© Український журнал клінічної та лабораторної медицини, 2013
УДК 612.017.582.284

Реакція лімфоїдних органів мишей на введення екстракту міцелію гриба *Leucoagaricus macrorhizus* у нормі і при пухлинному рості

В.В.Позур, М.П.Рудик, О.М.Макаренко,
М.М.Сухомлин, В.М.Святецька, Р.С.Довгий

ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка,
кафедра мікробіології та загальної імунології
Київ, Україна

У інтактних мишей та мишей з карциномою Ерліха досліджували вплив екстракту міцелію гриба Leucoagaricus macrorhizus на вагові індекси лімфоїдних органів та вміст у них мононуклеарних лейкоцитів. У здорових мишей при введенні гриба Leucoagaricus macrorhizus спостерігалося зниження відносної клітинності лімфовузлів та підвищення відносної маси селезінок. У мишей-пухлиноносіїв введення Leucoagaricus macrorhizus результувалось достовірним підвищенням показників відносної маси та клітинності лімфовузлів, відносної клітинності селезінок та зниженням показників відносної клітинності тимусів.

Ключові слова: Leucoagaricus macrorhizus, екстракт міцелію, лімфоїдні органи, відносна маса, відносна клітинність.

ВСТУП

Серед джерел нових ефективних та безпечних протипухлинних природних речовин усе частіше в останні роки постають базидієві гриби. Можливість використання грибів для терапії ракових захворювань запропонована в основному дослідниками зі східних країн, оскільки тут здавна відомо про нетрадиційні види лікування з використанням рідкісних рослин та лікарських грибів. Лікарські властивості базидієвих грибів та можливість їх практичного застосування в медицині активно вивчають дослідники з багатьох країн, насамперед Китаю, Японії, Кореї та Америки. Адже саме базидіоміцети містять деякі фракції водорозчинних полісахаридів та метаболіти, що мають антипроліферативні, цитотоксичні властивості та стимулюють імунну систему [5]. Найбільш вивченими видами базидіоміцетів, які містять біологічні речовини, що здатні стимулювати імунну систему та пригнічувати розвиток новоутворень, є *Ganoderma lucidum* (рейші), *Lentinus edodes* (шиїтаке), *Grifola frondosa* (мейтаке), *Hericium erinaceus* та *Agaricus blazei* (хімемацутаке) [7, 9-13]. Деякі з них вже використовуються для створення таких препаратів, як Lentinan, MEL (Meloxicam), Ganopoly, «Кордицепс и Линчжи» (McAster) та ін. [3, 4, 6]. *Leucoagaricus macrorhizus* — вид, занесений до Червоної Книги України, нещодавно введений в культуру. Відомості щодо його впливу на імунну систему в літературі відсутні.

Метою дослідження було оцінити реакції лімфоїдних органів мишей на введення екстракту міцелію гриба *Leucoagaricus macrorhizus* в нормі та при пухлинному рості.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження проведені на мишах лінії Balb/c. Миші були віком від 2 до 3 місяців, середньої ваги 18-20 г розведення віварію ННЦ «Інституту біології» КНУ ім. Т.Шевченка. Тварин утримували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до води та корму. Усі дослідження на тваринах здійснювали згідно з нормами, встановленими законом України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» і «Європейської конвенції із

захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей» від 20.09.1985 р. [2]. Для експериментів використовували водні екстракти міцелію штаму ТТ-1 *Leucoagaricus macrorhizus* з колекції чистих культур базидіоміцетів кафедри ботаніки ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету ім. Т.Шевченка. Культури грибів отримували тканинним методом шляхом перенесення фрагментів плодових тіл на поверхню агаризованого картопляно-глюкозного середовища в чашках Петрі. Міцелій грибів та культуральну рідину отримували в пласкодонних скляних колбах на 100 мл на рідкому картопляно-глюкозному середовищі. Для отримання екстракту міцелію гриба *L.macrorhizus* плодове тіло гриба розтирали в ступі для отримання гомогенної субстанції. Фільтрували суміш через марлевий фільтр. Імунізували тварин підшкірно, в область крижового відділу, по 0,2 мл досліджуваних речовин 6 разів через добу. Штам карциноми Ерліха був отриманий з Банку клітинних ліній та штамів ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України. Карциному Ерліха перещеплювали тваринам внутрішньом'язово у стегновий м'яз в концентрації 600-700 тис. клітин на одну тварину. Тривалість дослідження — 4 тижні після першої імунізації. Піддослідні лінійні миші були розподілені на чотири групи по 8 тварин у кожній: 1 група — інтактні тварини, які слугували контролем; 2 гупа — тварини-пухлиноносії, які слугували контролем; 3 група — тварини, яким вводили препарат *L.macrorhizus*; 4 група — тварини-пухлиноносії, яким вводили препарат *L.macrorhizus*. Реакцію органів імунної системи мишей — реґіонарних (по відношенню до місця введення досліджуваних речовин) пахових лімфовузлів, селезінок та тимусів — оцінювали за відносною масою ($P_{відн.}$) органа (ваговим індексом), що розраховували за формулою: $P_{відн.}$=Ро/Рз*100%, де *Ро* — маса органа, *Рз* — загальна маса тварини, а також за відносною клітинністю органа — відношенням абсолютної клітинності органа до його маси [8]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики з розрахунком середнього значення (М), середнього квадратичного відхилення (σ) та середньої квадратичної похибки (m). Для визначення вірогідності відмінності показників між дослідом та контролем використовували t-критерій Стьюдента [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відносна маса лімфовузлів інтактних мишей, яким вводили екстракт міцелію *L.macrorhizus*, достовірно не відрізнялася від інтактного контролю. Відносна клітинність при застосуванні *L.macrorhizus* знижувалася приблизно вдвічі в порівнянні з інтактним контролем (табл. 1).

Таким чином, введення екстракту міцелію *L.macrorhizus* інтактним мишам лінії Balb/c призводило до зменшення відносної клітинності лімфовузлів, що може свідчити про пригнічення первинної імунної відповіді.

Імунізація тварин-пухлиноносіїв екстрактом гриба *L.macrorhizus* не призводила до

ТАБЛИЦЯ 1

Реакція лімфоїдних органів мишей на введення екстракту міцелію *Leucoagaricus macrorhizus* у нормі і з карциномою Ерліха

Групи тварин	Лімфовузли		Селезінки		Тимуси	
	Ваговий індекс x10^{-2}	Відносна клітинність x10^{8}	Ваговий індекс x10^{-2}	Відносна клітинність x10^{8}	Ваговий індекс x10^{-2}	Відносна клітинність x10^{8}
Інтактні тварини						
Контрольні тварини	0,05±0,01	10,9±1,1	0,4±0,02	2,7±1,7	0,1±0,01	36,4±3,9
Тварини, яким вводили екстракт міцелію *L.macrorhizus*	0,06±0,01	5,9±1,8*	0,7±0,1*	2,8±0,4	0,2±0,04	30,3±5
Тварини з перещепленою пухлиною						
Контрольні тварини	0,07±0,007*	3,2±0,3*	1,2±0,2*	1,2±0,3	0,1±0,03	45,6±4,4*
Тварини, яким вводили екстракт міцелію *L.macrorhizus*	0,06±0,03	5±1,5*,**	1,6±0,3*	3,7±0,5**	0,1±0,01	26,1±5,4*,**

Примітки: ** — p<0,05 достовірно в порівнянні з контрольними здоровими тваринами, ** — p<0,05 достовірно в порівнянні з контрольними тваринами-пухлиноносіями.*

достовірних змін відносної маси лімфовузлів у порівнянні з інтактним контролем та контролем пухлини. Відносна клітинність при застосуванні *L.macrorhizus* знижувалася приблизно вдвічі в порівнянні з інтактним контролем та підвищувалася приблизно в 1,5 разу в порівнянні з контролем пухлини. Тобто у випадку мишей з пухлиною, навпаки, спостерігалася стимуляція первинної імунної відповіді.

Введення екстракту міцелію *L.macrorhizus* інтактним мишам призводило до підвищення відносної маси селезінок в 1,8 разу в порівнянні з інтактним контролем, у той час як відносна клітинність селезінки у тварин цієї групи достовірно не змінювалася в порівнянні з інтактним контролем.

Імунізація тварин-пухлиноносіїв екстрактом гриба *L.macrorhizus* не призводила до достовірних змін відносної маси селезінок у порівнянні з контролем тварин-пухлиноносіїв, але призводила до підвищення її більш ніж в 4 рази в порівнянні з інтактними контрольними тваринами. Відносна клітинність при застосуванні екстракту міцелію була вищою в 3,1 разу в порівнянні з контрольними тваринами-пухлиноносіями, але достовірно не відрізнялася в порівнянні з інтактним контролем.

Введення екстракту міцелію *L.macrorhizus* не призводило до достовірних змін відносної маси та клітинності тимусів у порівнянні з інтактним контролем. Відносна маса тимусів тварин досліджуваної групи з пухлиною Ерліха достовірно не змінювалася в порівнянні з інтактними тваринами та контрольними тваринами-пухлиноносіями. Відносна клітинність тимусів тварин з пухлиною, котрим вводили екстракт міцелію гриба *L.macrorhizus*, знижувалася приблизно вдвічі в порівнянні з контрольними тваринами-пухлиноносіями та була достовірно нижчою, ніж відносна клітинність інтактних контрольних тварин.

ВИСНОВКИ

Таким чином, при дії екстракту міцелію гриба *L.macrorhizus* на мишей з пухлиною спостерігалася тенденція до підвищення показників відносної клітинності лімфовузлів та селезінок та зниження відповідних показників тимусів. Це може свідчити про переважаючу активацію гуморальної ланки імунітету.

ЛІТЕРАТУРА

1. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных / О.Ю.Реброва. — М.: МедиаСфера, 2002. — 312 с.
2. Резников О. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах / О.Резников // Вісник НАН України. — 2001. — №1. — С. 5-7.
3. Edfawy M. Meloxicam modulates oxidative stress status, inhibits prostaglandin E2, and abrogates apoptosis in carbon tetrachloride-induced rat hepatic injury / M.Edfawy, M.H.Hassan, A.Mansour [et al.]// Int. J. Toxicol. — 2012. — Vol. 31 (3). — P. 276-286.
4. Gao Y. Antitumor activity and underlying mechanisms of ganopoly, the refined polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum*, in mice / Y.Gao, H.Gao, E.Chan [et al.] // Immunol. Invest. — 2005. — Vol. 34 (2). — P. 171-198.
5. Gao Y. Effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on the immune functions of patients with advanced lung cancer / Y.Gao, W.Tang, X.Dai [et al.] // J. Med. Food — 2005. — №8. — P. 68-159.
6. Higashi D. The effect of lentinan combination therapy for unresectable advanced gastric cancer / D.Higashi, K.Seki, Y.Ishibashi [et al.] // Anticancer Res. — 2012. — Vol. 32 (6). — P. 2365-2368.
7. Kim S.P. Composition and mechanism of antitumor effects of *Hericium erinaceus* mushroom extracts in tumor-bearing mice / S.P.Kim, M.Y.Kang, J.H.Kim [et al.] // J. Agric. Food. Chem. — 2011. — Vol. 59 (18). — P. 9861-9869.
8. Kozlowska E. Sensitivity of mouse lymphoid and nonlymphoid organs to Silesian air pollutants / E.Kozlowska, J.Kopec-Szlezak, N.Drela [et al.] // Ecotoxicol. Environ. Saf. — 1997. — Vol. 37, №1. — P. 10-16.
9. Lakhanpal T.N. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms / T.N.Lakhanpal, Rana Monika // Plant. Genet. Resour.: Charact. and Util. — 2005. — №2. — P. 288-303.
10. Masuda Y. A polysaccharide extracted from *Grifola frondosa* enhances the anti-tumor activity of bone marrow-derived dendritic cell-based immunotherapy against murine colon cancer / Y.Masuda, K.Ito, M.Konishi [et al.] // Cancer Immunol. Immunother. — 2010. — Vol. 59 (10). — P.1531-1541.
11. Wang P.Y. Antitumor and Immunomodulatory Effects of Polysaccharides from Broken-Spore of *Ganoderma lucidum* / P.Y.Wang, X.L.Zhu, Z.B.Lin // Front. Pharmacol. — 2012. — Vol. 3. — P. 135.
12. Wu B. A polysaccharide from *Agaricus blazei* inhibits proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells / B.Wu, J.Cui, C.Zhang [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. — 2012. — Vol. 50 (4). — P. 1116-1120.
13. Yukawa H. Direct cytotoxicity of *Lentinula edodes* mycelia extract on human hepatocellular carcinoma cell line / H.Yukawa, S.Ishikawa, T.Kawanishi [et al.] // Biol. Pharm. Bull. — 2012. — Vol. 35 (7). — P. 1014-1021.

В.В.Позур, М.П.Рудык, А.Н.Макаренко, М.Н.Сухомлин, В.Н.Святецкая, Р.С.Довгий. Реакция лимфоидных органов мышей на введение экстракта мицелия гриба Leucoagaricus macrorhizus в норме и при опухолевом росте. Киев, Украина.

Ключевые слова: *Leucoagaricus macrorhizus, экстракт мицелия, лимфоидные органы, относительная масса, относительная клеточность.*

У интактных мышей и мышей с карциномой Эрлиха исследовали влияние экстракта мицелия гриба Leucoagaricus macrorhizus на весовые индексы лимфоидных органов и содержание в них мононуклеарных лейкоцитов. У здоровых мышей при введении гриба Leucoagaricus macrorhizus наблюдалось снижение относительной клеточности лимфоузлов и повышение относительной массы селезенок. У мышей-опухоленосителей введение Leucoagaricus macrorhizus результировалось достоверным увеличением показателей относительной массы и клеточности лимфоузлов, относительной клеточности селезенок и снижением показателей относительной клеточности тимусов.

V.V.Pozur, M.P.Rudyk, O.M.Makarenko, M.M.Suhomlin, V.M.Svyatetska, R.S.Dovgiy. The reaction of lymphoid organs of mice on extract of mushroom Leucoagaricus macrorhizus mycelium in norm and under the tumor growth. Kyiv, Ukraine.

Key words: *Leucoagaricus macrorhizus, mycelium extract, lymphoid organs, relative weight, relative cellularity.*

The effects of mushroom extract of Leucoagaricus macrorhizus mycelium on the weight indexes and the cellularity of lymphoid organs in normal mice and mice with Ehrlich carcinoma were investigated. In intact mice application of mycelium extract caused decrease of relative cellularity of lymph nodes and increase of spleen relative weight. In tumor bearing mice injection of Leucoagaricus macrorhizus resulted in increase of the relative weight and cellularity of lymph nodes, spleen cellularity, and in decrease of the relative cellularity of thymus.

Надійшла до редакції 23.12.2012 р.