

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСТРАКТА *CUSCUTA JAPONICA* (CHOISY) ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

В.М.Катола, Н.Ю.Леусова

*Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН, 675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1*

## РЕЗЮМЕ

Продemonстрировано влияние водного экстракта повилики японской (*Cuscuta japonica*) на скорость роста *Mycobacterium tuberculosis*. Для ускорения роста микобактерий сухие стандартные питательные среды ФАСТ-3Л и Левенштейна-Йенсена смешивали с водным экстрактом *Cuscuta japonica*. Установлено, что сложный химический состав водного экстракта, приготовленного из сухих семян либо сухих вегетативных стеблей растения-паразита *Cuscuta japonica*, оказывает выраженное биологическое действие на *Myc. tuberculosis*. При смешивании стандартных питательных сред ФАСТ-3Л и Левенштейна-Йенсена с водным экстрактом *Cuscuta japonica*, микобактерии произрастают гораздо быстрее, сохраняя при этом типичные R-формы колоний. При этом *Myc. tuberculosis* на первой среде вырастают на 5 сутки (в 2,8 раза быстрее, чем на стандартной питательной среде), на второй среде – на 18 сутки (в 1,5 раза быстрее, чем на стандартной питательной среде). Механизм ускорения роста *Myc. tuberculosis* требует дальнейшего изучения. Наиболее вероятно, что химические вещества водного экстракта *Cuscuta japonica* прямо или косвенно воздействуют либо на синтез компонентов клеточной стенки (пептидогликан), либо изменяют ее химический состав. Тем самым увеличивается доступ в клетку трофических ресурсов.

*Ключевые слова:* микобактерии туберкулеза, стандартные питательные среды, экстракт повилики японской.

## SUMMARY

USE OF EXTRACT *CUSCUTA JAPONICA* (CHOISY) TO STIMULATE THE GROWTH OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

V.M.Katola, N.Yu.Leusova

*Institute of Geology and Nature Management of Far Eastern Branch RAS, 1 Relochniy Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation*

The influence of the aqueous extract of Japanese Dodder (*Cuscuta japonica*) on the velocity of *Mycobacterium tuberculosis* growth has been shown. To accelerate the growth of *Myc. tuberculosis*, dry culture media of FAST-3L and of Lowenstein Jensen were mixed with the aqueous extract of *Cuscuta japonica*. It was found out that the complex chemical composition of the aqueous extract made of dry seeds or dry vegetative stems of the plant parasite *Cuscuta japonica* has a biological

effect on *Myc. tuberculosis*. At mixing of standard culture media of FAST-3L and of Lowenstein Jensen with the aqueous extract of *Cuscuta japonica*, *Myc. tuberculosis* grow much faster preserving typical R-forms colonies. The mycobacterium in the first medium grow at the fifth day (2.8 times faster than in the standard culture medium), and in the second medium they grow at the 18th day (1.5 times faster than in the standard culture medium). The mechanism of *Myc. tuberculosis* growth acceleration demands a further study. The most probable is the fact that chemical substances of the aqueous extract of *Cuscuta japonica* directly or indirectly affect either the synthesis of cell wall components (peptidoglycan) or change its chemical composition. This leads to the access enhancement into the cell of trophic resources.

*Key words:* *Mycobacterium tuberculosis*, the standard culture media, extract of *Cuscuta japonica*.

Своевременное обнаружение и предупреждение распространения туберкулеза во многом зависят от качества лабораторной диагностики. Для повышения ее результативности во фтизиатрии начали применять наиболее перспективный метод полимеразной цепной реакции [6, 7]. Он удобен, точен, универсален и позволяет быстро детектировать бактерии, микроскопические грибы и вирусы. Однако данный метод не различает «живого» и «мертвого» возбудителя, не определяет формы его морфологической и генетической изменчивости, к тому же, недоступен для большинства бактериологических лабораторий. По-прежнему для выделения чистых культур клинических штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ), их последующей идентификации и определения лекарственной устойчивости используются стандартные питательные среды на яичной основе – Левенштейна-Йенсена, Финн-2, «Новая» и др. К сожалению, они низко чувствительны, и МБТ, обладающие медленным размножением (одно деление в течение 18-24 часов) и длительным инкубационным периодом (от недель до нескольких лет), произрастают на этих средах медленно и не всегда надежно. Более того, в процессе интенсивной химиотерапии происходит повреждение разных метаболических систем и МБТ могут утрачивать способность к нормальному развитию. Выделение МБТ несколько улучшается, если обрабатывать патологический материал детергентами (лаурилсульфат натрия, родолан, цетавлон и др.) или одновременно применять несколько отличающихся по составу сред и проводить многократные исследования материала. В настоящее время трудности в бактериологической диагностике туберкулеза могут изменить

автоматизированные системы культивирования МБТ с последующей радиометрической (БАСТЕС 460), колориметрической (МВ/ВасТ, VactALERT) и люминесцентной детекцией роста, среди которых наиболее эффективной является система БАСТЕС MGIT 960BD [1]. Этот автоматизированный комплекс содержит набор флаконов с жидкой питательной средой и флуоресцентным индикатором роста на дне, рассчитан на загрузку 960 образцов и заметно сокращает сроки культивирования. Но стоимость комплекса и флаконов чрезвычайно высока. В связи со сказанным возрастает потребность в усовершенствовании как традиционных питательных сред, так и конструировании новых. При этом желательно использовать дешевые виды сырья с высокой биологической ценностью (содержанием полноценных белков, углеводов, витаминов и прочих биостимуляторов). Таким условиям соответствует именно растительное сырье.

Поэтому было обращено внимание на растущее в Амурской области однолетнее покрытосеменное паразитическое растение – повилику японскую (*Cuscuta japonica*) из рода *Cuscuta* семейства Повиликовые (*Cuscutaceae* Dum.) [3]. Она встречается также в Приморье, Хабаровском крае и отнесена к категории карантинных сорняков. Ее проросток, по мере выхода на поверхность из почвы, совершает нутационные движения, находя будущую жертву, спиралеобразно тянется к ней, обвивает длинным, тонким, красноватым или желтоватым стеблем и внедряет в его сосудистые элементы специальные выросты-присоски (гаустории). Повилика паразитирует на луговых, полевых, огородных и садовых культурах, кустарниках, деревьях, задерживает их рост и развитие и нередко вызывает гибель. В отличие от растения-хозяина, в стеблях повилики больше воды, общего и белкового азота, фосфора, сахаров, триацилглицеринов и гликолипидов. Однако меньше стерина, свободных жирных кислот и других веществ. Используя воду, диоксид углерода и минеральные элементы, повилика синтезирует разнообразные органические вещества, включая гидролитические ферменты, позволяющие ей размягчать ткани хозяина. Химический состав *Cuscuta japonica* полностью не выяснен, но уже установлено, что в стебле содержатся кумарины (умбеллиферон), флавоноиды (кемпферол, 3-гликозид кверцетина), фенолкарбоновые кислоты и их производные (хлорогеновая, п-кумаровая, коричная кислоты), в семенах – сапонины, сахара, смолы и пр. Кроме того, в сухих стеблях депонируются Cs, Fe, Li, Ni и Rb, меньше Ca, Co, Mg, Mn и Zn, а в зрелых семенах больше, чем в стебле, Cd, Mg и Mn [4]. Повилики ядовиты и в официальной медицине не используются. В китайской и корейской народной медицине из них готовят чай, отвар, сок, пилюли и применяют как укрепляющие, тонизирующие, обезболивающие и вяжущие средства, назначают при заболеваниях печени, желудка, легких, простуде, лихорадке, стенокардии, сахарном диабете, нервных и психических нарушениях, головных и зубных болях, алкоголизме и др. [2]. Воздействие же этих растительных средств на биологические свойства микроорганиз-

мов практически не исследовано.

Учитывая использование лекарственных препаратов *Cuscuta japonica* (Choisy) при различной патологии и отчасти их химический состав, цель настоящей работы – показать влияние ее водного экстракта на скорость роста МБТ.

### Материалы и методы исследования

Промытые в проточной воде сухие семена и стебли *Cuscuta japonica* (Choisy) просушивали в термостате, заливали дистиллированной водой в отдельных стеклянных колбах и вновь помещали в термостат. Полученный таким образом экстракт фильтровали, стерилизовали в автоклаве и вносили в герметически закупоренные градуированные флаконы с сухими питательными средами для выращивания МБТ, а именно, ФАСТ-3Л и Левенштейна-Йенсена. Обе среды приготовлены на яично-солевой основе, но в составе первой среды дополнительно содержится картофель, молоко обезжиренное, пептон и гексадекан, в составе второй – L-аспарагин. В определенных соотношениях экстракт и питательные среды (каждая отдельно) перемешивали, разливали в стерильные пробирки, свертывали, выдерживали в термостате при температуре 37°C и повторно свертывали. Этот процесс подробно описан ранее [5]. Диагностическая эффективность модифицированных питательных сред апробирована путем посевов на них: а) культуры музейного («классического») вирулентного штамма МБТ Н37Rv; б) болтушки из почвы, в которую инокулировали культуру Н37Rv; в) центрифугата мокроты, взятой от больных фиброзно-кавернозным туберкулезом и обработанной 4% раствором едкого натрия и нейтрализованной 2 каплями соляной кислоты. Всего выполнено 98 опытов.

### Результаты исследования и их обсуждение

Нужно отметить, что среди цветковых растений род *Cuscuta* представляет наиболее высокоорганизованные паразитные растения. Полагают даже, что они участвуют в регуляции численности популяции своих хозяев и влияют на формирование и стабильность природных биоценозов. Переход к паразитическому образу жизни существенно сказался на их морфологии: во-первых, у них редуцировались листья и корневая система; во-вторых, появились гаустории, глубоко внедряющиеся в ткань растения-хозяина; в-третьих, изменилась внутренняя структура, что лишило паразита способности синтезировать питательные вещества на свету. То есть, не имеется присущих нормальным растительным клеткам хлоропластов, в которых формируются тилакоиды, содержащие хлорофилл, каротиноиды, ферменты и мелкие рибосомы [8]. Плоды *Cuscuta japonica* в виде коробочек густо покрывают разветвленный мясистый стебель диаметром до 2 мм и содержат 2-5 мелких (1-3 мм) округлых или яйцевидных семян с двумя плоскими сторонами, толстой стенкой и шершавой поверхностью. Впечатляет способность семян сохранять всхожесть более 40 лет, а упавших в почву – 10 лет. Внешний вид цветов, стеб-

лей и семян *Cuscuta japonica* показаны на рисунке 1 А, Б. Особое внимание заслуживает проросток. У всех представителей *Cuscuta* он растет за счет апикального полюса, тогда как базальная часть (корешок) отмирает на ранних стадиях развития. При этом в их ультраструктуре (рис. 2 А, Б), наряду с отсутствием фотосин-

тетического аппарата, наблюдается большое количество вакуолей, необходимых растительным клеткам для регуляции водно-солевого обмена и поддержания тургора растущих клеток, а в цитоплазме корешковых клеток – пустот.

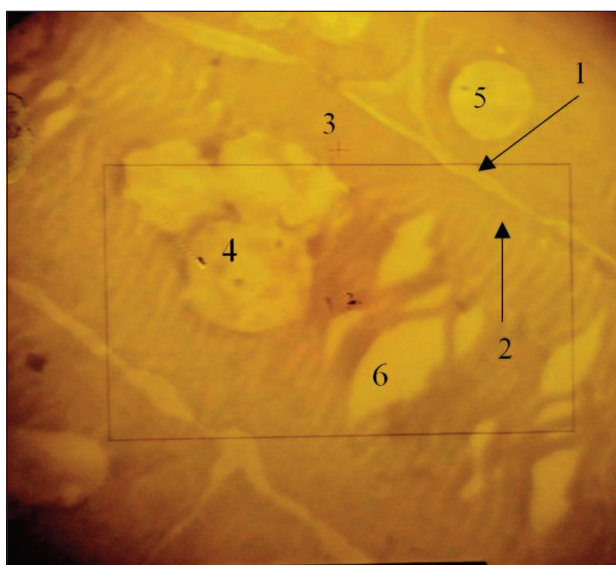


А



Б

Рис. 1. А – отмеченный стрелками стебель и цветки *Cuscuta japonica*; Б – внешний вид семени *Cuscuta japonica* (сканирующая электронная микроскопия,  $\times 24$ ).



А



Б

Рис. 2. А – ультратонкие срезы апикального полюса проростка *Cuscuta japonica*: 1 – клеточная стенка; 2 – плазматическая мембрана; 3 – цитоплазма; 4 – ядро; 5 – вакуоль; 6 – пустоты цитоплазмы ( $\times 7000$ ); Б – колонии культуры Н37Rv, выросшей на стандартной среде ФАСТ-3Л (средняя пробирка) и на среде, модифицированной экстрактами из сухих семян (№1) или стеблей (№2) *Cuscuta japonica*.

Поэтому неудивительно, что экстракт *Cuscuta japonica* может иметь сложный специфический комплекс химических веществ и обладать биологической активностью. Как видно из таблиц 1 и 2, при посеве чистой культуры Н37Rv и инфицированного материала (почва, мокрота) на плотные питательные среды ФАСТ-3Л или Левенштейна-Йенсена, модифицированные таким экстрактом, рост и развитие МБТ проявляется гораздо быстрее, чем на лабораторных средах. Обычно на стандартных питательных средах МБТ вырастают чаще всего через 3-4 недели либо

через 2-3 месяца, нередко даже больше. Их колонии грубые, сухие, шероховатые (R-тип) со сморщенной поверхностью, утолщенным центром и неровными краями. Рост этих форм происходит также и на модифицированных средах (рис. 2 Б). Предполагается, что на таких средах ускоренно могут развиваться и близкородственные виды, идентичные по последовательностям 16S рРНК, а именно *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii* и *M. caprae*, входящие в комплекс *Mycobacterium tuberculosis* и вызывающие туберкулез у человека и ряда животных.

Таблица 1

Время роста (в сутках) МБТ на питательной среде ФАСТ-3Л, смешанной с водным экстрактом из сухих семян или сухих стеблей *Cuscuta japonica*

| А        |          |           | Б        |          |           | Контроль<br>(n=7) |
|----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-------------------|
| I (n=7)  | II (n=7) | III (n=7) | I (n=7)  | II (n=7) | III (n=7) |                   |
| 4        | 4        | 4         | 5        | 5        | 6         | 14                |
| 5        | 4        | 4         | 6        | 5        | 5         | 14                |
| 4        | 4        | 4         | 6        | 6        | 7         | 15                |
| 4        | 5        | 6         | 5        | 7        | 7         | 15                |
| 5        | 5        | 6         | 5        | 6        | 6         | 14                |
| 5        | 6        | 5         | 5        | 5        | 5         | 14                |
| 4        | 4        | 4         | 5        | 5        | 5         | 15                |
| 4,4±0,2* | 4,5±0,3* | 4,7±0,3*  | 5,3±0,2* | 5,5±0,3* | 5,8±0,4*  | 14,3±0,2          |

*Примечание.* Здесь и в следующей таблице: А – время роста МБТ на питательной среде, смешанной с водным экстрактом из сухих семян; Б – время роста МБТ на питательной среде, смешанной с водным экстрактом из сухих стеблей; I – время роста коллекционной культуры Н37Rv; II – время роста МБТ при высеве почвенной болтушки, инфицированной культурой Н37Rv; III – время роста МБТ при посеве мокроты от больного фиброзно-кавернозным туберкулезом легких; контроль – время роста коллекционного штамма Н37Rv на стандартной питательной среде; n – объем выборок (количество опытов); \* – уровень значимости различий по сравнению с контролем ( $p < 0,001$ ).

Таблица 2

Время роста (в сутках) МБТ на питательной среде Левенштейна-Йенсена, смешанной с водным экстрактом из сухих семян или сухих стеблей *Cuscuta japonica*

| А          |            |            | Б          |            |            | Контроль<br>(n=7) |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|
| I (n=7)    | II (n=7)   | III (n=7)  | I (n=7)    | II (n=7)   | III (n=7)  |                   |
| 17         | 17         | 20         | 16         | 18         | 21         | 25                |
| 18         | 20         | 21         | 17         | 19         | 22         | 28                |
| 16         | 18         | 19         | 18         | 20         | 20         | 29                |
| 16         | 19         | 20         | 16         | 21         | 19         | 35                |
| 17         | 17         | 20         | 19         | 20         | 21         | 30                |
| 16         | 20         | 18         | 17         | 16         | 18         | 24                |
| 18         | 17         | 17         | 19         | 17         | 19         | 28                |
| 16,8±0,34* | 18,3±0,53* | 19,3±0,52* | 17,0±0,43* | 18,7±0,68* | 19,5±0,53* | 28,43±1,39        |

Таким образом, проведенными исследованиями установлено, что при добавке водного экстракта из сухих семян или стеблей *Cuscuta japonica* рост МБТ на среде ФАСТ-3Л проявляется в среднем на 5-е сутки (в контроле на 14-е сутки) или ускоряется в 2,8 раза, а на среде Левенштейна-Йенсена – в среднем на 18-е сутки (в контроле на 28-е сутки) или ускоряется в 1,5 раза. Это означает, что ускоренный рост МБТ обеспечивается одними и теми же веществами, которые концентрируются как в семенах, так и стеблях растения. Механизм стимуляции ими развития МБТ пока не изучен. Однако известно, что медленное размножение МБТ обусловлено недостаточным поступлением в

клетку питательных веществ из-за низкой проницаемости клеточной стенки, содержащей до 20-40% липидов (воски, нейтральные жиры, фосфолипиды, миколовые кислоты). Поэтому наиболее вероятно, что химические вещества водного экстракта повливали японской прямо или косвенно воздействуют либо на синтез компонентов клеточной стенки (пептидогликан), либо изменяют ее химический состав. Тем самым увеличивается доступ в клетку трофических ресурсов.

### Выводы

1. Сложный химический состав водного экстракта, приготовленного из сухих семян либо сухих вегетатив-

ных стеблей растения-паразита *Cuscuta japonica* оказывает выраженное биологическое действие на *Mycobacterium tuberculosis*.

2. При смешении стандартных питательных сред ФАСТ-3Л и Левенштейна-Йенсена с водным экстрактом *Cuscuta japonica* микобактерии туберкулеза произрастают гораздо быстрее, сохраняя при этом типичные R-формы колоний.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Использование автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960 в диагностике лекарственной устойчивости к резервным препаратам в г. Самаре / Я.М.Балабанова [и др.] // Туб. и бол. легких. 2009. №10. С.63–70.

2. Леусова Н.Ю., Некрасов Э.В. Использование видов рода повилика (*Cuscuta* L.) в медицине и биотехнологии // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2004. Вып.19. С.87–93.

3. Леусова Н.Ю. Особенности экологии растений-паразитов на примере повилики японской (*Cuscuta japonica* Choisy): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Благовещенск, 2006. 23 с.

4. Содержание минеральных элементов у растения-паразита *CUSCUTA JAPONICA* / Н.Ю.Леусова [и др.] // Пробл. региональной экологии. 2008. №3. С.68–71.

5. Питательная среда, ускоряющая рост микобактерий туберкулеза: пат. 2385926 МПК С12N 1/20 / авторы и заявители В.М.Катола, Н.Ю.Леусова; патентообладатель ИГиП ДВО РАН (RU).–№2007132045/13; заявл. 23.08.2007; опубл. 10.04. 2010, Бюл. №10.

6. Скотникова О.И. Молекулярно-биологические методы во фтизиатрии // Пробл. туб. и бол. легких. 2005. №8. С.5–10.

7. Роль ПЦР-анализа в комплексных бактериологических исследованиях во фтизиатрии / Л.Н.Черноусова

[и др.] // Пробл. туб. и бол. легких. 2001. № 3. С.58–60.

8. Яковлев Г.П., Челомбитко В.А. Ботаника. Учебник для вузов. СПб: СпецЛит, СПХФА, 2001. 680 с.

#### REFERENCES

1. Balabanova Ya.M., Fedorin I.M., Malomanova N.A., Drobnievskiy F., Nikolaevskiy V.V., Sun Kh., Mashkova Yu.A., Simak T.E., Kontsevaya I.S., Ignat'eva O.A., Mironova S.A. *Tuberkulez i bolezni legkikh* 2009; 10:63–70.

2. Leusova N.Yu., Nekrasov E.V. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniyâ* 2004; 19:87–93.

3. Leusova N.Yu. *Osobennosti ekologii rasteniy-parazitov na primere poviliki yaponskoy (Cuscuta japonica Choisy): avtoreferat dissertatsii kandidata biologicheskikh nauk* [The particularities of plants-parasite ecology at the example of Japanese dodder (*Cuscuta japonica* Choisy): abstract of thesis...candidate of biological sciences]. Blagoveshchensk; 2006.

4. Leusova N.Yu., Katola V.M., Radomskaya V.I., Radomskiy S.M. *Problemy regional'noi ekologii* 2008; 3:68–71.

5. Katola V.M., Leusova N.L. *Patent 2385926 RF. Pitatel'naya sreda, uskoryayushchaya rost mikobakteriy tuberkuleza* (Patent 2385926 RF. The medium, accelerating the growth of *Mycobacterium tuberculosis*); published 10.04. 2010.

6. Skotnikova O.I. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh* 2005; 8:5–10.

7. Chernousova L.N., Larionova E. E., Sevast'yanova E.V., Golyshvskaya V.I. *Problemy tuberkuleza i bolezney legkikh* 2001; 3:58–60.

8. Yakovlev G.P., Chelombit'ko V.A. *Botanika. Uchebnik dlya vuzov* [Botany. The textbook for high schools]. St. Petersburg: SpetsLit, SPHFA; 2001.

Поступила 29.10.2012

Контактная информация

Виктор Моисеевич Катола,

кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник,

Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН,

675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1.

E-mai: katola-amur@list.ru

Correspondence should be addressed to

Viktor V. Katola,

MD, PhD, Leading staff scientist,

Institute of Geology and Nature Management of Far Eastern Branch RAS,

1 Relochniy Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mai: katola-amur@list.ru