

DOI 10.12737/article_5926b8549d17e4.90563872

**М.В. Бибикина¹, И.А. Спиридонова¹, А.Ф. Корыстова², Л.Н. Кублик²,
М.Х. Левитман², В.В. Шапошникова², Ю.Н. Корыстов²**

ЭКСТРАКТ ГРИБА *LECANICILLIUM LECANII* ПОДАВЛЯЕТ РАДИАЦИОННЫЙ АПОПТОЗ ТИМОЦИТОВ

1. ООО «ВИОРИН», Москва; 2. Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пущино.
E-mail: ykorystov@rambler.ru

М.В. Бибикина – ген. директор ООО «ВИОРИН», д.б.н.; И.А. Спиридонова – с.н.с., к.б.н.; А.Ф. Корыстова – с.н.с.;
Л.Н. Кублик – с.н.с., к.б.н.; М.Х. Левитман – с.н.с., к.б.н.; В.В. Шапошникова – с.н.с., к.б.н.; Ю.Н. Корыстов – зав. лаб., д.б.н.

Реферат

Цель: Исследовать влияние экстракта гриба *Lecanicillium lecanii* на активность 15-липоксигеназы (15-ЛО) и радиационный апоптоз тимоцитов крыс.

Материал и методы: Экстракт получали при обработке гриба *Lecanicillium lecanii* ацетоном. Ацетон удаляли, а осадок растворяли в этаноле. Тимоциты крыс Вистар подвергались воздействию рентгеновского излучения в дозе 6 Гр и инкубировали 6 ч в питательной среде. Апоптоз тимоцитов регистрировали по повреждению ядер и фрагментации ДНК. 15-ЛО выделяли из ретикулоцитов крыс Вистар. Активность 15-ЛО определяли по окислению линолевой кислоты.

Результаты: Экстракт гриба подавлял активность 15-ЛО. Концентрация экстракта, снижающая активность 15-ЛО на 50 % (IC_{50}) составила 15 мкг/мл. После облучения тимоцитов доля поврежденных ядер увеличивалась до 67 %. Добавление экстракта сразу после облучения снижало процент поврежденных ядер и фрагментацию ДНК в облученных тимоцитах. Эффект увеличивался с ростом концентрации экстракта, и при дозе экстракта 50 мкг/мл процент поврежденных ядер в облученных тимоцитах падал до контроля (16 %), а фрагментация ДНК снижалась до уровня ниже контрольного. IC_{50} экстракта по снижению повреждения ядер равна 6 мкг/мл.

Выводы: Полученные данные показывают, что экстракт гриба *Lecanicillium lecanii* содержит эффективный ингибитор 15-ЛО.

Ключевые слова: апоптоз, тимоциты, радиация, ингибиторы, 15-липоксигеназа

Поступила: 14.06.2017. Принята к публикации: 19.04.2017

Введение

Одним из существенных факторов, осложняющих успешную лучевую терапию опухолей, является пострadiационный иммунодефицит, обусловленный гибелью лимфоидных клеток. Особенно чувствительны к облучению тимоциты – предшественники зрелых Т-клеток. Облучение инициирует в них гибель по типу апоптоза. Известно, что продукты 15-липоксигеназы (15-ЛО) необходимы для запуска апоптоза при некоторых воздействиях в клетках разных типов [1, 2]. Радиационный апоптоз тимоцитов подавляется общим ингибитором липоксигеназ нордигидрогваяретовой кислотой (НДГК) [3–5], но не специфическими ингибиторами 5 и 12-липоксигеназ [3]. Показана активация 15-ЛО в течение часа после облучения [6].

Многие микромицетные грибы продуцируют соединения с высокой гипополипидемической, кардиотоксической, иммуносупрессивной и другими активностями. Ранее показано, что экстракт гриба *Lecanicillium lecanii* проявляет высокую антиоксидантную активность [7]. Было также отмечено, что линолевая кислота, исходно содержащаяся в экстракте, не окислялась, что позволило предположить наличие в экстракте ингибитора окисления полиненасыщенных жирных кислот, возможно, ингибитора 15-ЛО.

Для проверки этого предположения в данной работе изучено влияние экстракта на активность 15-ЛО. В случае ингибирования экстрактом 15-ЛО планировалось исследование влияния экстракта на радиационный апоптоз тимоцитов.

Материал и методы

Культуру гриба *Lecanicillium lecanii* выращивали и хранили на агаризованной среде Райстрика. Для оценки биологической активности культуры растения в условиях глубинного культивирования в колбах на 750 мл, со 100 мл питательной среды А-9 с круговым вращением 180 об/мин в течение 14 сут. Биомассу микроорганизмов отделяли центрифугированием. Мицелий дважды экстрагировали 5 объемами (относительно объема осадка) ацетона в течение 30 мин. Ацетоновые экстракты объединяли и удаляли растворитель до водного остатка. Водный остаток встряхивали в делительной воронке с равным объемом хлороформа и отделяли реэкстракт в хлороформе от водной фазы. Растворитель удаляли на вакуум-выпарной установке (ИР-1) при 45 °С. Сухой экстракт растворяли в этаноле в концентрации 13 мг сухого экстракта на 1 мл этанола, и из этого матричного раствора готовили необходимые для опытов водные растворы.

Тимоциты выделяли от крыс-самцов линии Вистар с массой тела 130–150 г. Для этого извлеченный тимус помещали в раствор Хенкса с 10 ммоль/л HEPES (Sigma, США), pH 7,4 при 37 °С и протирали через капроновый фильтр, смачивая его средой. Клетки отмывали центрифугированием в течение 5 мин при 700 g и суспендировали в среде RPMI 1640 (Sigma, США) с гентамицином без добавления сыворотки. Тимоциты ($1,5 \cdot 10^7$ кл/мл) помещали в среду RPMI 1640 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma, США), 10 ммоль/л HEPES, 10 мкг/мл гентамицина и инкубировали в чашках Петри ($V = 3$ мл) при 37 °С в течение 6 ч. Перед инкубацией клетки облучали и добавляли в

культуру экстракт гриба *Lecanicilium lecanii*. Облучение проводили на рентгеновской установке РУТ-250-15-1 при мощности дозы 1,12 Гр/мин, напряжении 200 кВ, силе тока 20 мА, фильтры 1 мм Al и 1 мм Cu, фокусное расстояние 37 см, при комнатной температуре.

Повреждение ядер тимоцитов оценивали по конденсации хроматина (пикноз) и фрагментации ядра [3]. Клетки фиксировали смесью уксусной кислоты с этанолом (1/3) и окрашивали по Гимзе. Частоту повреждения ядер оценивали под микроскопом при 600-кратном увеличении на 500–600 клеток в препарате.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла исследовали с помощью проточного цитометра (Partec, Германия). Клетки фиксировали 70 % этанолом, переносили в фосфатный буфер (рН 7,2) и окрашивали Hoechst 33258 (Serva, Германия), 2 мкг/мл, 5 мин. Флюоресценцию возбуждали излучением с $\lambda = 450$ нм. Для получения гистограммы распределения клеток по содержанию ДНК измеряли 20–50 тыс. клеток. Апоптозными считали клетки с субдиплоидным набором ДНК – фаза суб.G₁.

15-ЛО выделяли из ретикулоцитов крыс, содержащих большое её количество [8]. Ретикулоциты лизировали обработкой дистиллированной водой. Белок осаждали высаливанием сульфатом аммония в течение 2 час, добавляя его в супернатант до 55 % насыщения, затем центрифугировали при 10000 g, 20 мин и отделяли белковый осадок. Осадок растворяли в 0,1 моль/л КН₂Р₀₄ и диализовали против раствора этого же буфера. Гемоглобин при используемой концентрации сульфата аммония практически не высаливался, оставаясь в растворе, т.е. происходило разделение 15-ЛО (осадок) и гемоглобина. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 260 и 280 нм по формуле C (мг/мл) = (E₂₈₀ 1,5) – (E₂₆₀ 0,76) [9]. Активность 15-ЛО определяли по методу [8]. Реакционная смесь (2 мл) содержала 0,5 ммоль/л линолевой кислоты (Sigma, США), 0,07 % дезоксихолата Na (DIAM, Германия), 5 % этанола в 0,1 моль/л калий фосфатном буфере рН 7,4. При быстром перемешивании добавляли раствор белка, выделенный из ретикулоцитов. Регистрировали увеличение поглощения при 234 нм (A₂₃₄/мин) на спектрофотометре Perkin-Elmer (M-40) при температуре 2–4 °С и постоянном перемешивании.

Опыты были выполнены не менее чем в трёх повторностях. Данные, представленные на рисунках, – это средние значения ± стандартные отклонения. Статистический анализ проведен с помощью парного *t*-теста Стьюдента. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты и обсуждение

Экстракт гриба ингибирует 15-ЛО. Концентрация экстракта, снижающая активность 15-ЛО на 50 % (IC₅₀), составляет 15 мкг/мл. Для НДГК IC₅₀ = 0,27 мкг/мл. Бóльшая по сравнению с экстрактом активность НДГК (в 55 раз) не свидетельствует о низкой эффективности

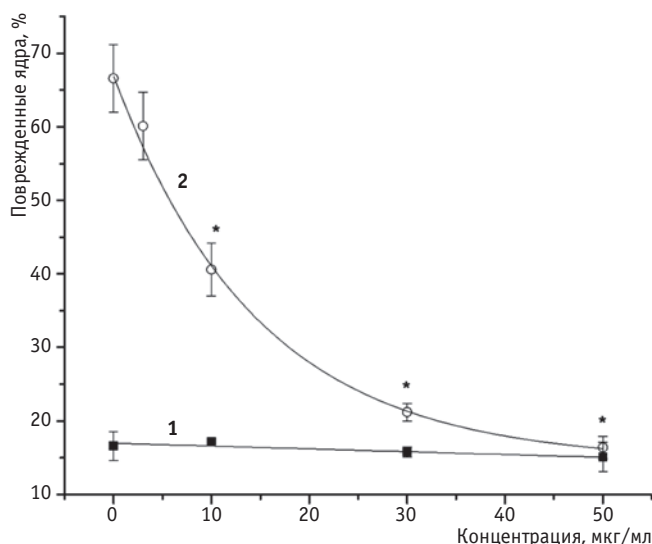


Рис. 1. Влияние экстракта гриба *Lecanicilium lecanii* на повреждение ядер в контрольных (1) и облучённых в дозе 6 Гр (2) тимоцитах крыс. По оси ординат – процент клеток с повреждёнными ядрами; по оси абсцисс – концентрация экстракта. * $p < 0,05$ относительно процента повреждённых ядер в облучённых без экстракта клетках

ингибитора 15-ЛО в экстракте, поскольку НДГК – чистый препарат, а ингибитор из экстракта не очищен.

Данные, представленные на рис. 1, показывают, что после облучения тимоцитов в дозе 6 Гр через 6 ч инкубации ядра повреждены в 67 % клеток. При добавлении в среду инкубации сразу после облучения экстракта гриба *Lecanicilium lecanii* процент повреждённых ядер снижается. При концентрации экстракта 50 мкг/мл повреждение ядер достигает контрольного уровня, а IC₅₀ экстракта равно 6 мкг/мл. Проточная цитометрия (табл.) также показывает, что при концентрации экстракта 50 мкг/мл доля апоптозных клеток (суб. G₁) в облучённом варианте снижается до уровня даже ниже контрольного. Эта концентрация экстракта существенно снижает апоптоз также в контрольных

Таблица

Влияние экстракта на распределение тимоцитов по содержанию ДНК в контроле и после облучения в дозе 6 Гр

Вариант опыта	Процент клеток с содержанием ДНК, соответствующий фазам клеточного цикла:			
	Суб.G ₁	G ₁	S	S+G ₂
Контроль	12,3 ± 3,0	65,0 ± 1,5	19,4 ± 4,0	3,5 ± 1,0
+экстракт, 30 мкг/мл	1,5 ± 1,0*	80,5 ± 1,0*	15,0 ± 0,5	3,0 ± 0,5
+экстракт, 50 мкг/мл	1,5 ± 1,0*	81,5 ± 1,0*	14,0 ± 0,5	3,0 ± 0,5
6 Гр	50,0 ± 1,5*	35,0 ± 1,0*	11,0 ± 1,5*	4,0 ± 0,5
6 Гр+экстракт, 3 мкг/мл	57,0 ± 1,0	29,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	4,0 ± 0,5
6 Гр+экстракт, 10 мкг/мл	19,0 ± 6,0**	62,0 ± 1,5**	15,5 ± 5,0	3,5 ± 1,0
6 Гр+экстракт, 30 мкг/мл	5,5 ± 2,5**	78,5 ± 1,0**	13,0 ± 1,5	3,0 ± 0,5
6 Гр+экстракт, 50 мкг/мл	3,5 ± 1,0**	80,0 ± 1,5**	13,5 ± 1,0	3,0 ± 0,5

Примечание:

* – $p < 0,05$ относительно процента клеток с соответствующим содержанием ДНК в контроле.

** – $p < 0,05$ относительно процента клеток с соответствующим содержанием ДНК в облучённых тимоцитах

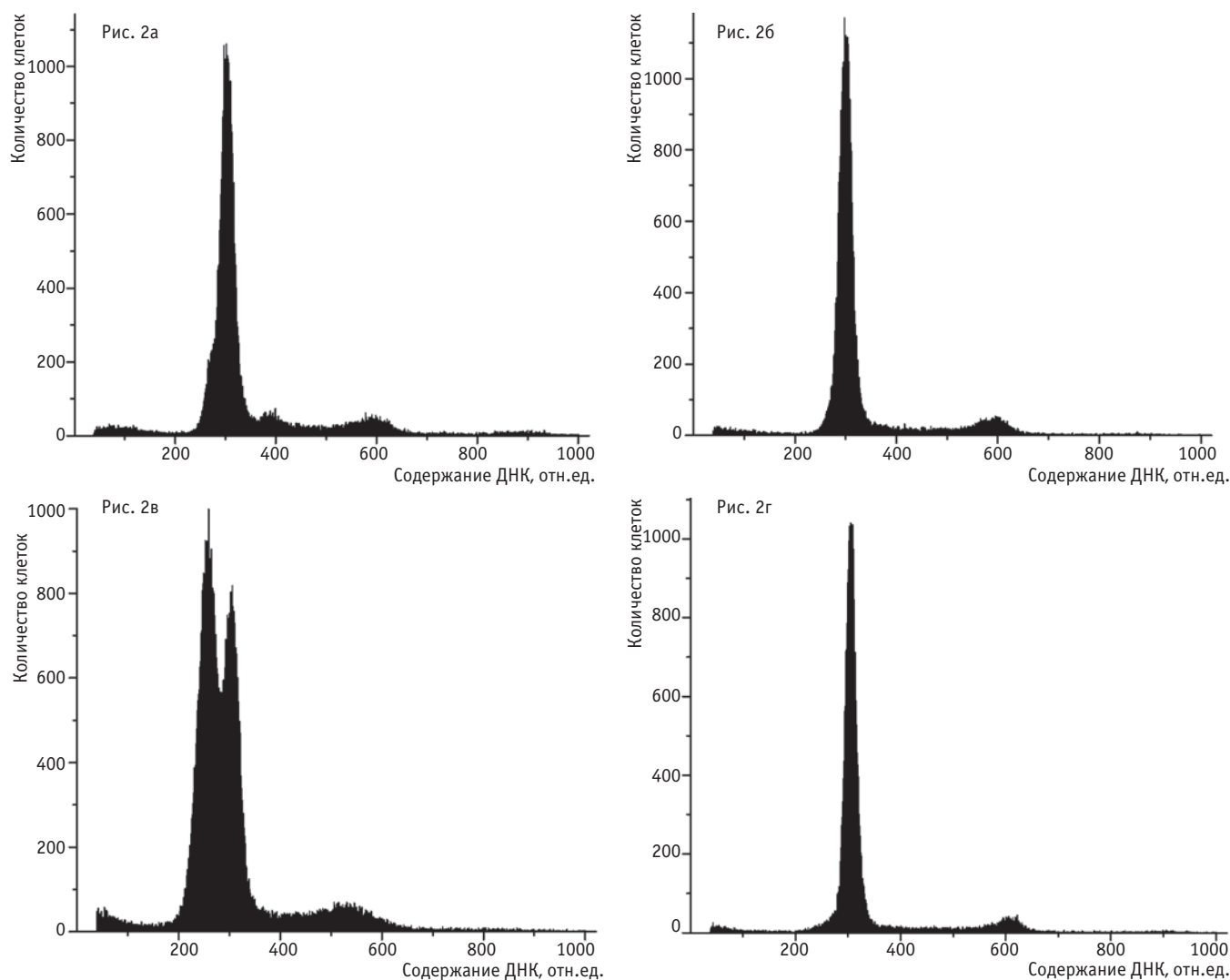


Рис. 2. Гистограммы распределения тимоцитов по содержанию ДНК в контрольных тимоцитах без обработки экстрактом (а) и после обработки 50 мкг/мл экстракта (б), в облученных в дозе 6 Гр (в), облучённых и обработанных 50 мкг/мл экстракта (г). По оси ординат – количество клеток с соответствующим содержанием ДНК; по оси абсцисс – содержание ДНК в клетках

timoцитах. Как в контрольных, так и в облучённых клетках экстракт увеличивает долю клеток в фазе G₁. В контроле при действии экстракта понижается доля клеток в фазе S. Увеличение доли клеток в G₁ и снижение в фазе синтеза ДНК (S) указывает на цитостатический эффект экстракта.

На рис. 2 приведены примеры гистограмм распределения тимоцитов по содержанию ДНК в контрольных тимоцитах без экстракта (2а) и после воздействия экстракта, 50 мкг/мл (2б), в облучённых в дозе 6 Гр (2в) и облучённых после воздействия экстракта, 50 мкг/мл (2г). Из представленных гистограмм видно, что экстракт в дозе 50 мкг/мл полностью предотвращает индуцированную облучением фрагментацию ДНК в тимоцитах.

Таким образом, ингибитор 15-ЛО из экстракта гриба *Lecanicilium lecanii* подавляет радиационный апоптоз тимоцитов в интервале концентраций, в котором он проявляет ингибирующую 15-ЛО активность. В контрольных тимоцитах экстракт также подавляет апоптоз, вызванный окислительным стрессом при их инкубации *in vitro* и, по-видимому, тоже связанный с активностью 15-ЛО.

Выводы

1. Экстракт гриба *Lecanicilium lecanii* содержит эффективный ингибитор 15-ЛО.
2. Экстракт гриба *Lecanicilium lecanii* подавляет радиационный апоптоз тимоцитов в интервале концентраций, в котором он проявляет ингибирующую 15-ЛО активность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maccarrone M., Ranalli M., Bellincampi L. et al. Activation of different lipoxygenase isozymes induces apoptosis in human erythroleukemia and neuroblastoma cells // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2000. Vol. 272. № 2. P. 345–350.
2. Sandstrom P.A., Pardi D., Tebbey P.W. et al. Lipid hydroperoxide-induced apoptosis: lack of inhibition by Bcl-2 over-expression // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 365. № 1. P. 66–70.
3. Гриченко О.Е., Шапошникова В.В., Левитман М.Х. и соавт. Исследование роли липоксигеназ в радиационном апоптозе тимоцитов // *Радиац. биол. Радиоэкология.* 2004. Т. 44. № 1. С. 27–31.
4. Матышевская О.П., Пастух В.Н., Солодушко В.А. Ингибирование липоксигеназной активности снижает индуцированную радиацией фрагментацию ДНК лимфоцитов // *Радиац. биол. Радиоэкология.* 1999. Т. 39. № 2–3. С. 282–286.

5. Shaposhnikova V.V., Dobrovinskaya O.R., Eidus L.Kh., Korystov Yu.N. Dependence of thymocyte apoptosis on protein kinase C and phospholipase A₂ // FEBS Lett. 1994. Vol. 348. № 3. P. 317–319.
6. Гриченко О.Е., Пушин А.С., Шапошникова В.В. и соавт. Исследование активности 15-липоксигеназы в тимocyтах после облучения // Изв. АН. Серия биол. 2004. № 5. С. 1–5.
7. Пузжевская Т.О., Бибилова М.В., Грамматикова Н.Э., Катлинский А.В. Влияние природных гиполлипидемических соединений на формирование биоплёнок штаммами рода *Pseudomonas* // Антибиотики и химиотерапия. 2009. Т. 54. № 1. С. 10–13.
8. Rapoport S.M., Schewe T., Wiesner R. et al. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte // Eur. J. Biochem. 1979. Vol. 96. № 3. P. 545–561.
9. Мешкова Н.П., Северин С.Е. Практикум по биохимии. – М.: МГУ. 1979. 430 с.

DOI 10.12737/article_5926b8549d17e4.90563872

Extract of *Lecanicillium Lecanii* Fungus Suppress Thymocyte Apoptosis after Irradiation

M.V. Bibikova¹, I.A. Spiridonova¹, A.F. Korystova², L.N. Kublik², M.Kh. Levitman²,
V.V. Shaposhnikova², Yu.N. Korystov²

1. LLC «VIORIN», Moscow, Russia; 2. Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, Moscow region, Pushchino. Russia. E-mail: ykorystov@rambler.ru

M.V. Bibikova – General Director LLC «VIORIN», Dr. Sc. Biol.; I.A. Spiridonova – Senior Researcher, PhD Biol.; A.F. Korystova – Senior Researcher; L.N. Kublik – Senior Researcher, PhD Biol.; M.Kh. Levitman – Senior Researcher, PhD Biol.; V.V. Shaposhnikova – Senior Researcher, PhD Biol.; Yu.N. Korystov – Head of Lab., Dr. Sc. Biol.

Abstract

Purpose: The effects of *Lecanicillium lecanii* fungus extract on 15-lipoxygenase activity and rat thymocyte apoptosis after irradiation were studied.

Material and methods: *Lecanicillium lecanii* fungus was extracted with acetone then acetone was evaporated and sediment was dissolved in ethanol. Wistar rat thymocytes were irradiated with X-rays at a dose of 6 Gy and incubated 6 h in nutrition medium. Apoptosis of thymocytes was recorded by nucleus damage and DNA fragmentation. 15-lipoxygenase activity was determined with linoleic acid oxidation.

Results: Fungus extract suppressed 15-lipoxygenase activity. Extract concentration that inhibited 15-lipoxygenase activity by 50 % (IC₅₀) = 15 µg/ml. It was shown that the share of damaged nuclei increased to 67 % after irradiation of thymocytes. The addition of the extract immediately after irradiation decreased the percent of damaged nuclei and DNA fragmentation in irradiated thymocytes. The effect increased with growth of extract concentration and in a dose of the extract 50 µg/ml percent of damaged nuclei in irradiated thymocytes decreased to control (16 %) and DNA fragmentation up to level below controlling one. IC₅₀ of extract on nucleus damage was 6 µg/ml.

Conclusion: These data show that *Lecanicillium lecanii* fungus extract contains effective 15-lipoxygenase inhibitor.

Key words: apoptosis, thymocytes, radiation, inhibitors, 15-lipoxygenase

REFERENCES

1. Maccarrone M., Ranalli M., Bellincampi L. et al. Activation of different lipoxygenase isozymes induces apoptosis in human erythroleukemia and neuroblastoma cells // Biochem. Biophys. Res. Com. 2000. Vol. 272. № 2. P. 345–350.
2. Sandstrom P.A., Pardi D., Tebbey P.W. et al. Lipid hydroperoxide-induced apoptosis: lack of inhibition by Bcl-2 over-expression // FEBS Lett. 1995. Vol. 365. № 1. P. 66–70.
3. Grichenko O.E., Shaposhnikova V.V., Levitman M.H. et al. Issledovanie roli lipoksigenaz v radiacionnom apoptoze timocitov // Radiac. biol. Radioehkologiya. 2004. Vol. 44. № 1. P. 27–31. (In Russian).
4. Matyshevskaya O.P., Pastukh V.N., Solodushko V.A. Ingibirovanie lipoksigenaznoj aktivnosti snizhaet inducirovannuyu radiaciej fragmentaciju DNK limfocitov // Radiac. biol. Radioehkologiya. 1999. Vol. 39. № 2–3. P. 282–286. (In Russian).
5. Shaposhnikova V.V., Dobrovinskaya O.R., Eidus L.Kh., Korystov Yu.N. Dependence of thymocyte apoptosis on protein kinase C and phospholipase A₂ // FEBS Lett. 1994. Vol. 348. № 3. P. 317–319.
6. Grichenko O.E., Pushin A.S., Shaposhnikova V.V. et al. Issledovanie aktivnosti 15-lipoksigenazy v timocitah posle oblucheniya // Izv. AN. Seriya biol. 2004. № 5. P. 1–5. (In Russian).
7. Puzhevskaya T.O., Bibikova M.V., Grammatikova N.E., Katlinskij A.V. Vliyanie prirodnyh gipolipidemicheskikh soedinenij na formirovanie bioplyonok shtammami roda *Pseudomonas* // Antibiotiki i himioterapiya. 2009. Vol. 54. № 1. P. 10–13. (In Russian).
8. Rapoport S.M., Schewe T., Wiesner R. et al. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte // Eur. J. Biochem. 1979. Vol. 96. № 3. P. 545–561.
9. Meshkova N.P., Severin S.E. Praktikum po biohimii. – M.: MGU. 1979. 430 pp. (In Russian).