

Тұжырым

Мақалада тетрахлорметанның әсерінен эритроцит мембранасының таңдамалы өткізгіштік қасиетінің өзгеруі және гепатотоксиканттың әрекетін фитокомпозиция көмегімен алдын алу мүмкіндігін зерттеу нәтижелері қарастырылған.

Summary

There are results of investigations of changes of erythrocyte membrane permeability at influence of carbon tetrachloride and possibility of prevention damaging action of hepatotoxicant by phytopreparation.

УДК 616-006.669+615.32

Колбай И.С., Джадранов Е.С., Джакибаева Г.Т., Сапко О.А.*, Кунаева Р.М.*

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МЕТАБОЛИТА ИЗ ГРИБА *Fusarium solani* НА РАЗВИТИЕ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЭРЛИХА И ЛЬЮИСА

(Центральная лаборатория биоконтроля, сертификации и предклинических испытаний,

* Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А.Айтхожина)

*В данной статье показано, что фракция КФ-F1 экстрацеллюлярного метаболита, полученного из гриба *Fusarium solani*, оказывает умеренное торможение на рост и развитие солидной опухоли Эрлиха, но практически не оказывает влияния на рост и развитие солидной опухоли Льюиса.*

Грибы рода *Fusarium* широко распространены в природе, вызывая различные повреждения растений [1]. Они, в частности гриб *F. solani* в процессе жизнедеятельности выделяют различные биологически активные вещества, среди которых встречаются полипептиды, токсины, в частности нафтазариновые фитотоксины, антибиотики, ферменты и др. [2,3]. Некоторые метаболиты относятся к специфическим стимуляторам роста, изменяя митотическую активность, содержание углеводов, активность ферментов, интенсивность фотосинтеза растений [4,5,6], оказывают фитотоксическое, антибиотическое, инсектицидное, фунгицидное действие [7,8].

В исследованиях *in vitro* обнаружено, что культурные фильтраты восьми видов грибов рода *Fusarium* обладают антибактериальной активностью против штаммов *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* [9]. Показано, что фракция КФ:F1, выделенная из экстрацеллюлярных метаболитов гриба *F. solani*, подавляет рост стафилококков [10]. При этом оставалось неизученным возможность расширения сферы применения данного препарата в плане изучения его антиканцерогенных свойств.

Вышеизложенные данные определили цель настоящего исследования - изучение влияния фракции КФ:F1 экстрацеллюлярного метаболита, полученного из гриба *Fusarium solani*, на развитие солидной опухоли Эрлиха в условиях *in vivo*.

Материалы и методы

Культуру гриба *F. solani* (штамм F-RKM 166, полученную из Республиканской коллекции микроорганизмов РК), культивировали на модифицированной среде Чапека [4], дополненной картофельным отваром. Культуру гриба выращивали на агаре в термостате при 25-27°C, или при комнатной температуре в жидкой питательной среде, без перемешивания, или при перемешивании на круговой качалке со скоростью 150 об/мин.

Фракцию КФ:F1 получали из культурального фильтрата гриба на стадии стационарного роста культуры по методу [11].

Для тестирования влияния фракции КФ:F1 экстрацеллюлярного метаболита гриба на рост солидной опухоли Эрлиха использовали 20 половозрелых беспородных белых мышей-самцов с массой тела 23-26 г, а на рост солидной опухоли Льюиса - 14 мышей-самцов линии C57Bl/6 с массой тела 21-26 г. Животных содержали в условиях вивария на стандартном пищевом рационе.

При работе со штаммом солидной опухоли Эрлиха нами в область левой части брюшной полости подкожно перевивалось 0,25 мл материала из асцитной опухоли. При работе со штаммом солидной опухоли Льюиса нами перевивался материал, полученный из солидной опухоли, который вводили подкожно.

Спустя двое суток после перевивания солидной опухоли Эрлиха и восемь суток – после перевивания солидной опухоли Льюиса исследуемых животных делили на две группы - опытную (1) и контрольную (2) с равным числом особей в каждой и животным опытной группы внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл фракции экстрацеллюлярного метаболита, что составило 0,67 мг сухого вещества на 10 г массы тела (LD-50 согласно нашим предварительным исследованиям составляет 7,5 мг/10 г массы тела). В течение эксперимента препарат вводили три раза в неделю. Всего было осуществлено 10 введений, а весь эксперимент длился 26 дней. Более позднее начало введения экстрацеллюлярного метаболита в случае солидной опухоли Льюиса было обусловлено ее более продолжительным ростом по сравнению с солидной опухолью Эрлиха, а также более слабой резистентностью организма линейных животных по сравнению с таковой у беспородных мышей, что вызвало необходимость в длительном адаптационном периоде организма после перевивания опухолевого штамма. Весь эксперимент длился 33 дня.

За животными исследуемых групп осуществляли ежедневное наблюдение. При этом фиксировали их общее состояние, потребление корма и воды, состояние шерстного покрова, реакцию на внешние раздражители, признаки роста перевитой опухоли.

В конце эксперимента опухоли извлекали, взвешивали и измеряли по трём взаимно перпендикулярным направлениям. Форму опухоли условно принимали за эллипсоид и их объём вычисляли по формуле:

$$V = \frac{4}{3} \pi abc, \quad \text{где: } \pi = 3,14; a,b,c - \text{ радиусы}$$

Плотность опухоли вычисляли по формуле:

$$\rho = \frac{m}{V}, \quad \text{где: } m - \text{ масса и } V - \text{ объём опухоли}$$

Процент торможения опухолевого роста определяли по формуле:

$$T\% = \frac{V_k - V_0}{V_k} \times 100,$$

Индекс эффективности подсчитывали по формуле:

$$\text{Индекс эффективности} = \frac{V_k}{V_0}$$

Где V_k – средняя масса опухолей (объем асцитной жидкости и количество опухолевых клеток) в контрольной группе, V_0 – средняя масса опухолей (объем асцитной жидкости и количество опухолевых клеток) в подопытной группе.

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием непарного критерия Фишера-Стьюдента и изменения считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На шестые сутки после перевивания солидной опухоли Эрлиха у всех животных наблюдали признаки опухолевого роста. Начиная с семнадцатых суток от начала эксперимента у животных опытной группы отмечали лёгкую угнетённость и взъерошенность шерсти. Данные изменения у мышей контрольной группы отсутствовали.

Три мыши опытной группы погибли в течение эксперимента после начала введения экстрацеллюлярного метаболита. Помимо этого у одной мыши контрольной группы наблюдали рост асцитной опухоли, вместо солидной. Данные животные выбраковывались. Представлены результаты экспериментов по остальным животным. Так, отмечено, что масса тела мышей (без учета массы опухоли) опытной группы, которым вводили фракцию КФ:F1 экстрацеллюлярного метаболита, составляла $25,5 \pm 0,4$ г, что на 19,8% ($p < 0,001$) было меньше, чем у животных контрольной группы без введения препарата ($30,8 \pm 0,9$ г). Данные, отражающие рост опухоли у мышей опытной и контрольной группы представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Влияние экстрацеллюлярного метаболита, полученного из грибов рода *Fusarium solani* на рост солидной опухоли Эрлиха

Группа	Размеры опухоли, мм			Масса опухоли, мг	Объём опухоли, мм ³	Плотность опухоли, мг/мм ³
	длина	ширина	толщина			
опыт	18,1±1,0	11,1±0,9	6,1±0,3	821,4±127,2	661,5±86,0	1,14±0,06
контроль	23,8±1,2**	15,0±0,5*	10,9±0,5***	2022,2±139,0***	2062,1±200,9***	1,00±0,04

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$

Из данных, приведённых в таблице 1, видно, что масса солидной опухоли Эрлиха у опытных животных составляет 40,6% от массы опухоли контрольных мышей. Объём солидной опухоли Эрлиха у опытных животных составляет 32,1% от объёма опухоли контрольных мышей. Разница в плотности опухоли незначительна. При этом процент торможения роста солидной опухоли Эрлиха при использовании фракции КФ:F1 экстрацеллюлярного метаболита, полученного из гриба *F.solani*, составил 59,38%, а индекс эффективности – 2,46.

Из вышеприведённых данных следует, что исследуемое вещество оказывает умеренное торможение на рост и развитие солидной опухоли Эрлиха [12]. При этом оно характеризуется также и определенным токсическим действием на организм в целом, что сопровождалось снижением массы тела животных, ухудшением их общего состояния, а также гибелью отдельных особей.

При работе со штаммом Льюиса первые признаки опухолевого роста начинали обнаруживаться на шестые сутки от начала эксперимента. В результате того, что у трёх мышей контрольной группы не удалось достичь перевивания исследуемого штамма опухолевых клеток, то данные животные выбраковывались. Масса

тела мышей (без учета массы опухоли) опытной группы, которым вводили фракцию КФ:F1 экстрацеллюлярного метаболита, составляла $22,9 \pm 0,8$ г, что лишь на 3,1% было меньше, чем у животных контрольной группы без введения препарата ($23,6 \pm 0,1$ г). Данные, отражающие рост опухоли у мышей опытной и контрольной группы представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние экстрацеллюлярного метаболита, полученного из грибов рода *Fusarium solani* на рост солидной опухоли Льюиса

группа	Размеры опухоли, мм			Масса опухоли, мг	Объём опухоли, мм ³	Плотность опухоли, мг/мм ³
	длина	ширина	толщина			
опыт	$19,7 \pm 2,8$	$12,4 \pm 1,5$	$8,9 \pm 0,9$	$1821,5 \pm 583,1$	$1350,4 \pm 483,8$	$1,35 \pm 0,09$
контроль	$21,3 \pm 2,1$	$13,8 \pm 2,0$	$9,5 \pm 1,0$	$2400,0 \pm 426,9$	$2463,6 \pm 552,6$	$2,93 \pm 0,65^*$

Примечание: * - $p < 0,05$

По результатам, приведённых в таблице 2, видно, что масса солидной опухоли Льюиса у опытных животных составляет 81,8% от массы опухоли контрольных мышей. Объём солидной опухоли Льюиса у опытных животных составляет 54,8% от объёма опухоли контрольных мышей. Плотность опухоли контрольных мышей более чем в два раза превосходит таковую у опытных животных. Процент торможения солидной опухоли Льюиса составил 0,18%, а индекс эффективности – 1,22.

Из вышеприведённых данных можно заключить, что исследуемое вещество практически не оказывает влияния на рост и развитие солидной опухоли Льюиса.

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что фракция КФ-F1 экстрацеллюлярного метаболита, полученного из гриба *Fusarium solani* оказывает умеренное торможение на рост и развитие солидной опухоли Эрлиха, но практически не оказывает влияния на рост и развитие солидной опухоли Льюиса.

Литература

1. Малюга А.А. Видовой состав и патогенность грибов рода *Fusarium*, вызывающих сухую гниль клубней картофеля в Западной Сибири // *Микология и фитопатология*. - 2003. – Т.37, № 4. - С.84-91.
2. Караджова Л.В. Фузариозы полевых культур. – Кишинев: Штииница, . 3. Kern, H. *Phytotoxins produced by Fusaria* // *Phytotoxins in Plant Disease*
3. Eds. Wood R.K.S., Balili A., Graniti A. - New York: Academic Press. - 1972. -P.35-48.
4. Билай В.И. Фузариум. – Киев: Наукова думка, 1977. - 441с.
5. Li S., Hartman G.L., Widholm J.M. Viability staining of soybean suspension-cultured cells and a seedling stem cutting assay to evaluate phytotoxiicity of *Fusarium solani* f.sp. *glycines* culture filtrates // *Plant Cell Reports*. - 1999. –V.18. - P. 375-380.
6. Jin H., Hartman G.L., Widholm J.M. Charakterization and purification of a phytotoxin produced by *Fusarium solani*, the causal agent of soybean sudden death syndrome // *Phytopathology* - 1996. – V.86. - P. 277-282.
7. Шахметов И.Ф., Асфандиярова Р.Р. Фитотоксичность культурального фильтрата *Fusarium oxysporum* Schlecht к каллусной ткани пшеницы. // *Микология и фитопатология*. 1991. т.25, Вып. 4. –С.343-347.
8. Меденцев А.Г., Аринбасарова А.Ю., Акименко В.К. Биосинтез нафтахиноновых пигментов грибами рода *Fusarium* // *Прикладная биохимия и микробиология*. - 2005. - Т.41, № 5. - С.573-577.
9. Qureshi S.A., Riaz R., Sultana V., Ehteshamul-Haque S., Jehan Ara. Pathogenicity and antimicrobial activity of seed-before *Fusarium solani* appel and wollenw. Emend. Snyder and hans strains // *Pakistan Journal of Biological Sci.* – 2003. – № 8. - P.1183-1186.
10. Колбай И.С., Джакибаева Г.Т., Байдалинов А.И. и др. Изучение антибактериальной активности фракции КФ-F1, выделенной из экстрацеллюлярных метаболитов гриба *Fusarium solani*, на модели стафилококковой инфекции // *Известия НАН РК. Сер.биол. и мед.* – 2008. - № 6. – С.42-44.
11. Сапко О.А., Утарбаева А.Ш., Кунаева Р.М. Использование культивируемых *in vitro* клеток картофеля для оценки биологической активности изолятов *Fusarium solani* // *Биотехнология. Теория и практика*. - 2005. - № 3. - С.128-135.
12. Ларионов Л.Ф. Химиотерапия злокачественных опухолей. - М.: Медицина, 1962. - 464 с.

Тұжырым

Тышқандарға жүргізілген тәжірибелерде *Fusarium solani* саңырауқұлағының клеткадан тыс метаболитінен бөлініп алынған КФ:F1 фракциясының Эрлихтің қатты ісіктің өсуі мен дамуына бірқалыпта әсер етуі көрсетілген және Льюистің қатты ісіктің өсуі мен дамуына әсері байқалған.

Summary

In experiments on mice it was shown that the fraction КФ:F1 of the extracellular metabolite of *Fusarium solani* fungus suppressed temperately the growth and development of Erlich solid carcinoma and had no effect upon the growth and development of Luis solid carcinoma