ФР) МФПЕ. Поглинальну активність оцінювали за показником фагоцитозу (ПФ) – кількістю МФПЕ, здатних до поглинання латексу, та фагоцитарним числом (ФЧ) – середньою кількістю частинки латексу, які поглинались МФПЕ.

У сироватці крові визначали концентрацію інтерферону та фактора некрозу пухлин- $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ). Сироватку зберігали при -20°C не більше 2 тижнів.

Активність інтерферону визначали шляхом мікротитрування у перещеплювальній культурі диплоїдних фібробластів мишей L-929. Облік результатів проводили при мікроскопії під інвертованим мікроскопом. Активність інтерферону оцінювали за пригніченням цитопатичної дії вірусу везикулярного стоматиту (ВВС). За титр інтерферону приймали те розведення зразка, при якому спостерігався захист 50% моношарів клітин від цитопатичної дії 100 ТЦД<sub>50</sub>/0,1 мл ВВС. При кожному окремому титруванні зразків використовували пробу референс-інтерферонів- $\alpha$  (міжнародний стандарт В 69/19) з відомою активністю [12].

Вміст ФНП $\alpha$  у сироватці крові досліджували загальноприйнятим методом за цитотоксичною дією на перещеплювальній культурі фібробластів мишей L-929. Кількість ФНП $\alpha$  у сироватці крові визначали за індексом цитотоксичності (ІЦ, %), який обчислювали за формулою:

$$ІЦ = \frac{ОГ(контролю АсD) - ОГ(зразка)}{ОГ(контролю АсD)} \times 100,$$

де ОГ (контролю АсD) – середнє арифметичне оптичної густини в лунках з контролем АсD; ОГ (зразка) – середнє арифметичне оптичної густини в лунках із одним досліджуваним зразком [12].

Всі отримані цифрові дані опрацьовували за допомогою комп'ютерної програми Ері Info (версія 6.0) методом варіаційної статистики з використанням критерію Стюдента. З метою оцінки окремих показників використовували їх середнє арифметичне значення  $\pm$  похибка середнього (M $\pm$ m) [13].

## 3. Результати і обговорення

*Coriolus versicolor* (L. ex Fr.) Quél, який належить до дереворуйнівних грибів білої гнилі, має досить тривалу історію використання у Східній медицині. Наприклад, у Китаї препарати на основі цього гриба застосовують в терапії інфекційних хвороб, зокрема при інфекційно-запальних процесах верхніх дихальних шляхів, сечостатевої системи і травного каналу, а також для оздоровлення печінки (в т.ч. при гепатитах В) та для корекції показників імунореактивності організму. Цей гриб добре адаптований до різних температурних умов. Зустрічається в тропічних, субтропічних і високотемпературних кліматичних широтах, росте на відмерлих стовбурах, пнях та гілках листяних та, рідше, хвойних дерев [8, 14].

В наших попередніх дослідженнях було показано [15], що біологічно активні речовини біомаси базидіального гриба штаму *C. versicolor* 353 стимулювали здатність макрофагів до накопичення реактогенних метаболітів кисню *in vitro*, що свідчить про можливість індукції неспецифічної імунної відповіді цим препаратом в системі *in vivo*.

Показано, що після введення інтактним мишам препарату біомаси базидіального гриба *C. versicolor* 353 підвищувалась функціональна активність МФПЕ, зокрема їх киснезалежна бактерицидність, що підтверджувалось суттєвим зростанням кількості НСТ-позитивних клітин у спонтанному НСТ-те-

сті. Так, під впливом цього препарату встановлено активацію киснезалежної бактерицидної активності МФПЕ на 3, 6 і 9 добу (табл. 1). Показники стимульованого НСТ-тесту МФПЕ зростали порівняно з контролем на 3, 6 і 9 добу, однак їх функціональний резерв (ФР) зберігався на рівні контролю.

**Таблиця 1**

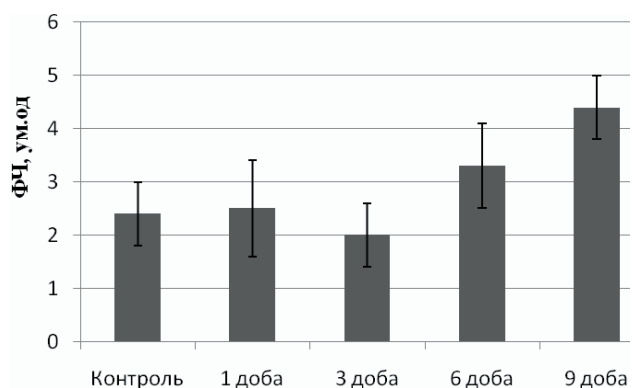
**Функціональна активність макрофагів перитонеального ексудату мишей, які отримували препарат біомаси базидіального гриба *C. versicolor* 353, M ± m**

Групи мишей	Термін спостереження	Показники функціональної активності			
		ПФ, %	НСТ-тест спон., %	НСТ-тест стим., %	ФР, %
Контроль	-	24,6 ± 8,6	25,6 ± 3,1	24,3 ± 1,8	4,8 ± 1,8
Миші, які отримували препарат	1 доба	41,3 ± 2,1*	17,7 ± 3,1	27,8 ± 6,1	6,7 ± 2,0
	3 доба	43,1 ± 3,2*	64,0 ± 2,9*	65,0 ± 6,3*	3,9 ± 0,9
	6 доба	45,8 ± 4,0*	60,0 ± 3,8*	74,0 ± 3,9*	7,9 ± 1,1
	9 доба	50,7 ± 2,9*	58,0 ± 2,9*	61,0 ± 1,1*	3,9 ± 0,8

Примітка. \*P < 0,05 порівняно з показниками контролю

Із даних, наведених у табл. 1, випливає, що препарат біомаси *C.versicolor* 353 мав активуючий вплив на поглинальну активність МФПЕ. Після введення мишам цього препарату спостерігалось підвищення ПФ на 1, 3, 6 та 9 добу. ФЧ МФПЕ мишей (рис. 1), які отримували препарат біомаси *C. versicolor* 353, становило 2,5 ± 0,1; 2,0 ± 0,9; 3,3 ± 0,8 та 4,4 ± 0,9 ум.од. відповідно на 1, 3, 6 та 9 добу проти 2,4 ± 0,7 ум.од. у контролі (P > 0,05).

Отже, під впливом препарату біомаси *C. versicolor* 353 активація поглинальної активності МФПЕ була частковою: упродовж усього терміну спостереження зростав ПФ на тлі незмінного ФЧ.



**Рис. 1.** Фагоцитарне число макрофагів черевної порожнини мишей, які отримували препарату біомаси *C. versicolor* 353

Результати проведених нами досліджень показали, що введення мишам препарату біомаси *C.versicolor* 353 призводило до активації ендогенного інтерферогенезу (табл. 2). Суттєве накопичення інтерферону у сироватці крові під впливом цього препарату спостерігали уже через 3 доби.

Високий рівень сироваткового інтерферону зберігався і на 6 добу. Водночас на 9 добу після введення

мишам препарату титри інтерферону зменшувались до рівня контролю.

Водночас встановлено, що препарат біомаси *C. versicolor* 353 in vivo не впливав на продукцію ФНП-α. Так, після введення мишам цього препарату концентрація ФНП-α у сироватці крові на 1, 3, 6 і 9 добу не змінювалась відносно показників контролю.

Таким чином, препарат біомаси *C.versicolor* 353 на експериментальній моделі інтактних мишей мав імуномодулювальний вплив. Після перорального введення цього препарату мишам протягом 9 діб підвищувалась функціональна активність клітин фагоцитарної системи та продукція ендогенного інтерферону.

Разом з тим цей препарат не впливав на продукцію потужного прозапального цитокіну – ФНП-α, що свідчить про відсутність розвитку запальної реакції організму. Препарат біомаси *C.versicolor* 353 є перспективним для створення препарату із імуномодулювальною дією, але потрібні додаткові дослідження його впливу на інші показники імунореактивності організму, зокрема на продукцію імунорегуляторних цитокінів різних опозиційних груп, як на моделі інтактних тварин, так і при різних патологічних станах.

**Таблиця 2**

**Продукція інтерферону та фактора некрозу пухлин-α після введення мишам препарату біомаси *C. versicolor* 353**

Групи мишей	Термін спостереження	Титри інтерферону, log <sub>2</sub> , Од/мл	Концентрація ФНП, ІЦТ (%)
Контроль	-	5,0 ± 0,8	2,9 ± 0,7
Миші, які отримували препарат	1 доба	5,1 ± 0,9	1,9 ± 0,8
	3 доба	8,0 ± 0,1*	2,3 ± 0,3
	6 доба	8,2 ± 0,1*	4,3 ± 1,8
	9 доба	5,2 ± 0,3	2,7 ± 0,9

Примітка. \*P < 0,05 порівняно з показниками контролю

### Висновки

1. Препарат біомаси *C.versicolor* 353 в дозі 50 мкг/мишу при пероральному введенні інтактним мишам протягом 9 діб щодоби активував клітин фагоцитарної системи: спостерігалось підвищення здатності макрофагів черевної порожнини до накопичення реактогенних метаболітів кисню в НСТ-тесті на 3, 6 та 9 добу, а також часткова активація їх поглинальної функції протягом усього терміну спостереження (зростав ПФ на тлі незмінного ФЧ).

2. Препарат біомаси *C. versicolor* 353 in vivo ефективно індукував продукцію «пізнього» інтерферону, про що свідчило підвищення титрів інтерферону в сироватці крові на 3 та 6 добу.

3. Препарат біомаси *C. versicolor* 353 in vivo не впливав на продукцію потужного прозапального цитокіну – ФНП-α: концентрація цього цитокіну у сироватці крові не змінювалась упродовж усього періоду спостереження.

4. Препарат біомаси *C. versicolor* 353 є перспективним для створення препарату із імуномодулювальною дією для корекції функціональної активності клітин фагоцитарної системи та продукції інтерферону.

## Література

1. Смирнов, Д. А. Влияние полисахаридов глубинных культур *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Crinipellis schevcepkovi* на фагоцитарную активность нейтрофилов [Текст] / Д. А. Смирнов, В. Г. Бабицкая, Т. А. Пучкова, В. В. Щерба // Биотехнология. – 2007. – № 1. – С. 47–51.
2. Караваева, А. В. Грибные гликаны как иммуномодуляторы и перспективы их практического использования [Текст] / А. В. Караваева, М. А. Кашкина // Микология и фитопатология. – 1994. – Т.28. – Вып.6. – С.76–84.
3. Бухало, А. С. Лекарственные препараты и пищевые добавки из макромицетов [Текст] / А. С. Бухало, Э. Ф. Соломко, С. П. Вассер, О. Б. Михайлова // Успехи медицинской микологии: материалы 3-го Всероссийского конгресса (Москва, апрель 2005 г.). – М., 2005. – Т. V, Глава 7. – С.254–256.
4. Скворцова, М. М. Трәмелан: опыт клинического применения [Текст] / М. М. Скворцова, Е. С. Горшина // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2009. – № 2. – С. 211–212.
5. Горшина, Е. С. Глубинное культивирование грибов рода *Trametes* Fr. с целью получения биологически активной биомассы: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.23, 03.00.24 [Текст] / Е. С. Горшина. – М., 2003. – 250 с.
6. Антоненко, Л. А. Особливості росту *Coriolus versicolor* у глибинній культурі // Л. О. Антоненко, І. Р. Клечак, Н. Ю. Митропольська, О. І. Нишпорська // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2009. – №1 (63). – С.128–133.
7. Антоненко, Л. А. Грибы рода *Coriolus* Quel (*Trametes* Fr.) – продуценты биологически активных веществ [Текст] / Л. А. Антоненко, И. Р. Клечак, В. Н. Кучма, Ю. С. Крысюк // материалы международной научной конференции: «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии» (Минск, 31 мая – 4 июня 2010). – Минск, 2010. – С. 96–99.
8. Hobbs, Ch. Medicinal value of Turkey Tail fungus *Trametes versicolor* (L.: Fr.) Pilat (*Aphyllorphomycetidae*). A literature review // *Int. J. Med. Mushr.* - 2004. – Vol. 6. – P. 195–218.
9. Vincent, E. C. Ooi A review of pharmacological activities of mushroom polysaccharides / Vincent, E. C. Ooi, Fang Liu // *Int. J. Med. Mushr.* – 1999. – Vol. 1. – P. 195–206.
10. Даниляк, М. І. Лікарські гриби. Медичне застосування та проблеми біотехнології [Текст] / М. І. Даниляк, С. В. Решетников. – К.: Ін-т ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, 1996. – 65с.
11. Резніков, О. Г. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах [Текст] / О. Г. Резніков // Вісник НАНУ. – 2001. – № 11. – С. 5–7.
12. Современные методы диагностики вирусных респираторных инфекций и их терапии с использованием препаратов интерферона (Методические рекомендации) [Текст] / Под. ред. А. Ф. Модзольского, Н. С. Дяченко, Н. Я. Спивака. – К., 1994. – 18 с.
13. Pagano, M. Regulation of the cell cycle by the cdk2 protein kinase in cultured human fibroblasts / Pagano M., Pepperkok R., Lukas J., Baldin V., Ansorge W., Bartek J. and Draetta G. // *J. Cell Biol.* – 1993. – 121. – PP. 101–111.
14. Stamets, P. Growing gourmet and medicinal mushroom / Stamets P. – Berkeley Toronto: Ten Speed Press, 2000. – 574 p.
15. Антоненко, Л. А. Иммуномодулирующие свойства биомассы базидиальных грибов рода *Coriolus* (*Trametes*) [Текст] / Л. А. Антоненко, И. Р. Клечак, Л. Н. Лазаренко // материалы международной научной конференции «Микробиологическая биотехнология – наукоёмкое направление современных знаний» (Кишинев, Молдова, 6–8 июля 2011 г.). – Кишинев, 2011. – С.129.