

© Макаренко А. Н., Рудык М. П., Позур В. В., Святецкая В. Н., *Довгий Р. С.

УДК 612. 017. 582. 284.

Макаренко А. Н., Рудык М. П., Позур В. В., Святецкая В. Н., *Довгий Р. С.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ СРЕДСТВА «КОРДИЦЕПС И ЛИНЧЖИ» НА КИСЛОРОД-ЗАВИСИМЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ И МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

(г. Киев)

*Учебно-научный центр «Институт биологии» (г. Киев)

Данная работа является фрагментом НИР «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій», шифр 11БФ036-01.

Вступление. Интерес медицины именно к препаратам лечебных грибов связан с появлением научных данных об их уникальном иммуномодуляторном действии [3]. В течение длительного периода изучения лечебных грибов (50 лет изучали действие гриба линчжи и 30 лет – действие гриба кордицепс) учеными из них были выделены отдельные вещества, которые обладают важными свойствами. Грибы кордицепс китайский (*Cordyceps sinensis*) и линчжи (трутовик лакированный, *Ganoderma lucidum*) являются мощными биоэнергетическими иммуномодуляторами быстрого действия, обладают общеукрепляющим действием, способствуют угнетению развития опухоли и предотвращают распространение метастазов [3]. Считается, что противоопухолевая активность кордицепса реализуется не за счет прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки, а в результате иммуномодуляторного действия [11], в то время как противоопухолевая активность линчжи реализуется вследствие как иммуномодуляторного действия, так и прямого цитотоксического действия на опухолевые клетки [8].

Широкому спектру клеток организма свойственно цитотоксическое действие, которое реализуется за счет продукции активных форм кислорода. Среди таких клеток особенное значение имеют макрофаги, которые локализованы преимущественно в тканях [1,7,10]. В ответ на фагоцитоз патогенов либо на контакт с растворимыми патоген-ассоциированными молекулами, а также провоспалительными цитокинами, у макрофагов развивается система реакций, которая имеет общее название «кислородный взрыв», и в результате которой образуется моновалентное производное молекулярного кислорода – супероксид-анион. Следствием следующих реакций является образование других токсических метаболитов, таких как перекись водорода, гипохлористая кислота (HOCl), гидроксил-радикал и синглетный кислород [9,5].

Целью данной работы было исследовать влияние средства «Кордицепс и Линчжи» на кислород-зависимый метаболизм перитонеальных макрофагов мышей и мононуклеаров крови человека.

Объект и методы исследования. Получение мононуклеаров периферической крови человека проводили методом центрифугирования в градиенте плотности [2]. Кровь донора разводили вдвое забуференным раствором Хенкса (pH 7,2). Разведенную кровь наслаивали на смесь фиколл-верографи-на ($\rho = 1,078$) и центрифугировали 40 минут при 400g. Белое кольцо в интерфазе между плазмой и градиентом забирали, трижды отмывали забуференным раствором Хенкса по 5 минут при 200g.

Для того, чтобы получить перитонеальные макрофаги мышей, животным в брюшную полость вводили по 5 мл среды Хенкса и проводили массаж передней стенки брюшной полости. Потом отбирали образовавшуюся суспензию клеток, и отмывали клетки (1500 об/мин, 10 мин) [2]. Осадок ресуспендировали в 1 мл среды Хенкса и доводили конечную концентрацию клеток до 3×10^6 клеток/мл. Количество жизнеспособных клеток подсчитывали за стандартной методикой, используя суправитальное окрашивание трипановым синим. Содержание животных и эксперименты проводились согласно положений «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», утвержденных Первым национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2001).

Функциональную активность клеток определяли по восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ-тест) [6]. 100 мкл клеток перитонеального экссудата вносили в плоскодонный планшет в концентрации 3×10^5 клеток в лунку. В опытах использовали готовое средство «Кордицепс и Линчжи» (производства компании McAster, Украина, Сертификаты UA. 1.003. X7862-13 от 17.07.2013 г.; UA. 1. 003. X001638-13 от 15.02.2013 г.; UA. 1.003. X001637-13 от 15.02.2013 г.) в жидком виде. Готовили водные растворы средства в трех концентрациях: 50 мкг/мл, 100 мкг/мл и

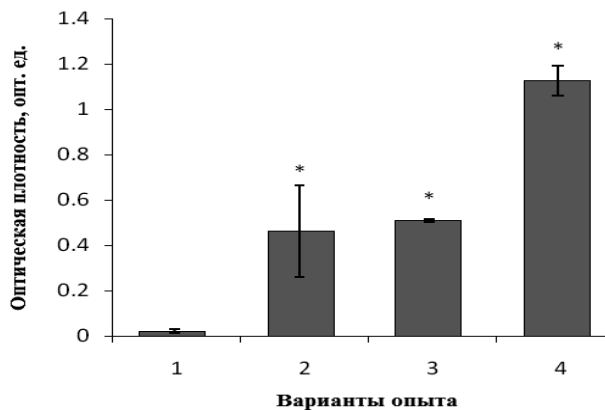


Рис. 1. Влияние средства «Кордицепс и Линчжи» на кислород-зависимый метаболизм мононуклеаров периферической крови человека.

1 – контроль;

2 – средство «Кордицепс и Линчжи» в концентрации 50 мкг/мл;

3 – средство «Кордицепс и Линчжи» в концентрации 100 мкг/мл;

4 – средство «Кордицепс и Линчжи» в концентрации 200 мкг/мл;

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

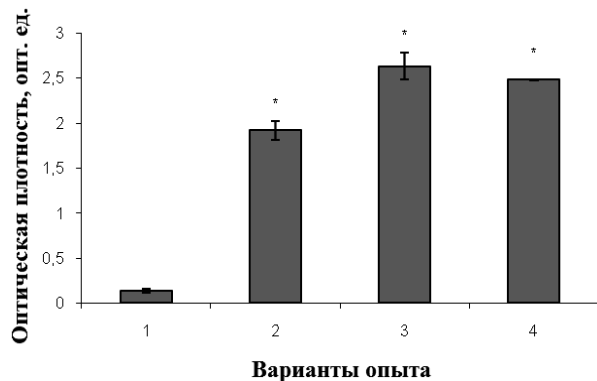


Рис. 2. Влияние средства «Кордицепс и Линчжи» на кислород-зависимый метаболизм перитонеальных макрофагов мышей.

1 – контроль;

2 – средство «Кордицепс и Линчжи» в концентрации 50 мкг/мл;

3 – средство «Кордицепс и Линчжи» в концентрации 100 мкг/мл;

4 – средство «Кордицепс и Линчжи» в концентрации 200 мкг/мл;

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

200 мкг/мл. В опытные лунки вносили по 20 мкл раствора средства. Инкубировали в течение 30 минут при 37°C для обеспечения адгезии макрофагов к поверхности пластика. В пробы добавляли 0,01 мл НСТ в концентрации 5 мкг/мл, и инкубировали 15 минут при 37°C. После чего осаждали клетки центрифугированием при 1500 об/мин в течение 10 минут. Супернатант отбирали. Реакцию восстановления НСТ останавливали добавлением 0,1 мл 2М КОН + 0,1 мл 50 % раствора диметилсульфоксида. Оптическую плотность диформаза определяли

на микроплетфотометре типа «Reader» при длине волны 630 нм. Для определения вероятности отличия показателей между опытом и контролем использовали t-критерий Стьюдента [4].

Результаты исследований и их обсуждение.

Мононуклеарные фагоциты могут быть цитотоксическими либо цитостатическими для широкого спектра опухолевых клеток-мишеней различной природы, действуя непосредственно, опосредованно или через другие молекулярно-клеточные механизмы. Активированные макрофаги осуществляют противоопухолевое действие, секретируя ряд растворимых факторов, таких как продукты метаболизма O_2 , которые обладают мощным бактерицидным и цитотоксическим действием. В процессе канцерогенеза цитотоксичность мононуклеарных фагоцитов угнетается по мере роста опухоли. Кроме того, опухолеопосредованная альтернативная активация опухолеассоциированных макрофагов способствует опухолевой прогрессии.

Применение средства во всех концентрациях вызывало значительное повышение кислород-зависимого метаболизма мононуклеаров периферической крови человека по сравнению с контролем (рис. 1).

При использовании средства в концентрации 50 мкг/мл наблюдалось повышение спонтанного метаболизма мононуклеаров периферической крови человека в 20 раз по сравнению с контролем. Добавление средства в концентрации 100 мкг/мл приводило к увеличению этого показателя в 22 раза, но между собой влияние этих концентраций достоверно не отличалось. Максимально эффективной для активации «кислородного взрыва» этих клеток оказалась концентрация средства 200 мкг/мл – в 50 раз по сравнению с контролем и в 2 раза по сравнению с другими концентрациями средства.

Реакция макрофагов мышей на добавление средства была подобной к таковой у мононуклеаров периферической крови человека (рис. 2).

Введение средства в концентрации 50 мкг/мл приводило к повышению кислород-зависимого метаболизма в 14 раз по сравнению с контролем. Наиболее эффективными оказались концентрации 100 и 200 мкг/мл, при использовании которых наблюдалось повышение метаболизма макрофагов в 19 и 18 раз, соответственно, по сравнению с контролем, и достоверное повышение по сравнению с введением средства в концентрации 50 мкг/мл.

Вывод. Средство «Кордицепс и Линчжи» осуществляло стимулирующее влияние на кислород-зависимый метаболизм перитонеальных макрофагов мышей и мононуклеарных лейкоцитов крови человека. Для моноцитов крови человека наиболее эффективной была доза 200 мкг/мл, которая вызывала усиление кислород-зависимого метаболизма в 50 раз по сравнению с контролем. Наиболее эффективными дозами, стимулирующими «кислородный взрыв» перитонеальных макрофагов мышей, оказались 100 и 200 мкг/мл, которые усиливали кислород-зависимый метаболизм в 19

и 18 раз соответственно. Таким образом, средство «Кордицепс и Линчжи» оказалось весьма эффективным стимулятором кислород-зависимого метаболизма фагоцитов человека и мышей. Учитывая важность цитотоксической функции мононуклеарных фагоцитов при опухолевом процессе, «Кордицепс и Линчжи» является перспективным

средством для иммуномодуляторной терапии раковых заболеваний.

Перспективы дальнейших исследований. В дальнейшем целесообразным является проведение исследований *in vivo* иммуномодулирующего и противоопухолевого действия средства «Кордицепс и Линчжи».

Литература

1. Иммунология / Вершигора А. Ю. [і співавт.] – К.: Вища шк., 2005. – 599 с.
2. Иммунологические методы / Под ред. Г. Ф. Фримеля; пер. с нем. – М.: Медицина. – 1987. – 472 с.
3. Перевозникова Н. И. Роль БАД на основе эффективных травяных формул (из истории тибетской медицины) / Н. И. Перевозникова, Е. М. Крепс, Л. Н. Шерстюк // Вісник Полтавської державної аграрної академії. – 2009. – № 1. – С. 175 – 178.
4. Статистический анализ медицинских данных / О. Ю. Реброва. – Москва : МедиаСфера. – 2002. – 312 с.
5. Forman H. J. Signaling by the respiratory burst in macrophages / H. J. Forman, M. Torres // IUBMB Life. – 2001. – № 51 (6). – P. 365 – 371.
6. Freeman R. Technique for the performance of the nitro-blue tetrazolium (NBT) test / R. Freeman, B. King // J. Clin. Pathol. – 1972. – Vol. 25 (10). – P. 912 – 914.
7. Iles K. E. Macrophage signaling and respiratory burst / K. E. Iles, H. J. Forman // Immunol. Res. – 2002. – № 26 (1-3). – P. 95 – 105.
8. Lin Z. B. Progress of studies on the antitumor activity and immunomodulating effect of Ganoderma / Z. B. Lin // J. Peking. Univ. (Health Sci). – 2002. – Vol. 34. – P. 493 – 498.
9. Moilanen E. Nitric oxide in inflammation and immune response / E. Moilanen, H. Vapaatalo // Ann. Med. – 1995. – № 27 (3). – P. 359 – 367.
10. Tan B. H. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens / B. H. Tan, C. Meincen, M. Bastian [et al.] // J. Immunol. – 2006. – № 177. – P. 1864 – 1871.
11. Yoshida J. Antitumor activity of an extract of Cordyceps sinensis (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines / J. Yoshida, S. Takamura, N. Yamaguchi [et al.] // Jpn. J. Exp. Med. – 1989. – Vol. 59(4). – P. 157–161.

УДК 612. 017. 582. 284.

ВИВЧЕННЯ ДІЇ ЗАСОБУ «КОРДИЦЕПС І ЛІНЧЖІ» НА КИСНЕ-ЗАЛЕЖНИЙ МЕТАБОЛІЗМ ПЕРИТОНЕАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ МИШЕЙ І МОНОНУКЛЕАРІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

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

Резюме. Кордицепс китайський та трутовик лакований є перспективними лікувальними грибами, окремі речовини яких можуть гальмувати розвиток пухлини і метастазування, зокрема і завдяки їхнім імунотропним властивостям. Відомо, що багато клітин організму здійснюють цитотоксичну дію завдяки продукції активних форм кисню, відповідно, стимуляція кисне-залежного метаболізму цих клітин може бути корисною для терапії ракових захворювань. Застосування 200 мкг/мл засобу викликало підвищення кисень-залежного метаболізму мононуклеарів крові людини в 50 разів, в той час як у перитонеальних макрофагах мишей аналогічна доза засобу підвищувала кисне-залежний метаболізм у 18 разів у порівнянні з контролем. Найефективнішою для макрофагів мишей була доза 100 мкг/мл, застосування якої викликало підвищення кисне-залежного метаболізму в 19 разів у порівнянні з контролем.

Ключові слова: «Кордицепс і Лінчжі», кисне-залежний метаболізм, перитонеальні макрофаги, мононуклеари крові.

УДК 612. 017. 582. 284.

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ СРЕДСТВА «КОРДИЦЕПС И ЛИНЧЖИ» НА КИСЛОРОД-ЗАВИСИМЫЙ МЕТАБОЛИЗМ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ И МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Макаренко А. Н., Рудык М. П., Позур В. В., Святецкая В. Н., *Довгий Р. С.

Резюме. Кордицепс китайский и трутовик лакированный являются перспективными лечебными грибами, отдельные вещества которых способны тормозить развитие опухоли и метастазирование, в частности и благодаря иммуномодуляторным свойствам. Известно, что многие клетки организма осуществляют цитотоксическое действие благодаря продукции активных форм кислорода, следовательно, стимуляция кислородзависимого метаболизма этих клеток может быть полезной для терапии раковых заболеваний. Применение 200 мкг/мл средства вызывало повышение кислород-зависимого метаболизма мононуклеаров крови человека в 50 раз, в то время как у перитонеальных макрофагов мышей аналогичная доза средства повышала кислород-зависимый метаболизм в 18 раз по сравнению с контролем. Наиболее эффективной для макрофагов мышей была доза 100 мкг/мл применение которой вызывало повышение кислородзависимого метаболизма в 19 раз по сравнению с контролем.

Ключевые слова: «Кордицепс и Линчжи», кислород-зависимый метаболизм, перитонеальные макрофаги, мононуклеары крови.

UDC 612. 017. 582. 284.

Study on the Influence of Medicine «Cordyceps and Lingzhi» on the Oxygen Dependent Metabolism of Murine Peritoneal Macrophages and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

Makarenko A. N., Rudyk M. P., Pozur V. V., Svyatetska V. N., Dovgiy R. S.

Abstract. Medicine interest to the preparations of higher mushrooms is connected with the appearance of scientific data about their unique immunomodulatory action. During a long period of medicinal mushrooms investigation scientists obtained substances with important biological and pharmacological properties. Mushrooms *Cordyceps sinensis* and *Ganoderma lucidum* act as powerful immunomodulators, which inhibit development and prevent dissemination of tumors. It is considered that antitumor activity of Cordyceps is determined by immunomodulatory action, whereas antitumor activity of Ganoderma is connected with both immunomodulatory and direct cytotoxicity against tumor cells.

A lot of human cells, particularly macrophages, possess cytotoxicity mediated by production of reactive oxygen species. After phagocytosis of pathogens macrophages develop a system of reactions, called "respiratory burst", the result of which is the formation of superoxide anion. Next reactions lead to formation of other toxic metabolites, such as hydrogen peroxide, hypochlorous acid and singlet oxygen.

The aim of our work is to investigate influence of medicine "Cordyceps & LingZhi" on the oxygen-dependent metabolism of murine peritoneal macrophages and human blood mononuclear cells.

Human blood mononuclear cells obtained by centrifugation in ficoll-verographine gradient. Murine peritoneal macrophages obtained by the following procedure. 5 ml of Hank's medium were injected into the abdominal cavity, and then anterior wall of abdominal cavity was massaged. Generated suspension of cells was taken away and centrifugated at 1500 rpm during 10 minutes. Sediment was resuspended in 1 ml of Hank's medium and diluted the final cell concentration to 3×10^6 cells/ml. The number of vital cells counted by standart methodic, using supravital staining by trypan blue.

In experiments liquid medicine "Cordyceps & LingZhi" (McAster, Ukraine, Certificates UA. 1. 003. X7862-13 from 17.07.2013; UA. 1.003. X001638-13 from 15.02.2013; UA. 1.003. X001637-13 from 15. 02. 2013) was used. We prepared water solutions of medicine in 3 concentrations: 50 mkg/ml, 100 mkg/ml, 200 mkg/ml. 20 mkl of medicine solution added to each experimental well of 96-well microplate. Functional activity of cells was determined by reduction of nitroblue tetrazolium (NBT-test). For the determination of statistic reliability of differences between experiment and control Student's t-test was used.

Mononuclear phagocytes may act as cytotoxic or cytostatic for the wide specter of tumor cells, acting directly of mediated by another cellular and molecular mechanisms. Activated macrophages realize their antitumor action by secretion of different soluble factors, such as products of oxygen metabolism, which possess powerful bactericidal and cytotoxic properties. During carcinogenesis mononuclear phagocytes cytotoxicity is inhibited as the result of tumor growth. Furthermore, alternative activation of tumor-associated macrophages promotes tumor progression.

Application of 50 mkg/ml medicine results in 20-fold increase of spontaneous oxygen-dependent metabolism of human peripheral blood mononuclear cells as compared to control. 100 mkg/ml of medicine increased this index by 22 times, but as compared to another concentrations there was no difference. 200 mkg/ml of medicine was the most effective and activated "respiratory burst" of these cells by 50 times as compared to control and in 2 times as compared to another concentrations of medicine.

Reaction of murine peritoneal macrophages was similar to those of Application of 50 mkg/ml medicine resulted in 14-fold increase of peritoneal macrophages oxygen-dependent metabolism as compared to control. The most effective doses were 100 and 200 mkg/ml, which increased oxygen-dependent metabolism in 19 and 18 times, respectively, as compared to control, and reliable increase as compared to 50 mkg/ml of medicine.

Thus, medicine "Cordyceps & LingZhi" is very effective stimulator of human and murine phagocytes. With regard to importance of cytotoxic function of mononuclear phagocytes at tumor growth, "Cordyceps & LingZhi" is the perspective medicine for immunomodulatory therapy of cancer.

Keywords: "Cordyceps & Lingzhi", oxygen-dependent metabolism, peritoneal macrophages, mononuclear blood cells.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 9. 06. 2014 р.