



УДК 632.23

© 2010

Ю. А. Потопальська, Л. Н. Юркевич, Е. М. Негребецька

Протипухлинна дія препарату амітозин та його аналога амітозинобераміду на пухлини рослин

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)

*Вивчено вплив препарату амітозин та його аналога амітозинобераміду на розвиток пухлин каланхоє, індукованих вірулентною бактерією *Agrobacterium tumefaciens*. Також досліджено власну флуоресценцію амітозину та амітозинобераміду і встановлено, що обидва препарати проникають у клітини пухлин каланхоє і пригнічують їх розвиток, виявляючи при цьому здатність до власної флуоресценції.*

Відомі дві причини генетичного утворення пухлин на рослинах — це мутації рослинних генів та наявність у геномі рослини послідовностей онкогенів агробактерій, як результат бактеріального переносу генів у процесі еволюції [1].

У природі широко відомі різні види пухлин рослин, які супроводжуються тканинною проліферацією. Серед них особливу увагу привертають пухлини, які викликаються фітопатогенною бактерією *Agrobacterium tumefaciens* [2–6]. Ця бактерія зумовлює типові неопластичне захворювання рослин — бактеріальний рак, або корончатий гал. Бактерія виступає тільки як ініціатор процесу. Далі він проходить і без неї [1, 7].

Інтерес до цього виду пухлин рослин викликаний тим, що вони мають основні ознаки, які властиві злоякісним новоутворенням тварин і людини, і в першу чергу характеризуються автономним нерегульованим ростом, трансплантабельністю та агресивністю. Тому корончатогогалові пухлини використовують як експериментальну модель у дослідках, метою яких є виявлення певних фундаментальних біологічних концепцій, що лежать в основі розуміння пухлинних процесів взагалі, та для вивчення протипухлинної дії препаратів [7–9].

У цій роботі наведені результати дослідження на пухлинах рослин дії оригінальних препаратів амітозин та амітозиноберамід — ефективних протипухлинних засобів, рекомендованих до широкого клінічного випробування і застосування [10].

До складу амітозину входять тіофосфамідні похідні алкалоїдів чистотілу, що належать до кількох груп, таких як хелідоніну, берберину, протопіну та хінолізидину. Для них харак-

терна власна флуоресценція в ультрафіолетових променях. Тому препарат амітозин має свою загальну флуоресценцію [10]. На культурі пухлинних клітин мишей та людини після дії амітозину встановлено флуоресценцію клітин, що свідчить про проникнення амітозину в клітини [10].

У завдання наших досліджень входила також можливість виявлення флуоресценції клітин пухлин рослин, індукованих *Agrobacterium tumefaciens* 8628, після їх обробки препаратами амітозин та амітозиноберамід.

Матеріали та методи досліджень. У досліді використовували препарати амітозин та амітозиноберамід (Інститут оздоровлення та відродження народів України) з концентрацією 0,1 мг/мл. Для дослідження люмінесцентно-мікроскопічної картини зрізів пухлин каланхое використовували люмінесцентний мікроскоп МЛ-2 ("ЛОМО", Росія).

Зміни маси корончатогогалових пухлин та протипухлинну активність зазначених препаратів досліджували на моделях пухлин рослин каланхое (*Kalanchoe daigremontiana*), індукованих високовірулентним штамом *Agrobacterium tumefaciens* 8628.

Для дослідів були підібрані рослини каланхое однакового віку, які мали однакову висоту та товщину стебла. Зараження агробактерією проводили в товщу листової пластинки або методом декапітації. Для цього рослини каланхое у фазі 5–7 листків декапітували стерильним скальпелем, а через 15–30 хв на поверхню зрізу наносили дводобову суспензію агробактерій у дозі $1 \cdot 10^8$ клітин.

Розміри пухлин визначали через кожні 5–6 діб. Об'єм їх вираховували за формулою

$$V = \frac{\rho abc}{4},$$

де ρ — питома маса пухлинної тканини; a , b , c — відповідно ширина, довжина, висота пухлини.

Питома маса пухлинної тканини наближена до одиниці, тому кількісно маса пухлини прирівнюється до її об'єму.

Для дослідження протипухлинної дії препаратів амітозин та амітозиноберамід їх розчини в концентрації 0,1 мг/мл наносили на пухлини у вигляді аплікацій, починаючи з 15-ї доби після інокуляції агробактерій, по 1–2 мл залежно від розміру пухлин.

Результати досліджень та їх обговорення. За літературними джерелами, перші симптоми появи пухлин при штучному зараженні з'являються на 10–30-ту добу у вигляді невеликих валиків і горбиків білого або світло-зеленого кольору на стеблі чи листку [7]. Аналогічне явище ми спостерігали і в наших дослідях.

Виходячи з отриманих даних, кінетична крива росту пухлин на стеблі каланхое має S-подібну форму (рис. 1). Кінетичні виміри показують, що швидкість розвитку пухлин каланхое, індукованих агробактерією, спочатку зростає, а через 30 діб починає зупинятися, напевно, завдяки якимось лімітуючим факторам. Це свідчить про те, що пухлини розвиваються за тими ж кінетичними законами, що і пухлини тварин та людини [11, 12].

На пухлині каланхое через 70 діб після обробки препаратом амітозин з'явилися некротичні плями, площа яких з часом зростала. Явище повного некрозу на вторинних пухлинах рослин, які не піддавалися дії препарату, не спостерігали, але темп їхнього росту уповільнювався та з'являвся незначний некроз поверхневих клітин.

Після дії амітозину (рис. 2) ріст пухлин сповільнювався. Починаючи з 6-ї доби після нанесення препарату відбувалася регресія пухлини. Середня маса пухлини за період дії препарату (29 діб) зменшилася на 7,89 г (табл. 1). Після дії амітозинобераміду також спо-

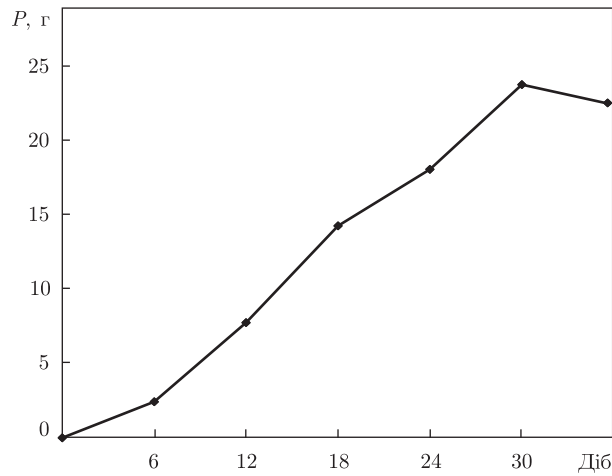


Рис. 1. Кінетична крива росту маси пухлин, індукованих *Agrobacterium tumefaciens* 8628, на рослинах каланхоє

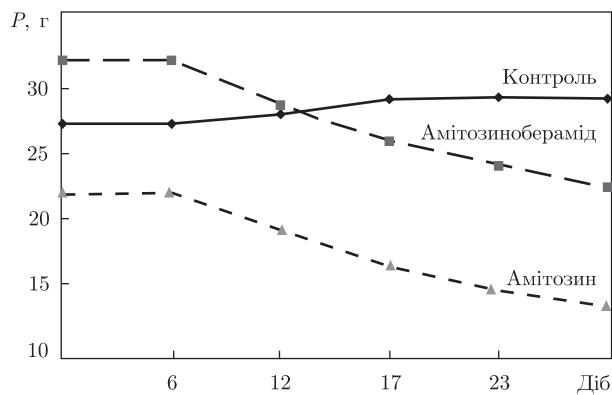


Рис. 2. Кінетичні криві зміни маси пухлин на рослинах каланхоє, заражених *Agrobacterium tumefaciens* 8628, під впливом протипухлинних препаратів

стерігали зменшення маси пухлини. Середня маса пухлини за вказаний вище період дії препарату зменшилася на 9,65 г (див. табл. 1). Кінетична крива зміни маси пухлин майже аналогічна такій при дії препарату амітозин (див. рис. 2).

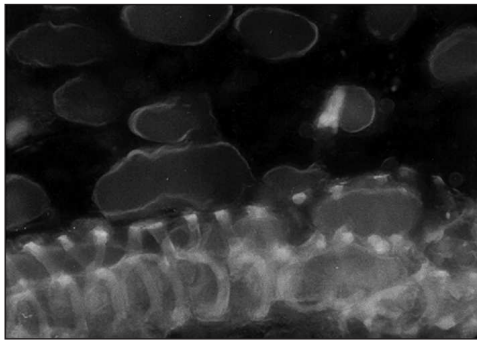
У контрольному варіанті (вода) спочатку фіксували незначне зростання маси пухлин, яке після триразової обробки стабілізувалося (див. рис. 2, табл. 1).

Одним із завдань нашої роботи було вивчення власної флуоресценції препаратів амітозин [13] і амітозиноберамід [14] та їх здатності до проникнення в клітини пухлин каланхоє. Під мікроскопом у прохідному та люмінесцентному світлі досліджено зрізи пухлин

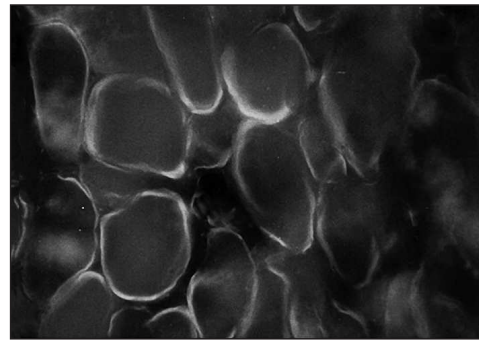
Таблиця 1. Результати впливу протипухлинних препаратів (час дії 29 діб) на зміну маси пухлини каланхоє

Серія дослідів	Початкова маса пухлини, г	Маса пухлини через 29 діб, г
Контроль ($n = 3$)	$27,12 \pm 12,84$	$29,15 \pm 8,1$
Амітозин ($n = 8$)	$22,0 \pm 6,35$	$13,11 \pm 5,75^*$
Амітозиноберамід ($n = 6$)	$32,05 \pm 6,12$	$22,4 \pm 4,91^*$

* $P < 0,05$.

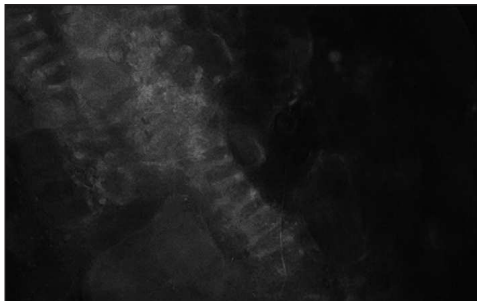


a

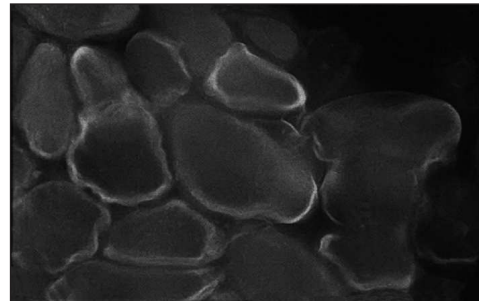


б

Рис. 3. Мікроскопічна картина зрізів пухлин із стебла живих рослин каланхое, оброблених препаратами амітозин (*a*) та амітозиноберамід (*б*) у концентрації 0,1 мг/мл протягом 21 доби в ультрафіолетовому світлі (зб. 3 × 40)



a



б

Рис. 4. Мікроскопічна картина зрізів контрольних пухлин із стебла живих рослин каланхое без обробки (*a*) та при обробці дистильованою водою протягом 21 доби (*б*) в ультрафіолетовому світлі (зб. 3 × 40)

каланхое, розташовані на стеблах рослин і оброблені вказаними препаратами в концентрації 0,1 мг/мл протягом 21 доби (7 разів через 72 год).

У досліді використовували два контролі:

- 1 — зріз пухлини із стебла живої рослини каланхое, нічим не обробленої;
- 2 — зріз пухлини із стебла живої рослини каланхое, обробленої дистильованою водою протягом 21 доби (7 разів через 72 год).

При дослідженні люмінесцентно-мікроскопічної картини зрізу пухлини із стебла живої рослини каланхое, обробленої препаратом амітозин у концентрації 0,1 мг/мл протягом 21 доби (7 разів через 72 год), спостерігали флуоресценцію салатовим кольором оболонок пухлинних клітин і флуоресценцію червоним кольором хлорофілу (рис. 3, *a*). При застосуванні амітозинобераміду люмінесцентно-мікроскопічна картина зрізу пухлини була більш виражена, оболонки пухлинних клітин флуоресценціювали салатовим кольором, хлорофіл — червоним кольором (див. рис. 3, *б*).

Дослідження під люмінесцентним мікроскопом зрізу контрольної пухлини із стебла живої рослини каланхое без обробки засвідчило незначну флуоресценцію салатовим кольором всього клаптика тканини, а не поодиноких клітин, і флуоресценцію червоним кольором хлорофілу (рис. 4, *a*). При обробці зрізу контрольної пухлини дистильованою водою протягом 21 доби (7 разів через 72 год) спостерігали збільшені в розмірах, розбухлі клітини, оболон-

ки яких слабо флуоресціювали салативим кольором, хлорофіл флуоресціював червоним кольором (див. рис. 4, б).

Таким чином, за даними експериментального вивчення протипухлинної дії амітозину та амітозинобераміду на рослинній моделі каланхое встановлено, що ці препарати в концентрації 0,1 мг/мл (при експозиції протягом 29 діб) пригнічують розвиток пухлин, індукованих вірулентною бактерією *Agrobacterium tumefaciens*. При дослідженні люмінесцентно-мікроскопічної картини зрізів пухлин із стебла живих рослин каланхое, оброблених амітозином і амітозиноберамідом у концентрації 0,1 мг/мл протягом 21 доби (7 разів через 72 год) виявлено, що обидва препарати проникають у клітини пухлин каланхое, концентруючись переважно в оболонках клітин та виявляючи при цьому здатність до власної флуоресценції. Отже, можна зробити висновок, що явище власної флуоресценції препаратів амітозин і амітозиноберамід може бути використане при вивченні механізму їх протипухлинної дії.

Результати цієї роботи вказують на можливість і перспективність вивчення і застосування препаратів амітозин та амітозиноберамід з метою пригнічення розвитку пухлин рослин.

1. *Пирузян Э. С., Андрианов В. М.* Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. – Москва: Наука, 1985. – 251 с.
2. *Rezmer C., Schlichting R., Wachter R., Ullrich C. I.* Identification and localization of transformed cells in agrobacterium tumefaciens-induced plant tumors // *Planta*. – 1999. – **209**, No 4. – P. 399–405.
3. *Ooms G., Hooykaas P. J., Moolenaar G., Schilperoort R. A.* Grown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions // *Gene*. – 1981. – **14**, No 1–2. – P. 33–50.
4. *Sobota A. E.* Effect of sublethal heat injury on tumour induction and RNA synthesis in *Agrobacterium tumefaciens* // *Microbios*. – 1978. – **23(92)**. – P. 115–126.
5. *Jin S., Song Y. N., Deng W. Y. et al.* The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures // *J. Bacteriol.* – 1993. – **175**, No 21. – P. 6830–6835.
6. *Wirawan I. G., Kang H. W., Kojima M.* Isolation and characterization of a new chromosomal virulence gene of *Agrobacterium tumefaciens* // *Ibid.* – 1993. – **175**, No 10. – P. 3208–3812.
7. *Потопальський А. І., Ткачук З. Ю.* Пухлини і нарости у рослин. – Київ: Вища шк., 1985. – 184 с.
8. *Зоз Н. Н., Серебряный А. М., Котенков П. В.* Ингибирование роста опухолей растений N-нитроза-N-ментил мочевиной // *Докл. АН СССР*. – 1977. – **233**, № 1. – С. 242–244.
9. *Серебряный А. М., Зоз Н. Н., Семенова Н. А. и др.* Противоопухолевая активность производных фосфорной кислоты // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* – 1979. – № 4. – С. 610–611.
10. *Потопальський А. І.* Амітозин – перший перспективний препарат із класу алкілованих алкалоїдів з цілеспрямованою молекулярною регуляцією пухлинного росту та імунорекцією організму // *Матеріали X з'їзду онкологів України, Крим, 10–12 жовтня 2001 р.* – Судак, 2001. – С. 37.
11. *Зінченко В. А.* Закономірності і механізми формування та подолання радіорезистентності клітин пухлини: Автореф. дис. . . . д-ра біол. наук. – Київ, 1999. – 35 с.
12. *Эмануэль Н. М.* Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. – Москва: Наука, 1977. – 409 с.
13. *Потопальський А. І., Петличная Л. І., Ивасивка С. В.* Барбарис и его препараты в биологии и медицине. – Киев: Наук. думка, 1989. – 286 с.
14. *Потопальський А. І.* Препараты чистотела в биологии и медицине. – Киев: Наук. думка, 1992. – 236 с.

Yu. A. Potopalska, L. N. Yurkevych, E. M. Nehrebetska

**Antitumor effect of amitozyn preparation and its analog
amitozynoberamide on plant tumors**

We study the effect of amitozyn preparation and of its analog amitozynoberamide on the tumor progression in kalanchoe plants. The progression of plant tumors was induced by Agrobacterium tumefaciens virulent bacterium. We have also studied the fluorescence of preparations and a possibility to penetrate into the tumor cells of kalanchoe plants. We have also detected the property of amitozyn and amitozynoberamide preparations to penetrate into the tumor cells of kalanchoe, to inhibit the tumor progression in plants, and to have their own fluorescence.