

ІМУНОЛОГІЯ ТА АЛЕРГОЛОГІЯ

УДК 615.322:612.017.11:[612.017.1:616-008

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2015

І.В. Ніженковська, В.Т. Підченко*, Н.Г. Бичкова*,
Н.А. Бісько**, А.Є. Родніченко***, Н.О. Козіко**

ВПЛИВ ГРИБА *GANODERMA LUCIDUM* (CURT.:FR.) P. KARST. НА НЕСПЕЦИФІЧНУ ІМУННУ ВІДПОВІДЬ У МИШЕЙ ЛІНІЇ СВА/Са З ВТОРИННИМ ІМУНОДЕФІЦИТОМ

*Національний медичний університет імені О.О.Богомольця,

**Інститут ботаніки ім. Н.Г.Холодного НАН України,

***ДУ «Інститут геронтології імені Д.Ф. Чеботарьова НАМН України»

Вступ. *Ganoderma lucidum* (трутовик лакований) – один з найвідоміших базидіальних грибів, який здавна використовується в Східній медицині для лікування та профілактики багатьох захворювань. Не вивченим залишається вплив біомаси гриба *Ganoderma lucidum*, вирощеної методом глибинного культивування на різні ланки імунітету при імунодефіцитних станах.

Мета. Визначення впливу порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum* на неспецифічну імунну відповідь у мишей в умовах модельованого вторинного імунодефіциту *in vivo*.

Матеріали і методи. Біомаса гриба *Ganoderma lucidum* була вирощена методом глибинного культивування. Дослідження проводили на статевозрілих (віком 3-5 міс) мишах-самцях лінії СВА/Са. Для моделювання імунодефіциту використовували імуносупресант циклофосфамід, який вводили одноразово дозою 150 мг/кг, внутрішньочеревно, в перший день експерименту. Досліджували показники фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів.

Результати. Встановлено, що введення порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum* протягом 10 днів мишам лінії СВА/Са з індукованою імунною недостатністю викликає достовірне збільшення фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу перитонеальних макрофагів на рівні референтного препарату, а також достовірне збільшення кількості перитонеальних макрофагів, при цьому збільшення цього показника було достовірно більшим порівняно з даними в групі мишей, які отримували референтний препарат.

Ключові слова: гриб *Ganoderma lucidum*, лінія СВА/Са, неспецифічна імунна відповідь, вторинний імунодефіцит.

Вступ. Більшість традиційних знань про лікувальні властивості грибів походить з таких країн, як Китай, Японія, Корея та ін., де здавна вирощуються, культивуються та використовуються такі базидіальні гриби, як *Ganoderma lucidum* (трутовик лакований), *Lentinus edodes* (шиїтаке), *Coriolus versicolor* (трутовик різнокольоровий) та ін. *Ganoderma lucidum* (трутовик лакований) – один з найвідоміших базидіальних грибів, який здавна використовується в медицині країн Сходу для запобігання та лікування хронічного гепатиту, бронхіту, атеросклерозу, гіпертензії, онкологічних захворювань [6,13].

У виконанні захисту організму від інфекції та інших чужеродних агентів важливу функцію виконують фактори неспецифічного захисту, які формуються в організмі до проникнення чужорідного агенту. Основною групою клітин, які забезпечують реакції природного імунітету, є фагоцитуючі лейкоцити (макрофаги), які забезпечують фагоцитоз – процес поглинання та перетравлення мікроорганізмів. Вони також виділяють біологічно-активні речовини, які стимулюють інші клітини імунної системи а також беруть участь у презентації антигену [8]. В якості діючої субстанції при дослідженні імуномодулюючих властивостей гриба *Ganoderma lucidum* зазвичай використовуються екстракти з плодових тіл гриба, рідше – міцелію та спор, та окремі полісахаридні фракції. Не вивченим залишається вплив біомаси гриба *Ganoderma lucidum*, вирощеної методом глибинного культивування на різні ланки імунітету при імунодефіцитних станах.

Тому, **метою** нашого дослідження було дослідження впливу порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum* на неспецифічну імунну відповідь у мишей в умовах модельованого вторинного імунодефіциту *in vivo*.

Матеріали та методи. Біомаса гриба *Ganoderma lucidum* була вирощена методом глибинного культивування на базі Інституту ботаніки ім. Н.Г.Холодного НАН України (м. Київ) під керівництвом доктора біологічних наук відділу мікології Н.А.Бісько. Біомаса гриба була висушена та подрібнена до порошкового стану. Для моделювання імунодефіциту використовували імуносупресант циклофосфамід (ЕНДОКСАН® - "Baxter Oncology GmbH", Німеччина), який вводили одноразово дозою 150 мг/кг, внутрішньочеревно, в перший день експерименту. Циклофосфамід належить до антинеопластичних засобів та має цитотоксичну, протипухлинну та імуносупресивну активність. Після ін'єкції циклофосфаміду мишам протягом 10 днів вводили порошок біомаси гриба *Ganoderma lucidum* перорально у дозі з розрахунку 0,01 мг на 20 гр маси тіла (0,5мг/кг). У попередній серії наших досліджень при застосуванні цієї дози спос-терігався найбільш виразний стимулюючий ефект на імунну відповідь. В якості референтного препарату використовували імунотропний препарат ехінацея (Ехінацея-Астрафарм, Україна). Дозу референтного препарату розраховували з використанням коефіцієнту, який визначає співвідношення між дозами лікарських засобів для людини і різних видів експериментальних тварин. Для миші він дорівнює 387,9.

Дослідження проводили на статевозрілих (віком 3-5 міс) мишах-самцях лінії СВА/Са. Тварини були розподілені на 4 групи: 1 - контрольні миші (n=6); 2 - миші, яким одноразово вводили циклофосфамід (150 мг/кг, n=6); 3 – миші, які після введення циклофосфаміду отримували протягом 10 днів порошок біомаси гриба *Ganoderma Lucidum* (0,5 мг/кг, n=6); 4 - миші, які після введення циклофосфаміду отримували протягом 10 днів референтний препарат ехінацея (12,85 мг/кг, n=6). Для визначення фагоцитарної активності на моношар макрофагів наносили 0,2 мл суспензії латексу (2,5•10⁸ мл) у середовищі RPMI-1640, інкубували протягом 60 хвилин у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ при 37 ° С. Потім скельця промивали, занурюючи їх у стакани з теплим фізіологічним розчином, висушували, а клітини фіксували у парах 4 % параформальдегіду та фарбували за Романовським-Гімза. У світловому мікроскопі оцінювали відсоток фагоцитуючих латекс клітин (фагоцитарний індекс), кількість часточок латексу, які були поглинені одним макрофагом (фагоцитарне число), та фагоцитарну активність, яку визначали

шляхом поділу кількості поглинених частинок латексу на сто підрахованих клітин [2]. Результати аналізували за допомогою методів параметричної (t-критерій Ст'юдента) та непараметричної (U-критерій Вілкоксона-Манна-Уїтні) статистики [1,3].

Результати та їх обговорення. Оскільки циклофосфамід є імуно-депресантом, він порушує процеси гемопоезу, оновлення тканин, викликає спустошення лімфоїдної тканини, пригнічує всі форми імунної відповіді. В наших дослідженнях було виявлено, що введення циклофосфаміду призвело до статистично достовірного зниження всіх показників фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів. Так, кількість перитонеальних макрофагів знизилась в 7,9 рази, фагоцитарний індекс знизився в 1,3 рази, фагоцитарна активність знизилась в 1,6 рази, фагоцитарне число зменшилось в 1,2 рази порівняно з даними в групі контрольних мишей.

Застосування порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum* в умовах введення циклофосфаміду призвело до статистично достовірного відновлення пригнічуючого впливу імуносупресанту на фактори неспецифічної імунної відповіді, а саме: кількість перитонеальних макрофагів збільшилась у 7,4 рази, відновившись майже до рівня контрольної групи мишей, що є кращим показником у порівнянні з референтним препаратом ехінацеї, який покращив цей показник лише у 4 рази (рис.1.); фагоцитарний індекс збільшився у 1,2 рази, на рівні референтного препарату, який сприяв зростанню фагоцитарного індексу в 1,3 рази (рис.3.); фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів збільшилась у 1,4 рази як при застосуванні порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum*, так і при застосуванні препарату ехінацеї (рис.2.); статистично достовірного відновлення фагоцитарного числа як при застосуванні порошку біомаси, так і при застосуванні референтного препарату не відмічалось (рис.4.).

Відновлення кількості перитонеальних макрофагів, фагоцитарного індексу та фагоцитарної активності на фоні введення циклофосфаміду може бути пов'язане з тим, що біомаса гриба *Ganoderma lucidum* також містить полісахариди, зокрема водорозчинні β -1-3-D-глюкани та β -1-6-D-глюкани, які вперше були виділені з плодових тіл гриба [5,6,8,13]. Водні екстракти плодових тіл та полісахариди, виділені з плодових тіл *Ganoderma lucidum*, здатні підвищувати фагоцитарну активність та ефективність фагоцитозу перитонеальних макрофагів *in vitro* [10]. Одним з проявів активації макрофагів є генерація оксиду азоту (NO), що може сприяти збільшенню цитотоксичної активності макрофагів [4, 5]. Нещодавнє відкриття рецепторів до β -D-глюканів на поверхні білих кров'яних клітин, зокрема лейкоцитів, моноцитів та макрофагів у тварин і людей, ймовірно може пояснити імуномодуючий вплив полісахаридів гриба *Ganoderma lucidum* на функціональну активність перитонеальних макрофагів [9]. Ефективність дії полісахаридів може збільшуватися за рахунок збільшення кількості рецепторів, які здатні зв'язуватися з ними, оскільки було показано, що полісахаридний екстракт *Ganoderma lucidum* може збільшувати експресію рецепторів CD14 і TLR-4 на поверхні макрофагів мишей лінії J 774A [7, 12].

Полісахариди *Ganoderma lucidum* також можуть захищати клітини від пошкоджень, викликаних окислювальним стресом. У своїх досліджах вчені You та Lin, 2002 [14] показали, що полісахарид-пептид, виділений з плодових тіл, запобігає окислювальному пошкодженню макрофагів, викликаному терт-бутилгідропероксидазою, збільшуючи тривалість життя макрофагів

і захищаючи від пошкоджень такі органели клітин як мітохондрії та ендоплазматичний ретикулум. В інших досліджах фукозозвмісний глікопротеїн стимулював дозрівання макрофагів серед мононуклеарних клітин пуповинної крові людини [11].

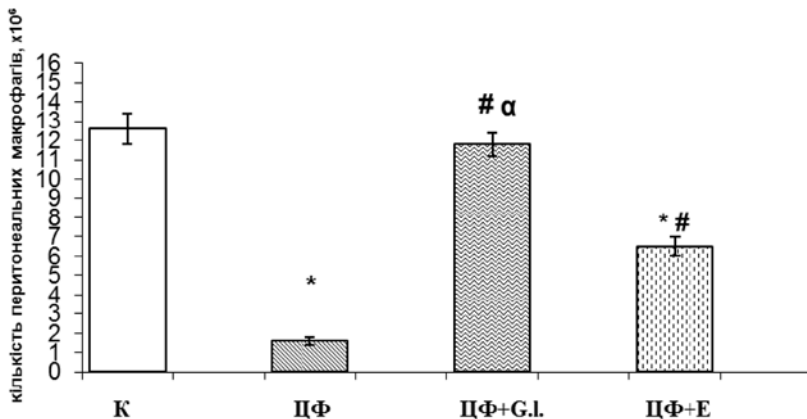


Рис. 1. Вплив порошку біомаси гриба *Ganoderma Lucidum* на кількість перитонеальних макрофагів

Примітка (тут і на наступних рисунках): К – контрольна група мишей; ЦФ – група мишей, які отримували внутрішньочеревно імуносупресант у дозі 150 мг/кг; ЦФ+G.l. – група мишей, які після ін'єкції імуносупресанту отримували гриб *Ganoderma Lucidum*; ЦФ+E – група мишей, які після ін'єкції імуносупресанту отримували референтний препарат. 1. * – $p < 0,05$ порівняно з даними в контрольній групі мишей; 2. # – $p < 0,05$ порівняно з даними в групі мишей, які отримували циклофосфамід; 3. α – $p < 0,05$ порівняно з даними в групі мишей, які отримували референтний препарат.

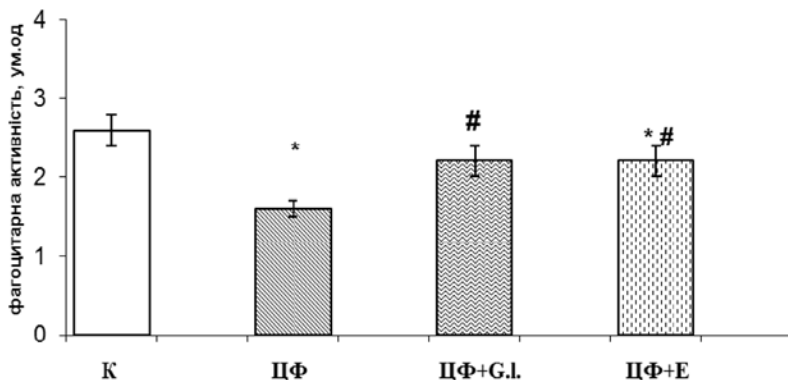


Рис. 2. Вплив порошку біомаси гриба *Ganoderma Lucidum* на фагоцитарну активність

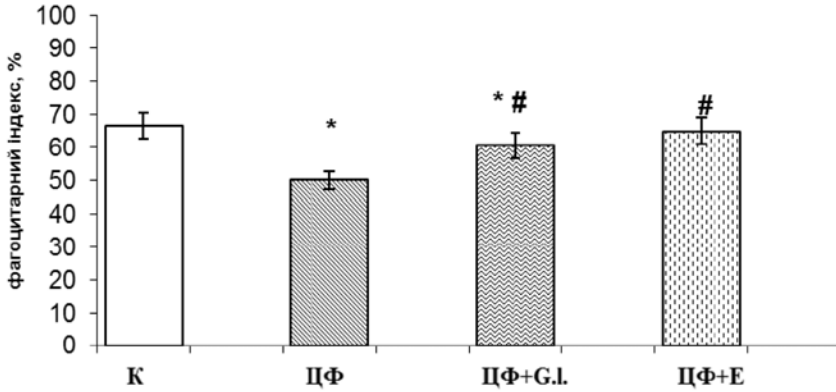


Рис. 3. Вплив порошку біомаси гриба *Ganoderma Lucidum* на фагоцитарний індекс

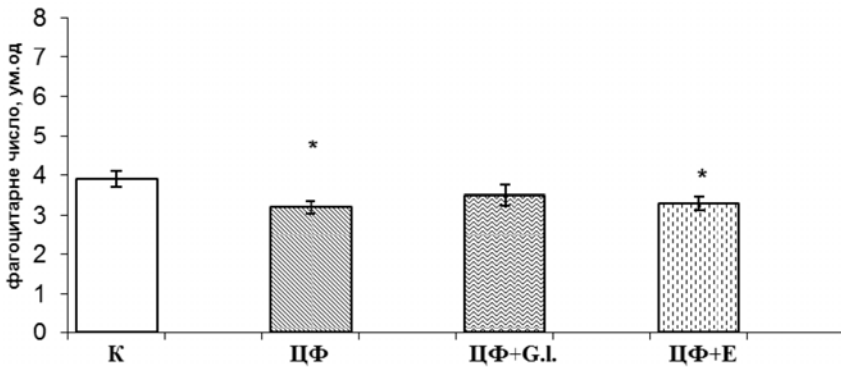


Рис. 4. Вплив порошку біомаси гриба *Ganoderma Lucidum* на фагоцитарне число

Таким чином, результати проведеного дослідження показують, що порошок біомаси гриба *Ganoderma Lucidum* нормалізує функціональну активність перитонеальних макрофагів в умовах введення імуносупресанту циклофосфаміду, що може свідчити про імуномодулюючий вплив біомаси гриба на неспецифічну імунну відповідь.

Висновки. При експериментальному імунодефіциті введення порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum* протягом 10 днів мишам лінії СВА/Са викликає достовірне збільшення фагоцитарної активності та фагоцитарного індексу перитонеальних макрофагів на рівні референтного препарату, відновлюючи ці показники майже до показників контрольної групи мишей. Застосування протягом 10 днів порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum* мишам лінії СВА/Са з індукованою імунною недостатністю, викликає достовірне збільшення

кількості перитонеальних макрофагів, відновлюючи цей показник майже до показників контрольної групи мишей. При цьому збільшення цього показника було достовірно більшим порівняно з даними в групі мишей, які отримували референтний препарат. Достовірних змін фагоцитарного числа при застосуванні порошку біомаси гриба *Ganoderma lucidum* протягом 10 днів мишам лінії СВА/Са на фоні циклофосфаміду виявлено не було. **Перспективою подальшого розвитку** наукового дослідження є вивчення імунотропних властивостей порошку біомаси гриба *G.lucidum* на інші ланки імунної системи.

Література

1. Гублер Е. В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е. В. Гублер, А. А. Генкин. – Л.: Медицина, 1973. – 141 с.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. Стефанова О.В. – Київ: Авіцена, 2001. – 528 с.
3. Минцер О. П. Методы обработки медицинской информации / О. П. Минцер, Б. Н. Угаров, В. В. Власов. – К.: Вища школа, 1991. – 271 с.
4. Activation of mouse macrophages by the alkali-extracted polysaccharide from spore of *Ganoderma lucidum*. / Q.J. Tang, J.S. Zhang, Y.J. Pan [et al.] // Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology. – 2004. – №20. – P. 142–144.
5. Fang J.N., Bao XF, Yuen WH. Studies on the polysaccharides from spores of *Ganoderma lucidum*. In: *Ganoderma: Genetics, Chemistry, Pharmacology and Therapeutic* / Zhi-Bin Lin (ed) // Proceedings of International Symposium on *Ganoderma* Research, Shanghai, October 21–23, 2002. - Beijing, Medical University Press.- P. 98–103.
6. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds / B. Boh, M. Berovic, J. Zhang [et al.] // *Biotechnology Annual Review*. – 2007. – №13. – P. 265–301.
7. *Ganoderma lucidum* polysaccharides enhance CD14 endocytosis of LPS and promote TLR4 signal transduction of cytokine expression / K.F. Hua, H.Y. Hsu, L.K. Chao, [et al] // *Journal of Cellular Physiology*. – 2007. – Vol. 212, №2. – P.537-550.
8. *Ganoderma lucidum* Polysaccharides: Immunomodulation and Potential Anti-Tumor Activities / Z. Xu, X. Chen, Z. Zhong [et al.] // *The American Journal of Chinese Medicine*. – 2011. – Vol. 39, №1. – P. 15-27.
9. Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum* / B.M. Shao, H. Dai, W. Xu [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. - №323. – P. 133–141.
10. Lei L.S., Li M.C., Sun L.S. *Ganoderma lucidum* and its components on the function of macrophages. In: *Ganoderma: Genetics, Chemistry, Pharmacology and Therapeutics* / Zhi-Bin Lin (ed) // Proceedings of International Symposium on *Ganoderma* Research, Shanghai, October 21–23, 2002.- Beijing, Medical University Press.- P. 20–23.
11. Polysaccharides of *Ganoderma lucidum* alter cell immunophenotypic expression and enhance CD56+ NK-cell cytotoxicity in cord blood / C.M. Chien, J.L. Cheng, Chang W.T. [et al.] // *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. – 2004. – №12. – P. 5603–5609.
12. Reishi polysaccharides induce immunoglobulin production through the TLR4/TLR2 mediated induction of transcription factor Blimp-1 / K.I. Lin, Y.Y. Kao, H.K. Kuo [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281. N 34. – P. 2411-2423.

13. Reshetnikov. S.V. Higher Basidiomycota as a source of Antitumor and Immunostimulating Polysaccharides (Review) / S.V. Reshetnikov, S.P. Wasser, K.K. Tan. // International Journal of Medicinal Mushrooms. – 2001. – Vol.3. – P. 361-394.

14. You Y.H. Protective effects of Ganoderma lucidum polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species / H.Y. You, Z.B. Lin // Acta Pharmacologica Sinica. – 2002. – №23. – P. 787–791.

І.В. Ниженковская, В.Т. Пидченко, Н.Г. Бычкова, Н.А. Бисько, А.Е. Родниченко, Н.А. Козико

Влияние гриба Ganoderma Lucidum (CURT.:FR.) P. Karst. на неспецифический иммунный ответ у мышей линии СВА/Са с вторичным иммунодефицитом

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, Киев,

Институт ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины, Киев, ГУ «Институт геронтологии имени Д.Ф. Чеботарева НАМН Украины», Киев

Вступление. Ganoderma lucidum (трутовик лакированный) – один из известных базидиальных грибов, который издавна применяется в Восточной медицине для лечения и профилактики множества заболеваний. Не изученным остается влияние биомассы гриба Ganoderma lucidum, выращенной методом глубинного культивирования на разные звена иммунитета при иммунодефицитных состояниях.

Цель. Определение влияния порошка биомассы гриба Ganoderma lucidum на неспецифический иммунный ответ у мышей линии СВА/Са в условиях моделированного вторичного иммунодефицита in vivo.

Материалы и методы. Биомасса гриба Ganoderma lucidum была выращена методом глубинного культивирования. Исследования проводили на половозрелых (возрастом 3-5 мес) мышах-самцах линии СВА/Са. Для моделирования иммунодефицита использовали иммуносупрессант циклофосфамид, который вводили однократно в дозировке 150 мг/кг, внутривенно, в первый день эксперимента. Исследовали показатели фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.

Результаты. Установлено, что введение порошка биомассы гриба Ganoderma lucidum на протяжении 10 дней мышам линии СВА/Са с индуцированной иммунной недостаточностью вызывает достоверное повышение фагоцитарной активности и фагоцитарного индекса перитонеальных макрофагов на уровне референтного препарата, а также достоверное повышение количества перитонеальных макрофагов, при этом повышение данного показателя было достоверно большим в сравнении с данными в группе мышей, которые получали референтный препарат.

Ключевые слова: гриб Ganoderma lucidum, линия СВА/Са, неспецифический иммунный ответ, вторичный иммунодефицит.

*I.V. Nizhenkovska, V.T. Pidchenko, N.G. Bychkova, N.A. Bisko,
A.E. Rodnichenko, N.O. Kozyko*

**Influence of fungus *ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst.
on the non-specific immune response in mice of line
CBA/CA with secondary immunodeficiency**

Bogomolets National medical university, Kyiv,

Kholodny Institute of Botany of NAS of Ukraine, Kyiv,

SI "D.F. Chebotarev State Institute of Gerontology NAMS of Ukraine", Kyiv

Introduction. *Ganoderma lucidum* is a well known basidiomycete, which has been used in Eastern medicine for the treatment and prevention of many diseases since olden times. The effect of fungus *Ganoderma lucidum* biomass obtained by submerged cultivation method at various components of immune system in case of immunodeficient conditions is not studied.

Aim. To investigate the influence of biomass powder of fungus *Ganoderma lucidum* on the non-specific immune response in mice line CBA/Ca in conditions of the simulated secondary immunodeficiency in vivo.

Materials and methods. The biomass powder of fungus *Ganoderma lucidum* was incubated by the method of submerged cultivation. CBA/Ca mice line aged 3–5 weeks were used for the research. For the simulation of immunodeficiency the immunosuppressant cyclophosphamide was used by means of administration once in a dose of 150 mg/kg intraperitoneally on the first day of the experiment. We studied the indicators of the phagocytic activity of peritoneal macrophages.

Results. Results of the study show that the administration of biomass powder of *Ganoderma Lucidum* for 10 days in mice line CBA/Ca with induced immune deficiency causes a significant increase of phagocytic activity and phagocytic index of peritoneal macrophages as the reference product and a significant increase of the number of peritoneal macrophages, herewith the increase was significantly higher in comparison with the data in the group of mice that received the reference drug.

Key words: fungus *ganoderma lucidum*, line CBA/CA, non-specific immune response, secondary immunodeficiency.

Відомості про авторів:

Підченко Віталій Тарасович – асистент кафе дри фармакогнозії та ботаніки НМУ імені О.О.Богомольця. Адреса: м. Київ, вул. Пушкінська, 22.

Ніженковська Ірина Володимирівна – д.мед.н., професор, завідувач кафедри фармацевтичної, біологічної та токсикологічної хімії НМУ імені О.О.Богомольця. Адреса: м. Київ, вул. Пушкінська, 22.

Бичкова Ніна Григорівна – д.біол.н., професор, гол.н.с. лабораторії імунології Інституту проблем патології. Адреса: м. Київ, просп. Перемоги, 34.

Бісько Ніна Анатоліївна – д.біол.н., пров.н.с. відділу мікології Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного. Адреса: м. Київ, вул. Терещенківська, 2, МСП-1.

Родніченко Анжела Євгенівна – к.біол.н., пров.н.с. ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України».

Козько Наталія Олександрівна – асистент кафедри аптечної та промислової технології ліків НМУ імені О.О.Богомольця. Адреса: м. Київ, вул. Пушкінська, 22.