

**ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ БИОМАССЫ И ЭКСТРАКТОВ
ГРИБА *STEREUM HIRSUTUM* НА МЫШАХ***А.В. Малышев, магистрант**Д.А. Грушевская, младший научный сотрудник**Научный руководитель – Е.О. Юрченко, к.б.н.**Полесский государственный университет*

Стереум жестковолосистый – *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers. (Stereaceae, Russulales, Basidiomycota) известен как легко культивируемый гриб, обладающий антибактериальными [1] и антиоксидантными активностями [2]. В Беларуси он встречается часто в качестве сапротрофа на валеже, реже патогена стволов и ветвей лиственных древесных растений. Так как гриб может быть потенциальным продуцентом полезных веществ для фармацевтики, нами было предпринято биологическое тестирование (первичное испытание) его биомассы и водных вытяжек на предмет возможной токсичности. В качестве тест-системы выбраны мыши, которые считаются чувствительным объектом в отношении грибных токсинов при кормлении [3, с. 292] и подкожном введении вытяжек из грибов [3, с. 303].

Были испытаны 2 изолята (генотипа) гриба, полученные из плодовых тел, собранных в Пинском районе, а также непосредственно их плодовые тела *ex situ*: изолят 4-100918 с отмершей ветви дуба (*Quercus robur*); изолят 5-291019 с валежного ствола лещины (*Corylus avellana*). Экстракт получали из воздушно-сухих плодовых тел, не позднее 2 дней после их сбора в природе; навеску гриба (1 г) помещали в 10 мл раствора NaCl (9 г/л) и гомогенизировали в микропробирках типа «эппендорф»; суспензию настаивали 16–18 ч в холодильнике (4°C), после чего центрифугировали пробирки 10 мин при 7000 об./мин и 4°C. Надосадок из всех микропробирок переносили в стеклянную пробирку и стерилизовали в автоклаве 20 мин при 112°C.

Экстракт мицелия получали после культивирования *S. hirsutum* глубинно в картофельно-сахарозной среде (отвар клубней картофеля 200 г/л; 20 г/л сахарозы) в колбах объемом 500 мл на качалке при 70 об./мин при 24°C в течение 3 недель. Скопления мицелия отжимали от культуральной жидкости, взвешивали во влажном состоянии и получали экстракт из гомогената, как описано выше (1 весовая часть мицелия, 10 объемных частей физраствора). Все действия с мицелием велись в асептических условиях, поэтому экстракт не стерилизовали в автоклаве.

В качестве лабораторной модели использовали нелинейных белых мышей, здоровые особи обоего пола. За 24 ч до проведения испытаний и вплоть до момента введения веществ *S. hirsutum*, животных держали при постоянной температуре 20°C. За 2 ч до начала испытаний, а также за 2 ч до взвешивания и обора опытной партии (объем каждой выборки обозначен ниже как n), животные были лишены воды и корма. Применялось пероральное введение культуральной биомассы, подкожная и внутривенная инъекции экстрактов [4]. Впоследствии условия содержания и кормления (овес и вода) обеспечивали нормальную жизнедеятельность животных; в ходе испытаний отмечались их поведенческие реакции [5; ГОСТ 32296–2013].

Для перорального введения мицелий отжимали от культуральной жидкости, промывали дистиллированной водой, обезвоживали в сушильном шкафу, измельчали в ступке и суспендировали в воде для инъекций в соотношении 0.5 г/мл. Введение суспензии производилось при помощи металлического зонда в желудок, по 0.5 мл на животное.

При разведении образцов для инъекции применялся 0.9% раствор NaCl; перед разведением и инъекцией экстракты стерильно фильтровали через фильтровальную бумагу. Подкожная инъекция производилась в холку, 0.2 мл раствора со скоростью 0.1 мл/с, иглой 23G.

Внутривенное введение производилось согласно протоколу испытания аномальной токсичности [6], в виде тест-дозы объемом 0.5 мл, в хвостовую вену в течение 10 с, при этом мышь фиксировалась на платформе Braintree Scientific IL-300.

Результаты перорального введения (алиментарной пробы). Суспензия порошка культурального мицелия 4-100918 вводилась однократно (n = 5), при наличии контрольной группы (n = 5), которая содержалась в тех же условиях. Каждая мышь получила по 0.25 г биомассы в пересчете на сухой вес гриба. При массе тела в экспериментальной группе от 17 до 24 г, введенная доза составляла 10–15 мг сухого вещества/г массы тела, или 10–15 г/кг. Наблюдение за животными велось в течение 7 суток после кормления. Таким же образом был испытан культуральный мицелий 5-

291019; наблюдения велись 8 суток. В ходе обоих экспериментов не были отмечены какие-либо аномалий в поведении и состоянии здоровья (аппетит, аллергические реакции) животных. Из этого следует, что биомасса *S. hirsutum* из чистой культуры в указанной дозе не имеет острой токсичности для мышей.

Результаты подкожного введения. Известно, что данный путь введения менее толерантен к нефизиологическим значениям рН образца, чем внутривенный и внутримышечный, и возможно местнораздражающее действие испытуемого вещества или препарата. Был испытан экстракт плодовых тел образца 4-100918 в неразведенном виде, $n = 5$. Наблюдение на мышами велось в течение 7 суток после инъекции. В следующем эксперименте вводился неразведенный экстракт культурального мицелия 4-100918 ($n = 5$); наблюдение велось в течение 5 суток. В обоих экспериментах не было замечено морфологических отклонений в месте укола в виде вялости или покраснения, а также отклонений от нормы в поведении и состоянии здоровья мышей: аппетит нормальный, общих аллергических реакций нет. Из этого следует, что описанные экстракты гриба (100 г/л) безвредны при подкожной пробе.

Результаты внутривенного введения. Для инъекций были отобраны мыши с массой тела 19–21 г. В первом эксперименте был использован экстракт плодовых тел образца 4-100918, разведенный 1:4; $n = 10$. Наблюдение велось в течение 7 суток после инъекции. Во втором эксперименте был введен экстракт мицелия чистой глубинной культуры изолята 4-100918. При этом были сформированы три экспериментальные группы животных: без разведения ($n = 5$), разведение 1:1 ($n = 5$) и 1:2 ($n = 5$). Наблюдения велись в течение 3 суток после инъекции. Эксперимент с неразведенным экстрактом мицелия изолята 4-100918 был повторен позднее, при этом наблюдения велись 8 суток. Для всех описанных вариантов инъекций отклонений в поведении и общем состоянии здоровья мышей (аппетит, аллергические реакции) не наблюдалось, равно как не было отмечено отклонений от нормы (вялости или покраснения) в точке инъекции.

Дополнительно был испытан экстракт плодовых тел генотипа 5-291019, в неразведенном виде, $n = 5$. Наблюдение велось 8 суток после инъекции. Введение экстракта культурального мицелия 5-291019 проводилось по той же схеме ($n = 5$). Наблюдение велось в течение 7 суток. В обоих экспериментах с генотипом гриба 5-291019 не было отмечено изменений в поведении, аппетите, не наблюдались аллергические реакции или иные отклонения в здоровье мышей.

Считается, что лекарственная субстанция в заданной дозе не является токсичной, если ни одна из мышей не погибает в течение всего времени наблюдения. Наши эксперименты представляли собой предварительные испытания сложного комплекса неидентифицированных метаболитов гриба, попадающих в раствор при экстракции 0.9% NaCl из подсушенных плодовых тел или сырого мицелия. Безвредность данных метаболитов оценивалась по внешним эффектам на модели мелких грызунов. Для более глубокой оценки действия веществ *S. hirsutum* на организм млекопитающих необходимо препарирование веществ или их групп и их испытание с описанием параметров внутренней среды организма.

Исследования проводились при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант Б18-111.

Список использованных источников

1. Imtiaj, A. Molecular analysis of ITS region and antibacterial activities of *Stereum hirsutum* / A. Imtiaj, T.S. Lee, S. Ohga // J. Fac. Agr., Kyushu Univ. – 2011. – Vol. 56, No. 2. – P. 199–204.
2. Lee, J. The antioxidant properties of solid-culture extracts of basidiomycetous fungi / J. Lee, J.H. Hong, J.D. Kim [et al.] // J. Gen. Appl. Microbiol. – 2013. – Vol. 59, No. 4. – P. 279–285.
3. Билай, В.И. Изучение токсинообразующих грибов / В.И. Билай, З.А. Курбацкая // В кн.: Методы экспериментальной микологии: Справочник / Отв. ред. В.И. Билай. – К.: Наук. думка, 1982. – С. 287–315.
4. Shimizu, S. Routes of administration // In: The laboratory mouse / H.J. Hedrich, G. Bullock (eds). – Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press, 2004. – P. 527–541.
5. Руководство по работе с лабораторными животными для сотрудников ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, занятых проведением доклинических испытаний. – М.: Рос. нац. иссл. мед. ун-т им. Н.И. Пирогова, 2015. – 42 с.
6. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ. РБ II). В 2 т. / Под общ. ред. А.А. Шерякова. Т. 1. Общие методы контроля качества лекарственных средств. – Молодечно: Тип. «Победа», 2012. – 1220 с.