

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

ПІДЧЕНКО ВІТАЛІЙ ТАРАСОВИЧ

УДК 615.322:582.287.237:612.017.1:57.04

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ІМУНОМОДУЛЯТОРНОЇ
АКТИВНОСТІ ТА НЕШКІДЛИВОСТІ ПОРОШКУ БІОМАСИ ГРИБА
GANODERMA LUCIDUM (CURT.:FR.) P.KARST.

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Національному медичному університеті імені О.О. Богомольця МОЗ України (м. Київ)

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України
НІЖЕНКОВСЬКА Ірина Володимирівна,
Національний медичний університет
імені О.О. Богомольця МОЗ України (м. Київ),
завідувач кафедри фармацевтичної, біологічної та
токсикологічної хімії

Офіційні опоненти:

доктор фармацевтичних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України
ЯКОВЛЄВА Лариса Василівна,
Національний фармацевтичний університет
МОЗ України (м. Харків),
завідувач кафедри фармакоелектрофізіології

доктор біологічних наук, доцент
СКІВКА Лариса Михайлівна,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка МОН України,
ННЦ «Інститут біології та медицини»,
завідувач кафедри мікробіології та загальної
імунології

Захист відбудеться «9» лютого 2017 р. о 12.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий «30» грудня 2016 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
д. фарм. н., професор

Т. С. Сахарова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Елімінація будь-якого інфекційного збудника є результатом синергічної взаємодії між захисними силами макроорганізму та антимікробними агентами, тому лікування антибіотиками, протівірусними та протигрибковими засобами може бути малоефективним у осіб зі зниженою функціональною активністю імунної системи (Б.В. Пинегин, Т.В. Латышева, 2001). Перебіг інфекційних захворювань на сьогоднішній день характеризується наявністю двох взаємопов'язаних і взаємозумовлених процесів: ростом числа хронічних інфекційних захворювань, викликаних умовно-патогенними або опортуністичними мікроорганізмами, і зниженням імунної реактивності населення (І.П. Колеснікова, 2012; A. Swaminathan et al., 2014).

На сьогодні спостерігається значне зростання інтересу дослідників до лікувально-профілактичних засобів, що діють на імунну систему організму (Р.П. Маслянко та співавт., 2012; О.А. Рухмакова, 2013). Чільне місце належить пошуку та дослідженню імуномодуляторів природного походження, які реалізують біологічну дію за рахунок еволюційно сформованих рецептор-лігандних взаємодій і, на відміну від синтетичних засобів, не створюють небезпеку тривалого і необоротного порушення гомеостазу та патологічних змін у функціонуванні інших фізіологічних систем (М.С. Савенкова, 2013; M. Mizuno, Y. Nishitani, 2013).

Особливу увагу дослідників привертає вивчення фармакологічної активності продуктів базидіального гриба *Ganoderma lucidum* (трутовик лакований), що розглядається як перспективне джерело для розробки нових лікувально-профілактичних засобів (K.S. Bishop et al., 2015). Відомо, що біологічно активні речовини (БАР), виділені з гриба *Ganoderma lucidum* мають такі фармакологічні ефекти: протизапальний, антибактеріальний, протівірусний, гепатопротекторний, гіпоглікемічний тощо (S.A. Heleno et al., 2013; M. Vazirian et al., 2014). В країнах Південно-Східної Азії препарати на основі *Ganoderma lucidum* використовують як допоміжні засоби при лікуванні лейкозу, деяких видів раку, гепатиту та діабету (D.De Silva et al., 2012; C. Kao et al., 2013).

Існуючі дослідження імуномодуляторної активності БАР, виділених з гриба *Ganoderma lucidum*, носять розрізнений характер, а фармакологічна активність сукупності біологічно активних речовин біомаси гриба, вирощеної методом культивування на рідких живильних середовищах *in vitro*, лишається недослідженою. Поза увагою дослідників залишається також вплив біомаси гриба на фактори вродженого та адаптивного імунітету в умовах вторинного імунодефіциту – патологічного стану імунної системи, властивого широкому спектру соматичних захворювань людини і тварин.

Таким чином, усе вищезазначене теоретично обґрунтовує доцільність подальшого фармакологічного дослідження порошку біомаси гриба (ПБГ) *Ganoderma lucidum*, отриманого методом культивування на рідкому живильному середовищі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт кафедри фармакогнозії та

ботаніки Національного медичного університету імені О.О. Богомольця МОЗ України в рамках теми «Дослідження арсеналу лікарських рослин флори України з антидіабетичними, імуномодулюючими, антиоксидантними та адаптаційними властивостями», державний реєстраційний номер 0113U006552.

Мета і задачі дослідження. *Мета роботи* – експериментальне обґрунтування доцільності створення ефективного та нешкідливого лікарського засобу з імуномодуляторною дією на основі ПБГ *Ganoderma lucidum*, отриманого методом культивування на рідкому живильному середовищі.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

1. Розробити спосіб біотехнологічного вирощування біомаси гриба *Ganoderma lucidum* методом культивування на рідкому живильному середовищі.
2. Вивчити гостру токсичність ПБГ *Ganoderma lucidum*.
3. Оцінити хронічну токсичність ПБГ *Ganoderma lucidum*.
4. Дослідити вплив ПБГ *Ganoderma lucidum* на показники гуморального та клітинного імунітету, фактори неспецифічної імунної відповіді та фактори, які беруть участь у специфічному імунітеті здорових мишей *in vivo* та визначити ефективну дозу.
5. Дослідити вплив ПБГ *Ganoderma lucidum* в різних дозах на морфологічні показники тимусу та селезінки здорових мишей *in vivo*.
6. Провести дослідження імуномодуляторної активності ПБГ *Ganoderma lucidum* на показники гуморального та клітинного імунітету, фактори неспецифічної імунної відповіді та активність факторів, які беруть участь у специфічному імунітеті тварин з модельованим вторинним імунодефіцитом *in vivo*.

Об'єкт дослідження. Імунодефіцитні стани.

Предмет дослідження. Імуномодуляторна активність ПБГ *Ganoderma lucidum* та нешкідливість в умовах гострого та хронічного дослідження.

Методи дослідження. Фармакологічні, токсикологічні, імунологічні, біохімічні, мікробіологічні, морфологічні, фізико-хімічні та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше на моделі експериментального вторинного імунодефіциту встановлена імуномодуляторна дія ПБГ *Ganoderma lucidum*, отриманого методом культивування на глюкозо-пептонному живильному середовищі з дріжджовим екстрактом, що характеризується відновленням показників гуморальної та клітинної імунної відповіді, а також факторів неспецифічного імунітету та цито-морфологічних показників лімфоїдних органів. Фармакологічна активність ПБГ *Ganoderma lucidum* підтверджується збільшенням кількості перитонеальних макрофагів у 7,4 раза, їх фагоцитарної активності (ФА) – у 1,4 раза, фагоцитарного індексу (ФІ) – у 1,2 раза, абсолютної та відносної кількості антитілоутворюючих клітин (АУК) в селезінці – в 2,1 раза, рівня антитіл в сироватці крові (гемаглютинінів (ГА) – у 2,4 раза, гемолізінів (ГЛ) – у 6,7 раза), відновленням мітоген-активованої проліферативної активності лімфоцитів, а також масових показників та клітинності лімфоїдних органів порівняно з групою позитивного контролю.

Доповнені наукові дані щодо нешкідливості ПБГ *Ganoderma lucidum*, що підтверджується відсутністю токсичної дії в умовах гострого та хронічного дослідження. Встановлено, що за умов внутрішньошлункового введення за

значенням LD₅₀ ПБГ *Ganoderma lucidum* належить до речовин IV класу токсичності – малотоксичні речовини за класифікацією К.К. Сидорова (1973).

Розширені уявлення про спектр ефективних доз ПБГ *Ganoderma lucidum*. Виявлена найбільш ефективна доза ПБГ *Ganoderma lucidum* – 0,5 мг/кг, введення якої приводило до підвищення активності як гуморальної, так і клітинної імунної відповіді здорових тварин, що підтверджується збільшенням абсолютної та відносної кількості АУК в селезінці в 5,1 та 4,1 раза відповідно та інших показників.

Удосконалено біотехнологічний метод культивування біомаси гриба *Ganoderma lucidum* на рідкому живильному середовищі та визначені умови щодо стандартизації складу живильного середовища, температури, кислотності середовища та терміну культивування *Ganoderma lucidum* для отримання біомаси з вмістом суми полісахаридів 10,65%.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані в дисертаційній роботі експериментальні дані доводять імуномодуляторну активність та нешкідливість ПБГ *Ganoderma lucidum in vivo*. Експериментально обґрунтована доцільність створення на основі біомаси гриба *Ganoderma lucidum* лікувально-профілактичного засобу для перорального застосування з метою корекції імунного статусу при вторинних імунодефіцитних станах. Отримані в роботі дані можуть бути основою для подальших доклінічних і клінічних досліджень та рекомендацій щодо застосування розробленого засобу в медичній практиці.

Запропоновано спосіб оцінки імунотоксичної дії водного розчину міцелію гриба *Ganoderma lucidum* (патент України на корисну модель № 97452, 2015 р.), спосіб визначення імунотропної дії біомаси гриба *Ganoderma lucidum* (патент України на корисну модель № 99004, 2015 р.), спосіб оцінки впливу різних доз біомаси гриба *Ganoderma lucidum* на гуморальну імунну відповідь (патент України на корисну модель № 101556, 2015 р.).

За результатами дослідження впроваджена оригінальна методика культивування лікарського гриба *Ganoderma lucidum* штаму 1900 для одержання біологічно активних добавок, лікувально-профілактичних засобів у науково-виробничій фірмі ТОВ «МікотекФарм» (лист від 17.11.2014 р.).

Результати роботи впроваджені в науково-дослідну роботу Науково-дослідного інституту експериментальної та клінічної медицини Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол № 7 від 29.09.2016 р.), Інституту гігієни та екології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол № 5 від 06.10.2016 р.).

Особистий внесок здобувача. Разом з науковим керівником проаналізовано наукову літературу за темою дисертації, визначено мету і завдання досліджень та написано зміст дисертаційної роботи. У комплексному дослідженні, над яким працював творчий колектив співавторів публікацій, особисто дисертантом: проведено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано та узагальнено дані літератури з поставлених питань, теоретично обґрунтовано та експериментально вивчено умови вирощування біомаси гриба *Ganoderma lucidum*, здійснено експериментальні дослідження, статистичну обробку одержаних результатів та оформлено їх у вигляді таблиць і рисунків. Автором написані 6 розділів дисертації

та сформульовані висновки.

Дослідження по культивуванню біомаси гриба *Ganoderma lucidum* були проведені на кафедрі фармакогнозії та ботаніки НМУ імені О.О. Богомольця і на базі відділу мікології Інституту ботаніки ім. Н.Г. Холодного НАН України за консультативної допомоги пров. н.с., д.біол.н. Н.А. Бісько. Фармакологічні властивості досліджували в Науково-дослідному інституті експериментальної та клінічної медицини НМУ імені О.О. Богомольця за консультативної допомоги д.мед.н., проф. Н.Г. Бичкової. Наукові праці опубліковано у співавторстві з І.В. Ніженковською, Н.Г. Бичковою, Н.А. Бісько, А.Є. Родніченко, Н.О. Козіко. Дисертант вдячний усім науковцям за методичну та консультативну допомогу.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, викладені в дисертаційній роботі, представлені та обговорені на вітчизняних та міжнародних наукових конференціях і симпозіумах: IV-му Міжнародному науково-практичному конгресі студентів і молодих вчених «Актуальні проблеми сучасної медицини» (Київ, 2012 р.); Національному конгресі «Клінічна фармація: 20 років в Україні» (Харків, 2013 р.); I-й Міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії» (Харків, 2014 р.); IV-й Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2014 р.); The Third European Conference on Biology and Medical Sciences (Vienna, Austria, 2014 р.); дистанційної науково-практичної конференції студентів і молодих учених «Інновації в медицині та фармації - 2015» (Мінськ, 2015 р.), II-й Міжнародній науково-практичній internet-конференції «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (Харків, 2016 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання теоретичної, практичної та експериментальної фармації» (Вінниця, 2016 р.), VIII Національному з'їзді фармацевтів України (Харків, 2016 р.).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 18 наукових праць: 6 статей, серед яких 4 – у фахових виданнях з переліку, затвердженого МОН України, 2 – у зарубіжних наукових фахових виданнях, 9 тез доповідей, отримано 3 патенти України на корисну модель.

Обсяг і структура дисертації. Загальний обсяг дисертації складає 195 сторінок. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, чотирьох розділів власних досліджень, розділу, що містить аналіз і узагальнення результатів, загальних висновків, списку використаних джерел літератури. Дисертація містить 23 таблиці та 50 рисунків. Бібліографія включає 209 посилань на наукові праці, з них 60 кирилицею, 149 латиною.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. У процесі виконання дисертаційної роботи проведені дослідження з визначення оптимальних умов для росту біомаси гриба *Ganoderma lucidum* (штам 1900, отриманий з Колекції культур шапинкових грибів

Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України) методом культивування на рідкому живильному середовищі.

З метою вивчення залежності росту та накопичення біомаси від фізико-хімічних факторів (температури інкубації та кислотності середовища) досліджували вплив температури інкубації на ріст культури на агаризованих живильних середовищах різного складу: 1) мальц-екстракт агар (МЕА, "DIFCO"); 2) картопляно-декстрозний агар (КДА, "DIFCO"); 3) глюкозо-пептон-дріжджевий агар (ГПДА), г/л: глюкоза – 25,0; пептон – 3,0; дріжджовий екстракт – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; агар-агар – 20,0 (А.С. Бухало та співавт., 2011). Інокульовані міцеліальною культурою чашки Петрі інкубували у термостаті за температури: $25 \pm 0,1$; $26 \pm 0,1$; 27 ± 1 ; $28 \pm 0,1$; $29 \pm 0,1$; $30 \pm 0,1$ і $31 \pm 0,1$ °С. Для визначення впливу кислотності середовища на ріст міцеліальної біомаси використовували рідке синтетичне середовище ГПД з початковим значенням рН 3,2; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,3.

Культивування гриба *Ganoderma lucidum* на рідких живильних середовищах проводили в мікробіологічних матрасах ємністю 1л, що містили 500 мл рідкого середовища за температури $28 \pm 0,1$ °С, кислотності середовища рН=5. Середовища стерилізували в автоклаві при 1атм. протягом 30хв. Інокульовали фізіологічно активним міцелієм за методикою, розробленою для міцеліальних грибів (А.С. Бухало та співавт., 2011) в кількості 10% за об'ємом. Глибинне культивування проводили на рідких живильних середовищах такого складу: 1) молочна сироватка, 2) середовище ГПД, г/л: глюкоза – 25,0; пептон – 3,0; дріжджовий екстракт – 2,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25; 3) комплексне середовище, г/л: глюкоза – 24,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 2,0; кукурудзяний екстракт – 10,0 мл; 4) відвар пшеничного борошна, г/л: пшеничне борошно – 20,0. Спектрофотометричним методом встановлювали кількісний вміст суми полісахаридів у отриманій біомасі (О.О. Цуркан та співавт., 2010).

Усі роботи з експериментальними тваринами проведені з дотриманням Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006р.), Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986 р.). Дотримання біоетичних норм засвідчене висновком Комітету з біоетики Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол № 95 від 05.05. 2016 р.).

Дослідження параметрів гострої токсичності порошку біомаси гриба (ПБГ) *Ganoderma lucidum* за умов внутрішньошлункового введення проведені на мишах лінії СВА/Са обох статей масою на момент відбору 18-22 г, щурах лінії Вістар обох статей масою на момент відбору 200-240 г. Гостру токсичність визначали методом Т.В. Пастушенко та співавт. (1985).

Визначення хронічної токсичності проводили на самцях білих нелінійних щурів масою на момент відбору 200-220 г. Визначали активність аланінамінотрансферази (АЛАТ) сироватки крові та тканини печінки, вміст у сироватці крові загальних ліпідів та загального холестеролу із застосуванням стандартних діагностиків (ТОВ «Філісіт-Діагностика», Україна), за протоколами

виробника. Вміст SH-груп білкового і небілкового синтезу в крові визначали методом Фоломієва (1981). Стан антиоксидантної системи організму визначали за активністю каталази цитозолу печінки (М.А. Королук и соавт., 1988) та перекисної резистентності еритроцитів методом А.А. Покровського та співавт. (1964). Вміст β -ліпопротеїдів визначали методом Барштейна (Ф.И. Комаров и соавт., 1981). Процеси деградації комплексу поліненасичених жирних кислот в організмі експериментальних тварин оцінювали за показниками перекисного окиснення ліпідів у мікросомальній фракції гепатоцитів та нефроцитів – рівнем малонового діальдегіду, гідроперекисів ліпідів (С.А. Смрщок и соавт., 1986), а також за ступенем окиснення атерогенних ліпопротеїдів (М.В. Лизенко, 2012).

Визначення імуотропної активності ПБГ *Ganoderma lucidum* проводили на здорових мишах лінії СВА/Са з вихідною масою 18-22 г, яким протягом 30 діб внутрішньошлунково вводили біомасу гриба в дозах 0,5 мг/кг, 5 мг/кг, 50 мг/кг, 500 мг/кг.

Визначення імуномодуляторної активності ПБГ *Ganoderma lucidum* проводили на мишах лінії СВА/Са з модельованим вторинним імунодефіцитом з вихідною масою 18-22 г. Для моделювання імунодефіциту використовували антинеопластичний засіб циклофосфамід (ЦФ) («Ендоксан», порошок для приготування розчину для ін'єкцій по 200 мг, виробництва «Baxter Oncology GmbH», Німеччина), який вводили одноразово в дозі 150 мг/кг, внутрішньоочеревинно, у перший день експерименту. Після ін'єкції ЦФ мишам протягом 10 днів перорально вводили ПБГ *Ganoderma lucidum* у дозі 0,5 мг/кг. Як референтний препарат використовували імуностимулятор рослинного походження – ехінацею («Ехінацея-Астрафарм», таблетки по 100 мг, виробництва ТОВ «Астрафарм», Україна). Дозу референтного препарату розраховували з використанням коефіцієнта видової стійкості (Ю.П. Рыболовлев и соавт., 1981).

Вплив ПБГ *Ganoderma lucidum* на фактори неспецифічного захисту оцінювали шляхом дослідження функціональної активності перитонеальних макрофагів з визначенням фагоцитарного індексу (ФІ), фагоцитарного числа (ФЧ) та фагоцитарної активності (ФА) (О.В. Стефанов, 2001).

Проліферативну активність спленоцитів визначали в реакції бласттрансформації лімфоцитів під впливом Т-клітинних (Phytohemagglutinin-P, "Sigma" (США), Concanavalin A, "Sigma") та В-клітинних мітогенів (Lipopolysaccharide, from *Escherichia coli* serotype 026:B6, "Sigma") (Т. Mosman, 1983).

Для оцінки рівня гуморальної імунної відповіді проводили реакцію локального гемолізу в гелі методом Єрне і Нордина (N.K. Jerne et al., 1963). Кількість АУК у селезінці, титр гемаглютининів і гемолізінів у сироватці крові визначали за стандартними методиками (О.В. Стефанов, 2001).

Оцінку впливу ПБГ *Ganoderma lucidum* на клітинний імунітет проводили за реакцією гіперчутливості сповільненого типу (РГСТ) (О.В. Стефанов, 2001).

Морфологічні дослідження селезінки та тимусу проводили за стандартними методиками світлової мікроскопії. Парафінові зрізи товщиною 5 мкм виготовляли на мікротомі "Microm" (Microm International GmbH, Німеччина). Гістологічні зрізи

зафарбовували гематоксилином Майєра та еозином–У та досліджували на світлооптичному рівні з використанням мікроскопа Olympus BX51. Морфометричні дослідження проводили за допомогою програми "Image J" і програми "Microsoft Office Excel". При цьому, визначали наступні параметри: площу (S, мм²) лімфатичного острівця селезінки, площу червоної та білої пульпи.

Експериментальні дані оброблено методами варіаційної статистики за допомогою програм «STATISTICA[®] for Windows 6.0» (StatSoft Inc., США) і «Microsoft Office Excel 2010» (Microsoft, США) за критерієм t Ст'юдента у випадку нормального розподілу, та за критерієм U Манна-Уїтні – в інших випадках, з прийнятим у медико-біологічних дослідженнях рівнем статистичної значущості $p \leq 0,05$ (А.А. Халафян, 2007).

Результати та їх обговорення. Новим і перспективним напрямком у культивуванні базидіальних грибів з метою отримання БАР є культивування міцелію вищих грибів на рідких живильних середовищах *in vitro*. Даний метод культивування дозволяє отримувати необхідну кількість БАР у більш короткий строк 2-3 тижні порівняно з вирощуванням плодових тіл протягом 3-5 місяців. При цьому, завдяки створенню оптимальних умов, вирощування можливо проводити протягом усього року, забезпечується більш високий та стабільний вихід біомаси, мінімізується потрапляння сторонньої мікрофлори на стерильне середовище, а також можливе застосування механізації та автоматизації технологічних процесів (R. Wagner et al., 2003).

Дослідження умов культивування біомаси гриба *Ganoderma lucidum* були спрямовані на визначення оптимальної температури, кислотності та складу рідкого живильного середовища для отримання ПБГ *Ganoderma lucidum* зі сталим вмістом суми полісахаридів. Проведені дослідження росту чистої культури на агаризованих середовищах показали, що швидкість росту міцелію *Ganoderma lucidum* значною мірою залежала як від температури, так і від складу середовища. Найбільші показники швидкості росту спостерігали за температури $28 \pm 0,1^\circ\text{C}$ для всіх живильних середовищ. Швидкість росту міцелію при $28 \pm 0,1^\circ\text{C}$ на середовищі ГПДА була вищою на 22,2% ($p < 0,05$) та 25,2% ($p < 0,05$) порівняно з МЕА та КДА відповідно. У той же час підвищення температури до $31 \pm 0,1^\circ\text{C}$ сприяло зниженню швидкості росту міцелію на ГПДА на 9,1%, на МЕА – на 18,2%, на КДА – на 18,9% порівняно з показником росту на цих же середовищах при $28 \pm 0,1^\circ\text{C}$. В результаті проведених досліджень було встановлено, що оптимальною температурою для росту міцелію *Ganoderma lucidum* є $t = 28 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Дослідження впливу значення кислотності середовища на ріст біомаси на синтетичному рідкому середовищі ГПД показало, що найбільш інтенсивне накопичення міцеліальної біомаси спостерігається при $\text{pH} = 5$. Проведені дослідження дозволили визначити температурний режим та кислотність середовища для наших подальших експериментів з підбору оптимального складу рідкого середовища для вирощування біомаси гриба *Ganoderma lucidum*.

Дослідження росту біомаси гриба *Ganoderma lucidum* на рідких живильних середовищах показали, що найбільш інтенсивний ріст біомаси спостерігається на глюкозо-пептонному середовищі з дріжджовим екстрактом. Показники росту

міцеліальної біомаси на означеному середовищі були достовірно вищими за аналогічні показники для інших середовищ як на 6, так і на 16 добу культивування (рис.1).

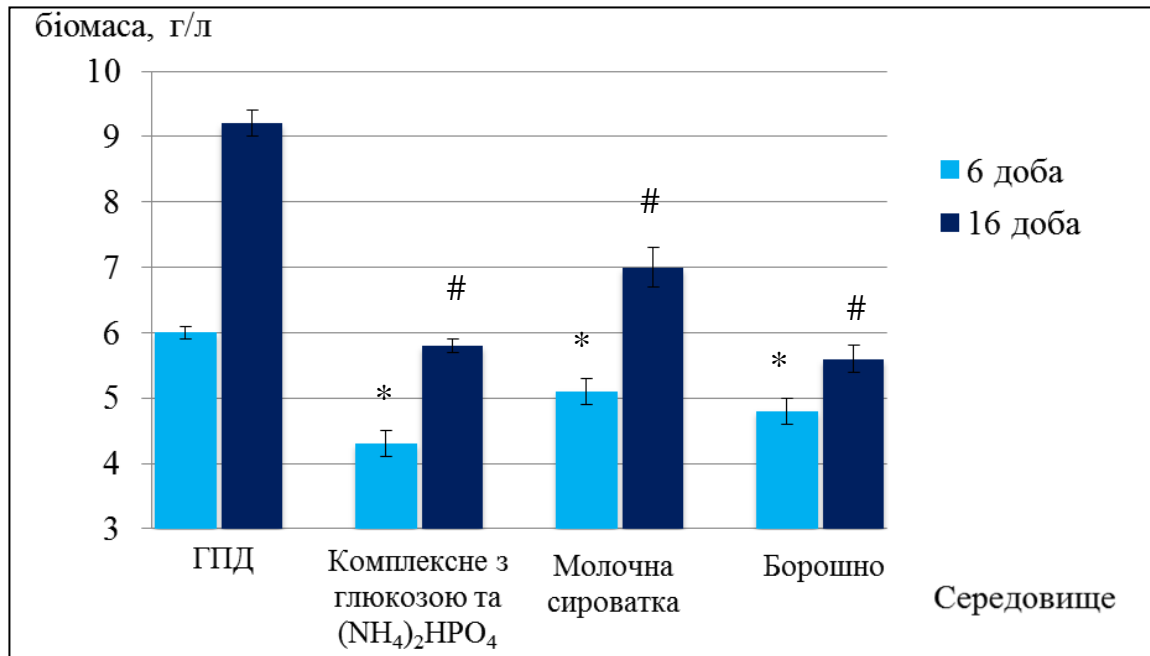


Рис.1 Вихід біомаси гриба *Ganoderma lucidum* при культивуванні на живильних середовищах різного складу

Примітка. ГПД – глюкозо-пептонне середовище з дріжджовим екстрактом; * – $p < 0,05$ порівняно з середовищем ГПД на 6-ту добу; # – $p < 0,05$ порівняно з середовищем ГПД на 16-ту добу

Таким чином, були визначені оптимальні умови для росту біомаси гриба *Ganoderma lucidum*: $t = 28 \pm 0,1^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5$, середовище – ГПД. За результатами кількісного хімічного аналізу було встановлено, що ПБГ *Ganoderma lucidum* містить в своєму складі 10,65% полісахаридів, у перерахунку на глюкозу.

Вивчення гострої токсичності ПБГ *Ganoderma lucidum* проводили за умов внутрішньошлункового введення, оскільки даний шлях застосування є найбільш вірогідним для подальшого використання. Результати дослідження гострої токсичності показали, що введення порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum* у діапазоні доз 1000-5000 мг/кг мишам обох статей лінії СВА/Са не призводило до їх загибелі. Для визначення видової чутливості тварин щодо дії досліджуваного ПБГ *Ganoderma lucidum* дослідження токсичності проводили також на щурах лінії Вістар. При одноразовому введенні ПБГ *Ganoderma lucidum* в інтервалі доз 1000-5000 мг/кг також не спостерігали загибелі дослідних тварин. Оскільки при введенні максимальної дози при внутрішньошлунковому введенні (5000 мг/кг) LD_{50} експериментально не була встановлена, за ступенем токсичності ПБГ *Ganoderma lucidum* ми віднесли до IV класу токсичності – малотоксичні речовини (О.В. Стефанов, 2001).

Під час досліджень хронічної токсичності було встановлено, що щоденне пероральне введення ПБГ *Ganoderma lucidum* білим нелінійним щурам не призводило до відхилень від норми в їх загальному стані та поведінці. Проведені

біохімічні дослідження не виявили достовірних змін показників функціонального стану печінки, нирок, ліпідного обміну, антиоксидантної системи експериментальних тварин. Введення ПБГ *Ganoderma lucidum* в усіх досліджуваних дозах протягом 30 діб не призводило до статистично достовірних змін рівня загального холестеролу в сироватці крові. При введенні ПБГ *Ganoderma lucidum* протягом 90 діб спостерігали зниження рівня загального холестеролу в крові на 15,57% ($p < 0,05$), 29,15% ($p < 0,05$), 22,94% ($p < 0,05$) та 19,51% ($p < 0,05$) при застосуванні доз ПБГ *Ganoderma lucidum* 0,5 мг/кг, 5 мг/кг, 50 мг/кг та 500 мг/кг відповідно порівняно зі значеннями показника через 30 діб введення. Через 6 місяців експерименту при введенні ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозах 0,5 мг/кг, 5 мг/кг, 50 мг/кг та 500 мг/кг рівень холестеролу був на 17,64% ($p < 0,05$), 25,19% ($p < 0,05$), 21,56% ($p < 0,05$) та 22,17% ($p < 0,05$) відповідно нижчим. Слід зазначити, що вищезначене зниження рівня загального холестеролу в крові залишалось в межах фізіологічних норм для даного виду експериментальних тварин (В.Г. Макаров, 2013).

Результати впливу ПБГ *Ganoderma lucidum* на фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Вплив ПБГ *Ganoderma lucidum* на показники фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів мишей лінії СВА/Са ($M \pm m$)

Групи тварин \ Показник	Кількість перитонеальних макрофагів, $\times 10^6$	Фагоцитарний індекс, %	Фагоцитарна активність, ум.од	Фагоцитарне число, ум.од
Контроль (n = 9)	15,2 \pm 1,5	64,0 \pm 1,8	2,8 \pm 0,2	4,3 \pm 0,2
№1 (0,5 мг/кг) (n = 9)	9,6 \pm 1,4*	66,7 \pm 1,7	3,0 \pm 0,3	4,5 \pm 0,3
№2 (5 мг/кг) (n = 9)	13,1 \pm 1,9	68,0 \pm 0,5*	3,7 \pm 0,1*	5,4 \pm 0,1*
№3 (50 мг/кг) (n = 9)	6,1 \pm 1,1*	63,0 \pm 2,1	3,0 \pm 0,2	4,7 \pm 0,2
№4 (500 мг/кг) (n = 10)	5,1 \pm 0,4*	66,7 \pm 2,0	3,3 \pm 0,1	4,9 \pm 0,2

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з групою контролю; n – кількість тварин у групі

Щоденне введення ПБГ *Ganoderma lucidum* мишам лінії СВА/Са протягом 30 діб в дозах 0,5 мг/кг, 50 мг/кг та 500 мг/кг призводило до статистично значимого зменшення кількості макрофагів у перитонеальному ексудаті, не зменшуючи при цьому їх функціональну активність, про що свідчили показники ФІ, ФА та ФЧ (табл.1). Отримані результати можуть свідчити про посилення процесів міграції макрофагів з перитонеальної порожнини у селезінку або інші органи (А.А. Cassado et al., 2015).

При введенні дослідним тваринам ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозі 5 мг/кг не відзначали зниження як кількості перитонеальних макрофагів, так і всіх показників їх

функціональної активності. Застосування означеної дози приводило до збільшення ФА на 32,14%, ФІ на 6,25%, та ФЧ на 25,58% порівняно з групою контролю (група тварин, яким вводили розчинник) ($p < 0,05$).

Введення дослідним тваринам ПБГ *Ganoderma lucidum* у дозі 500 мг/кг призводило до зниження кількості лімфоїдних клітин в селезінці та тимусі, еритроцитів в периферичній крові, а також знижувало проліферативну активність спленоцитів на введення Т- і В-мітогенів.

При застосуванні ПБГ у дозі 0,5 мг/кг не спостерігали достовірних змін як показників лімфоїдних органів, так і кількісного складу формули крові, але виявили збільшення кількості лейкоцитів на 81,25%, та кількості лімфоїдних клітин в селезінці на 44,69% порівняно з групою контролю ($p < 0,05$). Проліферативна активність на введення ФГА та КонА залишалась на рівні групи контролю, але була нижчою при введенні ЛПС.

Зважаючи на те, що застосування ПБГ *Ganoderma lucidum* у дозах, більших 0,5 мг/кг супроводжувались змінами масових показників і клітинності лімфоїдних органів, вважали за доцільне проведення морфологічного дослідження основних лімфоїдних органів – селезінки та тимусу при введенні мишам зазначених доз ПБГ *Ganoderma lucidum*. Морфологічні дослідження показали, що щоденне введення ПБГ *Ganoderma lucidum* мишам лінії СВА/Са протягом 30 діб не призводило до уражень селезінки, спустошення білої або червоної пульпи, інших деструктивних змін. У групі тварин, які отримували ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозі 0,5 мг/кг площа лімфатичних островців білої пульпи зростала в 1,6 раза порівняно з контролем ($p < 0,05$). В групах тварин, які отримували ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозах 5 мг/кг та 50 мг/кг, означений показник залишався на рівні контролю, а при застосуванні дози 500 мг/кг – знижувався на 30% порівняно з контрольною групою ($p < 0,05$). Отримані дані свідчать про збільшення проліферативної активності лімфоцитів у селезінці мишей у відповідь на введення ПБГ *Ganoderma lucidum* у дозі 0,5 мг/кг.

Введення ПБГ *Ganoderma lucidum* у дозах 0,5 мг/кг, 5 мг/кг, 50 мг/кг і 500 мг/кг не призводило до патологічних змін у гістологічній структурі тимусу дослідних тварин. Не встановлено змін, характерних для інволюції тимусу. Слід відмітити, що клітинність у мозковій речовині тимусу тварин, яким вводили досліджувану біомасу в дозі 500 мг/кг, була дещо нижчою порівняно з введенням інших доз, що підтверджує отримані нами дані в попередньому дослідженні, які засвідчили зниження маси тимусу та його клітинності в означеній групі. Оскільки при цьому не було встановлено інволютивних процесів у тимусі в усіх групах тварин, можна зробити припущення, що ці явища можуть бути пов'язані з міграцією Т-лімфоцитів у кров при застосуванні дослідним тваринам ПБГ *Ganoderma lucidum* (М.Д. Зассеева, 2015).

Введення тваринам біомаси в дозах 0,5 мг/кг, 5 мг/кг та 50 мг/кг приводило до збільшення відносної кількості АУК у селезінці в 4,1 раза, 2,7 раза та 1,7 раза відповідно порівняно з групою контролю. Абсолютна кількість АУК збільшувалась у 5,1 раза, 2,8 раза та 1,6 раза при застосуванні біомаси в дозах 0,5 мг/кг, 5 мг/кг та 50 мг/кг відповідно. Дослідження титру антитіл у сироватці крові показали, що введення дослідним тваринам ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозі 0,5 мг/кг приводить до статистично достовірного збільшення титру гемаглютинінів на 32,86%, гемолізінів

на 48,94% порівняно з контролем, що вказує на імуномодуляторну дію досліджуваного ПБГ (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив ПБГ *Ganoderma lucidum* на показники гуморального імунітету мишей лінії СВА/Са (M ± m)

Показник Групи тварин	Кількість АУК на $1 \cdot 10^6$ спленоцитів	Кількість АУК на селезінку, $1 \cdot 10^3$	Титр гемолізинів, \log_2	Титр гемаглютининів, \log_2
Контроль (n = 8)	40,3±7,0	10,1±1,6	7,0 ± 0,8	4,7 ± 0,9
№1 (0,5 мг/кг) (n = 8)	165,5±24,4*	51,5±8,0*	9,3 ± 0,3*	7,0 ± 0,2*
№2 (5 мг/кг) (n = 8)	108,8±5,8*	28,6±2,6*	8,0 ± 0,3	6,3 ± 0,3
№3 (50 мг/кг) (n = 8)	68±3,3*	16,8±0,6*	6,0 ± 1,2	5,5 ± 1,0
№4 (500 мг/кг) (n = 10)	42,3±10,2	15,9±5,3	8,0 ± 0,2	6,0 ± 0,4

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з групою контролю; n – кількість тварин у групі

Оскільки на даному етапі експерименту миші були імунізовані еритроцитами барана, доцільно було дослідити вплив ПБГ *Ganoderma lucidum* на лімфоїдні органи імунованих мишей. Отримані дані показали тенденцію до збільшення кількості лімфоїдних клітин в селезінці на 14,34% в групі тварин, які отримували ПБГ *Ganoderma lucidum* у дозі 0,5 мг/кг, порівняно з групою контролю.

Вплив ПБГ *Ganoderma lucidum* на РГСТ проявлявся у збільшенні індексу реакції у 2,4 раза при введенні ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозі 0,5 мг/кг порівняно з групою контролю (контроль – $4,7 \pm 1,5$ %, введення ПБГ *Ganoderma lucidum* у дозі 0,5 мг/кг – $11,5 \pm 2,6$ %; $p < 0,05$), що вказує на активацію Т-клітинної ланки імунітету.

Введення ПБГ *Ganoderma lucidum* у дозі 0,5 мг/кг протягом 10 діб мишам лінії СВА/Са з експериментальним імунодефіцитом приводило до достовірного збільшення (у 7,4 раза) кількості перитонеальних макрофагів майже до показників групи негативного контролю (НК – група тварин, яким вводили розчинник). Застосування означеної дози біомаси відновлювало фагоцитарну активність макрофагів (ФА збільшувалась в 1,4 раза, ФІ – в 1,2 раза), майже до показників групи негативного контролю (табл.3).

Лікувальне введення ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозі 0,5 мг/кг протягом 10 днів мишам лінії СВА/Са з модельованим вторинним імунодефіцитом приводило до достовірного відновлення масових коефіцієнтів та клітинності лімфоїдних органів порівняно з групою позитивного контролю (ПК – тварини з модельованим імунодефіцитом, викликаним одноразовим внутрішньоочеревинним введенням циклофосфаміду у дозі 150 мг/кг, які не отримували лікування).

Вплив ПБГ *Ganoderma lucidum* на показники фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів мишей лінії СВА/Са з модельованим імунодефіцитом (M ± m)

Показник Групи тварин	Кількість перитонеальних макрофагів, $\times 10^6$	Фагоцитарний індекс, %	Фагоцитарна активність, ум.од	Фагоцитарне число, ум.од
Негативний контроль (n = 10)	12,6 ± 0,3	66,5 ± 3,9	2,6 ± 0,2	3,9 ± 0,2
Позитивний контроль (n = 10)	1,6 ± 0,2*	50,0 ± 2,6*	1,6 ± 0,1*	3,2 ± 0,2*
ЦФ + ПБГ <i>Ganoderma lucidum</i> 0,5 мг/кг (n = 10)	11,8 ± 0,6# α	60,5 ± 4,0#	2,2 ± 0,2#	3,5 ± 0,3
ЦФ + Ехінацея 12,85 мг/кг (n = 10)	6,5 ± 0,2*#	65,0 ± 4,1#	2,2 ± 0,2#	3,3 ± 0,2*

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з негативним контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з позитивним контролем; α – $p < 0,05$ порівняно з введенням препарату ехінацеї; n – кількість тварин у групі

Маса тимусу зростала в 1,5 раза (ПК – $9,1 \pm 0,01$ мг, введення ПБГ *Ganoderma lucidum* – $13,5 \pm 1,1$; $p < 0,05$), кількість лімфоїдних клітин в тимусі – в 10,5 разів (ПК – $1,9 \pm 0,04 \times 10^6$, введення ПБГ *Ganoderma lucidum* – $20,0 \pm 2,7 \times 10^6$, $p < 0,05$), індекс заселення лімфоїдними клітинами тимусу – в 7 разів (ПК – $0,2 \pm 0,004$, введення ПБГ *Ganoderma lucidum* – $1,4 \pm 0,1$; $p < 0,05$), кількість лімфоїдних клітин в селезінці (ПК – $198,0 \pm 2,7 \times 10^6$, введення ПБГ *Ganoderma lucidum* – $290,0 \pm 24,1 \times 10^6$; $p < 0,05$), кількість ядровмісних клітин в стегновій кістці в – 1,9 раза (ПК – $15,5 \pm 3,4 \times 10^6$, введення ПБГ *Ganoderma lucidum* – $30,0 \pm 2,7 \times 10^6$; $p < 0,05$).

В умовах гематотоксичної дії ЦФ лікувальне введення ПБГ *Ganoderma lucidum* у дозі 0,5 мг/кг чинило нормалізуючий вплив на формулу крові мишей лінії СВА/Са та відмічалось збільшенням кількості еритроцитів у 2,2 раза ($p < 0,05$) порівняно з групою позитивного контролю.

Застосування ПБГ *Ganoderma lucidum* мишам лінії СВА/Са з індукованою імуною недостатністю достовірно відновлювало порушення проліферативної активності спленоцитів у відповідь на введення В- і Т-клітинних мітогенів (рис.2).

Лікувальне введення ПБГ *Ganoderma lucidum* мишам лінії СВА/Са з модельованим вторинним імунодефіцитом приводило до достовірного відновлення відносної та абсолютної кількості АУК у 2,1 раза порівняно з показниками групи позитивного контролю (табл.4).

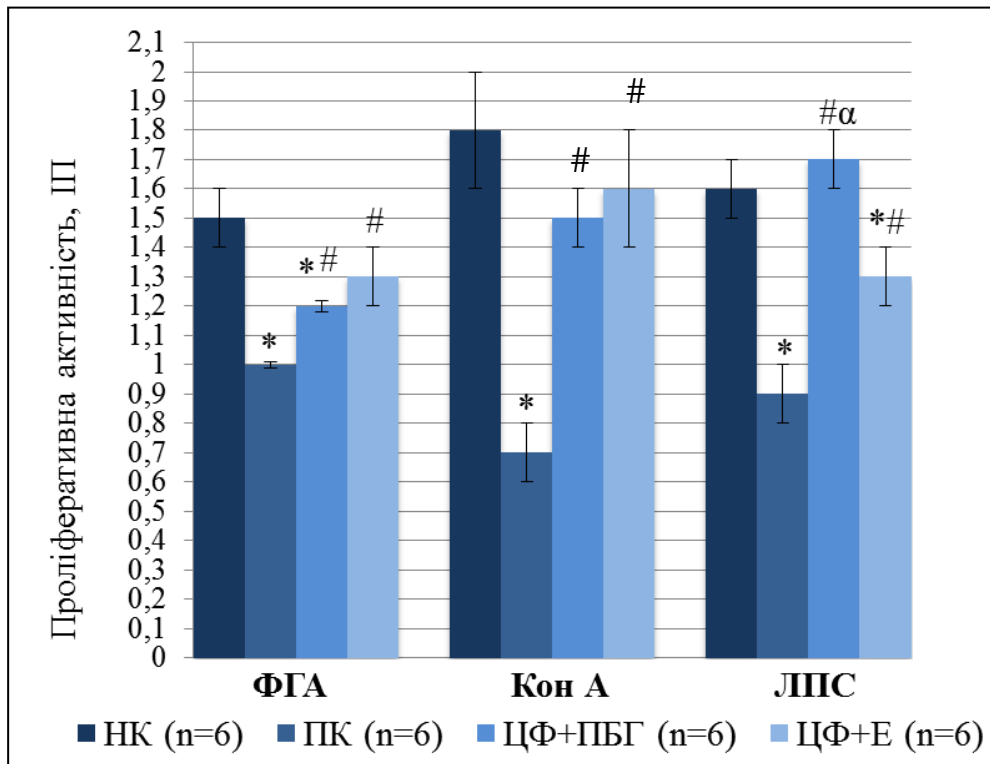


Рис.2 Вплив ПБГ *Ganoderma lucidum* на мітоген-активовану проліферативну активність спленоцитів мишей лінії SWA/Са з експериментальним імунодефіцитом ($M \pm m$)

Примітка. ФГА – фітогемаглютинін; КонА – конканавалін А; ЛПС – ліпополісахарид; НК – негативний контроль; ПК – позитивний контроль; * – $p < 0,05$ порівняно з негативним контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з позитивним контролем; α – $p < 0,05$ порівняно з введенням препарату ехінацеї; n – кількість тварин у групі

Таблиця 4

Вплив ПБГ *Ganoderma lucidum* на показники гуморального імунітету мишей лінії SWA/Са з модельованим вторинним імунодефіцитом ($M \pm m$)

Показник / Групи тварин	Кількість АУК на $1 \cdot 10^6$ спленоцитів	Кількість АУК на селезінку, $1 \cdot 10^3$	Титр гемолізину, \log_2	Титр гемаглютиніну, \log_2
Негативний контроль (n = 6)	$49,3 \pm 4,9$	$12,7 \pm 1,2$	$5,7 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,9$
Позитивний контроль (n = 12)	$10,4 \pm 1,2^*$	$3,6 \pm 0,5^*$	$0,7 \pm 0,1^*$	$1,7 \pm 0,3^*$
ЦФ+ ПБГ <i>Ganoderma lucidum</i> 0,5 мг/кг (n = 6)	$20,0 \pm 0,7^* \#$	$7,7 \pm 1,3^* \#$	$4,7 \pm 1,2 \#$	$4,0 \pm 0,6 \#$
ЦФ + Ехінацея 12,85 мг/кг (n = 6)	$19,3 \pm 0,6^* \#$	$5,7 \pm 0,3^* \#$	$4,7 \pm 0,8 \#$	$3,7 \pm 0,6 \#$

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з негативним контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з позитивним контролем; n – кількість тварин у групі

Введення ПБГ *Ganoderma lucidum* на тлі ЦФ-індукованої імуносупресії сприяло достовірному зростанню титру антитіл в сироватці крові: титр ГЛ у лікованих тварин перевищував аналогічний показник у групі позитивного контролю у 6,7 раза, відновившись майже до показників групи негативного контролю. Титр ГА збільшувався у 2,4 раза, майже досягаючи рівня показників групи негативного контролю, у той час як препарат ехінацеї спричиняв збільшення означеного показника у 2,2 раза.

Дослідження впливу ПБГ *Ganoderma lucidum* на РГСТ мишей з модельованим вторинним імунодефіцитом показало, що введення біомаси в дозі 0,5 мг/кг сприяло збільшенню індексу реакції ГСТ на 37,18% порівняно з групою позитивного контролю.

Результати вивчення впливу ПБГ *Ganoderma lucidum* на показники гуморального та клітинного імунітету, а також на фактори, які беруть участь у неспецифічному та специфічному імунітеті при модельованому імунодефіциті у мишей лінії СВА/Са показали, що досліджуваний засіб сприяв нормалізації аналізованих показників.

ВИСНОВКИ

Зниження імунної реактивності населення України зумовлює необхідність розробки лікувально-профілактичних засобів, що діють на імунну систему організму. Особливий інтерес представляють імуномодуляторні засоби природного походження, у тому числі на основі базидіальних грибів, які характеризуються мінімальною побічною дією. Впровадження нових лікувально-профілактичних засобів з імуномодуляторною активністю на основі базидіальних грибів потребує розробки новітніх методів культивування та підтвердження ефективності даних сполук. У проведених дослідженнях представлено теоретичне узагальнення та нове вирішення наукової задачі, яке полягає в експериментальному обґрунтуванні доцільності застосування порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum* як імуномодуляторного засобу. Розроблено перспективний фармакологічний агент для подальшого дослідження – порошок біомаси гриба *Ganoderma lucidum* з метою створення на його основі лікувально-профілактичного засобу з імуномодуляторною активністю.

1. Розроблені біотехнологічні умови щодо стандартизації складу живильного середовища (глюкозо-пептонне з дріжджовим екстрактом), температури ($t=28\pm 1^\circ\text{C}$), кислотності середовища ($\text{pH}=5$) та терміну культивування (16 діб) для отримання біомаси гриба *Ganoderma lucidum* з вмістом суми полісахаридів 10,65%.

2. Вивчення гострої токсичності порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum* за умов внутрішньошлункового введення в дозі 5000 мг/кг встановило, що досліджувана біомаса належить до IV класу токсичності – малотоксичні речовини.

3. Встановлена відсутність токсичного впливу ПБГ *Ganoderma lucidum* при пероральному введенні протягом 1, 3 та 6 місяців в дозах 0,5 мг/кг, 5 мг/кг, 50 мг/кг та 500 мг/кг на показники функціонального стану печінки, нирок, ліпідного обміну,

антиоксидантної системи експериментальних тварин.

4. При введенні ПБГ *Ganoderma lucidum* здоровим мишам лінії СВА/Са протягом 30 діб найбільш ефективною дозою є 0,5 мг/кг, при застосуванні якої спостерігали збільшення показників гуморальної та клітинної імунної відповіді: відносна кількість АУК в селезінці зростала в 4,1 раза, абсолютна кількість АУК – в 5,1 раза, титр ГЛ і ГА – в 1,3 та 1,5 раза відповідно, індекс реакції ГСТ збільшувався в 2,4 раза порівняно з групою контролю.

5. Застосування ПБГ *Ganoderma lucidum* у дозі 0,5 мг/кг протягом 30 діб здоровим тваринам не викликало патологічних змін у гістологічній будові тимусу та селезінки, а також співвідношенні білої та червоної пульпи останньої. Крім того, спостерігали збільшення середнього розміру лімфатичного острівця селезінки в 1,6 раза порівняно з контролем. У групі тварин, які отримували ПБГ *Ganoderma lucidum*, відмічалась міграція тимоцитів у периферичну кров, що може свідчити про активацію реакцій клітинного імунітету.

6. Введення ПБГ *Ganoderma lucidum* протягом 10 діб у дозі 0,5 мг/кг мишам лінії СВА/Са з модельованим вторинним імунодефіцитом викликало збільшення (у 7,4 раза) кількості перитонеальних макрофагів, відновлювало фагоцитарну активність макрофагів (збільшувало ФА в 1,4 раза та ФІ в 1,2 раза). Застосування означеної дози ПБГ *Ganoderma lucidum* приводило до відновлення масових показників та клітинності лімфоїдних органів, справляло нормалізувальний вплив на кількість еритроцитів у периферичній крові, формулу крові, сприяло відновленню порушення мітоген-стимульованої проліферативної активності спленоцитів, викликане циклофосамідом, а також показників гуморальної та клітинної імунної відповіді: відносна та абсолютна кількість АУК в селезінці зростала в 2,1 раза, рівень ГЛ в сироватці крові збільшувався в 6,7 раза, рівень ГА – в 2,4 раза, індекс реакції ГСТ збільшувався на 37,18% порівняно з групою позитивного контролю.

7. Результати фармакологічного та токсикологічного вивчення ПБГ *Ganoderma lucidum* стали обґрунтуванням для проведення подальших досліджень з метою впровадження даного об'єкту як лікарського засобу з імуномодуляторною дією, що може застосовуватись при вторинних імунодефіцитах.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Influence of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. on T-cell-mediated immunity in normal and immunosuppressed mice line CBA/Ca / I. V. Nizhenkovska, V. T. Pidchenko, N. G. Bychkova, N. A. Bisko, A. Y. Rodnichenko, N. O. Kozyko // Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti – 2015. – Vol. 64, №4. – P. 139–143. (Внесок дисертанта – проведення експериментальної частини дослідження, участь в аналізі даних, підготовка статті до друку).

2. Вплив гриба GANODERMA LUCIDUM (CURT.:FR.) P. KARST. на гуморальну імунну відповідь у мишей лінії СВА/СА з вторинним імунодефіцитом / В. Т. Підченко, І. В. Ніженковська, Н. Г. Бичкова, Н. А. Бісько, А. Є. Родніченко //

Фармацевт. часопис. – 2015. – № 2. – С. 94–100. (*Внесок дисертанта – проведення експериментальної частини дослідження, участь в аналізі даних, підготовка статті до друку*).

3. Вплив гриба *Ganoderma lucidum* (CURT.:FR.) P. Karst. на неспецифічну імунну відповідь у мишей лінії СВА/Са з вторинним імунодефіцитом / І. В. Ніженковська, В. Т. Підченко, Н. Г. Бичкова, Н. А. Бісько, А. Є. Родніченко, Н. О. Козіко // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупика. – Київ : НМАПО ім. П.Л. Шупика, 2015. – Вип. 24, кн. 2. – С. 315–322. (*Внесок дисертанта – проведення експериментальної частини дослідження, участь в аналізі даних, підготовка статті до друку*).

4. Вплив гриба *Ganoderma lucidum* (CURT.:FR.) P. KARST. на проліферативну активність спленоцитів у мишей лінії СВА/Са з вторинним імунодефіцитом / В. Т. Підченко, І. В. Ніженковська, Н. Г. Бичкова, Н. А. Бісько, А. Є. Родніченко, Н. О. Козіко // Український біофармацевтичний журнал. – 2015. – № 4. – С. 17–22. (*Внесок дисертанта – проведення експериментальної частини дослідження, участь в аналізі даних, підготовка статті до друку*).

5. Підченко В. Т. Визначення сумарного вмісту полісахаридів біомаси гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. / В. Т. Підченко // Фітотерапія. Часопис. – 2015. – № 3. – С. 58–62.

6. Влияние *Ganoderma lucidum* (CURT.:FR.) P. KARST. на активность факторов, участвующих в специфическом иммунитете у мышей линии СВА/Са с вторичным иммунодефицитом / И. В. Ниженковская, В. Т. Пидченко, Н. Г. Бычкова, Н. А. Бисько, А. Е. Родниченко, Н. А. Козико // Рецепт. – 2015. – № 4. – С. 67–78. (*Внесок дисертанта – проведення експериментальної частини дослідження, участь в аналізі даних, підготовка статті до друку*).

7. Пат. 97452 Україна, МПК G 01 N 35/00. Спосіб оцінки імунотоксичної дії водного розчину міцелію гриба *Ganoderma lucidum* / В. Т. Підченко, І. В. Ніженковська, Н. А. Бісько, Н. Г. Бичкова, А. Є. Родніченко ; заявник та патентовласник Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця. – № u201411786; заявл. 31.10.2014 ; опубл. 10.03.2015, Бюл. № 5. – 5с. (*Внесок дисертанта: здійснення патентного пошуку, участь в експерименті, підготовка патенту*).

8. Пат. 99004 Україна, МПК G 01 N 33/68. Спосіб визначення імунотропної дії біомаси гриба *Ganoderma lucidum* / В. Т. Підченко, І. В. Ніженковська, Н. А. Бісько, Н. Г. Бичкова, А. Є. Родніченко; заявник та патентовласник Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця. – № u201413624 ; заявл. 19.12.2014; опубл. 12.05.2015, Бюл. № 9. – 5с. (*Внесок дисертанта: здійснення патентного пошуку, участь в експерименті, підготовка патенту*).

9. Пат. 101556 Україна, МПК G 01 N 33/48, G 06 M 11/02, A 61 K 36/074. Спосіб оцінки впливу різних доз біомаси гриба *Ganoderma lucidum* на гуморальну імунну відповідь / В. Т. Підченко, І. В. Ніженковська, Н. А. Бісько, Н. Г. Бичкова, А. Є. Родніченко; заявник та патентовласник Нац. мед. ун-т ім. О.О. Богомольця. – № u201501111 ; заявл. 11.02.2015 ; опубл. 25.09.2015, Бюл. № 18. – 5с. (*Внесок дисертанта: здійснення патентного пошуку, участь в експерименті, підготовка патенту*).

10. Серета П. І. Визначення гострої токсичності водного розчину висушеного міцелію гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. / П. І. Серета, В. Т. Підченко // Клінічна фармація: 20 років в Україні : матеріали Нац. конгресу, 21-22 берез. 2013 р. – Харків, 2013. – С. 211–212.
11. Биотехнология выращивания биомассы гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. / П. И. Серета, Н. А. Бисько, Н. А. Козико, В.Т. Пидченко // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции : сб. науч. трудов. – Пятигорск : Пятигор. мед.-фармацевт. ин-т – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, 2013. – Вып. 68. – С. 206–209.
12. Пидченко В. Т. Определение токсичности высушенного мицелия гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst., полученного методом глубинного культивирования / В. Т. Пидченко // Молодая фармация – потенциал будущего : сб. материалов 4 Всерос. науч. конф. студентов и аспирантов с междунар. участием, г. Санкт-Петербург, 14-15 апр. 2014 г. – Спб. : Изд-во СПХФА, 2014. – С. 515–517.
13. Pidchenko V. T. The effect of different doses of biomass powder of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. on humoral immune response in mice line CBA/Ca / V. T. Pidchenko // The third European conference on biology and medical sciences, Vienna, 28th october 2014 : proceedings. – Vienna. 2014. –P. 111–117.
14. Вплив різних доз водного розчину міцелію гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. на Т-клітинний імунітет у мишей лінії CBA/Ca / І. В. Ніженковська, Н. Г. Бичкова, А. Є. Родніченко, В. Т. Підченко // Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії : матеріали 1 Міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 7-8 листоп. 2014 р. – Харків : НФаУ, 2014. – С. 130–131.
15. Пидченко В. Т. Исследование показателей хронической токсичности биомассы гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst., полученной методом глубинного культивирования / В. Т. Пидченко // Инновации в медицине и фармации – 2015 : материалы дистанц. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых. – Минск : БМГУ, 2015. – С. 925–930.
16. Підченко В. Т. Вплив гриба *Ganoderma lucidum* на морфологічні показники тимусу мишей лінії CBA/Ca / В. Т. Підченко, І. В. Ніженковська // Актуальні питання теоретичної, практичної та експериментальної фармації : зб. наук. робіт учасників Всеукр. наук.-практ. конф., м. Вінниця, 16 берез. 2016 р. – Вінниця, 2016. – С. 101–103.
17. Підченко В. Т. Вплив гриба *Ganoderma lucidum* на морфологічні показники селезінки мишей лінії CBA/Ca / В. Т. Підченко, І. В. Ніженковська // Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин : матеріали 2 Міжнар. наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 21-23 берез. 2016 р. – Харків : НФаУ, 2016. – С. 193–195.
18. Ніженковська І. В. Дослідження впливу температурного режиму на культивування гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. / І. В. Ніженковська, В. Т. Підченко, Н. А. Бисько // Фармація ХХІ століття: тенденції та перспективи : матеріали 8 Нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 13-16 верес. 2016 р. : у 2 т. – Харків, 2016. – Т. 1. – С. 123.

АНОТАЦІЯ

Підченко В.Т. Експериментальне обґрунтування імуномодуляторної активності та нешкідливості порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P.Karst. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2016.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню імуномодуляторної активності та нешкідливості порошку біомаси гриба (ПБГ) *Ganoderma lucidum* при експериментальному імунодефіциті.

Встановлено, що біомаса гриба *Ganoderma lucidum* (штам 1900), отримана методом культивування на глюкозо-пептонному живильному середовищі з дріжджовим екстрактом, в умовах одноразового внутрішньошлункового введення відноситься до речовин IV класу токсичності – малотоксичні речовини.

Доведена відсутність токсичного впливу ПБГ *Ganoderma lucidum* при введенні протягом 1, 3 та 6 місяців на показники функціонального стану печінки, нирок, ліпідного обміну, антиоксидантної системи піддослідних тварин.

Встановлено, що застосування ПБГ *Ganoderma lucidum* протягом 30 діб приводить до підвищення активності чинників як гуморальної, так і клітинної імунної відповіді здорових тварин.

Встановлено, що лікувальне введення ПБГ *Ganoderma lucidum* протягом 10 діб мишам лінії СВА/Са з модельованим вторинним імунодефіцитом (викликаним введенням циклофосфаміду) викликає відновлення фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів. Застосування ПБГ *Ganoderma lucidum* сприяє також відновленню показників гуморального та клітинного імунітету, чинить нормалізувальний вплив на масові коефіцієнти та клітинність лімфоїдних органів тварин з модельованим вторинним імунодефіцитом.

Ключові слова: гриб *Ganoderma lucidum*, експериментальний вторинний імунодефіцит, циклофосфамід, імуномодуляторна активність, порошок біомаси гриба *Ganoderma lucidum*.

АННОТАЦИЯ

Пидченко В.Т. Экспериментальное обоснование иммуномодуляторной активности и безопасности порошка биомассы гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P.Karst. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2016.

Диссертационная работа посвящена фармакологическому изучению порошка биомассы гриба (ПБГ) *Ganoderma lucidum*, полученного методом культивирования на жидкой питательной среде (глюкозо-пептонной с дрожжевым экстрактом).

В рамках исследования условий культивирования было установлено, что оптимальной средой для получения биомассы гриба *Ganoderma lucidum* (штамм 1900)

является глюкозо-пептонная среда с дрожжевым экстрактом. Оптимальными условиями были определены следующие параметры: температура ($t=28\pm 1^\circ\text{C}$), кислотность среды ($\text{pH}=5$) и длительность культивирования (16 суток). Содержание суммы полисахаридов в полученной биомассе составляет 10,65%.

В рамках исследования острой токсичности было установлено, что ПБГ *Ganoderma lucidum* относится к IV классу токсичности – малотоксичные вещества, по классификации К. К. Сидорова, поскольку однократное внутрижелудочное введение мышам линии СВА/Са и крысам линии Вистар максимальной дозы (для данного пути введения) 5000 мг/кг не приводило к гибели животных. Доказано отсутствие токсического воздействия ПБГ *Ganoderma lucidum* при введении в течение 1, 3 и 6 месяцев на показатели функционального состояния печени, почек, липидного обмена, антиоксидантной системы экспериментальных животных. Введение ПБГ *Ganoderma lucidum* во всех исследуемых дозах приводило к снижению уровня общего холестерина в сыворотке крови через 3 и 6 месяцев, однако эти показатели оставались в пределах физиологических норм для данного вида экспериментальных животных.

Определена наиболее эффективная доза ПБГ *Ganoderma lucidum* – 0,5 мг/кг. Установлено, что применение ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозе 0,5 мг/кг в течение 30 суток приводит к повышению активности факторов как гуморального, так и клеточного иммунного ответа здоровых животных. При применении ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозе 0,5 мг/кг мышам линии СВА/Са возрастает абсолютное количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенке в 5,1 раза, относительное количество АОК – в 4,1 раза, а также уровень антител в сыворотке крови (гемолизин – на 48,94%, гемагглютининов – на 32,86%), что указывает на иммуномодулирующее действие исследуемого ПБГ.

Результаты исследования влияния ПБГ *Ganoderma lucidum* на Т-клеточные реакции здоровых мышей, которые проявляются по типу реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), показали увеличение индекса реакции в 2,4 раза по сравнению с контролем.

Установлено, что применение ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозе 0,5 мг/кг на протяжении 30 суток не вызывает патологических изменений в гистологическом строении тимуса и селезенки здоровых мышей СВА/Са, а также в соотношении белой и красной пульпы последней. Кроме того, наблюдалось увеличение среднего размера лимфатического островка селезенки по сравнению с контрольной группой. Установлена миграция тимоцитов в периферическую кровь, что может свидетельствовать об активации реакций клеточного иммунитета.

Установлено, что лечебное введение ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозе 0,5 мг/кг в течение 10 дней мышам линии СВА/Са с моделированным вторичным иммунодефицитом (вызванным однократным внутрибрюшинным введением циклофосфамида в дозе 150 мг/кг) вызывает восстановление фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов. Количество перитонеальных макрофагов возросло в 7,4 раза, их фагоцитарная активность увеличивалась в 1,4 раза, фагоцитарный индекс – в 1,2 раза по сравнению с группой позитивного контроля.

Применение ПБГ *Ganoderma lucidum* способствует также восстановлению массовых показателей и клеточности лимфоидных органов, нормализации формулы

крови, а также восстановлению нарушений митоген-стимулированной пролиферативной активности спленоцитов на введение Т- и В- клеточных митогенов, вызванных введением циклофосфамида. Установлено, что введение ПБГ *Ganoderma lucidum* в дозе 0,5 мг/кг в течение 10 дней мышам линии СВА/Са с экспериментальным вторичным иммунодефицитом способствует восстановлению показателей гуморального и клеточного иммунного ответа: абсолютное и относительное количество АОК в селезенке возрастало в 2,1 раза, титр гемолизина в сыворотке крови – в 6,7 раза, титр гемагглютининов – в 2,4 раза, индекса реакции ГЗТ – на 37,18% по сравнению с группой позитивного контроля.

Таким образом, экспериментально обоснована целесообразность применения ПБГ *Ganoderma lucidum* в качестве иммуномодулирующего средства. Разработан перспективный фармакологический агент для дальнейших исследований – порошок биомассы гриба *Ganoderma lucidum* с целью создания на его основе лечебно-профилактического средства с иммуномодулирующей активностью.

Ключевые слова: гриб *Ganoderma lucidum*, экспериментальный вторичный иммунодефицит, циклофосфамид, иммуномодулирующая активность, порошок биомассы гриба *Ganoderma lucidum*.

SUMMARY

Pidchenko V.T. Experimental justification of immunomodulating activity and safety of biomass powder of fungus *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P.Karst.. – The manuscript.

The thesis for a Candidate of Pharmaceutical Sciences Degree in speciality 14.03.05 – Pharmacology. – National University of Pharmacy of Ministry of Healthcare of Ukraine, Kharkiv, 2016.

The thesis is devoted to the investigation of immunomodulatory activity and safety of biomass powder (BP) of fungus *Ganoderma lucidum* in experimental immunodeficiency.

It was found that the biomass of the fungus *Ganoderma lucidum* (strain 1900), obtained by cultivation on glucose-peptone culture medium supplemented with yeast extract, under the single intragastric administration belongs to the toxicity class IV – substances of low toxicity.

There were no toxic effects of BP of fungus *Ganoderma lucidum* when administered for 1, 3 and 6 months on functional state of the liver, kidneys, as well as on lipid metabolism, and antioxidant system of experimental animals.

It was found that the use of BP of the fungus *Ganoderma lucidum* for 30 days leads to the increase of the activity both humoral and cellular immune responses in intact animals.

It was established that oral administration of BP for 10 days to mice CBA / Ca with simulated secondary immunodeficiency (due to the introduction of cyclophosphamide) results in the restoration of phagocytic activity of peritoneal macrophages. Application BP of fungus *Ganoderma lucidum* also promote the restoration of humoral and cellular immunity, has a normalizing effect on weight indices and cellularity of lymphoid organs from animals with simulated secondary immunodeficiency.

Key words: fungus *Ganoderma lucidum*, experimental immunodeficiency, cyclophosphamide, immunomodulatory activity, biomass powder of fungus *Ganoderma lucidum*.