

Ставский Евгений Александрович,
д.м.н., доцент, НГМУ,
Новосибирск
Stavsky Evgeniy Aleksandrovich,
MD, DSc, Associate Professor, NSMU,
Novosibirsk

Теплякова Тамара Владимировна,
д.б.н., профессор, ГНЦ ВБ «Вектор»,
НСО, п. Кольцово

Мадонов Павел Геннадьевич,
д.м.н., доцент, НГМУ

Ермаченко Максим Александрович,
преподаватель, НГМУ,
Новосибирск

Шантурова Татьяна Владимировна,
заведующая учебным виварием НГМУ,
Новосибирск

**ОЦЕНКА ТРОМБОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ВЫСШИХ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ IN VITRO
EVALUATION OF THROMBOLYTIC PROPERTIES
OF HIGHER BASIDIOMYCETES IN VITRO**

Аннотация: В статье представлены результаты поиска среди высших базидиомицетов грибов, обладающих биологическими активными веществами с тромболитическими свойствами. Исследованы образцы из семи видов базидиомицетов и одного нематофагового гриба из коллекции лаборатории микологии ФБУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора с использованием двух экспресс-методов *in vitro*. Показано, что биологически активные субстанции грибов *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius* и *Inonotus obliquus* обладают тромболитическими свойствами.

Abstract: The article presents the results of the search among higher basidiomycetes fungi possessing biologically active substances with thrombolytic properties. Samples of seven species of basidiomycetes and one nematophagous fungus from the collection of the mycology laboratory of the Federal State Budgetary Scientific Institution of Virology and Biotechnology Vector of Rospotrebnadzor were studied using two express methods *in vitro*. It was shown that biologically active substances of the fungi *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius* and *Inonotus obliquus* possess thrombolytic properties.

Ключевые слова: грибы, базидиомицеты, тромболитические свойства

Keywords: fungi, basidiomycetes, thrombolytic properties

В настоящее время в практической медицине все чаще применяют протеолитические ферменты микроорганизмов. При этом особое внимание исследователей привлекают



протеиназы, обладающие фибринолитическими свойствами, а также способные лизировать тромбы. В частности, глутамилэндопептидаза, субтилизиноподобная протеиназа, металлопротеиназа и другие протеиназы, выделенные из *Bacillus pumilis* [1], *Bacillus subtilis* [2], *Bacillus intermedius* [3-5], *Bacillus amyloliquefaciens* и др [6-9]. В связи с широким распространением сердечно-сосудистых заболеваний актуальным является поиск новых ферментов с высокой биологической активностью, специфичностью и низкой токсичностью. Это направление исследований приобрело в последнее время особое значение в связи необходимостью профилактики и лечения постинфекционных тромбозов сосудов при COVID-19 [10]. Известно, что грибы содержат биологически активные вещества, такие как полисахариды, гликопротеины, терпены, стеролы, пигменты и др., которые могут проявлять антибактериальные, антивирусные, противоопухолевые, антипаразитарные, иммуномодулирующие и др. свойства [11-14]. Показано, что гриб чага *I. obliquus* способен улучшать реологию крови, этанольный экстракт мицелия и трипептид чаги препятствуют агрегации тромбоцитов мышей [21]. В связи с этим высшие базидиомицеты, способные синтезировать широкий комплекс биологически активных веществ, а также представители других систематических групп [15] могут оказаться перспективными для создания на их основе новых лекарственных средств различного назначения, включая тромболитики.

Целью исследования являлся поиск среди высших базидиомицетов из представителей высших базидиальных и хищных грибов, депонированных в коллекции лаборатории микологии ФБУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора, грибов, обладающих биологическими активными веществами с тромболитическими свойствами.

Исследовали образцы из семи видов базидиомицетов: *Fomes fomentarius* (плодовое тело) *Trametes versicolor* Кр-09-01, *Inonotus obliquus* (склероций), *Trametes pubescence* С-10-01, *Daedaleopsis confragosa* F-1368, *Lentinus edodes* 4080, *Pleurotus ostreatus* Н-09-01, а также несовершенного гриба, относящегося к нематофаговому грибу *Duddingtonia flagrans* F-882. В качестве объектов исследования использовали: водные растворы меланина, полученного из аптечного измельченного сырья природной чаги *Inonotus obliquus* согласно патенту [16]; водные экстракты из мицелия чаги и других грибов, полученных культивированием на жидких или плотных (агаризованных) питательных средах, а также водные растворы из сухих экстрактов грибов [11]. Тромболитические свойства указанных биологически активных комплексов грибов определяли *in vitro* в два этапа в экспериментальных тест-системах. На первом этапе проводили общий скрининг экспресс-методом, согласно которому о результатах лизиса тромба судили по уменьшению исходной площади фрагмента тромба после его инкубирования с изучаемой субстанцией гриба, во втором случае использовали метод, основанный на фиксации убыли массы фрагмента тромба (гравиметрический или весовой метод) после его инкубирования с изучаемой субстанцией гриба.

Кровь для формирования тромба получали от 15 крыс-самцов Wistar массой тела 280-300 г. Все животные содержались при естественном освещении на стандартном рационе при свободном доступе к корму и воде. Для исследования тромболитической эффективности экстрактов грибов аликвоты крови от крыс вносили в микропробирки объёмом 2,0 мл, где происходило дальнейшее формирование тромбов стандартных размеров в течение 24 ч. Образовавшийся тромб разрезали на фрагменты толщиной 0,8 мм и помещали в стандартные планшетные 96 луночные кюветы для спектрофотометрии. Определяли изначальную площадь тромба путем сканирования. Полученные образцы погружали в фосфатно-солевой буфер (ФСБ, рН 7,4). Затем в раствор добавляли исследуемые субстанции до концентрации 0,1 мг/мл и инкубировали смеси при температуре 37°C в течение 30 мин. Для каждой субстанции использовали по шесть образцов тромба. После инкубирования проводили повторное



сканирование образцов для выявления изменений площади тромба. В контрольных экспериментах проводили аналогичные манипуляции, но без добавления экстрактов. Площади тромба в первом и втором случаях рассчитывали с помощью специально разработанной программы.

Для исследования тромболитической эффективности экстрактов грибов гравиметрическим методом аликвоты крови от животных помещали в микропробирки объемом 2,0 мл, где происходило дальнейшее формирование тромбов стандартных размеров в течение 24 ч. Далее образовавшийся тромб разрезали на фрагменты массой не более 0,1-0,2 г. Уточняли изначальную массу тромба путем взвешивания и помещали в стандартные планшетные 96 луночные кюветы. Полученные образцы погружали в фосфатно-солевой буфер (рН 7,4). В раствор добавляли исследуемые субстанции в объеме 0,1 мл. При этом в ходе второго этапа провели оценку образцов, продемонстрировавших тромболитические свойства в ходе первого этапа исследований, а также образцов, оставшихся в достаточном количестве для продолжения их анализа. Далее образцы (по 6 образцов тромба для каждой субстанции) инкубировали при температуре 37°C в течение 60 и 180 мин. Проводили повторное взвешивание для выявления изменений массы тромба после указанных периодов инкубации. В контрольных экспериментах проводили аналогичные манипуляции, но без добавления экстрактов. Дополнительно следует отметить, что все манипуляции с тромбом при определении тромболитической активности препаратов грибов вышеуказанными двумя способами проводили в асептических условиях. Все данные статистически обрабатывали с помощью программ Microsoft Excel и Statistica. Достоверность различий средних величин оценивали по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$.

Результаты исследования различных препаратов из базидиальных и хищных грибов представлены в таблице. При этом в рамках первого метода исходная площадь каждого тромба была измерена и взята за 100 %.

Из данных, представленных в таблице, следует, что в контрольной группе без добавления исследуемых субстанций грибов, площадь тромба за 30 мин увеличилась на 3,21%. Данный феномен связан с чрезмерной плотностью суточного тромба, при инкубации он начинает поглощать фосфатно-солевой буферный раствор и временно увеличивается в объеме. Согласно полученным данным, статистически достоверным тромболитическим эффектом обладали водный экстракт из плодового тела гриба *Fomes fomentarius* (76,40%) и водный раствор сухого экстракта из склероция чаги *Inonotus obliquus* (66,03%). Слабую тромболитическую активность (9,5-10,68%) продемонстрировал водный раствор меланина из гриба чаги, однако при этом более высокую в сравнении с другими субстанциями изученных грибов.

Результаты определения тромболитической активности растворов субстанций некоторых высших базидиальных грибов гравиметрическим (весовым) методом показали, что только через 180 минут был получен видимый эффект. В частности, водный экстракт гриба *Trametes versicolor* Кр-09-01 полностью лизировал за 180 минут сгусток крови; водный раствор сухого экстракта чаги *Inonotus obliquus* также продемонстрировал, но менее выраженные тромболитические свойства (уменьшение за 180 минут массы тромбов на 30,55%, соответственно, по сравнению с контролем). При этом необходимо отметить, что концентрация водного экстракта гриба *Trametes versicolor*



Тромболитическая активность in vitro растворов
 субстанций высших базидиальных грибов

Исследуемые субстанции, наименование гриба	Масса сухого вещества, мг/мл	Площадь тромба через 30 мин после инкубации, % (n=6)	Изменение от первоначальной площади, %	Относительная масса тромба через 180 мин после инкубации, %	Изменение от первоначальной массы, %
Водный экстракт из плодового тела гриба <i>Fomes fomentarius</i>	6,0	23,60±11,97	-76,40	156,93±62,80	+56,9
Водный экстракт гриба <i>Trametes versicolor</i> Кр-09-01	22,0	96,72±12,89	-3,28	тромб растворился	тромб растворился
Водный экстракт гриба <i>Trametes versicolor</i> К-09-01	6,0	100,67±4,80	+0,67	н/и	н/и
Водный экстракт гриба <i>Trametes pubescence</i> С-10-01	23,5	103,65±3,89	+3,65	н/и	н/и
Водный раствор сухого экстракта чаги, <i>Inonotus obliquus</i>	2,0	33,97±11,49	-66,03	69,45±14,52	-30,55
Водный раствор меланина <i>Inonotus obliquus</i>	2,0	90,50±9,66	-9,50	100,00±31,90	0
Водный раствор меланина SH из гриба чаги	2,0	89,32±8,46	-10,68	107,78±20,91	+7,8
Водный экстракт гриба <i>Daedaleopsis confragosa</i> F-1368	15,45	94,12±9,30	-5,88	н/и	н/и
Водный экстракт гриба <i>Daedaleopsis confragosa</i> К-1323	13,3	95,28±4,48	-4,72	н/и	н/и



Водный экстракт гриба <i>Lentinus edodes</i> 4080	42,5	110,01±9,31	+10,01	н/и	н/и
Водный экстракт мицелия гриба <i>Pleurotus ostreatus</i> Н-09-01	4,16	94,40±9,86	-5,60	н/и	н/и
Водный экстракт мицелия гриба <i>Pleurotus ostreatus</i> К-09-26	4,25	105,97±8,35	+5,97	н/и	н/и
Водный экстракт поверхностной культуры нематофагового гриба <i>Duddingtonia flagrans</i> F-882	1,0	97,81±5,98	-2,18	н/и	н/и
Водный экстракт глубинной культуры культуры нематофагового гриба <i>Duddingtonia flagrans</i> F-882	14,58	103,21±1,01	+0,13	н/и	н/и
Контроль (тромб + ФСБ)		103,21±1,01	+3,21	230	+130

Примечание: "-" – снижение площади тромба от первоначальных значений; "+" – увеличение площади тромба от первоначальных показателей; н/и – не исследовали в связи с израсходованием материала.

Кр-09-01 (по сухому веществу) в реакционной смеси в 10 раз (см. табл.) превышала содержание в ней водного раствора сухого экстракта чаги *Inonotus obliquus*. Некоторые выявленные расхождения между показателями тромболитической активности ряда препаратов грибов в таблице в ходе исследований могут быть, скорее всего, связаны с разной чувствительностью применяемых методов, а также использованием не стандартизированных по содержанию в растворах грибов сухого вещества.

Настоящий трутовик (гриб *Fomes fomentarius*) растет на деревьях многих лиственных пород (берёза, бук, осина, ольха и др.) и обладает широким и разнообразным набором биологически активных субстанций. В плодовых телах трутовика настоящего обнаружены



более чем 10 сесквитерпенов [17], углеводы (полисахариды, хитин-глюкановый комплекс) [18]. На основе комплекса биополимеров гриба создан препарат Микотон, содержащий 70 % хитина, 20 % β -глюканов и 10 % меланинов. Препарат не токсичен и лишен побочных эффектов даже в больших дозах. Проявляет детоксикационные, генопротекторные, иммуномодулирующие, антиоксидантные, антихолестеринемические и антиинфекционные свойства. Микотон разрешен к использованию Минздравом Украины как биологически активная диетическая добавка [19]. Фильтраты культуры *Fomes fomentarius* проявляют активность против механической передачи вируса табачной мозаики [20]. Противовирусный эффект экстрактов из гриба отмечен в отношении ВИЧ-1, вируса гриппа H3N2, простого герпеса 2 типа [11].

Чага представляет собой бесплодную форму трутовика скошенного *Inonotus obliquus*, она поражает и развивается на стволах живых деревьев, преимущественно березы, в виде неправильных желвакообразных черных наростов. Природная чага издавна используется в народной и практической медицине, является фармакопейным препаратом. Следует отметить, что одним из свойств чаги является ее способность улучшать реологию крови. Это особенно важно при лечении от коронавируса SARS-CoV-2, так как при COVID-19 часто возникает угроза развития у больных тромбозов. В исследовании корейских ученых описывается экстракция и характеристика пептида из *Inonotus obliquus*, ингибирующего агрегацию тромбоцитов, показано, что этанольный экстракт мицелия *I. obliquus* ASI 74006 показал наивысшую ингибирующую активность в отношении агрегации тромбоцитов мышей (81,2%). Очищенный ингибитор агрегации тромбоцитов представляет собой новый трипептид с молекулярной массой 365 Да, имеющий последовательность Trp-Gly-Cys [21]. С учетом того, что водные экстракты и меланин из чаги ингибируют репликацию многих патогенных для человека вирусов [6], в том числе и SARS-CoV-2 [22] на основе чаги могут быть созданы противовирусные препараты широкого спектра действия. Факт выявления в ходе настоящих исследований у субстанций высших базидиомицетов *Fomes fomentarius*, *Trametes versicolor* и *Inonotus obliquus* тромболитических свойств делают перспективным рассматривать эти грибы наряду, например, с протеиназами бактерий *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus intermedius* и др [6-9] в качестве возможных источников создания на их основе новых тромболитических препаратов.

Таким образом, показано, что биологически активные субстанции грибов *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius* и *Inonotus obliquus* обладают тромболитическими свойствами, что позволяет рассматривать их в качестве продуцентов новых препаратов. Целесообразно продолжить дальнейшее изучение указанных грибов, а также других видов высших базидиальных и хищных грибов из коллекции лаборатории микологии ФБУН ГНЦ ВБ Вектор Роспотребнадзора для получения большей информации о перспективности их использования для создания на их основе новых лекарственных препаратов, и прежде всего, эффективных тромболитиков.

Список литературы:

1. Маликова Л.А., Марданова А.М., Соколова О.В. и др. Особенности биосинтеза внеклеточных субтилизиноподобных протеиназ, секретируемых *Bacillus pumilis* КММ 62. Ученые записки КГУ 2006; 148 (2): 90–101.
2. Kudrya V.A., Simonenko I.A. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994; 41: 505–9.
3. Ицкович Е.Л., Знаменская Л.В., Балабан Н.П. и др. Биосинтез щелочной внеклеточной протеиназы *Bacillus intermedius*. Микробиология 1995; 64 (5): 623–9.



4. Sharipova M.R., Shagimardanova E.I., Chastukhina I.B. et al. The expression of *Bacillus intermedius* glutamyl endopeptidase gene in *Bacillus subtilis* recombinant strains. *Mol. Biol. Rep.* 2007; 34: 79–87.
5. Balaban N.P., Kayumov A.R., Kirillova Yu. et al. The expression of the serine proteinase gene of *Bacillus intermedius* in *Bacillus subtilis*. *Microbiological Research* 2008; 163: 39–50.
6. Лютова Л.В., Андреев Г.В., Карабасова М.А. и др. Исследование тромболитических и фибринолитических свойств тиолзависимой сериновой протеиназы (ТСП) из *Thermoactinomyces vulgaris in vivo*. *Прикл. биохим. и микробиол.* 1990; 26 (5): 623–8.
7. Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2002; 59: 15–32.
8. Даниличев В.Ф., Кнорринг Г.Ю. Системная энзимотерапия при патологии глаз. *Кремлевская медицина. Клинический вестник* 2002; 3: 68–70.
9. Данилова Ю.В., Черёмин А.М., Замалева А.И., Марданова А.М., Замалютдинова Н.М., Шарипова М.Р. Тромболитическая и фибринолитическая активность бактериальных протеаз. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* Том VII, № 3, 2012 с. 49-51
10. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)/ Версия 12 (21/09/21). – 205с. – [https://diseases.medelement.com/disease/коронавирусная-инфекция covid-19-версия-12-кп-рф-2021/16889](https://diseases.medelement.com/disease/коронавирусная-инфекция-covid-19-версия-12-кп-рф-2021/16889) 9/1. (1-14).
11. Теплякова Т.В., Косонова Т.А. Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов. Новосибирск, 2014. – 298 с.
12. Сакович В.В. Базидиомицеты как источники биологически активных веществ/В.В. Сакович, Д.Д. Жерносеков//*Вестник Полесского государственного университета.*-2018.-№1.-с.3-13.
13. Bindhi, J. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activity of the ethanol extract of *Pleurotus ostreatus*/J.Bindhi [at al]//*Jornal of nature remains.*-2020.-Vol.20. – №2.-P.110-115.
14. Teplyakova T.V., Plyicheva T.N., Kosogova T.A. Higher Fungi Against Influenza Viruses. *International Journal of Medicinal Mushrooms*-2021.-23 (2).-P.1-11
15. Теплякова Т.В. Биоэкологические аспекты изучения и использования хищных грибов-гифомицетов.-Новосибирск, 1999,-299с.
16. Пат. 2480227 Российская Федерация, МПК А61К 36/06, А61К 31/785, А61Р 31/22, А61Р 31/12, А61Р 31/16, А61Р 31/18. Противовирусное средство на основе меланина / Т.В. Теплякова [и др.]; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». – № 2011127305/15; заявл. 01.07.2011; опубл. 27.04.2013, Бюл. № 12. – 11 с.
17. Jenny Faldt, Mats Jonsell, Goran Nordlander, Anna-Karin Borg-Karlson. Volatiles of Bracket Fungi *Fomitopsis pinicola* and *Fomes fomentarius* and their Function as Insect Attractants // *Journal of Chemical Ecology.* – 1999.– V. 25. – N 3. – P. 567-590
18. Кожемякина Н.В., Ананьева Е.П., Гурина С.В. Иммуностимулирующая активность некоторых базидиомицетов // *Имунопатология, Аллергология, Инфектология.* – 2010. – № 1. – С. 253-254
19. Сенюк О.Ф., Курочко Н.Ф., Горовой Л.Ф. Использование грибного препарата Микотон в лечении пациентов старческого возраста // *Имунопатология, Аллергология, Инфектология.* – 2010. – № 1. – С. 266
20. Aoki, Motomu Tan, Atsushi Fukushima, Tadaharu Hieda, Susumu Kubo, Muchiyo Takabayashi, Kuniaki Ono, and Yoichi Mikami. Antiviral Substances with Systemic Effects Produced by Basidiomycetes such as *Fomes fomentarius* // *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (2), 278 – 282, 1993



21. Hyun KW, Jeong SC, Lee DH, Park JS, Lee JS. Isolation and characterization of a novel platelet aggregation inhibitory peptide from the mushroom, medicinal *Inonotus obliquus*. *Peptides*. 2006;27 (6):1173-78

22. Пат. 2741714 Российская Федерация, МПК А61К 36/06, ВОИD 11/02, А61Р 31/14. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе водного экстракта гриба *Inonotus obliquus* / Т.В. Теплякова [и др.]; заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». – № 2020127270; 13.08.2020; опубли. 28.01.2021, Бюл. № 4. – 12 с.

