

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ Т-ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА АДРИАМИЦИНА НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ЭКСТРАКТОВ ИЗ МИЦЕЛИЯ ГРИБОВ ШИИТАКЕ (*LENTINULA EDODES*) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Изучена способность экстрактов из мицелия гриба (*Lentinula edodes*), выращенного в течение 10 сут в темноте, оказывать протективное действие при воздействии на Т-лимфоциты человека в условиях *in vitro* противоопухолевым препаратом адриамицином. Установлена способность экстрактов стимулировать бласттрансформацию и митотическую активность Т-лимфоцитов. После воздействия адриамицином на фоне введения экстрактов мицелия гриба в культурах Т-лимфоцитов наблюдалось существенное снижение числа большинства патологически измененных клеток, индуцированных противоопухолевым препаратом.

Ключевые слова: Т-лимфоциты *in vitro*; адриамицин; мицелий *Lentinula edodes*; бласттрансформация; митотическая активность.

К числу наиболее грозных осложнений современной химиотерапии опухолей относится токсическая гипоплазия кроветворения. Практически все известные в настоящее время цитостатики даже в терапевтических дозах оказывают угнетающий эффект на гемопоэз, что вынуждает клиницистов осуществлять химиотерапию онкологических больных при постоянном контроле картины крови и в случае необходимости прерывать лечение [1].

Особое значение в указанном аспекте имеет исследование механизмов повреждающего действия цитостатиков на генетические структуры гемопоэтических клеток нормального (не пораженного опухолью) костного мозга, поскольку известно, что большинство используемых в клинике цитостатических лекарств обладают выраженным цитогенетическим эффектом, который во многом и определяет токсическое действие этих препаратов на нормальные органы и ткани организма [1, 2].

Адриамицин (адриабластин, доксорубин) относится к группе антрациклиновых антибиотиков – пигментов с индикаторными свойствами. По химическому строению антрациклины являются гликозидами. Кислотные свойства соединению придает аминогруппа сахара, а основные свойства антрациклинов обусловлены гидроксильными группами агликона.

Хромофорная группа препарата представляет собой красный нерастворимый в воде агликон-антрациклон. В молекуле адриамицина агликон соединен гликозидной связью с аминсахаром даунозамином [2]. Адриамицин активен при лечении 18 форм злокачественных опухолей: лимфосаркомы, ретикулосаркомы, лимфогранулематоза, острых лейкозов, рака молочной железы, рака легкого, злокачественных опухолей яичника, сарком мягких тканей и некоторых костных сарком, нейробластомы и опухоли Вильмса у детей, в отдельных случаях при раке щитовидной железы и переходно-клеточном раке мочевого пузыря и др. [3].

Шиитаке (*Lentinula edodes*) – съедобный гриб, широко используемый как лекарственное средство. Имеются сведения о том, что потребление этого гриба снижает артериальное давление, уровень холестерина в крови, развитие сердечно-сосудистых заболеваний и возникновение раковых трансформаций клеток [4]. Его также стали использовать для предотвращения развития метастазов после хирургических операций раковых опухолей [5–7]. Экстракты из этого гриба в экспериментах на бактериях не обладали мутагенной активностью [8]. При этом Лима с соавт. [9] установили, что экстракты из гри-

ба обладают антимутагенной активностью при воздействии на эукариотические клетки мутагенов циклофосфамида и N-этил-N-нитрозомочевины [9].

Известны факты иммуностимулирующего действия компонентов этого гриба. Лентинан – полисахарид (3-1,3-глюкагон), экстрагированный из грибов *Lentinula edodes*, обладает выраженной иммуностимулирующей активностью и применяется в клинической практике США и Японии начиная с 1986 г. [5–7]. Установлено, что лентинан существенно стимулирует Т-систему иммунитета человека.

В настоящее время широко дискутируется возможность применения экстрактов гриба шиитаке и отдельных его метаболитов в качестве лекарственного средства, позволяющего снизить генетические эффекты, которые вызывает химиотерапия больных раком [10].

Цель настоящей работы – изучение в условиях *in vitro* цитогенетических последствий воздействия на Т-лимфоциты человека противоопухолевого препарата адриамицина на фоне введения в культуры экстрактов мицелия гриба шиитаке (*Lentinula edodes*).

Материал и методики исследования

Из мицелия гриба *Lentinula edodes* был получен экстракт, который стерилизовали, пропуская через миллиметровый фильтр с диаметром пор 3 мк. Концентрация сухого вещества в 1 мл экстракта составила 20 мг.

В культуры лимфоцитов периферической крови, полученные от здоровых доноров, вводили экстракты гриба шиитаке (*Lentinula edodes*) в дозе 0,1 мл на 1 мл культуральной среды RPMI и инкубировали на протяжении 72 ч в стандартных условиях [11].

Предварительно в пробит-анализе было показано, что данная доза экстракта не вызывает цитопатического эффекта в условиях культуры Т-лимфоцитов человека. В культуральные флаконы через 12 ч после начала культивирования был введен цитостатический препарат адриамицин в дозе 1 мкг/мл. Эта доза цитостатика, по нашим данным, вызывает выраженный цитогенетический эффект, индуцируя повышение числа клеток с микроядрами [12].

На 72-м часу культивирования Т-лимфоциты фиксировали и готовили стандартные препараты по ранее описанному методу с анализом кариопатологических изменений интерфазного ядра и делящихся Т-лимфоцитов [13].

В настоящей работе выполнено измерение площади ядер Т-лимфоцитов по методу, описанному в [14], с использованием компьютерной программы ImageJ, разработанной Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, и микроскопа фирмы «Zeiss Jena», оборудованного видеокамерой, а также проведен анализ бласттрансформации и митотической активности культур клеток.

Статистическую обработку осуществляли с использованием пакета статистических программ STATISTICA v.6.0, BIOSYS-2, Microsoft Access, BIOSTAT (Primer of Biostatistic version 4.03).

Все количественные показатели исследования обрабатывали с применением *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок, поскольку тестирование закона распределения при помощи критерия Колмогорова – Смирнова не выявило отличий от нормального. Анализ статистических различий качественных признаков производили с использованием теста χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность [15].

Различия сравниваемых результатов ($X \pm m$, где X – выборочное среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического) считались статистически значимыми при достигнутом уровне $p < 0,05$.

Таблица 1

Частота клеток с различными морфологическими изменениями ядра в культурах Т-лимфоцитов крови после воздействия адриамицином на фоне введения экстрактов мицелия гриба шиитаке (*Lentinula edodes*), % ($X \pm m$)

Регистрируемый тип изменений морфологии ядерного аппарата интерфазной клетки		Число клеток в культуре с различными видоизменениями морфологии ядра			
		Интактные культуры (контроль)	Культуры с введением адриамицина	Культуры с введением экстракта мицелия шиитаке	Культуры после введения экстракта мицелия и последующего введения адриамицина
	Круглое ядро	28,1±3,1	13,9±3,2*	29,3±2,1	<u>32,3±3,2</u>
	Овальное ядро	34,0±2,8	24,2±2,5	23,2±2,2**	20,8±3,2*
	Бобовидное ядро	28,5±2,2	13,5±3,4*	36,8±2,3**	<u>30,1±2,8*</u>
	Угловатое ядро	3,0±0,8	4,7±0,9	3,3±0,8	5,3±0,9
	Ядро с единичной протрузией	2,3±0,5	10,9±0,8*	1,9±0,3	<u>4,1±0,5</u>
	Ядро с большим числом протрузий	1,5±0,6	6,8±0,8*	1,3±0,6	<u>2,3±0,8</u>
	Ядро с одним микроядром	1,3±0,3	5,7±0,6*	1,2±0,6	<u>1,9±0,7</u>
	Ядро с несколькими микроядрами	0,8±0,3	4,5±0,5*	0,5±0,2	<u>1,8±0,2</u>
	Двухъядерные и многоядерные клетки	0,1±0,1	3,8±0,5*	0,1±0,1	<u>0,8±0,2*</u>
	Кариорексис ядра	0,2±0,1	3,4±0,5*	0,2±0,1	<u>1,5±0,2*</u>
	Кариопикноз ядра	0,1±0,1	7,1±0,9*	0,5±0,4	<u>1,4±0,4*</u>
	Кариолизис ядра	0,2±0,2	5,3±0,9*	1,9±0,6	<u>1,4±0,4*</u>

Примечание. Здесь и далее в таблицах звездочками отмечены значения, статистически отличающиеся от интактного контроля (одной при $p < 0,01$, двумя при $p < 0,05$). Подчеркнуты отличия показателей культур клеток, полученных после воздействия адриамицином на фоне воздействия, от данных, наблюдаемых после воздействия только одним адриамицином.

Результаты исследования и обсуждение

Для интактных культур (табл. 1) Т-лимфоцитов было характерно то, что подавляющее большинство клеток (около 90%) имеет округлое ядро (круглое, овальное или бобовидное). Анализ морфологических изменений ядер Т-лимфоцитов под влиянием введения адриамицина свиде-

тельствует об изменениях отдельных классов клеток по этому показателю. На фоне снижения числа клеток с округлым ядром существенно возрастают патологические изменения морфологии ядер отдельных клеток: с протрузиями, микроядрами и деструктивными изменениями, приводящими к гибели клетки, такими как кариорексис, кариопикноз и кариолизис (во всех случаях $p < 0,01$).

Наряду с этим отмечено также увеличение числа двуядерных клеток. Экстракты гриба шиитаке не вызвали появления патологических изменений ядер, но достоверно увеличивали в культуре число клеток с бобовидным ядром, при этом снижалось количество клеток с овальным ядром (в обоих случаях $p < 0,05$). Добавление в культуры адриамицина на фоне введения экстракта мицелия гриба существенно снижает, по сравнению с культурами, где был введен адриамицин без предварительного воздействия экстрактами, число клеток с патологиями ядра. Кроме того, снижается до интактного уровня количество клеток с микроядрами, а

также с кариопикнозом и кариорексисом, при этом повышенным остается число двуядерных клеток и клеток с единичными протрузиями ядер и кариолизисом.

Анализ патологий деления (табл. 2) при воздействии адриамицином показал, что более 40% изученных митозов имеют патологические изменения.

Чаще всего наблюдались метафазы с отставаниями отдельных хромосом, а также многогрупповые метафазы. Среди патологических ана-телофаз преобладали клетки с отставаниями хромосом и мостами. Увеличения числа клеток с колхициноподобными митозами (К-митозами) не отмечено.

Т а б л и ц а 2

Частота патологических митозов в Т-лимфоцитах периферической крови после воздействия адриамицином на фоне введения экстрактов мицелия гриба шиитаке (*Lentinula edodes*), % ($\bar{X} \pm m$)

Типы патологий деления ядер Т-лимфоцитов		Число клеток с патологиями деления			
		В интактном контроле	После введения адриамицина	После введения экстракта мицелия	После введения экстракта мицелия и последующего введения адриамицина
	Отставание хромосом в метафазе	0,4±0,2	12,2±3,4*	0,4±0,4	0,7±0,3
	Трех- и многополосная метафаза	0,1±0,1	2,5±0,9*	0,3±0,2	0,3±0,2
	Многогрупповая метафаза	0,2±0,1	8,5±2,9*	0,2±0,2	0,4±0,3
	К-митоз	0,4±0,2	0,8±0,4*	0,4±0,1	0,5±0,3
	Отставание хромосом и их фрагментов в ана-телофазе	0,2±0,1	5,3±1,5*	0,2±0,1	0,5±0,2
	Неравнополосная ана-телофаза	0,1±0,1	2,8±0,9*	0,1±0,1	0,8±0,4
	Трех- и многополосная ана-телофаза	0,1±0,1	3,8±1,2*	0,1±0,1	0,6±0,3
	Ана-телофаза с мостами	0,2±0,2	4,2±1,0*	0,2±0,2	0,4±0,3
ИТОГО		1,7±0,5	40,2±6,9	1,9±0,7	4,2±0,9

Если адриамицин существенно снижает митотическую активность культур клеток, подавляя бласттрансформацию Т-лимфоцитов, то экстракты гриба шиитаке при введении в культуры более чем в 2 раза усиливают митотическую активность этих клеток (табл. 3), при этом достоверно увеличивая в культурах и процессы бласттрансформации Т-лимфоцитов.

Установлено, что адриамицин индуцировал снижение общей площади культивируемых клеток, при этом экстракты гриба шиитаке, наоборот, способствовали резкому возрастанию числа крупных клеток, площадь которых достигает более 100 мк² (рис. 1).

Антимутагенные эффекты экстрактов мицелия шиитаке могут быть связаны с влиянием на следующие процессы в культурах Т-лимфоцитов:

- 1) стимуляция ДНК-репаративных процессов;
- 2) инактивирование мутагенных потенций адриамицина;
- 3) защита цитогенетических структур клетки от мутагенного действия адриамицина;
- 4) стимуляция апоптотических процессов;
- 5) активация лимфоцитов-киллеров по устранению генетически дефектных клеток [16].

Известно, что механизм противоопухолевого действия адриамицина связан с индуцированием в клетках свободных радикалов, что вызывает поражение ДНК на стадиях S и G2 [1, 13].

Наличие ана-телофаз с мостами свидетельствует о способности адриамицина к перестройкам с формированием дицентрических хромосом.

Таблица 3

Показатели бласттрансформации и митотической активности Т-лимфоцитов после воздействия экстрактами мицелия шиитаке (*Lentinula edodes*) и адриамицином, % (X±m)

Анализируемый показатель	Интактные культуры (контроль)	Культуры с введением адриамицина	Культуры с введением экстрактов гриба	Культуры после введения экстрактов гриба и последующего введения адриамицина
Митотическая активность	5,3±0,6	1,5±0,3**	12,6±1,2*	8,6±1,0**
Бласттрансформация	58,6±2,1	17,3±2,4*	72,4±4,8*	56,3±2,9

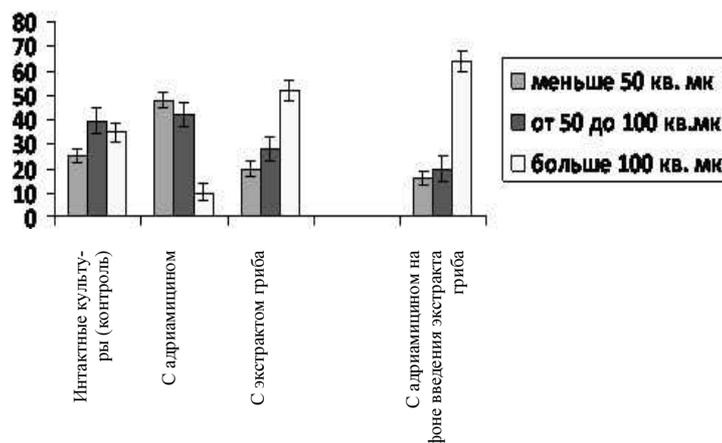


Рис. 1. Площадь ядер в культурах Т-лимфоцитов периферической крови после введения адриамицина и экстрактов мицелия из грибов шиитаке (*Lentinula edodes*)

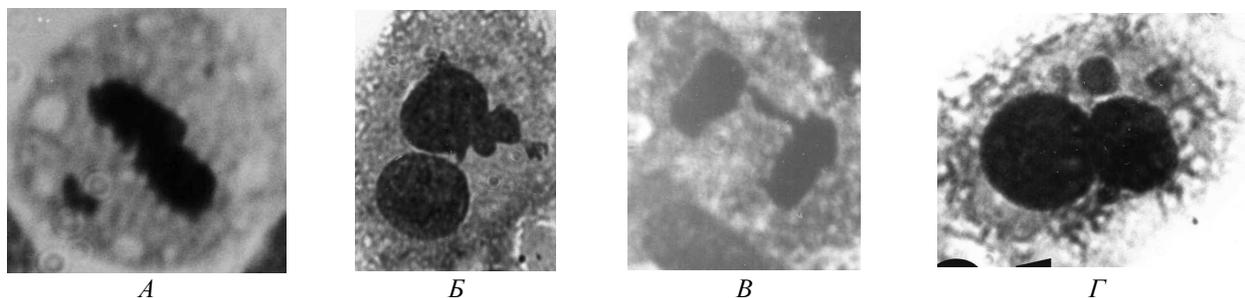


Рис. 2. Патологические изменения Т-лимфоцитов под влиянием адриамицина: А – метафаза с отставшей хромосомой; Б – двуядерный Т-лимфоцит с протрузиями; В – анафаза с мостом; Г – двуядерный Т-лимфоцит с микродренами. Увеличение 10 ок. × 100 об. Окраска азур-эозином

Известна способность экстрактов шиитаке стимулировать лимфоциты-киллеры [18], и мы полагаем, что это может способствовать устранению из культуры генетически дефектных клеток [16].

Появление после совместного воздействия экстрактов и адриамицина клеток с кариорексисом и кариопикнозом, по-видимому, свидетельствует в пользу этой гипотезы, а наблюдаемое повышение

числа клеток с кариолизисом возможно объяснить активацией апоптоических процессов под влиянием компонентов экстрактов грибов шиитаке в условиях культуры клеток.

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что в культурах Т-лимфоцитов, полученных от здоровых доноров, противоопухолевый препарат адриамицин способен индуцировать разнообразные ци-

тологические и цитогенетические изменения. Некоторые из них, такие как отставание хромосом, формирование микроядер способствуют утрате части цитогенетического материала, а кариорексис, кариопикноз и кариолизис – гибели измененных клеток. Введение адриамицина на фоне предварительного введения экстрактов мицелия грибов шиитаке (*Lentinula edodes*) вызывает существенно меньшие цитопатический и цитогенетический эффекты, что свидетельствует о протективном действии некоторых компонентов гриба.

ЛИТЕРАТУРА

1. Новицкий В.В., Переверзева Э.Р., Пономарков В.И. и др. Экспериментально-клинические аспекты некоторых токсических эффектов противоопухолевых препаратов. М. : Изд-во ВНИИМИ, 1987. Сер. Онкология. Вып. 2. 69 с.
2. Дудник Ю.В., Гаузе Г.Ф. Механизмы действия антрациклинов // Экспериментальная онкология. М., 1982. Т. 4, № 5. С. 18–22.
3. Переводчикова Н.И. Клиническая химиотерапия опухолевых заболеваний. М. : Медицина, 1976. 200 с.
4. Wasser S.P., Weis A.L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective // Crit. Rev. Immunol. 1999. Vol. 19, № 1. P. 65–96.
5. Новиков В.И., Карандашов В.И., Сидорович И.Г. Иммунотерапия при злокачественных новообразованиях. М. : Медицина, 1999. 136 с.
6. Поливанов К.А. Предоперационная иммунокоррекция в хирургическом лечении заболеваний желудка : автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2005. 18 с.
7. Shah S.K., Walker P.A., Moore-Olufemi S.D. et al. An evidence-based review of a *Lentinula edodes* mushroom extract as complementary therapy in the surgical oncology patient // Journal of Parenteral. and Enteral. Nutrition. 2011. Vol. 35, № 4. P. 449–458.
8. Grüter A., Friederich U., Würzler F.E. Antimutagenic effects of mushrooms // Mutat. Res. 1990. Vol. 231, № 2. P. 243–249.
9. Lima P.A., Delmanto R.D., Sugui M.M. et al. *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (shiitake) modulates genotoxic and mutagenic effects induced by alkylating agents *in vivo* // Mutat. Res. 2001. Vol. 496, № 1. P. 23–32.
10. Lindequist U., Niedermeyer T.H., Jülich W.D. The pharmacological potential of mushrooms // Evid. Based. Complement. Alternat. Med. 2005. Vol. 2, № 3. P. 285–299.
11. Moorhead P.S., Novel P.C., Mellman W.J. et al. Chromosome preparations of leukocyte cultured from human peripheral blood // Exptl. Cell Res. 1960. Vol. 20. P. 613–516.
12. Ильинских Н.Н., Новицкий В.В., Ванчугова Н.Н., Ильинских И.Н. Микроядерный анализ и цитогенетическая нестабильность. Томск : Изд-во Том. ун-та, 1992. 272 с.
13. Ильинских Н.Н., Васильев С.А., Крайцов В.Ю. Микроядерный тест в скрининге и мониторинге мутагенов. Saarbrücken : Lambert Academic Publishing, 2011. 524 с.
14. Ильинских И.Н., Новицкий В.В., Ильинских Е.Н. и др. Инфекционная кариопатология. Томск : Изд-во Том. ун-та, 2005. 196 с.
15. Боровиков В.П., Боровиков И.П. Статистический анализ и обработка данных в среде Windows. М. : Филинь, 1997. С. 608.
16. Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Бочаров Е.Ф. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет. Новосибирск : Наука, 1986. 250 с.
17. Shah S.K., Walker P.A., Moore-Olufemi S.D. et al. An evidence-based review of a *Lentinula edodes* mushroom extract as complementary therapy in the surgical oncology patient // Journal of Parenteral. and Enteral. Nutrition. 2011. Vol. 35, № 4. P. 449–458.
18. Terakawa N., Matsui Y., Satoi S. Immunological effect of active hexose correlated compound (AHCC) in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled trial // Nutrition and Cancer. 2008. Vol. 60, № 5. 643–651.
19. Засухина Г.Д. Репаративные механизмы клеток и проблемы окружающей среды. М. : Наука, 1979. 183 с.

Статья представлена научной редакцией «Биология» 26 декабря 2011 г.