

## ПРОТИПУХЛИННА АКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНИХ ПРЕПАРАТІВ У КУЛЬТУРІ КЛІТИН КАРТОПЛІ, ТРАНСФОРМОВАНИХ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*



*Комплексні препарати (КП) за участю дріжджового манану, діацетил-2,4-діоксигексагідро-1,3,5-триазину, ціаногуанідину, алкансульфофосфатів та вторинних метаболітів Pseudomonas sp. мають інгібуючу активність щодо пухлин, індукованих A. tumefaciens в культурі паренхіми бульб картоплі. Протипухлинна активність КП, як правило, вища при профілактичному, ніж при терапевтичному застосуванні препаратів.*

© О.Г. КОВАЛЕНКО, О.М. ПОЛІЩУК, В.О. ІСАКОВА, 2009

**Вступ.** Трансформація клітин, спричинювана *Agrobacterium tumefaciens* у деяких видів рослин, є складним процесом, що за своїми фізіологічно-біохімічними характеристиками подібний до канцерогенезу у тварин і тому часто слугує експериментальною моделлю при пошуку протипухлинних препаратів. Генетичною детермінантою, що обумовлює гіперплазію рослинних тканин, як відомо [1], є *Ti*-плазмід, здатна інтегруватися в клітинний геном і реплікуватися аналогічно деяким ДНК-геномним вірусам. Тому цілком логічним є припущення, що речовини, здатні пригнічувати процес репродукції вірусів, можуть також негативно впливати на реплікацію *Ti*-плазмід і, отже, попереджати або принаймні обмежувати зумовлене нею пухлиноутворення у рослин.

Раніше нами було вивчено антифетовірусну дію деяких мікробних метаболітів, синтетичних антиметаболітів та поверхнево-активних речовин (ПАР) і розроблено комплексні препарати (КП), які виявились активними щодо вірусів в культурі тканин картоплі *in vitro* [2, 3]. Основними чинниками розроблених препаратів є мікробні глікани, зокрема дріжджовий манан, а також антиметаболіти діацетил-2,4-діоксигексагідро-1,3,5-триазин, ціаногуанідин та алкансульфофосфатів (в складі емульгатора Е-30) або вторинні метаболіти *Pseudomonas sp.*, в тому числі гліколіпіди та ліпополісахариди (ЛПС), що виконували функцію ПАР. З іншого боку, відомо, що екзогенні ЛПС псевдомонад здатні пригнічувати, хоча і не досить активно, ріст пухлин, індукованих *A. tumefaciens* [4]. У зв'язку з цим цілком слушним здається припущення, що протипухлинну активність ЛПС та їх складових частин – гліканів і гліколіпідів – можна істотно підвищити, комбінуючи останні з антиметаболітами, зокрема зі згаданими хімічними похідними урацилу, сечовини та сульфонових кислот. З огляду на це метою нашої роботи було дослідити розроблені нами КП на моделі пухлин, індукованих *A. tumefaciens* в експлантах із паренхіми бульб картоплі.

**Матеріал і методика.** В дослідях використовували комплексні препарати КП-1 і КП-2 наступного складу: дріжджовий манан (ДМ), діацетил-2,4-діоксигексагідро-1,3,5-триазин (ДДТТ), ціаногуанідин (ЦГ), і як ПАР – алкансульфофосфатів в складі емульгатора Е-30 в КП-1 або вторинні метаболіти *Pseudomonas*

sp. PS-17 в КП-1: рамноліпід (РЛ) та комплекс РЛ з полісахаридом (ПС-17). Джерела і спосіб отримання препаратів описані у попередніх роботах [2, 3, 5]. Склад КП подано в табл. 1.

Протипухлинну активність комплексних препаратів досліджували на експлантах (диски товщиною 2–3 мм і діаметром 1 см) із паренхіми бульб картоплі Слов'янка та Екстаз, інокульованих *A. tumefaciens* 9054. Експланти картоплі готували, як указано в роботі [4]. Комплексні препарати застосовували різними способами: 1) додавали в розплавлений картопляний агар (КА), що слугував поживним середовищем для бактерій і експлантів (нерозведеними або розведеними КА 1 : 10); 2) обробляли експланти стерильними розчинами КП (0,1 мл) до або після інокуляції тест-культурою *A. tumefaciens*; 3) комбінували способи 1 і 2. Для індукції пухлиноутворення бактеріальну культуру титром  $10^8$  кл./мл наносили на диски картоплі за 30 хв до (профілактика) та через 30 хв після (терапія) обробки їх препаратом.

В контрольних варіантах оброблені КП експланти не засівали тест-культурою (негативний контроль) або не застосовували на них КП, але в ті ж строки, як і в контролі, інокульовали нею (позитивний контроль).

Підрахунок кількості пухлин та врахування інтенсивності їх розвитку проводили після культивування експлантів впродовж 2–3 тижнів за температури 22 °С.

Для вивчення впливу КП на тест-культуру *A. tumefaciens in vitro* вносили їх у концентрації, вказаній в табл. 1 (нерозведеними або розведеними 1 : 10 та 1 : 100 поживним середовищем), в розплавлений КА. Як контроль використовували КА без додавання КП. Відтак на дослідне і контрольне середовища висівали по 0,1 мл суспензії *A. tumefaciens* титром  $10^3$  кл./мл та ставили в термостат при температурі 28 °С на 24–48 год. Підрахунок колоній здійснювали візуально, вивчення їхньої морфології – за допомогою біокулярної лупи МБС-9.

Кількісні дані піддавали біометричній обробці за параметричними критеріями, вираховуючи середню кількість (М) колоній чи пухлин, середню похибку (m), критерій Ст'юдента (t) та значущість різниці даних (p) в дослідних варіантах і контролі.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Вивчення прямої, бактерицидної дії препаратів показало, що нерозведені КП-1 і КП-2 пригнічували утворення колоній на КА *A. tumefaciens* на 63–74 % (табл. 2). Розведення препаратів в 10–100 разів призводило до втрати їхньої інгібуючої активності. Концентрований КП-1, доданий до поживного середовища, призводив до лізису бактеріальних клітин і «розмитості» бактеріального газону. У варіантах з КП-1 колонії, як правило, не утворювались, а в середовищі, що містило КП-2, вони мали аномальний («кратеровидний») вигляд.

В результаті проведених дослідів встановлено, що КП-1 і КП-2, внесені в картопляний агар, де культивувались експланти бульб кар-

Таблиця 1  
Компонентний склад комплексних препаратів, г/л

Інгредієнти КП	КП-1	КП-2
Дріжджовий манан	0,2	КП-2
Діацетил-2,4-діоксигексагідро-1,3,5-триазин	0,05	0,2
Ціаногуанідин	0,05	0,05
Алкансульфоокислоти (емульгатор Е-30)	0,1	–
Комплекс вторинних метаболітів <i>Pseudomonas</i> sp.	–	0,1

Примітка. «–» – компонент відсутній.

Таблиця 2  
Дія КП-1 і КП-2 на утворення колоній *A. tumefaciens* в середовищі з КА

Препарат розведення і кратність	Середня кількість колоній		t	P, %
	М ± m	%		
КП-1				
1	63 ± 16	36,6	3,4	0,2
10	187 ± 7	108,7	2,0	3
100	198 ± 12	115,7	2,2	3
КП-2				
1	45 ± 29	26,2	3,2	0,3
10	210 ± 12	122,1	3,0	0,5
100	187 ± 25	114,5	1,0	<5
Контроль (фізіологічний розчин)	172 ± 28	100,0		

Таблиця 3

Вплив КП-1 і КП-2 на пухлиноутворення, індуковане *A. tumefaciens*, в експлантах картоплі сорту Слов'янка

Варіант	Додавання препарату	Розведення препарату, крат	Кількість здорових експлантів, %	Кількість пухлин на експлант	
				M ± m	%
КП-1					
1	В середовище	1	100	0	0
		10	55,5	2,2 ± 0,4	15,8 <sup>+++</sup>
2	На експлант за 30 хв до інфікування	1	0	6,4 ± 0,6	46,0 <sup>++</sup>
		10	0	7,3 ± 1,1	52,5 <sup>+</sup>
3	На експлант через 30 хв після інфікування	1	0	6,4 ± 0,9	46,0 <sup>++</sup>
		10	0	13,8 ± 3,0	99,3 <sup>°</sup>
4	В середовище + на експлант за 30 хв до інфікування	1	100	0	0
		10	0	11,6 ± 1,3	83,4 <sup>°</sup>
5	В середовище + на експлант через 30 хв після інфікування	1	61,1	2,3 ± 1,0	16,5 <sup>+++</sup>
		10	5,6	7,9 ± 0,9	56,8 <sup>+</sup>
6	Без препарату		0	13,9 ± 3,4	100,0
КП-2					
1	В середовище	1	61,1	4,8 ± 0,8	34,5 <sup>++</sup>
		10	38,9	5,7 ± 1,5	41,0 <sup>+</sup>
2	На експлант за 30 хв до інфікування	1	22,2	4,0 ± 0,7	28,8 <sup>++</sup>
		10	11,1	6,3 ± 1,0	45,3 <sup>+</sup>
3	На експлант через 30 хв після інфікування	1	0	7,9 ± 1,5	56,8 <sup>°</sup>
		10	11,1	5,9 ± 1,1	42,4 <sup>+</sup>
4	В середовище + на експлант за 30 хв до інфікування	1	67,7	1,8 ± 0,7	12,9 <sup>+++</sup>
		10	5,6	8,0 ± 1,3	57,6 <sup>°</sup>
5	В середовище + на експлант через 30 хв після інфікування	1	11,1	5,4 ± 1,1	38,8 <sup>++</sup>
		10	5,6	10,3 ± 1,5	74,1 <sup>°</sup>
6	Без препарату		0	13,9 ± 3,4	100,0

Примітка. Склад препаратів див. табл. 1. <sup>+++</sup> p ≤ 0,1 %; <sup>++</sup> 0,1 % < p ≤ 1 %; <sup>+</sup> 1 % < p ≤ 5 %; <sup>°</sup> p > 5 %.

топлі Слов'янка, у концентрованому вигляді пригнічували ріст пухлин на 83,5–100 та 61,2–87,1 % відповідно (табл. 3). Комбінування такого способу застосування КП-1 із внесенням його на експлант має такий же ефект у випадку інфікування тканин *A. tumefaciens* після, але не до обробки тканин препаратом. Таким чином, повне пригнічення пухлиноутворення спостерігається за умови подвійного профілактичного застосування КП-1, причому для досягнення такого ефекту важливішим є додавання КП-1 до поживного середовища, ніж застосування іншим способом, позаяк присутність його в середовищі сама по собі вже забезпечує 100% пригнічення росту пухлин. Одна ж обробка тканини цим препаратом до інокуляції *A. tumefaciens* супроводжується лише частковим

(на 54 %) інгібуванням пухлиноутворення. Що стосується КП-2, то подвійна профілактична обробка тканин – додавання в середовище та на експлант – мала адитивну дію (див. варіанти 1 і 4 в табл. 3). Терапевтичний ефект препаратів в цілому виявився значно нижчим за профілактичний, однак він теж заслуговує на увагу, особливо у тих варіантах, де мало місце подвійне застосування КП – додавання в КА та обробка експлантів (див. варіант 5 для обох КП в табл. 3).

Розведення препаратів у 10 разів супроводжувалось значним зниженням інгібуючої дії препаратів (інгібування пухлиноутворення до 43,5–84,2 % – для КП-1 і до 57,6–59,0 % – для КП-2).

Слід зазначити, що вираженої токсичності досліджуваних препаратів щодо паренхіми

Таблиця 4

Вплив КП-1 і КП-2 на пухлиноутворення, індуковане *A. tumefaciens* в експлантах картоплі сорту Екстаз

Варіанти	Додавання препарату	Кількість експлантів, що не мали пухлин, %	Кількість пухлин на експлант	
			M ± m	%
КП-1				
1	В середовище	100,0*	0,0	0,0
2	В середовище + на експлант за 30 хв до інфікування	83,3**	0,6 ± 0,4	26,1 <sup>++</sup>
3	В середовище + на експлант через 30 хв після інфікування	16,7**	2,2 ± 0,5	95,6°
КП-2				
1	В середовище	38,9**	1,6 ± 0,4	69,6 <sup>+</sup>
2	В середовище + на експлант за 30 хв до інфікування	77,8	0,6 ± 0,1	26,1 <sup>++</sup>
3	В середовище + на експлант через 30 хв після інфікування	61,1**	1,8 ± 0,6	78,3°
4	Позитивний контроль	11,1	2,3 ± 0,4	100,0
5	Негативний контроль	100,0*		

Примітка. Склад препарату див. в табл. 1. \*Повна мацерація. \*\* Часткова мацерація тканини. Надрядкові символи див. в примітці до табл. 3.

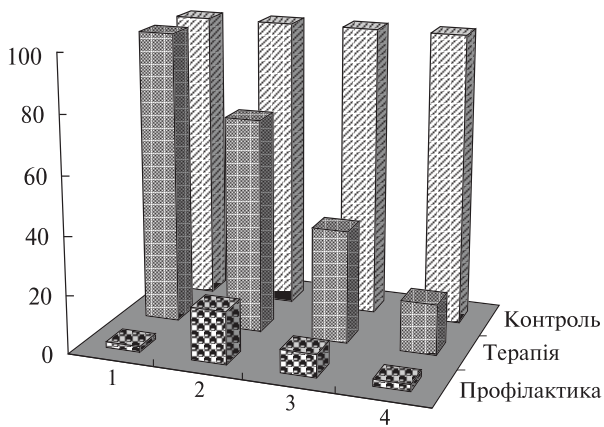
бульб картоплі сорту Слов'янка нами не виявлено. Деяка зміна забарвлення і консистенції тканини спостерігалась лише у картопляних дисках, оброблених КП-1.

На картопляних дисках з бульб картоплі сорту Екстаз досліджувані препарати також проявили значний профілактичний ефект – пригнічення пухлиноутворення сягало 74–100 % (табл. 4). Під впливом комплексного препарату 1, що застосовувався у концентрованому вигляді, спостерігалась мацерація тканин. Противухлинна дія КП-1 значною мірою обумовлена, очевидно, токсичною дією його щодо паренхіми картоплі цього сорту. Однак таке пояснення не може стосуватися КП-2, позаяк при однакових умовах (додавання в середовище) мацерація тканин спостерігалась рідко, а противухлинна дія у цього препарату була такою ж високою, як і препарату 1 (див. варіант 2 для обох препаратів в табл. 4).

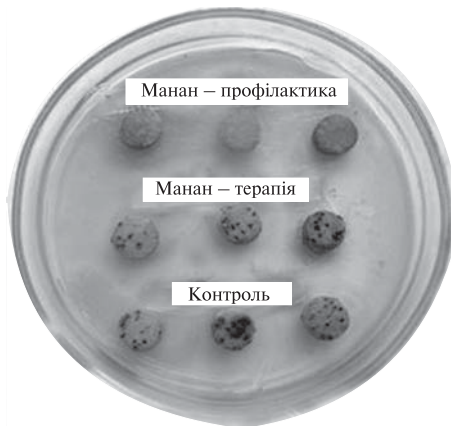
Таким чином, наші дослідження продемонстрували різну токсичність препаратів щодо паренхімних тканин двох сортів картоплі: високу, особливо у КП-1, щодо сорту Екстаз і помірну – щодо сорту Слов'янка. Це, мабуть,

зумовлено різними морфо-фізіологічними особливостями паренхіми бульб, характерними для цих сортів картоплі. Висока цитотоксичність КП-1, вірогідно, обумовлена наявністю в його складі алкансульфокислот. Це зазначалось нами і в дослідях з вегетуючими рослинами та ізольованим листям тютюну [2]. Тому необхідно у кожному конкретному випадку проводити додаткові дослідження з метою підбору концентрацій препарату, які б мали значний противухлинний ефект, але не справляли негативного впливу на рослинні тканини. У цьому відношенні кращим є КП-2, який за нашими даними має нижчу токсичність, очевидно, за рахунок того, що як ПАР тут використовувались вторинні метаболіти *Pseudomonas sp.*

Для того щоб з'ясувати, які компоненти КП є найбільш важливими у їхній противухлинній активності, а також з метою екологічного забезпечення та здешевлення препаратів в разі їх можливого практичного використання, ми виключили зі складу препаратів синтетичні антиметаболіти та ксенобіотики (ДГТ, ЦГ та алкансульфокислоти), залишивши лише мік-



**Рис. 1.** Вплив дріжджового манану (ДМ) та його комбінацій з вторинними метаболітами *Pseudomonas sp.* ПС-17 на пухлиноутворення, індуковане *A. tumefaciens* у паренхімі бульб картоплі сорту Слов'янка: по вертикалі – кількість пухлин порівняно з контролем, %; по горизонталі: 1 – ДМ, 0,2 г/л; 2 – ПС-17, 0,1 г/л; 3 – ДМ, 0,1 г/л; РЛ, 0,05 г/л; 4 – ДМ, 0,1 г/л; ПС-17, 0,05 г/л. Решта пояснень в тексті



**Рис. 2.** Вплив дріжджового манану на утворення пухлин, індукованих *A. tumefaciens* у паренхімі бульб картоплі сорту Слов'янка, при різних способах застосування полісахариду

робні метаболіти, а саме ДМ, РЛ та комплекс ПС-17, і випробували протипухлинну активність «спрощених» комбінацій. Вивилось, що при профілактичному способі застосування спрощені препарати також мають значну активність щодо пухлин, індукованих *A. tumefaciens* у паренхімі бульб картоплі сорту Слов'янка (рис. 1). Профілактичне застосування лише одного ДМ без домішок ПАР призводить до

98%-ного пригнічення росту пухлин, тобто має майже такий ефекту, як і у випадку застосування його з рамноліпідом та комплексом ПС-17 із псевдомонад. Терапевтична дія спрощених препаратів виявилась менш вираженою, особливо у дріжджового манану, який окремо зовсім не проявляв терапевтичного ефекту на відміну від профілактичного (рис. 2). Проте комбінування його з РЛ і, особливо, з комплексом ПС-17 супроводжується значним підвищенням активності ДМ як основного компонента КП, що може мати важливе значення для успішного використання комплексних препаратів як засобів оздоровлення і захисту рослин від пухлин, індукованих *A. tumefaciens*.

А втім одержані дані в цілому свідчать про перспективність подальшого дослідження КП, у складі яких, окрім мікробних гліканів та гліколіпідів (рамноліпіди і ЛПС псевдомонад), присутні антиметаболіти: діацетил-2,4-діоксигексагідро-1,3,5-триазин та ціаногунідин. Такі КП можуть бути ефективними засобами у попередженні розповсюдження збудників раку картоплі, винограду тощо, зниження шкочинності цих небезпечних захворювань серед культурних рослин.

**Висновки.** Показано протипухлинну та антибактеріальну (проти *A. tumefaciens*) дію двох комплексних препаратів наступного складу: дріжджовий манан, діацетил-2,4-діоксигексагідро-1,3,5-триазин, ціаногунідин і як ПАР – алкансульфофосфати в складі емульгатора Е-30 або комплекс вторинних метаболітів *Pseudomonas sp.* Протипухлинна активність препаратів вища при додаванні їх у середовище (картопляний агар) та обробці експлантів бульб картоплі до, але не після інокуляції їх *A. tumefaciens*. Протипухлинна активність КП-1, до складу якого входять алкансульфофосфати у вищих концентраціях, очевидно, частково обумовлена токсичністю його щодо паренхімних тканин картоплі, чого не можна сказати про КП-1, де як біоПАР використовувались гліколіпід та комплекс гліколіпідів і полісахариду псевдомонад.

Автори висловлюють щире подяку канд. біол. наук Л.М. Ващенко за надання для досліджень бактеріальної культури *A. tumefaciens* 9054, канд.

біол. наук О.В. Карпенко — препаратів рамнолініду та комплексу рамнолініду з полісахаридом.

O.G. Kovalenko, O.M. Polishchuk, V.O. Isakova

ANTITUMOR ACTIVITY OF SOME COMPLEX PREPARATIONS IN THE CULTURE OF POTATO CELLS TRANSFORMED BY AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Antitumor and antibacterial activity of complex preparations consisting of yeast mannan, diacetile-2,4-diohexahydro-1,3,5-triazine, cyanohyanidine, alcansulfonic acids (emulsifier E-30), and microbial metabolites was studied. The investigation was carrying out on explants of tuber potato parenchyma infected by *Agrobacterium tumefaciens*. We found that preparations have the antitumor activity. The most activity was exhibited by addition of preparations to the cultural medium and treatment of explants before of infection.

A.G. Kovalenko, E.H. Polishchuk, V.A. Isakova

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНЫХ ПРЕПАРАТОВ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК КАРТОФЕЛЯ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Показана ингибирующая активность комплексных препаратов по отношению к опухолям, индуцированным *A. tumefaciens* в культуре паренхимы клубней картофеля. В состав препаратов входят дрожжевой маннан, диацетил-2,4-диоксигексагидро-1,3,5-

триазин, цианоганидин, алкансульфонокислоты или микробные метаболиты *Pseudomonas sp.* Противоопухолевое действие препаратов выше при использовании их как профилактических, нежели терапевтических средств.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Потопальський А.І., Ткачук З.Ю.* Пухлини і нарости у рослин. — Київ : Вища шк., 1985. — 184 с.
2. *Коваленко О.Г., Кириченко А.М., Шепелевич В.В., Баркалова А.О.* Комбінована антифітовірусна дія дріжджового манану, деяких антиметаболітів і ксенобіотиків // Доп. НАН України. — 2006. — № 3. — С. 153–157.
3. *Kovalenko O.G.* Study of complex preparations as a way of plant protection from viral and bacterial infections // *Bioresources and Viruses : 5th Internat. Conf.* — Kyiv, 2007. — С. 71.
4. *Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Ващенко Л.М.* Вплив ліпополісахарид-білкового комплексу *Pseudomonas siringae* рв. *atrofaciens* на процес пухлиноутворення, спричинений *Agrobacterium tumefaciens* // Мікробіол. журн. — 2003. — **65**, № 3. — С. 5–13.
5. *Карпенко Е.В., Шульга А.Н., Шеглова Н.С., Елисеєв С.А., Вильданова-Марцішин Р.И., Туровский А.А.* Поверхностно-активные соединения культуры *Pseudomonas sp.* PS-17 // Мікробіол. журн. — 1996. — **58**, № 5. — С. 18–24.

Надійшла 23.05.08