

**mgr Aleksander Roszczyk**

**Wpływ wzbogaconego selenem polisacharydu (Se-Le-30)  
izolowanego z grzybni *Lentinula edodes* na limfocyty T**

**Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych  
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Beata Kaleta

Promotor pomocniczy: dr n. wet. Katarzyna Zielniok

Zakład Immunologii Klinicznej

Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023

**Słowa kluczowe:** cytokiny, punkty kontrolne układu odpornościowego, immunomodulacja, Lentinula edodes, limfocyty T, polisacharydy, proliferacja, selen.

**Keywords:** cytokines, immune checkpoints, immunomodulation, Lentinula edodes, T lymphocytes, polysaccharides, proliferation, selenium.

# Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

(analiza bibliometryczna z biblioteki WUM nr 1)



WARSZAWSKI  
UNIwersytet  
MEDYCZNY

BIBLIOTEKA UCZELNIANA

Nr referencyjny  
BIBG/Punktacja/ 393 /2023/KK

Warszawa, 07.06.2023

Sz. Pan  
Aleksander Roszczyk

ANALIZA BIBLIOMETRYCZNA PUBLIKACJI  
PANA ALEKSANDRA ROSZCZYKA,  
WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Lp.	Opis bibliograficzny	Impact Factor	MEiN
Artykuły			
1.	<b>Roszczyk A</b> [aut. koresp.], Zych M, Zielniok K, Krata N, Turło J, Klimaszewska M, Zagożdżon R, Kaleta B. The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis. <i>Biomolecules</i> . 2022;12(12):1-14 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	6,064	100
2.	Kaleta B, <b>Roszczyk A*</b> , Zych M, Kniotek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Malinowska E, Pac M, Turło J. Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells. <i>Biomolecules</i> . 2021;11(12):1-12 * równorzędny pierwszy autor [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	6,064	100
3.	<b>Roszczyk A</b> , Turło J, Zagożdżon R, Kaleta B. Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from Lentinula edodes. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> . 2022;23(16):1-13 [Rodzaj publikacji: praca poglądowa]	6,208	140
Łącznie:		<b>18,336</b>	<b>340</b>
Książki			
1.	-		
Rozdziały w książkach			
1.	-		

ul. Żwirki i Wigury 63  
02-091 Warszawa  
www.biblioteka.wum.edu.pl

tel.: +48 22 116 60 11  
biblioteka@wum.edu.pl

p.o. DYREKTOR  
Biblioteki Uczelnianej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
*M. Czarnicka*  
mgr Agnieszka Czarnicka

# Wykaz publikacji z całkowitego dorobku

(analiza bibliometryczna z biblioteki WUM nr 2)



WARSZAWSKI  
UNIwersytet  
MEDYCZNY

BIBLIOTEKA UCZELNIANA

Nr referencyjny  
BIBG/Punktacja/ 394 /2023/KK

Warszawa, 07.06.2023

Sz. Pan  
Aleksander Roszczyk

## ANALIZA BIBLIOMETRYCZNA CAŁOKSZTAŁTU DOROBKU PUBLIKACYJNEGO PANA ALEKSANDRA ROSZCZYKA, W POSTĘPOWANIU O NADANIE STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA

Lp.	Opis bibliograficzny	Impact Factor	MEiN
I. Artykuły opublikowane w czasopiśmie naukowych lub w recenzowanych materiałach z konferencji międzynarodowych ujętych w aktualnym wykazie MEiN <sup>1</sup>			
1.	<b>Roszczyk A</b> [aut. koresp.], Zych M, Zielniok K, Krata N, Turlo J, Klimaszewska M, Zagożdżon R, Kaleta B. The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis. <i>Biomolecules</i> . 2022;12(12):1-14 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	6,064	100
2.	Kaleta B, <b>Roszczyk A*</b> , Zych M, Kniotek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Malinowska E, Pac M, Turlo J. Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells. <i>Biomolecules</i> . 2021;11(12):1-12 * równorzędny pierwszy autor [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	6,064	100
3.	<b>Roszczyk A</b> , Turlo J, Zagożdżon R, Kaleta B. Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from Lentinula edodes. <i>International Journal of Molecular Sciences</i> . 2022;23(16):1-13 [Rodzaj publikacji: praca poglądowa]	6,208	140
4.	Dymowska M, Aksamit A, Zielniok K, Kniotek M, Kaleta B, <b>Roszczyk A</b> , Zych M, Dąbrowski F, Pączek L, Burdzińska A. Interaction between Macrophages and Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Wharton's Jelly-A Comparative Study. <i>Pharmaceutics</i> . 2021;13(11):1-24 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	6,525	100

<sup>1</sup> Wykaz sporządzony zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. b Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r., poz. 574 z późn. zm.). Wykaz stanowi załącznik do komunikatu MEiN z 21 grudnia 2021 r. o zmianie i sprostowaniu komunikatu w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych.

5.	Kniotek M, <b>Roszczyk A</b> , Zych M, Wrzosek M, Szafarowska M, Zagożdżon R, Jerzak M. Sildenafil Citrate Downregulates PDE5A mRNA Expression in Women with Recurrent Pregnancy Loss without Altering Angiogenic Factors-A Preliminary Study. Journal of Clinical Medicine. 2021;10(21):1-12 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	4,964	140
6.	Zych M, <b>Roszczyk A</b> [aut. koresp.], Kniotek M, Dąbrowski F, Zagożdżon R. Differences in Immune Checkpoints Expression (TIM-3 and PD-1) on T Cells in Women with Recurrent Miscarriages—Preliminary Studies. Journal of Clinical Medicine. 2021;10(18):1-10 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	4,964	140
7.	Kniotek M, Zych M, <b>Roszczyk A</b> , Szafarowska M, Jerzak M. Decreased Production of TNF- $\alpha$ and IL-6 Inflammatory Cytokines in Non-Pregnant Idiopathic RPL Women Immunomodulatory Effect of Sildenafil Citrate on the Cellular Response of Idiopathic RPL Women. Journal of Clinical Medicine. 2021;10(14):1-16 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	4,964	140
8.	Kniotek M, <b>Roszczyk A</b> , Zych M, Szafarowska M, Jerzak M. Differences in the Expression of KIR, ILT Inhibitory Receptors, and VEGF Production in the Induced Decidual NK Cell Cultures of Fertile and RPL Women. BioMed Research International. 2021;2021:1-10 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	3,246	70
9.	Zych M, <b>Roszczyk A</b> , Kniotek M, Kaleta B, Zagożdżon R. Sildenafil Citrate Influences Production of TNF- $\alpha$ in Healthy Men Lymphocytes. Journal of Immunology Research. 2019;2019:1-6 [Rodzaj publikacji: praca oryginalna]	3,327	100
Łącznie:		46,326	1030
II. Artykuły opublikowane przed 1.01.2019 r. w czasopismach ujętych w wykazie czasopism MNiSW z dnia 25.01.2017 r., o ile czasopismo uzyskało co najmniej 10 pkt.			
Łącznie:		-	-
III. Pozostałe artykuły			
Łącznie:		-	-
Łącznie (cz. I- III):		<b>46,326</b>	<b>1030</b>
IV. Monografie naukowe/rozdziały w monografiach wydane przez wydawnictwa ujęte w wykazie MEiN <sup>2</sup> lub jednostki organizacyjne podmiotów, których wydawnictwa są ujęte w tym wykazie			
brak			
V. Pozostałe monografie lub rozdziały w monografiach			
brak			
VI. Patenty			
brak			

p.o. DYREKTOR  
Biblioteki Uczelnianej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
*mgr Agnieszka Czárnecka*

<sup>2</sup> Wykaz sporządzony zgodnie z przepisami wydanymi na podstawie art. 267 ust. 2 pkt 2 lit. a Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r., poz. 574 z późn. zm.). Wykaz ogłoszony komunikatem MEiN z dnia 22 lipca 2021 r. w sprawie wykazu wydawnictw publikujących recenzowane monografie naukowe.

## ŻYCIORYS NAUKOWY

### *Curriculum Vitae*

<b>Imię i nazwisko</b>	Aleksander Roszczyk
<b>Data i miejsce urodzenia</b>	31.05.1992 Warszawa
<b>Adres domowy</b>	ul. Św. Stanisława 8/15 01-162 Warszawa
<b>E-mail</b>	aleksander.roszczyk@wum.edu.pl
<b>Numer telefonu</b>	504 720 197

### **Wykształcenie**

- 1.10.2017 - obecnie      *Studia III stopnia (doktoranckie)*  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.  
Praca realizowana w Zakładzie Immunologii Klinicznej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.  
Tytuł: „Wpływ wzbogaconego selenem polisacharydu (Se-Le-30)  
izolowanego z grzybnii *Lentinula edodes* na limfocyty T”  
Promotor: dr hab. n. med. Beata Kaleta  
Promotor pomocniczy: dr n. wet. Katarzyna Zielniok
- 1.10.2012 – 30.05.2017      *Dyplom magistra analityki medycznej*  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.  
Tytuł pracy magisterskiej: „Wpływ cytrynianu sildenafilu na  
ekspresję KIR2DL1, NKG2A, LILRB-1,-2 na idNK, oraz na  
indukcję pbNK do idNK. Porównanie ekspresji CD9, CD49a,  
CD158a, CD159a, CD85d, CD85j na idNK między grupą kontrolną  
a grupą kobiet z poronieniami nawykowymi”.  
Promotor: dr n. med. Monika Kniotek

## **Zatrudnienie**

1.03.2023 – obecnie	Clinical Data Management Specialist, KCR Placement
12.2019 – 02.2023	Asystent, Zakład Immunologii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
04.2021 – 11.2022	Diagnosta Laboratoryjny, Centralny Szpital Kliniczny Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji w Warszawie
04.2020 – 01.2021	Diagnosta Laboratoryjny, Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny
03.2017 – 06.2020	Diagnosta Laboratoryjny, Pracownia Immunologii, Klinika Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Szpital Kliniczny Im. Dzieciątka Jezus
03.2017 – 12.2019	Pracownik inżynierjno – techniczny, Zakład Immunologii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

## **Znajomość języków obcych**

Język angielski- zaawansowany (C1)

Język ukraiński- początkujący (A2)

## **Konferencje i Kursy Szkoleniowe**

### **Międzynarodowe**

- Konferencja “Biologia-Medycyna-Terapia”, Polskie Towarzystwo Biologii Medycznej, Szczawnica 22-25.05.2019 – Prezentacja plakatu
- Prague School of Flow Cytometry, Praga, ESCCA, 05/2018
- XVI Kongres Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej 8-10.06.2017 – Prezentacja ustna wyników badań

### **Krajowe**

- Monitorowanie Badań Klinicznych- część podstawowa, Soft Communication, Warszawa 01/2021
- Nauka programowania w Pythonie, ALX, Warszawa 06-07/2019

## **Działalność dydaktyczna na rzecz Uczelni**

W latach 2019 – 2023 prowadziłem zajęcia dydaktyczne (seminaria i ćwiczenia) z przedmiotu immunologia kliniczna dla studentów IV roku kierunku lekarskiego:

- „Immunomodulacyjne działanie probiotyków”
- „Zastosowanie cytometrii przepływowej w immunologii klinicznej”
- „Nowoczesne metody diagnostyczne w pracowni zgodności tkankowej”

W latach 2019 – 2023 prowadziłem zajęcia dydaktyczne (seminaria i ćwiczenia) z przedmiotu immunology dla studentów II roku English Division oraz clinical immunology dla studentów IV roku English Division:

- Seminarium: „Effector mechanisms of humoral immunity”
- Ćwiczenia z zastosowania cytometrii przepływowej w immunologii klinicznej

W latach 2018 – 2023 prowadziłem zajęcia dydaktyczne (seminaria i ćwiczenia) dla studentów II roku analityki medycznej z przedmiotu immunopatologia z immunodiagnostyką:

- „Limfocyty, ich różnicowanie i znaczenie w odporności”
- „Zastosowanie cytometrii przepływowej w immunologii klinicznej”

W latach 2017 – 2019 prowadziłem ćwiczenia z biochemii dla studentów II roku kierunku lekarskiego.



## Dorobek naukowy

	CAŁKOWITY	PRACE DO DOKTORATU
<b>IF</b>	<b>46,326</b>	<b>18,336</b>
<b>PUNKTY MNiSW / MEiN</b>	<b>1030</b>	<b>340</b>

### Publikacje wchodzące w skład cyklu

- 1) Roszczyk Aleksander, Turło Jadwiga Zofia, Zagożdżon Radosław, Kaleta Beata. Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *Lentinula edodes*. International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23(16): 1-13  
**IF 6,208 MEiN 140**
- 2) Roszczyk Aleksander, Zych Michał, Zielniok Katarzyna, Krata Natalia, Turło Jadwiga Zofia, Klimaszewska Marzenna Joanna, Zagożdżon Radosław, Kaleta Beata. The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis. Biomolecules. 2022; 12(12): 1-14.  
**IF 6,064 MEiN 100**
- 3) Kaleta Beata\*, Roszczyk Aleksander\*, Zych Michał, Kniotek Monika Joanna, Zagożdżon Radosław, Klimaszewska Marzenna Joanna, Malinowska Eliza, Pac Michał, Turło Jadwiga Zofia. Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human Immune Cells. Biomolecules. 2021; 11(12): 1-12.  
\*autorzy równorzędni  
**IF 6,064 MEiN 100**

## **Pozostale publikacje**

- 4) Kniotek Monika Joanna, Zych Michał, Roszczyk Aleksander, Szafarowska Monika, Jerzak Małgorzata. Decreased Production of TNF- $\alpha$  and IL-6 Inflammatory Cytokines in Non-Pregnant Idiopathic RPL Women Immunomodulatory Effect of Sildenafil Citrate on the Cellular Response of Idiopathic RPL Women. *Journal of Clinical Medicine*. 2021; 10(14): 1-16.

**IF 4,964 MEiN 140**

- 5) Zych Michał, Roszczyk Aleksander, Kniotek Monika Joanna, Dąbrowski Filip, Zagożdżon Radosław. Differences in Immune Checkpoints Expression (TIM-3 and PD-1) on T Cells in Women with Recurrent Miscarriages—Preliminary Studies. *Journal of Clinical Medicine*. 2021; 10(18): 1-10.

**IF 4,964 MEiN 140**

- 6) Kniotek Monika Joanna, Roszczyk Aleksander, Zych Michał, Szafarowska Monika, Jerzak Małgorzata. Differences in the Expression of KIR, ILT Inhibitory Receptors, and VEGF Production in the Induced Decidual NK Cell Cultures of Fertile and RPL Women. *BioMed Research International*. 2021; 2021:1-10.

**IF 3,246 MEiN 70**

- 7) Dymowska Marta, Aksamit Aleksandra, Zielniok Katarzyna, Kniotek Monika Joanna, Kaleta Beata, Roszczyk Aleksander, Zych Michał, Dąbrowski Filip, Pączek Leszek, Burdzińska Anna Maria. Interaction between Macrophages and Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Wharton's Jelly-A Comparative Study. *Pharmaceutics*. 2021; 13(11): 1-24.

**IF 6,525 MEiN 100**

- 8) Kniotek Monika Joanna, Roszczyk Aleksander, Zych Michał, Wrzosek Małgorzata, Szafarowska Monika, Zagożdżon Radosław, Jerzak Małgorzata. Sildenafil Citrate Downregulates PDE5A mRNA Expression in Women with Recurrent Pregnancy Loss without Altering Angiogenic Factors-A Preliminary Study. *Journal of Clinical Medicine*. 2021; 10(21): 1-12.

**IF 4,964 MEiN 140**

9) Zych Michał, Roszczyk Aleksander, Kniotek Monika Joanna, Kaleta Beata, Zagożdżon Radosław. Sildenafil Citrate Influences Production of TNF- $\alpha$  in Healthy Men Lymphocytes. Journal of Immunology Research. 2019; 2019:1-6.

**IF 3,327 MEiN 100**

**Prezentacje prac na konferencjach zagranicznych lub międzynarodowych (czynny udział - prezentacja pracy)**

1) Konferencja „Biologia-Medycyna-Terapia”, Polskie Towarzystwo Biologii Medycznej, Szczawnica 22-25.05.2019 – Prezentacja w sesji plakatowej.

2) XVI Kongres Polskiego Towarzystwa Immunologii Doświadczalnej i Klinicznej 8-10.06.2017 – Prezentacja ustna.

**Prezentacje prac na konferencjach zagranicznych lub międzynarodowych - współautorstwo pracy**

1) Konferencja ACCORD „Interdisciplinary Conference on Drug Sciences” 26-28.05.2022 – Sesja plakatowa, “Optimization of Se and Zn - enriched mycelium of Lentinula edodes (Berk.) Pegler as a immunostimulatory preparation”

**Nagrody i wyróżnienia**

2022 r. - nagroda naukowa zespołowa III stopnia za publikację pt. „Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells”. (nagroda Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego).

2022 r. - nagroda naukowa zespołowa II stopnia za publikację pt. „Interaction between Macrophages and Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Bone Marrow and Wharton's Jelly-A Comparative Study.” (nagroda Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego).

**Temat studiów doktoranckich (2017 – 2021)**

„Wpływ cytrynianu sildenafilu na aktywność indukowanych endometrialnych NK u pacjentek z nawykowymi poronieniami.”

**Temat studiów doktoranckich (2021 –2023)**

„Wpływ wzbogaconego selenem polisacharydu (Se-Le-30) izolowanego z grzybni *Lentinula edodes* na limfocyty T”

**Temat przewodu doktorskiego:**

„Wpływ wzbogaconego selenem polisacharydu (Se-Le-30) izolowanego z grzybni *Lentinula edodes* na limfocyty T”

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania wszystkim osobom, dzięki którym powstanie niniejszej pracy było możliwe.*

*Szczególne podziękowania składam mojej Promotor dr. hab. n. med. Beacie Kaleta, za merytoryczne wskazówki i opiekę, za przekazaną cenną wiedzę i przede wszystkim za anielską cierpliwość, wsparcie i motywację przez cały czas prowadzenia badań.*

*Serdeczne podziękowania kieruję do Promotor pomocniczej dr. n. wet. Katarzynie Zielniok, za nieocenione wsparcie, pomoc w rozwiązywaniu problemów i wyrozumiałość.*

*Dziękuję również wszystkim pracownikom Zakładu Immunologii Klinicznej. Szczególne podziękowania składam Kierownikowi Zakładu dr. hab. n. med. Radosławowi Zagożdżonowi, za niezwykle cenne krytyczne uwagi, wsparcie w dążeniu do celów naukowych i ogromną wiedzę merytoryczną, którą się ze mną dzielił. Dziękuję również dr n. med. Monice Kniołek, za wieloletnią współpracę badawczą, wiedzę i dyskusje naukowe. Dziękuję mojemu przyjacielowi Michałowi Zychowi za wszystko.*

*Pragnę złożyć szczególne podziękowania mojej Rodzinie i Bliskim - Rodzicom i Przyjaciółom, którzy wspierali mnie, motywowali i wierzyli w mój sukces.*

## Spis treści

Spis rycin.....	16
Wykaz stosowanych skrótów .....	17
Streszczenie w języku polskim.....	18
Streszczenie w języku angielskim .....	20
Wstęp.....	22
Polisacharydy pochodzące z <i>Lentinula edodes</i> .....	22
Subpopulacje limfocytów T .....	23
Cząstki kontrolujące układ odpornościowy .....	24
Aktywacja receptora limfocytów T (TCR, ang. T cell receptor) .....	25
Uzasadnienie połączenia prac w cykl publikacji.....	25
Założenia i cele pracy.....	28
Założenia.....	28
Cele pracy: .....	28
Kopie opublikowanych prac.....	29
Publikacja nr 1:.....	31
<i>Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from Lentinula edodes</i> .....	31
Publikacja nr 2:.....	45
<i>Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells</i> . .....	45
Publikacja nr 3:.....	58
<i>The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis</i> . .....	58
Uzupełniające wyniki badań.....	73
Materiały i metody .....	73
Materiał biologiczny oraz izolacja komórek .....	73
Ocena wpływu Se-Le-30 na aktywację limfocytów T i ekspresję ICPs .....	73
Ocena wpływu Se-Le-30 na produkcję cytokin.....	75
Ocena wpływu Se-Le-30 na aktywację szlaku sygnałowego TCR/CD3.....	75
Analiza statystyczna .....	77
Wyniki .....	77
Wpływ Se-Le-30 na produkcję cytokin.....	88
Wpływ Se-Le-30 na fosforylację białek szlaku sygnałowego TCR/CD3.....	91

Podsumowanie i wnioski .....	94
Wnioski .....	97
Literatura.....	98
Opinie komisji bioetycznej .....	102
Oświadczenia współautorów publikacji .....	105

## Spis rycin

<b>Rycina 1.</b> Wpływ Se-Le-30 na ekspresję markera aktywacji CD25. ....	79
<b>Rycina 2.</b> Wpływ Se-Le-30 na ekspresję markera CD366 (TIM-3) .....	81
<b>Rycina 3.</b> Wpływ Se-Le-30 na ekspresję markera CD279 (PD-1). ....	83
<b>Rycina 4.</b> Wpływ Se-Le-30 na populacje limfocytów T CD8 <sup>+</sup> naiwnych, efektorowych i centralnych pamięci w hodowlach niestymulowanych .....	85
<b>Rycina 5.</b> Wpływ Se-Le-30 na populacje limfocytów T CD8 <sup>+</sup> naiwnych, efektorowych i centralnych pamięci w hodowlach stymulowanych p-ciałem anti- CD3 .....	86
<b>Rycina 6.</b> Wpływ Se-Le-30 na populacje limfocytów T CD8 <sup>+</sup> naiwnych, efektorowych i centralnych pamięci w hodowlach stymulowanych p-ciałem anti- CD3/CD28.....	87
<b>Rycina 7.</b> Wpływ Se-Le-30 na stężenie interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ).....	89
<b>Rycina 8.</b> Wpływ Se-Le-30 na stężenie interleukiny 6 (IL-6).....	90
<b>Rycina 9.</b> Wpływ Se-Le-30 na stężenie czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ )....	91
<b>Rycina 10</b> Wpływ Se-Le-30 na fosforylację białek ZAP, SPLP76, LAT i LCK.....	93



## Wykaz stosowanych skrótów

**CCR7** – C-C chemokine receptor type 7/ C-C receptor dla chemokin typu 7

**CR3** – complement receptor 3/ receptor dla dopełniacza 3

**HMGB1** – high mobility group protein B1

**ICP** – immune checkpoints/cząstki kontrolujące układ odpornościowy

**IFN** –  $\gamma$  - interferon  $\gamma$

**IL-1/-2/-4/-6/-8/-10** – interleukin/ interleukina -1/-2/-4/-6/-8/-10

**LAT** – linker for activation of T cell/ łącznik aktywacji komórek T

**Lck** – lymphocyte-specific protein tyrosine kinase/ specyficzne dla limfocytów białko kinazy tyrozynowej

**NK** – natural killer (lymphocytes/cells) / naturalne komórki cytotoksyczne

**NO** – nitric oxide/ tlenek azotu

**PBMC** – peripheral blood mononuclear cells/ komórki mononuklearne krwi obwodowej

**PD-1 (CD279)** – programmed cell death protein 1/ białko programowanej śmierci komórkowej 1

**PD-L1** – programmed cell death protein ligand 1/ ligand białka programowanej śmierci komórkowej 1

**PHA** – phytohemagglutinin/fitohemaglutynina

**SAC** – *staphylococcus aureus* Cowan antigen/ antygen szczepu *staphylococcus aureus* Cowan

**SLP76** – SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa / białko leukocytów zawierające domenę SH2 o masie 76 kDa

**TCR** – T-cell receptor/ receptor limfocytów T

**TLR** – toll-like receptors/ receptory toll-podobne

**TIM-3 (CD366)** – T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3/ Immunoglobulina komórek T i białko 3 zawierające domenę mucyny

**TNF-  $\alpha$**  – tumor necrosis factor  $\alpha$ /czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$

**ZAP-70** – zeta-chain-associated protein kinase 70/ kinaza białka powiązanego z łańcuchem zeta 70

## Streszczenie w języku polskim

Wstęp: Badania ostatnich dwudziestu lat wykazały, że grzyby są cennym źródłem wielu substancji bioaktywnych. Polisacharydy pochodzenia grzybowego są najlepiej znanymi składnikami o udokumentowanych właściwościach immunomodulujących i przeciwnowotworowych. Jednym z najdokładniej przebadanych związków pochodzenia grzybowego jest lentinan,  $\beta$ -1,6:  $\beta$ -1,3-glukan ekstrahowany z owocników *Lentinula edodes*, który posiada właściwości immunostymulujące. Badany w niniejszej pracy Se-Le-30 jest wzbogaconą w selen mieszaniną liniowych 1,4- $\alpha$ -glukanów, liniowych 1,3- $\beta$ - i 1,6- $\beta$ -glukanów, izolowaną z grzybni *L. edodes*. Celem pracy była ocena właściwości immunomodulacyjnych Se-Le-30 w stosunku do ludzkich limfocytów T.

Materiały i metody: Z krwi obwodowej lub kożuszków leukocytnych pozyskanych od zdrowych krwiodawców wyizolowano komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (PBMCs) oraz limfocyty T. Następnie oceniono wpływ Se-Le-30 w hodowli in vitro na: ekspresję markerów aktywacji (CD25 i CD69), PD-1 i TIM-3, wpływ na proliferację limfocytów stymulowanych mitogenami: SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan), PHA (fitohemaglutyniny), alloantygenami, przeciwciałami anti-CD3 (OKT3) i anti-CD3/CD28, wpływ na produkcję cytokin (IL-2, -4, -6 -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) oraz na fosforylację białek szlaku sygnałowego związanego z CD3/TCR: ZAP70, Lck, LAT i SLP76.

Wyniki: Wykazano, że Se-Le-30 wpływa hamująco na proliferację limfocytów T stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 i alloantygenami natomiast przy stymulacji przeciwciałami anti-CD3/CD28 zwiększa ilość podzielonych limfocytów T. Ponadto Se-Le-30 zmniejsza ekspresję markerów aktywacji CD69 i CD25 oraz cząstek kontrolujących układ odpornościowy PD-1 i TIM-3 na limfocytach T stymulowanych przeciwciałem anti-CD3. Po zastosowaniu stymulacji przeciwciałami anti-CD3/CD28 obserwowano wzrost ekspresji w/w markerów. Wykazano, że niezależnie od zastosowanego modelu aktywacji limfocytów T Se-Le-30 zwiększa produkcję cytokin: IL-6, IL-10 i TNF- $\alpha$ , natomiast zmniejsza produkcję IL-2 i IL-4 przez limfocyty T stymulowane tylko przeciwciałem anti-CD3. Wpływ Se-Le-30 na produkcję cytokin i ekspresję CD25, TIM-3 i PD-1 był mniej wyraźny w hodowli izolowanych limfocytów T w porównaniu do hodowli PBMCs. Obserwowano również, że Se-Le-30 powodował zmniejszenie fosforylacji białek ZAP70, SLP76 i LAT, oraz zwiększenie fosforylacji Lck zarówno w hodowli stymulowanej przeciwciałem anti-CD3 jak i stymulowanej przeciwciałem anti-CD3/CD28.

Wnioski: Se-Le-30 posiada cechy immunomodulatora limfocytów T, a różnica w działaniu w zależności od zastosowanego modelu stymulacji jest unikatowa w odniesieniu do aktualnych danych literaturowych. Selektyny wpływ na proliferację limfocytów T, na produkcję cytokin, ekspresję markerów powierzchniowych w hodowlach izolowanych limfocytów T wskazują, że Se-Le-30 może oddziaływać bezpośrednio na limfocyty T, jednakże efekt ten jest wzmocniony w hodowli PBMCs. Może to wskazywać na wpływ tego polisacharydu również na inne komórki immunokompetentne obecne w PBMCs, tj. monocyty. Dalsze badania *in vitro* i *in vivo* wydają się konieczne aby w pełni wyjaśnić mechanizm działania Se-Le-30 oraz aby w przyszłości związek ten mógł być stosowany w terapii.

## Streszczenie w języku angielskim

**Introduction:** Research over the last twenty years has shown that mushrooms are a valuable source of many bioactive substances. Fungal-derived polysaccharides are the best-known constituents with documented immunomodulatory and anticancer properties. One of the most thoroughly studied compounds is lentinan,  $\beta$ -1,6:  $\beta$ -1,3-glucan extracted from the fruiting bodies of *Lentinula edodes*, which has immunostimulatory properties. Se-Le-30 tested in this study is a selenium-enriched mixture of linear 1,4- $\alpha$ -glucans, linear 1,3- $\beta$ - and 1,6- $\beta$ -glucans, isolated from *L. edodes* mycelium. The aim of the study was to evaluate the immunomodulatory properties of Se-Le-30 in relation to human T lymphocytes.

**Materials and methods:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and T lymphocytes were isolated from peripheral blood or buffy coats obtained from healthy blood donors. Next, the effect of Se-Le-30 in in vitro culture was analyzed: the expression of activation markers (CD25 and CD69), the effect on the proliferation of lymphocytes stimulated with mitogens: SAC (*Staphylococcus aureus* Cowan), PHA (phytohemagglutinins), alloantigens, anti-CD3 (OKT3) and anti-CD3/CD28 antibodies, influence on the production of cytokines (IL-2, -4, -6 -10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) and on the phosphorylation of pathway proteins CD3/TCR-related signaling: ZAP70, Lck, LAT and SLP76.

**Results:** It was shown that Se-Le-30 has an inhibitory effect on the proliferation of human T cells stimulated with anti-CD3 antibody and alloantigens and promoted T cell division when cells were stimulated with anti-CD3/CD28 antibodies. Moreover, Se-Le-30 decreased the expression of activation markers CD69 and CD25, as well as immune checkpoints TIM-3 and PD-1 on T cells stimulated with anti-CD3 antibody. After stimulation with anti-CD3/CD28 antibodies, an increase in the expression of the above-mentioned markers was observed. Regardless of the type of T cells stimulation Se-Le-30 upregulated production of IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$ , while it reduces the production of IL-2 and IL-4 by T cells stimulated only with anti-CD3 antibody. The effect of Se-Le-30 on the production of cytokines and the expression of CD25, TIM-3 and PD-1 was less significant in the culture of isolated T lymphocytes compared to the culture of PBMCs. It was also observed that Se-Le-30 caused decreased phosphorylation of ZAP70, SLP76 and LAT, and increased phosphorylation of Lck in both anti-CD3 and anti-CD3/CD28 antibody-stimulated cultures.

**Conclusions:** Se-Le-30 has the features of a T-cell immunomodulator, and the direction of its action depending on the stimulation model used is unique in relation to

current literature data. The selective effect on T lymphocytes proliferation, cytokines production and expression of surface markers in cultures of isolated T lymphocytes indicate that Se-Le-30 may act directly on T lymphocytes, however, this effect is enhanced in PBMCs culture. This may suggest the influence of this polysaccharide also on other immunocompetent cells present in PBMCs, i.e. monocytes. Further *in vitro* and *in vivo* studies seem to be necessary to fully explain the mechanism of action of Se-Le-30 and to use this compound in therapy in the future.

## Wstęp

### Polisacharydy pochodzące z *Lentinula edodes*

Twardnik japoński (*Lentinula edodes*), szerzej znany jako grzyb Shiitake, poza walorami smakowymi i odżywczymi [1], jest źródłem licznych bioaktywnych substancji o właściwościach immunomodulujących, przeciwnowotworowych, antyoksydacyjnych czy przeciwbakteryjnych [2,3]. Najważniejszymi bioaktywnymi komponentami *L. edodes* są polisacharydy:  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukany. Liczne badania przeprowadzone na modelach zwierzęcych wskazują, że polisacharydy pochodzące z *L. edodes* posiadają właściwości immunomodulacyjne. Wykazano m. in. zwiększenie zdolności chemotaktycznej makrofagów [4,5] i produkcji tlenku azotu NO [6,7] oraz nasilenie aktywności komórek NK (ang. natural killer) [4,8]. Związki te ponadto zwiększały proliferację splenocytów [6,8,9], proliferację i aktywację limfocytów [10-12], zwiększały ilość limfocytów CD4<sup>+</sup> w stosunku do CD8<sup>+</sup> [10], wpływały na wzrost produkcji cytokin, m. in. interleukiny (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, interferonu (IFN)- $\gamma$ , czynnika martwicy nowotworów (TNF)- $\alpha$  [5,7,9-11,13]. Badania wskazują również na działanie przeciwnowotworowe tych związków pośrednio przez ich wpływ na komórki immunokompetentne [4,6,7,14]. Warto zwrócić uwagę, że wyniki niektórych analiz dały przeciwne rezultaty. McCormack i wsp. zaobserwowali wpływ polisacharydów na zmniejszenie produkcji IL-4, IL-10 i IL-6 oraz zmniejszenie stosunku ilości limfocytów CD4<sup>+</sup> do CD8<sup>+</sup>, [15]. W innych badaniach wskazywano na brak wpływu tych związków na produkcję IL-2 [7], obniżenie produkcji IL-10 [16], TNF- $\alpha$ , IL-6, i IL-1 $\beta$  [17-19].

Badania przeprowadzone na ludzkich komórkach układu odpornościowego dotyczą głównie lentinanu - najlepiej opisanego polisacharydu izolowanego z owocników *L. edodes*. Jest to  $\beta$ -1,6:  $\beta$ -1,3-glukan, który posiada właściwości immunostymulujące. Wykazano, że związek ten zwiększa proliferację komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMCs, ang. peripheral blood mononuclear cells) [20], zwiększa liczbę limfocytów T i B [21,22], nasila aktywność komórek NK [20,23], zwiększa aktywację limfocytów T [20] oraz produkcję cytokin, m.in. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  [22,24] przyczyniając się do nasilenia infiltracji limfocytów o fenotypie CD4<sup>+</sup> do mikrośrodowiska nowotworowego [25]. Liczne badania w warunkach klinicznych wskazują na jego skuteczność (wydłużenie przeżycia pacjentów i ochronny wpływ na leukocyty w trakcie stosowania chemioterapii), dlatego preparat ten jest zatwierdzony w

niektórych krajach azjatyckich (m.in. w Chinach, Japonii i Rosji) jako lek w terapii nowotworów [3,26].

Dokładny immunomodulacyjny mechanizm działania polisacharydów izolowanych z *L. edodes* nie jest poznany, ale wykazano, iż związki te mają powinowactwo do licznych receptorów występujących na ludzkich komórkach immunokompetentnych, w tym receptorów CR3, dektyna-1, LaCer, Scavenger, TLR czy CD28 [27-32].

Selen, będąc jednym z niezbędnych dla ludzi mikroelementów, bierze udział w regulacji licznych procesów immunologicznych [33], a wzbogacanie tym pierwiastkiem związków biologicznie czynnych istotnie wzmacnia ich funkcję immunomodulacyjną [34,35]. Ostatnie badania z wykorzystaniem selenowanych polisacharydów wskazują między innymi na ich nasilone działanie antyoksydacyjne [36,37], immunostymulujące i przeciwnowotworowe [38].

Celem pracy było zbadanie immunomodulacyjnych właściwości selenowanych polisacharydów izolowanych z grzybni *L. edodes* (nazwanych Se-Le-30). Uzyskane wyniki, które są opisane w publikacjach składających się na cykl niniejszej rozprawy doktorskiej były nowatorskie oraz zaskakujące i skłoniły do przeprowadzenia dalszych analiz mających na celu określenie czy Se-Le-30 wpływa bezpośrednio na limfocyty T, w jaki sposób i czy obserwowany efekt jest determinowany wpływem innych komórek układu odpornościowego. Wyniki tych dodatkowych badań zostały przedstawione poniżej wraz z krótkim wstępem teoretycznym wprowadzającym w to zagadnienie.

### **Subpopulacje limfocytów T**

Naiwne (dziewicze) limfocyty T są pierwszą populacją limfocytów T opuszczającą grasnicę po selekcji negatywnej i pozytywnej. Komórki te charakteryzują się obecnością receptora CC chemokin typu 7 - CCR7 i ligandu dla CD62 zwanym L-selektyną lub CD62L, które wykazują powinowactwo do receptorów obecnych na komórkach występujących w węzłach chłonnych. Limfocyty naiwne posiadają na swojej powierzchni również receptor CD45RA, przy braku ekspresji CD45RO. Dlatego użycie w badaniach kombinacji CD45RA lub CD45RO z jednym z receptorów CD62L lub CCR7 pozwala z dużą dokładnością ocenić populację naiwnych limfocytów T. Limfocyty naiwne w odpowiedzi na antygeny napotkane na obwodzie mają zdolność do proliferacji i różnicowania się w różne typy komórek m. in. w centralne limfocyty T pamięci oraz efektorowe limfocyty T pamięci. „Młodsze” naiwne limfocyty T mają m. in. większą

zdolność produkcji IL-8 oraz mniejszą zdolność do proliferacji, trend ten odwraca się w miarę dojrzewania tych komórek [39,40]. Naiwne limfocyty T są hiporesponywne oraz mają niski potencjał proliferacyjny. Ich aktywacja i różnicowanie wymagają stymulacji wieloma sygnałami: z receptora limfocyty T (TCR, ang. T-cell receptor) włączając odpowiednio CD4 i CD8 w zależności od tego czy antygen przedstawiany jest przez cząsteczki MHC klasy II czy klasy I oraz sygnałów z receptorów kostymulujących oraz receptorów dla cytokin [41].

Centralne limfocyty T pamięci (T<sub>cm</sub>) wykazują powierzchniową ekspresję CD45RO przy braku CD45RA oraz zachowują ekspresję CD62L i CCR7, natomiast efektorowe limfocyty T pamięci (T<sub>em</sub>) różnią się od nich brakiem ekspresji CD62L i CCR7 [41,42]. Limfocyty T<sub>cm</sub> rezydują głównie w narządach limfatycznych, produkują duże ilości cytokin i posiadają słabą zdolność lityczną podczas gdy limfocyty T<sub>em</sub> posiadają niskie powinowactwo do narządów limfatycznych, wysoką zdolność lityczną oraz wysoką zdolność proliferacyjną [41]. Cytotoksyczne limfocyty T CD8<sup>+</sup> zaczynają się różnicować do efektorowych lub centralnych pamięci już po 2-24 godzinach stymulacji oraz nabywają zdolność do produkcji IL-2, TNF $\alpha$  i IFN- $\gamma$ . Pomocnicze limfocyty T CD4<sup>+</sup> wymagają dłuższej stymulacji do zróżnicowania do komórek efektorowych [43].

### **Cząstki kontrolujące układ odpornościowy**

Białko programowanej śmierci komórkowej 1 (PD-1, ang. programmed cell death protein 1) jest jednym z najlepiej zbadanych białek z grupy cząstek kontrolujących układ odpornościowy. Jego podstawową rolą jest wyhamowywanie nadmiernej odpowiedzi ze strony komórek układu odpornościowego poprzez wywołanie anergii, zmniejszenie proliferacji, indukowanie tolerancji i przejście komórek na typ regulatorowy. Ligandami dla PD-1 są białka PD-L1 i PD-L2 [44,45]. Interakcje PD-1/PD-L1 są w ostatnich latach intensywnie badane w kontekście immunoterapii przeciwnowotworowych, wykorzystujących mechanizm hamowania aktywności limfocytów [46-48].

Immunoglobulina komórek T i białko 3 zawierające domenę mucyny (TIM-3, ang. T cell immunoglobulin and mucin-domain containing protein 3) jest receptorem obecnym na limfocytach T, a jego rola jest związana z działaniem hamującym układ odpornościowy. W ostatnich latach TIM-3 jest badany w kontekście immunoterapii nowotworów i chorób autoimmunologicznych jako inhibitor punktów kontrolnych. Jego ligandami są galektyna typu 9 (Gal-9), glikoproteina CEACAM1 i HMGB1 (high mobility group protein B1 [49].



## **Aktywacja receptora limfocytów T (TCR, ang. T cell receptor)**

Zwiążanie się antygeny z receptorem TCR prowadzi do aktywacji limfocytów T, powodując złożoną serię zmian molekularnych w błonie komórkowej, cytoplazmie i jądrze, prowadząc do klonalnej ekspansji i różnicowanie w celu pełnienia swoich funkcji efektorowych. Włączenie mechanizmu związanego z transdukcją sygnału aktywacji wielobiałkowego kompleksu receptora TCR/CD3 opiera się na kaskadach sygnalizacyjnych kinaz tyrozynowych, które poprzez fosforylację kolejnych białek szlaku przekazują sygnał aktywacji do wewnątrz, prowadząc do aktywacji związanych z nim funkcji, np. produkcji cytokin, proliferacji, różnicowania. Wczesnym etapem aktywacji szlaku jest fosforylacja od strony cytoplazmatycznej motywów ITAMs (ang immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) kompleksu receptora TCR/CD3 przez białkową kinazę tyrozynową limfocytów (Lck). Kinaza ZAP-70 jest rekrutowana do kompleksu TCR/CD3, gdzie ulega aktywacji. Fosforylacja kinaz ZAP-70 na Tyr493 i Syk na Tyr526, będąca jedną z pierwszych występujących po aktywacji TCR/CD3, prowadzi do całkowitej aktywacji obu tych kinaz [50] i w następstwie, dalszych fosforylacji, przyłączania kolejnych białek do kompleksów receptorowych i fosforylacji transbłonowego białka adaptorowego LAT. Fosforylacja białka LAT na Tyr171 i 220 odsłania miejsca wiązania i rekrutację kolejnych białek, m. in. Grb2, Gads/SLP-76, PLC $\gamma$ 1 i kinazy PI3K[51]. Natomiast fosforylacja kinazy LCK na Tyr505 obniża aktywność katalityczną LCK[52], a kinazy SLP-76 przy Ser376 prowadzi do zmniejszenia aktywacji szlaku sygnałowego z TCR w mechanizmie ujemnej pętli zwrotnej [53]. Regulacja sprzężenia zwrotnego w kilku punktach tych szlaków pozwala na uzyskanie różnych efektów związanych z aktywacją szlaku, w zależności od typu komórki i sygnałów środowiska. Badanie fosforylacji białek szlaku TCR/CD3 pozwala pośrednio wskazać, czy dany antygen/substancja indukuje szlak sygnałowy związany z tym kompleksem receptorowym.

## **Uzasadnienie połączenia prac w cykl publikacji**

Badania ostatnich lat wskazują, że różne polisacharydy izolowane z *L. edodes* posiadają właściwości immunomodulacyjne. Większość analiz wykonano jednak na

modelach zwierzęcych. Ponadto nie są znane dokładne mechanizmy opowiadające za obserwowane wyniki.

Niniejszy cykl prac podejmuje kompleksową próbę wyjaśnienia wpływu Se-Le-30 na ludzki układ odpornościowy ze szczególnym uwzględnieniem limfocytów T. Dodatkowe analizy opisane w rozprawie mają natomiast na celu poznanie mechanizmów związanych z działaniem immunomodulacyjnym tego związku. Wszystkie trzy prace stanowią spójną całość, gdyż są zwartym tematycznie cyklem i posiadają ten sam cel badawczy.

Cykl artykułów został opublikowany w recenzowanych czasopismach naukowych, znajdujących się w wykazie czasopism określonym przez Ministra Nauki i Edukacji.

Przedstawiana rozprawa doktorska składa się z cyklu trzech publikacji: wprowadzającej pracy poglądowej oraz dwóch prac oryginalnych w których podjęto próbę zbadania wpływu selenowanego polisacharydu (Se-Le-30) na ludzki układ odpornościowy ze szczególnym uwzględnieniem limfocytów T.

- Publikacja nr 1 wchodząca w skład cyklu rozprawy doktorskiej: „Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *Lentinula edodes*.”

Cykl prac otwiera opracowanie, które przeprowadza analizę dostępnej literatury dotyczącej immunomodulacyjnego działania polisacharydów pochodzących z *Lentinula edodes* z podziałem na badania wykonane w modelach zwierzęcych oraz na komórkach ludzkich. Praca prezentuje aktualny stan wiedzy w powyższym temacie, ze szczególnym uwzględnieniem Lentinanu i innych  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukanów i wskazuje na niewątpliwy wpływ immunomodulacyjny tych związków. Wyniki omówionych prac sugerują również, że aktywność biologiczna polisacharydów izolowanych z *L. edodes* zależy od sposobu ich ekstrakcji, gdyż ten wpływa na skład monosacharydów, masę cząsteczkową, stopień rozgałęzienia i konformację helikalną. Praca ta stanowi ważny wkład w usystematyzowanie wiedzy i debatę nad w/w zagadnieniami.

- Publikacja nr 2 wchodząca w skład cyklu rozprawy doktorskiej: „Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human Immune Cells.”

Celem pracy było otrzymanie czystej i homogennej frakcji Se-Le-30 oraz zbadanie jej aktywności biologicznej w stosunku do ludzkich limfocytów T, granulocytów oraz komórek NK. Wykazano w niej specyficzne w stosunku do limfocytów T i komórek NK

działanie Se-Le-30. Obserwowano, że polisacharyd ten hamował proliferację limfocytów T stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 oraz alloantygenami w teście mieszanej hodowli limfocytów, obniżał wewnątrzkomórkową produkcję TNF- $\alpha$  przez limfocyty T, nieznacznie obniżał aktywność komórek NK, przy braku wpływu na limfocyty B i granulocyty. Wyniki tej pracy wskazują, że Se-Le-30, analog lentinanu wyizolowany z grzybnii *L. edodes* jest selektywnym immunosupresantem limfocytów T oraz prawdopodobnie komórek NK, co nie jest typowe dla  $\beta$ -glukanów pochodzących z grzybów. Wyniki te są innowacyjne i uzasadniają konieczność dalszych kompleksowych badań nad Se-Le-30 w kierunku jego potencjalnych zastosowań jako związku immunosupresyjnego.

- Publikacja nr 3 wchodząca w skład cyklu rozprawy doktorskiej: „The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis.”

W pracy nr 3 skupiono się na analizie wpływu Se-Le-30 na różne populacje limfocytów T (ich proliferację, aktywację oraz profil wydzielanych cytokin) w hodowli ludzkich PBMCs. Dzięki wykorzystaniu cytometrii przepływowej możliwa była ocena działania Se-Le-30 na dwie populacje limfocytów T: CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>. Dodatkowo porównano efekt działania Se-Le-30 na limfocyty T przy zastosowaniu dwóch różnych typów aktywacji (przeciwciałem anti-CD3 oraz przeciwciałem anti-CD3/CD28). Wykazano, że kierunek działania Se-Le-30 zależy od rodzaju stymulacji. Przy stymulacji anti-CD3 polisacharyd obniżał ekspresję markerów aktywacji, proliferację oraz produkcję IL-2 i IL-4. Przy stymulacji dwoma sygnałami Se-Le-30 zwiększał ekspresję markerów aktywacji, odsetek podzielonych komórek T oraz produkcję IFN- $\gamma$ . Ciekawą obserwacją jest to, że niezależnie od zastosowanej stymulacji Se-Le-30 zwiększał produkcję IL-6 i IL-10. Nie wykazano wpływu badanego związku na obniżenie żywotności komórek w hodowli. Uzyskane wyniki wskazują na działanie immunomodulacyjne Se-Le-30 wobec limfocytów T, ale również na produkcję IL-6 i IL-10, co może sugerować jego wpływ na monocyty krwi obwodowej, które są populacją komórek obecną w PBMC (około 20%). W/w wyniki zasugerowały konieczność dalszych analiz, dlatego aby wykluczyć udział innych komórek immunologicznych, badania powtórzono na izolowanych z PBMCs limfocytach T (komórek o fenotypie CD3<sup>+</sup>). Dodatkowo oceniono wpływ Se-Le-30 na cząstki kontrolujące układ odpornościowy: PD-1 i TIM-3 oraz na wewnątrzkomórkowe szlaki

sygnałowe limfocytów T zależne od receptora CD3. Wyniki tych eksperymentów zostały przedstawione poniżej w niniejszym opracowaniu.

## **Założenia i cele pracy**

### **Założenia**

Jak wspomniano wyżej, celem pracy było zbadanie immunomodulacyjnych właściwości wzbogaconych w selen polisacharydów izolowanych z grzybni *L. edodes* (Se-Le-30). Pierwsze analizy wykazały, że Se-Le-30 posiada selektywne właściwości immunosupresyjne w stosunku do ludzkich limfocytów T: hamuje ich proliferację w odpowiedzi na alloantygeny, oraz stymulację przeciwciałem anti-CD3 (OKT3) oraz fitohemaglutyniną (PHA), nie mając jednocześnie istotnego wpływu na proliferację limfocytów B i zdolność granulocytów do produkcji anionorodnika ponadtlenkowego [54,55]. Zaobserwowano ponadto, że dodatek selenu wykazywał pozytywny wpływ na przeżywalność komórek w hodowli w porównaniu do analogicznej frakcji bez dodatku tego mikroelementu [54,56] i wzmacniał właściwości antyoksydacyjne [57] co było wynikiem zmian strukturalnych badanej frakcji [56,58]. Hamowanie proliferacji limfocytów T wspomniane w pracach Kaleta *i wsp.* [54] i Klimaszewska *i wsp.* [55] było obserwacją unikalną dla badanych dotąd polisacharydów pochodzenia grzybowego, która to obserwacja została również potwierdzona w pracach niniejszego cyklu [59,60]. W ramach tych badań dowiedziono m.in., że w zależności od zastosowanego modelu aktywacji limfocytów T *in vitro*, wpływ polisacharydu na te komórki był przeciwstawny: przy zastosowaniu jednego sygnału aktywacji (przeciwciałem anti-CD3, OKT3) Se-Le-30 obniżał proliferację i aktywację limfocytów T, natomiast przy aktywacji dwoma sygnałami (przeciwciałem anti-CD3 i anti-CD28) polisacharyd ten zwiększał proliferację i aktywację limfocytów T w hodowli PBMCs [60]. Jak wspomniano wyżej, wyniki te zostały uzupełnione analizami mającymi na celu ocenę potencjalnych mechanizmów odpowiadających za obserwowany efekt.

### **Cele pracy:**

1. Dokonanie przeglądu literatury światowej opisującej immunomodulacyjne właściwości polisacharydów izolowanych z *L. edodes*.

2. Zbadanie wpływu Se-Le-30 na proliferację limfocytów stymulowanych mitogenami: przeciwciałem anti-CD3 (OKT3), fitohemaglutyniną (PHA), zawiesiną *Staphylococcus aureus* Cowan (SAC), alloantygenami oraz kulkami opłaszczonymi przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28.
3. Zbadanie wpływu Se-Le-30 na aktywność komórek NK.
4. Zbadanie wpływu Se-Le-30 na redukcję cytochromu C przez granulocyty.
5. Zbadanie wpływu Se-Le-30 na ekspresję wybranych cząstek powierzchniowych charakterystycznych dla aktywowanych limfocytów oraz cząstek kontrolujących układ odpornościowy (ICPs, ang. immune checkpoints).
6. Zbadanie wpływu Se-Le-30 na produkcję cytokin w hodowlach komórkowych niestymulowanych, stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 oraz kulkami opłaszczonymi przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28.
7. Zbadanie czy Se-Le-30 wpływa na różnicowanie się limfocytów T CD8<sup>+</sup> w kierunku komórek efektorowych lub centralnych pamięci.
8. Zbadanie wpływu Se-Le-30 na fosforylację wybranych białek wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego związanego z aktywacją CD3.

**Kopie opublikowanych prac**



**Publikacja nr 1:**

*Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from Lentinula edodes*



Review

# Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *Lentinula edodes*

Aleksander Roszczyk<sup>1</sup>, Jadwiga Turlo<sup>2</sup>, Radosław Zagożdżon<sup>1</sup> and Beata Kaleta<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Immunology, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Department of Drug Technology and Pharmaceutical Biotechnology, Medical University of Warsaw, Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland

\* Correspondence: beata.kaleta@wum.edu.pl; Tel.: +48-600301690

**Abstract:** *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, also known as shiitake mushroom, is a popular edible macrofungus and a source of numerous bioactive substances with multiple beneficial health effects. *L. edodes*-derived polysaccharides are the most valuable compounds, with anticancer, antioxidant, antimicrobial, and immunomodulatory properties. It has been demonstrated that their biological activity depends on the extraction method, which affects monosaccharide composition, molecular weight, branching degrees, and helical conformation. In this review, we discuss the immunomodulatory properties of various polysaccharides from *L. edodes* in animal models and in humans.

**Keywords:** immunomodulation; *Lentinula edodes*; polysaccharide



Citation: Roszczyk, A.; Turlo, J.; Zagożdżon, R.; Kaleta, B. Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *Lentinula edodes*. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 8980. <https://doi.org/10.3390/ijms23168980>

Academic Editors: Anna Aiello, Giulia Accardi and Danila Di Majo

Received: 5 July 2022  
Accepted: 10 August 2022  
Published: 11 August 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, also known as shiitake mushroom, is the most popular edible macrofungus, belonging to the Basidiomycota [1]. *L. edodes* grows naturally in the humid and warm regions of North and South America, Asia, and Australia and is also widely cultivated all over the world [2]. Numerous studies have demonstrated that *L. edodes* fruiting bodies and mycelium are a source of various nutrients and bioactive substances with multiple beneficial health effects [2,3]. *L. edodes* contains about 68–78% of carbohydrates (mono-, di-, tri-, and polysaccharides), exogenous amino acids (including arginine, histidine, leucine, isoleucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, valine, and tryptophan), lipids (5–8% of dry matter), vitamins (including B1, B2, B12, C, D, E), minerals (including Ca, K, Mg, Mn, P, Zn, and Na), fiber, and numerous substances with antibacterial, antiviral, and antifungal properties [3,4]. The main compounds of *L. edodes* are presented in Figure 1. *L. edodes*-derived polysaccharides are widely studied and the most valuable compounds with proven anticancer, antioxidant, antiaging, antimicrobial, and immunomodulatory properties [5,6]. Studies on the mechanism of the immunomodulatory action of fungal polysaccharides suggested that it is a complex interaction between immunological, metabolic, and epigenetic changes [7]. As detailed below,  $\beta$ -glucans are the main polysaccharides found in the fungal cell wall and are responsible for most of the biological effects. Glucan molecules are considered to be pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and various pattern-recognition receptors (PRRs) can recognize them (please see below for details) [7,8].

It is worth emphasizing that besides polysaccharides, other *L. edodes* compounds are biologically active [5,6]. Findings from recent studies indicated that exogenous amino acids regulate cytokines and nitric oxide (NO) synthesis, antibodies production, and lymphocytes proliferation [3]. In addition, evidence of B and D vitamins role in the immune response has accumulated in past years. It has been demonstrated that B vitamins regulate the function of T helper (Th) cells, natural killer (NK) cells, and macrophages, including cells proliferation, cytokines synthesis, and NO production. Vitamin D also regulates the function of all immune cells, including T and B lymphocytes, monocytes/macrophages, and dendritic



cells. Minerals present in *L. edodes*, particularly Mg and Zn, are essential for the innate and adaptive immune response. They regulate the function of macrophages, neutrophils, T and B lymphocytes, as well as NK cells [4].

It has been demonstrated that cultivation and extraction method are essential steps in obtaining polysaccharides because they affect their monosaccharide composition, different molecular weight, branching degrees, helical conformation, as well as biological activity [7,8].

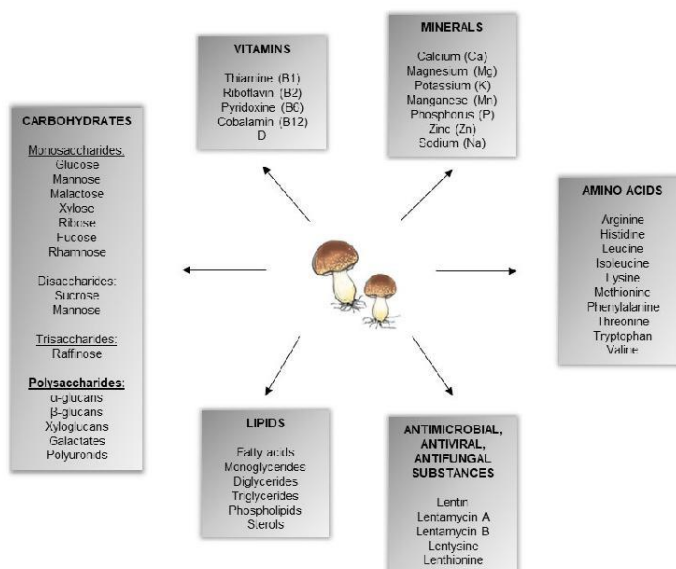


Figure 1. Main active compounds of *Lentinula edodes*.

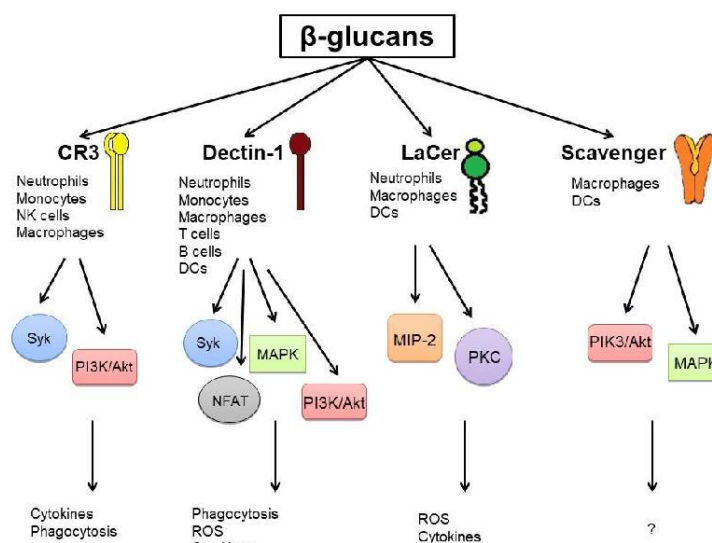
In this review, we discuss immunomodulatory properties of polysaccharides from *L. edodes* in animal models and in humans.

## 2. Polysaccharides from *L. edodes*—Immunomodulatory Properties

### 2.1. Surface Receptors and Signaling Pathways

Over the past three decades, numerous studies have shown that *L. edodes*-derived polysaccharides exhibit immunomodulatory properties. It has been confirmed that they can modulate both innate and adaptive immune responses, and thus should be considered as biological response modifiers (BRMs) [9,10]. *L. edodes* biologically active polysaccharides mostly belong to the group of β-glucans. Glucans are PAMPs, therefore numerous cell surface receptors on monocytes/macrophages, neutrophils, natural killer (NK) cells, dendritic cells (DCs), as well as T and B cells recognize them [11,12]. So far, several polysaccharide-binding receptors have been identified, including complement receptor 3 (CR3), dectin-1, and lactosylceramide (LaCer). CR3 is expressed on neutrophils, monocytes, macrophages, and NK cells and recognizes mainly β-1,3-glucans [11]. The interaction of polysaccharides with CR3 leads to enhanced spleen tyrosine kinase (Syk) phosphorylation, augmented phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) activation, and stimulation of nuclear factor kappa B (NF-κB) leading to the cytokine production (including interleukin (IL)-2, IL-10, tumor necrosis factor (TNF)-α) [13]. Dectin-1 is expressed on monocytes, macrophages, neutrophils, T cells, and dendritic cells. It recognizes β-1,3- and β-1,6-glucans. Binding of β-glucans to dectin-1 activates numerous signaling pathways, including Syk, PI3K/protein kinase B (Akt), mitogen-activated protein kinase (MAPK), and nuclear factor of activated T

cells (NFAT), to enhance innate immune responses (phagocytosis, reactive oxygen species production, IL-12, IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  synthesis) [12,13]. Lactosylceramide (LaCer) is another polysaccharide-binding receptor which recognizes  $\beta$ -1,3-glucans. LaCer is highly expressed on neutrophils, macrophages, and dendritic cells. The interaction of polysaccharides with LaCer enhances neutrophil oxidative burst response, induces macrophage inflammatory protein (MIP)-2, and activates NF- $\kappa$ B (via protein kinase C (PKC)-dependent pathway) [13,14]. It has been suggested that fungal  $\beta$ -glucans can also be recognized by scavenger receptors (expressed on macrophages and dendritic cells), however, the exact mechanism of their activation is not fully understood. It is believed that ligand binding is associated with activation of kinases PI3K/Akt and MAPK [15,16].  $\beta$ -glucan receptors on immune cells and immune activation induced by  $\beta$ -glucans are presented in Figure 2.



**Figure 2.** Main  $\beta$ -glucan receptors on immune cells and their immunomodulatory properties.

Due to the fact that fungal polysaccharides from various sources have different composition, molecular weight, and conformation, they can bind to multiple receptor types with different affinity and activate various signalling pathways. Therefore, it is very likely that future research will contribute to the discovery of new receptors for mushroom-derived polysaccharides.

## 2.2. Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *L. edodes*—Studies Performed in Animals

Numerous studies have been conducted to determine the immunomodulatory effects of polysaccharides isolated from mycelium or fruiting bodies of *L. edodes* in animal models.

Chen et al. [8] investigated immunomodulatory properties of three polysaccharide fractions (named F1, F2, and F3) isolated from *L. edodes* water extracts in BALB/c mice. All three fractions were composed of glucose (Glc), galactose (Gal), and mannose (Man) in different proportions. F1 was mainly composed of 38.0% Glc, 12.2% Gal, and 12.3% Man. F2 mainly consisted of 28% Glc, 4.6% Gal, and 4.4% Man; F3 contained 13.6% Glc, 2.7% Gal, and 2.5% Man. Moreover, all three fractions had different molecular weights (136 kDa, 14–61 kDa, and 14–35 kDa, respectively). The study demonstrated that F1, F2, and F3 polysaccharides increased thymus index and footpad thickness in mice. In addition, all

three fractions increased proliferation of Concanavalin A- and LPS-stimulated splenocytes. The group also revealed that F2 and F3 upregulated serum immunoglobulin(Ig)G and IgM levels and enhanced NK cells cytotoxicity. These results suggest that F1, F2, and F3 polysaccharides isolated from *L. edodes* had immunoenhancing activity. The fraction with the highest molecular weight (F1) improved cellular immunity, while F2 and F3 improved both cellular and humoral immunity.

In a study by Pan et al. [17], the effect of supplementation of *L. edodes*-derived 1,3/1,6- $\beta$  glucan on C57BL/6J mice gut microbiota was evaluated. It was reported that both short-term (7 days) and long-term (15 weeks) supplementation of  $\beta$ -glucan (at the dose of 1.5 mg per mouse/day) inhibited macrophage accumulation in the colon of mice fed by a high-fat diet and downregulated the expression of proinflammatory cytokines, including IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

The immunomodulatory properties of bioprocessed polysaccharide (BPP) isolated from *L. edodes* liquid mycelial culture supplemented with black rice bran were studied by Kim and colleagues [18]. BPP is a  $\beta$ -glucan composed of glucose, galactose, rhamnose, fucose, mannose, and xylose. It was found that BPP upregulated spleen lymphocyte proliferation, as well as increased serum IFN- $\alpha$  levels in mice infected with *Salmonella* Typhimurium. In addition, BPP administration augmented Th1 cytokines production (including IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, and IL-12) in mice splenocytes but did not affect Th2 cytokines production (IL-4, IL-5, and IL-10). The same polysaccharide, isolated from mycelial culture supplemented with tumeric reduced the phagocytic activity of the chicken-derived macrophage cell line HD-11 when infected with *Salmonella* Gallinarum and upregulated the expression of IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase in response to various *Salmonella* infections [19].

In another study, the biological activity of five novel polysaccharides (described as SLNT1, SLNT2, JLNT1, JLNT2, and JLNT3) isolated from the dried fruit body of *L. edodes* was evaluated in H22-bearing mice [20]. All polysaccharides consisted of glucose and had similar structures of (1 $\rightarrow$ 3)-linked- $\beta$ -D-glucan and triple-helix conformation. Biological activity analyzes demonstrated that supplementation of two out of five tested polysaccharides with the highest molecular weights (SLNT1 and JLNT1) suppressed H22 tumor growth. Moreover, these two polysaccharides stimulated IL-2 and TNF- $\alpha$  production and induced the tumor cell apoptosis.

In a study by Song et al. [21], the biological effect of acidic-hydrolysis polysaccharides from spent mushroom compost of *L. edodes* (ASMCP) was evaluated in mice with LPS-induced kidney injury (KI). ASMCP is a homogenous  $\beta$ -glucan composed of rhamnose, (32.36%), arabinose (22.58%), galactose (8.92%), and glucose (36.14%), with molar ratios of 4:3:1:4. Immunological studies demonstrated that ASMCP reduced the serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ , urea nitrogen, creatinine, and uric acid. Moreover, it upregulated activity of superoxide dismutase, catalase, and malondialdehyde, suggesting their antioxidant, antiinflammatory, and renoprotective activity.

In another study, the impact of lentinan, a (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucan with (1 $\rightarrow$ 6) branches, encapsulated into CaCO<sub>3</sub> microparticles on lymphocyte activation, as well as humoral and cellular immunity in BALB/c mice, was analyzed [22]. Animals were immunized with ovalbumin (OVA) and injected with lentinan (0.2 mL at a concentration of 10  $\mu$ g/mL). It was demonstrated that lentinan-CaCO<sub>3</sub>-OVA enhanced lymphocyte proliferation, increased activation of B cells, and upregulated the ratio of CD4<sup>+</sup> to CD8<sup>+</sup> T cells in spleen lymphocytes. In addition, increased secretion of immunoglobulins IgG and IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  was observed.

In another similar research, lentinan was covalently attached to multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) and its immunoregulatory capacities were analyzed in BALB/c mice [23]. Hydrophobic MWCNTs in this study were used as an adjuvant in a vaccine delivery system for intensification of the immune response. The study demonstrated that lentinan attached to MWCNTs (L-MWCNTs) had higher solubility, lower cytotoxicity, and higher biostability than soluble lentinan. L-MWCNTs enhanced production of IL-4, IL-6,

TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ . Moreover L-MWCNTs upregulated the percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen and enhanced the production of anti-OVA IgG antibodies. The observed enhancement of the immunomodulatory effects of lentinan was associated with the fact that nanotubes rapidly entered immune cells, contained larger amounts of antigens, and potentiated cellular and humoral immunity.

Wang and colleagues [24] investigated the effect of lentinan on the immune cells of BALB/c mice with sepsis. Animals received 40, 100 or 250 mg/kg of lentinan daily (by intraperitoneal injection). It was found that the drug (at all doses tested) significantly decreased IL-10 production and FoxP3 expression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs. Moreover, it attenuated LPS-stimulated Erk-FoxO1 activation. The obtained results led to the hypothesis that lentinan could be used as an immunoregulatory drug preventing sepsis in patients with burns, however, further studies in this field are needed.

The immunomodulatory effects of orally administered lentinan were also studied in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with LPS-induced inflammation [25]. It has been demonstrated that lentinan decreased the expression of TNF- and IFN-related genes involved in acute inflammatory reactions.

In another study, the impact of lentinan supplementation on immune response in Brown Norway rats was studied by McCormack et al. [26]. Lentinan (12 mg/kg) was orally administered for 20 weeks and the number of immune cells, as well as serum levels of GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$ , was determined. It was found that lentinan supplementation increased the number of circulating monocytes and CD8<sup>+</sup> T cells and decreased the ratio of CD4/CD8 cells. Moreover, this drug reduced the production of IL-4, IL-6, IL-10, and GM-CSF.

Zheng et al. [27] isolated and purified a polysaccharide, named L-II from the fruiting body of *L. edodes*, and evaluated its effects on the cellular immune response in Sarcoma-180-bearing mice. The polysaccharide L-II consisted of d-glucopyranose and had molecular weight of  $2.03 \times 10^5$  Da. Animals were treated with L-II in a doses 1, 5, and 10 mg/kg body weight. It was demonstrated that L-II in all tested concentrations increased the thymus and spleen weight, delayed-type hypersensitivity response, as well as the phagocytosis of macrophages. Moreover, this polysaccharide elevated serum TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  but not IL-2. In addition, L-II increased nitrogen oxide production and catalase activity in macrophages.

Jeff et al. [28], likewise, isolated and purified two mannogalactoglucan-type polysaccharides (WPLE-N-2 and WPLE-A0.5-2), from the fruiting bodies of *L. edodes*, and evaluated their effects on the cellular immune response of Sarcoma-180-bearing mice. Both polysaccharides were  $\alpha$ -glucans composed of glucose, galactose, and mannose. Animals were treated with 100 mg/kg body weight of the polysaccharides for 10 days. The group observed a significant tumor regression in the polysaccharides' groups. Moreover, polysaccharides upregulated NO production in peritoneal macrophages and macrophage phagocytosis and enhanced concanavalin and LPS-induced splenocytes proliferation.

Park and colleagues [29] investigated whether a standardized mycelial extract of *L. edodes*, containing  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucans, amino acids, and minerals (named AHCC<sup>®</sup>) promotes the therapeutic effect of immunotherapy in cancers in mice. The group used a combination of oral AHCC<sup>®</sup> and dual immune checkpoint blockade (DICB), including PD-1/CTLA-4 blockade. It was demonstrated that the treatment reduced tumor growth and increased granzyme B and Ki-67 expression by tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells in MC38 colon-cancer-bearing mice compared with a combination of water and DICB.

All of the results, which are summarized in Table 1, suggest that polysaccharides isolated from *L. edodes* have immunomodulatory properties. However, different studies gave opposite results. Reasons for such divergences may be different animal models used in studies, different chemical structure and molecular weight of analyzed polysaccharides, or even lack of precise analysis of which of the components of the extracts/powdered *L. edodes* is responsible for the observed immunomodulatory activity. Therefore, future investigation in this field is needed.

**Table 1.** Main studies of immunomodulatory effects of *L. edodes* polysaccharides in animal models.

Sample	Animal Model	Immunomodulatory Effects	Reference
F1, F2, and F3 heteropolysaccharide fractions composed of glucose, galactose, and mannose in different proportions, isolated from <i>L. edodes</i> water extracts	BALB/c mice	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Increased thymus index and footpad thickness (F1, F2, and F3 fraction).</li> <li>2. Increased proliferation of Con A- and LPS-stimulated splenocytes (F1, F2, F3 fraction).</li> <li>3. Increased serum IgG and IgM levels (F1, F2, F3 fraction).</li> <li>4. Enhanced cytotoxic activity of NK cells (F2 and F3 fraction).</li> </ol>	Chen et al. [8]
1, 3/1, 6- $\beta$ -glucan from <i>L. edodes</i>	C57BL/6J mice	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inhibited macrophage accumulation in the colon.</li> <li>2. Inhibited expression of proinflammatory cytokines: IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, and IL-1<math>\beta</math>.</li> </ol>	Pan et al. [17]
Bioprocessed polysaccharide (BPP)— $\beta$ -glucan composed of glucose, galactose, rhamnose, fucose, mannose, and xylose, isolated from <i>L. edodes</i> liquid mycelial culture supplemented with black rice bran	BALB/c mice infected with <i>Salmonella</i> Typhimurium	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Upregulated spleen lymphocyte proliferation.</li> <li>2. Increased serum IFN-<math>\alpha</math> levels.</li> <li>3. Increased IL-1<math>\beta</math>, IL-2, IL-6, and IL-12 production in splenocytes.</li> </ol>	Kim et al. [18]
Bioprocessed polysaccharide (BPP)— $\beta$ -glucan composed of glucose, galactose, rhamnose, fucose, mannose, and xylose, isolated from <i>L. edodes</i> liquid mycelial culture supplemented with tumeric	Chickens infected with <i>Salmonella</i> Gallinarum	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Reduced phagocytic activity of the chicken-derived macrophage cell line HD-11.</li> <li>2. Increased expression of IL-1<math>\beta</math>, IL-10, TNF-<math>\alpha</math>, iNOS.</li> <li>3. Reduced expression of IL-4, IL-6, IFN-<math>\beta</math>, IFN-<math>\gamma</math>.</li> </ol>	Han et al. [19]
SLNT1, SLNT2, JLNT1, JLNT2, and JLNT3 polysaccharides ((1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucans composed of glucose), isolated from <i>L. edodes</i> fruit body	H22-bearing mice	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Suppressed H22 tumor growth and enhanced tumor cell apoptosis (SLNT1 and JLNT1).</li> <li>2. Increased IL-2 and TNF-<math>\alpha</math> production (SLNT1 and JLNT1).</li> </ol>	Wang et al. [20]
Polysaccharide (homogenous $\beta$ -glucan composed of rhamnose, arabinose, galactose, and glucose) isolated from <i>L. edodes</i> spent compost (ASMCP)	Kunming strain mice with LPS-induced kidney injury	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Reduced the serum levels of TNF-<math>\alpha</math>, IL-6 and IL-1<math>\beta</math>.</li> <li>2. Reduced serum levels of urea nitrogen, creatinine, and uric acid.</li> <li>3. Increased activity of superoxide dismutase, catalase, and malondialdehyde.</li> </ol>	Song et al. [21]
Lentinan ((1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucan with (1 $\rightarrow$ 6) branches) encapsulated into CaCO <sub>3</sub> microparticles	BALB/c mice	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Enhanced lymphocyte proliferation.</li> <li>2. Enhanced activation of B cells.</li> <li>3. Increased ratio of CD4<sup>+</sup> to CD8<sup>+</sup> T cells in spleen lymphocytes.</li> <li>4. Increased serum IgG levels.</li> <li>5. Increased IL-2, IL-4, IFN-<math>\gamma</math>, and TNF-<math>\alpha</math> production.</li> </ol>	Liu et al. [22]
Lentinan covalently attached to multiwalled carbon nanotubes	BALB/c mice	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Enhanced production of antiovalbumin IgG antibodies.</li> <li>2. Increased production of IL-4, IL-6, TNF-<math>\alpha</math>, and IFN-<math>\gamma</math>.</li> <li>3. Upregulated percentage of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in spleen</li> </ol>	Xing et al. [23]
Lentinan	BALB/c mice	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Decreased IL-10 production.</li> <li>2. Decreased FoxP3 expression of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs.</li> <li>3. Decreased LPS-induced IL-10 production in Tregs.</li> <li>4. Attenuated LPS-stimulated Erk-FoxO1 activation.</li> </ol>	Wang et al. [24]
Lentinan	Rainbow trout ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) with LPS-induced inflammation	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Decreased expression of TNF- and IFN-related genes.</li> </ol>	Djordjevic et al. [25]

Table 1. Cont.

Sample	Animal Model	Immunomodulatory Effects	Reference
Lentinan	Brown Norwegian rats	1. Increased number of circulating monocytes. 2. Increased number of CD8 <sup>+</sup> T and decreased ratio of CD4/CD8 cells. 3. Decreased production of IL-4, IL-6, IL-10, and GM-CSF.	Jeff et al. [26]
L-II polysaccharide consisted of D-glucopyranose, isolated from <i>L. edodes</i> fruiting body	Sarcoma 180-bearing mice	1. Increased the thymus and spleen weight. 2. Increased delayed-type hypersensitivity response. 3. Increased phagocytosis of macrophages. 4. Increased TNF- $\alpha$ and IFN- $\gamma$ serum levels. 5. Increased NO production and catalase activity in macrophages.	Zheng et al. [27]
WPLE-N-2 and WPLE-A0.5-2 polysaccharides ( $\alpha$ -glucans composed of glucose, galactose, and mannose), isolated from <i>L. edodes</i> fruiting body	Sarcoma 180-bearing mice	1. Increased NO production in peritoneal macrophages. 2. Increased phagocytosis of macrophages. 3. Enhanced Con-A and LPS-induced splenocytes proliferation.	Jeff et al. [28]
AHCC <sup>®</sup> , a standardized extract of cultured <i>L. edodes</i> mycelia containing $\alpha$ - and $\beta$ -glucans, starches, sugars, amino acids, and minerals	C57BL/6 mice	1. Reduced tumor growth. 2. Increased granzyme B and Ki-67 expression by tumor-infiltrating CD8 <sup>+</sup> T cells.	Park et al. [29]

Abbreviations: Con-A, concanavalin A; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IFN, interferon; IL, interleukin; NK, natural killer; NO, nitrogen oxide; LPS, lipopolysaccharide; TNF, tumor necrosis factor.

### 2.3. Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *L. edodes*—Studies Performed in Humans

The first studies on the biological activity of *L. edodes* polysaccharides in humans were carried out in the 1980s.

The immune activating effects of lentinan were firstly described in healthy humans by Aoki [30] and Tani et al. [31]. It was found that this drug in vitro enhanced the proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and increased the production of lymphokine-activated killer cell and NK cells activity. Similar results were obtained in gastric cancer patients when lentinan was administered intravenously (2 mg of lentinan for 7 days) with classic chemotherapy [31,32]. Moreover, it was found that this drug significantly increased IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  production by PBMCs of these patients, and increased the ratio of activated T cells and cytotoxic T cells in the spleen [30,32]. In another study, conducted in patients with gastric cancer the effect of lentinan on lymphocyte subsets of peripheral blood, lymph nodes, and tumor tissues was evaluated [33]. A total of 2 mg of lentinan was intravenously administered twice to twelve patients. No changes in the lymphocyte subsets of peripheral blood were found, however, the number of CD4<sup>+</sup> T cells in lymph nodes was elevated. In addition, the number of tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup>, Leu11, and LeuM3 cells was significantly increased.

The effect of orally administered lentinan on the immune response in healthy elderly humans was investigated in the placebo-controlled clinical study in 2011 [34]. Forty-two participants were randomly assigned to two groups given either 2.5 mg/day Lentinex<sup>®</sup> or placebo. It was found that the number of total CD3<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> T cells was lower in the placebo group than in the Lentinex<sup>®</sup> group, however, no changes in the number of CD8<sup>+</sup> T cells were detected. In addition, it was demonstrated that the number of B cells in the placebo group was nonsignificantly decreased and nonsignificantly increased in the Lentinex<sup>®</sup> group. Interestingly, the difference between groups after six weeks after the end of the supplementation was significant. The number of CD56<sup>+</sup> NK cells increased significantly in both groups, but there was no difference between the groups. Changes in humoral response were also described. The complement C3 decreased significantly in both groups, but no difference between the groups was observed. No statistically significant changes in IgG, IgA, and IgM levels were found between the studied groups.

In another randomized, placebo-controlled clinical trial, the hypocholesterolemic, microbiota-modulatory, and immunomodulatory effect of *L. edodes* extract was analyzed in hypercholesterolemic patients [35]. Fifty-two participants were assigned to two groups given either a  $\beta$ -D-glucan-enriched (BGE) mixture (10.4 g/day) obtained from *L. edodes* fruiting bodies ensuring a 3.5 g/day of fungal  $\beta$ -D-glucans or a placebo incorporated in three different food products. No significant differences in lipid- or cholesterol-related parameters were found compared with the placebo group. In addition, the BGE showed no immunomodulatory effect (including changes in IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  production). However, BGE modulated the colonic microbiota.

The immunomodulating properties of *L. edodes* mushroom have also been investigated in healthy young adults in another randomized study [36]. Fifty-two participants were randomized to consume either one (5 g) or two (10 g) servings of dried, prepared *L. edodes* daily for 4 weeks. It was demonstrated that mushrooms consuming increased ex vivo proliferation of  $\gamma\delta$ -T cells and NK-T cells, as well as the expression of activation receptors on these cells. In addition, an increased level of secretory IgA in saliva and decreased level of C-reactive protein in serum was observed. The concentration of IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ /chemokine C-C ligand 3 (MIP-1 $\alpha$ /CCL3), and MIP-1 $\beta$  in PBMCs culture supernatants was also analyzed. It was found that mushroom intake upregulated IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\alpha$  levels and downregulated MIP-1 $\alpha$ /CCL3. No changes were observed for IL-6, IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\beta$ , IL-17, and IFN- $\gamma$ . It was concluded that regular *L. edodes* consumption resulted in improved immunity, however, it was not analyzed which component of the mushroom exerted immunomodulatory effects.

Wang et al. [37] evaluated the influence of lentinan on cytokines profile and T cell subsets in 73 patients with nonsmall cell lung cancer (NSCLC) treated with vinorelbine and cisplatin. As expected, all patients with NSCLC had a higher subset ratio of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. It was found that the combined therapy of lentinan–vinorelbine–cisplatin resulted in a significant increase in CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NKT cells, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> subsets. Moreover, therapy with lentinan decreased the number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, increased the production of IL-10 and TGF- $\beta$ 1, and upregulated IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12. It was concluded that lentinan-based chemo-immunotherapy could be a promising strategy in NSCLC treatment.

Our group also investigated the immunomodulatory properties of polysaccharides from *L. edodes* in healthy human immune cells. We isolated from the mycelial cultures a selenium(Se)-enriched analog of lentinan (named Se-L) and, as a reference, the non-Se-enriched fraction (named L) and evaluated its effects on the proliferation of human PBMCs stimulated with various T and B-cells mitogens and influence on superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) production by granulocytes [38]. Our study demonstrated that none of the polysaccharides has a significant effect on the generation of reactive oxygen species by granulocytes. However, we found that both fractions significantly decreased the proliferation of PBMCs stimulated with anti-CD3 antibody and phytohemagglutinin (PHA) in a dose-dependent manner. Structural studies of the obtained fraction revealed that it is a protein-containing mixture of high molar mass polysaccharides (MW  $3.9 \times 10^6$  g/mol and  $2.6 \times 10^5$  g/mol)  $\alpha$ - and  $\beta$ -glucans composed of glucose or mannose. At this early stage of the research, it was not determined which of the components of the fraction was responsible for the immunosuppressive activity. Therefore, in our next study, we separated homogenous (Se)-enriched fraction (named Se-Le-30), defined four-polysaccharide components of this fraction, and determined their structures and immunomodulatory properties in human immune cells [39,40]. We found that Se-Le-30 downregulated the proliferation of human PBMCs stimulated with anti-CD3 antibodies or allostimulated and decreased the production of TNF- $\alpha$  by CD3<sup>+</sup> T cells. This result suggests that Se-Le-30 fraction is a selective T cells immunosuppressant, which presumably acts through the modulation of signaling via the TCR–CD3 receptor complex. Later analyses demonstrated that all four polysaccharide components of Se-Le-30 also inhibited the proliferation of anti-CD3-stimulated PBMCs,

but the inhibitory effect was weaker than that of the Se-Le-30 fraction. In continuation of our study, we extracted from a postculture medium of *L. edodes* exopolysaccharides fraction (Se-containing and nonselenated) composed mainly of a highly branched 1-6- $\alpha$ -mannoprotein of molecular weight  $4.5 \times 10^6$  Da and also evaluated its effect on human PBMCs and granulocytes. The analysis demonstrated that similarly to polysaccharides isolated from *L. edodes* mycelium, exopolysaccharides have no influence on the production of reactive oxygen species by granulocytes but reduce PMBCs proliferation induced by the anti-CD3 antibody. However, the observed effect was much weaker than that for the fractions isolated from mycelium [41].

Most of the results (summarized in Table 2) strongly suggest that polysaccharides from *L. edodes* have immunomodulatory properties in humans, however, various polysaccharide fractions may significantly differ in biological activity. These differences result both from the polysaccharides source (fruiting bodies or mycelium) and extraction method, which affects monosaccharide composition, molecular weight, branching degrees, and helical conformation [7,8]. Lentinan, a (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucan with (1 $\rightarrow$ 6) branches, extracted from fruiting bodies of *L. edodes*, functions as an effective immunostimulatory agent. In contrast, polysaccharides with different structure isolated from *L. edodes* mycelium have selective immunosuppressive activity.

**Table 2.** Main studies of immunomodulatory effects of *L. edodes* polysaccharides in humans.

Sample	Participants	Immunomodulatory Effects	Reference
Lentinan used in PBMCs culture	Healthy humans	1. Enhanced proliferation of PBMCs. 2. Increased production of lymphokine-activated killer cell. 3. Increased NK cells activity.	Aoki [30] Tani et al. [31]
Lentinan administered intravenously with chemotherapy	Gastric cancer patients	1. Enhanced proliferation of PBMCs. 2. Increased production of lymphokine-activated killer cell. 3. Increased NK cells activity. 4. Increased IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ production by PBMCs. 5. Increased ratio of activated T cells and cytotoxic T cells in the spleen. 6. Elevated number of CD4 cells in lymph nodes 7. Increased number of tumor-infiltrating CD4, Leu11, and LeuM3 cells.	Tani et al. [31] Arinaga et al. [32] Takeshita et al. [33]
Lentinan administered orally	Healthy elderly humans	1. Higher number of total CD3 <sup>+</sup> and CD4 <sup>+</sup> T cells. 2. Increased number of B cells (nonsignificantly).	Gaullier et al. [34]
$\beta$ -D-glucan-enriched mixture obtained from <i>L. edodes</i> fruiting bodies incorporated in food products	Patients with hypercholesterolemia	1. No changes in IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ production.	Morales et al. [35]
Whole dried <i>L. edodes</i>	Healthy young humans	1. Increased ex vivo proliferation of $\gamma\delta$ -T cells and NK-T cells. 2. Increased expression of activation receptors on $\gamma\delta$ -T cells and NK-T cells. 3. Increased level of secretory IgA in saliva. 4. Decreased level of CRP in serum. 5. Upregulated production of IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\alpha$ by PBMCs. 6. Downregulated production of MIP-1 $\alpha$ /CCL3 by PBMCs.	Dai et al. [36]
Lentinan in combined therapy with vinorelbine and cisplatin	Patients with non-small cell lung cancer (NSCLC)	1. Increased number of CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> NKT cells. 2. Increased number of CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T cells. 3. Increased number of CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T cells. 4. Decreased number of CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Tregs. 5. Increased production of IL-10, TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12.	Wang et al. [37]



Table 2. Cont.

Sample	Participants	Immunomodulatory Effects	Reference
Polysaccharides (Se-L and L) isolated from <i>L. edodes</i> mycelium used in PBMCs and granulocytes cultures	Healthy humans	1. Decreased proliferation of anti-CD3 Ab and PHA-stimulated PBMCs. 2. No effects on production of O <sub>2</sub> <sup>-</sup> by granulocytes.	Kaleta et al. [38]
Homogenous polysaccharide fraction (Se-Le-30) isolated from <i>L. edodes</i> mycelium used in PBMCs and granulocytes cultures	Healthy humans	1. Decreased proliferation of anti-CD3 Ab-stimulated PBMCs. 2. Decreased proliferation of all stimulated PBMCs. 3. Decreased production of TNF- $\alpha$ by CD3 <sup>+</sup> T cells. 4. No effects on production of O <sub>2</sub> <sup>-</sup> by granulocytes.	Kaleta et al. [39,40]
Exopolysaccharide isolated from a postculture medium of <i>L. edodes</i>	BALB/c mice	1. Decreased proliferation of anti-CD3 Ab-stimulated PBMCs. 2. No effects on production of O <sub>2</sub> <sup>-</sup> by granulocytes.	Górska-Jakubowska et al. [41]

Abbreviations: CRP, c-reactive protein; IFN, interferon; Ig, immunoglobulin; IL, interleukin; MIP-1 $\alpha$ /CCL3, macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ /chemokine C-C ligand 3; NK, natural killer; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PHA, phytohaemagglutinin; Se, selenium; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor.

### 3. Polysaccharides from *L. edodes* as Vaccine Adjuvants

A separate area of research is the analysis on the use of *L. edodes* polysaccharides as vaccine adjuvants in order to increase the immunogenicity of antigens [42]. It has been proven that polysaccharides of natural origin are safe, nontoxic, have good biocompatibility, and are able to stimulate the immune response alone [43].

Lentinan as a biologically active polysaccharide was investigated as a potential adjuvant for Bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccination [44]. Drandarska and colleagues studied the immunomodulating effects of the combined application of BCG with lentinan (intranasal application at a dose of 1 mg/kg, three times at 2-day intervals) in guinea pigs. Forty-five days after treatment, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitrite production by alveolar macrophages, as well as their killing ability against *Mycobacterium tuberculosis* and *Staphylococcus aureus*, were measured. The obtained results suggest that BCG plus lentinan application induced a higher level of alveolar macrophage activation and enhanced the local immunohistological response to BCG in lungs.

In another study, it was suggested that lentinan enhanced the effects of the vaccine against *Trichinella spiralis* in C57BL/6J mice [45]. Recombinant *T. spiralis* Serpin (rTs-Serpin) was used as a vaccine with lentinan as an adjuvant. It was demonstrated that this combination reduced the rate of helminth burden, increased the levels of anti-rTs-serpin IgG1 and IgG2a antibodies, and upregulated production of IFN- $\gamma$  and IL-4 by CD4<sup>+</sup> T cells. Moreover, the group investigated the role of NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) in vaccine + lentinan-induced immune protection and found that lentinan increased the expression of NLRP3 mRNA, suggesting that this transcription factor may play a role in lentinan-induced immunoprotection.

Since only few studies have been conducted to analyze the potential of lentinan to influence vaccine effectiveness, further research is urgently needed. When testing new polysaccharides as vaccine adjuvants, it is important to take into consideration their separation methods, structure, and purity.

### 4. Concluding Remarks and Future Perspectives

In the last three decades, the immunomodulatory effects of various polysaccharides from *L. edodes* have been described. As summarized in the present review, numerous in vitro and in vivo studies conducted on animal models and in humans suggested that these glucans can be used as immunostimulants or immunosuppressants in many conditions.

Research confirms that *L. edodes* polysaccharides can modulate an immune response by various biochemical pathways, however, some analyses gave inconclusive or conflict-

ing results. Reasons for such divergences may be the presence of many variables that affect studies effects, including different *L. edodes* strains used, different cultivation conditions, various isolation and purification methods, as well as different dosage and route of administration.

Therefore, future studies must be focused not only on understanding the immune-related pathways and mechanisms but also on an improvement in the methodological quality.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.R. and B.K.; writing—original draft preparation, A.R. and B.K.; writing—review and editing, J.T. and R.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author without any restrictions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Gaitán-Hernández, R.; López-Peña, D.; Esqueda, M.; Gutiérrez, A. Review of Bioactive Molecules Production, Biomass, and Basidiomata of Shiitake Culinary-Medicinal Mushrooms, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms* **2019**, *21*, 841–850. [\[CrossRef\]](#)
- Muszyńska, B.; Pazdur, P.; Lazur, J.; Sułkowska-Ziaja, K. *Lentinula edodes* (Shiitake)—Biological activity. *Med. Int. Rev.* **2017**, *27*, 189–195.
- Bisen, P.S.; Baghel, R.K.; Sanodiya, B.S.; Thakur, G.S.; Prasad, G.B. *Lentinus edodes*: A macrofungus with pharmacological activities. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2419–2430. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Finimundy, T.; Dillon, A.; Henriques, J.; Ely, M. A Review on General Nutritional Compounds and Pharmacological Properties of the *Lentinula edodes* Mushroom. *Food Nutr. Sci.* **2014**, *5*, 1095–1105.
- Xu, X.; Yan, H.; Tang, J.; Chen, J.; Zhang, X. Polysaccharides in *Lentinus edodes*: Isolation, structure, immunomodulating activity and future prospective. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2014**, *54*, 474–487. [\[CrossRef\]](#)
- Sheng, K.; Wang, C.; Chen, B.; Kang, M.; Wang, M.; Liu, K.; Wang, M. Recent advances in polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.): Isolation, structures and bioactivities. *Food Chem.* **2021**, *358*, 129883. [\[CrossRef\]](#)
- Meng, X.; Liang, H.; Luo, L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydr. Res.* **2016**, *424*, 30–41. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Chen, S.; Liu, C.; Huang, X.; Hu, L.; Huang, Y.; Chen, H.; Fang, Q.; Dong, N.; Li, M.; Tang, W.; et al. Comparison of immunomodulatory effects of three polysaccharide fractions from *Lentinula edodes* water extracts. *J. Funct. Foods* **2020**, *66*, 103791. [\[CrossRef\]](#)
- Friedman, M. Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans. *Foods* **2016**, *5*, 80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Leung, M.Y.; Liu, C.; Koon, J.C.; Fung, K.P. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunol. Lett.* **2006**, *105*, 101–114. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Akramiene, D.; Kondrotas, A.; Didziapetriene, J.; Kevelaitis, E. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina* **2007**, *43*, 597–606. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Goodridge, H.S.; Wolf, A.J.; Underhill, D.M. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol. Rev.* **2009**, *230*, 38–50. [\[CrossRef\]](#)
- Chan, G.C.F.; Chan, W.K.; Sze, D.M.Y. The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* **2009**, *2*, 25. [\[CrossRef\]](#)
- Zimmerman, J.W.; Lindermuth, J.; Fish, P.A.; Palace, G.P.; Stevenson, T.T.; DeMong, D.E. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a beta-(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22014–22020. [\[CrossRef\]](#)
- Rice, P.J.; Kelley, J.L.; Kogan, G.; Ensley, H.E.; Kalbfleisch, J.H.; Browder, I.W.; Williams, D.L. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucans. *J. Leukoc. Biol.* **2002**, *72*, 140–146.
- Lin, Y.L.; Liang, Y.C.; Lee, S.S.; Chiang, B.L. Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by NF-kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *78*, 533–543. [\[CrossRef\]](#)

17. Pan, W.; Jiang, P.; Zhao, J.; Shi, H.; Zhang, P.; Yang, X.; Biazik, J.; Hu, M.; Hua, H.; Ge, X.; et al.  $\beta$ -Glucan from *Lentinula edodes* prevents cognitive impairments in high-fat diet-induced obese mice: Involvement of colon-brain axis. *J. Transl. Med.* **2021**, *19*, 54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kim, S.P.; Park, S.O.; Lee, S.J.; Nam, S.H.; Friedman, M. A Polysaccharide isolated from the liquid culture of *Lentinus edodes* (Shiitake) mushroom mycelia containing black rice bran protects mice against salmonellosis through upregulation of the Th1 immune reaction. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2384–2391. [[CrossRef](#)]
19. Han, D.; Lee, H.T.; Lee, J.B.; Kim, Y.; Lee, S.J.; Yoon, J.W. A Bioprocessed Polysaccharide from *Lentinus edodes* Mycelia Cultures with Turmeric Protects Chicks from a Lethal Challenge of *Salmonella Gallinarum*. *J. Food Prot.* **2017**, *80*, 245–250. [[CrossRef](#)]
20. Wang, K.P.; Zhang, Q.L.; Liu, Y.; Wang, J.; Cheng, Y.; Zhang, Y. Structure and inducing tumor cell apoptosis activity of polysaccharides isolated from *Lentinus edodes*. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 9849–9858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Song, X.; Ren, Z.; Wang, X.; Jia, L.; Zhang, C. Antioxidant, anti-inflammatory and renoprotective effects of acidic-hydrolytic polysaccharides by spent mushroom compost (*Lentinula edodes*) on LPS-induced kidney injury. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *151*, 1267–1276. [[CrossRef](#)]
22. Liu, Z.; Yu, L.; Gu, P.; Bo, R.; Wusiman, A.; Liu, J.; Hu, Y.; Wang, D. Preparation of lentinan-calcium carbonate microspheres and their application as vaccine adjuvants. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *245*, 116520. [[CrossRef](#)]
23. Xing, J.; Liu, Z.; Huang, Y.; Qin, T.; Bo, R.; Zheng, S.; Luo, L.; Huang, Y.; Niu, Y.; Wang, D. Lentinan-Modified Carbon Nanotubes as an Antigen Delivery System Modulate Immune Response in Vitro and in Vivo. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 19276–19283. [[CrossRef](#)]
24. Wang, S.X.; Liu, Q.Y.; Li, Y. Lentinan ameliorates burn sepsis by attenuating CD4+ CD25+ Tregs. *Burns* **2016**, *42*, 1513–1521. [[CrossRef](#)]
25. Djordjevic, B.; Skugor, S.; Jørgensen, S.M.; Overland, M.; Mydland, L.T.; Krasnov, A. Modulation of splenic immune responses to bacterial lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed lentinan, a beta-glucan from mushroom *Lentinula edodes*. *Fish Shellfish Immunol.* **2009**, *26*, 201–209. [[CrossRef](#)]
26. McCormack, E.; Skavland, J.; Mujic, M.; Bruserud, Ø.; Gjertsen, B.T. Lentinan: Hematopoietic, immunological, and efficacy studies in a syngeneic model of acute myeloid leukemia. *Nutr. Cancer* **2010**, *62*, 574–583. [[CrossRef](#)]
27. Zheng, R.; Jie, S.; Hanchuan, D.; Moucheng, W. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Int. Immunopharmacol.* **2005**, *5*, 811–820. [[CrossRef](#)]
28. Jeff, I.B.; Fan, E.; Tian, M.; Song, C.; Yan, J.; Zhou, Y. In vivo anticancer and immunomodulating activities of mannogalactoglucan-type polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berkeley) Singer. *Cent. Eur. J. Immunol.* **2016**, *41*, 47–53. [[CrossRef](#)]
29. Park, H.J.; Boo, S.; Park, I.; Shin, M.S.; Takahashi, T.; Takanari, J.; Homma, K.; Kang, I. AHCC<sup>®</sup>, a Standardized Extract of Cultured *Lentinula Edodes* Mycelia, Promotes the Anti-Tumor Effect of Dual Immune Checkpoint Blockade Effect in Murine Colon Cancer. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 875872. [[CrossRef](#)]
30. Aoki, T. Lentinan. In *Immune Modulation Agents and Their Mechanisms*; Fenichel, R.L., Chirgis, M.A., Eds.; Marcel Dekker: New York, NY, USA, 1984; pp. 63–77.
31. Tani, M.; Tanimura, H.; Yamaue, H.; Tsunoda, T.; Iwahashi, M.; Noguchi, K.; Tamai, M.; Hotta, T.; Mizobata, S. Augmentation of lymphokine-activated killer cell activity by lentinan. *Anticancer Res.* **1993**, *13*, 1773–1776.
32. Arinaga, S.; Karimine, N.; Takamuku, K.; Nanbara, S.; Inoue, H.; Nagamatsu, M.; Ueo, H.; Akiyoshi, T. Enhanced induction of lymphokine-activated killer activity after lentinan administration in patients with gastric carcinoma. *Int. J. Immunopharmacol.* **1992**, *14*, 535–539. [[CrossRef](#)]
33. Takeshita, K.; Watanuki, S.; Iida, M.; Saito, N.; Maruyama, M.; Sunagawa, M.; Habu, H.; Endo, M. Effect of lentinan on lymphocyte subsets of peripheral blood, lymph nodes, and tumor tissues in patients with gastric cancer. *Surg. Today* **1993**, *23*, 125–129. [[CrossRef](#)]
34. Gaullier, J.M.; Sleboda, J.; Øfjord, E.S.; Ulvestad, E.; Nurminiemi, M.; Moe, C.; Tor, A.; Gudmundsen, O. Supplementation with a soluble  $\beta$ -glucan exported from Shiitake medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) singer mycelium: A crossover, placebo-controlled study in healthy elderly. *Int. J. Med. Mushrooms* **2011**, *13*, 319–326. [[CrossRef](#)]
35. Morales, D.; Shetty, S.A.; López-Plaza, B.; Gómez-Candela, C.; Smidt, H.; Marín, F.R.; Soler-Rivas, C. Modulation of human intestinal microbiota in a clinical trial by consumption of a  $\beta$ -D-glucan-enriched extract obtained from *Lentinula edodes*. *Eur. J. Nutr.* **2021**, *60*, 3249–3265. [[CrossRef](#)]
36. Dai, X.; Stanilka, J.M.; Rowe, C.A.; Esteves, E.A.; Nievesm, C., Jr.; Spaiserm, S.J.; Christman, M.C.; Langkamp-Henken, B.; Percival, S.S. Consuming *Lentinula edodes* (Shiitake) Mushrooms Daily Improves Human Immunity: A Randomized Dietary Intervention in Healthy Young Adults. *J. Am. Coll. Nutr.* **2015**, *34*, 478–487. [[CrossRef](#)]
37. Wang, X.E.; Wang, Y.H.; Zhou, Q.; Peng, M.; Zhang, J.; Chen MMA, L.J.; Xie, G.M. Immunomodulatory Effect of Lentinan on Aberrant T Subsets and Cytokines Profile in Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Pathol. Oncol. Res.* **2018**, *26*, 499–505. [[CrossRef](#)]
38. Kaleta, B.; Górski, A.; Zagożdżon, R.; Cieślak, M.; Kaźmierczak-Barańska, J.; Nawrot, B.; Klimaszewska, M.; Malinowska, E.; Górski, S.; Turło, J. Selenium-containing polysaccharides from *Lentinula edodes*-Biological activity. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *223*, 115078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Klimaszewska, M.; Górski, S.; Łapienis, G.; Kaleta, B.; Górski, S.; Kaszowska, M.; Dawidowski, M.; Gamian, A.; Zagożdżon, R.; Górski, A.; et al. Identification of the Primary Structure of Selenium-Containing Polysaccharides Selectively Inhibiting T-Cell Proliferation. *Molecules* **2021**, *26*, 5404. [[CrossRef](#)]

40. Kaleta, B.; Roszczyk, A.; Zych, M.; Kniotek, M.; Zagożdżon, R.; Klimaszewska, M.; Malinowska, E.; Pac, M.; Turło, J. Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human Immune Cells. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1777. [[CrossRef](#)]
41. Górka-Jakubowska, S.; Klimaszewska, M.; Podsadni, P.; Kaleta, B.; Zagożdżon, R.; Górka, S.; Gamian, A.; Strączek, T.; Kapusta, C.; Cieślak, M.; et al. Selenium-Containing Exopolysaccharides Isolated from the Culture Medium of *Lentinula edodes*: Structure and Biological Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13039. [[CrossRef](#)]
42. Shah, R.R.; Hassett, K.J.; Brito, L.A. Overview of Vaccine Adjuvants: Introduction, History, and Current Status. *Methods Mol Biol.* **2017**, *1494*, 1–13. [[PubMed](#)]
43. Wan, X.; Yin, Y.; Zhou, C.; Hou, L.; Cui, Q.; Zhang, X.; Cai, X.; Wang, Y.; Wang, L.; Tian, J. Polysaccharides derived from Chinese medicinal herbs: A promising choice of vaccine adjuvants. *Carboh. Polym.* **2022**, *276*, 2022. [[CrossRef](#)]
44. Drandarska, I.; Kussovski, V.; Nikolaeva, S.; Markova, N. Combined immunomodulating effects of BCG and lentinan after intranasal application in guinea pigs. *Int. Immunopharmacol.* **2005**, *5*, 795–803. [[CrossRef](#)]
45. Jin, X.; Liu, X.; Ding, J.; Zhang, L.; Yang, Y.; Wang, X.; Yang, Y.; Liu, M. Lentinan improved the efficacy of vaccine against *Trichinella spiralis* in an NLRP3 dependent manner. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Publikacja nr 2:**

*Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells.*

Article

# Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human Immune Cells

Beata Kaleta <sup>1,\*</sup>, Aleksander Roszczyk <sup>1,†</sup>, Michał Zych <sup>1</sup>, Monika Kniotek <sup>1</sup>, Radosław Zagózdźon <sup>1</sup>, Marzenna Klimaszewska <sup>2</sup>, Eliza Malinowska <sup>2</sup>, Michał Pac <sup>3</sup> and Jadwiga Turło <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Immunology, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland; aleksander.roszczyk@wum.edu.pl (A.R.); michal.zych@wum.edu.pl (M.Z.); monika.kniotek@wum.edu.pl (M.K.); radoslaw.zagodzdzon@wum.edu.pl (R.Z.)

<sup>2</sup> Department of Drug Technology and Pharmaceutical Biotechnology, Medical University of Warsaw, Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland; marzenna.klimaszewska@wum.edu.pl (M.K.); eliza.malinowska@wum.edu.pl (E.M.); jadwiga.turlo@wum.edu.pl (J.T.)

<sup>3</sup> Department of Immunology, Transplantology, and Internal Diseases, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland; michal.pac@student.wum.edu.pl

\* Correspondence: beata.kaleta@wum.edu.pl; Tel.: +48-600301690

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Kaleta, B.; Roszczyk, A.; Zych, M.; Kniotek, M.; Zagózdźon, R.; Klimaszewska, M.; Malinowska, E.; Pac, M.; Turło, J. Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human Immune Cells. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1777. <https://doi.org/10.3390/biom11121777>

Academic Editor: Chi-Feng Hung

Received: 29 October 2021

Accepted: 25 November 2021

Published: 26 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** A common edible mushroom *Lentinula edodes*, is an important source of numerous biologically active substances, including polysaccharides, with immunomodulatory and antitumor properties. In the present work, the biological activity of the crude, homogenous (Se)-enriched fraction (named Se-Le-30), which has been isolated from *L. edodes* mycelium by a modified Chihara method towards human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and peripheral granulocytes, was investigated. The Se-Le-30 fraction, an analog of lentinan, significantly inhibited the proliferation of human PBMCs stimulated with anti-CD3 antibodies or allostimulated, and down-regulated the production of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  by CD3+ T cells. Moreover, it was found that Se-Le-30 significantly reduced the cytotoxic activity of human natural killer (NK) cells. The results suggested the selective immunosuppressive activity of this fraction, which is non-typical for mushroom derived polysaccharides.

**Keywords:** *Lentinula edodes*; selenium; polysaccharide; immunosuppressant

## 1. Introduction

Research over the past twenty years has shown that mushrooms are a valuable source of numerous bioactive substances [1]. The best-known components with documented immunomodulatory and antitumor properties are mushroom-derived polysaccharides [2–4]. It has been demonstrated that these compounds can affect T and B lymphocytes, natural killer (NK) cells, macrophages, and neutrophils [3,5]. The immunomodulatory properties of fungal polysaccharides depend on their structure, in particular their monosaccharide composition, molecular weight, branching degrees, presence of functional groups, water-solubility, as well as their triple-helical conformation [6]. Lentinan is one of the best known mushroom-derived compounds. It is a highly purified (1-3;1-6)- $\beta$ -D-glucan, extracted from *Lentinula edodes* (shiitake mushroom) fruiting bodies. Lentinan is used in China, Japan, and Russia as an anticancer drug and is usually administered with basic therapy [7,8]. It is postulated that the anticancer activity of this glucan is associated with its immunostimulatory properties and not with the direct impact on tumor cells [9,10].

Selenium (Se) is a vital micronutrient, important for various aspects of human health, including immune responses. Se plays a significant role in the activation, proliferation, and differentiation of immune cells [11–14]. Therefore, in our previous studies, we have

synthesized, isolated, and characterized an Se-containing analog of lentinan and examined whether Se incorporation affects its biological activity. Structural studies have shown that the isolated fraction was a protein-containing mixture of high molecular weight polysaccharides,  $\alpha$  and  $\beta$ -glucans containing glycosidically-bonded Se [15]. Regardless of the Se content, the structure of the isolated fraction was dissimilar to lentinan [15]. Next, we have analyzed the impact of this lentinan analog on cells viability, its antioxidant activity, effects on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) proliferation, and the production of reactive oxygen species by granulocytes [16]. Our analyses implicated selective immunosuppressive activity, untypical for fungal polysaccharides, that was further potentiated by Se incorporation. However, it was not clear which component of this fraction was responsible for the observed immunosuppressive effects. Thus, the goal of the current work was to obtain a purer and more homogenous fraction from the Se-enriched mycelium of *L. edodes* using the modified Chihara method [17], to investigate the biological activity of this Se-enriched extract (named Se-Le-30) in human immune cells in vitro.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Biosynthesis and Extraction of Se-Enriched Polysaccharide Fraction (Se-Le-30)

The *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strain used in our study was ATCC 48085 (ATCC, Manassas, VA, USA). The culture medium was fortified with selenium (Se) at a concentration of 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  by the addition of sodium selenite (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Se-enriched mycelia of *L. edodes* were cultivated under the submerged conditions described in our previous papers [15,18–20]. Mycelia were harvested by filtration, washed three times with distilled water, and freeze-dried.

The Se-enriched polysaccharide fraction (Se-Le-30), an analog of the Japanese anti-cancer drug lentinan, was isolated from the Se-enriched *L. edodes* mycelium via the modified Chihara method [17]. We have completed the original method by the preliminary extraction of lipids, small carbohydrate molecules, and other non-polysaccharide compounds, with methanol (4 h of extraction in boiling methanol, 1:4 *w/v*).

### 2.2. Se-Le-30 Fraction Structure Examination

The Se content, monosaccharide composition, protein content, and type of the glycosidic bonds were determined by methods described in our previous paper [15]. Briefly, the Se content was determined by the modified fluorometric method (RP HPLC with fluorescence detection), the monosaccharide composition of the polysaccharide was determined by the use of reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC), the protein content was determined by the use of the Bradford method, verified was determined via the measurement of the nitrogen content in the analyzed fractions, and the type of glycosidic bonds were determined by spectral analysis [20,21].

### 2.3. The Analysis of the Biological Activity of Se-Le-30

#### 2.3.1. The Effects of Se-Le-30 on Mitogen-Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Proliferation

PBMCs from 15 healthy donors were separated by density gradient centrifugation on Histopaque-1077 (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Samples were commercially obtained from the Regional Blood Centre in Warsaw. PBMCs ( $1 \times 10^6$  cells/well) were cultured in 96-well flat-bottom microplates in a RPMI 1640 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 2 mM L-glutamine (Sigma, Saint Louis, MO, USA), antibiotic-antimycotic solution (1.5% penicillin-streptomycin-amphotericin, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). PBMCs were stimulated with mitogens: anti-CD3 mAb (OKT3, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), phytohemagglutinin (PHA, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Sigma, Saint Louis, MO, USA), or suspension of *Staphylococcus aureus* Cowan strain (SAC, 0.004% *w/v*, Calbiochem, San Diego, CA, USA), and incubated with the Se-Le-30 fraction in concentrations of 1, 10, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to repeat the pattern

of our previous experiments [16]. As an additional control, an analogous test without any mitogens (autostimulation) was carried out. PBMCs were cultured for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were pulsed with a 1 µCi/well of [3H]-thymidine (113 Ci/nmol, NEN) for 18 h before the end of culture. When culture ended, cells were harvested, and the radioactivity was measured with a liquid scintillation counter (Wallac, PerkinElmer, Waltham, MA, USA), giving the level of radioactivity as 'corrected counts per minute' (ccpm). All experiments were performed in triplicates.

### 2.3.2. The Effects of Se-Le-30 on Alloantigen-Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Proliferation in Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

PBMCs were isolated from the heparinized blood of 10 donors, as described above, and resuspended in a RPMI 1640 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 2 mM L-glutamine (Sigma, Saint Louis, MO, USA), antibiotic-antimycotic solution (1.5% penicillin-streptomycin-amphotericin, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). PBMCs were divided into two groups: (1) responder cells and (2) stimulatory cells, which were inactivated by gamma-irradiation for 90 min. The MLR was performed via the co-culture of  $1 \times 10^5$  of responder cells and  $1 \times 10^5$  of stimulatory cells. PBMCs were treated with Se-Le-30 at a concentration of 100 µg/mL. Control cultures contained an equivalent volume of the medium. PBMCs cultures were incubated at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere for 72 h. DNA synthesis was measured in the last 18 h by adding a 1 µCi/well of [3H]-thymidine (113 Ci/nmol, NEN, PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Cells were harvested, and [3H]-thymidine uptake (expressed as radioactivity, ccpm) was quantified in a scintillation counter (Wallac PerkinElmer, Waltham, MA, USA). All experiments were performed in triplicates.

### 2.3.3. The Effects of Se-Le-30 on Cytotoxicity of Natural Killer (NK) Cells

PBMCs were isolated from 11 blood donors by density-gradient centrifugation, as described above, and adjusted to  $1 \times 10^7$  cells/2.6 mL in culture medium (RPMI 1640 with 10% FBS). A human chronic leukemia cell line, K562 (ATCC #CCL-243), was used as the target cell line. K562 cells were stained with 1.2 µL 3,3'-diiodo-4',4'-diacetylcarboxyanine perchlorate (Sigma) for 20 min at 37 °C in a sterile environment with 5% CO<sub>2</sub> and a humidified atmosphere. After incubation, the cells were suspended in a RPMI 1640 medium (with 10% FBS) to a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL and used for the cytotoxicity assay. Effector cells were incubated for 4 h at 37 °C with target cells in the following combinations: PBMCs in RPMI, K562 in RPMI, PBMCs with K562 in ratios of 50:1 and 12:1, and PBMCs with K562 in ratios of 50:1 and 12:1 supplemented with Se-Le-30 in the concentrations of 1, 10 and 100 µg/mL. After incubation, the cells were stained with propidium iodide solution (0.1 µg/mL, Sigma) to detect dead cells. Live target cells (T- K562 cells) were identified as cells with low fluorescence in a channel dedicated to PE (negative for propidium iodide) and with positive, above the third decade on a logarithmic scale, in a channel dedicated for FITC (positive for 3,3'-diiodo-4',4'-diacetylcarboxyanine perchlorate). Dead target cells (Td-K562) were distinguished as with positive fluorescence in both FITC and PE channels. The percentage of dead target cells was calculated as follows: %Td = (Td/T) × 100. Specific lysis was calculated by %Td cultured with effector cells—%Td cultured without effector cells. Cytotoxicity against K562 was analyzed using the FACS Canto II Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and BD FACS Diva 6.1.3. software.

### 2.3.4. The Effects of Se-Le-30 on TNF-α, IFN-γ, TGF-β, and IL-10 Production by CD3+ T Cells

PBMCs from healthy donors were isolated, as described above, and suspended at a density of  $1 \times 10^6$  cells/mL in a RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS, Sigma), 2 mM glutamine (Sigma), and antibiotic-antimycotic solution (100 IU penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 0.25 µg/mL amphotericin, Corning). Cells were cultured in 24-well plates (Nunc, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and incubated



for 48 h (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) in the presence of Se-Le-30 in a concentration of 100 µg/mL, and separately with the same volume of 0.9% NaCl (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) as a control. After incubation, cells were stimulated with 50 ng/mL PMA (Sigma, Saint Louis, MO, USA) and 1 µg/mL ionomycin (Sigma, Saint Louis, MO, USA), in the presence of 4 µL/mL Golgi-Stop (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 4 h. Then, cells were washed twice and resuspended in 100 µL stain buffer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), stained with monoclonal antibody anti-CD3, PerCP (SK7-clone, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 15 min, at room temperature in the dark. After surface antigen staining, cells were washed in 1000 µL, then resuspended in 300 µL BD Cytotfix/Cytoperm solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 20 min at 4 °C for permeabilization. In the next step, cells were washed twice in 1 mL and resuspended in 100 µL BD Perm/Wash™ buffer, then monoclonal antibodies against intracellular cytokines were added: anti-IFN-γ PE-Cy7 (B27 clone, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-TNF-α FITC (MAB11 clone, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-IL-10 PE (JES3-9D7 clone, Becton Dickinson), and anti-TGF-β PE (TW4-9E7 clone, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), incubated in darkness for 30 min at 4 °C, washed once in 1 mL Perm/Wash buffer and resuspended in 300 µL of stain buffer. Cell readouts data was acquired using a Becton Dickinson FACS Canto II cytometer (BD FACS Canto II, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed with BD FACS Diva 6.1.3 software. Analyses were conducted on live cells.

### 2.3.5. The Effects of Se-Le-30 on Superoxide Production by Granulocytes

Granulocytes were separated from whole blood samples of six healthy donors (commercially obtained from the Regional Blood Centre in Warsaw) by density gradient centrifugation on Histopaque-1077 and Histopaque-1119 (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Granulocytes were harvested from the interface between Histopaque-1077 and Histopaque-1119 and washed two times with cold phosphate-buffered saline (PBS, Biomed, Lublin, Poland). Granulocytes ( $2.5 \times 10^5$  cells/well) were cultured in 96-well round-bottom microplates in a sterile medium containing PBS, 6 mM glucose (Sigma, Saint Louis, MO, USA), and 1% bovine serum albumin (BSA, Biowest, Nuaille, France). Granulocytes were either activated or not by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma, Saint Louis, MO, USA) and incubated with cytochrome c (Sigma, Saint Louis, MO, USA) and Se-Le-30 in the concentration of 100 µg/mL for 30 min at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. The concentration of 100 µg/mL was chosen because it was the highest active concentration of polysaccharides tested in our previous studies [16]. The number of superoxide anions (nmols O<sub>2</sub><sup>-</sup>) generated by granulocytes was calculated using the Lambert–Beer law. Control cultures contained an equivalent amount of medium. To correct O<sub>2</sub><sup>-</sup> independent reduction of cytochrome c, an additional control with superoxide dismutase (SOD, 30 mg/mL, Sigma, Saint Louis, MO, USA) was used. Generation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> by reduction of cytochrome c was detected at room temperature using a microplates reader at 550 nm (Chromate 4300 Microplate Reader, BioFront Technologies, FL, USA). All experiments were performed in triplicates.

### 2.4. Statistical Analysis

Data gathered from the experiment was tested for normality distribution with the Shapiro–Wilk and Lilliefors tests. The Wilcoxon paired test was used for data series that did not have a normal distribution. The Student *t*-test was performed for the series with normal distribution, confirmed with both of the normality tests mentioned. ANOVA was used for data sets with normal distribution, and the Friedman test for data series with at least one data set did not show normal distribution, and data failed to be transformed to normal distribution. The data were analyzed with Statistica 13.1. Figures were prepared with GraphPad Prism 7. A probability value of  $p < 0.05$  with a 95% confidence interval was considered to indicate a statistically significant difference.

### 3. Results

#### 3.1. Structural Analysis

A detailed structural analysis of the Se-Le-30 being tested in the current work (including the first-order structure of its polysaccharide components) has been described in a separate publication [18]. To avoid repeating the results presented there, we will give only brief information on the composition of this fraction, as stated below.

The yield of the extraction and purification of Se-Le-30 by the modified Chihara method was low and amounted to about 0.04% of the mycelial dry weight. The concentration of Se was 48 µg/g. The total content of proteins was 3.3%. Glucose and mannose constituted nearly 96.7% of total monosaccharides, in a proportion of approximately 93:4 by mass. Se-Le-30 turned out to be a mixture of four polysaccharide structures, none of which is similar are lentinan (the structure of polysaccharides presented in fraction Se-Le-30 versus lentinan are presented in Supplementary Figure S1). Importantly, these structures were difficult to separate from each other due to intermolecular interactions. As shown in our previous paper [18], the main component of the Se-Le-30 fraction was a linear 1-4- $\alpha$ -D-glucan with an  $M_w > 2000$  kDa, with probable helical structure, and was much more flexible and hydrophilic than lentinan (A). The next component of the Se-Le-30 fraction was a mixture of unbranched 1-6- $\beta$ -D-glucan, unbranched 1-3- $\beta$ -D-glucan, and 1-3- $\beta$ -branched 1-6- $\beta$ -D-glucan—all with a probable helical conformation (B, C and D). As we stated in our previous work [18], the content of the polysaccharides B-C/D in the Se-Le-30 fraction was less than 3% which suggested its low content in the *L. edodes* cell wall (or low extractability with hot water).

The molar mass of the analyzed polysaccharide was:  $M_n = 1.69 \times 10^6$  g/mol,  $M_w = 3.62 \times 10^6$  g/mol,  $D = 2.15$  (dispersity).

#### 3.2. Biological Activity of Se-Le-30

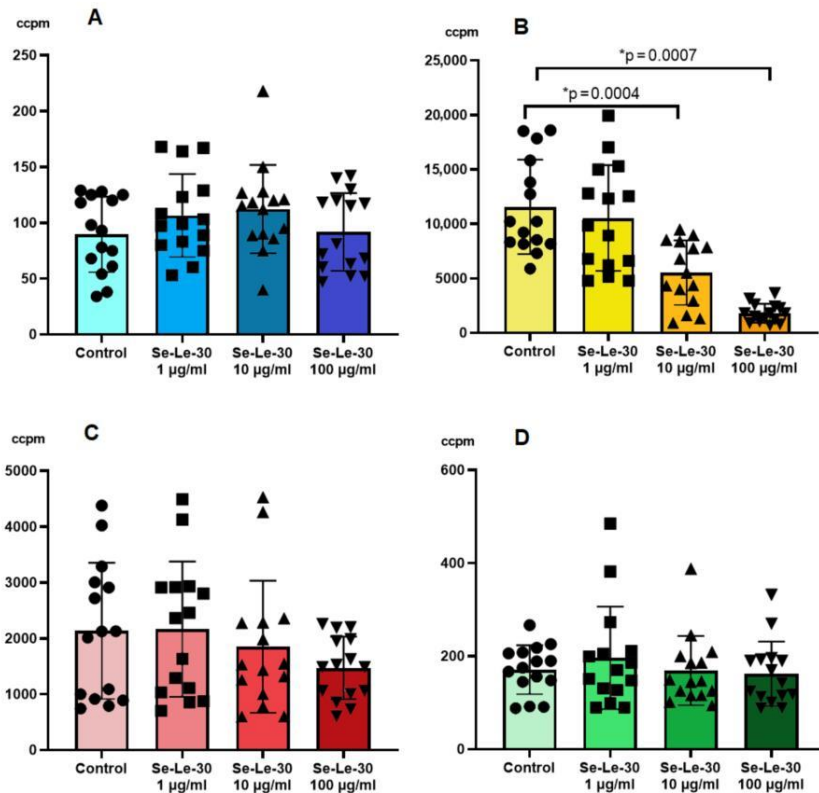
##### 3.2.1. The Effect of Se-Le-30 on Proliferation of the Mitogen-Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

The mitogen-induced proliferation of PBMCs is a widely used assay to assess non-specific cellular immunity. To study this response, human PBMCs were stimulated with two T-cells mitogens (anti-CD3 mAb (OKT3) and PHA) or a suspension of *Staphylococcus aureus* Cowan strain (SAC, B cells mitogen). The effect of Se-Le-30 on the mitogen-stimulated proliferation of human PBMCs is presented in Figure 1. The study demonstrated that Se-Le-30 in the concentrations of 10 and 100 µg/mL significantly inhibited OKT3-induced proliferation of PBMCs ( $p = 0.0004$  and  $p = 0.0007$ , respectively). However, no significant inhibitory effect of this fraction on PHA- and SAC-stimulated PBMCs was detected.

The cell viability assessment via the trypan blue exclusion method indicated that the inhibitory effect on OKT3-stimulated PBMCs proliferation was not due to the toxicity of the analyzed polysaccharide.

##### 3.2.2. The Effect of Se-Le-30 on Alloantigen-Stimulated Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) Proliferation in Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

Mixed lymphocyte reaction (MLR) has been used for the selection of donors for transplantation. Today the MLR-based assay is an efficient model for the study of T-cell activation and proliferation, and for the monitoring of the immune status of transplant organ recipients. In MLR, T cells from two unrelated donors are cocultured. The foreign histocompatibility antigens present on allogeneic cells serve as stimulators of proliferation.

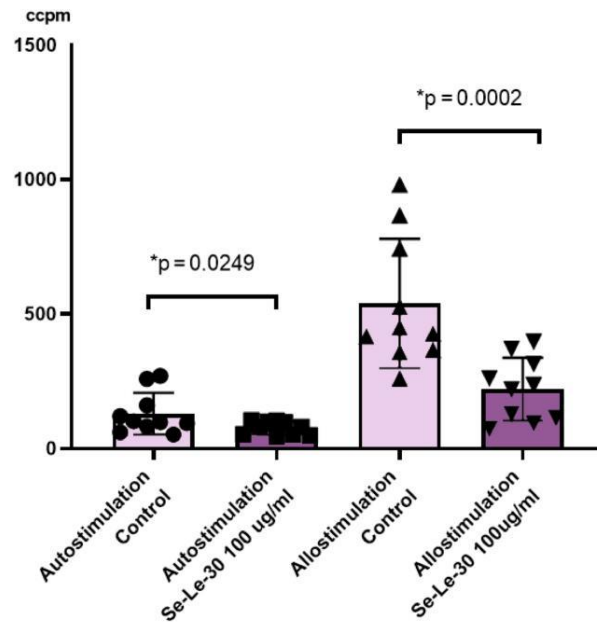


**Figure 1.** The effect of Se-Le-30 (in the concentrations of 1, 10 and 100 µg/mL) on the proliferation of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) non-stimulated (A), stimulated with anti-CD3 monoclonal antibody (OKT3, B), phytohemagglutinin (PHA, C) or suspension of *Staphylococcus aureus* Cowan strain (SAC, D). The proliferation of lymphocytes was examined on the DNA synthesis level by the measurements of <sup>3</sup>H-thymidine incorporation. The results are presented as a level of radioactivity measured as 'corrected counts per minute' (ccpm). Statistical differences were considered when  $p < 0.05$ . The mean value ( $n = 15$ ) and standard deviation are given. \*  $p < 0.05$  vs. control.

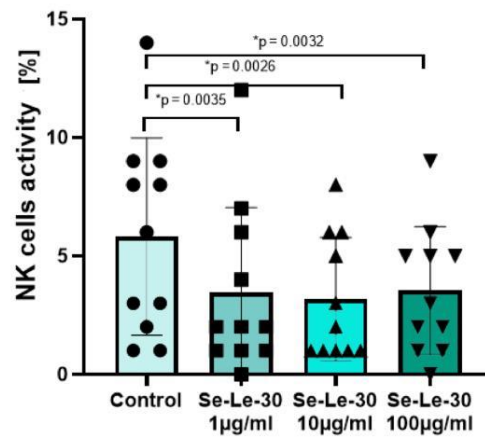
The effect of Se-Le-30 on auto- and allo-stimulated PBMCs proliferation is presented in Figure 2. It was demonstrated that this fraction significantly inhibited a proliferative response in the MLR assay performed with human auto- or allo-stimulated PBMCs ( $p = 0.0249$  and  $p = 0.0002$ , respectively).

### 3.2.3. The Effect of Se-Le-30 on Cytotoxicity of Natural Killer (NK) Cells

The effect of Se-Le-30 on the cytotoxic activity of human NK cells is presented in Figure 3. The study demonstrated that this Se-enriched polysaccharide significantly down-regulated the cytotoxicity of NK cells in the concentrations of 1, 10, and 100 µg/mL ( $p = 0.0039$ ,  $p = 0.0039$ , and  $p = 0.0032$ , respectively).



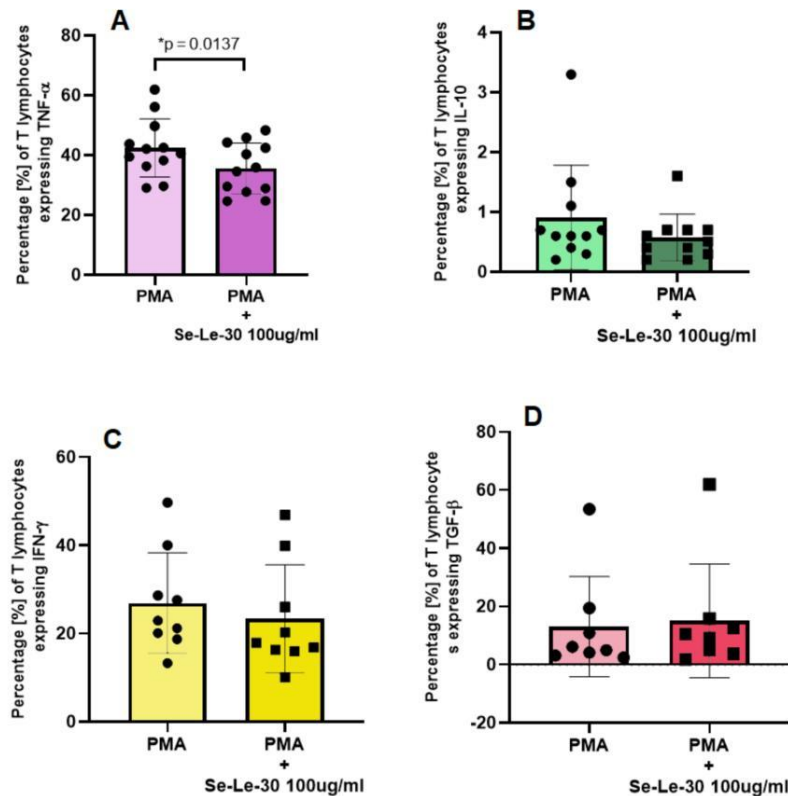
**Figure 2.** The effect of Se-Le-30 (100 µg/mL) on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) proliferation in a mixed lymphocyte reaction (MLR). The proliferation of lymphocytes cultured with irradiated PBMCs from the same donor (autostimulation) or from the second unrelated donor (allostimulation) was examined on the DNA synthesis level by the measurement of 3H-thymidine incorporation. The results are presented as a level of radioactivity measured as ‘corrected counts per minute’ (ccpm). Statistical differences were considered when  $p < 0.05$ . The mean value ( $n = 10$ ) and standard deviation are given. \*  $p < 0.05$  vs. control.



**Figure 3.** The effects of Se-Le-30 (in concentrations of 1, 10 and 100 µg/mL) on the cytotoxic activity of human natural killer (NK) cells. Statistical differences were considered when  $p < 0.05$ . The mean value ( $n = 11$ ) and standard deviation are given. \*  $p < 0.05$  vs. control.

### 3.2.4. The Effect of Se-Le-30 on Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ , Interleukin (IL)-10, Interferon (INF)- $\gamma$ and Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ Production by CD3+ T Cells

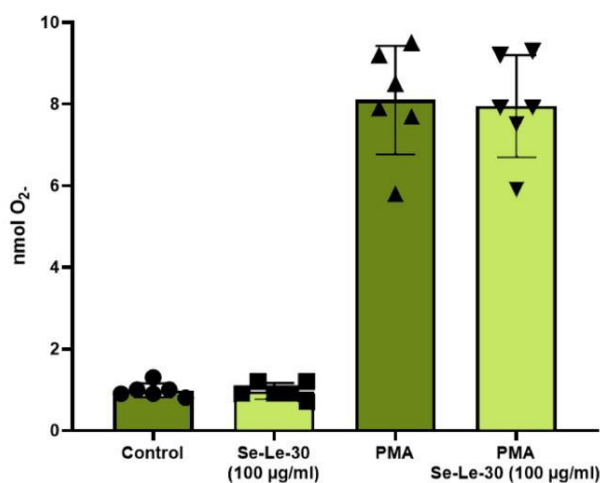
The effect of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Se-Le-30 on TNF- $\alpha$ , IL-10, INF- $\gamma$ , and TGF- $\beta$  production by CD3+ T cells is presented in Figure 4. The study demonstrated that Se-Le-30 significantly down-regulated the number of TNF- $\alpha$  producing CD3+ T cells, however, did not affect the number of IL-10, INF- $\gamma$  and TGF- $\beta$  producing CD3+ T cells.



**Figure 4.** The effects of Se-Le-30 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on the percentage of CD3+ T lymphocytes producing tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (A), interleukin (IL)-10 (B), interferon (INF)- $\gamma$  (C), and transforming growth factor (TGF)- $\beta$  (D). Statistical differences were considered when  $p < 0.05$ . The mean values ( $n = 12$  for TNF- $\alpha$ ,  $n = 11$  for IL-10,  $n = 9$  for IFN- $\gamma$ , and  $n = 8$  for TGF- $\beta$ ) and standard deviations are given. \*  $p < 0.05$  vs. control. For a detailed explanation of the gating strategy, please see Supplementary Figure S2.

### 3.2.5. The Effect of Se-Le-30 on Superoxide Anion ( $\text{O}_2^-$ ) Production by Granulocytes

Granulocytes generate reactive oxygen species, including superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ), during phagocytosis and in response to soluble agonists. To study this response, the production of  $\text{O}_2^-$  in the cytochrome c reduction assay was measured. The analysis demonstrated that Se-Le-30 has no significant effect on the  $\text{O}_2^-$  production by human granulocytes ( $p = 0.715$ ) (Figure 5).



**Figure 5.** The effect of Se-Le-30 (in the concentration of 100 µg/mL) on the production of superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) by human peripheral blood granulocytes. The auto- and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) stimulation of granulocytes is presented as a concentration of O<sub>2</sub><sup>-</sup> determined by cytochrome c reduction rate. *p* value was calculated for control cultures vs. cultures with Se-Le-30 and PMA stimulated cultures vs. cultures with PMA and Se-Le-30. The mean value (*n* = 6) and standard deviation are given.

#### 4. Discussion

In the last decades, numerous mushroom-derived polysaccharides have been described and used as immunomodulatory and anti-cancer agents [2,9,10]. The exact mechanism of their action is not fully explained, but it was revealed that they act as biological response modifiers (BRMs) that stimulate cell-mediated immune response [9,10]. One of the best-characterized polysaccharides of fungal origin is lentinan, isolated from fruiting bodies of *L. edodes*. Due to their unique properties and confirmed safety, fungal polysaccharides, mainly β-glucans from *L. edodes*, are used in the prevention and adjuvant therapy in many diseases [7,8].

In our previous studies, we used the Yap and Ng [22] method for the isolation of the polysaccharide fractions from the Se-enriched mycelium of *L. edodes*. This method is known to be considerably milder than a multi-step fractionation procedure used for isolation of lentinan from fruiting bodies of *L. edodes* by Chihara [17]. In accordance with our expectations, the currently studied polysaccharide (named Se-Le-30), isolated by modified Chihara method from the Se-enriched mycelium of *L. edodes*, was characterized by a higher purity but much lower content of Se as compared to described in our earlier papers fraction Se-L [15,16].

As mentioned above, the immunomodulatory properties of mushroom-derived polysaccharides depend on their structure [6]. Lentinan, one of the best known natural enhancers of the immune system, is a (1,6)-branched (1,3)-β-glucan extracted from *L. edodes* fruiting bodies [5]. Our structure studies showed that Se-Le-30 fraction is a mixture of α-1,4-glucan and β-1,3-branched β-1,6-D-glucan with a much higher than lentinan molecular weight ( $3.62 \times 10^6$  g/mol vs.  $1.153 \times 10^3$  g/mol). This may explain why the biological activity of the Se-Le-30 observed in the present study was different (i.e., opposite) to lentinan.

Our data reveal that Se-Le-30 significantly inhibits anti-CD3-, but not PHA- or SAC-stimulated proliferation of human PBMCs. These observations are consistent with our findings for T-cell proliferation measured in human allogeneic MLR. This outcome sug-

gests that Se-Le-30 is a selective immunosuppressant, which acts through the modulation of signaling via the TCR-CD3 receptor complex; however, the exact mechanism of action was not examined at this stage of research. It is worth emphasizing that selective immunosuppressive activity is not typical for polysaccharides of fungal origin.

Next, we explored whether Se-Le-30 affects the cytokine production of human CD3<sup>+</sup> T cells. Intracellular cytokine staining by flow cytometry demonstrated that the analyzed fraction significantly down-regulated the production of TNF- $\alpha$ ; however, it had no effect on the numbers of IL-10-, IFN- $\gamma$ - and TGF- $\beta$ -producing CD3<sup>+</sup> T cells. Opposite results were obtained in a few studies analyzing the biological activity of lentinan, which is considered an effective immunostimulatory drug [9,10]. Wang et al. [23] revealed that lentinan, in a dose-dependent manner, increased the anti-CD3 antibody-induced proliferation of T cells in mice. Moreover, numerous studies confirmed that this drug augments the production of some immune mediators, including IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  [24,25], IL-3 [26], IL-6 [27], IL-10, TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-12 [25,28]. In addition, several reports suggested that lentinan stimulates the proliferation of lymphocytes, monocytes and macrophages [29]. We assume that opposite results obtained in our study and research for lentinan are associated with different structures of these glucans since the elements of the polysaccharide structure determine their biological activity [6].

In our study, we also investigated the effects of Se-Le-30 on human NK cells' cytotoxic activity. These cells express complement receptor type 3 (CR3) and toll-like receptor 4 (TLR-4), which are recognized by polysaccharides [30]. We found that the analyzed fraction significantly down-regulated cytotoxic activity of human NK cells. In contrast to Se-Le-30, recent studies demonstrated that lentinan activates the NK cells of healthy blood donors and cancer patients. It was observed that the drug promoted the cytotoxicity of NK cells via the upregulation of IFN- $\gamma$  and perforin production and increasing the expression of the activating receptor NKp30 [31,32]. In similar studies, the enhancement of NK activity was observed in chronic lymphocytic leukemia patients [33,34].

It has been demonstrated that receptors for  $\beta$ -glucans are expressed on neutrophils [35]. Moreover, as in our previous study, we showed that Se-enriched polysaccharides exert antioxidant effects in HeLa cells [16]. In the present study, we decided to analyze the effects of Se-Le-30 on the production of superoxide anions (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) using human peripheral blood granulocytes. However, we found no significant influence of Se-Le-30 on the reactive oxygen species production by these cells. This suggests that the antioxidant activity observed in the previous analysis is not related to the inhibition of ROS synthesis.

In summary, the results obtained in the present study indicate that Se-Le-30, an analog of lentinan, isolated by the modified Chihara method from the Se-enriched mycelium of *L. edodes*, is a T/NK cell-selective immunosuppressant, which is not typical for mushroom-derived  $\beta$ -glucans. Our results are, therefore, innovative and substantiate the necessity for further comprehensive investigations on the immunomodulatory activities of Se-Le-30 towards prospective applications as an immunosuppressive compound.

## 5. Patents

The result of the described research is a patent application P.438570 "Selenized bioactive polysaccharide fraction from *Lentinula edodes*, a pharmaceutical composition comprising selenized bioactive polysaccharide fraction, the selenized bioactive polysaccharide fraction for use as medicaments and a method of preparation thereof" filed with the Patent Office of the Republic of Poland on 22 July 2021.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom1121777/s1>, Figure S1: The structure of polysaccharides presented in fraction Se-Le-30 versus lentinan: (A)  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4) glucan; (B)  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) glucan; (C)  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6) glucan; (D)  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6) glucan, (E).  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 3) glucan (lentinan). Figure S2: Gating strategy for flow cytometry intracellular cytokine expression assay. Mononuclear cells were gated on the FSC-A/SSC-A plot as cells below  $50 \times 10^3$  on SSC and  $50\text{--}200 \times 10^3$  FSC (A). Data from previously gated population cell aggregates were excluded (B). Subsequently, CD3<sup>+</sup> cells were identified by fluorescence above  $10^3$

on the PerCP channel (C). An experiment was conducted in two variations of intracellular staining: IFN- $\gamma$ -FITC and TGF- $\beta$ -PE (Tube 1), TNF $\alpha$ -FITC and IL-10-PE (Tube 2). The cut-off value for positive fluorescence of studied intracellular cytokines (D1, D2, E1, E2) was based on the Fluorescence-Minus-One experiment and corresponding isotype controls. The hierarchy for studies populations and target cells (F1 and F2).

**Author Contributions:** Conceptualization, B.K., R.Z., M.K. (Marzena Klimaszewska) and J.T.; methodology, B.K., A.R., M.Z., M.K. (Marzena Klimaszewska), M.K. (Monika Kniotek), E.M., M.P. and J.T.; validation, A.R., M.Z., M.K. (Monika Kniotek), M.P., R.Z. and J.T.; formal analysis, R.Z. and J.T.; investigation, B.K., A.R., M.Z., M.K. (Marzena Klimaszewska), M.K. (Monika Kniotek), E.M. and M.P.; writing—original draft preparation, B.K., A.R. and J.T.; writing—review and editing, M.Z., M.K. (Marzena Klimaszewska), M.K. (Monika Kniotek), R.Z. and M.P.; visualization, A.R.; supervision, R.Z. and J.T.; project administration, R.Z. and J.T.; funding acquisition, R.Z. and J.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the National Science Centre, Poland, grant number DEC-2013/09/B/NZ7/03978 and by internal funds of the Medical University of Warsaw.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Medical University of Warsaw (no. KB/174/2017).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** All the data are illustrated in the figures and in the Supplementary Materials.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Elsayed, E.A.; El Enshasy, H.; Wadaan, M.A.M.; Aziz, R. Mushrooms: A Potential Natural Source of Anti-Inflammatory Compounds for Medical Applications. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wasser, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *60*, 258–274. [[CrossRef](#)]
3. Borchers, A.T.; Keen, C.L.; Gershwin, M.E. Mushrooms, Tumors, and Immunity: An Update. *Exp. Biol. Med.* **2004**, *229*, 393–406. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Yu, Y.; Shen, M.; Song, Q.; Xie, J. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *183*, 91–101. [[CrossRef](#)]
5. Zheng, R.; Jie, S.; Hanchuan, D.; Moucheng, W. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Int. Immunopharmacol.* **2005**, *5*, 811–820. [[CrossRef](#)]
6. Ferreira, S.; Passos, C.; Madureira, P.; Vilanova, M.; Coimbra, M.A. Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *132*, 378–396. [[CrossRef](#)]
7. Sullivan, R.; Smith, J.E.; Rowan, N.J. Medicinal Mushrooms and Cancer Therapy: Translating a traditional practice into Western medicine. *Perspect. Biol. Med.* **2006**, *49*, 159–170. [[CrossRef](#)]
8. Mahajna, J.A.; Yassin, M.; Wasser, S.P. Mushrooms Extracts Having Anticancer Activity. US Patent 7 258 862 B2, 21 August 2007.
9. Kataoka, H.; Shimura, T.; Mizoshita, T.; Kubota, E.; Mori, Y.; Mizushima, T.; Wada, T.; Ogasawara, N.; Tanida, S.; Sasaki, M.; et al. Lentinan with S-1 and paclitaxel for gastric cancer chemotherapy improve patient quality of life. *Hepatogastroenterology* **2009**, *56*, 547–550.
10. Higashi, D.; Seki, K.; Ishibashi, Y.; Egawa, Y.; Koga, M.; Sasaki, T.; Hirano, K.; Mikami, K.; Futami, K.; Maekawa, T.; et al. The effect of lentinan combination therapy for unresectable advanced gastric cancer. *Anticancer. Res.* **2012**, *32*, 2365–2368.
11. Spallholz, J.E.; Boylan, L.M.; Larsen, H.S. Advances in Understanding Selenium's Role in the Immune System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, *587*, 123–139. [[CrossRef](#)]
12. Hawkes, W.C.; Kelley, D.S.; Taylor, P.C. The Effects of Dietary Selenium on the Immune System in Healthy Men. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *81*, 189–213. [[CrossRef](#)]
13. Hoffmann, P.R.; Berry, M.J. The influence of selenium on immune responses. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 1273–1280. [[CrossRef](#)]
14. Rayman, M.P. Selenium and human health. *Lancet* **2012**, *379*, 1256–1268. [[CrossRef](#)]
15. Malinowska, E.; Klimaszewska, M.; Strączek, T.; Schneider, K.; Kapusta, C.; Podsadni, P.; Lapienis, G.; Dawidowski, M.; Kleps, J.; Górska, S.; et al. Selenized polysaccharides—Biosynthesis and structural analysis. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *198*, 407–417. [[CrossRef](#)]



16. Kaleta, B.; Górski, A.; Zagożdżon, R.; Cieślak, M.; Kaźmierczak-Barańska, J.; Nawrot, B.; Klimaszewska, M.; Malinowska, E.; Górka, S.; Turlo, J. Selenium-containing polysaccharides from *Lentinula edodes*—Biological activity. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *223*, 115078. [[CrossRef](#)]
17. Chihara, G.; Hamuro, J.; Maeda, Y.; Arai, Y.; Fukuoka, F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.* **1970**, *30*, 2776–2781.
18. Klimaszewska, M.; Górka, S.; Lapienis, G.; Kaleta, B.; Górka, S.; Kaszowska, M.; Dawidowski, M.; Gamian, A.; Zagożdżon, R.; Górski, A.; et al. Identification of the Primary Structure of Selenium-Containing Polysaccharides Selectively Inhibiting T-Cell Proliferation. *Molecules* **2021**, *26*, 5404. [[CrossRef](#)]
19. Turlo, J.; Gutkowska, B.; Herold, F. Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 1085–1091. [[CrossRef](#)]
20. Turlo, J.; Gutkowska, B.; Herold, F.; Gajzlerska, W.; Dawidowski, M.; Dorociak, A.; Zobel, A. Biological Availability and Preliminary Selenium Speciation in Selenium-Enriched Mycelium of *Lentinula edodes* (Berk.). *Food Biotechnol.* **2011**, *25*, 16–29. [[CrossRef](#)]
21. Cheong, K.-L.; Wu, D.-T.; Zhao, J.; Li, S.-P. A rapid and accurate method for the quantitative estimation of natural polysaccharides and their fractions using high performance size exclusion chromatography coupled with multi-angle laser light scattering and refractive index detector. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1400*, 98–106. [[CrossRef](#)]
22. Yap, A.-T.; Ng, M.-L. An Improved Method for the Isolation of Lentinan from the Edible and Medicinal Shiitake Mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). *Int. J. Med. Mushrooms* **2001**, *3*, 11. [[CrossRef](#)]
23. Wang, S.-X.; Liu, Q.-Y.; Li, Y. Lentinan ameliorates burn sepsis by attenuating CD4 + CD25 + Tregs. *Burns* **2016**, *42*, 1513–1521. [[CrossRef](#)]
24. Fruehauf, J.P.; Bonnard, G.D.; Herberman, R.B. The effect of lentinan on production of interleukin-1 by human monocytes. *Immunopharmacology* **1982**, *5*, 65–74. [[CrossRef](#)]
25. Chihara, G. Immunopharmacology of Lentinan, a polysaccharide isolated from *Lentinus edodes*: Its application as a host defense potentiator. *Int. J. Oriental Med.* **1992**, *17*, 57–77.
26. Izawa, M.; Ohno, K.; Amikura, K.; Hamuro, J. Lentinan augments the production of Interleukin 3 and colony stimulating factor(s). In *Manipulation of Host Defence Mechanisms*; Aoki, T., Ed.; Excerpta Medica: Amsterdam, The Netherlands, 1984; p. 59.
27. Maeda, Y.Y.; Sakaizumi, M.; Moriwaki, K.; Chihara, G.; Yonekawa, H. Genetical control on lentinan-induced acute phase responses and vascular responses. *Folia Histochem. Cytobiol.* **1992**, *30*, 207–209.
28. Wang, X.-E.; Wang, Y.-H.; Zhou, Q.; Peng, M.; Zhang, J.; Chen, M.; Ma, L.-J.; Xie, G.-M. Immunomodulatory Effect of Lentinan on Aberrant T Subsets and Cytokines Profile in Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Pathol. Oncol. Res.* **2018**, *26*, 499–505. [[CrossRef](#)]
29. Hobbs, C. Medicinal Value of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Agaricomycetidae). A Literature Review. *Int. J. Med. Mushrooms* **2000**, *2*, 287–302. [[CrossRef](#)]
30. Mian, M.F.; Lauzon, N.M.; Andrews, D.; Lichty, B.D.; Ashkar, A.A. FimH Can Directly Activate Human and Murine Natural Killer Cells via TLR4. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 1379–1388. [[CrossRef](#)]
31. Tani, M.; Tanimura, H.; Yamaue, H.; Iwahashi, M.; Tsunoda, T.; Tamai, M.; Noguchi, K.; Arii, K. In vitro generation of activated natural killer cells and cytotoxic macrophages with lentinan. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1992**, *42*, 623–627. [[CrossRef](#)]
32. Huyan, T.; Li, Q.; Yang, H.; Jin, M.-L.; Zhang, M.-J.; Ye, L.-J.; Li, J.; Huang, Q.-S.; Yin, D.-C. Protective effect of polysaccharides on simulated microgravity-induced functional inhibition of human NK cells. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *101*, 819–827. [[CrossRef](#)]
33. Amino, M.; Noguchi, R.; Yata, J.; Matsumura, J.; Hirayama, R.; Abe, O.; Enomoto, K.; Asato, Y. Studies on the effect of lentinan on human immune system. II. In vivo effect on NK activity, MLR induced killer activity and PHA induced blastic response of lymphocytes in cancer patients. *Gan Kagaku Ryoho. Cancer Chemother.* **1983**, *10*, 2000–2006.
34. Péater, G.; Káaroly, V.; Imre, B.; Jáanos, F.; Kaneko, Y. Effects of Lentinan on Cytotoxic Functions of Human Lymphocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **1988**, *10*, 157–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Taylor, P.; Brown, G.; Reid, D.M.; Willment, J.; Martinez-Pomares, L.; Gordon, S.; Wong, S.Y.C. The  $\beta$ -Glucan Receptor, Dectin-1, Is Predominantly Expressed on the Surface of Cells of the Monocyte/Macrophage and Neutrophil Lineages. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 3876–3882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Publikacja nr 3:**

*The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis.*



## Article

# The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis

Aleksander Roszczyk<sup>1,\*</sup>, Michał Zych<sup>1</sup>, Katarzyna Zielniok<sup>1</sup>, Natalia Krata<sup>2</sup>, Jadwiga Turło<sup>3</sup>, Marzenna Klimaszewska<sup>3</sup>, Radosław Zagożdżon<sup>1</sup> and Beata Kaleta<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Clinical Immunology, Medical University of Warsaw, Nowogrodzka 59, 02-006 Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Department of Immunology, Transplantology and Internal Diseases, Medical University of Warsaw, 02-006 Warsaw, Poland

<sup>3</sup> Department of Drug Technology and Pharmaceutical Biotechnology, Medical University of Warsaw, Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland

\* Correspondence: aleksander.roszczyk@wum.edu.pl (A.R.); beata.kaleta@wum.edu.pl (B.K.); Tel.: +48-22-502-12-62 (A.R.); +48-22-502-10-58 (B.K.)



**Citation:** Roszczyk, A.; Zych, M.; Zielniok, K.; Krata, N.; Turło, J.; Klimaszewska, M.; Zagożdżon, R.; Kaleta, B. The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1900. <https://doi.org/10.3390/biom12121900>

Academic Editor: Vladimir N. Uversky

Received: 7 November 2022

Accepted: 14 December 2022

Published: 19 December 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Polysaccharides isolated from *Lentinula edodes* are bioactive compounds with immunomodulatory properties. In our previous studies from *L. edodes* mycelium, we have isolated a selenium(Se)-enriched fraction (named Se-Le-30), a mixture of linear 1,4- $\alpha$ -glucan and linear 1,3- $\beta$ - and 1,6- $\beta$ -glucans. In this study, we analyzed the effects of Se-Le-30 on the activation and proliferation of human T lymphocytes stimulated by anti-CD3 and anti-CD3/CD28 antibodies (Abs) and on the production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Se-Le-30 had effects on T cell proliferation induced by Abs against CD3 and CD28. It significantly inhibited the proliferation of CD3-stimulated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and enhanced the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells stimulated with anti-CD3/CD28 Ab. Moreover, Se-Le-30 downregulated the number of CD3-stimulated CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells, as well as CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> cells, and upregulated the expression of CD25 marker on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells activated with anti-CD3/CD28 Abs. Furthermore, Se-Le-30 enhanced the synthesis of IFN- $\gamma$  by the unstimulated and anti-CD3/CD28-stimulated PBMCs, inhibited synthesis of IL-2 and IL-4 by CD3-stimulated cells, and augmented the synthesis of IL-6 and IL-10 by unstimulated, CD3-stimulated, and CD3/CD28-stimulated PBMCs. Together, we demonstrated that Se-Le-30 exerts immunomodulatory effects on human T lymphocytes. These observations are of importance for the prospective use of Se-Le-30 in research or as a therapeutic compound.

**Keywords:** immunomodulation; *Lentinula edodes*; T lymphocytes; PBMC

## 1. Introduction

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (shiitake mushroom) is a source of numerous bioactive compounds of which the most valuable are polysaccharides [1]. *L. edodes*-derived polysaccharides, especially  $\beta$ -glucans, are biological response modifiers (BRMs) with anticancer, antimicrobial, and immunomodulatory properties [2]. Several randomized controlled studies demonstrated that fungal  $\beta$ -glucans exhibit immune-enhancing effects without causing noticeable adverse effects [3,4].

Lentinan is one of the widely studied polysaccharides from *L. edodes*. It is a highly purified  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) branched  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucan with molecular weight (Mw) of  $1.153 \times 10^3$  g/mol, which is clinically used as an adjuvant in cancer therapies in some Asian countries [2].

It has been documented that the biological activity of fungal polysaccharides depends on their source (mycelium or fruiting bodies), methods of extraction, composition, Mw, branching degrees, and helical conformation [5–7]. Polysaccharides with higher Mw and triple helical conformation show stronger biological activity, which may be explained by

their ability to induce clustering of various receptors [6–8]. Similarly, the sugar composition of polysaccharides affects their activity, for example, mannose, xylose, and arabinose have been related to immunomodulatory effects on macrophages [9].

So far, a number of surface receptors have been found to interact with  $\beta$ -glucans, including dectin-1 [10], complement receptor type 3 (CR3) [11–14], toll-like receptors (TLRs) type 2/4/6 [13,15–18], lactosylceramide (LaCer) [13,19], and scavenger receptors [13]. Thus, fungal polysaccharides, due to their ability of binding to multiple types of receptors on a wide variety of immune cells, depending on their composition, conformation, and Mw, may exhibit different biological effects and activate distinct signaling pathways.

In our previous studies, we isolated a selenium(Se)-enriched lentinan analog (named Se-Le-30) from *L. edodes* mycelial cultures. Structural studies demonstrated that obtained fraction is a mixture of linear 1,4- $\alpha$ -glucan and linear 1,3- $\beta$ - and 1,6- $\beta$ -glucans with much higher than lentinan Mw ( $3.62 \times 10^6$  g/mol) [20]. We then analyzed the immunomodulatory properties of this glucan on healthy human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). We found that Se-Le-30 significantly inhibited the proliferation of PBMCs both when stimulated with anti-CD3 monoclonal antibody (mAb, OKT3) ad upon allostimulation in a mixed lymphocyte reaction (MLR), without causing cytotoxicity or reducing the TNF- $\alpha$  production by CD3<sup>+</sup> T cells. These preliminary results suggested that Se-Le-30 is a T cell-selective immunosuppressant, which most likely acts through the modulation of signaling via the T cell receptor (TCR)/CD3 complex. While antibodies against CD3 effectively induce proliferation, however, in the absence of a costimulatory signal, proliferating T cells can lose their function or undergo early apoptosis [21]. Therefore, in the present study, we analyzed the effects of Se-Le-30 on the activation and proliferation of human T lymphocytes stimulated by CD3 and CD3/CD28 Abs and on the production of cytokines.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Biosynthesis and Isolation of Se-Le-30

The *L. edodes* (Berk.) Pegler strain used in this study was American Type Culture Collection 48085 (ATCC, Manassas, VA, USA). Sodium selenite (Sigma, Saint Louis, MO, USA) was added to the culture medium to obtain a Se concentration of 30  $\mu$ g/mL. *L. edodes* mycelium was cultivated under the conditions described in the previous papers [20,22–24]. The mycelium was harvested by filtration, washed, and freeze-dried, and Se-Le-30 was isolated by the modified Chihara method [25,26]. Its structural analysis was described in detail in our previous paper [20].

### 2.2. PBMCs Isolation

Blood samples were collected by venipuncture into heparin-coated tubes. PBMCs were isolated from 9 mL of whole blood using Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic) according to the manufacturer's instructions. Blood samples were obtained from the Regional Blood Centre in Warsaw, Poland, under the approval of the Bioethics Committee of the Medical University of Warsaw (no. KB/174/2017; updated AKBE/186/2021).

### 2.3. Preparation for Flow Cytometry Analysis

Prior to flow cytometry assays, all antibodies, viability marker, and carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) were titrated to obtain the highest signal-to noise ratio for each fluorochrome. Fluorescence-Minus-One experiments were performed in order to determine the cut-off value for the positive population for each marker. Prior to conducting each experiment, an instrument quality control was performed. CFSE stock solution was prepared according to the manufacturer's instructions and stored in aliquots of 5  $\mu$ L at  $-20$  °C for further use.

#### 2.4. Proliferation Assay

Isolated PBMCs were counted. Up to  $1 \times 10^7$  cells were washed, resuspended in 1 mL of RPMI 1640 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 5% heat-inactivated human serum (Sigma, Saint Louis, MO, USA) and transferred to a 14 mL Falcon tube. Next, 110  $\mu$ L of Phosphate-Buffered Saline (PBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was added to 5  $\mu$ L of CFSE stock solution. CFSE was added to the cells suspension, vortexed, and incubated at 25 °C, for 7 min in the dark. After incubation, cells were washed twice in PBS with 10% human serum. PBMCs ( $1 \times 10^5$  cells/well) were cultured in 96-well flat-bottom plates (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) for 5 days in the following variants: (1) cells stimulated with Dynabeads coated with anti-CD3/CD28 Abs (ratio 2:5, Gibco, MA, USA); (2) cells stimulated with anti-CD3 Ab (plates were pre-coated with 0.75  $\mu$ g/mL of Ab, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA); and (3) unstimulated cells (control). PBMCs were incubated in the presence of Se-Le-30 (100  $\mu$ g/mL) or without polysaccharide adding an equivalent amount of water for injection instead (control cultures). After 5 days, cells were collected and transferred to 4 mL polypropylene Falcon tubes, washed in PBS, and resuspended in 100  $\mu$ L of 1:400 Zombie Violet™ stock solution (BioLegend, San Diego, CA, USA). Cells were incubated for 20 min at room temperature in the dark and washed with 2 mL BD Pharmingen Stain Buffer (BSA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Next, they were resuspended in 100  $\mu$ L of Stain Buffer, and labelled with anti-CD3, anti-CD4, and anti-CD8 Abs (15 min at room temperature in the dark). After incubation, cells were washed with 2 mL of Stain Buffer, resuspended in 100  $\mu$ L of PBS with 0.01% sodium azide (Sigma, Saint Louis, MO, USA), and acquired with a DxFlex flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) using CytExpert software (Beckman Coulter). Flow cytometry data were analyzed using FlowJo software (v. 10.8.1; BD, Ashland, OR, USA). The division index was calculated as the total number of divisions divided by the number of cells at the start of the culture. The proliferation index was calculated as the total number of divisions divided by the number of cells that went into division. The expansion index was calculated as the total number of cells divided by the number of cells at the start of the culture. The replication index was calculated as the total number of divided cells divided by the number of cells that went into division.

#### 2.5. Activation Assay

For the activation assay  $2 \times 10^5$  of PBMCs were seeded on 96-well flat-bottom plates (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) and cultured for 12, 24, and 48 h in the following variants: (1) cells stimulated with anti-CD3/CD28 Abs (ratio 2:5, Gibco, MA, USA); (2) cells stimulated anti-CD3 Ab (coated on plate wells, 0.75  $\mu$ g/mL, BD Pharmingen, USA); and (3) unstimulated cells (control cultures). PBMCs were incubated in the presence of Se-Le-30 (100  $\mu$ g/mL) or without polysaccharide with an equivalent amount of water for injection. Cells were harvested after 12, 24, and 48 h, washed in 2 mL of Stain Buffer (BSA, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and labeled with mouse anti-human CD3-PerCP (Clone SK7, BD Biosciences, San Jose, California, USA), CD4-APC-Cy7 (Clone SK3, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD8-APC (Clone SK1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD25-FITC (Clone 2A3, BD Biosciences, San Jose, California, USA), CD69-Brilliant Violet 510 (Clone FN50, BioLegend, San Diego, CA, USA). PBMCs were incubated for 15 min at room temperature in the dark, washed in 2 mL of bovine serum albumin (BSA), and resuspended in 100  $\mu$ L of PBS with 0.01% sodium azide. At least  $2 \times 10^4$  CD3<sup>+</sup> T cells were acquired on Becton Dickinson FACSCanto II cytometer (BD FACSCanto II, Becton Dickinson, NJ, USA). Data were analyzed using BD FACS Diva 6.1.3. software. Cell surface expression of CD69 and CD25 (percentage) was analyzed in CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells. For information on the gating strategy see Supporting Information (Figure S1).

#### 2.6. Multiplex Cytokine Profiling

Cytokines detection in cell culture supernatants was performed by Luminex® Multiplex Assay.  $2 \times 10^5$  of PBMCs were cultured for 24 h in variants described above. Initially,

dynabeads coated with CD3/CD28 Abs have been removed by a magnet. Cell cultures were transferred to 4 mL polypropylene tubes and centrifuged. Cell-free supernatants were recovered and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for future analysis.

Before analysis, Luminex calibration and verification were performed using MAGPIX Calibration Kit and MAGPIX Performance Verification Kit (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The concentration of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and interferon (IFN)- $\gamma$  was measured on MAGPIX (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) with Luminex-based bead array MILLIPIX<sup>®</sup> Human Cyto Panel A (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) according to manufacturer's instructions. Standards and quality controls were run on the same plate as analyzed supernatants. Data were analyzed using xPONENT software (Luminex Corp., Austin, TX, USA).

### 2.7. Cell Viability Assay

On 96-well flat-bottom plates,  $2 \times 10^5$  of PBMCs were seeded (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) and cultured for 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere with 5%  $\text{CO}_2$ , in the presence of Se-Le-30 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and with an equivalent amount of medium and water for injection as controls. After incubation, cells were harvested, washed in 2 mL of PBS, resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of Zombie Violet<sup>™</sup> (BioLegend, San Diego, CA, USA) stock solution at a ratio of 1:400, incubated for 20 min at room temperature in the dark, then washed with 2 mL of Stain Buffer and labeled with mouse anti-human CD3 Ab (CD3-PerCP, Clone SK7, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) in 100  $\mu\text{L}$  of Stain Buffer for 15 min. Next, cells were washed in 2 mL of Stain Buffer, resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of PBS with 0.01% sodium azide, and acquired with DxFlex flow cytometer. For each variant, the percentage of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes positive for Zombie Violet dye was recorded and compared to control cultures.

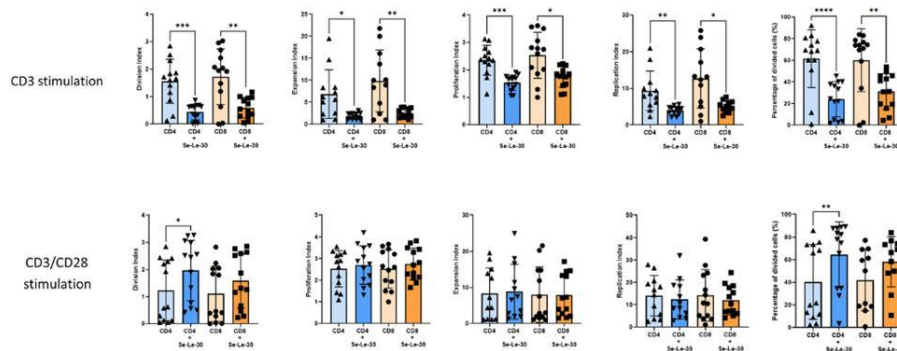
### 2.8. Statistical Analysis

Statistical analysis of acquired data and their visualization were performed using GraphPad Prism 9.4.0 (GraphPad Software). The normality of the data sets distribution was tested using Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, Anderson-Darlin, D'Agostino, and Pearson tests. The data set was considered to have a normal distribution when each of the applied tests had a prediction value higher than 0.05. Determination for outliers was performed using both ROUT (Q = 1%) and Grubbs' ( $\alpha = 0.05$ ) methods. The Student t-test was performed when the distribution of differences was normal, and the Wilcoxon test was used when the distribution of differences was not normal. A *p*-value of  $< 0.05$  (\*) was considered statistically significant, and  $p < 0.01$  (\*\*), or  $p < 0.001$  (\*\*\*) as highly significant. Graphs are presented as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean).

## 3. Results

### 3.1. Effects of Se-Le-30 on Human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells Proliferation

The effects of Se-Le-30 on the proliferation of human T cells are shown in Figure 1. Polysaccharide significantly inhibited the proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells stimulated with anti-CD3 Ab (division index:  $p = 0.0003$ ; proliferation index:  $p = 0.0003$ ; expansion index:  $p = 0.0141$ ; replication index:  $p = 0.0095$ ; percentage of cells divided:  $p < 0.0001$ ) and enhanced proliferation when cells were stimulated with anti-CD3/CD28 Abs (division index:  $p = 0.0216$ ; percentage of cells divided:  $p = 0.0033$ ). Similarly, Se-Le-30 inhibited the proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells stimulated with anti-CD3 Ab (division index:  $p = 0.0012$ ; proliferation index:  $p = 0.0123$ ; expansion index:  $p = 0.0058$ ; replication index:  $p = 0.0146$ ; percentage of cells divided:  $p < 0.0001$ ) but had no effect on double stimulated CD8<sup>+</sup> T cells proliferation ( $p > 0.05$ ). It must be noted that the mode of activation and possibly anti-CD3 Abs concentration was different for the stimulation with Abs against CD3 only and double stimulation with Abs against CD3 and CD28.



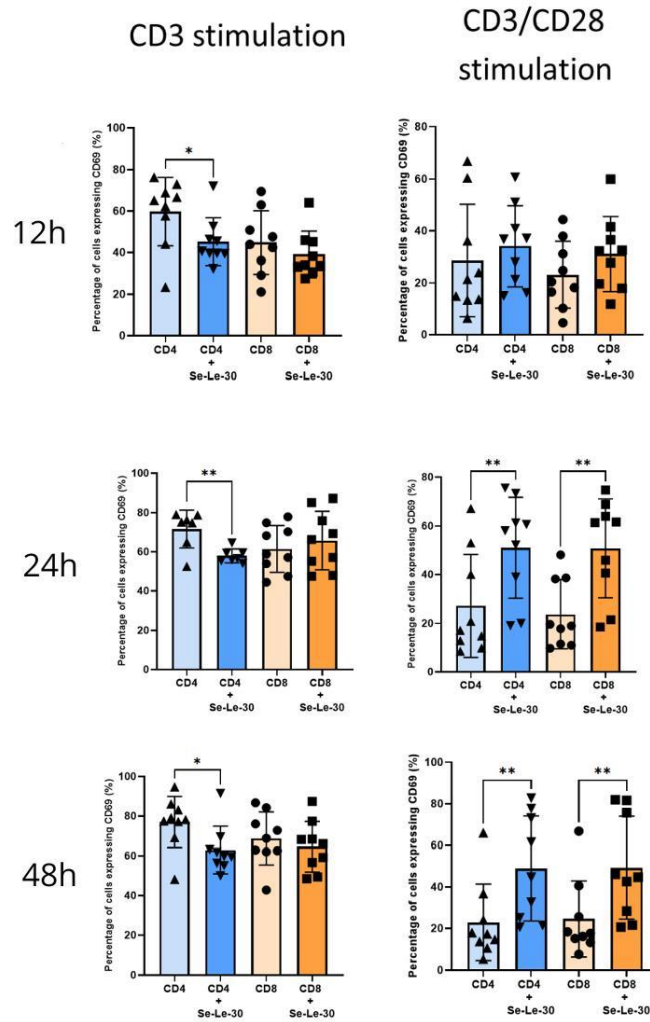
**Figure 1.** Effects of Se-Le-30 on the proliferation of human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells stimulated with anti-CD3 Ab (top row) and anti-CD3/CD28 Abs (bottom row). PBMCs from 13 healthy donors were stimulated and treated with Se-Le-30 (100 µg/mL) for 5 days. In each experiment, the division index, proliferation index, expansion index, replication index, and percentage of divided cells were calculated by using FlowJo software. Statistical differences were considered when  $p < 0.05$ . \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Points on bar charts represent experiments conducted with individual donors.

### 3.2. Effects of Se-Le-30 on Human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells Activation

Upon T cell activation, several of their cell surface markers are upregulated. CD69 is a very early marker, which can be detected on the surface of T cells 2–3 h after activation. CD25 (interleukin-2 receptor, IL-2R) is an early activation marker, with increased cell surface expression 12–24 h after activation [27].

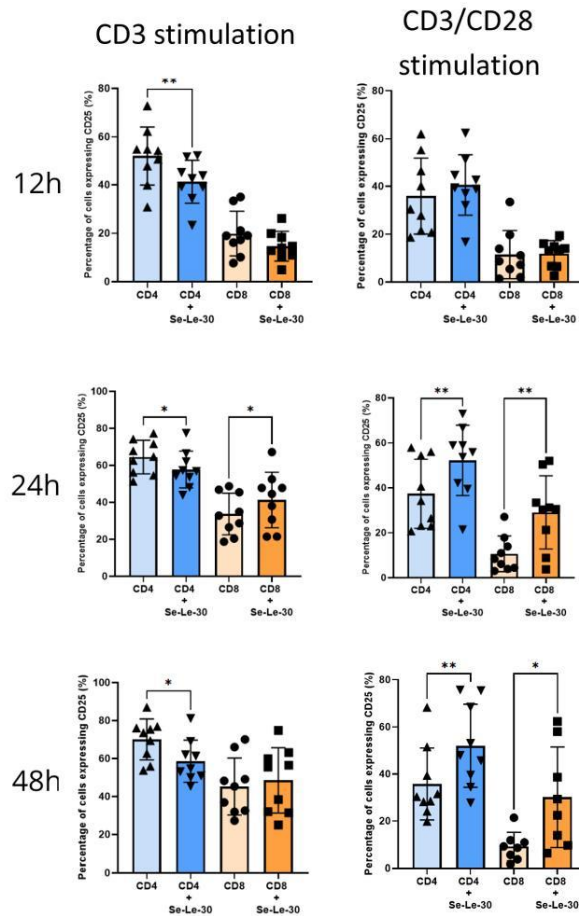
The effect of Se-Le-30 on the presence of CD69 marker on T cells is presented in Figure 2. When cells were stimulated with anti-CD3 Ab, the polysaccharide significantly decreased the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells after 12, 24, and 48 h ( $p = 0.059$ ,  $p = 0.0253$ , and  $p = 0.0219$ , respectively). When cells were stimulated with CD3/CD28 Abs, Se-Le-30 upregulated the percentage of CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T cells after 24 and 48 h of culture ( $p = 0.0080$ , and  $p = 0.0015$ , respectively). The number of anti-CD3-stimulated CD8<sup>+</sup> cells expressing the CD69 marker did not change after 12, 24, and 48 h of culture ( $p > 0.05$ ), however, polysaccharide upregulated the percentage of anti-CD3/CD28-stimulated CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T cells after 24 and 48 h of culture ( $p = 0.0065$ , and  $p = 0.0090$ , respectively).

The effect of Se-Le-30 on the presence of CD25 marker on T cells is presented in Figure 3. When cells were stimulated with anti-CD3 Ab, the polysaccharide significantly decreased the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells after 12, 24, and 48 h ( $p = 0.059$ ,  $p = 0.0253$ , and  $p = 0.0219$ , respectively). When cells were stimulated with CD3/CD28 Abs, Se-Le-30 increased the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells after 24 h and 48 h ( $p = 0.0032$ , and  $p = 0.0090$ , respectively). The number of anti-CD3-stimulated CD8<sup>+</sup> cells expressing the CD25 marker did not change after 12 and 48 h of culture ( $p > 0.05$ ) but slightly increased after 24 h of stimulation ( $p = 0.0501$ ). Conversely, when cells were stimulated with anti-CD3/CD28 Abs, Se-Le-30 increased the percentage of CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells (after 24 h:  $p = 0.0039$ , and after 48 h:  $p = 0.0095$ ).



**Figure 2.** Effects of Se-Le-30 on human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells activation. PBMCs from nine healthy donors were stimulated with anti-CD3 Ab or anti-CD3/CD28 Abs and treated with Se-Le-30 (100 µg/mL) for 12, 24, or 48 h. The expression of the CD69 marker on the surface of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was detected by flow cytometry. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Points on bar charts represent experiments conducted with individual donors.

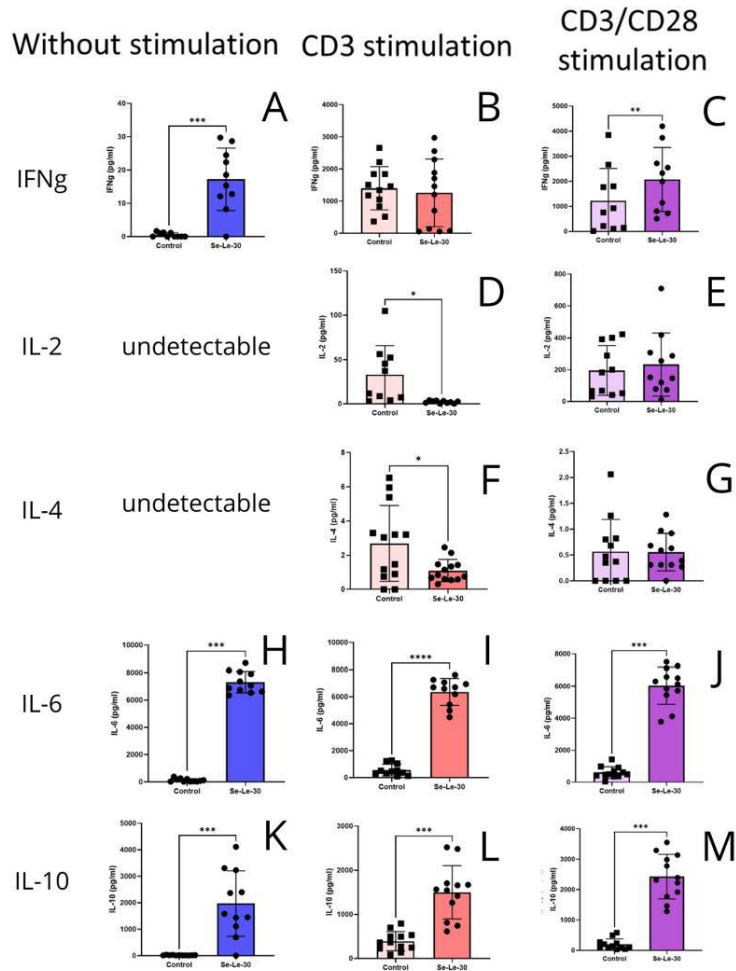




**Figure 3.** Effects of Se-Le-30 on human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells activation. PBMCs from nine healthy donors were stimulated with anti-CD3 Ab or anti-CD3/CD28 Abs and treated with Se-Le-30 (100 µg/mL) for 12, 24, or 48 h. The expression of the CD25 marker on the surface of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was detected by flow cytometry. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . Points on bar charts represent experiments conducted with individual donors.

### 3.3. Effects of Se-Le-30 on Cytokines Production by PBMCs

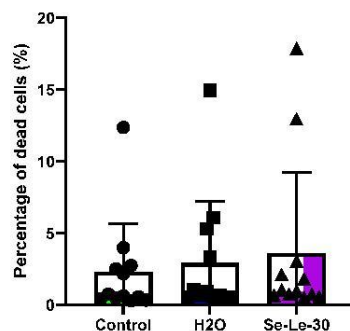
The effects of Se-Le-30 on cytokines secretion by PBMCs are shown in Figure 4. Polysaccharide had no influence on IFN- $\gamma$  secretion by anti-CD3-stimulated PBMCs ( $p > 0.05$ ), however, significantly upregulated its secretion in anti-CD3/CD28-stimulated cells ( $p = 0.0026$ ). Moreover, it was observed that Se-Le-30 inhibited the secretion of IL-2 and IL-4 by anti-CD3-stimulated cells ( $p = 0.0170$ , and  $p = 0.0310$ , respectively), with no significant effect on anti-CD3/CD28-stimulated cells ( $p > 0.05$ ). In addition, Se-Le-30 was found to increase the secretion of IL-6 and IL-10 by PBMCs in anti-CD3-stimulated and anti-CD3/CD28-stimulated cells (for IL-6  $p < 0.0001$ , and  $p < 0.0001$ , respectively; for IL-10  $p = 0.0003$ ,  $p < 0.0001$ , respectively).



**Figure 4.** Effects of Se-Le-30 on cytokines secretion by PBMCs. PBMCs from 13 healthy donors were stimulated with anti-CD3 Ab and anti-CD3/CD28 Ab and treated with Se-Le-30 (100 µg/mL) for 24 h. The levels of secreted cytokines in the culture medium (pg/mL) were determined with a Luminex-based multiplex assay. (A–C): the levels of IFN-γ; (D,E): the levels of IL-2; (F,G): the levels of IL-4; (H–J): the levels of IL-6; (K–M): the levels of IL-10. Please note the differences in Y scale values between the stimulation panels, especially for IL-2. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . Points on bar charts represent experiments conducted with individual donors.

### 3.4. Effect of Se-Le-30 on Human CD3<sup>+</sup> T Cells Viability

The effects of Se-Le-30 on T cells viability are shown in Figure 5. Polysaccharide did not reduce CD3<sup>+</sup> T cells viability after 24 h of culture. The percentage of dead cells did not differ statistically between control cultures and Se-Le-30 cultures.



**Figure 5.** Effect of Se-Le-30 on CD3<sup>+</sup> T cell viability. Evaluation of CD3<sup>+</sup> T-cell viability after 24h culture with Se-Le-30 (100 µg/mL), with an equivalent amount of water for injection (H2O) or culture medium (control), was performed using Zombie Violet™ staining by flow cytometry. Cells were considered dead when they showed high violet fluorescence at 450 nm. Repeated measures one-way ANOVA test,  $p = 0.2076$ . Points on bar charts represent experiments conducted with individual donors.

#### 4. Discussion

Over the past few years, multiple studies have confirmed that various *L. edodes* polysaccharides can modulate the immune system through the activation of numerous signaling pathways. We have previously demonstrated that Se-Le-30, a selenium-enriched lentinan analog, significantly inhibited the proliferation of human T cells stimulated with anti-CD3 Ab [20,26,28]. In the present study, we have further compared the effects of Se-Le-30 on the activation and proliferation of human T lymphocytes stimulated by CD3 or CD3/CD28 Abs, as well as on their secretion of cytokines. The results of this study not only confirmed our previous observations regarding anti-CD3 Ab stimulation, but also demonstrated that when lymphocytes were stimulated with a dual signal (i.e., anti-CD3/CD28 Abs), Se-Le-30 enhanced their activation and proliferation: it increased the percentage of divided CD4<sup>+</sup> T cells and their division index (please see Figure 1). These findings are in line with the results described by Wang et al. [29], who reported that lentinan, a  $\beta$ -1,3-branched  $\beta$ -1,6-D-glucan, increased the number of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy. Moreover, this glucan inhibited the synthesis of IL-10, and enhanced IFN- $\gamma$ . Conversely, our study indicated that Se-Le-30 increased the secretion of both IL-10 and IFN- $\gamma$  in CD3/CD28-stimulated cells. In another randomized study, *L. edodes* was administered orally to healthy young adults and it was shown that fungus ingestion resulted in an increase in the proliferative potential of T lymphocytes, upregulated the expression of CD69 activation marker on T cells, and enhanced the production of IL-10 [30]. Similarly, it has been found that *L. edodes* extract consumption increased the plasma levels of IL-10 in healthy men exposed to exercise-induced skeletal muscle damage, but had no effect on the levels of IL-6 [31]. In the present study, we have found that Se-Le-30 increased IFN- $\gamma$  secretion by PBMCs, which is consistent with data obtained in a study in patients receiving *L. edodes* mycelia extract combined with cancer immunotherapy [32]. Similarly, elevated serum IFN- $\gamma$  levels were reported in a group of healthy adults administered rice bran fermented with *L. edodes* [32]. However, in contrast to our findings, there was no evidence of an effect of *L. edodes* on the regulation of IL-2, IL-4, and IL-10 secretion [33]. Another well-studied polysaccharide obtained from the mycelium of *L. edodes* is AHCC<sup>®</sup>, an active hexose-correlated compound which contains 20% of  $\alpha$ -1,4-glucans [34]. Similar to Se-Le-30, AHCC<sup>®</sup> was found to increase the secretion of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of healthy adults [35]. Moreover, this glucan increased the proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells in adults receiving the influenza vaccine [36].

On the other hand, some studies did not confirm the effect of *L. edodes*  $\beta$ -glucans on cytokines secretion in humans [37,38]. However, it should be noted that in these studies, the source of  $\beta$ -glucans was orally administrated substances, which might suggest that this type of administration might be ineffective to induce the effect of regulating the secretory activity of PBMCs.

Data on the immunomodulatory effects of glucans isolated from *L. edodes* in humans are limited, however, numerous studies have been conducted to evaluate its properties in animal models. Chen S. et al. demonstrated that three polysaccharide fractions with different molecular weights isolated from *L. edodes* reverted immune suppression in mice and upregulated splenic T lymphocytes proliferation in response to Concanavalin A and LPS [5]. The polysaccharide with the lowest molecular weight of 14-35 kDa was found to be the most effective [5]. In another study, the immunomodulatory properties of the synthetic analogue of lentinan basic unit- glucohexose have been analyzed. It was demonstrated that it upregulated CD69 expression on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and increased the number of IFN- $\gamma$  producing CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in mice [39]. These results are consistent with our study in humans. Most studies on the immunomodulatory properties of lentinan and its analogues have shown its immune-enhancing properties, however, there are some reports suggesting the immunosuppressive activity of *L. edodes* polysaccharides as well. McCormack and colleagues demonstrated that lentinan reduced serum levels of IL-4, IL-6, and IL-10 in rats [40]. Moreover, it was found that this drug enhanced the expansion of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, which is similar to our findings in humans [41].

So far, numerous polysaccharide-binding receptors have been identified in immune cells, thus *L. edodes* polysaccharides can modulate the immune response by various signaling pathways. Dectin-1 is one of the most studied receptors responsible for the recognition of  $\beta$ -glucans and delivering activation signals [42]. Dectin-1 is expressed on numerous immune cells, including T and B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, and neutrophils [10] and recognizes both  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6) glucans [42]. Activation of dectin-1 by  $\beta$ -glucans stimulates phagocytosis, reactive oxygen species (ROS) production, NF $\kappa$ B-mediated cytokine secretion (including IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ ), synthesis of chemokine CXCL2, differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes into Th1 and Th17, and activation of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes [43]. Complement receptor 3 (CR3) is expressed on neutrophils, monocytes, natural killer (NK) cells, CD8<sup>+</sup> T cells, as well as activated CD4<sup>+</sup> T cells and likewise has been implicated in the recognition of  $\beta$ -glucans [44,45]. Activation of CR3 upregulates phagocytosis and degranulation of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells [12]. TLRs are a family of pattern recognition receptors (PRRs) that recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [46]. TLR2 is expressed on monocytes, neutrophils, B cells, and activated T cells [47] and acts as a costimulatory receptor that regulates cell proliferation [48,49]. TLR4 is highly expressed in monocytes [50], but is also involved in T cell development and differentiation [50,51]. TLR6 is mainly expressed on neutrophils and monocytes and is associated with NF-kappa-B activation and cytokines secretion [52,53]. LaCer is expressed on neutrophils and triggers cells response via NF- $\kappa$ B-like factor pathway, leading to oxidative burst [54] and production of macrophage inflammatory protein(MIP)-2 [55].

The binding of  $\beta$ -glucans to dectin-1 affects both CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes activation, resulting in enhanced granzyme production in CD8<sup>+</sup> lymphocytes and differentiation of CD4<sup>+</sup> into Th1 and Th17 phenotype [56,57]. Binding of  $\beta$ -glucans to CR3 results in the activation of phagocytes and NK cells, which promotes phagocytosis and cytotoxic degranulation. This may help to overcome tumor resistance to these forms of effector mechanism and lead to higher secretion of IL-6 and IFN- $\gamma$  [12]. It has been suggested that 1,4- $\alpha$ -d-glucans do not affect macrophages via CR3 binding [58], but activation of T lymphocytes up-regulates expression of CR3 [44,45]. Interestingly, it was found that blocking the CD11b subunit of CR3 contributed to T lymphocyte proliferation inhibition after stimulation with anti-CD3 Abs [44]. Evidently, this finding allows us to hypothesize that Se-Le-30 might block CR3 and thus inhibit the proliferation of T lymphocytes when stimulated with anti-CD3 Ab only. Especially considering that CR3 expression on T lym-

phocytes is enhanced after activation. Dual CD3/CD28 stimulation would also be affected, but less significantly. This might be reflected in a higher division index and percentage of divided cells, while having no impact on other proliferation indexes.

There is growing evidence that polysaccharides derived from *L. edodes* interact with TLRs present in immune cells [15,16,59]. A study of 28 polysaccharides from different origins has shown that they interact with TLR4 and stimulate IL-10, while having no effect on IL-6 [18]. One recent study indicates that novel *L. edodes* polysaccharides (named MPSSS) may interact with cells via the TLR4/JNK pathway, which resulted in decreased secretion of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) [16] and/or interacts with TLR4-NF- $\kappa$ B pathway [15,60]. Another study on sparan, a 6-branched 1,3- $\beta$ -D-glucan, demonstrated that this polysaccharide interacts with TLR4. Moreover, it was shown that sparan upregulated phosphorylation of ERK, p38, and JNK, and enhanced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B p50/p65 in dendritic cells [59]. Indeed, (1,4)- $\alpha$ -D-glucans have been observed to interact with TLR6 receptors [58] and TLR4 in MyD88/IKK/NF $\kappa$ B pathway [61].

As mentioned above, dectin-1, CR3, and TLRs are implicated in the recognition of  $\beta$ -glucans by immune cells. Interestingly, recent research has shown that  $\beta$ -glucans may stimulate an immune response by binding to CD28 on the surface of T cells and that this stimulation is potentiated by CD3 activation. Cormer and colleagues explored interactions of  $\beta$ -1,3 glucans with the CD28 receptor and found that glucan molecules insert themselves into a channel on the surface of CD28 and moreover diffuse around the receptor, coming into contact with different regions of the protein [62]. This is another potential mechanism underlying the observed immunomodulatory effects of Se-Le-30.

## 5. Conclusions and Future Perspectives

Se-Le-30, a fraction of polysaccharides isolated from mycelium of *L. edodes* is a mixture of linear 1,4- $\alpha$ -glucan and linear 1,3- and 1,6- $\beta$ -glucans. In vitro models demonstrated that Se-Le-30 exerts immunomodulatory effects on human T lymphocytes, however, the direction of its biological activity depends on the type of cell stimulation.

Moreover, it has been revealed that Se-Le-30 upregulated the production of IL-6 and IL-10 in PBMCs, regardless of the type of stimulation. Human PBMCs include lymphocytes, NK cells, monocytes, and dendritic cells, therefore, it is possible that other than T cell population is responsible for the observed activity. Future studies focusing on the mechanism of action of Se-Le-30, including identification of intracellular signaling pathways, as well as in vitro analyses with purified CD3<sup>+</sup> T cells and other PBMC cell types are warranted.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom12121900/s1>, Figure S1: Gating strategy.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.R., R.Z. and B.K.; methodology, A.R., M.Z., K.Z., N.K., M.K. and B.K.; validation, A.R., J.T. and B.K.; formal analysis, J.T., R.Z. and B.K.; investigation, A.R., M.Z., K.Z., M.K. and N.K.; data curation, A.R. and B.K.; writing—original draft preparation, A.R. and B.K.; writing—review and editing, M.Z., K.Z., N.K., M.K., J.T. and R.Z.; visualization, A.R.; supervision, B.K.; project administration, R.Z., J.T. and B.K.; funding acquisition, R.Z., J.T. and B.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by internal funds 2022 from the Medical University of Warsaw.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Medical University of Warsaw (no. KB/174/2017; updated AKBE/186/2021).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author without any restrictions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Bisen, P.S.; Baghel, R.K.; Sanodiya, B.S.; Thakur, G.S.; Prasad, G.B. Lentinus edodes: A macrofungus with pharmacological activities. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2419–2430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sheng, K.; Wang, C.; Chen, B.; Kang, M.; Wang, M.; Liu, K.; Wang, M. Recent advances in polysaccharides from Lentinus edodes (Berk.): Isolation, structures and bioactivities. *Food Chem.* **2021**, *358*, 129883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Steimbach, L.; Borgmann, A.V.; Gomar, G.G.; Hoffmann, L.V.; Rutkevski, R.; de Andrade, D.P.; Smiderle, F.R. Fungal beta-glucans as adjuvants for treating cancer patients—A systematic review of clinical trials. *Clin. Nutr.* **2021**, *40*, 3104–3113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vlassopoulou, M.; Yannakoulia, M.; Pletsas, V.; Zervakis, G.I.; Kyriacou, A. Effects of fungal beta-glucans on health - a systematic review of randomized controlled trials. *Food Funct.* **2021**, *12*, 3366–3380. [[CrossRef](#)]
- Chen, S.; Liu, C.; Huang, X.; Hu, L.; Huang, Y.; Chen, H.; Fang, Q.; Dong, N.; Li, M.; Tang, W. Comparison of immunomodulatory effects of three polysaccharide fractions from Lentinula edodes water extracts. *J. Funct. Foods* **2020**, *66*, 103791. [[CrossRef](#)]
- Zhang, L.; Li, X.; Xu, X.; Zeng, F. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1515–1521. [[CrossRef](#)]
- Chan, G.C.; Chan, W.K.; Sze, D.M. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol.* **2009**, *2*, 25. [[CrossRef](#)]
- De Marco Castro, E.; Calder, P.C.; Roche, H.M. beta-1,3/1,6-Glucans and Immunity: State of the Art and Future Directions. *Mol. Nutr. Food Res.* **2021**, *65*, e1901071. [[CrossRef](#)]
- Lo, T.C.; Jiang, Y.H.; Chao, A.L.; Chang, C.A. Use of statistical methods to find the polysaccharide structural characteristics and the relationships between monosaccharide composition ratio and macrophage stimulatory activity of regionally different strains of Lentinula edodes. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584*, 50–56. [[CrossRef](#)]
- Willment, J.A.; Marshall, A.S.; Reid, D.M.; Williams, D.L.; Wong, S.Y.; Gordon, S.; Brown, G.D. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur. J. Immunol.* **2005**, *35*, 1539–1547. [[CrossRef](#)]
- Akramiene, D.; Kondrotas, A.; Didziapetriene, J.; Kevelaitis, E. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina* **2007**, *43*, 597–606. [[CrossRef](#)]
- Ross, G.D.; Větvicka, V.; Yan, J.; Xia, Y.; Větvickova, J. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology* **1999**, *42*, 61–74. [[CrossRef](#)]
- Brown, G.D.; Gordon, S. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 471–479. [[CrossRef](#)]
- Thomton, B.P.; Větvicka, V.; Pitman, M.; Goldman, R.C.; Ross, G.D. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* **1996**, *156*, 1235–1246.
- Guo, J.; Zheng, L.; Chen, L.; Luo, N.; Yang, W.; Qu, X.; Liu, M.; Cheng, Z. Lipopolysaccharide activated TLR4/NF-kappaB signaling pathway of fibroblasts from uterine fibroids. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 10014–10025.
- Wang, Y.; Zeng, Y.; Zhu, L.; Wan, J.; Lei, N.; Yao, X.; Duan, X.; Zhang, Y.; Cheng, Y.; Tao, N.; et al. Polysaccharides From Lentinus Edodes Inhibits Lymphangiogenesis via the Toll-Like Receptor 4/JNK Pathway of Cancer-Associated Fibroblasts. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 547683. [[CrossRef](#)]
- Zhang, X.; Qi, C.; Guo, Y.; Zhou, W.; Zhang, Y. Toll-like receptor 4-related immunostimulatory polysaccharides: Primary structure, activity relationships, and possible interaction models. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *149*, 186–206. [[CrossRef](#)]
- Wismar, R.; Brix, S.; Laerke, H.N.; Frokiaer, H. Comparative analysis of a large panel of non-starch polysaccharides reveals structures with selective regulatory properties in dendritic cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, 443–454. [[CrossRef](#)]
- Zimmerman, J.W.; Linderthuth, J.; Fish, P.A.; Palace, G.P.; Stevenson, T.T.; DeMong, D.E. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a beta-(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 22014–22020. [[CrossRef](#)]
- Klimaszewska, M.; Gorska, S.; Lapienis, G.; Kaleta, B.; Gorska, S.; Kaszowska, M.; Dawidowski, M.; Gamian, A.; Zagodzón, R.; Gorski, A.; et al. Identification of the Primary Structure of Selenium-Containing Polysaccharides Selectively Inhibiting T-Cell Proliferation. *Molecules* **2021**, *26*, 5404. [[CrossRef](#)]
- Noel, P.J.; Boise, L.H.; Green, J.M.; Thompson, C.B. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 636–642.
- Turlo, J.; Gutkowska, B.; Herold, F. Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of Lentinula edodes (Berk.) Pegl. mycelial extracts. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 1085–1091. [[CrossRef](#)]
- Turlo, J.; Gutkowska, B.; Herold, F.; Gajzlarska, W.; Dawidowski, M.; Dorociak, A.; Zobel, A. Biological Availability and Preliminary Selenium Speciation in Selenium-Enriched Mycelium of Lentinula edodes (Berk.). *Food Biotechnol.* **2011**, *25*, 16–29. [[CrossRef](#)]
- Gorska-Jakubowska, S.; Klimaszewska, M.; Podsadni, P.; Kaleta, B.; Zagodzón, R.; Gorska, S.; Gamian, A.; Straczek, T.; Kapusta, C.; Cieslak, M.; et al. Selenium-Containing Exopolysaccharides Isolated from the Culture Medium of Lentinula edodes: Structure and Biological Activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13039. [[CrossRef](#)]
- Chihara, G.; Hamuro, J.; Maeda, Y.Y.; Arai, Y.; Fukuoka, F. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from Lentinus edodes (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.* **1970**, *30*, 2776–2781.

26. Kaleta, B.; Roszczyk, A.; Zych, M.; Kniotek, M.; Zagożdżon, R.; Klimaszewska, M.; Malinowska, E.; Pac, M.; Turlo, J. Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human Immune Cells. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1777. [[CrossRef](#)]
27. Gonzalez-Amaro, R.; Cortes, J.R.; Sanchez-Madrid, F.; Martin, P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 625–632. [[CrossRef](#)]
28. Kaleta, B.; Gorski, A.; Zagożdżon, R.; Cieslak, M.; Kazmierczak-Baranska, J.; Nawrot, B.; Klimaszewska, M.; Malinowska, E.; Gorska, S.; Turlo, J. Selenium-containing polysaccharides from *Lentinula edodes*-Biological activity. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *223*, 115078. [[CrossRef](#)]
29. Wang, X.E.; Wang, Y.H.; Zhou, Q.; Peng, M.; Zhang, J.; Chen, M.; Ma, L.J.; Xie, G.M. Immunomodulatory Effect of Lentinan on Aberrant T Subsets and Cytokines Profile in Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Pathol. Oncol. Res.* **2020**, *26*, 499–505. [[CrossRef](#)]
30. Dai, X.; Stanilka, J.M.; Rowe, C.A.; Esteves, E.A.; Nieves, C., Jr.; Spaizer, S.J.; Christman, M.C.; Langkamp-Henken, B.; Percival, S.S. Consuming *Lentinula edodes* (Shiitake) Mushrooms Daily Improves Human Immunity: A Randomized Dietary Intervention in Healthy Young Adults. *J. Am. Coll. Nutr.* **2015**, *34*, 478–487. [[CrossRef](#)]
31. Zembron-Lacny, A.; Gajewski, M.; Naczek, M.; Siatkowski, I. Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) extract on antioxidant and inflammatory response to prolonged eccentric exercise. *J. Physiol. Pharmacol.* **2013**, *64*, 249–254. [[PubMed](#)]
32. Tanigawa, K.; Ito, Y.; Sakai, M.; Kobayashi, Y. Evaluation of quality of life and immune function in cancer patients receiving combined immunotherapy and oral administration of *lentinula edodes* mycelia extract. *Gan To Kagaku Ryoho* **2012**, *39*, 1779–1781. [[PubMed](#)]
33. Choi, J.Y.; Paik, D.J.; Kwon, D.Y.; Park, Y. Dietary supplementation with rice bran fermented with *Lentinus edodes* increases interferon-gamma activity without causing adverse effects: A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Nutr. J.* **2014**, *13*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ritz, B.W. Supplementation with active hexose correlated compound increases survival following infectious challenge in mice. *Nutr. Rev.* **2008**, *66*, 526–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Yin, Z.; Fujii, H.; Walshe, T. Effects of active hexose correlated compound on frequency of CD4+ and CD8+ T cells producing interferon-gamma and/or tumor necrosis factor-alpha in healthy adults. *Hum. Immunol.* **2010**, *71*, 1187–1190. [[CrossRef](#)]
36. Roman, B.E.; Beli, E.; Duriancik, D.M.; Gardner, E.M. Short-term supplementation with active hexose correlated compound improves the antibody response to influenza B vaccine. *Nutr. Res.* **2013**, *33*, 12–17. [[CrossRef](#)]
37. Morales, D.; Shetty, S.A.; Lopez-Plaza, B.; Gomez-Candela, C.; Smidt, H.; Marin, F.R.; Soler-Rivas, C. Modulation of human intestinal microbiota in a clinical trial by consumption of a beta-D-glucan-enriched extract obtained from *Lentinula edodes*. *Eur. J. Nutr.* **2021**, *60*, 3249–3265. [[CrossRef](#)]
38. Gaullier, J.M.; Sleboda, J.; Ofjord, E.S.; Ulvestad, E.; Nurminiemi, M.; Moe, C.; Tor, A.; Gudmundsen, O. Supplementation with a soluble beta-glucan exported from Shiitake medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) singer mycelium: A crossover, placebo-controlled study in healthy elderly. *Int. J. Med. Mushrooms.* **2011**, *13*, 319–326. [[CrossRef](#)]
39. Wang, J.; Dong, S.; Liu, C.; Wang, W.; Sun, S.; Gu, J.; Wang, Y.; Boraschi, D.; Qu, D. beta-Glucan oligosaccharide enhances CD8(+) T cells immune response induced by a DNA vaccine encoding hepatitis B virus core antigen. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, *10*, 645213. [[CrossRef](#)]
40. Han, D.; Lee, H.T.; Lee, J.B.; Kim, Y.; Lee, S.J.; Yoon, J.W. A Bioprocessed Polysaccharide from *Lentinus edodes* Mycelia Cultures with Turmeric Protects Chicks from a Lethal Challenge of *Salmonella Gallinarum*. *J. Food Prot.* **2017**, *80*, 245–250. [[CrossRef](#)]
41. McCormack, E.; Skavland, J.; Mujic, M.; Bruserud, O.; Gjertsen, B.T. Lentinan: Hematopoietic, immunological, and efficacy studies in a syngeneic model of acute myeloid leukemia. *Nutr. Cancer* **2010**, *62*, 574–583. [[CrossRef](#)]
42. Adams, E.L.; Rice, P.J.; Graves, B.; Ensley, H.E.; Yu, H.; Brown, G.D.; Gordon, S.; Monteiro, M.A.; Papp-Szabo, E.; Lowman, D.W.; et al. Differential high-affinity interaction of dectin-1 with natural or synthetic glucans is dependent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *325*, 115–123. [[CrossRef](#)]
43. Mata-Martinez, P.; Bergon-Gutierrez, M.; Del Fresno, C. Dectin-1 Signaling Update: New Perspectives for Trained Immunity. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 812148. [[CrossRef](#)]
44. Wagner, C.; Hansch, G.M.; Stegmaier, S.; Deneffle, B.; Hug, F.; Schoels, M. The complement receptor 3, CR3 (CD11b/CD18), on T lymphocytes: Activation-dependent up-regulation and regulatory function. *Eur. J. Immunol.* **2001**, *31*, 1173–1180. [[CrossRef](#)]
45. Muto, S.; Větvička, V.; Ross, G.D. CR3 (CD11b/CD18) expressed by cytotoxic T cells and natural killer cells is upregulated in a manner similar to neutrophil CR3 following stimulation with various activating agents. *J. Clin. Immunol.* **1993**, *13*, 175–184. [[CrossRef](#)]
46. Oberg, H.H.; Juricke, M.; Kabelitz, D.; Wesch, D. Regulation of T cell activation by TLR ligands. *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90*, 582–592. [[CrossRef](#)]
47. Flo, T.H.; Halaas, O.; Torp, S.; Ryan, L.; Lien, E.; Dybdahl, B.; Sundan, A.; Espevik, T. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J. Leukoc. Biol.* **2001**, *69*, 474–481. [[CrossRef](#)]
48. Komai-Koma, M.; Jones, L.; Ogg, G.S.; Xu, D.; Liew, F.Y. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 3029–3034. [[CrossRef](#)]
49. Kabelitz, D. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **2007**, *19*, 39–45. [[CrossRef](#)]

50. Hornung, V.; Rothenfusser, S.; Britsch, S.; Krug, A.; Jahrsdorfer, B.; Giese, T.; Endres, S.; Hartmann, G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 4531–4537. [[CrossRef](#)]
51. Zanin-Zhorov, A.; Cohen, I.R. Signaling via TLR2 and TLR4 Directly Down-Regulates T Cell Effector Functions: The Regulatory Face of Danger Signals. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Nakao, Y.; Funami, K.; Kikkawa, S.; Taniguchi, M.; Nishiguchi, M.; Fukumori, Y.; Seya, T.; Matsumoto, M. Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 1566–1573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Jin, B.; Sun, T.; Yu, X.H.; Yang, Y.X.; Yeo, A.E. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, *2012*, 836485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wakshull, E.; Brunke-Reese, D.; Linderthum, J.; Fiset, L.; Nathans, R.S.; Crowley, J.J.; Tufts, J.C.; Zimmerman, J.; Mackin, W.; Adams, D.S. PGG-glucan, a soluble beta-(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: Evidence for a glycosphingolipid beta-(1,3)-glucan receptor. *Immunopharmacology* **1999**, *41*, 89–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hahn, P.Y.; Evans, S.E.; Kottom, T.J.; Standing, J.E.; Pagano, R.E.; Limper, A.H. Pneumocystis carinii cell wall beta-glucan induces release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2043–2050. [[CrossRef](#)]
56. Leibundgut-Landmann, S.; Osorio, F.; Brown, G.D.; Reis e Sousa, C. Stimulation of dendritic cells via the dectin-1/Syk pathway allows priming of cytotoxic T-cell responses. *Blood* **2008**, *112*, 4971–4980. [[CrossRef](#)]
57. Agrawal, S.; Gupta, S.; Agrawal, A. Human dendritic cells activated via dectin-1 are efficient at priming Th17, cytotoxic CD8 T and B cell responses. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13418. [[CrossRef](#)]
58. Nair, P.K.; Melnick, S.J.; Ramachandran, R.; Escalon, E.; Ramachandran, C. Mechanism of macrophage activation by (1,4)-alpha-D-glucan isolated from *Tinospora cordifolia*. *Int. Immunopharmacol.* **2006**, *6*, 1815–1824. [[CrossRef](#)]
59. Kim, H.S.; Kim, J.Y.; Ryu, H.S.; Park, H.G.; Kim, Y.O.; Kang, J.S.; Kim, H.M.; Hong, J.T.; Kim, Y.; Han, S.B. Induction of dendritic cell maturation by beta-glucan isolated from *Sparassis crispa*. *Int. Immunopharmacol.* **2010**, *10*, 1284–1294. [[CrossRef](#)]
60. Xu, Y.; Ma, J.; Zheng, Q.; Wang, Y.; Hu, M.; Ma, F.; Qin, Z.; Lei, N.; Tao, N. MPSS impairs the immunosuppressive function of cancer-associated fibroblasts via the TLR4-NF-kappaB pathway. *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, 5. [[CrossRef](#)]
61. Lo, T.C.; Hsu, F.M.; Chang, C.A.; Cheng, J.C. Branched alpha-(1,4) glucans from *Lentinula edodes* (L10) in combination with radiation enhance cytotoxic effect on human lung adenocarcinoma through the Toll-like receptor 4 mediated induction of THP-1 differentiation/activation. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 11997–12005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Comer, J.; Bassette, M.; Burghart, R.; Loyd, M.; Ishiguro, S.; Azhagiya Singam, E.R.; Vergara-Jaque, A.; Nakashima, A.; Suzuki, K.; Geisbrecht, B.V.; et al. Beta-1,3 Oligoglucans Specifically Bind to Immune Receptor CD28 and May Enhance T Cell Activation. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## Uzupełniające wyniki badań

### Materialy i metody

Opisy metod zawarte w tym rozdziale dotyczą doświadczeń uzupełniających cykl prac i nie zostały opublikowane w momencie przygotowywania rozprawy. Pozostałe opisy metod zawarte są w obu publikacjach oryginalnych (strony 44-46 i 57-59).

#### *Material biologiczny oraz izolacja komórek*

W celu izolacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMCs) z Regionalnej Stacji Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie pozyskano kożuszkę leukocytno-płytkową od 22 zdrowych krwiodawców w wieku 18-64 lata. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego: (nr KB/174/2017, aktualizacja nr AKBE/186/2021, w załączeniu).

Z kożuszków leukocytno-płytkowych metodą wirowania w gradiencie stężeń (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich) wyizolowano PBMCs zgodnie z protokołem producenta. Komórki zawieszono w 1 ml medium RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) z 10% dodatkiem inaktywowanej surowicy ludzkiej (Sigma) oraz 1% dodatkiem roztworu streptomycyny i penicyliny (Thermo Fisher Scientific). Po ustaleniu liczby wyizolowanych PBMCs, pobrano 10 mln komórek dla każdej z próbek w celu izolacji limfocytów T. Izolację przeprowadzono metodą selekcji negatywnej z wykorzystaniem zestawu MojoSort™ Human CD3 T Cell Isolation Kit (Biolegend). Następnie limfocyty T zawieszono w 1 ml medium RPMI 1640 i oceniono ich liczbę.

Tak wyizolowane komórki posłużyły do oceny wpływu Se-Le-30 na profil wydzielanych cytokin, fosforylację wybranych białek szklaków aktywacyjnych związanych z CD3, aktywację limfocytów T, subpopulacje limfocytów T CD8<sup>+</sup>, oraz ekspresję cząstek kontrolujących układ odpornościowy (ang. immune checkpoints, ICPs).

#### *Ocena wpływu Se-Le-30 na aktywację limfocytów T i ekspresję ICPs*

Hodowle PBMCs oraz izolowanych limfocytów T prowadzone były równocześnie na oddzielnych 96-dółkowych płaskodennych płytkach (Greiner Bio-One).  $2 \times 10^5$  komórek/dółek hodowano przez 24 godziny w 37°C, w wilgotnym środowisku z 5% CO<sub>2</sub> w następujących wariantach: 1) komórki bez stymulacji w obecności Se-Le-30 (100 µg/ml) i 2) w obecności równoważnej do Se-Le-30 objętości wody do iniekcji (10%) jako kontroli; 3) komórki stymulowane przeciwciałem anti-CD3 uprzednio opłaszczonym na płytce w

stężeniu 0.75 µg/ml (Becton Dickinson Pharmingen) w obecności Se-Le-30 (100 µg/ml) i 4) w obecności 10% wody do iniekcji; 5) komórki stymulowane przeciwciałami anti-CD3 i anti-CD28 opłaszczonymi na kulkach (w stosunku 2 kulki na 5 komórek, Gibco) w obecności Se-Le-30 (100 µg/ml) i 6) w obecności 10% wody do iniekcji. Każdą hodowlę prowadzono w trzech powtórzeniach.

Przed wykonaniem analiz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej zoptymalizowano stężenie przeciwciał w celu uzyskania jak najwyższego współczynnika sygnału do tła, ograniczając w ten sposób m. in. niespecyficzne wiązanie przeciwciał. Następnie wykonano kompensację na ustalonych uprzednio ilościach przeciwciał, przeprowadzono doświadczenie fluorescence-minus-one (FMO, fluorescencja minus jeden) aby uzyskać punkty odcięcia populacji negatywnej dla każdego z markerów z uwzględnieniem tła.

Po 24 godzinach hodowle komórkowe zostały zebrane i przeniesione do polipropylenowych probówek typu Falcon. Kulki opłaszczone przeciwciałami anti-CD3/CD28 zostały usunięte w polu magnetycznym, a następnie zawiesina z komórkami i medium została odwirowana. Supernatanty zamrożono w -80°C w celu wykorzystania do późniejszej oceny profilu cytokin metodą Luminex, natomiast komórki zawieszono w 100 µL Stain Buffer (BSA, BD Biosciences) i wyznakowano następującymi przeciwciałami: anti-CD3 PerCP (klon SK7, BD Biosciences), anti-CD25 FITC (klon 2A3, BD Biosciences), anti-CD8 APC (klon SK1, BD Biosciences), anti-CD4 APC-Cy7 (klon SK3, BD Biosciences), anti-CD279 BV480 (klon EH12.1, Becton Dickinson), anti-CD366 PE (klon 7D3, Becton Dickinson), anti-CD45RO BV711 (klon UCHL-1, Becton Dickinson), anti-CD62L (klon DREG-56, Becton Dickinson). Próbkę inkubowano 15 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła i zawieszono w 100 µl Stain Buffer. Detekcję ekspresji badanych markerów prowadzono z wykorzystaniem cytometru CytoFlex (Beckman Coulter), natomiast analizę wykonano za pomocą oprogramowania CytExpert (Beckman Coulter). Po dyskryminacji dubletów do analizy wybrano limfocyty o fenotypie CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> oraz CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Następnie w obu populacjach oceniono ekspresję markerów CD25, CD279 (PD-1) i CD366 (Tim-3). Oceniono również występowanie subpopulacji limfocytów centralnych pamięci o fenotypie CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, efektorowych pamięci o fenotypie CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> oraz naiwnych o fenotypie CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>, a następnie zanalizowano wpływ Se-Le-30 na zmiany w ilości w/w populacji.

### *Ocena wpływu Se-Le-30 na produkcję cytokin*

W celu oceny wpływu Se-Le-30 na produkcję cytokin oceniono ich ilość z wykorzystaniem metody Luminex® Multiplex Assay. Bezpośrednio przed wykonaniem oznaczeń przeprowadzono kalibrację i weryfikację urządzenia z wykorzystaniem zestawów MAGPIX Calibration Kit oraz MAGPIX Performance Verification Kit (Merck Millipore). Stężenie TNF $\alpha$ , IL-6 oraz IFN- $\gamma$  zbadano z wykorzystaniem zestawu MILLIPLEX® Human Cyto Panel A (Merck Millipore) zgodnie z instrukcją producenta. Uzyskane wyniki analizowano z wykorzystaniem programu xPONENT software (Luminex Corp.).

### *Ocena wpływu Se-Le-30 na aktywację szlaku sygnałowego TCR/CD3*

W celu oceny wpływu Se-Le-30 na aktywację wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego limfocytów T związanego z CD3, wyizolowane limfocyty T były hodowane przez 24 godziny na płytkach 24-dołkowych płaskodennych bez stosowania stymulacji, w medium RPMI 1640 zawierającym 10% inaktywowanej surowicy ludzkiej i 1% roztworu penicyliny i streptomycyny, w gęstości 1 milion komórek na 0.8 ml, w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Po tym czasie przeprowadzono eksperymenty polegające na dodaniu do hodowli: 1) 200  $\mu$ l medium hodowlanego (kontrola); 2) 100  $\mu$ l medium hodowlanego i 100  $\mu$ l wody destylowanej (kontrola z równoważną do Se-Le-30 ilością wody, w której rozpuszczony był Se-Le-30); 3) 100  $\mu$ l medium hodowlanego i 100  $\mu$ l roztworu Se-Le-30; 4) 100  $\mu$ l medium hodowlanego zawierającego 1 ng przeciwciał anti-CD3 i 100  $\mu$ l wody destylowanej; 5) 100  $\mu$ l medium hodowlanego zawierającego 1 ng przeciwciał anti-CD3 i 100  $\mu$ l roztworu Se-Le-30; 6) 100  $\mu$ l medium hodowlanego zawierającego 2 x 10<sup>5</sup> kulek opłaszczonych przeciwciałami anti-CD3/CD28 i 100  $\mu$ l wody destylowanej; 7) 100  $\mu$ l medium hodowlanego zawierającego 2 x 10<sup>5</sup> kulek opłaszczonych przeciwciałami anti-CD3/CD28 i 100  $\mu$ l roztworu Se-Le-30. Na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych polegających na ustaleniu optymalnego czasu ekspozycji na czynnik aktywujący białka szlaku CD3/TCR (fosforylację ZAP-70, SLP-76, LCK i LAT w odpowiedzi na działanie przeciwciał anti-CD3/CD28 i kulek opłaszczonych przeciwciałami anti-CD3/CD28), ustalono czas 60s jako najlepszy dla zobrazowania aktywacji białek szlaku TCR metodą Western blot. W każdym wariancie doświadczalnym po 60 sekundach ekspozycji na dodane czynniki zawiesina komórek została przeniesiona do eppendorfa 2 mL, zwirowana w 3500 rpm przez 2 minuty, a następnie supernatant został usunięty. W przypadku eksperymentów z kulkami anti CD3/CD28 po 60 sekundach usunięto kulki przy pomocy

poła magnetycznego przed zwirowaniem zawiesiny. Uzyskany pelet komórkowy został poddany procedurze izolacji białek (przy użyciu SDS) zgodnie z metodą rekomendowaną przez producenta użytego zestawu przeciwciał (T Cell Signaling Antibody Sampler Kit #14541, Cell Signaling Technology), tj. zawieszony w 200µl wrzącego buforu 2X SDS sample buffer (0.125 M Tris-HCl pH = 6.8, 0.14 M (4%) SDS, 20% glicerol, 10% β-merkaptotanol, 0,1% inhibitorów proteaz (P8340, Sigma Aldrich) i fosfataz (P5726, Sigma Aldrich) i następnie inkubowany w 100°C przez 6 minut. Po ostygnięciu próbki zostały rozcieńczone 200µl wody z dodatkiem inhibitorów proteaz i fosfataz do uzyskania 1X SDS sample buffer. Próbki zostały rozporcjowane i zamrożone w -80 °C do dalszych analiz. Elektroferetyczny rozdział białek został przeprowadzony w 10% żelu poliakrylamidowymz użyciem 20 µl próbki na dołek, w warunkach denaturujących, w buforze SDS-PAGE (25 mM Tris-HCl / 192 mM glicyna / 0.1% SDS) przy stałym napięciu 100V . Mokry transfer został przeprowadzony przez 70 min w buforze do transferu (25 mM Tris-HCl / 192 mM glicyna / 10% metanol), przy stałym napięciu 100V na membranę PVDF (Immobilon®-FL, Millipore). Po transferze membrane były blokowane przy użyciu 5% roztworu BSA (ang. bovine serum albumin) przez 1h w temperaturze pokojowej. Po zablokowaniu, membrane były inkubowane z jednym z przeciwciał pierwszorzędowych: anti-ZAP70 #3165, SLP76 #70896, LCK #2984, LAT #45533, phosphoZAP70 (Tyr493) /Syk (Tyr526) #2704, phosphoSLP76(Ser376) #14745, phosphoLCK(Tyr505) #2751, phosphoLAT(Tyr220) #3584 (wszystkie Cell Signaling Technology, w stężeniu 1:500) oraz β-actin #sc-47778 (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000) na kołowrotku przez 24 godziny w 4°C. Po inkubacji membrane zostały 4-krotnie płukane przez 10 min w TBST #9997 (Cell Signaling Technology), następnie inkubowane z przeciwciałami drugorzędowymi Anti-rabbit IgG, HRP-linked #7074 lub Anti-mouse IgG, HRP-linked #7076 przez 60 min w temperaturze pokojowej. Po serii kolejnych płukań (4 × 10 min w TBST) przystępowano do detekcji chemiluminescencyjnej badanych białek, przeprowadzonej przy użyciu zestawu Clarity ECL Western Blotting Substrates #1705060 (BioRad) przy użyciu aparatu Chemidoc MP Imaging System (BioRad). Analizę densytometryczną wykonano przy użyciu programu Image Lab w wersji 6.1.0, dzieląc średnią gęstość optyczną (IOD) badanego prążka białka w formie ufosforylowanej (znormalizowaną o białko referencyjne na danej membranie) przez średnią gęstość optyczną białka w formie całkowitej (znormalizowaną o białko referencyjne na danej membranie). Białka ufosforylowane i całkowite wykrywane były u każdego z dawców na oddzielnych membranach. Wyniki przedstawiono w formie wykresów słupkowych ilorazu

średniej gęstości optycznej ( $\pm$ SEM) znormalizowanych białek ufosforylowanych do białek całkowitych od co najmniej 4 dawców.

#### *Analiza statystyczna*

Analizę statystyczną oraz graficzną prezentację wyników wykonano z wykorzystaniem programu GraphPad Prism 9.4.0 (GraphPad Software). Poziom istotności  $\alpha$  ustalono na 0.05. Testy Shapiro-Wilka oraz Kolmogorova-Smirnova wykorzystano do oceny normalności rozkładu danych. Przyjęto, że rozkład jest zgodny z normalnym, jeśli dla obu testów współczynnik predykcji p jest większy niż 0.05. Analiza danych odstających została przeprowadzona przy użyciu testu ROUT, przy współczynniku Q znaczącym maksymalny udział fałszywie dodatnich wyników równym 1%. Jeżeli rozkład różnic pomiędzy porównywanymi wynikami był normalny przeprowadzano test t- Studenta, natomiast jeżeli rozkład różnic nie wykazywał cech takiego rozkładu przeprowadzano test Wilcoxon. Wartość  $p < 0.05$  (\*) uznano za istotną statystycznie, a  $p < 0,01$  (\*\*) lub  $p < 0,001$  (\*\*\*) za wysoce istotną.

## **Wyniki**

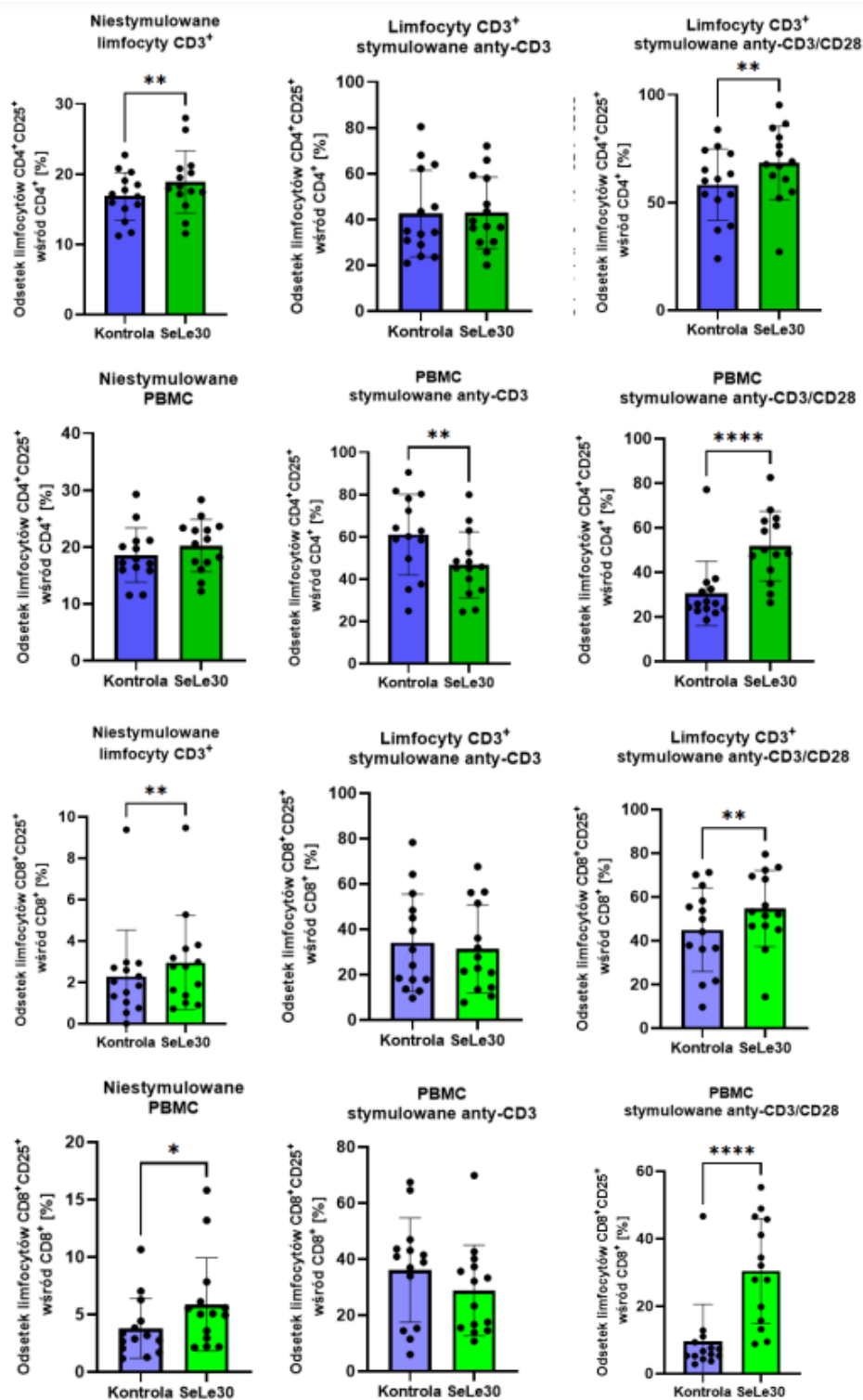
### *Wpływ Se-Le-30 na aktywację limfocytów T i ekspresję ICPs*

Wpływ Se-Le-30 na odsetek limfocytów T posiadających na powierzchni ekspresję markera CD25 jest przedstawiony na Rycinie 1.

Wykazano, że związek ten zwiększał odsetek limfocytów T o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $p = 0.0035$ ) i CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $p = 0.0032$ ) w hodowlach założonych z izolowanych niestymulowanych limfocytów. W przypadku niestymulowanej hodowli PBMCs nie wykazano wpływu na populację CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, natomiast obserwowano obniżenie odsetka limfocytów CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ( $p = 0.0464$ ).

W hodowli izolowanych limfocytów T stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 nie wykazano wpływu Se-Le-30 na zmiany ekspresji markera CD25. Polisacharyd natomiast zmniejszał odsetek komórek o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> w hodowlach PBMCs stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 ( $p = 0.0017$ ), bez widocznego wpływu na limfocyty CD8<sup>+</sup>.

W hodowli izolowanych limfocytów T stymulowanych podwójnym sygnałem (anti-CD3/CD28) obserwowano zwiększenie odsetka komórek CD4<sup>+</sup> oraz CD8<sup>+</sup> wykazujących ekspresję CD25 (odpowiednio  $p = 0.0041$  i  $p = 0.0066$ ). Podobne wyniki uzyskano w hodowlach PBMCs, ale tu wpływ Se-Le-30 był silniejszy dla obu populacji ( $p < 0.0001$  dla CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> i  $p < 0.0001$  dla CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>).



*Rycina 1. Wpływ Se-Le-30 na ekspresję markera aktywacji CD25.*

*Wpływ Se-Le-30 na ekspresję markera aktywacji CD25 na limfocytach T CD4<sup>+</sup> (wiersz 1 i 2) i CD8<sup>+</sup> (wiersz 3 i 4) w hodowlach z izolowanymi limfocytami T (wiersz 1 i 3) i w hodowlach z PBMCs (wiersz 2 i 4) w zależności od zastosowanego modelu stymulacji limfocytów T (kolumna 1: hodowla niestymulowana, kolumna 2: hodowla stymulowana przeciwciałem anti-CD3, kolumna 3: hodowla stymulowana przeciwciałem anti-CD3/CD28). Współczynnik predykcji  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.001$  (\*\*\*) i  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*).*

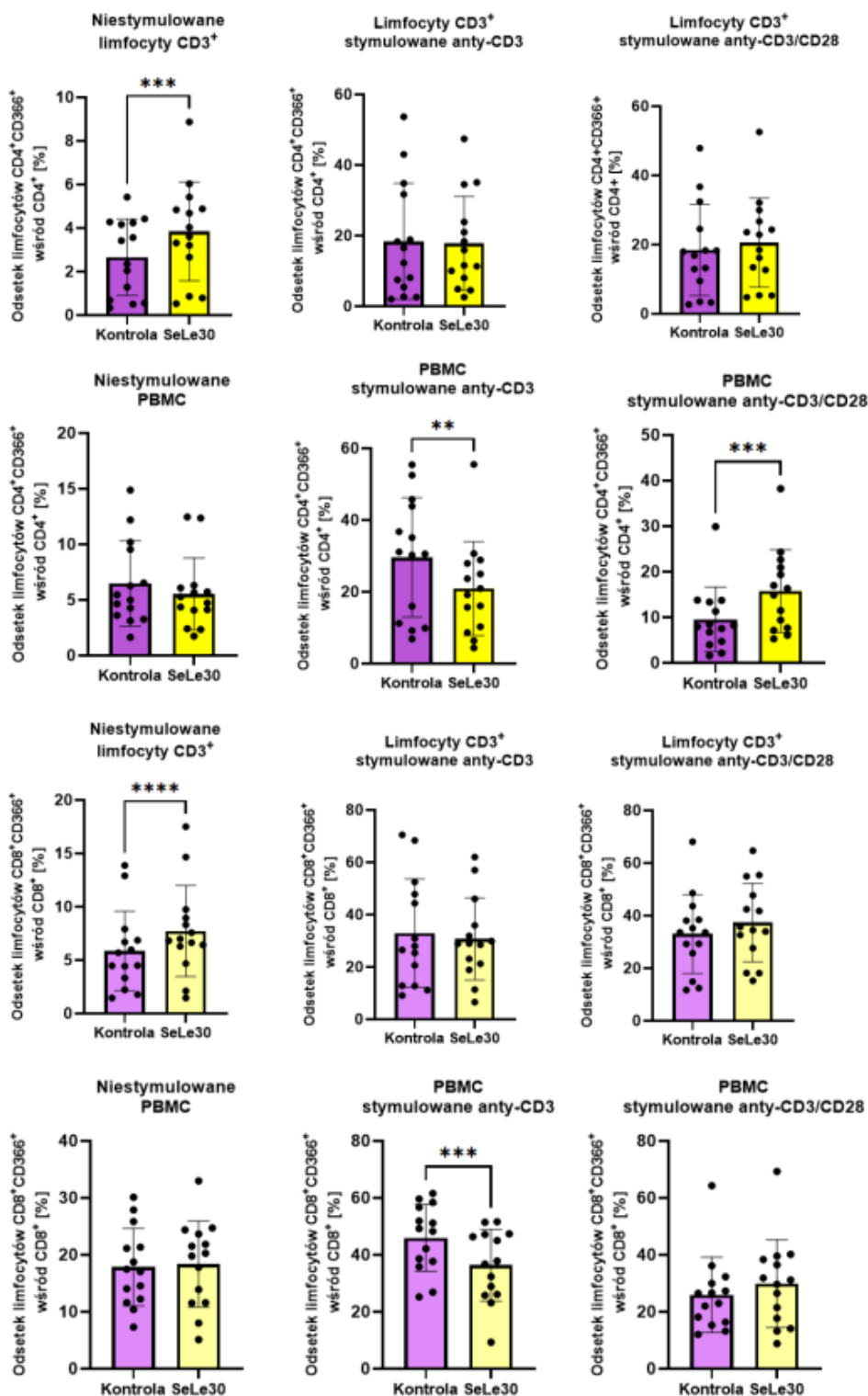
Wpływ Se-Le-30 na odsetek limfocytów T posiadających na powierzchni ekspresję markera CD366 (TIM-3) jest przedstawiony na Rycinie 2.

Wykazano, że Se-Le-30 zwiększał odsetek limfocytów T o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD366<sup>+</sup> ( $p = 0.0008$ ) i CD8<sup>+</sup>CD366<sup>+</sup> ( $p < 0.0001$ ) w hodowlach założonych z izolowanych niestymulowanych limfocytów T. W przypadku niestymulowanej hodowli PBMCs nie wykazano wpływu na zmiany ekspresji CD366 na limfocytach CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>.

W hodowli izolowanych limfocytów T stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 nie wykazano wpływu Se-Le-30 na zmiany ekspresji CD366 na limfocytach CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>, ale w hodowlach PBMCs przy tej samej stymulacji Se-Le-30 zmniejszał ekspresję CD366 na limfocytach T CD4<sup>+</sup> ( $p = 0.0060$ ) i CD8<sup>+</sup> ( $p = 0.0001$ ).

W hodowli izolowanych limfocytów T stymulowanych podwójnym sygnałem (anty-CD3/CD28) nie stwierdzono istotnego wpływu Se-Le-30 na ekspresję CD366, ale w hodowlach PBMCs stwierdzono wzrost ekspresji CD366 na limfocytach T CD4<sup>+</sup> ( $p = 0.0001$ ) bez wpływu na limfocyty CD8<sup>+</sup>.





Rycina 2. Wpływ Se-Le-30 na ekspresję markera CD366 (TIM-3)

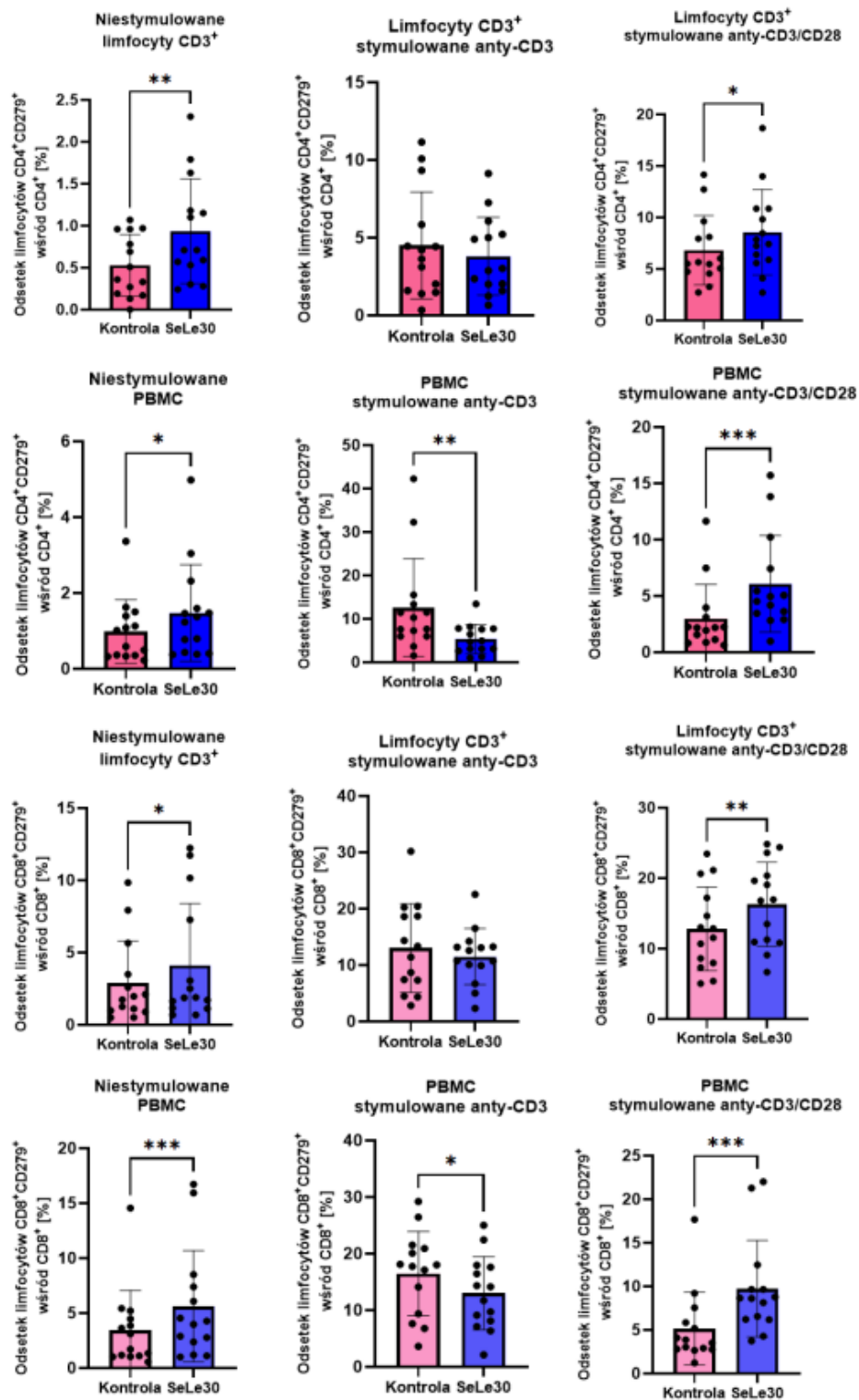
Wpływ Se-Le-30 na ekspresję markera CD366 (TIM-3) na limfocytach T CD4<sup>+</sup> (wiersz 1 i 2) i CD8<sup>+</sup> (wiersz 3 i 4) w hodowlach z izolowanymi limfocytami T (wiersz 1 i 3) i w hodowlach z PBMCs (wiersz 2 i 4) w zależności od zastosowanego modelu stymulacji limfocytów T (kolumna 1: hodowla niestymulowana, kolumna 2: hodowla stymulowana przeciwciałem anty-CD3, kolumna 3: hodowla stymulowana przeciwciałem anty-CD3/CD28). Współczynnik predykcji  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) i  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Wpływ Se-Le-30 na odsetek limfocytów T posiadających na powierzchni ekspresję markera CD279 (PD-1) jest przedstawiony na Rycinie 3.

Wykazano, że Se-Le-30 zwiększał odsetek limfocytów CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> posiadających ekspresję CD279 (odpowiednio  $p = 0.0060$  i  $p = 0.0295$ ) w hodowlach izolowanych limfocytów T niepoddanych stymulacji. Podobne wyniki uzyskano w niestymulowanej hodowli PBMCs ( $p = 0.0366$  dla limfocytów CD4<sup>+</sup> i  $p = 0.0001$  dla CD8<sup>+</sup>).

W hodowli izolowanych limfocytów T stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 nie wykazano wpływu Se-Le-30 na ekspresję CD279 na obu populacjach limfocytów, natomiast w hodowli PBMCs związek ten obniżał ekspresję CD279 zarówno na limfocytach o fenotypie CD4<sup>+</sup> ( $p = 0.0012$ ) jak i CD8<sup>+</sup> ( $p = 0.0460$ ).

W hodowli izolowanych limfocytów T stymulowanych podwójnym sygnałem (anty-CD3/CD28) wykazano wzrost odsetka limfocytów o fenotypie CD4<sup>+</sup>CD279<sup>+</sup> ( $p = 0.0211$ ) oraz limfocytów o fenotypie CD8<sup>+</sup>CD279<sup>+</sup> ( $p = 0.0017$ ) pod wpływem Se-Le-30. Podobne rezultaty uzyskano w hodowlach PBMCs stymulowanych anti-CD3/CD28 ( $p = 0.0001$  dla limfocytów CD4<sup>+</sup> i  $p = 0.0001$  dla CD8<sup>+</sup>).



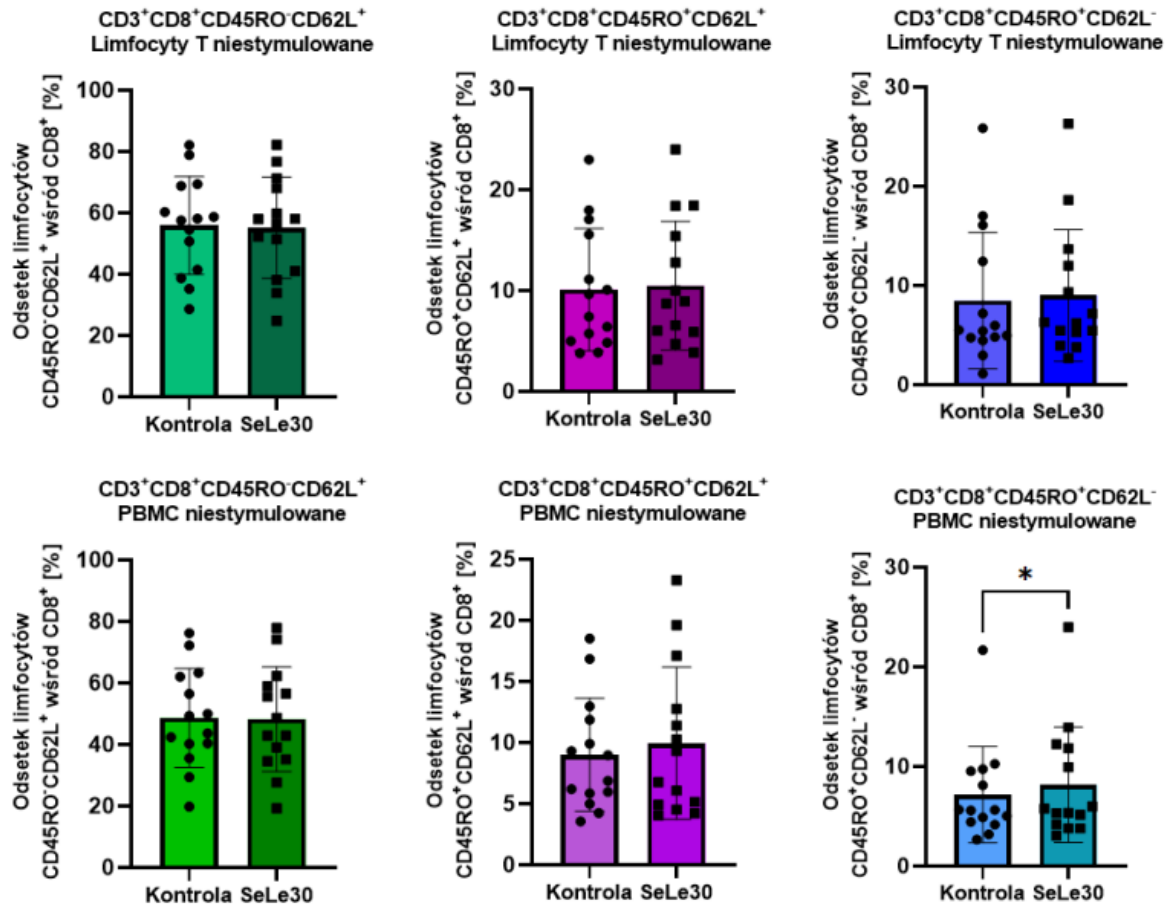
**Rycina 3.** Wpływ Se-Le-30 na ekspresję markera CD279 (PD-1).

Wpływ Se-Le-30 na ekspresję markera CD279 (PD-1) na limfocytach T CD4<sup>+</sup> (wiersz 1 i 2) i CD8<sup>+</sup> (wiersz 3 i 4) w hodowlach z izolowanymi limfocytami T (wiersz 1 i 3) i w hodowlach z PBMCs (wiersz 2 i 4) w zależności od zastosowanego modelu stymulacji limfocytów T (kolumna 1: hodowla niestymulowana, kolumna 2: hodowla stymulowana przeciwciałem anty-CD3, kolumna 3: hodowla stymulowana przeciwciałem anty-CD3/CD28). Współczynnik predykcji  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*), i  $p < 0.001$  (\*\*\*)

Wpływ Se-Le-30 na limfocytów T naiwne, efektorowe pamięci i centralne pamięci jest przedstawiony na Rycinach 4, 5 i 6.

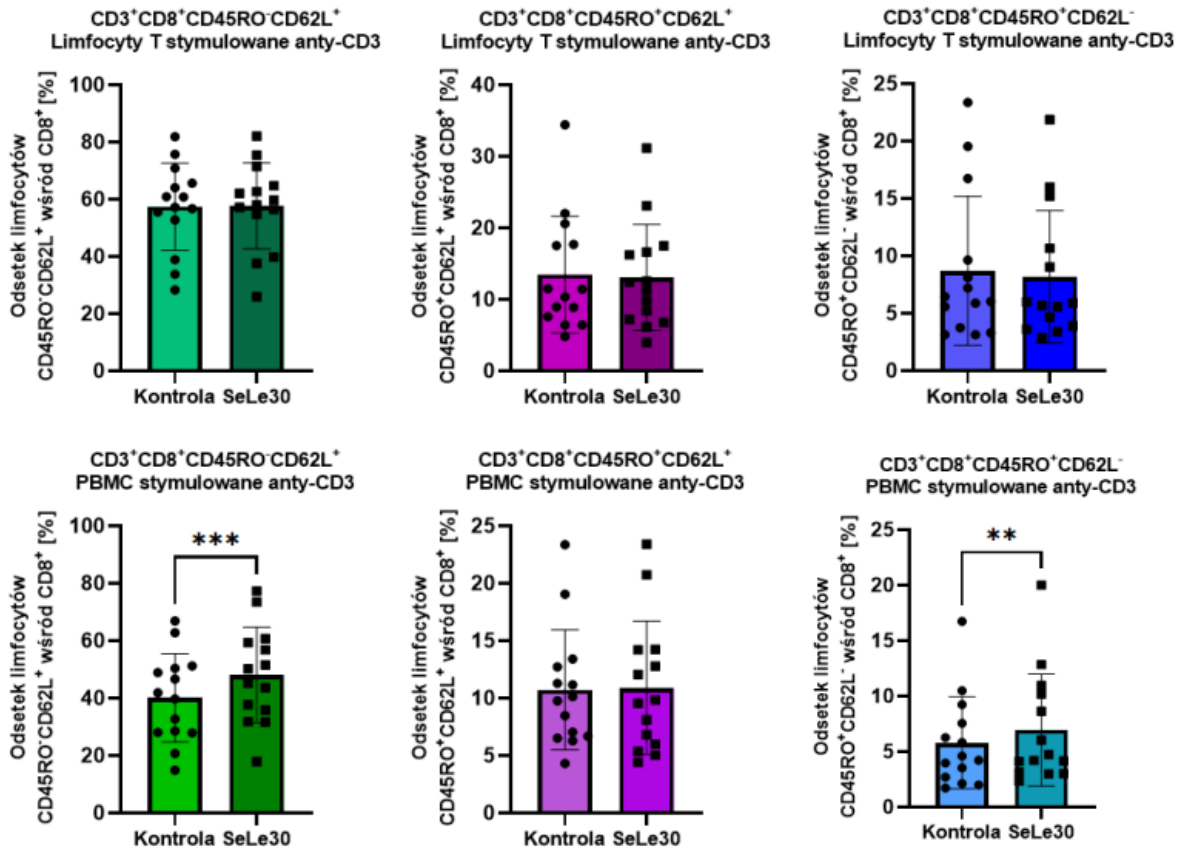
Wykazano, że w niestymulowanej hodowli PBMCs Se-Le-30 istotnie zwiększał odsetek limfocytów T CD8<sup>+</sup> centralnych pamięci ( $p = 0.0203$ ), nie wykazano natomiast jego wpływu na inne subpopulacje limfocytów T. Badany polisacharyd nie zmieniał odsetka subpopulacji limfocytów CD8<sup>+</sup> przy stymulacji przeciwciałem anti-CD3 w hodowli z izolowanymi limfocytami T. Wykazano natomiast, że Se-Le-30 istotnie zwiększał odsetek limfocytów T naiwnych i centralnych pamięci (odpowiednio  $p = 0.0006$  i  $p = 0.0085$ ) w hodowlach PBMCs stymulowanych przeciwciałem anti-CD3.

W hodowlach izolowanych limfocytów T stymulowanych podwójnym sygnałem Se-Le-30 obniżał odsetek limfocytów T CD8<sup>+</sup> centralnych pamięci ( $p = 0.0031$ ) i naiwnych ( $p = 0.0011$ ), natomiast w hodowli z PBMCs obniżał odsetek limfocytów T CD8<sup>+</sup> efektorowych pamięci ( $p = 0.0295$ ).



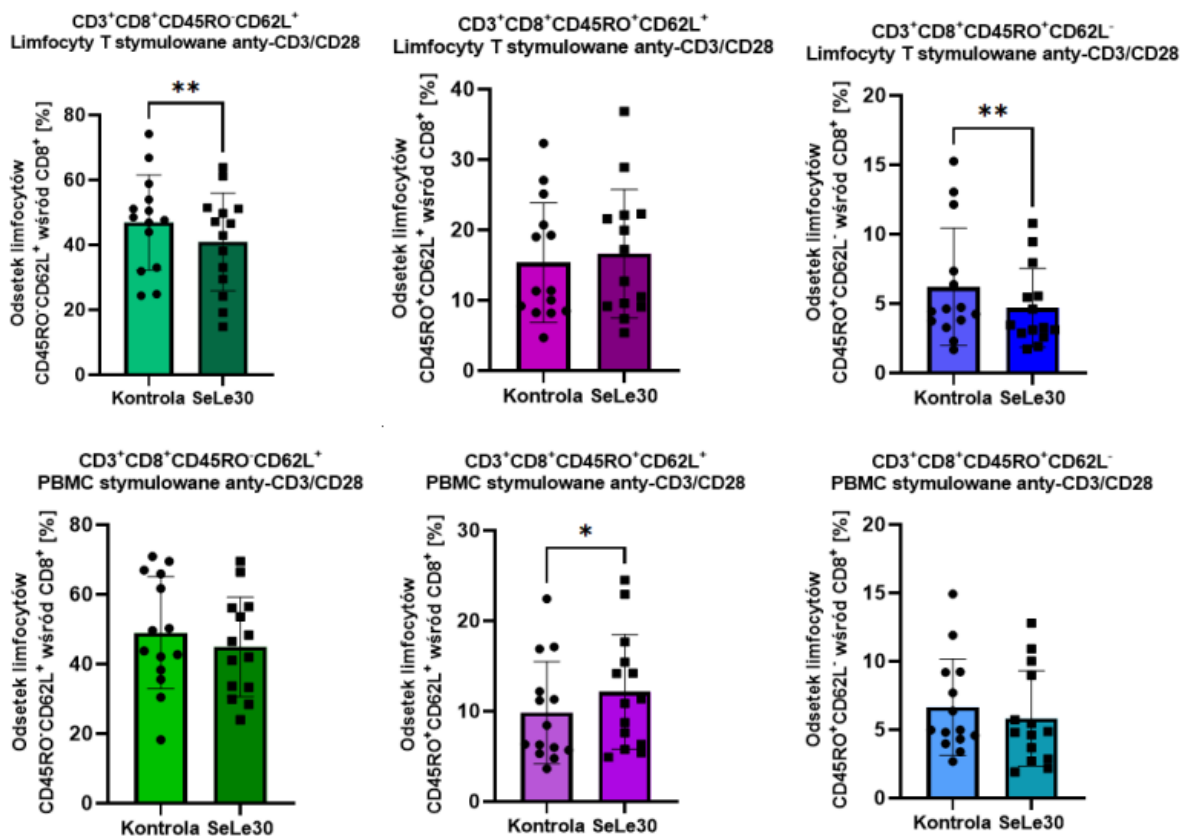
**Rycina 4.** Wpływ Se-Le-30 na populacje limfocytów T CD8<sup>+</sup> naiwnych, efektorowych i centralnych pamięci w hodowlach niestymulowanych

Wpływ Se-Le-30 na: odsetek limfocytów T naiwnych (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>, kolor zielony) wśród wszystkich limfocytów T CD8<sup>+</sup> w niestymulowanej hodowli izolowanych limfocytów T (rzęd 1) i hodowli PBMCs (rzęd 2), odsetek limfocytów T efektorowych pamięci (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, kolor fioletowy) wśród wszystkich limfocytów T CD8<sup>+</sup> w niestymulowanej hodowli izolowanych limfocytów T (rzęd 1) i hodowli PBMCs (rzęd 2), odsetek limfocytów T centralnych pamięci (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, kolor niebieski) wśród wszystkich limfocytów T CD8<sup>+</sup> w niestymulowanej hodowli izolowanych limfocytów T (rzęd 1) i hodowli PBMC (rzęd 2). Współczynnik predykcji  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) i  $p < 0,001$  (\*\*\*).



**Rycina 5.** Wpływ Se-Le-30 na populacje limfocytów T CD8<sup>+</sup> naiwnych, efektorowych i centralnych pamięci w hodowlach stymulowanych p-ciałem anti-CD3

Wpływ Se-Le-30 na: odsetek limfocytów T naiwnych (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>, kolor zielony) wśród wszystkich limfocytów T CD8<sup>+</sup> w stymulowanej przeciwciałem anti-CD3 hodowli izolowanych limfocytów T (rząd 1) i hodowli PBMC (rząd 2), odsetek limfocytów T efektorowych pamięci (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, kolor fioletowy) wśród wszystkich limfocytów T CD8<sup>+</sup> w stymulowanej przeciwciałem anti-CD3 hodowli izolowanych limfocytów T (rząd 1) i hodowli PBMCs (rząd 2), odsetek limfocytów T centralnych pamięci (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, kolor niebieski) wśród wszystkich limfocytów T CD8<sup>+</sup> w stymulowanej przeciwciałem anti-CD3 hodowli izolowanych limfocytów T (rząd 1) i hodowli PBMCs (rząd 2). Współczynnik predykcji  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) i  $p < 0,001$  (\*\*\*).



**Rycina 6.** Wpływ Se-Le-30 na populacje limfocytów T CD8<sup>+</sup> naiwnych, efektorowych i centralnych pamięci w hodowlach stymulowanych p-ciałem anti- CD3/CD28

Wpływ Se-Le-30 na: odsetek limfocytów T naiwnych (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>, kolor zielony) wśród wszystkich limfocytów T CD8<sup>+</sup> w stymulowanej przeciwciałem anti-CD3/CD28 hodowli izolowanych limfocytów T (rzęd 1) i hodowli PBMCs (rzęd 2), odsetek limfocytów T efektorowych pamięci (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, kolor fioletowy) wśród wszystkich limfocytów T CD8<sup>+</sup> w stymulowanej przeciwciałem anti-CD3/CD28 hodowli izolowanych limfocytów T (rzęd 1) i hodowli PBMCs (rzęd 2), odsetek limfocytów T centralnych pamięci (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, kolor niebieski) wśród wszystkich limfocytów T CD8<sup>+</sup> w stymulowanej przeciwciałem anti-CD3/CD28 hodowli izolowanych limfocytów T (rzęd 1) i hodowli PBMCs (rzęd 2). Współczynnik predykcji  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) i  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### *Wpływ Se-Le-30 na produkcję cytokin*

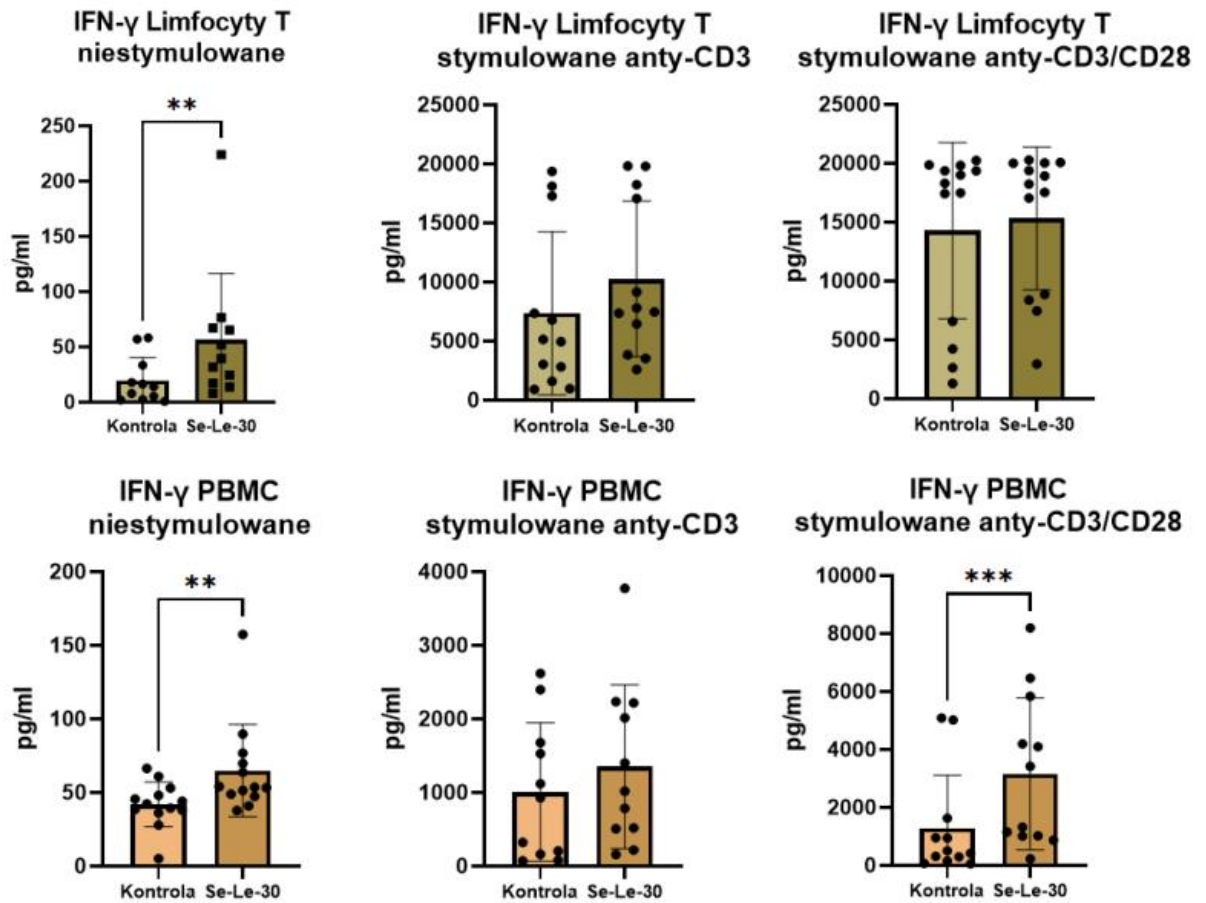
Wpływ Se-Le-30 na produkcję IFN- $\gamma$ , IL-6 oraz TNF- $\alpha$  jest przedstawiony na Rycinach 7, 8 i 9.

Wykazano, że badany polisacharyd zwiększał produkcję IFN- $\gamma$  zarówno w niestymulowanych hodowlach izolowanych limfocytów T ( $19.57 \pm 21.05$  pg/ml vs  $56.32 \pm 60.27$  pg/ml,  $p = 0.0068$ ) oraz hodowlach PBMCs ( $41.96 \pm 15.14$  pg/ml vs  $64.99$  pg/ml  $\pm 31.32$  pg/ml,  $p = 0.0046$ ). Se-Le-30 istotnie wpływał również na zwiększenie produkcji IL-6 przez izolowane limfocyty T ( $26.05 \pm 21.21$  pg/ml vs  $371.5 \pm 370.0$  pg/ml,  $p = 0.0039$ ) oraz PBMCs ( $1072.0 \pm 1338$  pg/ml vs  $9821 \pm 1441$  pg/ml,  $p < 0.0001$ ). Ponadto obserwowano również jego wpływ na wzrost produkcji TNF- $\alpha$  (dla hodowli limfocytów T:  $65.35 \pm 79.56$  pg/ml vs  $855.0 \pm 1087$  pg/ml,  $p = 0.0384$ ; dla hodowli z PBMC:  $729.8 \pm 1073$  pg/ml vs  $3394 \pm 1812$  pg/ml,  $p = 0.0011$ ).

W hodowlach izolowanych limfocytów T, które były stymulowane przeciwciałem anti-CD3 nie obserwowano wpływu Se-Le-30 na produkcję IFN- $\gamma$ , ale wykazano nasilenie produkcji IL-6 ( $303.3 \pm 543.9$  pg/ml vs  $1623.0 \pm 3102$  pg/ml,  $p = 0.0078$ ) oraz TNF $\alpha$  ( $2094.0 \pm 1362$  pg/ml vs  $2830.0 \pm 1494$  pg/ml,  $p = 0.0294$ ). Natomiast w hodowlach PBMCs stymulowanych w ten sam sposób zaobserwowano jedynie wpływ polisacharydu na zwiększenie stężenia IL-6 ( $3544 \pm 3161$  pg/ml vs  $10643 \pm 743.7$  pg/ml,  $p < 0.0001$ ). Warto zaznaczyć, że w przypadku PBMCs zmiana była znacznie bardziej istotna w porównaniu do izolowanych limfocytów T.

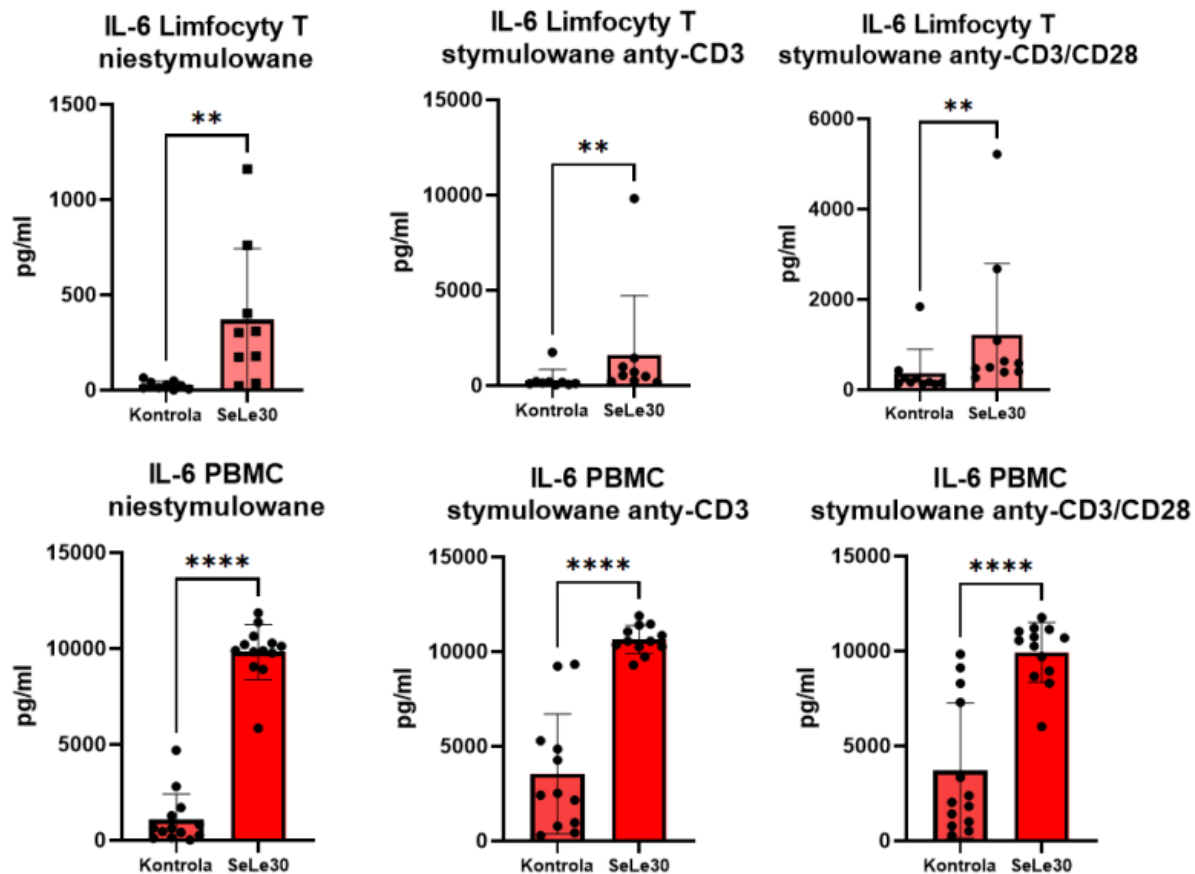
W hodowlach izolowanych limfocytów T stymulowanych przeciwciałami anti-CD3/CD28 Se-Le-30 zwiększał produkcję IL-6 ( $367.3 \pm 527.0$  pg/ml vs  $1223.0 \pm 1570$  pg/ml,  $p = 0.0078$ ). W hodowlach PBMCs polisacharyd zwiększał stężenie IFN- $\gamma$  ( $1287.0 \pm 1816$  pg/ml vs  $3152.0 \pm 2625$  pg/ml,  $p = 0.0005$ ), IL-6 ( $3703.0 \pm 3559$  pg/ml vs  $9926 \pm 1580$  pg/ml,  $p < 0.0001$ ) oraz TNF- $\alpha$  ( $2246 \pm 1558$  pg/ml vs  $4865.0 \pm 3080$  pg/ml,  $p = 0.0155$ ).





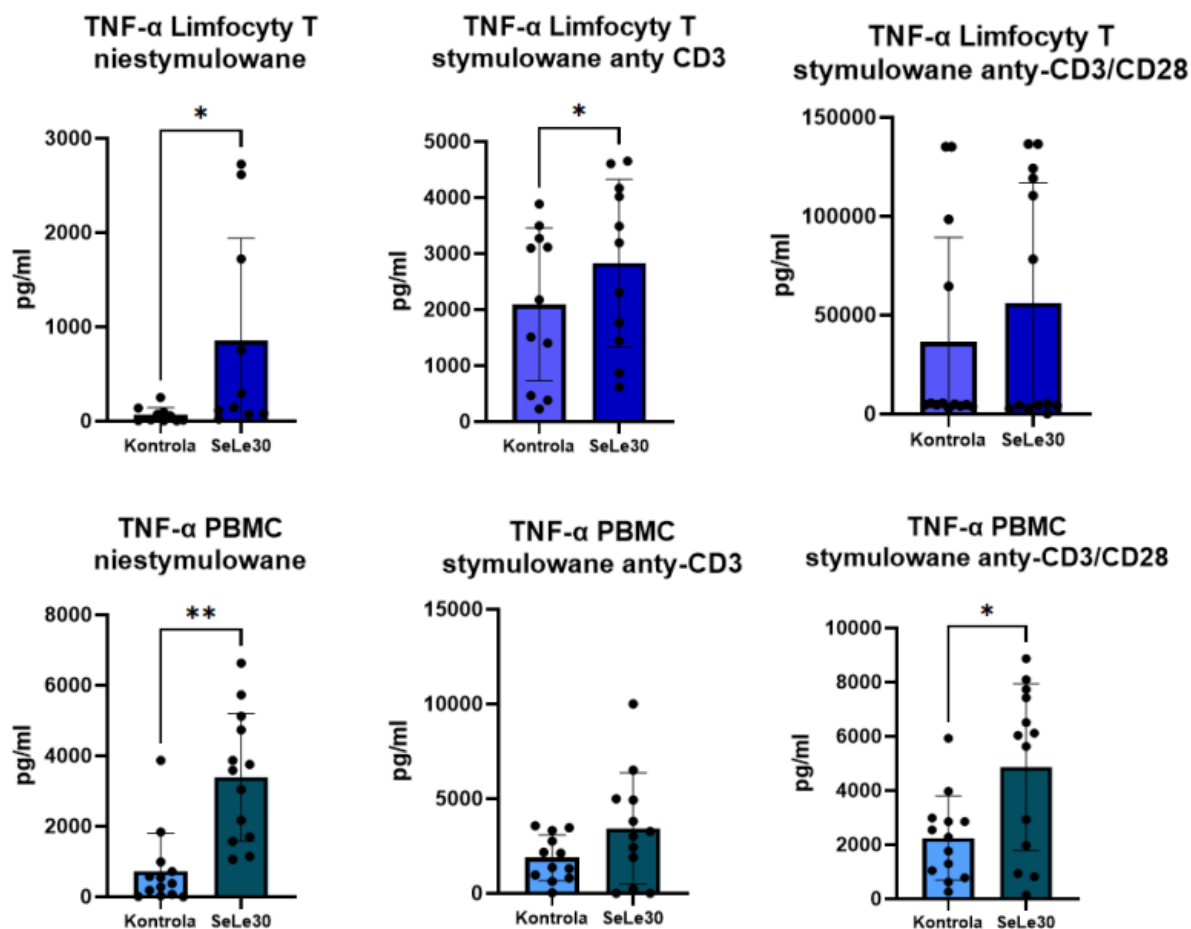
*Rycina 7. Wpływ Se-Le-30 na stężenie interferonu gamma (IFN- $\gamma$ )*

*Wpływ Se-Le-30 na stężenie IFN- $\gamma$  w hodowlach izolowanych limfocytów T (wiersz 1) i PBMCs (rzęd 2) niestymulowanych (kolumna 1), stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 (kolumna 2) i anti-CD3/CD28 (kolumna 3). Współczynnik predykcji  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)*



*Rycina 8. Wpływ Se-Le-30 na stężenie interleukiny 6 (IL-6)*

*Wpływ Se-Le-30 na stężenie IL-6 w hodowlach izolowanych limfocytów T (wiersz 1) i PBMCs (rzęd 2) niestimulowanych (kolumna 1), stymulowanych przeciwciałem anty-CD3 (kolumna 2) i przeciwciałem anty- CD3/CD28 (kolumna 3). Współczynnik predykcji  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) i  $p < 0,001$  (\*\*\*)*



**Rycina 9.** Wpływ Se-Le-30 na stężenie czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ )

Wpływ Se-Le-30 na stężenie TNF- $\alpha$  w hodowlach izolowanych limfocytów T (wiersz 1) i PBMCs (rzęd 2) niestymulowanych (kolumna 1), stymulowanych przeciwciałem anty-CD3 (kolumna 2) i przeciwciałem anty-CD3/CD28 (kolumna 3). Współczynnik predykcji  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) i  $p < 0,001$  (\*\*\*)

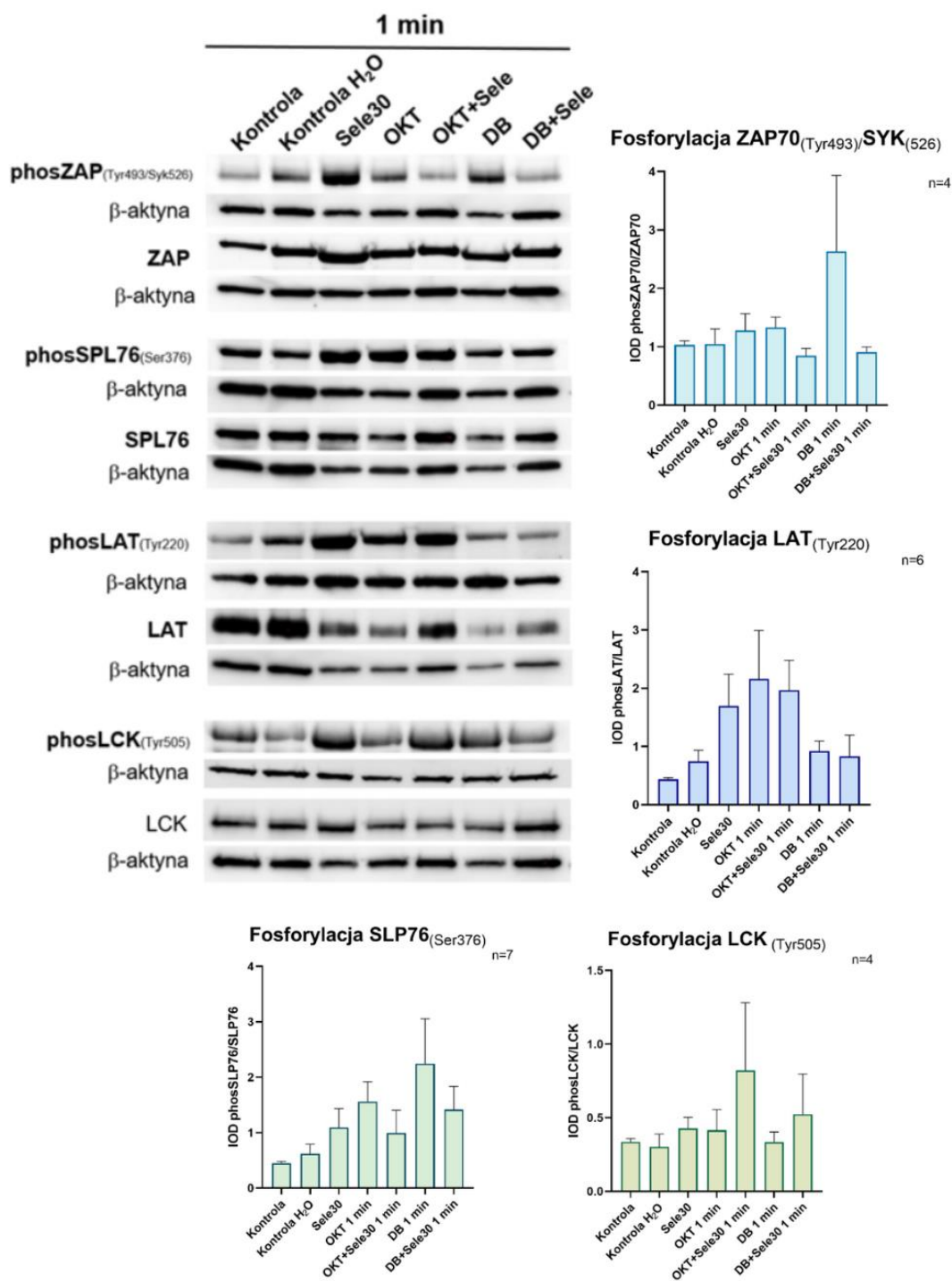
#### Wpływ Se-Le-30 na fosforylację białek szlaku sygnałowego TCR/CD3

Analiza western-blot aktywacji głównych białek szlaku sygnałowego TCR/CD3 w wyizolowanych limfocytach T pozwala przypuszczać, że Se-Le-30 wpływa na regulację tego szlaku. Zaobserwowano, że Se-Le-30 wywiera odmienny efekt na regulację tego szlaku w limfocytach T niestymulowanych w porównaniu do stymulowanych zarówno przeciwciałem anty-CD3 jak i anty-CD3/CD28. W limfocytach niestymulowanych, dodanie Se-Le-30 powodowało nieznaczny wzrost fosforylacji kinazy ZAP-70 oraz znaczny wzrost fosforylacji białka LAT, które mogą wskazywać na aktywację szlaku TCR, przy jednoczesnym wzroście fosforylacji kinazy SLP-76 na Tyr376, która hamuje zwrotnie aktywację szlaku TCR. Wyraźniejszy, odmienny efekt działania Se-Le-30 zaobserwowano

dla limfocytów T stymulowanych zarówno anty-CD3 jak i anty-CD3/CD28, w których Se-Le-30 powodował zmniejszenie fosforylacji kinazy ZAP-70 (przy braku wpływu na fosforylację białka LAT), zmniejszenie fosforylacji SLP-76 oraz wzrost fosforylacji kinazy LCK na Tyr505 związanej z obniżeniem jej aktywności katalitycznej. Wyniki te mogą wskazywać, że Se-Le-30 w stymulowanych limfocytach T działa wyciszająco na aktywację szlaku TCR/CD3.

Opracowanie statystyczne wyników densytometrii nie wykazało istotnych statystycznie różnic między traktowaniami, jednak trendy dla hodowli z Se-Le-30 wydają się być koherentne dla wszystkich badanych białek. Niemniej, należy zachować ostrożność

przed wyciąganiem jednoznacznych wniosków z przedstawionych wyników analizy Western blot, dopóki wyniki te nie zostaną powtórzone metodami ilościowymi.



**Rycina 10** Wpływ Se-Le-30 na fosforylację białek ZAP-70, SLP-76, LAT i LCK.

Rycina przedstawia reprezentatywne membrany z analizy Western blot poziomu fosforylacji białek ZAP-70, SLP-76, LAT i LCK w limfocytach T, znormalizowane o poziom β-aktyny jako białka referencyjnego. Prążki na membrane reprezentują kolejno

traktowania: hodowlę izolowanych limfocytów T niestymulowaną (Kontrola), hodowlę izolowanych limfocytów T niestymulowaną z 10% wody destylowanej (Kontrola H<sub>2</sub>O), hodowlę izolowanych limfocytów T z Se-Le-30 (Sele30), hodowlę izolowanych limfocytów T stymulowaną przeciwciałem anti-CD3 przez 60 sekund (OKT 1 min), hodowlę izolowanych limfocytów T stymulowaną przeciwciałem anti-CD3 przez 60 sekund w obecności Se-Le-30 (OKT3 + Sele30 1min), hodowlę izolowanych limfocytów T stymulowaną przeciwciałem anti-CD3/CD28 przez 60 sekund (DB 1 min) oraz hodowlę izolowanych limfocytów T stymulowaną przeciwciałem anti-CD3/CD28 przez 60 sekund w obecności Se-Le-30 (DB + Sele30 1min). Wykresy przedstawiają wyniki analizy gęstości optycznej prążków (IOD) białek w formie ufosforylowanej podzielonej przez IOD prążków białek w formie całkowitej, wykonanej przy pomocy programu ImageLab (BioRad).

## Podsumowanie i wnioski

Grzyby lecznicze, w tym *L. edodes* są szeroko wykorzystywane, szczególnie w krajach azjatyckich, do biosyntezy związków o działaniu immunomodulacyjnym, przeciwzapalnym i przeciwnowotworowym. Wieloletnie badania składu chemicznego tych grzybów umożliwiły identyfikację wielu związków odpowiedzialnych za poszczególne kierunki działania farmakologicznego. Najważniejszymi bioaktywnymi substancjami izolowanymi z *L. edodes* są polisacharydy, głównie  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukany o udowodnionych właściwościach immunomodulacyjnych. Warto podkreślić, że kierunek aktywności biologicznej oraz jej siła jest uzależniona od struktury tych złożonych związków, w szczególności od składu monosacharydowego, rozpuszczalności, masy molowej i struktury przestrzennej.

Przedstawiony w rozprawie doktorskiej cykl publikacji zawiera analizę wpływu selenowanego polisacharydu (Se-Le-30) izolowanego z grzybni *L. edodes* na ludzkie limfocyty T w modelu *in vitro*.

W pracy poglądowej *Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from Lentinula edodes*, która jest wstępem teoretycznym do badań, scharakteryzowano bioaktywne substancje występujące w *L. edodes*, w szczególności polisacharydy izolowane z jego owocnika lub grzybni. Opisano ponadto liczne receptory powierzchniowe występujące w błonie komórek układu odpornościowego oraz potencjalne mechanizmy odpowiadające za działanie immunomodulacyjne polisacharydów. W pracy szczegółowo podsumowano dotychczasowy stan wiedzy w zakresie badań nad tymi związkami, z podziałem na analizy przeprowadzone na modelach zwierzęcych i na komórkach ludzkich. Przegląd dostępnej literatury potwierdził, że polisacharydy *L. edodes* mogą modulować

odpowieź immunologiczną poprzez różne szlaki biochemiczne, należy jednak podkreślić, że część badań dała niejednoznaczne lub sprzeczne rezultaty, co może wynikać z odmiennych warunków hodowli grzyba, różnych metod izolacji tych związków, a więc ich odmiennej budowy, a także różnych dawek/stężeń preparatów stosowanych w badaniach.

W pracy *Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells* opisano metodę otrzymywania homogennej frakcji Se-Le-30 oraz oceniono jej aktywności biologiczną w stosunku do ludzkich limfocytów T, granulocytów oraz komórek NK. W badaniu wykazano, że Se-Le-30 hamuje proliferację limfocytów T oraz zmniejsza wewnątrzkomórkową produkcję TNF- $\alpha$  przez te komórki. Obserwowano również nieznaczne obniżenie aktywności komórek NK. Jednocześnie nie wykazano wpływu badanej frakcji na limfocyty B i granulocyty. Wyniki tych badań sugerują, że Se-Le-30, jest selektywnym immunosupresantem limfocytów T oraz komórek NK, co warto podkreślić nie jest typowe dla  $\beta$ -glukanów.

Uzyskane rezultaty skłoniły do zaplanowania kolejnych analiz, które zostały opisane w pracy *The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis*. W badaniach skupiono się na ocenie wpływu Se-Le-30 na aktywację, proliferację oraz produkcję cytokin przez dwie populacje ludzkich limfocytów T: o fenotypie CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>. Dodatkowo porównano efekt działania Se-Le-30 na limfocyty T przy zastosowaniu dwóch różnych typów aktywacji. Wykazano, że kierunek działania Se-Le-30 zależy od rodzaju stymulacji. Przy stymulacji anty-CD3 polisacharyd hamował aktywację, proliferację oraz produkcję IL-2 i IL-4. Przy stymulacji dwoma sygnałami Se-Le-30 zwiększał aktywację komórek, ilość podzielonych limfocytów T oraz stężenie IFN- $\gamma$ . Zaskakującą obserwacją było to, że niezależnie od zastosowanej stymulacji polisacharyd zwiększał produkcję IL-6 i IL-10, co sugeruje jego wpływ również na monocyty krwi obwodowej, które mogły być obecne w hodowlach w niewielkiej ilości. Aby wykluczyć udział innych niż limfocyty T komórek immunologicznych, badania powtórzono na izolowanych z PBMCs limfocytach T i dodatkowo oceniono wpływ Se-Le-30 na cząstki kontrolujące układ odpornościowy: PD-1 i TIM-3 oraz na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe limfocytów T zależne od receptora CD3. Niezależnie od tego, czy analizowano wpływ Se-Le-30 na izolowane limfocyty T czy PBMCs wykazano podobny kierunek działania jeśli chodzi o produkcję IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  i IL-6 oraz ekspresję cząstek powierzchniowych CD25, CD366 i CD279.

Warto jednak podkreślić, że efekt ten był wyraźniejszy w przypadku hodowli PBMCs, co może sugerować potencjalny wpływ polisacharydu na populację inną niż limfocyty T, prawdopodobnie monocyty czy makrofagi. Kolejne analizy wykazały, że w hodowli PBMCs stymulowanej przeciwciałem anti-CD3 Se-Le-30 zwiększa odsetek limfocytów T naiwnych i centralnych pamięci, natomiast przy stymulacji przeciwciałami anti-CD3/CD28 wzrastała liczba limfocytów T efektorowych pamięci. Pozwala to przypuszczać, że przy aktywacji dwoma sygnałami polisacharyd promuje różnicowanie się limfocytów T CD8<sup>+</sup> w kierunku efektorowych pamięci, które mają wysoki potencjał proliferacyjny, co może częściowo tłumaczyć zwiększenie proliferacji w tym modelu. Należy również podkreślić brak wpływu Se-Le-30 na zmianę wspomnianych wyżej subpopulacji w hodowli izolowanych limfocytów T w zestawieniu z obserwowanym wpływem w hodowli PBMCs.

Wyniki badania fosforylacji białek szlaku sygnałowego związanego z TCR wskazują na wpływ polisacharydu na aktywację tego szlaku w niestymulowanych limfocytach T oraz jego hamowanie w stymulowanych (niezależnie od rodzaju zastosowanej stymulacji). Może to wskazywać, że Se-Le-30 posiada zdolność wiązania się z kompleksem receptora TCR i kompetycyjnie współzawodniczy o miejsca wiązania dla jego ligandów. Jednak obserwacje te wymagają weryfikacji i dalszego potwierdzenia bardziej precyzyjnymi ilościowymi metodami.

Podsumowując, uzyskane dane wskazują zarówno na bezpośredni wpływ Se-Le-30 na limfocyty T oraz możliwy wpływ na aktywację białek sygnałowych zależnych od CD3. Z drugiej strony zmiany stężenia IL-6 i IL-10 oraz różnice obserwowane między hodowlami izolowanych limfocytów T a PBMCs wskazują na potencjalny pośredni wpływ polisacharydu poprzez populacje monocytów/makrofagów, która następnie może oddziaływać na limfocyty T poprzez m.in. wydzielane przez nie cytokiny.



## Wnioski

1. Przegląd literatury światowej szeroko opisuje immunomodulacyjne właściwości polisacharydów izolowanych z *L. edodes*. Kierunek ich aktywności biologicznej zależy od sposobu izolacji i budowy w/w związków, jednak większość danych wskazuje na ich działanie immunostymulujące.
2. Se-Le-30 nie wpływa na proliferację limfocytów stymulowanych zawiesiną *Staphylococcus aureus* Cowan (SAC), hamuje proliferację limfocytów T stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 i alloantygenami oraz zwiększa ilość podzielonych limfocytów T przy stymulacji przeciwciałem anti-CD3/CD28.
3. Se-Le-30 zmniejsza aktywność cytotoksyczną komórek NK wobec linii docelowej K562.
4. Se-Le-30 nie wpływa na zdolność redukcji cytochromu przez granulocyty krwi obwodowej.
5. Se-Le-30 zmniejsza ekspresję TIM-3 i PD-1 oraz wczesną aktywację limfocytów T stymulowanych przeciwciałem anti-CD3 i zwiększa aktywację oraz ekspresję TIM-3 i PD-1 przy stymulacji podwójnym sygnałem anti-CD3/CD28.
6. Se-Le-30 wpływa na zwiększenie produkcji IL-6, IL-10 oraz TNF- $\alpha$ , co sugeruje wpływ na monocyty lub makrofagi. Ponadto przy stymulacji przeciwciałem anti-CD3 Se-Le-30 zmniejsza stężenie IL-2 i IL-4. Kierunek zmian był jednakowy dla hodowli PBMC i izolowanych limfocytów T, natomiast efekt był silniejszy w hodowlach z PBMCs.
7. W modelu stymulacji przeciwciałem anti-CD3 Se-Le-30 zwiększa odsetek limfocytów T CD8<sup>+</sup> naiwnych i centralnych pamięci, natomiast w modelu stymulacji przeciwciałem anti-CD3/CD28 nasila różnicowanie się komórek efektorowych pamięci, które mają większą zdolność proliferacyjną, co koresponduje z obserwowanym wpływem na proliferację limfocytów T.
8. Obserwacje związane z fosforylacją białek szlaku sygnałowego TCR/CD3 wskazują, że Se-Le-30 prawdopodobnie wykazuje zdolność wiązania się z tym kompleksem receptorowym, regulując w ten sposób aktywację limfocytów T.

## Literatura

1. Finimundy, T.; Dillon, A.; Henriques, J.; Ely, M. Sciences N (2014) A review on general nutritional compounds and pharmacological properties of the Lentinula edodes mushroom. In Proceedings of the Food Nutr Sci; p. 1095.
2. Bisen, P.S.; Baghel, R.K.; Sanodiya, B.S.; Thakur, G.S.; Prasad, G.B. Lentinus edodes: a macrofungus with pharmacological activities. *Curr Med Chem* **2010**, *17*, 2419-2430, doi:10.2174/092986710791698495.
3. Zhang, M.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Tian, Q. Mushroom polysaccharide lentinan for treating different types of cancers: A review of 12 years clinical studies in China. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2019**, *163*, 297-328, doi:10.1016/bs.pmbts.2019.02.013.
4. Kurashige, S.; Akuzawa, Y.; Endo, F. Effects of Lentinus edodes, Grifola frondosa and Pleurotus ostreatus administration on cancer outbreak, and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N-butanolnitrosoamine. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **1997**, *19*, 175-183, doi:10.3109/08923979709007657.
5. Han, D.; Lee, H.T.; Lee, J.B.; Kim, Y.; Lee, S.J.; Yoon, J.W. A Bioprocessed Polysaccharide from Lentinus edodes Mycelia Cultures with Turmeric Protects Chicks from a Lethal Challenge of Salmonella Gallinarum. *J. Food Prot.* **2017**, *80*, 245-250, doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-306.
6. Jeff, I.B.; Fan, E.; Tian, M.; Song, C.; Yan, J.; Zhou, Y. In vivo anticancer and immunomodulating activities of mannogalactoglucan-type polysaccharides from Lentinus edodes (Berkeley) Singer. *Cent Eur J Immunol* **2016**, *41*, 47-53, doi:10.5114/ceji.2015.56962.
7. Zheng, R.; Jie, S.; Hanchuan, D.; Moucheng, W. Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from Lentinus edodes. *Int Immunopharmacol* **2005**, *5*, 811-820, doi:10.1016/j.intimp.2004.11.011.
8. Chen, S.; Liu, C.; Huang, X.; Hu, L.; Huang, Y.; Chen, H.; Fang, Q.; Dong, N.; Li, M.; Tang, W. Comparison of immunomodulatory effects of three polysaccharide fractions from Lentinula edodes water extracts. *J. Funct. Foods* **2020**, *66*, 103791, doi:10.1016/j.jff.2020.103791.
9. Kim, S.P.; Park, S.O.; Lee, S.J.; Nam, S.H.; Friedman, M. A Polysaccharide Isolated from the Liquid Culture of Lentinus edodes (Shiitake) Mushroom Mycelia Containing Black Rice Bran Protects Mice against Salmonellosis through Upregulation of the Th1 Immune Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 2384-2391, doi:10.1021/jf405223q.
10. Liu, Z.; Yu, L.; Gu, P.; Bo, R.; Wusiman, A.; Liu, J.; Hu, Y.; Wang, D. Preparation of lentinan-calcium carbonate microspheres and their application as vaccine adjuvants. *Carbohydr Polym* **2020**, *245*, 116520, doi:10.1016/j.carbpol.2020.116520.
11. Xing, J.; Liu, Z.; Huang, Y.; Qin, T.; Bo, R.; Zheng, S.; Luo, L.; Huang, Y.; Niu, Y.; Wang, D. Lentinan-Modified Carbon Nanotubes as an Antigen Delivery System Modulate Immune Response in Vitro and in Vivo. *ACS Appl Mater Interfaces* **2016**, *8*, 19276-19283, doi:10.1021/acsami.6b04591.
12. Elhousseiny, S.M.; El-Mahdy, T.S.; Elleboudy, N.S.; Farag, M.M.S.; Aboshanab, K.M.; Yassien, M.A. Immunomodulatory activity of extracts from five edible basidiomycetes mushrooms in Wistar albino rats. *Scientific Reports* **2022**, *12*, 12423, doi:10.1038/s41598-022-16349-2.
13. Wang, K.P.; Zhang, Q.L.; Liu, Y.; Wang, J.; Cheng, Y.; Zhang, Y. Structure and inducing tumor cell apoptosis activity of polysaccharides isolated from Lentinus edodes. *J Agric Food Chem* **2013**, *61*, 9849-9858, doi:10.1021/jf403291w.
14. Zhu, F.; Zhang, Q.; Feng, J.; Zhang, X.; Li, T.; Liu, S.; Chen, Y.; Li, X.; Wu, Q.; Xue, Y.; et al. beta-Glucan produced by Lentinus edodes suppresses breast cancer progression via the inhibition of macrophage M2 polarization by integrating autophagy and inflammatory signals. *Immun Inflamm Dis* **2023**, *11*, e876, doi:10.1002/iid3.876.

15. McCormack, E.; Skavland, J.; Mujic, M.; Bruserud, O.; Gjertsen, B.T. Lentinan: hematopoietic, immunological, and efficacy studies in a syngeneic model of acute myeloid leukemia. *Nutr. Cancer*. **2010**, *62*, 574-583, doi:10.1080/01635580903532416.
16. Wang, S.X.; Liu, Q.Y.; Li, Y. Lentinan ameliorates burn sepsis by attenuating CD4(+) CD25(+) Tregs. *Burns* **2016**, *42*, 1513-1521, doi:10.1016/j.burns.2016.04.003.
17. Song, X.; Ren, Z.; Wang, X.; Jia, L.; Zhang, C. Antioxidant, anti-inflammatory and renoprotective effects of acidic-hydrolytic polysaccharides by spent mushroom compost (*Lentinula edodes*) on LPS-induced kidney injury. *Int J Biol Macromol* **2020**, *151*, 1267-1276, doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.173.
18. Pan, W.; Jiang, P.; Zhao, J.; Shi, H.; Zhang, P.; Yang, X.; Biazik, J.; Hu, M.; Hua, H.; Ge, X.; et al. beta-Glucan from *Lentinula edodes* prevents cognitive impairments in high-fat diet-induced obese mice: involvement of colon-brain axis. *J Transl Med* **2021**, *19*, 54, doi:10.1186/s12967-021-02724-6.
19. Zhang, Y.; Cui, Y.; Feng, Y.; Jiao, F.; Jia, L. Lentinus edodes Polysaccharides Alleviate Acute Lung Injury by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation. *Molecules* **2022**, *27*, 7328.
20. Tani, M.; Tanimura, H.; Yamaue, H.; Tsunoda, T.; Iwahashi, M.; Noguchi, K.; Tamai, M.; Hotta, T.; Mizobata, S. Augmentation of lymphokine-activated killer cell activity by lentinan. *Anticancer Res* **1993**, *13*, 1773-1776.
21. Gaullier, J.M.; Sleboda, J.; Ofjord, E.S.; Ulvestad, E.; Nurminiemi, M.; Moe, C.; Tor, A.; Gudmundsen, O. Supplementation with a soluble beta-glucan exported from Shiitake medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) singer mycelium: a crossover, placebo-controlled study in healthy elderly. *Int. J. Med. Mushrooms*. **2011**, *13*, 319-326, doi:10.1615/intjmedmushr.v13.i4.10.
22. Wang, X.E.; Wang, Y.H.; Zhou, Q.; Peng, M.; Zhang, J.; Chen, M.; Ma, L.J.; Xie, G.M. Immunomodulatory Effect of Lentinan on Aberrant T Subsets and Cytokines Profile in Non-small Cell Lung Cancer Patients. *Pathol. Oncol. Res.* **2020**, *26*, 499-505, doi:10.1007/s12253-018-0545-y.
23. Arinaga, S.; Karimine, N.; Takamuku, K.; Nanbara, S.; Inoue, H.; Nagamatsu, M.; Ueo, H.; Akiyoshi, T. Enhanced induction of lymphokine-activated killer activity after lentinan administration in patients with gastric carcinoma. *Int J Immunopharmacol* **1992**, *14*, 535-539, doi:10.1016/0192-0561(92)90114-z.
24. Aoki, T. Lentinan. In: Immune Modulation Agents and Their Mechanisms. Fenichel RL and Chirigos MA (eds.). *Marcel Dekker Inc., New York* **1984**, 63-67.
25. Takeshita, K.; Watanuki, S.; Iida, M.; Saito, N.; Maruyama, M.; Sunagawa, M.; Habu, H.; Endo, M. Effect of lentinan on lymphocyte subsets of peripheral blood, lymph nodes, and tumor tissues in patients with gastric cancer. *Surg Today* **1993**, *23*, 125-129, doi:10.1007/BF00311229.
26. Steimbach, L.; Borgmann, A.V.; Gomar, G.G.; Hoffmann, L.V.; Rutkevicki, R.; de Andrade, D.P.; Smiderle, F.R. Fungal beta-glucans as adjuvants for treating cancer patients - A systematic review of clinical trials. *Clin Nutr* **2021**, *40*, 3104-3113, doi:10.1016/j.clnu.2020.11.029.
27. Goodridge, H.S.; Wolf, A.J.; Underhill, D.M. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev* **2009**, *230*, 38-50, doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x.
28. Willment, J.A.; Marshall, A.S.; Reid, D.M.; Williams, D.L.; Wong, S.Y.; Gordon, S.; Brown, G.D. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol* **2005**, *35*, 1539-1547, doi:10.1002/eji.200425725.
29. Akramiene, D.; Kondrotas, A.; Didziapetriene, J.; Kevelaitis, E. Effects of beta-glucans on the immune system. *Medicina* **2007**, *43*, 597-606, doi:10.3390/medicina43080076.
30. Ross, G.D.; Vetvicka, V.; Yan, J.; Xia, Y.; Vetvickova, J. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacol.* **1999**, *42*, 61-74, doi:10.1016/s0162-3109(99)00013-2.
31. Brown, G.D.; Gordon, S. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell. Microbiol.* **2005**, *7*, 471-479, doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00505.x.

32. Lo, T.C.; Hsu, F.M.; Chang, C.A.; Cheng, J.C. Branched alpha-(1,4) glucans from *Lentinula edodes* (L10) in combination with radiation enhance cytotoxic effect on human lung adenocarcinoma through the Toll-like receptor 4 mediated induction of THP-1 differentiation/activation. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 11997-12005, doi:10.1021/jf202457r.
33. Hoffmann, P.R.; Berry, M.J. The influence of selenium on immune responses. *Mol Nutr Food Res* **2008**, *52*, 1273-1280, doi:10.1002/mnfr.200700330.
34. Zhu, C.; Ling, Q.; Cai, Z.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Hoffmann, P.R.; Zheng, W.; Zhou, T.; Huang, Z. Selenium-Containing Phycocyanin from Se-Enriched *Spirulina platensis* Reduces Inflammation in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis by Inhibiting NF-kappaB Activation. *J Agric Food Chem* **2016**, *64*, 5060-5070, doi:10.1021/acs.jafc.6b01308.
35. Malinowska, E.; Klimaszewska, M.; Straczek, T.; Schneider, K.; Kapusta, C.; Podsadni, P.; Lapienis, G.; Dawidowski, M.; Kleps, J.; Gorska, S.; et al. Selenized polysaccharides - Biosynthesis and structural analysis. *Carbohydr Polym* **2018**, *198*, 407-417, doi:10.1016/j.carbpol.2018.06.057.
36. Cao, J.; Liu, X.; Cheng, Y.; Wang, Y.; Wang, F. Selenium-enriched Polysaccharide: an Effective and Safe Selenium Source of C57 Mice to Improve Growth Performance, Regulate Selenium Deposition, and Promote Antioxidant Capacity. *Biol Trace Elem Res* **2022**, *200*, 2247-2258, doi:10.1007/s12011-021-02832-w.
37. Zhang, Z.; Zhang, Y.; Liu, H.; Wang, J.; Wang, D.; Deng, Z.; Li, T.; He, Y.; Yang, Y.; Zhong, S. A water-soluble selenium-enriched polysaccharide produced by *Pleurotus ostreatus*: Purification, characterization, antioxidant and antitumor activities in vitro. *Int J Biol Macromol* **2021**, *168*, 356-370, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.070.
38. Sun, H.; Zhu, Z.; Tang, Y.; Ren, Y.; Song, Q.; Tang, Y.; Zhang, Y. Structural characterization and antitumor activity of a novel Se-polysaccharide from selenium-enriched *Cordyceps gunnii*. *Food Funct* **2018**, *9*, 2744-2754, doi:10.1039/c8fo00027a.
39. van den Broek, T.; Borghans, J.A.M.; van Wijk, F. The full spectrum of human naive T cells. *Nat Rev Immunol* **2018**, *18*, 363-373, doi:10.1038/s41577-018-0001-y.
40. Jr, J.C.; Travers P; M, W.; al., e. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. **2001**.
41. Liu, Q.; Sun, Z.; Chen, L. Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein Cell* **2020**, *11*, 549-564, doi:10.1007/s13238-020-00707-9.
42. Mousset, C.M.; Hobo, W.; Woestenenk, R.; Preijers, F.; Dolstra, H.; van der Waart, A.B. Comprehensive Phenotyping of T Cells Using Flow Cytometry. *Cytometry A* **2019**, *95*, 647-654, doi:10.1002/cyto.a.23724.
43. Kaech, S.M.; Wherry, E.J.; Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* **2002**, *2*, 251-262, doi:10.1038/nri778.
44. Salmaninejad, A.; Valilou, S.F.; Shabgah, A.G.; Aslani, S.; Alimardani, M.; Pasdar, A.; Sahebkar, A. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *Journal of Cellular Physiology* **2019**, *234*, 16824-16837, doi:10.1002/jcp.28358.
45. Ghiotto, M.; Gauthier, L.; Serriari, N.; Pastor, S.; Truneh, A.; Nunes, J.A.; Olive, D. PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int Immunol* **2010**, *22*, 651-660, doi:10.1093/intimm/dxq049.
46. Pawłowska, A.; Suszczyk, D.; Okła, K.; Barczyński, B.; Kotarski, J.; Wertel, I. Immunotherapies based on PD-1/PD-L1 pathway inhibitors in ovarian cancer treatment. *Clinical and Experimental Immunology* **2019**, *195*, 334-344, doi:10.1111/cei.13255.
47. Alsaab, H.O.; Sau, S.; Alzhrani, R.; Tatiparti, K.; Bhise, K.; Kashaw, S.K.; Iyer, A.K. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol* **2017**, *8*, 561, doi:10.3389/fphar.2017.00561.
48. Simon, S.; Labarriere, N. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncoimmunology* **2017**, *7*, e1364828, doi:10.1080/2162402X.2017.1364828.

49. Wolf, Y.; Anderson, A.C.; Kuchroo, V.K. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nat Rev Immunol* **2020**, *20*, 173-185, doi:10.1038/s41577-019-0224-6.
50. Wang, H.; Kadlecsek, T.A.; Au-Yeung, B.B.; Goodfellow, H.E.; Hsu, L.Y.; Freedman, T.S.; Weiss, A. ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, *2*, a002279, doi:10.1101/cshperspect.a002279.
51. Paz, P.E.; Wang, S.; Clarke, H.; Lu, X.; Stokoe, D.; Abo, A. Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem J* **2001**, *356*, 461-471, doi:10.1042/0264-6021:3560461.
52. Chow, L.M.; Fournel, M.; Davidson, D.; Veillette, A. Negative regulation of T-cell receptor signalling by tyrosine protein kinase p50csk. *Nature* **1993**, *365*, 156-160, doi:10.1038/365156a0.
53. Di Bartolo, V.; Montagne, B.; Salek, M.; Jungwirth, B.; Carrette, F.; Fournane, J.; Sol-Foulon, N.; Michel, F.; Schwartz, O.; Lehmann, W.D.; et al. A novel pathway down-modulating T cell activation involves HPK-1-dependent recruitment of 14-3-3 proteins on SLP-76. *J Exp Med* **2007**, *204*, 681-691, doi:10.1084/jem.20062066.
54. Kaleta, B.; Gorski, A.; Zagozdzon, R.; Cieslak, M.; Kazmierczak-Baranska, J.; Nawrot, B.; Klimaszewska, M.; Malinowska, E.; Gorska, S.; Turlo, J. Selenium-containing polysaccharides from *Lentinula edodes*-Biological activity. *Carbohydr Polym* **2019**, *223*, 115078, doi:10.1016/j.carbpol.2019.115078.
55. Klimaszewska, M.; Gorska, S.; Lapienis, G.; Kaleta, B.; Gorska, S.; Kaszowska, M.; Dawidowski, M.; Gamian, A.; Zagozdzon, R.; Gorski, A.; et al. Identification of the Primary Structure of Selenium-Containing Polysaccharides Selectively Inhibiting T-Cell Proliferation. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26175404.
56. Gorska-Jakubowska, S.; Klimaszewska, M.; Podsadni, P.; Kaleta, B.; Zagozdzon, R.; Gorska, S.; Gamian, A.; Straczek, T.; Kapusta, C.; Cieslak, M.; et al. Selenium-Containing Exopolysaccharides Isolated from the Culture Medium of *Lentinula edodes*: Structure and Biological Activity. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms222313039.
57. Turlo, J.; Gutkowska, B.; Herold, F. Effect of selenium enrichment on antioxidant activities and chemical composition of *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. mycelial extracts. *Food Chem Toxicol* **2010**, *48*, 1085-1091, doi:10.1016/j.fct.2010.01.030.
58. Malinowska, E.; Klimaszewska, M.; Strączek, T.; Schneider, K.; Kapusta, C.; Podsadni, P.; Łapienis, G.; Dawidowski, M.; Kleps, J.; Górska, S.; et al. Selenized polysaccharides – Biosynthesis and structural analysis. *Carbohydrate Polymers* **2018**, *198*, 407-417, doi:10.1016/j.carbpol.2018.06.057.
59. Kaleta, B.; Roszczyk, A.; Zych, M.; Kniotek, M.; Zagozdzon, R.; Klimaszewska, M.; Malinowska, E.; Pac, M.; Turlo, J. Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human Immune Cells. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1777, doi:10.3390/biom11121777.
60. Roszczyk, A.; Zych, M.; Zielniok, K.; Krata, N.; Turło, J.; Klimaszewska, M.; Zagozdzon, R.; Kaleta, B. The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1900.

## **Opinie komisji bioetycznej**



## Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303  
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61  
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl  
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

**KB/174./2017**

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym  
w dniu 10 października 2017 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

**Dr hab.n.med.Radosław Zagożdżon,**  
Zakład Immunologii Klinicznej,  
ul.Nowogrodzka 59,  
02-006 Warszawa

**dotyczącym:** wyrażenia opinii w sprawie badania pt „, Ocena wpływu polisacharydów pochodzenia rybowego na aktywność komórek układu odpornościowego.”

wyraża następującą  
opinię

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi\*.
- stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.\*

**Uwagi Komisji – verte**

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.

Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .

W załączeniu: skład komisji oraz lista obecności

Przewodniczący Komisji Bioetycznej

Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Wierzbicki

\*niepotrzebne skreślić



## Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303  
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61  
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl  
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

Warszawa, dnia 08 listopada 2021r.

AKBE/136 / 2021

Dr hab. n. med. i n. o zdr. Beata Kaleta  
Zakład Immunologii Klinicznej  
ul. Nowogrodzka 59  
02-006 Warszawa

### OŚWIADCZENIE

Niniejszym oświadczam, że Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w dniu 08 listopada 2021 r. przyjęła do wiadomości informację na temat badania pt „Ocena wpływu polisacharydów pochodzenia grzybowego na aktywność komórek układu odpornościowego.” Wyżej wymienione badanie jest zgodne z zasadami etyki badań naukowych.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej

Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma –Kozakiewicz



## **Oświadczenia współautorów publikacji**

Warszawa, dnia 26.06.2023

Mgr Aleksander Roszczyk

#### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells**. Kaleta B, Roszczyk A, Zych M, Kniotek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Malinowska E, Pac M, Turło J. *Biomolecules*. 2021;11(12) oświadczam, że mój udział polegał na przeprowadzeniu analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na proliferację limfocytów i produkcję cytokin, na produkcję wolnych rodników tlenowych przez granulocyty, opracowaniu wyników badań i ich analizie statystycznej oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 50%.

.....*A. Roszczyk*.....

Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 26.06.2023

Mgr Aleksander Roszczyk

#### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis**. Roszczyk A, Zych M, Zielniok K, Krata N, Turło J, Klimaszewska M, Zagożdżon R, Kaleta B., *Biomolecules*. 2022;12(12):1900 oświadczam, że mój udział polegał na przeprowadzeniu analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na aktywację, proliferację i produkcję cytokin przez limfocyty T, opracowaniu wyników badań i ich analizie statystycznej oraz przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 50%.

A. Roszczyk

Podpis współautora publikacji

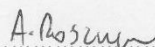
Warszawa, dnia 26.06.2023

Mgr Aleksander Roszczyk

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *Lentinula edodes***. Roszczyk A, Turło J, Zagożdżon R, Kaleta B., Int J Mol Sci. 2022;23(16):8980 oświadczam, że mój udział polegał na przeglądzie literatury, zaplanowaniu układu pracy i przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu, przygotowaniu poprawek edytorskich i językowych oraz akceptacji ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 50%.



Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 21.06.2023

Prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *Lentinula edodes***. Roszczyk A, Turło J, Żagożdżon R, Kaleta B., Int J Mol Sci. 2022;23(16):8980 oświadczam, że mój udział polegał na przeglądzie literatury, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz akceptacji ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przegląd literatury, zaplanowanie układu pracy i przygotowanie wstępnej wersji manuskryptu, przygotowanie poprawek edytorskich i językowych oraz akceptację ostatecznej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 21.06.2023

Prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis**. Roszczyk A, Zych M, Zielniok K, Krata N, Turło J, Klimaszewska M, Zagożdżon R, Kaleta B., *Biomolecules*. 2022;12(12):1900 oświadczam, że mój udział polegał na pozyskaniu finansowania badań, nadzorze merytorycznym i pomocy w przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu i jego krytycznej rewizji.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na aktywację, proliferację i produkcję cytokin przez limfocyty T, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 24.06.2022

Prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło


### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human Immune Cells**. Kaleta B, Roszczyk A, Zych M, Kniotek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Małinowska E, Pac M, Turło J. *Biomolecules*. 2021;11(12) oświadczam, że mój udział polegał na pozyskaniu finansowania badań, nadzorze merytorycznym i pomocy w przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu i jego krytycznej rewizji.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na proliferację limfocytów i produkcję cytokin, na produkcję wolnych rodników tlenowych przez granulocyty, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 14.06.2023 r.

Dr n. med. Natalia Krata

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis**. Roszczyk A, Zych M, Zielniok K, Krata N, Turlo J, Klimaszewska M, Zagożdżon R, Kaleta B., *Biomolecules*. 2022;12(12):1900 oświadczam, że mój udział polegał na pomocy w wykonaniu analiz cytometrycznych i krytycznej rewizji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określiam jako 5%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określiam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na aktywację, proliferację i produkcję cytokin przez limfocyty T, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



.....  
Podpis współautora publikacji



Warszawa, dnia 14.06.2023 r.

Dr n. med. Katarzyna Zielniok

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis**. Roszczyk A, Zych M, Zielniok K, Krata N, Turło J, Klimaszewska M, Zagożdżon R, Kaleta B., *Biomolecules*. 2022;12(12):1900 oświadczam, że mój udział polegał na wykonaniu oznaczenia stężenia cytokin oraz krytycznej rewizji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na aktywację, proliferację i produkcję cytokin przez limfocyty T, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.

  
.....

Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 14.06.2023 r.

Dr hab. n. med. Beata Kaleta

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis**. Roszczyk A, Zych M, Zielniok K, Krata N, Turło J, Klimaszewska M, Zagożdżon R, Kaleta B., *Biomolecules*. 2022;12(12):1900 oświadczam, że mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, uzyskaniu zgody komisji bioetycznej, nadzorze merytorycznym, pomocy w przygotowaniu manuskryptu i jego krytycznej rewizji.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 13%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na aktywację, proliferację i produkcję cytokin przez limfocyty T, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 14.06.2023 r.

Dr hab. n. med. Beata Kaleta

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells**. Kaleta B, Roszczyk A, Zych M, Kniotek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Malinowska E, Pac M, Turło J. *Biomolecules*. 2021;11(12) oświadczam, że mój udział polegał na opracowaniu koncepcji badań, uzyskaniu zgody komisji bioetycznej, nadzorze merytorycznym, pomocy w przygotowaniu manuskryptu i jego krytycznej rewizji.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 15%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na proliferację limfocytów i produkcję cytokin, na produkcję wolnych rodników tlenowych przez granulocyty, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 14.06.2023 r.

Dr hab. n. med. Beata Kaleta

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *Lentinula edodes***. Roszczyk A, Turło J, Zagożdżon R, Kaleta B., *Int J Mol Sci.* 2022;23(16):8980 oświadczam, że mój udział polegał na przeglądzie literatury, zaplanowaniu układu pracy i przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu, przygotowaniu poprawek edytorskich i językowych oraz akceptacji ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przegląd literatury, zaplanowanie układu pracy i przygotowanie wstępnej wersji manuskryptu, przygotowanie poprawek edytorskich i językowych oraz akceptację ostatecznej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 14.06.2023 r.

Dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells**. Kaleta B, Roszczyk A, Zych M, Kniotek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Malinowska E, Pac M, Turło J. *Biomolecules*. 2021;11(12) oświadczam, że mój udział polegał na pozyskaniu finansowania badań, nadzorze merytorycznym i pomocy w przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu i jego krytycznej rewizji.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na proliferację limfocytów i produkcję cytokin, na produkcję wolnych rodników tlenowych przez granulocyty, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



.....  
Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 14.06.2023 r.

Dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Immunomodulatory Properties of Polysaccharides from *Lentinula edodes***. Roszczyk A, Turło J, Zagożdżon R, Kaleta B., Int J Mol Sci. 2022;23(16):8980 oświadczam, że mój udział polegał na przeglądzie literatury, przygotowaniu wstępnej wersji manuskryptu oraz akceptacji ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określiam jako 10%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określiam jako 50% i obejmował on m. in.: przegląd literatury, zaplanowanie układu pracy i przygotowanie wstępnej wersji manuskryptu, przygotowanie poprawek edytorskich i językowych oraz akceptację ostatecznej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 14.06.2023 r.

Dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis**. Roszczyk A, Zych M, Zielniok K, Krata N, Turło J, Klimaszewska M, Zagożdżon R, Kaleta B., *Biomolecules*. 2022;12(12):1900 oświadczam, że mój udział polegał na pozyskaniu finansowania badań, nadzorze merytorycznym i krytycznej rewizji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na aktywację, proliferację i produkcję cytokin przez limfocyty T, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



.....  
Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 14.06.2023 r.

Dr n. med. Monika Kniotek

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells**. Kaleta B, Roszczyk A, Zych M, Kniotek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Malinowska E, Pac M, Turło J. *Biomolecules*. 2021;11(12) oświadczam, że mój udział polegał na wykonaniu analiz dotyczących wpływu selenopolisacharydu na aktywację komórek NK i pomocy w przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na proliferację limfocytów i produkcję cytokin, na produkcję wolnych rodników tlenowych przez granulocyty, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



.....  
Podpis współautora publikacji



Warszawa, dnia 24.06.23

Dr n. med. Michał Zych

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis**. Roszczyk A, Zych M, Zielniok K, Krata N, Turło J, Klimaszewska M, Zagożdżon R, Kaleta B., *Biomolecules*. 2022;12(12):1900 oświadczam, że mój udział polegał na pomocy w wykonaniu analiz stężeń cytokin i krytycznej rewizji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 7%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na aktywację, proliferację i produkcję cytokin przez limfocyty T, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



.....  
Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 24.06.23

Dr n. med. Michał Zych

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells**. Kaleta B, Roszczyk A, Zych M, Kniotek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Malinowska E, Pac M, Turło J. *Biomolecules*. 2021;11(12) oświadczam, że mój udział polegał na pomocy w wykonaniu analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na proliferację limfocytów i produkcję cytokin oraz pomocy w przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na proliferację limfocytów i produkcję cytokin, na produkcję wolnych rodników tlenowych przez granulocyty, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



.....  
Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 26.06.23

Dr n. farm. Marzenna Joanna Klimaszewska

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells**. Kaleta B, Roszczyk A, Zych M, Kniotek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Malinowska E, Pac M, Turło J. *Biomolecules*. 2021;11(12) oświadczam, że mój udział polegał na biosyntezie i ocenie struktury selenopolisacharydu i pomocy w przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na proliferację limfocytów i produkcję cytokin, na produkcję wolnych rodników tlenowych przez granulocyty, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.

*Marzenna Klimaszewska*

Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 26.06.23

Dr n. farm. Marzenna Joanna Klimaszewska

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **The Effect of Novel Selenopolysaccharide Isolated from *Lentinula edodes* Mycelium on Human T Lymphocytes Activation, Proliferation, and Cytokines Synthesis**. Roszczyk A, Zych M, Zielniok K, Krata N, Turło J, Klimaszewska M, Zagożdżon R, Kaleta B., *Biomolecules*. 2022;12(12):1900 oświadczam, że mój udział polegał na przygotowaniu selenopolisacharydu do badań oraz krytycznej rewizji manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na aktywację, proliferację i produkcję cytokin przez limfocyty T, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.

*Marzenna Klimaszewska*

Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 14.06.2023 r.

Dr n. farm. Eliza Malinowska

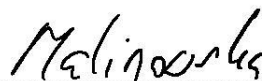
### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells**. Kaleta B, Roszczyk A, Zych M, Kniotek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Malinowska E, Pac M, Turło J. *Biomolecules*. 2021;11(12) oświadczam, że mój udział polegał na biosyntezie i ocenie struktury selenopolisacharydu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5%.

Wkład mgr. Aleksandra Roszczyka w powstanie publikacji określam jako 50% i obejmował on m. in.: przeprowadzenie analiz dotyczących oceny wpływu selenopolisacharydu na proliferację limfocytów i produkcję cytokin, na produkcję wolnych rodników tlenowych przez granulocyty, opracowanie wyników badań i ich analizę statystyczną oraz przygotowanie manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr. Aleksandra Roszczyka.



.....  
Podpis współautora publikacji

Warszawa, dnia 27.06.2023

Lek. Michał Pac

#### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Selective Biological Effects of Selenium-Enriched Polysaccharide (Se-Le-30) Isolated from Lentinula edodes Mycelium on Human Immune Cells**. Kaleta B, Roszczyk A, Zych M, Kniolek M, Zagożdżon R, Klimaszewska M, Malinowska E, Pac M, Turlo J. *Biomolecules*. 2021;11(12) oświadczam, że mój udział polegał na pomocy w analizie statystycznej wyników badań i pomocy w przygotowaniu pierwotnej wersji manuskryptu.

Michał Pac