

К.С. Циганенко, к.б.н., О.П. Кобзиста, к.б.н.,
О.М. Зайченко, д.б.н.

ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ І ТОКСИГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВОГО БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО МЕТАБОЛІТУ З *ASPERGILLUS PARVULUS SMITH*

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
НАН України, Київ

Гриби роду *Aspergillus* Mich. відомі як продуценти широкого спектру біологічно активних речовин. Серед них найбільш вагомими є метаболіти, що обумовлюють антагоністичні властивості представників цього роду. Зокрема це стосується антибіотиків і мікотоксинів [1-4]. На сьогодні значна частина антибіотичних сполук з аспергілів не знайшла практичного використання через їх токсичність та інші побічні ефекти [5]. З огляду на це, пошук нових метаболітів з важливими характеристиками має супроводжуватись дослідженням їх токсигенних властивостей.

Раніше нами [6] в процесі скринінгу малодосліджених видів роду *Aspergillus* на їх здатність до синтезу метаболітів, перспективних для подальшого практичного застосування, був відібраний штам *A. parvulus*, культуральні фільтрати якого проявляли значну антибіотичну активність щодо грампозитивних та грамнегативних бактерій [7], а також високу фітотоксичну, в тому числі гербіцидну, дію [8].

В результаті відпрацьованого нами методичного підходу з культурального фільтрату *A. parvulus* була виділена в кристалічному вигляді активна сполука з умовною назвою "AP 3142" [9].

Метою даної роботи було подальше дослідження деяких характеристик цієї речовини і зокрема її фізико-хімічних і токсигенних властивостей.

Матеріали та методи дослідження

Для дослідження властивостей активного метаболіту було використано ряд біологічних і фізико-хімічних методів.

Елементний склад сполуки визначали методом сплавлення з натрієм за Черонісом [10]. При цьому визначали присутність в препараті атомів азоту, сірки, галогенів. В окремих дослідках визначали наявність фосфору [11].

Температуру плавлення отриманої кристалічної речовини визначали за Кофлером [12, 13] та обчислювали її як середню з 5-6 вимірювань.

Спектральні характеристики препарату реєстрували за допомогою спектрофотометра "Specord" (Німеччина) як в УФ-, так і у видимій області спектру [14].

Кількісну характеристику біологічної активності "AP 3142" визначали по критерію "мінімальна пригнічуюча концентрація" (МПК), яку знаходили за допомогою загальноприйнятого методу двохкратних серійних розведень у рідкому поживному середовищі [15]. В якості тест-організму використовували суспензію бактеріальної культури *Bacillus subtilis* 617 з густиною 5×10^6 кл./мл, а як рідке поживне середовище — картопляний бульйон. Пробірки інкубували при 37°C впродовж 24 годин.

Токсичні властивості отриманого кристалічного препарату визначали за допомогою методу шкірної проби на кроликах [16], а також шляхом його підшкірного та внутрішньооче-

ревинного введення білим мишам у дозах від 2,5 до 500 мг/кг [17]. За тваринами вели постійний нагляд впродовж 10 діб, визначали їх загальний стан, масу та стан шкіри.

Результати та їх обговорення

Хімічну ідентифікацію кристалічного препарату проводили за допомогою елементного аналізу. Було з'ясовано, що ця речовина складається лише з основних компонентів органічних сполук, зокрема вуглецю, водню та кисню.

Досліди щодо виявлення інших елементів, які найчастіше присутні в складі органічних речовин, дали негативний результат. Так, відсутність азоту підтверджувалась появою жовтого забарвлення в реакції з хлористим залізом (III) у присутності сірчаної кислоти. Відсутність сірки була засвідчена в реакції з ацетатом свинцю. В складі досліджуваної речовини не було виявлено також елементів групи галогенів.

Кристали сполуки без плавлення при температурі 52°C перетворюються у білу непрозору речовину, що, найбільш вірогідно, було пов'язано з її дегідратацією. Слід наголосити, що при цьому речовина не втрачала біологічної активності. Подальше нагрівання супроводжувалось обвуглюванням, яке спостерігалось при температурі 273°C.

Таким чином, характерною для цієї сполуки можна вважати температуру розкладу 273°C.

Аналіз спектральних характеристик водного розчину препарату у видимій та в ультрафіолетовій областях спектру засвідчив наявність чіткого максимуму в УФ області спектру при довжині хвилі 265 нм ($E = 37800$). Порівнюючи це значення з табличними рівнями максимумів поглинання основних класів органічних сполук в області 200-800 нм можна зробити припущення, що в структурі молекули досліджуваної сполуки можуть міститися від 3 до 6 спряжених подвійних зв'язків, атоми йоду, азоту та карбоксильна група [14]. Однак, елементний аналіз цієї речовини показав відсутність в структурі атомів азоту та галогенів. Виходячи з цього, можна зробити висновок, що ця речовина є ненасиченою поліеновою сполукою, яка містить карбоксильну групу.

У видимій частині спектру не було відмічено максимумів поглинан-

ня, на що може вказувати також і відсутність забарвлення.

Дослідження біологічних властивостей сполуки показало досить високу антибіотичну активність, яку засвідчує значення мінімальної пригнічуючої концентрації щодо *B. subtilis* 617 (0,14 мг/мл) [18].

При визначенні МПК водного розчину "AP 3142" методом двохкратних серійних розведень ріст тест-культури *B. subtilis* 617 не спостерігався у перших трьох пробірках, а в усіх наступних та у контролі був виявлений повноцінний ріст бацил. Останній пробірці, де спостерігалася затримка росту тест-культури, відповідало розведення 1 : 4 (0,14 мг/мл кристалічної речовини), тобто МПК становила 0,14 мг/мл.

Дослідження токсигенних властивостей сполуки методом шкірної

проби на кролях засвідчило її безпечність. Водний розчин в МПК в жодному випадку не спричиняв навіть гіперемії.

Підшкірне введення мишам культуральних фільтратів також не справляло шкідливого впливу. Але, при підшкірній ін'єкції водного розчину препарату у дозі 500 мг/кг на 3 добу спостереження у 50 % мишей в місцях введення з'являлась гіперемія III ступеню діаметром 7 мм з подальшим облісінням, набряком, інколи виразками. Але дослідні миші не втрачали апетиту та були активними; на 6 добу спостереження область гіперемії вкривалась суцільною кірочкою. При підшкірному а також і при внутрішньоочеревинному введенні у вказаній дозі загибель мишей не реєструвалась.

Таким чином, на даній стадії дослідження "AP 3142" можна вважати умовно не токсичним для теплокровних.

В середині 70-х років минулого століття Chao et al. [19 — 21] виділили з *A. parvulus* та ідентифікували два метаболіти. Описані сполуки за структурами були віднесені до речовин хінонової природи і отримали назву аспарвенон та парвуленон. Однак, дослідники не наводять даних щодо біологічної активності цих сполук.

Отриманий нами кристалічний препарат не належить до класу хінонів, а є ненасиченою поліеновою сполукою, яка містить карбоксильну групу. Це дає нам підстави зробити висновок, що "AP 3142" є дійсно новим метаболітом, який проявляє широкий спектр біологічних активностей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Билай В.И. Биологически активные вещества микроскопических грибов. — Киев: Наук. думка, 1965. — 267 с.
2. Билай В.И. Микроскопические грибы — продуценты антибиотиков. — Киев: Изд-во АН УССР, 1961. — 181 с.
3. Тутельян В.А., Кравченко Л.В. Микотоксины (медицинские и биологические аспекты) — Москва: Медицина, 1985. — 320 с.
4. Берестецкий О.А., Боровков А.В. Фитотоксические метаболиты почвенных пенициллиев // Микробиол. журн. — 1979. — 41, № 3. — С. 291-302.
5. Берестецкий О.А., Боровков А.В. Фитотоксические метаболиты почвенных аспергиллов // Микробиол. журн. — 1981. — 43, № 4. — С. 517-530.
6. Циганенко К.С., Зайченко О.М. Антибиотичні властивості деяких видів роду *Aspergillus* Mich. // Микробиол. журн. — 2004. — 66, № 4. — С. 56-61.
7. Циганенко К.С., Зайченко О.М. Антибиотичні та фітотоксичні властивості деяких штамів *Aspergillus parvulus* Smith // Микробиол. журн. — 2004. — 66, № 5. — С. 62-67.
8. Циганенко К.С., Зайченко О.М. Характеристика фітотоксичних властивостей *Aspergillus parvulus* Smith // Агрокол. журн. — 2004. — № 4. — С. 42-45.
9. Циганенко К.С. Виділення та деякі властивості біологічно активного метаболіту AP 3142 *Aspergillus parvulus* Smith // Вісник Одеського національного ун-ту. Сер. Біологія. — 2005. — 10, № 3. — С. 228 — 233.
10. Черонис Н. Микро- и полумикрометоды органической химии. — Москва: Иностран. лит-ра, 1960. — 521 с.
11. Воскресенская П.И. Техника лабораторных работ. — Москва, Ленинград: Химия, 1964. — 551 с.
12. Алимарин И.П., Бусев А.И., Виноградов и др. Аналитическая химия фосфора. — Москва: Наука, 1974. — 222 с.
13. Лазуревский Г.В., Терентьева И.В., Шапиурин А.А. Практикум работы по химии природных соединений. — Москва: Высшая школа, 1966. — 335 с.
14. Majewski, W.A., Pfanstiel, J.F., Plusquellic, D.F., Pratt, D.W. High resolution optical spectroscopy in the UV // Laser techniques in chemistry. — 1995. — V. 23. — P. 101 — 148.
15. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. — Москва: Мир, 1967. — 347 с.
16. Ветеринарно-санитарная и микологическая оценка кормов // Методические указания для ветеринарных врачей, повышение квалификации по ветеринарной микотоксикологии. — Ленинград: Изд-во Лен. вет. ин-та, 1987. — 42 с.
17. Методы экспериментальной микологии / Под ред. В.И. Билай. — Киев: Наук. думка, 1982. — 550 с.
18. Циганенко К.С. AP 3142 — новый біологічно активний метаболіт *Aspergillus parvulus* Smith // X з'їзд Товариства мікробіологів України. — Одеса, 2004. — С. 90.
19. Chao M., Rosentein R.D. Monoacetate of O-Methylasparvenone // Acta Cryst. — 1975. — B 31. — P. 2937 — 2939.
20. Chao P.D., Schiff P.L., jr., Slatkin D.J. et al. The isolation and identification of two new quinones from *Aspergillus parvulus* // Apha Academic of Pharmaceutical Science 121st Annual Meeting, Chicago, Illinois, 1974. — P. 162.
21. Chao P.D., Schiff P.L., jr., Slatkin D.J. et al. A metabolites of *Aspergillus*: asparvenone and O-methylasparvenone, naphthalenones from *Aspergillus parvulus* // Lloydia. — 1975. — Vol. 38. — P. 213 — 217.

Е.С. Цыганенко, О.П. Кобзистая, А.М. Зайченко

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И ТОКСИГЕННЫХ СВОЙСТВ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА ИЗ *ASPERGILLUS PARVULUS* SMITH

В работе исследованы некоторые физико-химические и токсигенные свойства нового биологически активного метаболита, выделенного из *A. parvulus*. Полученный кристаллический препарат не содержал азота, серы и галогенов, разлагался с обугливанием при 273 °C, имел максимум поглощения в УФ части спектра (265 нм), его МПК по отношению к *B. subtilis* составляла 0,14 мг/мл, не токсичен для теплокровных.

K.S. Tsyganenko, O.P. Kobzyska, O.M. Zaichenko

THE RESEARCH OF PHYSICAL-CHEMICAL AND TOXIGENIC PROPERTIES OF NEW BIOLOGIC ACTIVE METABOLITE FROM *ASPERGILLUS PARVULUS* SMITH

The physical-chemical and toxigenic properties of new biological active metabolite from *A. parvulus* were investigated in this work. The received crystal preparation did not contain nitrogen, sulfur and halogens, destroyed at 273°C, has a maximum of absorption in the UV part of spectrum (at 265 nm), its minimal suppressing concentration for *B. subtilis* was 0.14 mg/ml, and it was not toxic for animals.