

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ
№ 101556

СПОСІБ ОЦІНКИ ВПЛИВУ РІЗНИХ ДОЗ БІОМАСИ ГРИБА
GANODERMA LUCIDUM НА ГУМОРАЛЬНУ ІМУННУ
ВІДПОВІДЬ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 25.09.2015.

Голова Державної служби
інтелектуальної власності України

 Г. Г. Карінова



(11) 101556

Пронумеровано, прошито металевими
люверсами та скріплено печаткою
2 арк.
25.09.2015



Уповноважена особа

(підпис)

(19) UA

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

G06M 11/02 (2006.01)

A61K 36/074 (2006.01)

(21) Номер заявки: u 2015 01111

(22) Дата подання заявки: 11.02.2015

(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.09.2015

(46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: 25.09.2015, Бюл. № 18

(72) Винахідники:

Підченко Віталій Тарасович,
UA,

Ніженковська Ірина

Володимирівна, UA,

Бісько Ніна Анатоліївна, UA,

Бичкова Ніна Григоріївна,

UA,

Родніченко Анжела

Євгеніївна, UA

(73) Власник:

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О.

БОГОМОЛЬЦЯ,

бул. Шевченка, 13, м. Київ-4,

01601, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ОЦІНКИ ВПЛИВУ РІЗНИХ ДОЗ БІОМАСИ ГРИБА GANODERMA LUCIDUM НА ГУМОРАЛЬНУ ІМУННУ ВІДПОВІДЬ

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб оцінки впливу різних доз біомаси гриба Ganoderma Lucidum на гуморальну імунну відповідь, що включає дослідження крові, який відрізняється тим, що додатково визначають титр гемолізину та гемаглютиніну в сироватці крові, кількість антитілоутворюючих клітин в селезінці до і після лікування, розраховують співвідношення їх по відношенню до контролю і при зміні показників оцінюють гуморальну імунну відповідь до біомаси гриба Ganoderma Lucidum.



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101556** (13) **U**
(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

G06M 11/02 (2006.01)

A61K 36/074 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 01111**
(22) Дата подання заявки: **11.02.2015**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.09.2015**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.09.2015, Бюл.№ 18**

(72) Винахідник(и):
**Підченко Віталій Тарасович (UA),
Ніженковська Ірина Володимирівна (UA),
Бісько Ніна Анатоліївна (UA),
Бичкова Ніна Григоріївна (UA),
Родніченко Анжела Євгеніївна (UA)**
(73) Власник(и):
**НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ,
бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA)**

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ВПЛИВУ РІЗНИХ ДОЗ БІОМАСИ ГРИБА GANODERMA LUCIDUM НА ГУМОРАЛЬНУ ІМУННУ ВІДПОВІДЬ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки впливу різних доз біомаси гриба Ganoderma Lucidum на гуморальну імунну відповідь включає дослідження крові. В якому додатково визначають титр гемолізину та гемаглютиніну в сироватці крові, кількість антитілоутворюючих клітин в селезінці до і після лікування, розраховують співвідношення їх по відношенню до контролю і при зміні показників оцінюють гуморальну імунну відповідь до біомаси гриба Ganoderma Lucidum.

UA 101556 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме до фармакотерапії, і може бути використана для оцінки впливу різних доз біомаси гриба *GANODERMA LUCIDUM* на гуморальну імунну відповідь.

5 Пошук та розробка імуномодуляторів рослинного походження з метою застосування їх у комплексній терапії хворих з різною соматичною патологією, інфікованих вірусними, бактеріальними, грибковими та атипovими збудниками є актуальною проблемою. Увагу дослідників багатьох країн світу привертають до себе природні об'єкти, зокрема їстівні гриби, які використовуються не тільки як продукти харчування, але і як цінна сировину для одержання речовин лікувально-профілактичної і лікувальної дії. Більшість традиційних знань про лікувальні властивості грибів походить з Далекого Сходу, де здавна вирощуються, культивуються та використовуються такі базидіальні гриби, як *Ganodermalucidum* (трутовик лакований), *Lentinusedodes* (шиїтаке), *Coriolusversicolor* (трутовик різнокольоровий) та ін. [1].

Один з найвідоміших базидіальних грибів - *Ganodermalucidum* (трутовик лакований). Дослідження *Ganodermalucidum* останніх років призвели до виділення з нього біологічно-активних речовин, що мають імуномодулюючі, протипухлинні, протівірусні, антибіотичні, гепатопротекторні, антиоксидантні, гіполіпідемічні, гіпоглікемічні, генопротекторні властивості, здатні регулювати роботу серцево-судинної, дихальної та нервової системи [2]. Більшість з перерахованих вище біологічних ефектів, в тому числі і протипухлинна дія, обумовлена імуномодулюючими властивостями гриба. Не дивлячись на те, що загальна кількість публікацій, присвячених *Ganodermalucidum*, значна, відчувається дефіцит досліджень найбільш перспективних для практичного використання штамів гриба. З огляду на роль профілактичного напрямку в охороні здоров'я населення України, проблема розробки біологічно-активних продуктів на основі рослинної сировини з адаптогенними та імуностимулюючими властивостями є надзвичайно актуальною. Не менш важливим аспектом проблеми є пошук та розробка імуномодуляторів з метою застосування їх у комплексній терапії хворих з різною соматичною патологією, інфікованих вірусними, грибковими та атипovими збудниками.

В численних дослідях *in vitro* та *in vivo* було показано, що водні екстракти плодovих тіл, спор і міцелію *G. Lucidum* та виділені з них полісахаридні фракції та індивідуальні полісахариди, а також деякі тритерпени і білок LZ-8, мають виражені імуномодулюючі властивості. Характер дії біологічно-активних речовин *G. Lucidum* на імунну систему різноманітний та включає в себе вплив на функції гуморального та клітинного імунітету. Найбільш важливими біологічно активними речовинами, що проявляють імуномодулюючу активність є полісахариди, зокрема β -D-глюкани.

Незважаючи на велику кількість досліджень по вивченню впливу окремих біологічно-активних речовин, виділених з міцелію, плодovого тіла, спор гриба *Ganodermalucidum* на стан імунітету, цікавим залишається вивчення можливості застосування міцелію гриба *Ganodermalucidum* для корекції імунодефіцитних станів.

Для визначення наявності або відсутності імунотоксичної дії дослідного лікарського засобу застосовують методи дослідження, які дозволять оцінити вплив досліджуваного препарату на: В-клітинний імунітет (гуморальна відповідь); Т-клітинний імунітет (клітинні реакції); фактори неспецифічного імунітету та активність факторів, що беруть участь у специфічному імунітеті.

Найближчим аналогом до способу, що заявляється, є спосіб використання димедролу, що має імунотоксичні властивості [3]. Однак, цей спосіб не дозволяє прогнозувати вплив різних доз біомаси гриба *GANODERMA LUCIDUM* на гуморальну імунну відповідь.

45 Для вивчення гуморальної імунної відповіді дослідного лікарського засобу застосовують методи дослідження, які дозволяють оцінити функціональний стан різних ланок системи імунітету.

В основу корисної моделі поставлена задача вивчення характеру дії (імуносупресорна, імуностимулююча) біомаса гриба *Ganoderma Lucidum* на гуморальну імунну відповідь при курсовому введенні. Ці дані дозволять обґрунтувати наступні дослідження по вивченню імуномодулюючої дії *Ganoderma Lucidum* на експериментальних моделях, що виникають при порушеннях у функціонуванні імунної системи.

Технічний результат, що досягається при здійсненні заявленої корисної моделі, полягає у підвищенні точності оцінки ефективності на гуморальну відповідь біомаси гриба *Ganoderma Lucidum* за рахунок дослідження загальної кількості лімфоцитів периферійної крові та лейкоцитарної формули та реакції бласттрансформації лімфоцитів.

За доступними літературними даними такий спосіб не відомий.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб включає дослідження крові, в якому, згідно з корисною моделлю, додатково визначають титр гемолізину та агрегації в сироватці крові, кількість антитілоутворюючих клітин в селезінці до і після лікування, розраховують

співвідношення їх по відношенню до контролю і при зміні показників, оцінюють гуморальну імунну відповідь до біомаси гриба *Ganoderma Lucidum*.

Переваги цього способу: простота у проведенні досліджень і визначенні показників.

Спосіб здійснюється наступним чином:

5 Дослідження імунотоксичної дії проводили на статевозрілих (віком 3-5 міс.) тваринах: мишах-самцях лінії СВА/Са. Тварини були розподілені на 5 груп: контрольні, які отримували розчинник та опитні, які протягом місяця отримували біомасу гриба *Ganoderma Lucidum* у різних дозах: з розрахунку 0,01 мг на 20 гр маси тіла; 10 мг на 20 гр маси тіла; 1 мг на 20 гр маси тіла або 10 мг на 20 гр маси тіла.

10 Об'єм імунологічних досліджень включають визначення: 1. Факторів, що беруть участь у специфічному імунітеті, оцінка впливу препаратів на масу та клітинність лімфоїдних органів. 2. Вплив на гуморальний імунітет: визначення титру гемолізінів та гемаглютининів, визначення кількості антитілоутворюючих клітин в селезінці [3].

15 Забір крові у лабораторних тварин та отримання сироватки. Для евтаназії мишей застосовували передозування ефіру медичного для наркозу [4]. Після проведення процедури евтаназії тварин проводили процедуру забору крові з орбітального синусу шляхом енуклеації. Кров центрифугували при 1500 об/хв протягом 15 хвилин. Сироватку відбирали в пробірки. Відібрану сироватку використовували (після заморожування при -20 °С) для визначення титрів гемолізінів і гемаглютининів [5].

20 Виділення лімфоїдних органів. Одразу після видалення селезінку або тимус занурювали до розчину Хенксу, який містив в собі 10 % сироватки ембріонів корів (СЕК). Селезінку гомогенізували в 3,0-5,0 мл розчину Хенксу, тимус гомогенізували в 1,0 мл розчину Хенксу. Подрібнену у гомогенізаторі тканину переносили у центрифужні пробірки, фільтруючи її через капронний фільтр. Пробірки з клітинами центрифугували 10 хв при 1500 об/хв та температурі + 4 °С. Після центрифугування зливали надосад, відбирали клітини для підрахунку. Підрахунок загальної кількості клітин проводили у камері Горяєва з використанням 3 % оцтової кислоти, що дозволяє вилучити з обліку еритроцити [6].

Відносну масу тимусу та селезінки розраховували як відсоток співвідношення маси тимуса або селезінки до маси тіла.

30 Індекс заселення лімфоїдними клітинами тимусу та селезінки розраховували як співвідношення кількості клітин в органі до маси органу.

Виділення клітин кісткового мозку. Одразу ж після видалення стегнові кістки вміщували до чашки Петрі. Стегнові кістки ретельно відокремлювали від м'яких тканин, ножицями зрізали епіфізи. Вилучали клітини шляхом вимивання розчином Хенксу (в об'ємі 1,0 мл) з додаванням 15 % СЕК за допомогою шприца з ін'єкційною голкою. Відбирали клітини для підрахування. Підраховували кількість клітин у камері Горяєва [6].

Визначення титру гемаглютининів та гемолізінів в сироватці крові.

40 Визначення титру гемаглютининів. Для того, щоб виключити імунний гемоліз, дослідну сироватку декомплентували шляхом нагрівання протягом 30 хв. при температурі 56 °С. Потім готували ряд послідовних розведень (у об'ємному відношенні 1:4, 1:8, 1:16 т.д.) у пластикових круглодонних планшетах в об'ємі 0,2 мл. До розведень сироватки додавали 0,1 мл 1 % завис еритроцитів барана та залишали при кімнатній температурі. Оцінку реакції проводили через 2-4 години. При позитивній реакції, еритроцити, що аглютинували, вистилають дно лунки рівномірним шаром. При негативній реакції усі еритроцити збираються разом у вигляді крапки.

45 Визначення титру гемолізінів. Сироватку дослідних тварин, як і при визначенні гемаглютининів, декомплентували шляхом нагрівання протягом 30 хв. при температурі 56 °С. Потім готували ряд послідовних розведень (у об'ємному відношенні 1:4, 1:8, 1:16 т.д.) у пластикових круглодонних планшетах в об'ємі 0,2 мл, і додавали 0,1 мл 1 % завису еритроцитів барана та 30 хв. інкубували при температурі 37 °С. До суміші додавали комплемент мурчака в об'ємі 0,05 мл, який попередньо розводили фізіологічним розчином у об'ємному відношенні 1:10. Суміш перемішували та інкубували при температурі 37 °С одну годину.

50 Оцінка результатів. Результати визначення гемаглютининів виражали у вигляді титру антитіл - величини, зворотної останньому розведенню сироватки, яка ще аглютинує еритроцити. Найбільше розведення сироватки, яке викликає гемоліз еритроцитів, визначали як титр гемолізінів. Результати представляли в одиницях - \log_2 [7].

55 Реакція локального гемолізу в гелі (за Єрне). Для оцінки рівня гуморальної імунної відповіді тварин імунізували еритроцитами барана внутрішньочеревинно в дозі $2,5 \cdot 10^8$ клітин на мишу (0,2 мл 3 % завис еритроцитів барана на фізіологічному розчині). Тварин забивали на 5-у добу після ін'єкції.

Для постановки реакції виділяли селезінку. Готували 1 % розчин агарози на розчині Хенкса. Чашки Петрі розставляли на столику для підігріву, заливали в кожну розплавлений розчин 1 % агарози, розрівнювали круговими рухами та переставляли на вирівнювальний столик для застигання. 10 клітин селезінки (у відповідному об'ємі) додавали до 0,65 мл суміші розплавленої агарози з 3 % зависом еритроцитів барана (5:1). Агарозу з еритроцитами тримали на водяній бані при температурі 48 °С. Отриману суміш спленоцитів з антигеном обережно розмішували та виливали на підігріту чашку Петрі поверх першого шару агарози, давали застигнути на вирівнюючому столику та вміщували до термостату. Чашки інкубували 1 годину при 37 °С. В кінці інкубації поверх другого шару (суміші спленоцитів з антигеном) додавали по 0,8 мл розведеного 1:10 розчину комплементу (ліофілізованої сироватки мурчаків). Чашки інкубували з комплементом при 37 °С ще 1,5 год.

Оцінка результатів. Підраховували кількість видимих зон гемолізу на чашку. Результати представляли у вигляді кількості антитілоутворюючих клітин (АУК) на 10^6 клітин, або абсолютної кількості АУК в перерахунку на загальну кількість клітин в органі [8].

Експериментальні дані оброблялися загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Кількісні характеристики випадкових величин представлені у вигляді середніх значень (M) та помилок середніх значень (m). Розрахунки проводились за допомогою комп'ютерних програм "Statistica 6.1" та "Excel".

Значущість розбіжностей показників оцінювалася за критерієм Ст'юдента (t) (у разі нормального розподілу) або за критерієм Вілкоксона-Манна-Уїтні (U) (у разі відмінності закону розподілу від нормального). Зміни показників вважали вірогідними при $P < 0,05$ [9,10].

Показник, який в найбільшій мірі відображає активність імунітету, здатність до продукції АУК в селезінці у відповідь на введення антигену. Аналіз антитілоутворення на еритроцити барана після застосування різних доз водного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum* виявив вірогідне зростання відносної та абсолютної кількості АУК в селезінці (табл.). Причому, якщо істотні зміни відносної кількості АУК в селезінці були виявлені на дози з розрахунку 0,01 мг на 20 гр маси тіла та 0,1 мг на 20 гр маси тіла, то збільшення абсолютної кількості АУК в селезінці були виявлені при дозі з розрахунку 1 мг на 20 гр маси тіла. Щодо рівня антитіл в сироватці крові, то статистично доведені зміни титру гемаглютининів та гемолізину були виявлені при застосуванні дози з розрахунку 0,01 мг на 20 гр маси тіла.

Встановлено, що найбільш виражений стимулюючий ефект спостерігався при застосуванні дози з розрахунку 0,01 мг на 20 гр маси тіла. Так, при застосуванні цієї дози відносна кількість АУК в селезінці зростала порівняно з контролем в 4,12 рази, абсолютна - в 5,08 рази. При застосуванні дози з розрахунку 0,1 мг на 20 гр маси тіла було виявлено зростання відносної кількості АУК в селезінці порівняно з контролем в 2,7 рази, абсолютної - в 2,8 рази. Застосування дози з розрахунку 1 мг на 20 гр маси тіла призвело до збільшення абсолютної кількості АУК в селезінці в 1,6 рази.

Таблиця

Характеристика В-клітинної імунної відповіді на еритроцити барана, (M±m)

Експериментальні групи	Показники імунної системи			
	Кількість АУК на $1 \cdot 10^6$ спленоцитів (відносна кількість)	Кількість АУК на селезінку (абсолютна кількість), 10^3	Титр гемолізину, \log_2	Титр гемаглютининів, \log_2
Контрольні миші (n=4)	40,2±10,7	10,1±2,5	7,0±0,8	4,7±0,9
0,01 мг/м (n=4)	165,5±37,3*	51,4±12,2*	9,3±0,5*	7,0±0,0*
0,1 мг/м (n=4)	108,8±8,9*	28,6±3,9*	8,0±0,4	6,3±0,5
1 мг/м (n=4)	68,0±5,1	16,8±0,9*	6,0±1,8	5,5±1,6
10 мг/м (n=5)	42,3±15,3	15,8±8,0	8,0±0,3	6,0±0,6

Примітка. * - P (t) < 0,05 порівняно з контрольними мишами.

Застосування біомаси гриба *Ganoderma Lucidum* у різних дозах мишам-самцям лінії СВА/Са суттєвого впливу на масу та клітинність лімфоїдних органів не виявив. Були виявлені вірогідні зміни тільки відносної маси селезінки при застосуванні дози з розрахунку 0,1 мг на 20 гр маси тіла.

5 Таким чином, дані проведених досліджень дозволяють зробити висновок, що застосування різних доз біомаси гриба *Ganoderma Lucidum* імунотоксичної дії на гуморальну імунну відповідь, масу та клітинність органів імунної системи виявлено не було, а навіть спостерігалася стимуляція антитілоутворення на введення Т-залежного антигену. Оскільки істотний стимулюючий вплив на гуморальну імунну відповідь (кількість АУК в селезінці) був виявлений у
10 відповідь на застосування дози *Ganoderma Lucidum* з розрахунку 0,01 мг на 20 гр маси тіла, в подальшому з метою дослідження впливу *Ganoderma Lucidum* на фактори гуморального імунітету у мишей з індукованою імунологічною недостатністю буде використана ця доза.

На базі лабораторії імунології кафедри біорганічної, біорганічної та фармацевтичної хімії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця була проведена оцінки впливу
15 різних доз біомаси гриба *GANODERMA LUCIDUM* на гуморальну імунну відповідь.

Джерела інформації:

1. Sergey V. Reshetnikov, Solomon P. Wasser, Kok Kheng Tan. Higher Basidiomycota as a source of Antitumor and Immunostimulating Polysaccharides (Review) // *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2001. - Vol. 3. - P. 361-394).
- 20 2. Автономова А.В., Краснопольська Л.М. Мікологія і фітопатологія.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації /За ред. Стефанова О.В. - К.: Авіцена, 2001. - 528 с.
4. Эвтаназия экспериментальных животных /Методические рекомендации по выведению животных из эксперимента. - М.: МЗ СССР, 1985. - 13 с.
- 25 5. Западнюк И.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте /И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария. - К.: Вища школа, 1974. - 303 с.
6. Лимфоциты. Методы: Пер. с англ. /Под. ред. Дж. Клауса. - М.: Мир, 1990. - 395 с.
7. McGregor D.D. The antibody response of rats depleted of lymphocytes by chronic drainage from the thoracic duct // *D.D. McGregor, J.L. Gowas // J. Exp. Med.* - 1963. - Vol. 118. - № 2. - P. 303-320.
- 30 8. Jerne N.K. Cell-bound antibodies // *N.K. Jerne, A.A. Nordin, C. Henry.* - Wistar Institute Press. - 1963. - 109 p.
9. Гублер Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях /Е.В. Гублер, А.А. Генкин. - Л.: Медицина, 1973. - 141 с.
10. Минцер О.П. Методы обработки медицинской информации /О.П. Минцер, Б.Н. Угаров, В.В. Власов. - К.: Вища школа, 1991. - 271 с.
- 35

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

40 Спосіб оцінки впливу різних доз біомаси гриба *Ganoderma Lucidum* на гуморальну імунну відповідь, що включає дослідження крові, який відрізняється тим, що додатково визначають титр гемолізину та гемаглютиніну в сироватці крові, кількість антитілоутворюючих клітин в селезінці до і після лікування, розраховують співвідношення їх по відношенню до контролю і при зміні показників оцінюють гуморальну імунну відповідь до біомаси гриба *Ganoderma Lucidum*.

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601