

Г.П. Потебня¹
 О.А. Танасиенко¹
 Н.Л. Черемшенко¹
 В.А. Шляховенко¹
 Э.А. Коваленко²
 Е.И. Гетьман²

¹ Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии, Киев

² Институт микробиологии и вирусологии, Киев

ЗАКОНОМЕРНОСТИ БИОСИНТЕЗА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛЕКТИНОВ КУЛЬТУРОЙ *BACILLUS SUBTILIS* B-7025 ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Ключевые слова: *B. subtilis* B-7025, питательные среды, опухолевые клетки, агглютинация, лизис.

Резюме. Для повышения биосинтетической активности использованы дешевые полноценные и сбалансированные питательные среды для культивирования бактериальной культуры *B. subtilis* B-7025 — продуцента цитотоксических веществ. Культура *B. subtilis* B-7025 в зависимости от состава питательной среды синтезирует различные биологически активные вещества. Установлено, что на модифицированной среде Гаузе микроорганизм синтезирует внеклеточные лектины, цитотоксические в отношении опухолевых клеток. При культивировании продуцента на отрубевой среде происходит преимущественный синтез протеолитических ферментов, лизирующих опухолевые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Оптимальные условия, необходимые для роста в мясо-пептонном бульоне (МПБ) штамма *B. subtilis* B-7025 и биосинтеза им цитотоксических веществ, губительно действующих на опухолевые клетки (ОК) различного гистогенеза, ранее уже были описаны [1, 2]. Однако использование этой питательной среды для культивирования бактерий сопряжено с определенными трудностями, такими, как нестабильное качество, невозможность стандартизации МПБ и высокая стоимость. В настоящее время для повышения биосинтетической активности микроорганизмов все чаще используют дешевые синтетические и полусинтетические питательные среды, на основе которых разрабатывают более совершенные технологии в целях значительного повышения продуктивности бактериальных культур. Поэтому наши дальнейшие усилия были направлены на разработку более дешевых, полноценных и сбалансированных питательных сред для выращивания *B. subtilis* B-7025 с целью усовершенствования технологии получения цитотоксических веществ и повышения их выхода.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использована спорообразующая аэробная культура *B. subtilis* B-7025 — продуцент цитотоксических в отношении ОК веществ. Культивирование бактерий осуществляли в стационарных условиях в матрасах емкостью 1 л с

рабочим объемом 300 мл или в пробирках емкостью 50 мл с рабочим объемом 10 мл при температуре 37 °С в течение 10 сут. В 1-е сутки пробы отбирали каждые 3 ч, затем — один раз в сутки.

Для выращивания *B. subtilis* B-7025 использовали следующие питательные среды:

- отрубевую среду (ОС) — 10% экстракт на основе пшеничных отрубей — селективную питательную среду для биосинтеза протеолитических ферментов с исходным pH 6,0 [3];
- модифицированную для синтеза лектинов среду Гаузе следующего состава (г/л): бульон Хоттингера — 30 мл, пептон — 5,0, NaCl — 5,0, галактоза — 10,0, исходный pH среды — 6,0 [4];
- модифицированную для синтеза лектинов среду 25Л следующего состава (г/л): глюкоза — 10,0; желатин — 10,0; KH_2PO_4 — 1,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,75; ZnSO_4 — 0,25; FeSO_4 — 0,02; NaCl — 0,02; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5; CaCl_2 — 0,08; исходный pH среды — 7,0. Кроме того, среда содержала биостимулятор — лиофилизированный дрожжевой автолизат из избыточных жидких пивных дрожжей [4].

В качестве контрольной среды использовали МПБ — универсальную питательную среду для изучения биосинтетической активности культуры *B. subtilis* B-7025.

Посевным материалом служила культура, находящаяся в логарифмической фазе роста, выращенная на скошенной агаризованной среде Громыко (МПБ:сусло-агар в соотношении 1:1). Посев проводили инокулюмом в количестве 1–2% от объема.

Бактериальные клетки отделяли центрифугированием при 5000–6000 об/мин в течение 20 мин. Освобожденную от клеток культуральную жидкость (КЖ) и клетки использовали для определения биологической активности. Контроль чистоты КЖ проводили микроскопически.

Цитотоксические препараты из центрифугата КЖ микроорганизма *B. subtilis* B-7025 выделяли по методу, описанному ранее [5].

Противоопухолевую активность КЖ микроба и препарата оценивали *in vitro* по цитотоксическому действию на ОК саркомы-37 и рака Эрлиха [6]; количество биомассы — весовым методом после высушивания клеток при температуре 105 °С, pH — потенциометрически.

Общую протеолитическую активность определяли электрофоретически с использованием желатина в качестве субстрата [7].

Полученные результаты обработаны статистически [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что цитотоксическое действие препарата, выделенного из КЖ *B. subtilis* B-7025, на ОК состоит как минимум из двух этапов: на первом — ОК агглютинируют, образуя конгломераты клеток, на втором — при более длительной инкубации или повышении концентрации препарата в инкубационной среде происходит лизис ОК. Это может свидетельствовать о том, что выделенный препарат является бифункциональным и обладает как агглютинирующей, так и ферментативной активностью (в данном случае протеолитической) либо содержит как минимум два вещества с разными биологическими активностями.

Исходя из этого, для выращивания *B. subtilis* B-7025 нами была испытана питательная среда (ОС) (на основе пшеничных отрубей), применяемая для биосинтеза протеолитических ферментов, и модифицированные для синтеза лектинов среды 25Л и Гаузе.

Защелачивание КЖ *B. subtilis* B-7025, характерное для культивирования продуцента на МПБ и свидетельствующее о накоплении внеклеточных цитотоксических веществ на исследуемых питательных средах, происходило с разной степенью интенсивности (рисунок).

Таким же значимым было повышение pH КЖ бактерий, выращенных на среде Гаузе. При исходном значении pH этой питательной среды 6,0 к 5–7-м суткам роста продуцента ее pH повышался до 8,0–8,3. Незначительное защелачивание КЖ происходило и при росте культуры на ОС, однако начиная с 3-х суток наблюдали постепенное снижение pH до исходного значения. Динамика pH КЖ *B. subtilis* B-7025, выращенной на питательной среде 25Л, значительно отличалась от таковой при росте штамма на остальных средах. При исходном pH среды 7,0 к 24 ч роста отмечалось резкое

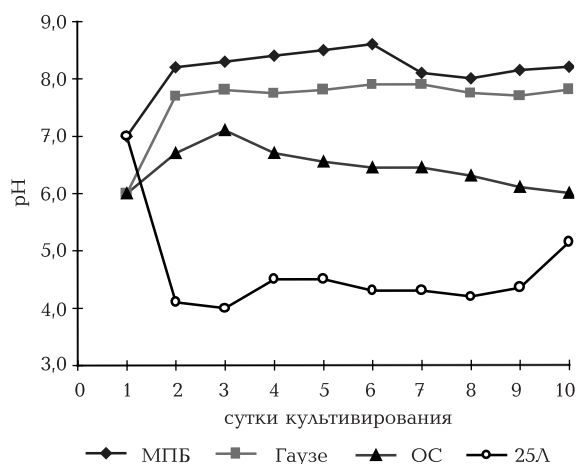


Рисунок. Динамика изменения pH культуральной жидкости *B. subtilis* B-7025 при выращивании на разных питательных средах

снижение pH КЖ до 4,2–4,5. Эти значения pH сохранялись в течение всего остального периода роста, что не характерно для продуцирования цитотоксических веществ исследуемым штаммом в контрольной среде.

При сравнительном изучении динамики накопления цитотоксических веществ в КЖ при выращивании *B. subtilis* B-7025 в исследуемых питательных средах установлено, что они синтезируются на всех питательных средах, за исключением среды 25Л (табл. 1).

Таблица 1

Динамика цитотоксической и цитолитической активности культуральной жидкости *B. subtilis* B-7025 при выращивании на различных питательных средах, %

Сутки	Лизированные ОК				Убитые ОК, оставшиеся после лизиса			
	МПБ	Гаузе	ОС	25Л	МПБ	Гаузе	ОС	25Л
1-е	0	0	0	0	0	0	0	0
2-е	0	0	80	0	50	0	95	0
3-и	20	10	00	0	100	90	—	0
4-е	40	25	100	0	80	98	—	0
5-е	100	35	100	30	—	100	—	0
6-е	100	40	100	40	—	100	—	0
7-е	100	45	100	30	—	100	—	0
8-е	100	40	50	10	—	100	100	0
9-е	100	25	50	0	—	85	100	0
10-е	100	25	50	0	—	70	50	0

Как видно из данных табл. 1, пик цитотоксического действия на ОК КЖ бактерий, выращенных на трех питательных средах (МПБ, Гаузе и ОС), совпадает и приходится на 6–7-е сутки роста культуры, однако количественные соотношения синтезируемых цитотоксических веществ, а возможно, и их природа, разные. Так, КЖ бактерий, выращенных на ОС, оказывала 100% лизирующее действие на ОК при полном отсутствии агглютинирующей активности (табл. 2), что, скорее всего, связано с преимущественным синтезом в данной среде протеолитических ферментов. Подтверждением этого

предположения явилось наличие в центрифугате КЖ *B. subtilis B-7025*, выращенной на ОС, высокой протеолитической активности, обнаруженное с помощью электрофоретического метода.

Таблица 2

Динамика агглютинирующей активности КЖ *B. subtilis B-7025* при выращивании на различных питательных средах, %

Сutki	МПБ	Гаузе	ОС	25Л
1-е	50	40	0	0
2-е	80	60	0	0
3-и	95	90	0	0
4-е	98	90	0	0
5-е	100	95	0	0
6-е	100	95	0	0
7-е	100	100	0	0
8-е	100	95	0	0
9-е	90	95	0	0
10-е	85	90	0	0

КЖ бактерий, выращенных на МПБ и модифицированной среде Гаузе, в отличие от таковой бактерий, выращенных на ОС, оказывала на ОК сходное действие: в первые 10–15 мин совместной инкубации ОК с КЖ последняя на 90–100% агглютинировала их, а к концу времени инкубации вызывала полный или частичный лизис (см. табл. 2.).

Из КЖ продуцента, выращенного на исследуемых питательных средах, получены экспериментальные образцы препаратов и изучена их активность. Так же, как и КЖ, препарат, выделенный из ОС роста, в зависимости от концентрации, проявлял лизирующую или цитотоксическую активность и совсем не агглютинировал ОК (табл. 3.).

Таблица 3

Активность препаратов, выделенных из культуральной жидкости *B. subtilis B-7025*, при выращивании на различных питательных средах, %

Концентрация препаратов, мг/мл	Лизированные ОК			Убитые ОК, оставшиеся после лизиса			Агглютинированные ОК		
	МПБ	Гаузе	ОС	МПБ	Гаузе	ОС	МПБ	Гаузе	ОС
1,00	100	30	100	–	100	–	0	70	0
0,50	90	0	100	100	100	–	80	50	0
0,25	75	0	70	100	100	100	20	20	0
0,12	0	0	10	95	95	100	0	0	0
0,06	0	0	0	85	60	80	0	0	0

Препараты, выделенные из КЖ бактерий, выращенных на модифицированной среде Гаузе и МПБ, проявляли в отношении ОК в основном высокую агглютинирующую активность. Однако при механическом разбивании клеточных конгломератов (на магнитной мешалке или при интенсивном встряхивании) ОК погибали или лизировались.

Такое комбинированное действие КЖ и выделенных препаратов на ОК может быть обусловлено следующим:

- культура *B. subtilis B-7025* синтезирует на модифицированной среде Гаузе и МПБ два активных в отношении ОК вещества — лектины, агглютинирующие ОК, и протеолитические ферменты, лизирующие их;
- продуцент синтезирует только лектины, которые связываются с ОК и индуцируют изменения в их мембране, вызывающие активацию внутриклеточных литических ферментов, следствием чего является полный или частичный лизис ОК [9].

Полученные результаты согласуются с данными литературы о многообразии функции микробных лектинов, повышающих активность ключевых литических ферментов ОК, таких, как гликозидазы, протеазы, эстеразы, фосфатазы, гемолизин и т.д. [10–13]. Такая функция микробных лектинов свидетельствует об их роли в реализации биологических эффектов на ОК.

Согласно полученным данным установлено, что культура *B. subtilis B-7025* в зависимости от состава питательной среды может продуцировать различные цитотоксические вещества, такие, как литические ферменты, цитотоксические лектины, гемолизины и т.д. В результате проведенных исследований нами подобрана, с одной стороны, оптимальная для синтеза цитотоксических лектинов, модифицированная среда Гаузе, а с другой — более дешевая по сравнению с МПБ питательная среда на основе пшеничных отрубей, которая является оптимальной для синтеза литических в отношении ОК ферментов. Проведение таких исследований является начальным и необходимым этапом работы с бактериальными культурами — продуцентами биологически активных веществ и свидетельствует о возможной направленной регуляции их синтеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Затула Д.Г. (1969) Микробиологические аспекты изучения злокачественных опухолей. Наук. думка, Киев, 239 с.
2. Затула Д.Г., Танасиенко О.А., Хомяк О.Г., Сытенко В.К., Загадгарчук Н.А. (1986) Изучение условий культивирования *Bacillus mesentericus* AB-56 — продуцента противоопухолевого антибиотика. Химиотерапия опухолей в СССР, 44: 193–198.
3. Лугіна Т.М., Васківнюк В.Т., Пасічник А.М. (1977) Вплив деяких джерел живлення на ферментативну активність *Bacillus mesentericus*. Мікробіол. журн., 39(1): 26–30.
4. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.П. (1992) Лектины бактерий. Наук. думка, Киев, 345 с.
5. Затула Д.Г., Танасиенко О.А., Хомяк О.Г., Сытенко В.К. (1986) Выделение и очистка антибиотика бактериальной природы, обладающего противоопухолевой активностью. Химиотерапия опухолей в СССР, 44: 204–207.

6. Айзенман Б.Е., Мандрик Т.П., Швайгер М.О., Киприанова Е.А. (1960) Быстрый метод выявления *in vitro* поврежденных и мертвых клеток карциномы Эрлиха. Антибиотики, 5(3): 97 – 101.
7. Moll U.M., Youngleib G.I., Rosinsky K.B., Quigley J.P. (1990) Tumor promoter-stimulated Mr 92000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells. Isolation and characterisation of enzyme from HT1080 tumor cells. Cancer Res., 58(19): 6162 – 6170.
8. Лакин Г.Ф. (1990) Биометрия. Высш. шк., Москва, 352 с.
9. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Гетьман Е.И., Потебня Г.П., Танасиенко О.А. (2002) Лектиновая активность противоопухолевых веществ, синтезируемых *B. subtilis* B-7025. Микробиол. журн., 1: 13 – 16.
10. Gilboa-Gaber N. (1988) Pseudomonas aeruginosa lectins as a model for lectin production, properties, application and functions. Zel. Bact. Hyg., A270: 3 – 15.
11. Gilboa-Garber N., Garber N. (1989) Microbial lectin cofunction with lytic activities as a model for a general basis lectin role. FEMS Microbiol. Lett., 63(3): 211 – 222.
12. Beuth J., Ko H. L., Roszkowski W., Roszkowski K., Ohshima Y. (1990) Lectins: Mediators of adhesion for bacteria in infectious diseases and for tumor cells in metastasis. Zbl. Bact., 274: 350 – 358.
13. Mandal C., Mandal S. (1990) Sialic acid binding lectins. Experimentia, 46: 433 – 441.

ЗАКОНОМІРНОСТІ БІОСИНТЕЗУ ЦИТОТОКСИЧНИХ ЛЕКТИНІВ БАКТЕРІАЛЬНОЮ КУЛЬТУРОЮ *BACILLUS SUBTILIS* B-7025 ПРИ ВИРОЩУВАННІ НА РІЗНИХ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

**Г.П. Потебня, О.А. Танасієнко,
Н.Л. Черемшенко, В.А. Шляховенко,
Е.О. Коваленко, К.І. Гетьман**

Резюме. Для підвищення біосинтетичної активності підібрані дешеві повноцінні та збалансовані поживні середовища для культивування бактеріальної культури *B. subtilis* B-7025 — продуцента цитотоксичних речовин. Культура *B. subtilis* B-7025 залежно від складу поживного середовища синтезує різні біологічно активні

речовини. Встановлено, що на модифікованому поживному середовищі Гаузе мікроорганізм синтезує позаклітинні лектини, цитотоксичні по відношенню до пухлинних клітин. При вирощуванні продуцента на висівковому середовищі відбувається переважний синтез протеолітичних ферментів, які лізують пухлинні клітини.

Ключові слова: *B. subtilis* B-7025, поживні середовища, пухлинні клітини, аглютинація, лізис.

REGULARITIES OF BIOSYNTHESIS OF CYTOTOXIC LECTINES BY *BACILLUS SUBTILIS* B-7025 CULTURE, GROWING ON DIFFERENT MEDIA

**G.P. Potebnya, O.A. Tanasiyenko,
N.L. Cheremshenko, V.A. Shlyahovenko,
E.A. Kovalenko, E.I. Getman**

Summary. In order to increase biosynthetic activity of *B. subtilis* B-7025 culture (a producer of cytotoxic substances) we used cheap, completely prepared and well-balanced media. The culture of *B. subtilis* B-7025 produce different bioactive substances, depending upon a composition of cultural medium. We established that on modified Gauze medium the microorganism synthesized the extracellular lectines, which had been cytotoxic for tumor cells. Being cultivated on bran medium the bacterial culture produced mainly proteolysis enzymes, active against tumor cells.

Key words: *B. subtilis* B-7025, cultural medium, tumor cells, agglutination, lysis.

Адрес для переписки:

Потебня Григорий Платонович
03022, Киев, ул. Васильковская, 45
Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины