УДК 615.9 14.00.20 (14.00.31)

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЖИДКОГО ПРЕПАРАТА TRICHODERMA В ОПЫТАХ IN VITRO И IN VIVO

Хоанг Л.Т., Абдельрахман А.А., Иванова В.В., Тхи Т.Н., Рябичко С.С., Фаттахова А.Н., Алимова Ф.К.

ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, e-mail: vilenavitalievna@rambler.ru

С целью обнаружения новых препаратов в качестве противоопухолевых и иммуностимулирующих средств проведен анализ цитотоксической и органотоксической активности жидких препаратов плесневых грибов T. harzianum 206(2) и T. harzianum IhI в отношении к опухолевым клеткам HeLa в опытах in vitro и в отношении самок мышей линии Webster в опытах in vivo. Показано, что данные препараты обладали слабым цитотоксическим эффектом по отношению к опухолевым клеткам HeLa, а также введение жидких препаратов T. harzianum 206(2) и T. harzianum IhI нивелировало токсическое действие пирена на кожу и печень мышей. При этом была выявлена тенденция к регенерации тканей.

Ключевые слова: HeLa, пирен, метаболическая активность *Trichoderma spp.*

BIOLOGICAL ACTIVITY OF A LIQUID PRODUCT OF TRICHODERMA IN EXPERIMENTS IN VITRO AND IN VIVO

Hoang L.T., Abdelrakhman A.A., Ivanova V.V., Tkhi T.N., Ryabichko S.S., Fattakhova A.N., Alimova F.K.

Kazan (Volga Region) federal university, Kazan, e-mail: vilenavitalievna@rambler.ru

In order to develop a novel drugs with antitumor and immunostimulating activity, the study analyzed on cytotoxic and organotoxic effects of cultural fluids of two strains of fungi Trichoderma harzianum 206(2) and IhI tested on HeLa cells in vitro and Webster mice females in vivo. Given objects was shown to have a weak cytotoxicity to HeLa cells as well as injection of liquid preparations of T.harzianum 206(2) и T. harzianum IhI could revoke toxic action of pyrene on the skin and liver of mice. Herewith, mice tissues were revealed to regenerate faster.

Keywords: histology, HeLa, pyrene, the metabolic activity of Trichoderma spp.

В настоящее время существует потребность получения новых биологически активных веществ, которые способны восстанавливать клетки и ткани, подвергшиеся воздействию вредных факторов окружающей среды. Данная проблема особенно актуальна в экологически опасных районах страны, где в среду поступает большое количество загрязнителей.

Одним из таких токсичных загрязнителей, по данным National Oceanicand Atmospheric Administration USA (NOAA), является пирен. Он образуется в результате различных процессов горения. Попадая в организм, пирен может распространяться в почках, печени. Исследования на животных показали, что пирен может вызывать нефропатию, изменения в крови, а также проблемы с воспроизводством потомства.

Несмотря на то, что различными авторами накоплено большое количество данных по разным аспектам жизнедеятельности и функционирования грибов *Trichoderma,* и они являются продуцентами метаболитов широкого спектра действия, вопрос об их использовании в качестве медицинских агентов остается открытым и может представлять интерес в дальнейших научных исследованиях. Исследования в этой области ведутся достаточно активно; постоянно обнаруживаются новые метаболиты с полезными свойствами [4, 8].

В связи с вышесказанным целью настоящей работы явилось характеристика биологической активности жидкого препарата *Trichoderma* в опытах *in vitro и in vivo*. Для достижения цели проводили скрининг цитотоксической и органотоксической активности наиболее известных штаммов *T. harzianum* 206(2) и *T. harzianum*IhI на клетках линии HeLa и здоровых самцах сертифицированной линии Webster. Также была оценена степень совместного влияния токсина пирена и жидкого препарата *Trichoderma* на состояние внутренних органов мышей.

Материалы и методы исследования

Скрининг на тест-организмах

Опухолевые **клетки *HeLa*** были предоставлены лабораторией молекулярной фармакологии кафедры биохимии КФУ от к.б.н., доцента Фаттаховой А. Н.

Клетки *HeLa* ($1 \cdot 10^5$ клеток/мл) поддерживались на минимальной среде (MEM), содержащей дополнительно 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 100 000 МЕ пенициллина при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO_2. Культуральная среда менялась каждые 3 дня. Клетки промывали 2 раза фосфатно-солевым буфером PBS (37 мм NaCl, KCl 2,7 мм; 8,1 мм NaH_2PO_4) перед добавлением свежей среды [6].

Мыши линии Swiss Webster, самки, были получены из питомника лабораторных животных «Пу-

щино». Окраска шерсти – белая. Мыши содержались в вентилируемых боксах специальной установки на подстилке из бумаги при постоянной температуре 25 ± 2 °С и влажности 57 ± 2 %, в нормальном световом режиме 12:12 ч и свободном доступе к пище и воде. Животные получали сбалансированный корм.

Раствор пирена. Полициклический ароматический углеводород пирен был приобретен у Sigma-Aldrich (Steinheim, Германия). 500 мг пирена растворяют в 25 мл оливкового масла до конечной концентрации 20 мг/мл.

Методы, используемые в данной работе, предполагают полное отсутствие пропагул и наличия «нативных» метаболитов в культуральной жидкости исследуемого штамма микромицета. Поэтому нами был выбран метод ультрафильтрации.

Исследуемые штаммы *Trichoderma* сеяли в колбы со стерильной жидкой средой Чапека (50 мл). На одни сутки помещали в термостат при 28 °С. Культивировали на качалке 5 дней со скоростью 128 об./мин, 28 °С. После чего нативную культуральную жидкость освобождали от мицелия ультрафильтрацией.

Определение цитотоксичности in vitro. К 50 мкл суспензии клеток *HeLa* добавляли 25 мкл, 50 мкл или 100 мкл культуральной жидкости (КЖ) *T. harzianum* 206(2) и *T. harzianum*IhI. Инкубировали смесь при 37 °С в течение 30 минут. Жизнеспособность оценивали с использованием камеры Горяева методом исключения красителя трипанового синего.

Определение влияния пирена и жидкого препарата Trichoderma на состояние внутренних органов мышей в опытах *in vivo*. Эксперименты проводили на мышах линии SwissWebster, у которых моделировали патологические изменения путём подкожного введения пирена. Было исследовано 3 группы мышей: 1-я – интактная (контроль) – 5 животных; 2-я – опытная (в течение 7 суток ежедневно подкожно на спине вводили пирен по 50 мкл в концентрации 20 мкг/мл, начиная с 8-х суток – воду для инъекций в том же объеме) – 3 мыши; 3-я – опытная (в течение 7 суток ежедневно подкожно на спине вводили пирен по 50 мкл в концентрации 20 мкг/мл, начиная с 8-х суток – жидкий препарат *Trichoderma* по 250 мкл). Внутри 3-й группы было 2 подгруппы 3а (вводили жидкий препарат *T. harzianum* 206(2)) и 3б (вводили жидкий препарат *T. harzianum*IhI) – по 3 мыши.

На 15-е сутки мышей убивали, вскрывали и отбирали внутренние органы: кожу в месте введения препаратов, мозг, печень, селезенку, почки, кишечник и сердце для проведения гистологического анализа. Ткани фиксировали в растворе формалина и метанола, обезвоживали и пропитывали парафином. Из парафиновых блоков делали срезы толщиной 4–6 мкм. Гистологические препараты готовили по стандартной схеме.

Полученные препараты исследовали при помощи световой микроскопии.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ MicrosoftExcel. Уровень значимости, примененный в работе, равен $P = 0{,}05$. Если выборки имели нормальное распределение, доверительный интервал строился по средним значениям. По этой же причине для сравнения полученных данных использовались параметрические критерии значимости: критерий Стьюдента, основан на сравнении средних и дисперсий [1].

Результаты исследования и их обсуждение

Грибы рода *Trichoderma* обладают высокой физиологической активностью и подавляют рост целого ряда патогенных грибов и грамположительных бактерий [9, 10]. В связи с этим представляет интерес исследование антибиотической активности штаммов грибов рода *Trichoderma* в отношении возбудителей болезней человека и животных, а также может представлять интерес в отношении токсичности и к опухолевым клеткам [8].

Определение цитотоксичности жидкого препарата *Trichoderma* по отношению к опухолевым клеткам *HeLa in vitro*. Антибиотические соединения способны не только тормозить рост микроорганизмов, но и способны удерживать рост опухолевых клеток.

Для дальнейших исследований цитотоксичности культуральной жидкости в отношении клеток *HeLa* мы отобрали штаммы *T. citrinoviride* 203, *T. harzianum* 206(2), *T. harzianum*IHI и *T. spp*306, *T. asperellum* 202, *T. citrinoviride* 321 с высокой антибиотической активностью.

Влияние КЖ *Trichoderma* на опухолевые клетки *HeLa* исследовали в одной концентрации. Объем суспензии клеток: объем КЖ 1:1. В качестве контроля использовали фосфатный буфер (ФСБ) и среду культивирования микроорганизмов.

В результате исследования было показано, что только жидкие препараты штаммов *T. harzianum* 206(2) и *T. harzianum*IHI обладали слабым цитотоксическим эффектом (рис. 1).

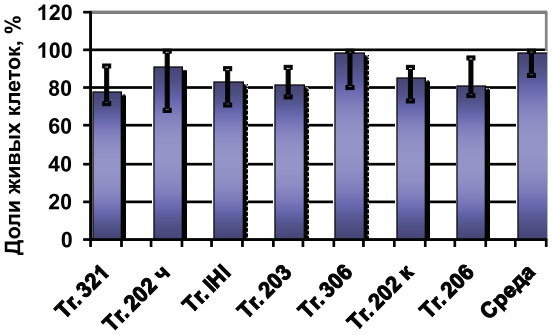

Рис. 1. Выживаемость опухолевых клеток HeLa в реакционной смеси, содержащей дозы жидкого препарата Trichoderma

Влияние пирена и жидкого препарата *Trichoderma* на состояние кожи и внутренних органов мышей в опытах *in vivo* *Trichoderma spp* продуцирует ряд микотоксинов, включающие аламетицины, хризопанол, эмодин, эргоконин, глиотоксин, глиовирин, G-белки, харзианум А, гепте-

лидовую кислоту, изоцианоциклопентены, конингинины A,B,C,G, арацельзин, сатурниспорин, сузукациллин, триходермин, трихорзианины A и B, трихотецены, трихотоксины, триховиридин и виридин [5]. Однако сатратоксин H, триходермол, триходермин и T-2 токсин являются наиболее частыми и токсичными. Сатратоксин H обладает иммуносупрессирующим действием, что приводит к терратогенности у животных, в то время как другие три являются ингибиторами синтеза белков и вызывают нарушения желудочно-кишечного тракта животных и человека [8]. С другой стороны, Sun и др. (2006) сообщают о новом веществе – циклотетрапептиде, триходерине A, продуцируемым морским грибом *Trichoderma reesei*. Ими [10] была показана цитотоксичность данного гриба против линии клеток человеческой меланомы A375-S2.

В связи с вышеизложенным следующим этапом наших исследований было изучение влияния подкожного введения жидкого препарата *Trichoderma*, а затем пирена мышам линии SwissWebster. Таким образом моделировали патологические изменения.

Было исследовано 3 группы мышей: 1-я – интактная группа (контроль); 2-я – опытная группа (в течение 7 суток ежедневно подкожно на спине вводили пирен по 50 мкл в концентрации 20 мкг/мл, начиная с 8-х суток – воду для инъекций в том же объеме); 3-я – опытная группа (в течение 7 суток ежедневно подкожно на спине вводили пирен по 50 мкл в концентрации 20 мкг/мл, начиная с 8-х суток – жидкий препарат *Trichoderma* по 250 мкл). Внутри 3-й группы было 2 подгруппы 3а (вводили жидкий препарат *T. harzianum* 206(2)) и 3б (вводили жидкий препарат *T. harzianum*IhI) – по 3 мыши.

Влияние пирена и жидкого препарата *Trichoderma* на состояние кожи мышей в месте введения препаратов. На фотографии среза кожи интактных мышей хорошо заметны слои эпидермиса и дермы кожи (рис. 2а). Волосяные фолликулы хорошо выражены и содержатся в большом количестве.

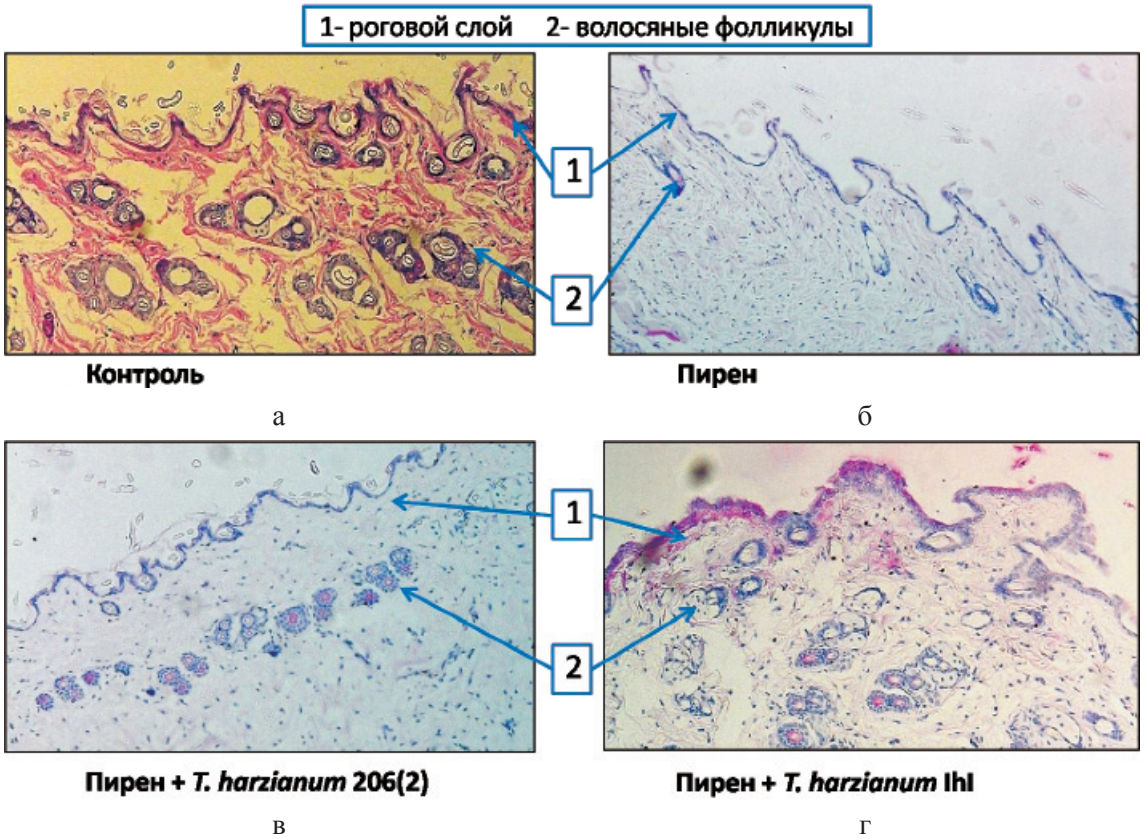

Рис. 2. Срезы кожи мышей:
а – срез кожи интактной мыши (1 группа), окраска гематоксилином-эозином, х200;
б – срез кожи мыши 2-й группы, получавшей пирен в течение 7 дней, окраска гематоксилином-эозином, х200; в – срез кожи мыши 3а группы, получавшей жидкий препаратT. harzianum 206(2), окраска гематоксилином-эозином, х200; г – срез кожи мыши 3б группы, получавшей жидкий препаратT. harzianum IhI, окраска с гематоксилином-эозином, х200

Под воздействием пирена слой эпидермиса уменьшался примерно в 3 раза по сравнению с контролем. Количество волосяных фолликулов также сильно снижено (рис. 2б). У мышей 3-й группы наблюдается увеличение размера эпидермиса, а также количества волосяных фолликул (рис. 2в). В роговом слое видны сформировавшиеся клетки, это указывает на то, что идет хорошая дифференцировка клеток.

На препарате кожи мыши 3б группы виден толстый роговой слой, в эпидермисе большее количество слоев эпидермиса. Это может свидетельствовать о том, что идет регенерация клеток кожи и вследствие чего восстанавливается ее структурное строение (рис. 2г).

Влияние пирена и жидкого препарата *Trichoderma* на состояние печени мышей в месте введения препаратов. На фотографии среза печени контрольной (интактной) мыши хорошо видна дольчатая структура органа, гепатоциты имеют неправильную многоугольную форму. Гепатоциты располагаются друг к другу рядом, образуя при этом печеночные балки или так называемые трабекулы. Клетки и печеночные балки ровные, симметричны относительно кровеносных капилляров. Щелевидные пространства равномерные, хорошо просматриваются (рис. 3а).

Через 7 дней после воздействия гепатоксина можно отметить, что баночное строение печеночной ткани слабо выражено, обнаружены полностью разрушенные участки. Гепатоциты отличаются небольшими размерами ядер и цитоплазмы. Большая часть цитоплазмы светло окрашена, мелкая, частично – угловатой формы, обеднена хроматином. Ядра мелкие, плохо обозначены, располагаются эксцентрично (по периферии), мелкие ядрышки. Отмечено небольшое содержание двухядерных гепатоцитов (22,20 %). Клетки ретикулоэндотелия малочисленны и имеют мелкие ядра. Также в сосудистой системе выявлены признаки застойной венозной гиперемии, которая проявляется расширением и полнокровием синусоидальных капилляров (преимущественно вокруг центральных вен) (рис. 3б).

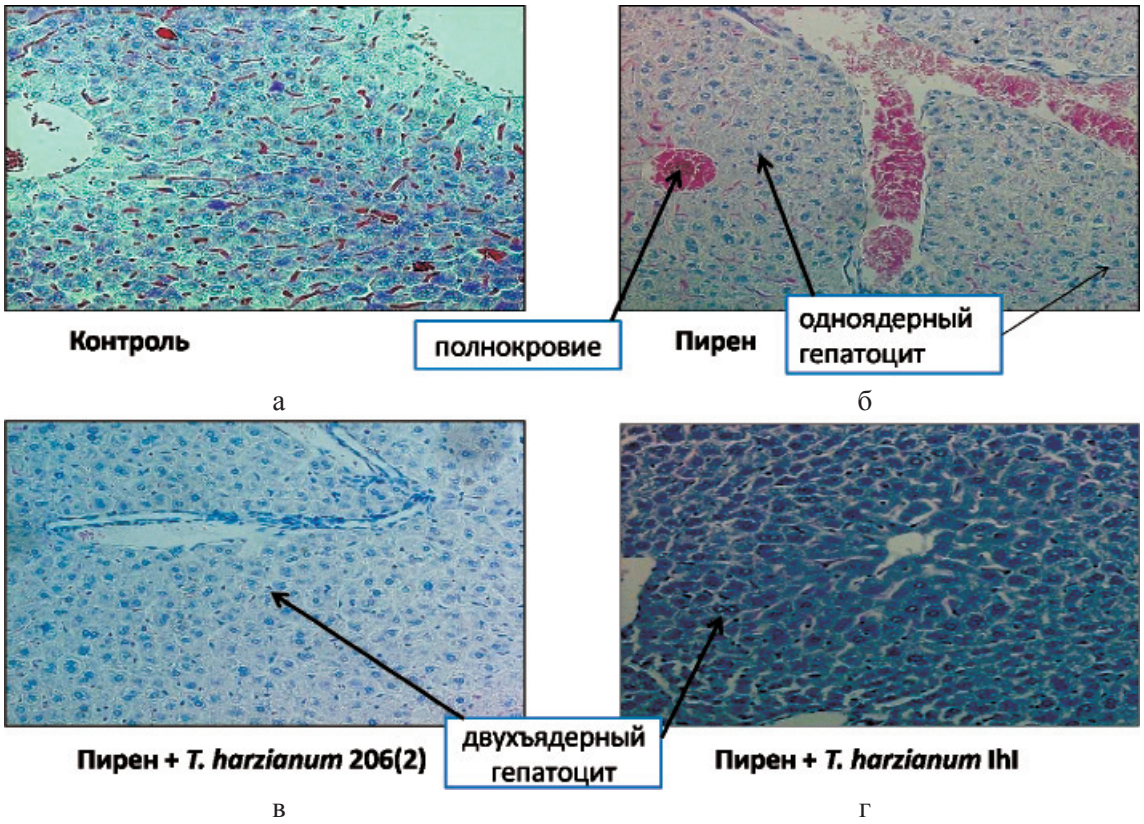

Рис. 3. Срезы печени мышей:
а – срез печени интактной мыши (1 группа), окраска гематоксилином-эозином, х200;
б – срез печени мыши 2-й группы, получавшей пирен в течение 7 дней, окраска гематоксилином-эозином, х200; в – срез печени мыши 3а группы, получавшей жидкий препарат T. harzianum 206(2), окраска гематоксилином-эозином, х200; г – срез печени мыши 3б группы, получавшей жидкий препарат T. harzianum IhI, окраска гематоксилином-эозином, х200

В печени мышей 3а группы, получавшей жидкий препарат *T. harzianum* 206(2), сохранено баночное строение. Гепатоциты, формирующие печеночные балки, различаются по объему и форме. Гепатоциты среднего размера имеют круглоовальную форму с умеренным

количеством хроматина, с одним, реже двумя мелкими ядрышками вблизи кариолемы. Большинство – двухъядерные митотические активированные клетки (~30,22 %) (рис. 3в).

Также отмечено увеличение количества ретикуло-эндотелиальных клеток, но они небольшого размера. Заметно ослабевает сосудорасстройство в виде застойного полнокровия синусоидальных клеток и оттека перисоидального пространства.

В печени мышей 3б группы, получавшей жидкий препарат*T. harzianum* IhI,баночное строение более выражено по сравнению с группой 2. Гепатоциты имеют большие размеры и более выражены по структурным признакам, многие из них имеют темноокрашенные цитоплазмы. Значительно увеличено содержание гепатоцитов с двумя ядрами (~36,33 %). В структуре ядра гепатоцитов увеличено содержание эохроматина, большинство ядер содержит одно крупное, реже несколько мелких ядрышек, располагаемых в центральной области клетки. В печени мышей 3б группы наблюдалось увеличение размеров клеток ретикулоэндотелия и их численности. Также заметно ослабевает сосудорасстройство в виде застойного полнокровия.

Таким образом, при применении жидкого препарата *Trichoderma* в течение 7 дней после воздействия гепатоксина выявлена тенденция к восстановлению печеночной ткани: дольчатая структура органа восстанавливается; вокруг кровеносных сосудов заметны обширные участки пролиферирующих ярко окрашенных гепатоцитов, имеющих более плотную структуру.

Влияние пирена и жидкого препарата *Trichoderma* на состояние мозга мышей в месте введения препаратов.

Известно, что некоторые метаболиты грибов способны проникать через гемато-энцефалический барьер.

При изучении срезов мозга, в первую очередь, обращают внимание на отсутствие хроматолиза и центральное расположение ядра. В мозге мышей 2-й группы обнаружены слившиеся нейроны и единичные нейроны с эксцентрично расположенным ядром, хроматолиза нет.

В мозге мышей 3б группы, получавшей жидкий препарат*T. harzianum* IhI, не выявлено особых отличий от контроля: если в контроле много мелких клеток Пуркинье, то здесь они крупные и светлые. Обнаружен двухядерный нейрон – признак патологии.

Заключение

Установлено, что только жидкие препараты *T. harzianum* 206(2) и *T. harzianum*IhI обладали слабым цитотоксическим эффектом по отношению к опухолевым клеткам *Hela* в опытах *invitro*. Введение жидких препаратов *T.harzianum* 206(2) и *T. harzianum*IhI нивелирует токсическое действие пирена на кожу и печень мышей, возможно опосредованно с иммунной системой. Выявлена тенденция к восстановлению тканей.

Таким образом, впервые показана возможность использования метаболитов культуральной жидкости грибов рода *Trichoderma* для снижения токсичного действия пирена на стоке мышей Webster путём вероятного усиления их иммунной системы. Кроме того, тестирование влияния метаболитов грибов рода *Trichoderma* на различных объектах является обязательным этапом при создании любого биологического препарата. Будут продолжаться вестись более подробные исследования.

Список литературы

1. Акберова Н.И. Описательная статистика. Интервальные оценки: учебно-методическое руководство и сборник задач к практическим занятиям по курсу «Математические методы в биохимии». – 2004. – 40 с.

2. Алимова Ф.К. Биологическое разнообразие видов рода Trichoderma(Fungi, Ascomycetes, Hypocreales) и их роль в функционировании микробиоты и защите растений в агроценозах различных почвенно-климатических зон на территории Республики Татарстан: дис. ... д-ра биол. наук – Казань: Казанский гос. ун-т. им. В.И. Ульянова-Ленина, 2006. – С. 406.

3. Шариков А.М. Изучение антибиотической активности метаболитов грибов рода Trichoderma в отношении штаммв Bacillussubtilis // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – № 2. – С. 57–59.

4. Guo-Hong L. Three new acoraneses quiterpenes from Trichoderma sp. YMF1.02647 / L. Guo-Hong, Z. Yang, P. Zhao, X. Zheng, S. Luo, R. Sun, X. Niu, K. Zhang // Phytochem.Lett. – 2010. – Vol. 73. – P. 168–170.

5. Garo E. Trichodermamides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-devived fungus Trichodermavirens / E. Garo, C.M. Starks, P.R. Jensen, W. Fencial, E. Lobkobsky, J. Clardy // Nat. Prod. – 2003, –Vol. 66. – P. 423–426.

6. Kitamura A., Growth inhibition of HeLa cell by internalization of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin (BCG) / A. Kitamura, S. Mastumoto, I. Asahina // Cancer Cell International. – 2009. – Vol. 9.

7. Mei S. Antimicrobial peptaibols, novel suppressors of tumor cells, targeted calcium-mediated apoptosis and autophagy in human hepatocellular carcinoma cells / S. Mei, H. Wang, S. Xie, Y. Luo, C. Sun, X. Chen, Y. Zhang // Molecular Cancer. – 2010. –Vol. 89. – P. 1–16.

8. Preecha P. 9-epi-Viridiol, a novel cytotoxic furanosteroid from soil fungus Trichodermavirens / P. Preecha, J. Rangsan, P. Siripong, S. Pyang // Nat. Prod. Res. – 2006. – Vol. 20. – P. 1321–1325.

9. Reino J.L., Secondary metabolites from species of the biocontrol agent Trichoderma / J.L. Reino, Guerrero, R.F. Hernández, R. Galán, I.G. Collado // Phytochemistry Reviews. – 2007. – Vol. 89. – P. 115–137.

10. Sun Yi. A new cyclotetrapeptide from marine fungus Trichoderma reesei / Yi. Sun, Li Tian, Yong-Fu Huang, Yi Sha, Yue-Hu Pei // Die Pharmazie – An International Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2006. –V ol. 61, № 9. – P. 809–810.

Рецензенты:

Абрамова З.И., д.б.н., профессор кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань;

Багаева Т.В., д.б.н., зав. кафедрой физиологии растений Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань;

Канарский А.В., д.т.н., профессор кафедры пищевой биотехнологии Казанского национального исследовательского технологического университета, г. Казань.

Работа поступила в редакцию 12.10.2011.