

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА *TRICHODERMA ASPERELLUM* 302 ИЗ ПОГРЕБЕННЫХ ПОЧВ

© Р. И. Тухбатова,¹ А. Н. Фаттахова, Ф. К. Алимова

Казанский (Приволжский) федеральный университет;

¹ электронный адрес: resedushka@gmail.com

Меланома — одна из самых злокачественных опухолей, характеризующаяся высокой агрессивностью и неблагоприятным прогнозом. Существуют различные способы лечения опухолей, но в последнее время в области онкологии проводятся исследования противоопухолевой активности метаболитов грибов. В этой работе мы изучили влияние культуральной жидкости (КЖ) гриба *Trichoderma asperellum* 302 на рост и развитие меланомы В16. Наши результаты показали, что КЖ *T. asperellum* 302 обладает противоопухолевыми свойствами и вызывает разрушение опухолевой ткани. Полученные данные открывают новые возможности и перспективы использования активных веществ, получаемых из грибов, в комплексной терапии рака.

Ключевые слова: *Trichoderma*, меланома, противоопухолевое действие.

Принятые сокращения: КЖ — культуральная жидкость.

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смерти во всем мире, их частота неуклонно растет. В XXI в. были достигнуты значительные успехи в познании природы злокачественных новообразований, их причин и способов предотвращения (Аникеев, 2009). Меланома кожи — злокачественная опухоль из клеток меланоцитарной системы и одно из наиболее агрессивно протекающих злокачественных новообразований человека, обладающее высоким метастатическим потенциалом (Константинова, 2007; Малышев, Рукша, 2009).

Существуют различные способы лечения меланомы, но в последнее время появились исследования в области онкологии, где в качестве противоопухолевых агентов используются метаболиты грибов (Imen et al., 2008; Simona, 2009; Wätjen et al., 2009). Доказано, что эннатины А1, В и В1, выделенные из штамма *Fusarium tricinatum*, вызывают апоптоз клеток культуры Н4ПЕ, что сопровождается торможением фосфорилирования внеклеточной регулируемой протеинкиназы ERK (Wätjen et al., 2009); а микотоксин зеаленон вызывает апоптоз в клетке HepG2 путем р53-зависимого митохондриального сигнала (Imen et al., 2008). Бухман с соавторами (2005) показали, что водные экстракты субстратного мицелия лекарственного гриба *Ganoderma lucidum* проявляют противоопухолевые свойства, снижая темпы развития опухолевой ткани, усиливая противоопухолевый эффект циклофосфида и увеличивая продолжительность жизни мышей.

Несмотря на то что к настоящему времени накоплено большое количество данных о жизнедеятельности и функционировании грибов *Trichoderma* (Harman et al., 2004; Mukherjee et al., 2013), вопрос об использовании их в качестве противоопухолевых агентов остается открытым.

В этой работе мы изучили влияние культуральной жидкости гриба *T. asperellum* 302 на рост и развитие меланомы В16.

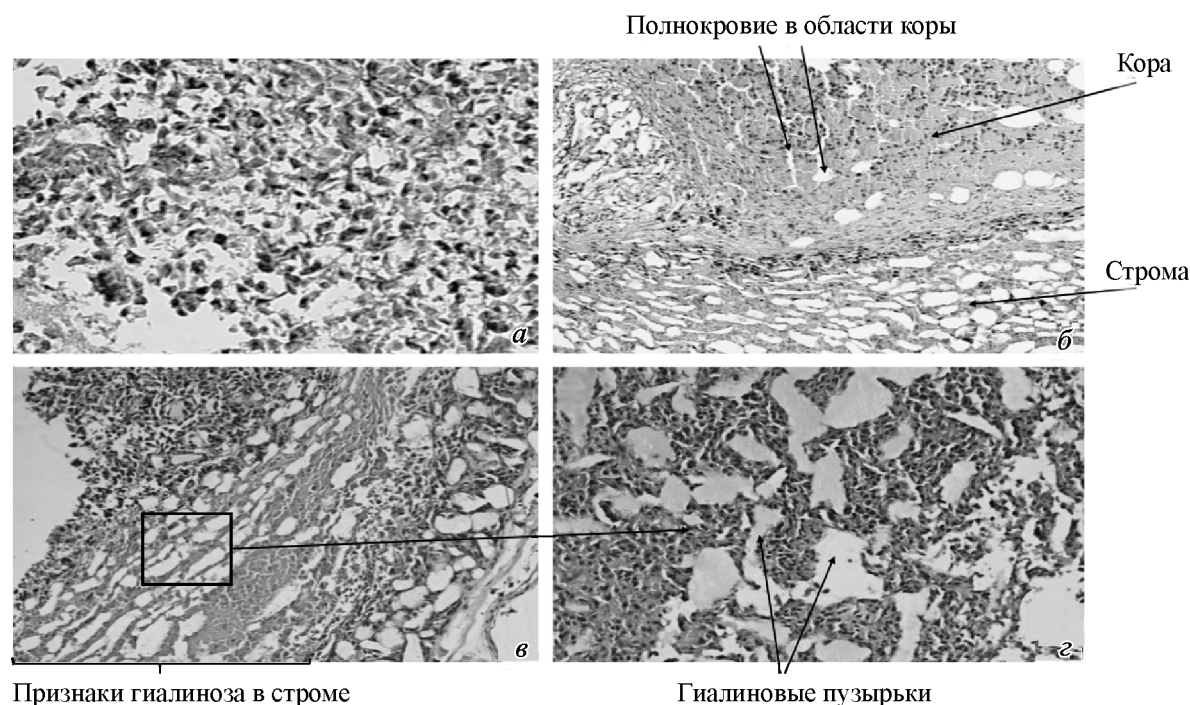
Материал и методика

В работе были использованы самки мышей с привитой меланомой В16 линии С57/В16, полученные из питомника лабораторных животных «Пушино». Мышей содержали согласно международным этическим нормам в вентилируемых боксах специальной установки на подстилке из бумаги при постоянных температуре (22—25 °С) и влажности, нормальном световом режиме и свободном доступе к пище и воде.

Мышам ежедневно внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в объеме 350 мкл (контроль), доксорубин (1 мг на 1 кг массы тела) (положительный контроль) или КЖ гриба *T. asperellum* 302 в объеме 350 мкл (эксперимент) вплоть до их гибели. Во время эксперимента ежедневно производили взвешивание мышей. После гибели животных брали образцы меланомы для гистологического исследования.

Штамм *T. asperellum* 302 был выделен из погребенной почвы Мурзихинского II могильника (VIII—VI вв. до н. э., Алексеевский р-н Республики Татарстан, Россия). Его выращивали на жидкой среде Чапека в течение 7 сут при 28 °С на чачалке со скоростью 128 об/мин. Методы, использовавшиеся в работе, обеспечивали полное отсутствие пропагул гриба — культуральную жидкость освобождали от мицелия фильтрацией (фильтры Millipore диаметром 0.22 мкм).

Использованные реактивы: физиологический раствор (0.9 % NaCl) (ПанЭко, Россия), доксорубин



Микрофотографии гистологических срезов анапластической недифференцированной меланомы В16, полученной от мышей контрольной группы (а) и экспериментальной группы, получавшей КЖ *Trichoderma asperellum* 302 (б—г).

При введении КЖ *T. asperellum* 302 наблюдаются полнокровие в области коры меланомы (б), а также появление признаков гиалиноза и гиалиновых пузырьков (в—г). Окраска гематоксилин-эозином. Об. 40×.

(EBEWE Pharma GmbH, Австрия), гематоксилин, эозин и раствор для гистологической обработки IsoPrep (БиоВитрум, Россия), а также среда для заключения препаратов Bio Mount (Bio-Optica, Италия).

Результаты и обсуждение

Для обнаружения противоопухолевой активности при работе с неочищенным и нестандартизированным экстрактом гриба необходимо было использовать достаточно чувствительную модель. При подборе модели мы исходили из данных литературы (Бухман и др., 2005), свидетельствующих о невысокой противоопухолевой активности экстрактов такого типа и необходимости их длительного введения (не менее 10 сут), а также о стимулировании противоопухолевой резистентности организма, лежащей в основе наблюдаемой противоопухолевой активности экстрактов. В результате была выбрана экспериментальная модель развития перевиваемой меланомы В16 на мышцах-гибридах линии С57/В16.

Максимальная продолжительность жизни животных в контрольной и опытной группах составила 9 сут, в группе, получавшей доксорубицин, — 15 сут. Средняя продолжительность жизни животных, получавших КЖ *T. asperellum* 302, на 26.3 % превышала продолжительность жизни контрольных животных. При этом надо отметить, что опытные животные вели более активный образ жизни, были более подвижными и агрессивными по сравнению с остальными.

Изучение массы тела мышей показало, что основное увеличение этого показателя происходит, вероятно, за счет увеличения массы опухолевой ткани. Так, масса тела мышей с привитой опухолью и не получавших лечения

достоверно превышала массу тела интактных животных. Такие же результаты были получены Бухман с соавторами (2005) в ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе РАМН (Москва). Масса контрольных и опытных мышей к концу опыта увеличивалась (в среднем на 10—20 %), а у мышей, получавших доксорубицин, уменьшалась (в среднем на 13.2 %). Таким образом, введение КЖ *T. asperellum* 302 не влияло на опухоль по указанному параметру.

После гибели животных брали образцы меланомы для гистологического исследования. На рисунке, а представлен срез опухоли — анапластической недифференцированной меланомы В16 у животных контрольной группы. Окраска препарата меланомы гематоксилином и эозином позволяет выявить в области между стромой и корой опухоли зону некроза, где нет ядер (см. рисунок, б). Вероятно, под воздействием КЖ *T. asperellum* 302 произошло разрушение кровеносных сосудов в опухоли и как результат — кровоизлияние (см. рисунок, б). На рисунке, в, г в области стромы четко видны гиалиновые капсулы, которые возникают в результате разрушения межклеточных связей. Считается, что гиалиноз — один из первых признаков некротических изменений в тканях (Струков, Серов, 1995).

Можно предположить, что действующими агентами могли быть антибиотики или микотоксины стероидного типа либо ферменты. Так, известно, что грибы рода *Trichoderma* активно продуцируют фермент L-лизин- α -оксидазу, известную своими противоопухолевыми свойствами (Pokrovsky et al., 2013).

Таким образом, результаты внутрибрюшинного введения КЖ *T. asperellum* 302 показали, что она обладает противоопухолевыми свойствами, вызывая разрушение опухолевой ткани. Полученные данные открывают новые

возможности и перспективы использования активных веществ, получаемых из грибов, в комплексной терапии рака.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Список литературы

- Аникеенок М. О. 2009. Индукция ATM/ATR сигнального каскада в ответ на ДНК — повреждающее действие *Helicobacter pylori*: Дис. ... канд. биол. наук. Казань. 113 с. (Anikeenok M. O. 2009. The induction of ATM/ATR signaling cascade in response to DNA-damaging effect of *Helicobacter pylori*: Ph. D. thesis in field of biology. Kazan. 113 p.)
- Бухман В. М., Исакова Е. Б., Антимонова А. В., Белицкий И. В., Либензон А. В., Краснополяская Л. М. 2005. Противоопухолевые свойства мицелия лекарственного гриба *Ganoderma lucidum* в опытах *in vivo*. Успехи медицинской микологии. М.: Национальная академия микологии. 245 с. (Buhman V. M., Isakova E. B., Antimonova A. V., Belicky I. V., Libenson A. V., Krasnopolskaya L. M. 2005. Anticancer properties of mycelium of the drug fungus *Ganoderma lucidum* *in vivo*. Advances in medical mycology. Moscow: National academy of mycology. 245 p.)
- Константинова М. М. 2007. Ингибиторы внутриклеточной передачи сигнала при меланоме: перспективы и разочарования таргетной терапии. Современ. онкол. 9 (3) : 46. (Konstantinova M. M. 2007. Inhibitors of intracellular signaling in melanoma: prospects and disappointment of targeted therapy. Modern Oncol. 9 (3) : 46.)
- Мальшев А. С., Рукша Т. Г. 2009. Применение дерматоскопии для оптимизации ранней диагностики меланомы кожи. Сиб. онкол. журн. 1 : 80. (Malyshev A. S., Ruksha T. G. 2009. Application of dermatoscopy for optimize of early diagnosis of melanoma. Siberian J. Oncol. 1 : 80.)
- Струков А. И., Серов В. В. 1995. Патологическая анатомия. М.: Медицина. 688 с. (Strukov A. I., Serov V. V. 1995. Pathological anatomy. Moscow: Medicine. 688 p.)
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004. Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 2 : 43—56.
- Imen A., Chayma B. 2008. The mycotoxin Zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. Toxicol. In Vitro. 22 : 1671—1680.
- Mukherjee P. K., Horwitz B. A., Estrella A. H., Schmoll M., Kenerley C. M. 2013. Trichoderma research in the Genome era. Annu. Rev. Phytopathol. 51 : 105—129.
- Pokrovsky V. S., Treshalina H. M., Lukasheva E. V., Sedakova L. A., Medentzev A. G., Arinbasarova A. Y., Berezov T. T. 2013. Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine α -oxidase from Trichoderma cf. aureoviride Rifai BKM-F-4268D. Anticancer Drugs. 24 : 846—851.
- Simona C., Luis O. 2009. The mycotoxin ochratoxin A inhibits DNA topoisomerase II and induces polyploidy in culture CHO cells. Toxicol. In Vitro. 23 : 1110—1115.
- Wätjen W., Debbab A., Hohlfeld A., Chovolou Y., Kampkötter A., Edrada R. A., Ebel R., Hakiki A., Mosaddak M., Totzke F., Kubbutat M. H., Proksch P. 2009. Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation. Mol. Nutr. Food Res. 53 : 431—440.

Поступила 4 II 2014

ANTICANCER PROPERTIES OF *TRICHODERMA ASPERELLUM* 302 FROM BURIED SOILS

R. I. Tukhatova,¹ A. N. Fattakhova, F. K. Alimova

Kazan (Volga Region) Federal University;

¹ e-mail: resedushka@gmail.com

Melanoma is one of the most malignant tumors, which leaves no chance of survival in the case of the «bang». There are various ways to treat tumors, however, recently in the field of cancer research, there are studies in which fungal metabolites have been used as antitumor agents. In this study we examined the effect of the culture fluid of the fungus *Trichoderma asperellum* 302 on the growth and development of melanoma B16. We have shown that these culture fluid has anticancer properties, causing destruction of tumor tissue. Obtained data open new possibilities and prospects for the use of active substances derived from fungi in the complex therapy of cancer.

Key words: *Trichoderma*, melanoma, anticancer effect.