



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **97452** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
G01N 35/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|--|--|
| (21) Номер заявки: u 2014 11786 | (72) Винахідник(и): Підченко Віталій Тарасович (UA), Ніженковська Ірина Володимирівна (UA), Бісько Ніна Анатоліївна (UA), Бичкова Ніна Григоріївна (UA), Родніченко Анжела Євгеніївна (UA) |
| (22) Дата подання заявки: 31.10.2014 | |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.03.2015 | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.03.2015, Бюл.№ 5 | (73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, бул. Шевченка, 13, м. Київ-4, 01601 (UA) |

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ІМУНОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ВОДНОГО РОЗЧИНУ МІЦЕЛІЮ ГРИБА GANODERMA LUCIDUM

(57) Реферат:

Спосіб оцінки імунотоксичної дії водного розчину міцелію гриба Ganoderma Lucidum в експерименті, що включає дослідження крові, причому додатково визначають загальну кількість лейкоцитів периферійної крові та лейкоцитарної формули, реакції бласттрансформації лімфоцитів на Т-клітинні мітогени (ФГА та Кон-А) та на В-клітинний мітоген (ЛПС) до і після лікування, розраховують співвідношення їх по відношенню до контролю і при зміні показників оцінюють ступінь імунотоксичної дії водного розчину міцелію гриба Ganoderma Lucidum.

UA 97452 U

Корисна модель, що заявляється, належить до медицини, а саме до фармакотерапії, і може бути використана для оцінки ефективності імунотоксичної дії водного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum* в експерименті.

Одним з найважливіших питань клінічної медицини є ґрунтовне вивчення закономірностей розвитку побічних ефектів лікарських засобів

Пошук та розробка імунomodulatorів рослинного походження з метою застосування їх у комплексній терапії хворих з різною соматичною патологією, інфікованих вірусними, бактеріальними, грибковими та атипичними збудниками є актуальною проблемою. Увагу дослідників багатьох країн світу привертають до себе природні об'єкти, зокрема їстівні гриби, які використовуються не тільки як продукти харчування, але і як цінну сировину для одержання речовин лікувально-профілактичної і лікувальної дії. Більшість традиційних знань про лікувальні властивості грибів походить з Далекого Сходу, де здавна вирощуються, культивуються та використовуються такі базидіальні гриби, як *Ganodermalucidum* (трутовик лакований), *Lentinusedodes* (шиїtake), *Coriolusversicolor* (трутовик різнокольоровий) та ін. (1).

Один з найвідоміших базидіальних грибів - *Ganodermalucidum* (трутовик лакований). Дослідження *Ganodermalucidum* останніх років призвели до виділення з нього біологічно-активних речовин, що мають імунomodulatory, протипухлинні, противірусні, антибіотичні, гепатопротекторні, антиоксидантні, гіполіпідемічні, гіпоглікемічні, генопротекторні властивості, здатні регулювати роботу серцево-судинної, дихальної та нервової системи. (2). Більшість з перерахованих вище біологічних ефектів, в тому числі і протипухлинна дія, обумовлена імунomodulatory властивостями гриба. Не дивлячись на те, що загальна кількість публікацій, присвячених *Ganodermalucidum*, значна, відчувається дефіцит досліджень найбільш перспективних для практичного використання штамів гриба. З огляду на роль профілактичного напрямку в охороні здоров'я населення України, проблема розробки біологічно-активних продуктів на основі рослинної сировини з адаптогенними та імуностимулюючими властивостями є надзвичайно актуальною. Не менш важливим аспектом проблеми є пошук та розробка імунomodulatorів з метою застосування їх у комплексній терапії хворих з різною соматичною патологією, інфікованих вірусними, грибковими та атипичними збудниками.

В численних дослідках *invitro* та *invivo* було показано, що водні екстракти плодів тіл, спор і міцелію *G. Lucidum* та виділені з них полісахаридні фракції та індивідуальні полісахариди, а також деякі тритерпени і білок LZ-8, мають виражені імунomodulatory властивості. Характер дії біологічно-активних речовин *G. Lucidum* на імунну систему різноманітний та включає в себе вплив на функції гуморального та клітинного імунітету. Найбільш важливими біологічно активними речовинами, що проявляють імунomodulatory активність є полісахариди, зокрема β -D-глюкани.

Незважаючи на велику кількість досліджень по вивченню впливу окремих біологічно-активних речовин, виділених з міцелію, плодового тіла, спор гриба *Ganodermalucidum* на стан імунітету, цікавим залишається вивчення можливості застосування міцелію гриба *Ganodermalucidum* для корекції імунodefіцитних станів.

Найбільш близьким за технічним вирішенням до способу, що заявляється, є спосіб використання димедролу, що має імунотоксичні властивості (3), який виступає як прототип. Однак, цей спосіб не дозволяє прогнозувати ефективність імунотоксичної дії.

Для вивчення імунотоксичної дії дослідного лікарського засобу застосовують методи дослідження, які дозволяють оцінити функціональний стан різних ланок системи імунітету.

Задача корисної моделі, що заявляється, полягає у вивченні впливу водного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum* на фактори неспецифічного імунітету, на активність факторів, що беруть участь у специфічному імунітеті та на клітинну імунну відповідь при курсовому введенні.

Існуючі на даний час способи оцінки ефективності імунотоксичної дії водного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum* відсутні.

Технічний результат, що досягається від вирішення задачі, на відміну від прототипу полягає у підвищенні точності оцінки ефективності імунотоксичної дії водного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum* за рахунок дослідження загальної кількості лейкоцитів периферійної крові та лейкоцитарної формули, реакції бласттрансформації лімфоцитів на Т-клітинні мітогени (ФГА та Кон-А) та на В-клітинний мітоген (ЛПС).

За доступними літературними даними такий спосіб оцінки ефективності імунотоксичного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum* не відомий.

Поставлена задача вирішується тим, що у відомому способі, який включає дослідження крові, згідно з корисною моделлю, додатково визначають загальну кількість лейкоцитів периферійної крові та лейкоцитарної формули, реакції бласттрансформації лімфоцитів на Т-клітинні мітогени (ФГА та Кон-А) та на В-клітинний мітоген (ЛПС) до і після лікування,

розраховують співвідношення їх по відношенню до контролю і при зміні показників оцінюють ефективність імунотоксичної дії водного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum*.

Переваги цього способу: простота у проведенні досліджень і визначенні показників.

Спосіб здійснюється наступним чином:

5 Дослідження імунотоксичної дії проводили на статевозрілих (віком 3-5 міс.) тваринах: мишах-самцях лінії СВА/Са. Тварини були розподілені на 5 груп: контрольні, які отримували розчинник та опитні, які протягом місяця отримували водний розчин міцелію гриба *Ganoderma Lucidum* у різних дозах: з розрахунку 0,01 мг на 20 гр маси тіла; 0,1 мг на 20 гр маси тіла; 1 мг на 20 гр маси тіла або 10 мг на 20 гр маси тіла.

10 Об'єм імунологічних досліджень включав визначення:

1. Факторів, що беруть участь у специфічному імунитеті: оцінка впливу препаратів на масу та клітинність лімфоїдних органів, формулу крові (визначення загальної кількості лейкоцитів периферійної крові та лейкоцитарної формули) та реакцію бласттрансформації лімфоцитів на Т-клітинні мітогени (ФГА та Кон-А) та на В-клітинний мітоген (ЛПС).

15 2. Дослідження факторів неспецифічного імунитету: фагоцитарна активність перитонеальних макрофагів.

3. Визначення Т-клітинного імунитету: реакція гіперчутливості повільного типу (4).

20 Забір крові у лабораторних тварин та отримання сироватки. Для евтаназії мишей застосовували передозування ефіру медичного для наркозу (5). Після проведення процедури евтаназії тварин проводили процедуру забору крові з орбітального синусу шляхом енукеації. Кров центрифугували при 1500 об/хв протягом 15 хвилин. Сироватку відбирали в пробірки. Відібрану сироватку використовували (після заморожування при -20°C) для визначення титрів гемолізинів і гемаглютининів (6).

25 Виділення лімфоїдних органів. Одразу після видалення селезінки або тимус занурювали до розчину Хенксу, який містив в собі 10 % сироватки ембріонів корів (СЕК). Селезінку гомогенізували в 3,0-5,0 мл розчину Хенксу, тимус гомогенізували в 1,0 мл розчину Хенксу. Подрібнену у гомогенізаторі тканину переносили у центрифужні пробірки, фільтруючи її через капроновий фільтр. Пробірки з клітинами центрифугували 10 хв при 1500 об/хв та температурі $+4^{\circ}\text{C}$. Після центрифугування зливали надосад, відбирали клітини для підрахунку. Підрахунок загальної кількості клітин проводили у камері Горяєва з використанням 3 % оцтової кислоти, що дозволяє вилучити з обліку еритроцити (7).

Відносну масу тимуса та селезінки розраховували як відсоток співвідношення маси тимуса або селезінки до маси тіла.

35 Індекс заселення лімфоїдними клітинами тимуса та селезінки розраховували як співвідношення кількості клітин в органі до маси органу.

Виділення клітин кісткового мозку. Одразу ж після видалення стегнові кістки вміщували до чашки Петрі. Стегнові кістки ретельно відокремлювали від м'яких тканин, ножицями зрізали епіфізи. Вилучали клітини шляхом вимивання розчином Хенксу (в об'ємі 1,0 мл) з додаванням 15 % СЕК за допомогою шприца з ін'єкційною голкою. Відбирали клітини для підрахунку. 40 Підраховували кількість клітин у камері Горяєва [Лимфоциты. Методы: Пер. с англ. / Под. ред. Дж. Клауса. - М.: Мир, 1990. - 395 с.].

Виділення клітин перитонеального ексудату тварин. Одразу ж після забою в черевну порожнину миші вводили 5 мл забуференого фізіологічного розчину (рН 7,4), що містило 20 од/мл гепарину та 1 % сироватки ембріонів корів. Протягом 1-2 хвилин миші масажували живіт, 45 потім робили розріз передньої стінки живота та за допомогою шприца відсмоктували рідину із різних відділів черевної порожнини. Відбирали клітини для підрахунку у камері Горяєва (7).

Підготовка, фіксація, фарбування мазків крові. Лейкоцитарна формула. Приготування мазків. Утримуючи предметне скло за довгі краї помішували на його поверхню краплину свіжої крові. Приставляли шліфоване скло вузьким краєм до скла з кров'ю зліва від краплі під кутом 50 45° та просували його вправо до зіткнення з кров'ю. Чекали, поки кров розійдеться по всьому ребру шліфованого скла, а потім легким рухом вели його справа наліво до тих пір, поки не буде вичерпана крапля крові. Крапля повинна бити невеликою і поміщена на склі не доходючи 1-1,5 см до його країв. Не можна сильно натискати на скло, так як можна ушкодити клітини. На чистому та висушеному склі маркером або олівцем відмічали номер мазка та дату. Після 55 приготування мазки сушили на повітрі до зникнення вологого блиску.

60 Комбіноване фарбування фіксатором - барвником Май-Грюнвальда та фарбою Романовського. Фіксація базується на обробці мазків фіксуючими рідинами, що надають форменим елементам стійкості по відношенню води, що міститься в фарбах, яка без фіксації мазків гемолізує еритроцити та видозмінює будову лейкоцитів. Комбіноване фарбування дає можливість диференціювати складові частини клітин.

На нефіксований мазок наливали піпеткою 10-15 крапель готової фарби-фіксатора Май-Грюнвальда, через 3 хвилини вносили по краплях стільки ж води та продовжували фарбування 1 хвилину, після чого фарбу змивали водою, а мазок висушували на повітрі. Готували розчин фарби Романовського: 1-2 краплі фарби на 1 мл дистильованої води. На підсушений мазок

наливали свіжепідготовлений розчин фарби Романовського на 15 хвилин, змивали фарбу водою і мазок висушували на повітрі.

Оцінка результатів. Лейкоцитарну формулу підраховували в зафарбованих мазках крові. Лейкоцити периферичної крові діляться на гранулоцити (нейтрофіли, еозинофіли, базофіли) і агранулоцити (лімфоцити, моноцити).

Знаходили 200 лейкоцитів та виражали співвідношення окремих їх видів в процентах. Оскільки більш крупніші форми клітин (моноцити, нейтрофіли) розміщуються більш по периферії, впродовж верхнього і нижнього країв мазка, а більш менші (лімфоцити) знаходяться близько до його центру, підрахунок проводять завжди по одній і тій же системі: половину клітин підраховують на одній поздовжній стороні мазка, а іншу - на протилежній його стороні. Підрахунок проводять по зигзагу: 3-4 поля зору по краю мазка, потім 3-4 поля зору під прямим кутом в середині мазка, потім продовжують підрахунок в 3-4 полях зору паралельно краю мазка і повертаються знову до краю мазка, рахуючи також 3-4 поля. Такий рух при підрахунку продовжують до тих пір, поки не підрахують половину клітин, а потім переходять на протилежний край, де підраховують іншу половину. Краще вести підрахунок в самому тонкому місці ближе до кінця мазка, де добре видно структуру клітин, а не на початку мазка, де шар крові самий товстий.

Лейкоцитарна формула дає уяву тільки про відносні величини (в %). Тому, визначивши процентний склад окремих видів клітин, обчислювали абсолютну їх кількість, тобто визначають скільки клітин кожного виду клітин знаходиться в 1 мкл крові за формулою:

абсолютна кількість лімфоцитів = $A \times B / 100$, де A - кількість лімфоцитів в %, B - загальна кількість клітин в 1 мкл крові (8).

Визначення загальної кількості еритроцитів периферичної крові мишей. До 4 мл 0,9 % розчину хлориду натрію вносили по 5 мкл свіжої периферичної крові (розведення 1:800). Суспензію обережно ресуспендували. Краплю суспензії клітин вносили до камери Горяєва. Після заповнення камеру залишали на 1 хвилину в спокої для осідання формених елементів крові. Підраховували еритроцити у 5 великих квадратах ($5 \times 16=80$ малих) під мікроскопом. Враховували не менш 200 клітин. Оцінка результатів.

Концентрація еритроцитів (кількість клітин в 1 мкл крові) визначали за формулою:

$$X = a \times 4000 \times v / c,$$

де X - кількість клітин в 1 мкл крові; a - кількість клітин, підрахованих в певній кількості малих квадратів; v - ступінь розведення крові, 1/4000 мкл - об'єм малого квадрата; перемножуючи на 4000 приводимо до об'єму 1 мкл крові; c - кількість підрахованих малих квадратів.

З урахуванням нашого розведення формула набула такого кінцевого вигляду:

$$X = a \times 4000 \times 800 / 80 = a \times 40\,000$$

Концентрацію еритроцитів виражали в $\times 10^{12}/л$ (8).

Визначення загальної кількості лейкоцитів периферичної крові мишей. До 90 мкл 3 розчину оцтової кислоти вносили по 10 мкл периферичної крові (розведення 1:10). Суспензію обережно ресуспендували. Краплю суспензії клітин вносили до камери Горяєва. Після заповнення камеру залишали на 1 хвилину в спокої для осідання формених елементів крові. Підраховували лейкоцити у 5 великих квадратах ($5 \times 16=80$ малих) під мікроскопом. Враховувалося не менш 200 клітин.

Оцінка результатів.

Концентрація лейкоцитів (кількість клітин в 1 мкл крові) визначали за формулою:

$$X = a \times 4000 \times v / c,$$

де X - кількість клітин в 1 мкл крові; a - кількість клітин, підрахованих в певній кількості малих квадратів; v - ступінь розведення крові, 1/4000 мкл - об'єм малого квадрата; перемножуючи на 4000 приводимо до об'єму 1 мкл крові; c - кількість підрахованих малих квадратів.

З урахуванням нашого розведення формула набула такого кінцевого вигляду:

$$X = a \times 4000 \times 10 / 80 = a \times 500$$

Концентрацію лейкоцитів виражали в $\times 10^9 / л$ (8).

Визначення фагоцитарної активності перитонеальних макрофагів. Виділяли клітини перитонеального ексудату. Готували розчин латексу в концентрації $2,5 \cdot 10^8$ мл середовища RPMI-1640. Отриману клітинну суспензію відмивали у середовищі RPMI-1640. Суспензію клітин доводили до концентрації $2,5 \cdot 10^6$ мл, потім 0,2 мл цієї суспензії нашаровували на чисті покривні скельця, розміром 18×18 мм, які були розташовані у шестилункових стерильних планшетах і

інкубували протягом 60 хвилин у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ при 37 °С. Після інкубації неадгезовані клітини змивали зі скелець теплим розчином 0,9 % NaCl, послідовно занурюючи їх у три стакани. Клітини, що прилипли до скла, утворюють збагачений макрофагами моношар. На отриманий моношар наносили 0,2 мл суспензії латексу у середовищі RPMI-1640 та інкубували

45 хв у зволоженій атмосфері з 3 % CO₂ при 37 °С. Потім скельця змивали, занурюючи їх у стакани з теплим фізіологічним розчином, висушували, а клітини фіксували у парах 4 % параформальдегіду, приготовленого на розчині Хенксу (pH 7,4), після чого фарбували за Романовським-Гімза.

У світловому мікроскопі підраховували не менш 200 макрофагів, визначаючи показники функціональної активності: фагоцитарну активність, фагоцитарне число та фагоцитарний індекс. Фагоцитарна активність - процент активних макрофагів до загального числа підрахованих перитонеальних макрофагів. Фагоцитарне число - кількість часточок латексу, які поглинулися одним макрофагом. Фагоцитарний індекс - кількість клітин, здатних до фагоцитозу часточок латексу (4).

Реакція бласттрансформації лімфоцитів під впливом Т - та В-клітинних мітогенів. Проліферативну відповідь Т - та В-лімфоцитів на мітогени оцінювали за здатністю активованих лімфоцитів метаболізувати бромід-3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолій (МТТ) з утворенням нерозчинного МТТ-формазану. Ефективність такого перетворення відображає загальний рівень дегідрогеназної активності клітин і прямопропорційна концентрації живих клітин. Для постановки реакції бласттрансформації спленоцити мишей культивували (у концентрації 4·10⁶/мл) у стерильних скляних пробірках у 0,5 мл середовища RPMI-1640, яке містило 10 % інактивованої СЕК, 10 мМ 2-меркаптоетанолу, 20 мМ HEPES, 100 Од/мл бензилпеніциліну, 0,1 мг/мл стрептоміцину, 0,01 мг/мл ФГА, 0,005 мг/мл Кона або 0,03 мг/мл ЛПС. Проліферативну активність лімфоцитів оцінювали через 72 год. культивування.

За 2 год. до кінця інкубації спленоцити (2·10⁶ кл/0,1 мл середовища) переносили до 96-лункового плоскостонного планшету та вносили по 0,01 мл 0,5 % розчину МТТ. Через 2 год. інкубації при 37 °С утворені кристали формазану розчиняли у 0,15 мл 0,04 моль/л розчину HCl на ізопропіловому спирті. Вміст лунок добре перемішували до повного розчинення кристалів, центрифугували 10 хв. при 1500 об/хв. Надосад переносили до чистого планшету та вимірювали оптичну щільність надосаду на мікропланшетному фотометрі "Multiskan EX" при довжині хвилі 492 нм. Результати представляли у вигляді індексу проліферації ІП (умовні одиниці), який розраховувався за формулою: ІП = оптична щільність у пробах мітогенактивованих культур спленоцитів/оптична щільність у пробах контрольних культур (9).

Реакція гіперчутливості повільного типу (РГПТ). По закінченні курсового введення дослідного препарату мишей імунізували одноразовим внутрішньочеревним введенням еритроцитів барана в дозі 2·10⁵ клітин в об'ємі 0,5 мл фізіологічного розчину на 20 г маси тіла. Через 5 діб експериментальним тваринам в підшову задньої лівої лапи (дослідної) вводили 10 еритроцитів барана в об'ємі 0,02 мл (завершальна ін'єкція), а в праву (контрольну) лапу вводили ізотонічний фізіологічний розчин в такому ж об'ємі. Контрольні групи отримували тільки еритроцити барана але не отримували дослідний препарат. Оцінку реакції проводили через 24 години по різниці мас дослідної (Д) і контрольної (К) лап. Для цього обидві лапки відрізали одразу ж після забою тварин вище п'яtkового суглоба.

Індекс реакції (ІР) обчислювали для кожної тварини за формулою:

$$IP = D - K / K * 100 \%$$

Експериментальні дані оброблялися загальноприйнятими методами варіаційної статистики. Кількісні характеристики випадкових величин представлені у вигляді середніх значень (М) та помилок середніх значень (m). Розрахунки проводились за допомогою комп'ютерних програм "Statistica 6.1" та "Exell".

Значущість розбіжностей показників оцінювалася за критерієм Стюдента (t) (у разі нормального розподілу) або за критерієм Вілкоксона-Манна-Уїтні (U) (у разі відмінності закону розподілу від нормального). Зміни показників вважали вірогідними при P<0,05 (10,11).

Таким чином, дані проведених досліджень дозволяють зробити висновок, що найбільш виразна імунотоксична дія на деякі показники, що вивчалися спостерігалася при застосуванні водного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum* у дозі з розрахунку 10 мг на 20 гр маси тіла.

Окрім того, був встановлений стимулюючий ефект на деякі показники, що вивчалися при застосуванні дози з розрахунку 0,01 мг на 20 гр маси тіла. Тому в подальшому з метою дослідження імуноотропної дії водного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum* у мишей з індукованою імунологічною недостатністю буде використана ця доза.

На базі лабораторії імунології кафедри біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії Національного медичного університету імені О.О.Богомольця проведена оцінка ефективності

імунотоксичної дії водного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum* експериментальних мишах-самцях лінії СВА/Са.

Джерела інформації:

1. Sergey V. Reshetnikov, Solomon P.Wasser, KokKheng Tan. Higher Basidiomycota as a source of Antitumor and Immunostimulating Polysaccharides (Review) // International Journal of Medicinal Mushrooms. 2001. Vol.3. P. 361-394.
2. Автономова А.В., Краснопольська Л.М. Мікологія і фітопатологія.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. Стефанова О.В. - Київ: Авіцена, 2001. - 528 с.
5. Эвтаназия экспериментальных животных / Методические рекомендации по выведению животных из эксперимента. - М.: МЗ СССР, 1985. - 13 с.
6. Западнюк И.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария. - К.: Вища школа, 1974. - 303 с.
7. Лимфоциты. Методы: Пер. с англ. / Под. ред. Дж. Клауса. - М.: Мир, 1990. - 395 с.
8. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования (под ред. Е.А.Кост). - М.: Медицина, 1975. - 383 с.
9. Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay / T. Mosman // J. Immunol. Methods. - 1983. - Vol. 65. - №1. - P. 55-63].
10. Гублер Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В. Гублер, А.А. Генкин. - Л.: Медицина, 1973. - 141 с.
11. Минцер О.П. Методы обработки медицинской информации / О.П. Минцер, Б.Н. Угаров, В.В. Власов. - К.: Вища школа, 1991. - 271 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб оцінки імунотоксичної дії водного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum* в експерименті, що включає дослідження крові, який **відрізняється** тим, що додатково визначають загальну кількість лейкоцитів периферійної крові та лейкоцитарної формули, реакції бласттрансформації лімфоцитів на Т-клітинні мітогени (ФГА та Кон-А) та на В-клітинний мітоген (ЛПС) до і після лікування, розраховують співвідношення їх по відношенню до контролю і при зміні показників оцінюють ступінь імунотоксичної дії водного розчину міцелію гриба *Ganoderma Lucidum*.

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601