

Л.Т.ТОБАГАБЫЛ, И.С.КОЛБАЙ, Г.К.АСАН, О.А.САПКО*,
А.Ш.УТАРБАЕВА*, А.Н.МИХАЛЕВ* Р.М.КУНАЕВА*

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОГО МЕТАБОЛИТА ГРИБА *FUSARIUM SOLANI*

(ДГП «Центральная лаборатория биоконтроля, сертификации и предклинических испытаний» РГП ЦБИ КН МОН РК; *ДГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» РГП ЦБИ КН МОН РК)

В экспериментах на мышах показано, что фракция КФ:F1 экстрацеллюлярного метаболита гриба *Fusarium solani* проявляет ингибирующее влияние на этапы IgM- и IgG-гуморального ответа, причем показана большая степень подавления синтеза IgM. Выявлено стимулирующее влияние КФ:F1 на состояние клеточного иммунитета в реакции гиперчувствительности замедленного типа и синтез интерлейкина-2 и γ-интерферона на его второй стадии.

Грибы рода *Fusarium* представляют неоднородную группу фитопатогенов, поражающих разные полевые культуры. *F. solani* и его разновидности вызывают корневые и стеблевые гнили растений [1]. Возбудители фузариозов полевых культур при взаимодействии с высшими растениями проявляют себя как антагонисты, стимуляторы роста или паразиты. Подобное многообразие взаимоотношений объясняется способностью этих грибов продуцировать широкий спектр соединений: токсины, полифенолы, пептиды, ферменты, антибиотики, гиббереллины [2-3]. Эти соединения обладают широким спектром биологической активности, включая фитотоксическое, антибиотическое, инсектицидное, фунгицидное [4-5].

В исследованиях *in vitro* обнаружено, что культурные фильтраты восьми видов грибов рода *Fusarium* обладают антибактериальной активностью против штаммов *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* [6]. Из сухой биомассы штамма PS-64 гриба *Fusarium* был получен препарат, для которого установлены иммуномодулирующие свойства [7].

Учитывая вышесказанное целью настоящего исследования явилось изучение влияния фракции КФ:F1 экстрацеллюлярного метаболита гриба *Fsolani* на клеточный и гуморальный иммунитет интактных мышей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культтуру гриба *Fsolani* (штамм F-RKM 166,

полученную из Республиканской коллекции микроорганизмов РК), культивировали на модифицированной среде Чапека [8], дополненной картофельным отваром. Культтуру 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 экстрацеллюлярного метаболита получали из культурального фильтрата гриба на стадии стационарного роста культуры по методу [9].

Для изучения влияния метаболита гриба на клеточный и гуморальный иммунитет, были проведены эксперименты на 73 беспородных белых мышах обоего пола массой 22-30 г. Исследования проводили в условиях антигенной стимуляции эритроцитами барана (ЭБ), моделирующими различные варианты чужеродного агента (корпускулярный, тимусзависимый, содержащий множество антигенных детерминант). Исследовали действие двух доз вещества – 37,5 мг/кг и 18,8 мг/кг, вводимых внутрибрюшинно однократно, на разных стадиях развития клеточного и гуморального иммунитета.

В первой серии опытов мышей сенсибилизовали внутрибрюшинным введением 0,2 мл суспензии ЭБ в концентрации 5×10^6 . Фракцию КФ:F1 в дозах 37,5 мг/кг (подгруппа «а») и 18,8 мг/кг (подгруппа «б») вводили животным или одновременно с антигеном (группа I), или на 5-е сутки после иммунизации (группа II). Определение титра антител проводили в реакции гемаг-

глютинации по общепринятой методике в I группе на 4-е сутки после иммунизации (пик синтеза IgM), а во II группе - на 7-е сутки (пик синтеза IgG).

С целью устранения гетероаглютининов проводили адсорбцию исследуемой сыворотки, используя 25% суспензию ЭБ. Далее готовили разведения сыворотки с добавлением 1% ЭБ, начиная от 1:10 до 1:2560. В контрольную лунку вносили 0,5 мл физиологического раствора и добавляли 0,5 мл 1% ЭБ. Учет реакции вели после инкубации в термостате в течение 2 часов при 37°C. За титр принимали то последнее разведение исследуемой сыворотки, при котором еще наблюдали положительный результат.

Во второй серии экспериментов клеточный иммунитет определяли по способности мышей к индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) к ЭБ. Сенсибилизирующую дозу ЭБ вводили мышам внутрибрюшинно в виде 5% суспензии в объеме 0,2 мл физиологического раствора, а разрешающую дозу вводили на 5-й день после сенсибилизации в подошвенную подушечку стопы в виде 10% суспензии в объеме 0,1 мл физиологического раствора. В контралатеральную лапу в качестве контроля в эти сроки вводили физиологический раствор в таком же объеме. Мышам I опытной группы КФ:F1 вводили одновременно с сенсибилизирующей дозой антигена, что позволяет выявлять его влияние на процесс образования сенсибилизованных Т лимфоцитов, а II группе – одновременно с разрешающей дозой, что позволяет выявлять влияние вещества на стадию взаимодействия лимфоцитов-эффекторов с сенсибилизирующим антигеном. Контрольным животным (III группа) введение сенсибилизирующей и разрешающей дозы ЭБ, а также введение физиологического раствора в контрольную лапку проводили по аналогичной схеме с опытными группами животных. Степень повышения чувствительности в данном тесте выявляли по интенсивности воспалительной реакции стопы, учет которой осуществляли через 24 часа после введения разрешающей дозы антигена. Для этого мышей декапитировали с соблюдением норм гуманного отношения к животным, после этого обе лапки отрезали на уровне голеностопного сустава и взвешивали на весах. Определяли индекс воспаления (ИВ) по разнице массы опытной (m_0) и контрольной (m_k) лап:

$$\text{ИВ} = \frac{m_0 - m_k}{m_k} \cdot 100\%$$

Во всех исследуемых группах животных этой серии проводили исследование периферической крови с определением в сыворотке крови количества цитокинов – интерлейкинов 2 и 6 (ИЛ-2, ИЛ-6), γ -интерферона (γ -ИФ) иммуноферментным методом с использованием набора реагентов ИФА-БЕСТ. Результаты регистрировали на микропланшетном фотометре STAT FAX 2100, измеряя оптическую плотность в двухволновом режиме, по которым находили концентрацию цитокинов на калибровочной кривой.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В течение 3-4 дней после иммунизации (введение антигена в организм) протекает латентный период, т.е. скрытые процессы восприятия антигенного раздражения. Первыми после антигенной стимуляции (через 3-4 дня) синтезируются антитела класса IgM (антитела первичного ответа). На 5-е сутки после иммунизации происходит переключение синтеза IgM на IgG, которое происходит непосредственно в антителосинтезирующих клетках. На 6-7-е сутки приходится пик развития IgG-ответа.

Результаты реакции гемагглютинации в контрольной группе животных показали, что титр IgM, определяемый на 4-е сутки после антигенной стимуляции ЭБ, и титр IgG, определяемый на 7-е сутки после иммунизации, составили 1:1280. Однократное введение КФ:F1 животным I группы в латентной стадии антигенной стимуляции (одновременно с введением ЭБ), показало снижение выработки IgM, что говорит о подавлении первичной гуморальной реакции. При этом, большее угнетение синтеза этого класса белков наблюдалось при более высокой концентрации вещества – при дозе 18,8 мг/кг агглютинация ЭБ наблюдалась еще при разведении сыворотки 1:640, а при дозе 37,5 мг/кг – только при 1:320. Также показано ингибирующее влияние КФ:F1 на процесс образования IgG, который составил при введении двух доз 1:640.

В следующем опыте введение разрешающей дозы ЭБ в подошвенную подушечку стопы мышей, которым одновременно с сенсибилизирую-

щей дозой антигена вводили КФ:F1 (Ia подгруппе в дозе 37,5 мг/кг, в Iб подгруппе - 18,8 мг/кг) приводило к повышению РГЗТ, что выражалось в достоверном увеличении индекса воспаления (ИВ) лапки (таблица 1).

Эти данные свидетельствуют о том, что испытуемое вещество оказывает влияние на развитие первой стадии клеточного иммунного ответа, повышая накопление сенсибилизирующих лимфоцитов (T-эффекторов). При этом обнаружена дозозависимость влияния фракции КФ:F1 на процесс образования клона антиген-специфических Т-лимфоцитов, более выраженная при введении высокой дозы ($p<0,01$) чем низкой ($p<0,05$). При введении II группе животных КФ:F1 на 5-е сутки после сенсибилизации одновременно с разрешающей дозой ЭБ, то есть на стадии взаимодействия лимфоцитов-эффекторов с антигеном, также наблюдалось повышение ИВ в двух опытных подгруппах по сравнению с контрольной группой животных ($p<0,05$).

Таким образом, наибольшее стимулирующее действие КФ:F1 оказывал на стадии образования клона лимфоцитов-эффекторов в концентрации 37,5 мг/кг.

Как на стадии образования T-эффекторов, так и на стадии их взаимодействия с антигеном, раз-

ные дозы КФ:F1 достоверно повышали количество ($p<0,01$) и объем ($p<0,001$) эритроцитов (Таблица 2).

В связи с этим, сенсибилизованные лимфоциты, функционально относящиеся к клеткам-киллерам в клеточных РГЗТ, по-видимому, можно рассматривать как регуляторы эритропоэза. Роль эритроцитов в антиинфекционном иммунитете немаловажна. Они пассивно адсорбируют большое количество странствующих антигенов, что в известной мере предотвращает массивное поступление антигена в органы иммуногенеза. Кроме того, эритроцит несет на своей поверхности такие структуры, как рецепторы для С3b-компонента комплемента и Fc-фрагмента IgG, имеющих значение для иммунных реакций. Все это свидетельствует о том, что выявленные изменения гемопоэза под влиянием КФ:F1 могут приводить к адекватным изменениям иммуногенеза.

При введении испытуемого вещества на второй стадии развития клеточного иммунитета у сенсибилизованных ЭБ мышей (II группа) в сыворотке крови наблюдали повышение концентрации ИЛ-2 и γ -ИФ ($p<0,01$) (Таблица 3).

Известно, что эти цитокины участвуют в регуляции клеточного иммунитета, Т-клеточной пролиферации и активации макрофагов. Кроме

Таблица 1. Индекс воспаления после однократного воздействия КФ:F1 на разных стадиях клеточного иммунного ответа

Группы животных	Ia 37,5 мг/кг	Iб 18,8 мг/кг	IIa 37,5 мг/кг	IIб 18,8 мг/кг	III контроль
ИВ %	12,8±5,6	8,4±2,1	6,3±2,3	7,3±1,8	3,7±2,2

Таблица 2. Количество и объем эритроцитов периферической крови мышей после воздействия КФ:F1 в различных дозах на разных стадиях клеточного иммунитета

Показатели	Группы животных				
	Ia	Iб	IIa	IIб	III
Количество эритроцитов, $\times 10^6/\text{мкл}$	6,4±2,2	7,9±2,9	5,3±2,1	6,8±2,3	1,9±0,4
Объем эритроцитов, %	30,7±5,6	32,8±4,1	24,2±3,5	25,4±4,3	6,2 ±1,7

Таблица 3. Концентрация цитокинов в сыворотке крови мышей после воздействия КФ:F1 в различных дозах на разных стадиях клеточного иммунитета

Показатели	Группы животных				
	Ia	Iб	IIa	IIб	III
ИЛ-2	10,0±0,2	11±0,2	28,7±2,1	32±1,9	12±0,3
γ -ИФ	20,6±2,5	20,6±2,5	36,2±2,8	41,0±3,1	18,2±0,4

того, γ -ИФ определяет дифференцировку Th в Th1, который ответственен за развитие иммунитета по клеточному типу (фагоцитоз, цитотоксичность, гиперчувствительность замедленного типа и др.). Эти результаты согласуются с приведенными выше данными о повышении индекса воспаления лапки сенсибилизованных мышей в реакции гиперчувствительности замедленного типа. В то же время, не обнаружено изменений в содержании ИЛ-6, который регулирует дифференцировку Th в Th2, определяющий развитие иммунитета по гуморальному типу.

Таким образом, проведенные эксперименты позволяют заключить, что фракция КФ:F1 экстракцеллюлярного метаболита гриба *Fusarium solani* оказала ингибирующее влияние на этапы IgM- и IgG-гуморального ответа. Количественная оценка эффекта вводимых доз метаболита показало большую степень подавления синтеза IgM, являющихся антителами первичного ответа, при более высокой концентрации вещества. Выявлено стимулирующее влияние КФ:F1 на состояние клеточного иммунитета в реакции гиперчувствительности замедленного типа. Показано стимулирующее влияние КФ:F1 на синтез ИЛ-2 и γ -ИФ на второй стадии клеточного иммунитета (взаимодействия Т-эффекторов с антигеном).

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. Kern H. Phytotoxins produced by Fusaria // Phytotoxins in Plant Disease / Eds. Wood R.K.S., Balili A., Graniti A. - New York: Academic Press, 1972. - P.35-48.
3. Li S., Hartman G.L., Widholm J.M. Viability staining of soybean suspension-cultured cells and a seedling stem cutting assay to evaluate phytotoxicity of *Fusarium solani* f.sp. *glycines* culture filtrates // Plant Cell Reports. -1999. -V.18. - P.375-380.

4. Шаяхметов И.Ф., Асфандиярова Р.Р. Фитотоксичность культурального фильтрата *Fusarium oxysporum* Shlecht к каллусной ткани пшеницы. // Микология и фитопатология. 1991. т.25, Вып. 4. - С.343-347.

5. 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.

6. Qureshi S.A., Riaz R., Sultana V. e.a. Pathogenicity and antimicrobial activity of seed-before *Fusarium solani* appel and wollenw. Emend. Snyd and hans strains // Pakistan Journal of Biological Sciences. - 2003. - N 8. - P.1183-1186.

7. Горшина Е. С., Исаакян Л. А., Качалай Д. П. Препарат, влияющий на тканевой обмен и модулирующий процессы иммунитета в биологических системах, и биологически активная пищевая добавка «Мипровит». - Патент РФ №2092179, 1997.

8. Билай В.И. Фузарии. Киев: Наукова думка, 1977. - 441с.

9. Санко 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.

Резюме

Тышқандарға жүргізілген тәжірибелерде *Fusarium solani* санырауқұлағының, клеткадан тыс метаболитінен белініп алынған КФ:F1 фракциясы, гуморалді IgM- және IgG кезеңдеріне бәсендегетін әсер етті, сонымен катар IgM синтезіне үлкен дөрежеде басымдылық көрсетілді. КФ:F1 фракциясының клеткалық иммунитет реакциясының бәсенсу түрті аса сезімталдырылғының және интерлейкин-2 мен γ -интерферонының синтезіне оның екінші кезеңінде ынталандыруышы әсер ететіні көрсетілді.

Summary

In experiments on mice it was shown that the fraction KФ:F1 of the extracellular metabolite of *Fusarium solani* fungi suppressed the stages of IgM- and IgG- humoral reaction with the more marked suppression of IgM synthesis. It was shown the stimulating effect of KФ:F1 upon a state of cellular immunity in the reaction of delayed-type hypersensitivity and the synthesis of interleukin-2 and γ -interferon at the second stage of cellular immunity.