

Ispitivanje uticaja čaja *Ganoderma lucidum* na količinu antitela u krvi miša

Ispitivan je uticaj čaja Ganoderma lucidum na imunomodulaciju u krvi miša. Eksperimentalne životinje u grupi „čaj“ su tretirane čajem Ganoderma lucidum u cilju stimulisanja imunog odgovora i produkcije antitela. Životinje u grupi „vakcina“ su vakcinisane vakcinom protiv gripa pod pretpostavkom da osim nespecifične stimulacije proizvodnje antitela može doći i do specifične proizvodnje antitela na sastojke iz gljive Ganoderma lucidum, dok su životinje u grupi „čaj+vakcina“ vakcinisane i tretirane čajem. Pokazano je da ovaj čaj stimuliše proizvodnju antitela u krvi ispitivanih miševa. Takođe, pokazano je da dolazi do neočekivanih interakcija u grupi miševa koji su tretirani i čajem i vakcinom protiv gripa. Radi objašnjenja dobijenih rezultata neophodno je sprovesti dalja istraživanja.

Uvod

Poznato je da određeni čajevi stimulišu imuni odgovor. Primer stimulatora je *Ganoderma lucidum* (P. Karst) je jedna od najpoznatijih tradicionalnih kineskih gljiva koja se već 2000 godina koristi u medicinske svrhe na dalekom istoku.

Pokazano je da intracelularni i ekstracelularni polisaharidi iz gljive *Ganoderma lucidum* inhibiraju rast nekoliko vrsta kancerogenih ćelija. Ova gljiva proizvodi mnoge oksidovane triterpene, naročito genodermne kiseline sa različitim biološkim funkcijama, kao što su citotoksični efekat na ćelije hepatoma, inhibicija lučenja histamina, inhibicija sinteze i absorpcije holesterola, stimulacija agregacije trombocita i inhibicija trombinom indukovane agregacije trombocita. Pokazano je i antibakterijsko dejstvo ekstrakta iz *Ganoderma lucidum* na određene mikroorganizme (Klaus i Nikšić 2007)

Antitela odnosno imunoglobulini su glikoproteini prisutni u krvi, limfnom sistemu, tkivima kao i membranama sluzokože. Antitela su simetrične strukture i izgrađena su od dva identična laka i dva identična teška lanca. Produkuju se u formi integralnih membranskih proteina na površini B-limfocita i u sekretovanoj formi od strane antigenom stimulisanih B-ćelija koja su distribuirana u plazmi, mukoznim sekretima i intersticijalnoj tečnosti. Antitela su ključni molekuli stečenog imunog sistema i doprinose imunitetu na tri načina: sprečavaju prodiranje patogena i oštećivanje ćelija od strane patogena vezujući se za iste, stimulišu eliminaciju patogena posebnim vrstama ćelija, kao što su makrofagi, i pokreću procese uništenja patogena određenim imunim odgovorima kao što je komplement.

Nekoliko istraživanja je pokazalo da polisaharidi iz gljive *Ganoderma lucidum* moduliraju funkcije imunog sistema i u eksperimentima *in vivo* i eksperimentima *in vitro* (Lin 2005). Efekti izazvani polisaharidima iz *Ganoderma lucidum* na imunomodulaciju su obimni i uključuju poboljšanje funkcije antigen prezentujućih ćelija, mononuklearnog fagocitnog sistema i ćelijskog imuniteta. Nedavno je pokazano da je mehanizam antikancerogenog delovanja polisaharida iz *Ganoderma lucidum* povezan sa imunitetskim mehanizmima (Lin 2005).

U ovom radu ispitivan je uticaj čaja *Ganoderma lucidum* na količinu antitela u krvi miša.

Materijal i metode

Istraživanje je sprovedeno na modelu *in vivo*. Eksperimentalne životinje su podeljene u 4 grupe. U grupi „čaj“ životinje su tretirane čajem od *Ganoderma lucidum* u cilju stimulisanja proizvodnje antitela, u grupi „vakcina“ životinje su vakcinisane vakcinom protiv sezonskog gripa pod pretpostavkom da osim nespecifične stimulacije proizvodnje antitela

Anđelika Kalezić (1993), Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 56, učenica 1. razreda Medicinske škole „7. April“ u Novom Sadu

MENTORI:

Luka Mihajlović, Hemijski fakultet, Beograd

Ana Parabicki, Institut „Siniša Stanković“, Beograd

može doći i do specifične proizvodnje antitela na sastojke iz gljive *Ganoderma lucidum*, dok su u grupi „čaj+vakcina“ životinje i vakcinisane i tretirane čajem od *Ganoderma lucidum*.

Određivanje koncentracije proteina iz krvnih seruma Bradfordovom metodom je izvršeno radi normalizacije uzoraka u cilju poređenja relativne količine antitela.

Urađena je SDS-PAGE elektroforeza na osnovu koje je dobijen imunoblot kojim su upoređene količine antitela kod ispitivanih grupa eksperimentalnih životinja.

Priprema čaja od *Ganoderma lucidum*. 5 g suvih delova gljive je potopljeno u 3 dL vode na nekoliko sati, nakon čega su u istoj vodi kuvani 45 minuta.

Vakcinacija eksperimentalnih životinja izvršena je intramuskularno VAXIGRIP vakcinom (proizvođač: Sanofi Pasteur/Lion, Francuska). VAXIGRIP je inaktivisani rascepani virus gripa koji sadrži antigene ekvivalentne sledećim sojevima: A/Barisbane/59/2007 (H1N1; A/Barisbane/10/2007 (H3N2; B/Florida/4/2006) Ekscipijensi koji se u vakcini nalaze su: puferski rastvor koji sadrži natrijum-hlorid, natrijum-hidrogenfosfat dihidrat, kalijum-hlorid i vodu za injekcije. Cilj vakcinacije je bio izazivanje imunog odgovora kod domaćina. Grupa „vakcina“ predstavljala pozitivnu kontrolu pod pretpostavkom da osim nespecifične stimulacije proizvodnje antitela može doći i do specifične proizvodnje antitela na sastojke iz gljive *Ganoderma lucidum*. Doza vakcine određena je Klarkovom formulom.

Uticaj gljive *Ganoderma lucidum* ispitivan je na modelu in vivo. Korišćeni su miševi soja NMRI, muškog pola, starosti oko šest meseci. Miševi su bili prosečne težine oko 30 g. U ispitivanju je korišćeno 20 miševa raspoređenih u 4 grupe od po 5 miševa: fiziološka kontrola, čaj (miševi su tretirani čajem), vakcina (miševi su vakcinisani prvog dana tretiranja), čaj+vakcina (miševi su vakcinisani i tretirani čajem). Grupama tretiranim čajem celodnevna voda zamenjena je čajem od *Ganoderma lucidum*, tretiranje je trajalo 10 dana. Miševi su hranjeni karakterističnom hranom za sitne glodare i čuvani su pod istim uslovima na sobnoj temperaturi.

Nakon desetog dana tretmana miševi su žrtvovani dekapitacijom. Neposredno pre dekapitacije izvršena je nekroza etrom. Uzeta je krv svakog miša iz svih grupa.

Određivanje koncentracije proteina iz krvnih seruma Bradfordovom metodom. Bradfordova metoda je kolorimetrijska metoda za određivanje koncentracije proteina. Ova metoda se zasniva na promeni crvene boje Commassie Brilliant Blue G, koja je u dvostruko protonovanoj formi, u stabilnu plavu koja se postiže vezivanjem za proteine. Tokom formiranja kompleksa Commassie Brilliant Blue G boja-protein događaju se interakcije koje podrazumevaju dva tipa veze. Crvena forma boje prvo daje protone onim grupama proteina koje se mogu jonizovati, što dovodi do remećenja nativnog stanja proteina, pri čemu dolazi do izlaganja hidrofobnih džepova proteina (remeti se tercijska struktura proteina). Ovi hidrofobni džepovi se nekovalentno vezuju za nepolarne regione boje van der Waals-ovim silama, tako da pozitivne amino grupe proteina postavljaju naspram negativno naelektrisanih delova boje. Veza se zatim pojačava njihovim jonskim interakcijama. Vezivanje proteina stabilizuje plavu formu boje Commassie Brilliant Blue G. Za standardnu krivu je korišćen BSA (Vujčić 2002).

Elektroforeza proteina seruma izvršena je na SDS-PAGE sistemu (Laemmli 1970).

Imunoblot-mokar elektrotransfer. Za imunoblot je korišćen isti gel kao i za elektroforezu. Nakon elektroforeze proteini seruma su transferovani na nitroceluloznu membranu 45 minuta, sa gustinom struje od 1 mA/cm². Membrana je blokirana odmašćenim mlekom (5%) tokom 2 sata, nakon čega su dodata antimišja kozja antitela sa kuplovanom alkalnom fosfatazom (proizvođač Sigma GmBH), po uputstvima proizvođača. Imunoblot je razvijan na standardni način (Hempelmann 1987). Za obradu rezultata dobijenih imunoblot tehnikom korišćeni su softverski paketi Origin 8.5 i ImageQuant.

Rezultati i diskusija

Na osnovu optičke gustine traka izračunata je relativna količina antitela po uzorku i rezultati su statistički obrađivani ANOVA testom, nakon čega je izvršen Šefeov test.

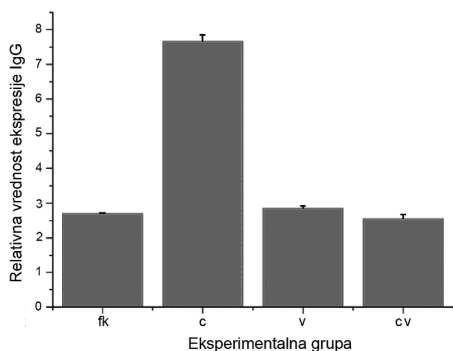
Na grafiku 1. je prikazana količina antitela po grupama eksperimentalnih životinja. U grupi čaj je došlo do statistički značajnog povećanja količine antitela dok je u grupi vakcina količina antitela ostala približno ista. U grupi čaj+vakcina je vakcina najverovatnije inhibirala dejstvo sastojaka iz *Ganoderma lucidum* na produkciju antitela pa je i u ovoj

grupi količina antitela ostala približno ista kao i u grupi vakcina u odnosu na kontrolnu grupu.

U grupi vakcina očekivano je da će vakcinacija životinja stimulisati imuni odgovor te da će doći i do povećane produkcije antitela. Za grupu „čaj“ je pretpostavljeno da će sastojci iz gljive *Ganoderma lucidum* stimulisati imuni odgovor, pa time i produkciju antitela, dok je u grupi „čaj+vakcina“ očekivana najveća produkcija antitela.

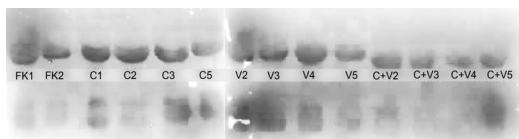
Dobijeni rezultati ne odgovaraju očekivanim, i mehanizam kojim je došlo do ovakve imune reakcije nije poznat.

Određivanje koncentracije proteina iz krvnih seruma je izvršeno Bradfordovom metodom radi normalizacije uzoraka u cilju poređenja relativne količine antitela. Na slici 3 prikazane su koncentracije proteina iz krvnog seruma eksperimentalnih ži-



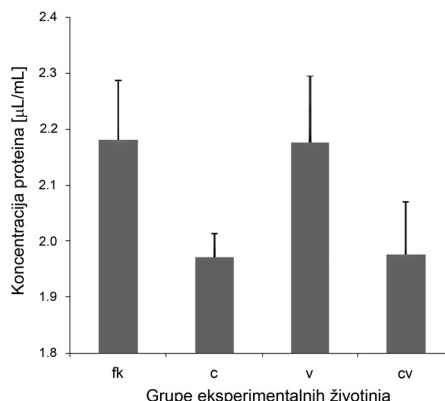
Slika 1. Količina antitela po grupama eksperimentalnih životinja; fk – fiziološka kontrola, c – grupa „čaj“, v – grupa „vakcina“, cv – grupa „čaj+vakcina“.

Figure 1. Quantity of antibodies by groups of experimental animals; fk – physiological control, c – tea group, v – vaccine group, cv – tea-vaccine group.



Slika 2. Prikaz NC membrane na kojoj je detektovano prisustvo antitela

Figure 2. NC membrane with detected antibodies



Slika 3. Koncentracija proteina u krvnim serumima po grupama eksperimentalnih životinja

Figure 3. Concentration of proteins in blood serum by groups of experimental animals

votinja. Sa grafika se vidi da su kontrolna grupa i grupa vakcina imale približno istu koncentraciju proteina. Grupe čaj i vakcina+čaj su takođe imale približno iste vrednosti koncentracije proteina, mada je koncentracija proteina u ovim grupama znatno manja od koncentracije proteina u kontrolnoj grupi i grupi vakcina.

Zaključak

Istraživanje je pokazalo da čaj od gljive *Ganoderma lucidum* ima određeni uticaj na imuni odgovor a samim tim i na produkciju antitela. Dobijenim rezultatima je utvrđeno da sastojci iz *Ganoderma lucidum* stimulišu produkciju antitela. Međutim u kombinaciji sa vakcinom protiv gripa nije došlo do očekivanog efekta, najverovatnije jer je vakcina inhibirala dejstvo sastojaka iz *Ganoderma lucidum*.

Literatura

Hempelmann E., Heiner Schirmer R., Fritsch G., Hundt E., Gröschel-Stewart U. 1987. Studies on glutathione reductase and methemoglobin from human erythrocytes parasitized with *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **23**: 19.

Jakovljević V. 2006. *Eksperimentalna farmakologija u naučno-istraživačkom radu*. Novi Sad: Alfa graf

Klaus A., Nikšić M. 2007. Influence of the extracts isolated from *Ganoderma lucidum* mushroom on some microorganisms. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 113: 219.

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 630.

Lin Z. B. 2005. Cellular and Molecular Mechanisms of Immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *Journal of Pharmacological Sciences*, **99**: 144.


Vujčić Z. 2002. *Eksperimentalna biohemija – Praktikum*. Beograd: Rantec

fluids and tissues. Antibodies contribute to the immune system in three ways: stopping microorganisms from breaking through and damaging the cell by bonding with pathogens, stimulating the elimination of pathogens with particular kinds of cells like macrophages, and starting the process of destroying pathogens with certain immune responses like complements.

The aim of this experiment was the examination of the influence of the *Ganoderma lucidum* tea on the quantity of antibodies in the blood of mice.

The influence of the *Ganoderma lucidum* mushroom was investigated on an in vivo model. During the testing, 20 mice were distributed into 4 groups of 5 mice: physiological control, tea (mice were treated with tea), vaccine (mice were vaccinated on the first day of testing), tea+vaccine (mice were being vaccinated and treated with tea).

The concentration of proteins in blood serum was measured with the method developed by Bradford. For the calibration line BSA was used (Vujčić 2002). Electrophoretic analysis SDS-PAGE was made with the method by Laemmli (Laemmli 1970). The optical quantify of proteins in the blood serum was also measured with the immunoblot-semidry electrotransfer technique. (Hempelmann 1987)

The results showed that there was a statistically significant increase in the amount of antibodies in the group Tea, while the amount of antibodies in the group Vaccine remained approximately the same. In the group Tea+Vaccine the vaccine most probably inhibited the effects of the ingredients from *Ganoderma lucidum* in the production of antibodies, so the amount of antibodies in this group also remained approximately the same as in the Vaccine group in comparison to the Control group. The results do not match the expected, and the mechanism that caused this immune response is not known. In the next period histological analysis of the tissue from isolated organs will also be performed. Future research is needed, and it will be based on exploring the exact mechanism by which ingredients from the mushroom *Ganoderma lucidum* affect immune modulation. 

Andjelika Kalezić

Influence of *Ganoderma lucidum* Tea on Immunomodulation in the Blood of Mice

It is known that certain teas stimulate immune responses. An example of a stimulator is *Ganoderma lucidum* (Leyss. Ex Fr.) Karst, one of the most famous traditional Chinese mushrooms that has been used for medical purpose in the Far East for 2000 years.

Antibodies or immunoglobulines are glycoproteins which are produced as results of stimulating antigens. Antibodies are found in blood, other body