

ІМУНОМОДУЛЮВАЛЬНІ І ПРОТИВІРУСНІ ВЛАСТИВОСТІ БАЗИДІАЛЬНОГО ГРИБА *TRAMETES VERSICOLOR*

Результати сучасних досліджень підтверджують значний профілактичний і терапевтичний ефект вищих базидіальних грибів [1–4]. Імуномодулювальні властивості вже доведено для полісахаридів базидіального гриба *Trametes (Coriolus) versicolor*, на основі яких створено комерційні препарати PSK і PSP [2], що широко використовуються в онкології при лікуванні раку шлунку, стравоходу, прямої кишки, яєчників, матки, простати в поєднанні з хіміо- або радіо-терапією.

Функціональні препарати, на основі міцелію вищих базидіальних грибів, що містять природні біологічно активні комплекси, сьогодні знайшли застосування у дієтичному харчуванні. Слід зазначити, що структура макромолекул біологічно активних препаратів, одержаних із біологічного джерела, дуже залежить від особливостей технологічного процесу виробництва і змінюється при найменшій його модифікації, оскільки біологічним системам, що застосовуються в ньому властива висока варіабельність. Вирішальне значення мають біологічні властивості штаму-продуцента, склад живильного середовища, умови культивування, повнота очищення готового продукту тощо. При вивченні безпечності такого біотехнологічного продукту як потенційного лікарського засобу, особлива увага приділяється його імуногенності [5, 6]. Імунна система організму пацієнта реагує на найменші зміни білка діючої речовини препарату та на наявність домішок. Клінічно це може проявлятися розвитком та генералізацією імунопатологічних процесів в організмі пацієнтів: алергічними реакціями, зниженням або втратою терапевтичної активності препарату, аутоімунними реакціями тощо.

Нами розроблена біотехнологія глибинного культивування міцелію *T. versicolor* з використанням штама-продуцента з колекції чистих культур шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України [7]. Проте іму-

нологічні і противірусні властивості такого біотехнологічного продукту раніше не досліджувались.

Мета роботи полягала у визначенні цитотоксичної та противірусної дії культуральної рідини вищого базидіального гриба *Trametes versicolor* 353 в перещеплювальній культурі клітин НЕР-2 та вивченні впливу біомаси *T. versicolor* 353 на показники імунореактивності організму на експериментальній моделі *in vivo*.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був вищий базидіальний гриб *Trametes versicolor* 353 з колекції шапинкових грибів Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Штам *T. versicolor* 353 культивували на комплексному середовищі та молочній сироватці (ТУ 46.39 України 11-93). До складу комплексного середовища входили (г/дм³): глюкоза – 20; дріжджовий екстракт – 3,0; пептон – 3,0; K₂HPO₄ – 1,0; KH₂PO₄ – 1,0; MgSO₄ – 0,25; пивне сусло – 20 см³/дм³. рН середовища – 5,0. Штам-продуцент культивували при перемішуванні зі швидкістю 120 об/хв протягом 4 діб при температурі 30 ± 1 °С. Зразки культуральної рідини деконтамінували фільтруванням через шприцеві фільтри з діаметром пор 0,22 мкм та стандартизували за рН (7,2–7,4) і вмістом білка від 20 до 26 мг/см³. Одержані розчини аліквотували по 1,00 см³ і зберігали при – 40 °С до початку досліджень.

Дослідження параметрів цитотоксичної дії (CD₅₀ і МПК) зразків культуральних рідин базидіального гриба *T. versicolor* 353 проводили у повній відповідності до [8, 9]. У роботі використовували перещеплювальну клітинну лінію аденокарциноми гортані людини (НЕР-2) штам *Cincinnati*, одержаний із Банку клітинних ліній з тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького (ІЕПОР) НАН України (м. Київ).

Наявність або відсутність цитотоксичного ефекту в оброблених клітинних культурах визначали при мікроскопічному дослідженні під інвертованим мікроскопом через 24, 48 і 72 год після нанесення зразків. Розраховували концентрації зразків культуральних рідин в (мг/см³) в перерахунку на білок, що відповідали їх CD_{50} і МПК [8, 9].

Противірусну дію зразків культуральних рідин досліджували відносно до вірусу герпесу людини першого антигенного типу (ВПГ-1) штаму УС та вірусу везикулярного стоматиту (ВВС) штаму Індіана, з колекції патогенних штамів вірусів людини кафедри вірусології НМАПО. Перед початком досліджень зазначені віруси попередньо адаптували до клітинної лінії НЕР-2 та визначали їх інфекційну активність. Противірусну дію зразків культуральних рідин в нетоксичних для клітин концентраціях (1 МПК) в культурі клітин НЕР-2 досліджували в профілактичному і лікувальному режимах [8]. Ефективність противірусної дії препаратів при кожному режимі застосування оцінювали в паралельних дослідженнях за наявністю або відсутністю цитопатичної дії зазначених вірусів на моношар клітин. Облік результатів проводили за методом Кербера [8, 9]. Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) зразків культуральних рідин і їх хіміотерапевтичний індекс (ХТІ) визначали і розраховували відповідно до методичних рекомендацій [8].

Визначення імуномодулювальних властивостей ліофілізованих зразків біомаси базидіального гриба *Trametes versicolor* 353 проводили на мишах лінії BALB/c (18–20 г), самиць віком 6–8 тижнів. Усі дослідження проводились із урахуванням норм Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей від 20.09.1985 р. та закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [10].

Мишам перорально вводили суспензію препарату біомаси базидіального гриба *T. 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 [11]. Визначали кількість НСТ-позитивних макрофагів у спонтанному та стимульованому НСТ-тестах, розраховували функціональний резерв (ФР) МФПЕ. Поглинальну активність оцінювали за показником фагоцитозу (ПФ) та фагоцитарним числом (ФЧ).

У сироватці крові визначали концентрацію інтерферону та фактора некрозу пухлин- β (ФНП- α). Сироватку зберігали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ не більше 2 місяців. 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 ТЦД₅₀/0,1 см³ ВВС. При кожному окремому титруванні зразків використовували пробу референс-інтерферону (міжнародний стандарт В 69/19) з відомою активністю [11].

Вміст ФНП- α у сироватці крові досліджували загальноприйнятим методом за цитотоксичною дією на перещеплювальній культурі фібробластів мишей L-929. Кількість ФНП- α у сироватці крові визначали за індексом цитотоксичності (ІЦ, %) [11].

Всі отримані цифрові дані опрацьовували за допомогою комп'ютерної програми Epi Info (версія 6.0) методом варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

За результатами аналізу розрахованих середніх цитотоксичних доз зразків культуральних рідин базидіального гриба *T. versicolor* 353 показано, що цитотоксична дія зразків залежить від тривалості впливу зразка на клітинний моношар (табл. 1).

Найменша цитотоксична дія зразків спостерігалась при експозиції впродовж 24 год, а найбільша – 72 год і більше не змінювалась при подальшій експозиції впродовж 96 годин.

Склад поживного середовища мав вирішальне значення в цитотоксичній дії зразків. Так, найменшу цитотоксичну дію в перещеплювальній культурі клітин НЕР-2 виявив зразок культуральної рідини штаму *T.versicolor* 353, при культиву-

Параметри цитотоксичності зразків культуральних рідин базидіального гриба *T. versicolor* 353, отриманих при культивуванні на різних середовищах

Склад поживних середовищ	CD ₅₀ , мг/см ³			МПК, мг/см ³		
	термін спостереження, год					
	24	48	72	24	48	72
Молочна сироватка	3,21±0,16	1,13±0,05	0,56±0,02	1,60±0,06	0,56±0,03	0,28±0,01
Комплексне середовище	7,21±0,35	2,55±0,12	1,80±0,09	3,60±0,18	1,27±0,05	0,90±0,02

ванні на комплексному середовищі (CD₅₀ складало 7,21 ± 0,25 мг/см³), який був майже у 2,2 менш токсичний, ніж зразок, отриманий при культивуванні на молочній сироватці (CD₅₀ складало 3,21 ± 0,16 мг/см³).

Показано, що подовження тривалості експозиції від 24 год до 48 і 72 год суттєво підвищувало цитотоксичну дію досліджуваних зразків культуральних рідин в культурі клітин. Так, для найменш токсичного зразка – культуральної рідини штаму *T. versicolor* 353, вирощеного на комплексному середовищі, – при збільшенні тривалості експозиції з 24 до 72 год, CD₅₀ зростало у 4 рази. Проте всі досліджені зразки культуральних рідин при 72-годинній експозиції проявляють відносно низьку токсичність у культурі клітин (CD₅₀ складало 1,80 і 0,56 мг/см³, для зразка з комплексного середовища і молочної сироватки, відповідно) і можуть бути віднесені до групи малотоксичних сполук природного походження.

При проведенні аналогічних досліджень в присутності сироватки крові ембріонів корів (до 5 %) у середовищі інкубування клітинного моношару у всіх досліджених зразках культуральних рідин не було виявлено цитотоксичної дії на моношар культури клітин НЕР-2 у жодному випадку. Тобто, сироватка крові повністю інгібувала цитотоксичну дію зразків культуральних рідин, а токсичні компоненти зразків зв'язувались білками сироватки крові.

Встановлено, що зразки культуральних рідин *T. versicolor* 353, при культивуванні на молочній сироватці і комплексному середовищі, в концентрації, що дорівнює 1 МПК при експозиції 72 год повністю інгібували репродукцію 1 ТЦД₅₀ ВПГ-1 і 1 ТЦД₅₀ ВВС при внесенні зразків на клітинні моношари в лікувальному режимі. В той же час всі зразки не проявляли антивірусної дії відносно до ВПГ-1 і ВВС в культурі клітин НЕР-2 в профілактичному режимі.

Для культуральної рідини штаму *T. versicolor* 353, при культивуванні на комплексному середовищі, МІК і ХТІ відносно до ВПГ-1 штаму УС і до ВВС штаму Індіана були в межах варіювання середнього арифметичного і складали відповідно 0,31 ± 0,05 мг/см³ і 2,82 ± 0,19. МІК культуральної рідини штаму *T. versicolor* 353, при культивуванні на молочній сироватці, відносно до ВВС штаму Індіана складав 0,20 ± 0,03 мг/см³, відносно до ВПГ-1 штаму УС – 0,10 ± 0,04 мг/см³. ХТІ цього зразка відносно до ВПГ-1 штаму УС і ВВС штаму Індіана складав 2,82 ± 0,19 і 1,41 ± 0,07 відповідно.

Аналіз показників ХТІ (менше за 4) зразків культуральної рідини *T. versicolor* 353 дав змогу встановити, що зразки не мали вірусінгібуючої дії відносно до ВПГ-1 та ВВС, оскільки визначені на цих моделях вірусів значення МІК тільки у 2–3 рази менші від МПК. Проте було висловлено припущення, що біомаса базидіального гриба *T. versicolor* 353 може розглядатись як коіндуктор ендogenousного інтерферону в організмі тварин і людини.

Високомолекулярні сполуки, як правило, діючи як ад'юванти, підсилюють імунну відповідь, покращуючи найчастіше презентацію вірусних антигенів клітинам імунної системи; а грибні полісахариди, стимулюючи продукцію ендogenousного інтерферону впливають на специфічну імунну відповідь.

У зв'язку з цим наступним етапом досліджень було вивчення імуномодулювальних властивостей *in vivo* ліофілізованої біомаси базидіального гриба *T. versicolor* 353, вирощеного на комплексному середовищі. Показано, що після введення інтактним мишам суспензії біомаси базидіального гриба *T. versicolor* 353 підвищувалась функціональна активність МФПЕ мишей. Так, під впливом суспензії біомаси встановлено активацію киснезалежної бактерицидної активності МФПЕ на 3, 6 і 9 добу (табл. 2), що

Таблиця 2

Функціональна активність макрофагів перитонеального ексудату мишей, які отримували суспензію біомаси базидіального гриба *T. versicolor* 353, $M \pm m$

Групи мишей	Термін спостереження	Показники функціональної активності				
		ПФ, %	ФЧ, ум.од.	НСТ-тест спонт., %	НСТ-тест стимул., %	ФР, %
Контроль	–	24,6 ± 2,6	2,4 ± 0,6	20,6 ± 3,1	24,3 ± 1,8	3,7 ± 1,8
Миші, які отримували суспензію біомаси	1 доба	41,3 ± 2,1*	2,5 ± 0,1	21,1 ± 3,1	27,8 ± 6,1	6,7 ± 2,0
	3 доба	43,1 ± 3,2*	2,0 ± 0,9	61,1 ± 2,9*	65,0 ± 6,3*	3,9 ± 0,9
	6 доба	45,8 ± 4,0*	3,3 ± 0,8	66,1 ± 3,8*	74,0 ± 3,9*	7,9 ± 1,1
	9 доба	50,7 ± 2,9*	4,4 ± 0,9	58,0 ± 2,9*	61,0 ± 1,1*	3,0 ± 0,8

Примітки: * $p < 0,05$ порівняно з показниками контролю; ПФ – показник фагоцитозу; ФР – функціональний резерв; ФЧ – фагоцитарне число.

Таблиця 3

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

Групи мишей	Термін спостереження	Титри інтерферону, \log_{10} , Од/см ³	Концентрація ФНП- α , ІЦ (%)
Контроль	–	5,0 ± 0,8	2,9 ± 0,7
Миші, які отримували суспензію біомаси	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.

підтверджувалось суттєвим зростанням кількості НСТ-позитивних клітин у спонтанному НСТ-тесті.

Показники стимульованого НСТ-тесту МФПЕ також зростали порівняно з контролем на 3, 6 і 9 добу, однак їх функціональний резерв (ФР) зберігався на рівні контролю.

Препарат біомаси *T. versicolor* 353 мав активуючий вплив на поглинальну активність МФПЕ (табл. 2). Після введення мишам суспензії біомаси спостерігалось підвищення ПФ на 1, 3, 6 та 9 добу. Фагоцитарне число МФПЕ мишей, які отримували суспензію біомаси *T. versicolor* 353, і контрольної групи статистично не відрізнялось. Отже, активація поглинальної активності МФПЕ під впливом суспензії біомаси *T. versicolor* 353 була частковою: упродовж усього терміну спостереження зростав ПФ на тлі незмінного ФЧ.

Результати проведених нами досліджень показали, що введення мишам суспензії біомаси *T. versicolor* 353 призводило до активації ендогенного інтерфероногенезу (табл. 3). Суттєве накопичення інтерферону у сироватці крові під впливом суспензії біомаси спостерігали вже через 3 доби. Високий рівень сироваткового інтерферону зберігався і на 6 добу, проте вже на 9 добу – зменшувався до рівня контролю.

Водночас встановлено, що суспензія біомаси *T. versicolor* 353 *in vivo* не впливала на продукцію ФНП- α . Так, після введення мишам суспензії

біомаси концентрація ФНП- α у сироватці крові на 1, 3, 6 і 9 добу не змінювалась відносно показників контролю (ІЦ 2,9 ± 0,7 %), що свідчить про відсутність розвитку запальної реакції організму.

Висновки

1. Встановлено, що цитотоксична дія всіх зразків культуральної рідини базидіального гриба *T. versicolor* 353 залежить від тривалості впливу на клітинний моношар. Найменшою цитотоксична дія була при експозиції впродовж 24 год для зразка культуральної рідини штаму *T. versicolor* 353 (CD_{50} складало 7,21 ± 0,35 мг/см³), вирощеного на комплексному середовищі, а при додаванні в середовище інкубування клітинних моношарів сироватки крові ембріонів корів (до 5 %) цитотоксична дія зразків культуральної рідини *T. versicolor* 353 повністю інгібувалась.

2. Показано, що зразки культуральної рідини *T. versicolor* 353 проявляють тенденцію до противірусної дії відносно до ДНК-геномного вірусу ВПГ-1 і до РНК-геномного вірусу ВВС, інгібуючи репродукцію зазначених вірусів на 1 Іг ТЦД₅₀ при нанесенні їх на клітинні моношари у лікувальному режимі, проте за показниками ХТІ (менше за 4) досліджені зразки культуральної рідини не мали безпосередньої вірусінгібуючої дії відносно до цих вірусів.

3. Встановлено, що суспензія біомаси штаму *T. versicolor* 353, вирощеного на комплексному середовищі, після перорального щоденно-

го введення мишам протягом 9 діб у дозі 50 мкг/мишу підвищувала функціональну активність клітин фагоцитарної системи та продукцію ендogenous інтерферону, проте не впливала на продукцію прогизапального цитокіну – ФНП-а.

4. Отримані нами дані свідчать, що біомаса *T. versicolor* 353 є перспективною сировиною для

створення препарату із імуномодульовальною 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.

ЛІТЕРАТУРА

1. Биологические свойства лекарственных макромицетов в культуре. Сборник научных трудов в двух томах / Под ред. чл.-кор. НАН Украины С.П. Вассера. – К., 2012. – 2.– 459 с.
2. Maehara Y., Tsujitani S., Saeki H. Biological mechanism and clinical effect of protein-bound polysaccharide K (Krestin): review of development and future perspectives // *Surgery Today*. – 2012. – 42, N 1. – P. 8–28.
3. Krupodorova T., Rybalko S., Barshteyn V. Antiviral activity of Basidiomycetes mycelia against influenza type A (serotype H1N1) and herpes simplex virus type 2 in cell culture // *Virologica sinica*. – 2014. – 29, N 5. – P. 284–290.
4. Teplyakova T.V., Psurtseva N.V., Kosogova T.A., Mazurkova N.A., Khanin V.A., Vlasenko V.A. Antiviral activity of polyporoid mushrooms (Higher Basidiomycetes) from Altai Mountains (Russia) // *Intern. J. Med. Mush.* – 2012. – 14, N 1. – P. 37–45.
5. Ebbers H., Crow S., Vulto A., Schellekens H. Interchangeability, immunogenicity and biosimilars // *Nat. Biotechnol.* – 2012. – 30. – P. 1186–1190.
6. Shellecens H. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins // *Nephrol. Dial. Transplant.* – 2005. – 20, Suppl. 6. – P. 3–9.
7. Антоненко Л.А., Клечак І.Р., Митропольська Н.Ю., Нишпорська О.І. Особливості росту *Coriolus versicolor* у глибинній культурі // *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. – 2009. – № 1 (63). – С. 128–133.
8. Щербінська А.М., Дяченко Н.С., Рибалко С.Л., Носач Л.М., Дядюн С.Т., Вринчану Н.О. Вивчення антивірусної дії потенційних лікарських засобів : методичні вказівки. – К., 2000. – 40 с.
9. Основи клітинної технології у біології та медицині: метод. вказівки до викон. лаборатор. робіт для студ. спец. 7.05140101 «Промислова біотехнологія» / Уклад. : О.П. Трохименко, Л.О. Антоненко, С.О. Соловійов та ін. – К.: НТУУ «КПІ». – 2011. – 48 с.
10. Резніков О.Г. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // *Вісник НАНУ*. – 2001. – № 11. – С. 5–7.
11. Современные методы диагностики вирусных респираторных инфекций и их терапии с использованием препаратов интерферона (Методические рекомендации) / Под. ред. А.Ф. Модзольского, Н.С. Дяченко, Н.Я. Спивака. – К., 1994. – 18 с.

ТИТОВА Л.О.¹, КЛЕЧАК І.Р.¹, ТРОХИМЕНКО О.Р.², ЛАЗАРЕНКО Л.М.³, ДУГАН О.М.¹

¹ National Technical University of Ukraine «Kyiv Polytechnic Institute», Ukraine, 03056, Kyiv-56, Prospect Peremohy, 37, e-mail: lora.a@bigmir.net

² Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Ukraine, 04112, Kyiv, Dorohozhytska str., 9

³ D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NASU, Ukraine, D03680, Kyiv, GSP, Akademika Zabolotny str., 154

IMMUNOMODULATING AND ANTIVIRAL ACTIVITIES BASIDIOMYCETES *TRAMETES VERSICOLOR*

Aims. The aim of current work was to assess the cytotoxicity and antiviral activity of culture broth from higher basidiomycetes *Trametes versicolor* 353 in culture cell HEP-2 and to investigate the effect of biomass *T. versicolor* 353 on the immunoreactivity indicators on experimental model *in vivo*. **Methods.** The cytotoxicity and antiviral properties of culture broth of *T. versicolor* 353 studied using standard methods in cell culture. Functional activity of peritoneal exudate macrophages was determined spectrophotometric method. The content of TNF- α in serum was determined by standard procedure for cytotoxic effects on cell culture L-929. **Results.** It was established that the cytotoxic effect of all the samples of the culture broth depends on the composition medium and the duration of their effects on cell monolayer. It was shown that that samples no possess direct antiviral activity against investigated the viruses. Introduction mice the suspension of biomass *T. versicolor* 353 led to activation of endogenous interferon and not affected the production of proinflammatory cytokines. **Conclusions.** The biomass of *T. versicolor* 353 may be a promising material for the creation products with immunomodulating activities.

Keywords: immunomodulating, antiviral activity, *Trametes versicolor*, low cytotoxicity, endogenous interferon.