

Н.І. Федосова
 О.М. Караман
 І.М. Восійкова
 Т.В. Симчич
 А.В. Іванченко
 Н.Л. Черемшенко
 О.О. Круць
 Г.В. Діденко

Інститут експериментальної
 патології, онкології
 і радіобіології
 ім. Р.Є. Кавецького
 НАН України, Київ, Україна

Ключові слова: лектиноподібна
 речовина, *V. subtilis*, пухлинні
 клітини, лімфоцити,
 макрофаги, цитотоксична дія.

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЛЕКТИНОПОДІБНОЇ РЕЧОВИНИ *V. SUBTILIS* B-7724 У СИСТЕМІ *IN VITRO*

Мета: оцінка *in vitro* цитотоксичної дії на пухлинні та імунотоксичні клітини лектину, виділеного з фільтрату культуральної рідини *Bacillus subtilis* B-7724 за модифікованим методом. **Об'єкт і методи:** лектиноподібну речовину (ЛПР) отримували із культуральної рідини *V. subtilis* B-7724 після 10-добового культивування на стандартизованому середовищі Гаузе. Досліджували *in vitro* цитотоксичну активність ЛПР проти клітин пухлинних (раку Ерліха, меланоми B16, A549, K562) або умовно нормальних (MDBK) клітинних ліній, а також клітин імунотоксичних органів інтактних мишей лінії Balb/c. Оцінку цитотоксичного впливу проводили, використовуючи цитоморфологічний аналіз за допомогою світлового мікроскопа та колориметричний МТТ-тест. Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. **Результати:** ЛПР, виділена з середовища росту мікроорганізму *V. subtilis* B-7724, виявляє дозозалежну цитотоксичну активність щодо клітин різних модельних пухлин: мінімальну активність виявляє в концентрації 0,02 мг/мл, максимальну — 0,1 мг/мл. Серед клітин перевивних пухлинних ліній найбільш чутливою виявилася меланома B16: індекс цитотоксичності (ІЦ) становив 72,3% (0,02 мг/мл) та 97,2% (0,04 мг/мл). Практично нечутливими до цитотоксичної дії ЛПР були клітини лінії K562: ІЦ = 13,4% (0,02 мг/мл) та 22,3% (0,04 мг/мл). Серед клітин імунотоксичних органів найбільш чутливими до дії ЛПР виявилися клітини тимуса. Більш резистентні клітини макрофагальної ланки: додавання ЛПР в концентрації 0,02 мг/мл практично не мало цитотоксичного впливу: через 60 хв ІЦ = 14,8%, через 24 год — 60,9%. Імунотоксичну дію виявляла концентрація ЛПР 0,1 мг/мл (ІЦ 90,2–99,5%). **Висновок:** концентрації ЛПР 0,02–0,04 мг/мл у подальшому можуть бути використані в дослідях *in vivo* як такі, що володіють цитотоксичною активністю щодо пухлинних клітин, але водночас не мають суттєвої імунотоксичної дії. Одержані результати можуть стати підґрунтям для вдосконалення напрямків і методів використання ЛПР *V. subtilis* B-7724 в онкологічній клінічній практиці.

На сьогодні існує значна кількість робіт щодо вивчення біологічних властивостей лектинів. Під терміном «лектини» розуміють специфічні білки, які здатні вибірково зв'язувати вуглеводи та вуглеводні компоненти глікокон'югатів різної природи. Лектинами прийнято вважати лише ті вуглеводзв'язувальні білки, які мають неіммунне походження (не є антитілами) та не володіють специфічною глікоферментативною активністю. Лектини присутні в будь-якій живій системі і завдяки своїй високій вуглеводній специфічності відіграють провідну роль у процесах вуглеводно-білкового розпізнавання та мають поліфункціональні властивості (мітогенні, імуномодулюючі, протипухлинні). Ці білки беруть участь у процесах міжклітинної адгезії, взаємодії хазяїн-патоген, передачі сигналу в клітині [1, 2]. Завдяки властивості

зв'язуватися з рецепторами деяких гормонів (зокрема інсуліну), факторів росту лектини здатні активувати або інгібувати різноманітні біологічні процеси в клітині (проліферація, активація чи пригнічення синтезу ДНК, мутагенний вплив) [3].

Лектини викликають низку характерних імунологічних реакцій, в тому числі аглютинацію клітин (зокрема еритроцитів), преципітацію (осадження) глікопротеїнів. Важлива здатність лектинів регулювати імунну відповідь реалізується за рахунок активації системи комплементу, яка належить до системи вродженого імунітету і забезпечує розпізнавання чужорідних білків. Лектин запускає процес активації системи комплементу, зв'язуючись з манозними вуглеводними залишками компонентів цієї системи. Важливою для функціонування імунної системи є здатність лек-

тинів розпізнавати і зв'язувати вуглеводи на поверхні мембран клітин-мішеней та забезпечувати тим самим ряд важливих функцій імунітетних клітин: розпізнавання чужорідних рецепторів, активація антигенпрезентуючих клітин (макрофагів (МФ), дендритних клітин), індукція процесів апоптозу, лізис чужорідної клітини [4].

Значну увагу дослідників у галузі не тільки імунології, але й онкології вже тривалий час привертають протипухлинні властивості багатьох лектинів. На сьогодні показано, що пряма протипухлинна дія лектинів може реалізовуватися через різні механізми: апоптоз, аутофагія, інгібування росту пухлини [5–7]. Найбільш вивченими з погляду протипухлинних та імунотулюючих ефектів є лектини рослин. Виражений цитотоксичний ефект проти клітин різних пухлин (рак молочної залози, печінки, легені, меланома) продемонстрований для лектинів омели та квасолі звичайної [8, 9], канавалії мечоподібної та софори [10]. У дослідженнях *in vitro* та *in vivo* показана антипроліферативна активність лектинів, отриманих з деяких грибів [11, 12]. Меншою мірою досліджено цитотоксичні властивості тваринних лектинів [13].

Бактерії також можуть бути джерелом для отримання лектинів. Особливу увагу привертають позаклітинні лектини (їх виділення не потребує накопичення значної кількості мікробної біомаси). Серед речовин мікробного походження на сьогоднішній день найбільш вивченими є лектини сапрофітних штамів бактерій роду *Bacillus*, зокрема *B. subtilis*. При дослідженні властивостей 223 штамів цієї бактерії показано, що 65 із них є лектинпродукуючими. Позаклітинні лектини *B. subtilis* являють собою термостабільні, металонезалежні глікопротеїни з молекулярною масою 25–50 кДа, стійкі до дії рН, детергентів і тривалого зберігання, мають рідкісну специфічність до сіалових кислот, сіаловмісних глікокон'югатів та проявляють різноманітну медико-біологічну активність: інтерферон-індукуючу, імунотропну, протипухлинну, антивірусну. Деякі лектини виявляють токсичну активність. Це пов'язано з тим, що частина субодниць, які складають лектин, є лектиновими, а інша — токсином. Одержані дані щодо гемаглютинуючих властивостей позаклітинних лектинів *Bacillus* свідчать про те, що ці біополімери мають дуже вузьку вуглеводну специфічність та високий ступінь впізнавання певних структур і можуть успішно конкурувати з моноклональними антитілами як аналітичні й діагностичні реагенти [14–16]. Слід відзначити, що при використанні лектинів як протипухлинних засобів необхідно враховувати не лише можливість отримання цих білків у достатній кількості, але і збереження їх властивостей (в тому числі вуглеводної специфічності). Останнє залежить як від джерела отримання білків, так і від методів їх виділення та очистки. В аспекті біотехнологічного виробництва процес отримання бактеріальних лектинів досить простий і можливий для стандартизації. Проте фізико-хімічні та біологічні властивості бактеріальних лектинів змінюються за-

лежно від штаму мікроорганізму та методу виділення. Тому в кожному окремому випадку при внесенні змін в умови культивування бактерій, зміні середовища росту або модифікації методу одержання речовини необхідно детально вивчати та охарактеризувати властивості отриманого лектину.

Достатньо давно продемонстрована перспективність використання лектину *B. subtilis* в імунотерапії низки злоякісних новоутворень людини [17–21], а саме при виготовленні протипухлинних аутовакцин з операційного матеріалу. Водночас поширення впровадження таких вакцин в клінічну практику вимагає строгої стандартизації культивування цього мікроорганізму та методів виділення і контролю його лектину.

Виходячи з викладеного, метою нашої роботи була оцінка *in vitro* цитотоксичної дії на пухлинні та імунікомпетентні клітини лектину, виділеного з фільтрату культуральної рідини *B. subtilis* В-7724 за модифікованим методом.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

В якості продуцента лектиноподібної речовини було використано спороутворюючу грампозитивну сапрофітну бактерію *B. subtilis* В-7724. Даний штам (досліджений в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології (ІЕПОР) ім. Р.Є. Кавецького НАН України під найменуванням *B. subtilis* В-7025) був одержаний методом аналітичної селекції зі штаму *B. subtilis* АБ-56 [22, 23]. У 2018 р. штам був депонований у депозитарії Інституту мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України як *B. subtilis* ІМВ В-7724.

Досліджувану речовину отримували із культуральної рідини *B. subtilis* В-7724 після 10-добового культивування на стандартизованому середовищі Гаузе при температурі 37 °С. Речовину отримували за методом [22], модифікованим з метою збільшення виходу кінцевого продукту, що дозволило збільшити вихід останнього в 1,7 рази. Виявлено, що отримана речовина проявляє властивості лектинів: в концентрації 10 мкг/мл здатна аглютинувати еритроцити кроля. Аналіз амінокислотного складу цієї лектиноподібної речовини (ЛПР) показав, що в ній превалюють лейцин та тирозин (близько 18,0%), фенілаланін (близько 15,0%) і валін (близько 10,0%).

Перша серія досліджень включала оцінку *in vitro* цитотоксичної активності ЛПР проти клітин пухлинних або умовно нормальних клітинних ліній, отриманих із Клітинного банку ліній з тканин людини та тварин ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Зокрема, були використані клітини раку Ерліха (РЕ; асцитний варіант недиференційованої пухлини молочної залози миші); мишачої меланоми В16; А549 (недрібноклітинний рак легені людини); К562 (хронічна мієлогенна лейкемія людини); МДВК (клітини нирки ембріона великої рогатої худоби, умовно нормальна клітинна лінія).

Клітини культивували при 37 °С у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ у повному поживному середовищі

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

(RPMI 1640 («SIGMA», США), 10% сироватки ембріонів теляти («SIGMA», США), 40 мкг/мл гентаміцину). Суспензію клітин висаджували на 96-лункові планшети в концентрації $1 \cdot 10^5$ клітин на лунку в 100 мкл повного ростового середовища. Через 24 год в лунки вносили досліджувану речовину в різних концентраціях (0,02–0,1 мг/мл) та інкубували за стандартних умов протягом 60 та 120 хв. Оцінку цитотоксичного впливу проводили, використовуючи такі методи: цитоморфологічний аналіз за допомогою світлового мікроскопа, колориметричний МТТ-тест. Як контроль використовували лунки з чистим середовищем культивування або з клітинами без додавання ЛПР. Для визначення цитотоксичної активності в МТТ-тесті [24] після завершення відповідного терміну інкубації планшети двічі відмивали 0,9% NaCl та додавали 200 мкл повного середовища RPMI-1640 і 20 мкл розчину МТТ (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) («SIGMA», США) в концентрації 5 мг/мл. Інкубували 4 год за стандартних умов, двічі відмивали фізіологічним розчином та додавали 140 мкл 50% розчину ДМСО (диметилсульфоксид; «SERVA»). Оптичну густину (ОГ) вимірювали при $\lambda = 540$ нм на автоматичному *microELISA reader* (StatFax-2100, USA). Індекс цитотоксичності (ІЦ) розраховували за формулою:

$$ІЦ = 1 - \frac{ОГ_{К+ЛПР} - ОГ_{бланк}}{ОГ_{К} - ОГ_{бланк}} \cdot 100\%$$

де: $ОГ_{К+ЛПР}$ — показник в лунках з клітинами та ЛПР; $ОГ_{К}$ — в лунках з клітинами без додавання ЛПР; $ОГ_{бланк}$ — в лунках лише з середовищем культивування.

Наступна серія досліджень включала оцінку токсичного впливу ЛПР на клітини імункомпетентних органів (тимус, периферичні лімфатичні вузли) та на перитонеальні Мф інтактних тварин (мишей лінії Balb/c). Дослідження цитотоксичної активності проводили, як описано вище. Перед початком культивування оцінювали кількість життєздатних клітин, виділених від мишей лінії Balb/c, за стандартною методикою, використовуючи суправітальне забарвлення трипановим синім [25]. Суспензію лімфоцитів/Мф вносили в лунки планшета по 100 мкл ($1 \cdot 10^5$ клітин/лунку), додавали відповідні концентрації ЛПР та інкубували за стандартних умов. Результати оцінювали через 60 хв, 120 хв, 24 год в МТТ-тесті, розраховуючи ІЦ (%).

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами [26]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінку цитотоксичної активності ЛПР на першому етапі дослідження проводили, використовую-

ючи клітини РЕ та хронічної мієлогенної лейкемії людини (лінія K562). Результати розрахунку ІЦ (%) за результатами МТТ-тесту наведено в табл. 1.

Таблиця 1
Динаміка змін цитотоксичної активності різних концентрацій ЛПР

| Концентрація ЛПР, мг/мл | ІЦ (%) щодо клітин | | | |
|-------------------------|--------------------|-------------------------|------------|-------------------------|
| | РЕ | | K562 | |
| | 1 год | 2 год | 1 год | 2 год |
| 0,02 | 19,3 ± 4,4 | 48,4 ± 4,4 ¹ | 0 ± 0 | 13,4 ± 1,0 ¹ |
| 0,04 | 38,3 ± 5,4 | 59,2 ± 2,6 ¹ | 0 ± 0 | 22,3 ± 8,7 ¹ |
| 0,06 | 78,8 ± 3,5 | 79,2 ± 3,3 | 10,4 ± 2,5 | 35,7 ± 1,6 ¹ |
| 0,08 | 85,3 ± 1,0 | 87,7 ± 2,0 | 15,2 ± 2,9 | 39,2 ± 3,7 ¹ |
| 0,1 | 89,2 ± 1,0 | 89,3 ± 1,7 | 20,2 ± 3,4 | 41,0 ± 4,2 ¹ |

¹ $p < 0,05$ порівняно з показником ІЦ після 1 год інкубації.

Як видно з табл. 1, через 1 год низькі концентрації ЛПР (0,02 та 0,04 мг/мл) спричинили незначну загибель клітин РЕ (ІЦ становив 19,3 та 38,3% відповідно). При додаванні речовини в концентрації 0,06 мг/мл ІЦ суттєво зростав і сягав 78,8% ($p < 0,05$ порівняно з показником ІЦ ЛПР в концентрації 0,04 мг/мл). Подальше збільшення концентрації діючої речовини до 0,1 мг/мл призводило до поступового підвищення ІЦ до 89,2%. Через 2 год в лунках з мінімальною концентрацією ЛПР (0,02 мг/мл) відмічали загибель майже половини ПК (ІЦ = 48,4%), подальше збільшення концентрації діючої речовини супроводжувалося рівномірним підвищенням цитотоксичної активності до 89,3%.

Аналогічні результати були отримані при використанні в якості мішеней клітин K562. Після 1 год інкубації з ЛПР відмічали незначну загибель ПК: максимальний ІЦ становив 20,2% для ЛПР в концентрації 0,1 мг/мл. Через 2 год реєстрували суттєве збільшення ($p < 0,05$ порівняно з попереднім терміном) кількості клітин, що загинули, для всіх досліджуваних концентрацій речовини.

Крім того, відмічено, що клітини різних пухлинних ліній мають різну чутливість до цитотоксичного впливу досліджуваної речовини. Застосування ЛПР у найнижчих концентраціях (0,02 та 0,04 мг/мл) призводило до загибелі майже половини клітин РЕ протягом 2-годинної інкубації (ІЦ становив 48,4 та 59,2% відповідно), тоді як на клітини K562 зазначені концентрації ЛПР практично не впливали: після інкубації протягом 1 год ІЦ становив 0%, після 2 год — 13,4% (0,02 мг/мл) та 22,3% (0,04 мг/мл). Найвища застосована концентрація ЛПР (0,1 мг/мл) призводила до загибелі більшої частини клітин РЕ вже через 1 год (ІЦ = 89,2%), для клітин K562 ІЦ становив в цей термін лише 20,2%.

Отримані результати показали, що оцінку цитотоксичної активності досліджуваної речовини щодо пухлинних клітин різних ліній доцільно проводити після інкубації протягом 2 год. Для подальших досліджень були відібрані концентрації ЛПР 0,02 та 0,04 мг/мл як такі, що володіють цитотоксичною активністю, але не призводять до суттєвої загибелі клітин-мішеней.

Наступний етап дослідження включав визначення та порівняння цитотоксичного впливу ЛПР на пухлинні клітини різного походження та вислової приналежності. З цією метою ми використали такі клітинні лінії:

- клітини з тканин людини — А549 (недрібноклітинний рак легені людини, моношарова культура) та К562 (хронічна мієлогенна лейкемія людини, суспензійна культура);
- клітини з тканин тварин — меланома В16 (меланома миші); MDBK (клітини нирки ембріона великої рогатої худоби, умовно нормальні клітинні лінії, мають здатність до необмеженого поділу).

Як видно з даних, наведених в табл. 2, ЛПР в досліджуваних концентраціях практично не впливала на клітини мієлоїдного походження. Після інкубації протягом 2 год ІЦ щодо клітин лінії К562 становив 13,4% (0,02 мг/мл) та 22,3% (0,04 мг/мл).

Таблиця 2

Цитотоксичний вплив (ІЦ, %) ЛПР мікробного походження на пухлинні клітини різних ліній

| Концентрація ЛПР, мг/мл | Лінія клітин | | | |
|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|------------|
| | MDBK | A549 | Меланома В16 | K562 |
| 0,02 | 36,8 ± 3,1 ^{1,2} | 59,1 ± 3,3 ^{1,2} | 72,3 ± 1,9 ¹ | 13,4 ± 1,0 |
| 0,04 | 56,4 ± 4,6 ^{1,2} | 93,2 ± 1,3 ^{1,2} | 97,2 ± 0,2 ¹ | 22,3 ± 2,7 |

¹p < 0,05 порівняно з показником ІЦ щодо К562.

²p < 0,05 порівняно з показником ІЦ щодо меланоми В16.

Цитотоксичний вплив досліджуваної речовини на клітини нирки ембріона великої рогатої худоби (MDBK) був більш виражений. Концентрація ЛПР 0,02 мг/мл мала незначний цитотоксичний ефект (ІЦ = 36,8%). Інкубація з ЛПР в концентрації 0,04 мг/мл призводила до загибелі практично половини клітин (ІЦ = 56,4%).

Найбільш чутливими виявилися клітини меланоми (В16) та недрібноклітинного раку легені людини (А549). Розрахований ІЦ (ЛПР 0,04 мг/мл) становив 97,2% для клітин меланоми В16 та 93,2% — для клітин раку легені А549.

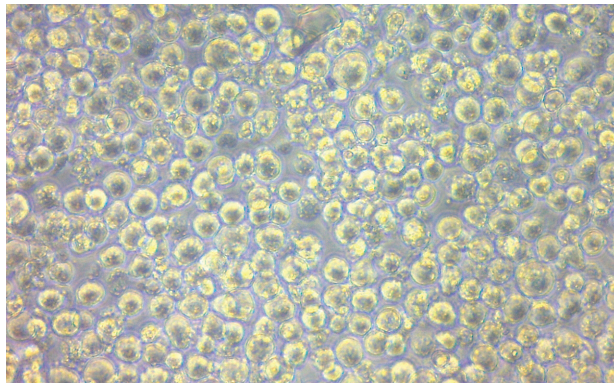
На рисунку наведено мікрофотографії лунок планшета, отримані при проведенні мікроскопічного контролю стану клітин двох пухлинних ліній (К562 та А549) на інвертованому мікроскопі (збільшення × 40) після 2 год інкубації з ЛПР. Для порівняння продемонстровано зразки клітин, які були інкубовані в повному ростовому середовищі без додавання ЛПР (контрольні лунки) або з додаванням ЛПР в концентрації 0,04 мг/мл (дослідні лунки). Як видно з рисунка, інкубація з ЛПР клітин раку легені А549, які виявилися більш чутливими до впливу речовини, призводила до зміни їх морфологічних ознак та суттєвого зменшення кількості. На клітини лінії К562 отримана речовина практично не впливала. Проведені раніше дослідження властивостей лектину *B. subtilis*, отриманого за вихідною методикою [23], показали, що цитотоксична дія лектину реалізувалася в два етапи: спочатку спостерігали аглютинацію пухлинних клітин

та утворення конгломератів, потім відбувався їх лізис. Такий ефект автори пов'язували з властивістю синтезованого лектину індукувати процес активації та/або зміни специфічності внутрішньоклітинних протеолітичних ферментів, що призводило по повного або часткового лізису клітин пухлини. За даними літератури відомо, що основна роль лектинів полягає в їх дії як кофакторів, завдяки яким виявляють свою активність ключові літичні ферменти, такі як глікозидаза, протеаза, естераза, фосфатаза, гемолізін та ін. [27].

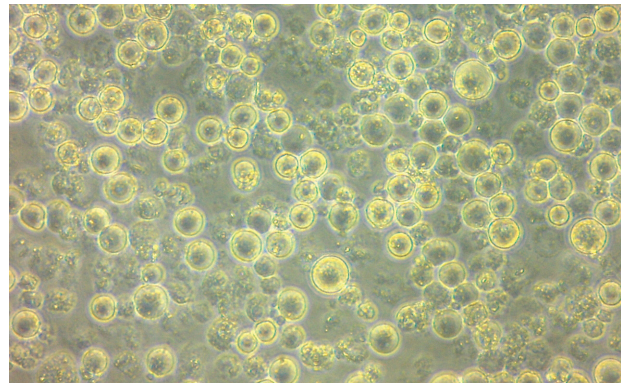
Отримані нами результати збігаються з даними літератури щодо цитотоксичного впливу лектинів різного походження на клітини пухлин. Так, Н. Rudiger та співавтори показали, що різні штами пухлин мають відмінну чутливість до дії лектину омели. Зокрема, саркома С37 виявилася більш чутливою, ніж лімфома NK/Ly, а остання — більш чутливою, ніж карцинома Ерліха [28]. Така різна чутливість пухлинних клітин до лектинів, вірогідно, зумовлена різним рівнем переглікозилювання (зокрема фукозилювання та/або сіалування) вуглеводних ланцюгів глікопротеїнів цитоплазматичної мембрани [29]. Залежність цитотоксичного впливу на клітини свавців від використаної концентрації активної речовини була показана для ізолектинів фітогемаглютиніну [30]. За умов експерименту ці речовини індукували загибель клітин (як злаякісних, так і умовно нормальних ліній) за рахунок індукції програмованої загибелі клітин (апоптозу) через стимуляцію рецепторзалежних сигнальних шляхів.

Таким чином, проведені в системі *in vitro* дослідження показали, що ЛПР, отримана з культуральної рідини *B. subtilis* В-7724, має цитотоксичні властивості щодо пухлинних клітин різних ліній. Доречно відмітити, що найбільш чутливими до цитотоксичного впливу ЛПР виявилися клітини меланоми В16 та недрібноклітинного раку легені А549, тобто злаякісних новоутворень, які, як відомо, виявляють високу резистентність до хімотерапевтичних препаратів [31, 32]. Такі результати дозволили припустити, що клітини різного походження нормальних тканин (зокрема системи імунітету) також будуть мати різну чутливість до дії досліджуваної речовини. Застосування лектинів *in vivo*, у ролі цитотоксичних щодо пухлинних клітин засобів, обмежується їх пошкоджувальним впливом на клітини різних органів і тканин. З метою обґрунтування вибору концентрації діючої речовини для подальшого дослідження в системі *in vivo* потрібно було оцінити ступінь токсичності (зокрема імунотоксичності) цієї речовини для інтактних клітин організму експериментальних тварин.

Тому наступним етапом нашого дослідження було визначення токсичного впливу ЛПР, отриманої з середовища росту *B. subtilis*, на клітини імункомпетентних органів (тимус, периферичні лімфатичні вузли) та перитонеальні Мф інтактних мишей лінії Balb/c (табл. 3).

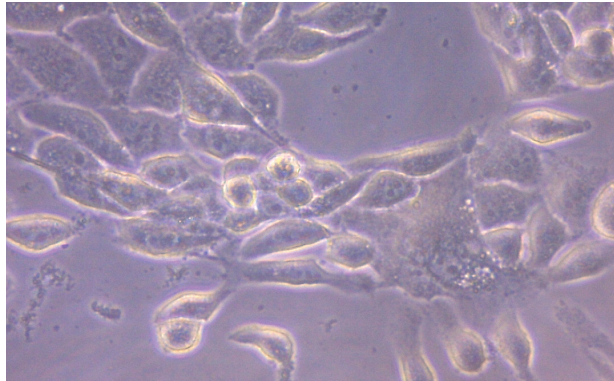


Контрольні лунки

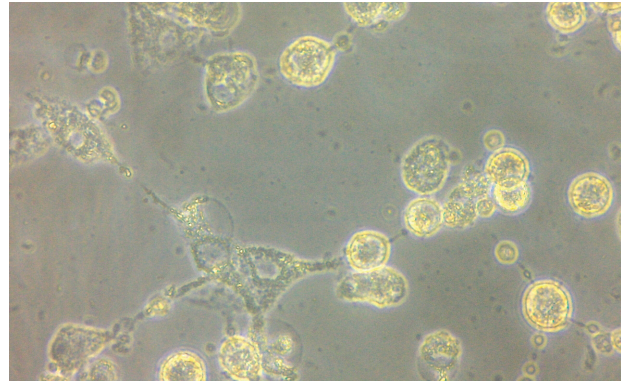


Дослідні лунки

K562



Контрольні лунки



Дослідні лунки

A549

Рисунок. Цитотоксична активність ЛПР в концентрації 0,04 мг/мл проти клітин низькочутливих (K562) та високочутливих (A549) ліній (нативний препарат, $\times 40$)

Таблиця 3
Цитотоксична активність ЛПР проти імунокомпетентних клітин (ІЦ, %)

| Термін інкубації | Концентрація лектину, мг/мл | | |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 0,02 | 0,04 | 0,1 |
| Тимоцити | | | |
| 2 год | 52,2 \pm 4,2 ¹ | 60,4 \pm 7,9 ¹ | 84,5 \pm 2,8 ¹ |
| 24 год | 83,0 \pm 3,8 ¹ | 94,5 \pm 1,8 ¹ | 99,5 \pm 1,8 ¹ |
| Лімфоцити периферичних лімфатичних вузлів | | | |
| 2 год | 41,9 \pm 2,7 ¹ | 52,5 \pm 7,6 ¹ | 77,9 \pm 3,9 ¹ |
| 24 год | 68,6 \pm 2,2 ¹ | 71,3 \pm 6,9 | 98,3 \pm 1,2 ¹ |
| Перитонеальні Мф | | | |
| 2 год | 14,8 \pm 1,8 | 30,2 \pm 1,2 | 60,3 \pm 1,8 |
| 24 год | 50,9 \pm 2,6 | 56,4 \pm 2,2 | 90,2 \pm 0,9 |

¹p < 0,05 порівняно з показниками ІЦ Мф.

Показано, що ЛПР володіє цитотоксичною дією на клітини як лімфоїдного, так і моноцитарно-макрофагального ряду. Найбільш чутливими до впливу ЛПР виявилися клітини тимуса: при додаванні мінімальної концентрації речовини (0,02 мг/мл) вже через 2 год ІЦ становив 52,2%, а через добу — 83,0%. Застосування ЛПР в концентрації 0,04 мг/мл призвело до загибелі практично всіх клітин-мішеней після 24 год інкубації (ІЦ = 94,5%).

Цитотоксичний вплив на лімфоцити периферичних лімфатичних вузлів виявився дещо слабшим: додавання до лімфоцитів ЛПР в концентрації 0,02 мг/мл зумовлювало загибель 41,9% клітин через 2 год та 68,6% — через 24 год. При збільшенні концентрації діючої речовини до 0,04 мг/мл від-

мічали незначне підвищення ІЦ через 1 та 24 год (на 20,2 та 4% відповідно).

Найбільш резистентними до дії досліджуваної речовини виявилися перитонеальні Мф. Додавання ЛПР в концентрації 0,02 мг/мл мало незначний цитотоксичний вплив на ці клітини протягом 2 год інкубації (ІЦ = 14,8%), через добу реєстрували загибель 50,9% клітин-мішеней. Підвищення концентрації речовини супроводжувалося пропорційним зростанням її цитотоксичного впливу. Незалежно від концентрації ЛПР її цитотоксична активність проти перитонеальних Мф була достовірно нижчою (p < 0,05) порівняно з такою проти клітин тимуса та периферичних лімфатичних вузлів.

Застосування максимальної концентрації речовини (0,1 мг/мл) призводило до загибелі практично всіх клітин-мішеней через 24 год: ІЦ становив 99,5 \pm 1,8 (тимоцити), 98,3 \pm 1,2 (лімфоцити периферичних лімфатичних вузлів), 90,2 \pm 0,9% (Мф). Тобто зазначена концентрація ЛПР виявилася токсичною для всіх клітин-мішеней, незалежно від їх чутливості.

Наведені вище результати свідчать про відмінність впливу досліджуваної речовини на клітини лімфоцитарної та моноцитарно-макрофагальної ланок імунної системи. Лімфоцити (і тимуса, і периферичних лімфатичних вузлів) виявилися більш чутливими, ніж Мф. Вірогідно різний ступінь чутливості клітин імунної системи до цитотоксичного впливу

досліджуваної ЛПР зумовлений наявністю рецепторів певного виду на поверхні клітинної мембрани. Як відомо, кожен з лектинів має свою унікальну вуглеводну специфічність і може зв'язувати певні рецептори на мембранах клітин організму людини і тварин. Імунокомпетентні клітини несуть значну кількість лектинзв'язувальних рецепторів, які можуть як активувати клітини імунної системи [33], так і пригнічувати або індукувати апоптоз останніх. Наприклад, показано, що до біологічної ролі рецепторів із залишками β D-галактози родини галектинів належать формування та регуляція імунного гомеостазу організму, а саме контроль за апоптозом Т-лімфоцитів і дозріванням В-лімфоцитів [34], регуляція процесів вродженого і набутого імунітету [35, 36]. Антигенрозпізнавальний рецептор антигенпрезентуючих клітин, Мф і моноцитів має більш складну будову, розпізнаючи не тільки відсутність свого (за наявністю рецепторів до Cal β 1CalNac α (PNA⁺)), а також і наявність чужого антигену через манозний рецептор (Man⁺) [37].

Таким чином, проведене нами в системі *in vitro* дослідження дозволило підібрати найменші концентрації ЛПР, продукованої мікроорганізмом *B. subtilis* В-7724, які володіють цитотоксичною активністю щодо пухлинних клітин, але водночас не мають суттєвої токсичної дії на клітини імунної системи. Визначені концентрації (0,02–0,04 мг/мл) у подальшому можуть бути використані в досліді *in vivo* з метою оцінки протипухлинної дії отриманої речовини.

ВИСНОВКИ

1. ЛПР, виділена з середовища росту мікроорганізму *B. subtilis* В-7724, виявляє дозозалежну цитотоксичну активність щодо клітин різних модельних пухлин: мінімальну активність — в концентрації 0,02 мг/мл, максимальну — 0,1 мг/мл.

2. Найбільш чутливою до цитотоксичної дії ЛПР виявилася меланома В16: ІЦ = 72,3% (0,02 мг/мл) та 97,2% (0,04 мг/мл). Практично нечутливими були клітини лінії К562: ІЦ = 13,4% (0,02 мг/мл) та 22,3% (0,04 мг/мл).

3. Найбільш чутливими до дії ЛПР виявилися клітини тимуса: при додаванні в лунки мінімальної концентрації речовини (0,02 мг/мл) через 60 хв ІЦ = 52,2, через 24 год — 83,0%. Клітини макрофагальної ланки більш резистентні: при додаванні ЛПР в мінімальній концентрації ІЦ становив 14,8% (60 хв) та 60,9% (24 год).

4. Цитотоксична активність досліджуваної речовини проти перитонеальних Мф була достовірно нижчою ($p < 0,05$) порівняно з такою проти клітин тимусу та периферичних лімфатичних вузлів.

5. Концентрації ЛПР 0,02 або 0,04 мг/мл можуть бути використані в подальших досліді як такі, що володіють цитотоксичною активністю проти пухлинних клітин, але водночас не мають суттєвої імунотоксичної дії *in vivo*.

6. Одержані результати можуть скласти підґрунтя для вдосконалення напрямків і методів використання ЛПР *B. subtilis* В-7724 в онкологічній клінічній практиці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Antoyuk VO. Lectins: distribution and function in living organisms and peculiarities of the procurement of raw materials. Ukr Biofarm J 2013; 6 (29): 1–10 (in Ukrainian).
2. Karaman OM, Fedosova NI, Voeikova IM, et al. Perspectives of using lectins for cancer diagnostic and treatment. Oncology 2018; 20 (1): 10–6 (in Ukrainian).
3. Piven OO, Lukash LL. Influence of exogeneous proteins on mutagenic process. Cytol Genet 2011; (1): 68–79 (in Russian).
4. Tsrkin VI, Anisimov AYu, Dmitrieva SL, et al. Outlook study of erythrocyte agglutination induced lectin to diagnose of preterm labor. Scientific review. Medical Sciences 2017; (1): 83–104 (in Russian).
5. Pervin MKY, Isemura M, Nakamura Y. Plant lectins in therapeutic and diagnostic cancer research. Int J Plant Biol Res 2015; 3: 1–6.
6. Korman DB. Lectins of mistletoe white — antitumor properties and mechanisms of action. Question Oncol 2011; 57 (6): 689–98 (in Russian).
7. Lisyany NI, Gnedkova IA, Gnedkova MA. Study of plant lectins anti-tumor action on glioma cells of different stages of anaplasia. Ukr Neurosurg J 2009; (1): 30–8 (in Russian).
8. Fu LL, Zhou CC, Yao S, et al. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. Int J Biochem Cell Biol 2011; 43: 1442–9.
9. Marvibaigi M, Supriyanto E, Amini N, et al. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. Biomed Res Int 2014; 2014: 1–15.
10. Shi Z, Chen J, Li CY, et al. Antitumor effects of concanavalin A and Sophora flavescens lectin *in vitro* and *in vivo*. Acta Pharmacol Sin 2014; 35: 248–56.
11. Singh RS, Kaur HP, Kanwar JR. Mushroom lectins as promising anticancer substances. Curr Protein Pept Sci 2016; 17: 797–807.
12. Hassan MA, Rouf R, Tiralongo E, et al. Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. Int J Mol Sci 2015; 16: 7802–38.
13. Ovcharenko YuS, Chikalovets IV, Molchanova VI, Chernikov OV. Antibacterial activity of lectins from the assistance *Didemnum Ternatanum*. Int Res J 2018; 5 (71): 82–4 (in Russian).
14. Podgorsky VS, Kovalenko EA, Karpova IS, et al. Extracellular lectins of saprophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus* (review). Applied Biochem Microbiol 2014; 50 (3): 256–63 (in Russian).
15. Savustyanenko AV. Mechanisms of action of probiotics based on *Bacillus subtilis*. Actual Infectology 2016; 2 (11): 35–44 (in Russian).
16. Roy AA, Pasichnyk LA, Tserkovniak LS, et al. Influence of bacteria of *Bacillus* genus on the agent of bacterial cancer of tomatoes. Microbiol J 2012; 74 (5): 74–80 (in Russian).
17. Zajciuk VV, Vereshchako RI, Cheshuk VE, et al. Efficacy of the use of antitumor autovaccine in the treatment of patients with a different morphological structure of breast cancer. Oncology 2006; 8 (1): 70–3 (in Ukrainian).
18. Zajciuk VV, Vereshchako RI, Cheshuk VE, et al. Efficacy of combination of anticancer autovaccine with standard anticancer treatment in breast cancer (analysis of 10-year surveillance data). Oncology 2015; 17 (1): 47–54 (in Russian).
19. Chorny VO, Potebnia GP, Lisovenko GS, et al. Outlooks of use of an anticancer autovaccine in the treatment of patients with extensive stomach cancer. Oncology 2003; 5 (2): 107–10 (in Ukrainian).
20. Potebnya GP, Smolanka II, Lisovenko GS, et al. Efficacy of autoimmunotherapy in the treatment of lung cancer patients. Oncology 2000; 2 (3): 191–4 (in Russian).
21. Shalimov SA, Kolesnik EA, Grinevich YA, et al. Adjuvant immunotherapy in treatment of patients with colorectal cancer. Oncology 2003; 5 (2): 101–6 (in Russian).

22. **Potebnya GP, Lisovenko GS, Cheremshenko NL, et al.** The laws of biosynthesis of cytotoxic lectins by culture of *Bacillus subtilis B-7025* at growing on different nutrient media. Ukr Chemother J 2002; 1 (13): 54–7 (in Russian).

23. **Potebnya GP, Tanasienko OA, Lisovenko GS, Savtsova ZD.** Use of cytotoxic lectins of bacterial origin in immunotherapy of experimental tumors. In: Structure and Biological Activity of Bacterial Biopolymers. Ed. *VK Pozur*. K: Vyd-polygr Center «Kyiv University», 2003: 235–304 (in Ukrainian).

24. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65: 55–63.

25. **Claus J.** Lymphocytes Methods. M.: Mir, 1990. 395 p. (in Russian).

26. **Sidenko AB, Vishnyakov VV, Isaev SM.** Theory of Statistics. M.: MAX-Press, 2011. 343 p. (in Russian).

27. **Lam SK, Ng TB.** Lectins: production and practical applications. Appl Microbiol Biotechnol 2011; 89: 45–55.

28. **Rudiger H, Gabius HJ.** Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. Glycoconj J 2001; 18: 589–613.

29. **Pinho SS, Reis CA.** Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. Nat Rev Cancer 2015; 15: 540–55.

30. **Kochubei TO, Maksymchuk OV, Macewicz LL, et al.** Proapoptotic properties of total phytohemagglutinin and its individual isolectins in human cell culture 4BL. Ukr Biochem J 2014; 86 (4): 103–9 (in Ukrainian).

31. **Kukushkina MM, Korovin SI, Kukushkina SM, et al.** Immunotherapy of advanced melanoma. Clinical Oncology 2017; 7 (1): 6–11 (in Russian).

32. **Shevchenko AI, Kolesnik AP, Kadzhoian AV, Kuzmenko VA.** Chemoresistance factors in non-small cell lung cancer. Pathology 2016; (1): 4–9 (in Russian).

33. **Hranovska N, Skachkova O, Gorbach O, et al.** Phenotypic and functional properties of generated human dendritic cells after treatment with cytotoxic lectins *B. Subtilis B-7025*. Bulletin of the Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology 2014; 3 (68): 76–9 (in Russian).

34. **Dam TK, Brewer CF.** Effects of clustered epitopes in multivalent ligand-receptor interactions. Biochemistry 2008; 47: 8476–85.

35. **Rabinovich GA, Toscano MA, Jackson SS, et al.** Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. Curr Opin Struct Biol 2007b; 17: 520–64.

36. **Van Die I, Cummings RD.** Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response? Glycobiology 2010; 20: 2–18.

37. **Kushch OG.** Lectins in immunomorphology. World of Medicine and Biology 2014; 4 (47): 150–7 (in Ukrainian).

ESTIMATION OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF LECTIN-LIKE SUBSTANCE OF *B. SUBTILIS B-7724* IN SYSTEM *IN VITRO*

N.I. Fedosova, O.M. Karaman, I.M. Voeykova, T.V. Symchych, A.V. Ivanchenko,

N.L. Cheremshenko, O.O. Kruts, G.V. Didenko

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Objective: *in vitro* evaluation of cytotoxic activity in relation to tumor cells of various lines and im-

munotoxic activity of lectin-like substance (LLS) isolated from the culture liquid medium filtrate of B. subtilis B-7724 by the modified method. Object and methods: LLS was obtained from the culture medium *B. subtilis B-7724*, after 10-day cultivation on a standardized medium. The *in vitro* cytotoxic activity of LLS was investigated in relation to tumor cells (*Ehrlich cancer, melanoma B16, A549, K562*) or conditionally normal (*MDBK*) cell lines, as well as cells of the immune-competent organs of *Balb/c* intact mice. The evaluation of the cytotoxic effect was performed using a cytomorphological analysis using a light microscope and a colorimetric MTT test. The wells with culture medium and target cells, which did not add the test drug, served as control. Statistical processing of the results was carried out according to commonly accepted methods. The probability of the difference between control and experimental measurements was estimated by the Student *t*-criterion. **Results:** LLS isolated from the growth medium of the microorganism *B. subtilis B-7724*, detects dose-dependent cytotoxic activity in relation to cells of various model tumors: the minimum activity is found at a concentration of 0.02 mg/ml, maximum — 0.1 mg/ml. Among the cells of transplantable tumor lines, the melanoma *B16*: cytotoxic index (CI) = 72.3 (0.02 mg/ml) and 97.2% (0.04 mg/ml) was the most sensitive. The cells of the *K562* line: CI = 13.4 (0.02 mg/ml) and 22.3% (0.04 mg/ml) were virtually insensitive to the LLS of the cytotoxic action. Among the cells of the immunocompetent organs, the most sensitive to the action of LLS were thymus cells. More resistant macrophage cells: adding LLS at a concentration of 0.02 mg/ml practically did not have a cytotoxic effect: after 60 minutes CI = 14.8%, after 24 hours — 60.9%. Immunotoxic effect showed a concentration of LLS 0.1 mg/ml (CI = 90.2–99.5%). **Conclusion:** LLS concentrations of 0.02–0.04 mg/ml can be used subsequently *in vivo* experiments as having cytotoxic activity against tumor cells, but at the same time, have no significant immunotoxic activity. The obtained results can form the basis for improving the directions and methods of using *B. subtilis B-7724* LLS in oncology clinical practice.

Key Words: lectin-like substance, *B. subtilis*, tumor cells, lymphocytes, macrophages, cytotoxic action.

Адреса для листування:

Федосова Н.І.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології

і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

E-mail: immunomod@ukr.net

Одержано: 26.09.2018