



УДК 616-006.04:577.121:616-08

© 2012

Г. В. Діденко, О. П. Кузьменко, Є. Г. Шпак, І. А. Тавровська,  
М. А. Надірашвілі, І. О. Блюм, Г. П. Потєбня

**Оптимізація методів виділення, електрофоретична  
характеристика та протипухлинна ефективність  
цитотоксичних метаболітів із фільтрату культуральної  
рідини *Bacillus subtilis* B-7025**

(Представлено членом-кореспондентом НАН України В. Л. Ганулом)

*Проведено оптимізацію виділення білків із фільтрату культуральної рідини *Bacillus subtilis* B-7025 шляхом об'єднання методів осадження білків солями сульфату амонію різної концентрації з подальшою термообробкою. Виявлено три компоненти з різною молекулярною масою, які характеризуються вираженою цитотоксичністю щодо пухлинних клітин (18 кДа, 70 кДа та лектин 7 кДа) не тільки в умовах *in vitro*, але і *in vivo*.*

В останні роки зростає інтерес дослідників до методів біотерапії, зокрема імунотерапії хворих онкологічного профілю [1, 2]. Одним із перспективних підходів є застосування протипухлинних вакцин, виготовлених на основі пухлиноасоційованих антигенів, дія яких ґрунтується на формуванні специфічних реакцій протипухлинного імунітету [3, 4]. Але більшість пухлиноасоційованих антигенів мають низьку імуногенність, що зумовлює необхідність пошуку різноманітних шляхів підвищення ефективності протипухлинних вакцин. Одним із них є посилення імунної відповіді на пухлиноасоційовані антигени за рахунок їх модифікації продуктами мікробного синтезу [5]. Ефективними виявились, зокрема, метаболіти мікроорганізму *Bacillus subtilis* B-7025, який є продуктом селекції штаму *B. mesentericus* АБ-56 [6]. Використання вакцин, виготовлених з аутологічних пухлинних клітин та фільтрату культуральної рідини (ФКР) *B. subtilis* B-7025, дозволило збільшити виживаність хворих на рак шлунка, легені, молочної залози, ободової та прямої кишки [7, 8]. Водночас електрофоретична характеристика окремих складових ФКР *B. subtilis* B-7025 недостатньо досліджена, що гальмує їх подальше застосування при конструюванні протипухлинних вакцин.

У зв'язку з вищесказаним актуальним і перспективним напрямком досліджень стало виділення, характеристика та оцінка протипухлинного ефекту компонентів мікробного синтезу *B. subtilis* B-7025. Це дасть можливість вдосконалити та стандартизувати технології конструювання протипухлинних вакцин.

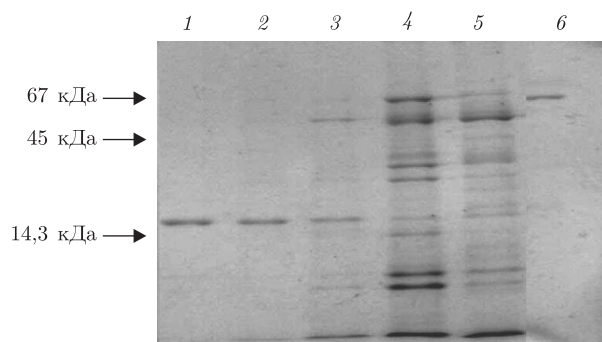


Рис. 1. Електрофореграма компонентів, отриманих за рахунок насичення розчину ФКР *B. subtilis* B-7025 солями сульфату амонію в таких концентраціях: 1 – 20%, 2 – 30%, 3 – 40%, 4 – 50%, 5 – 60%, 6 – 80%

**Матеріали та методи.** Для виділення цитотоксичних компонентів з ФКР *B. subtilis* B-7025 (10-та доба культивування) були використані такі методи: етанольна преципітація [9], іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі [10], колонкова хроматографія з TOYOPEARL G10 та осадження білків сульфатом амонію [11]. Білковий склад отриманих фракцій контролювали за допомогою SDS-електрофорезу; їх цитотоксичну активність визначали *in vitro* за забарвленням пухлинних клітин 0,4% розчином трипанового синього. Морфологічні зміни в пухлинних клітинах, викликані цитотоксичною дією фракцій, визначали у фіксованих цитопрепаратах, забарвлених за методом Романовського–Гімза. У досліджах також використовували ліофілізований лектин, який входить до складу ФКР *B. subtilis* B-7025. Протипухлинний ефект застосування компонентів мікробного синтезу *B. subtilis* B-7025 оцінювали за середньою тривалістю життя 37 мишей лінії C<sub>57</sub>Bl з перещепленою карциномою легені Льюїс та 33 мишей лінії Balb/c із солідною формою карциноми Ерліха (самці віком 2,5–3,5 міс., масою 19–22 г). Тварини одержані з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Перещеплення пухлин здійснювали внутрішньом'язово ( $1 \cdot 10^6$  кл./тварину). На другу добу після перещеплення проводили ін'єкції виділених фракцій у міжлопаткову ділянку тулуба підшкірно в об'ємі 0,3 мл/тварину раз на тиждень, протягом трьох тижнів. Утримання мишей та робота з ними здійснювались у відповідності до загальноприйнятих міжнародних правил проведення робіт з експериментальними тваринами. Дослідження виконані з використанням стандартних штамів експериментальних пухлин, одержаних з клітинного банку тканин людини і тварин ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали, використовуючи *t*-критерій Стьюдента.

**Результати дослідження.** Після апробації ряду методів, що перелічені вище, нами було обрано метод осадження білків сульфатом амонію, оскільки отримані при цьому фракції були насичені окремими протеїдами в кількості, достатній для приготування протипухлинної вакцини і проведення експериментів. Інші апробовані методи мали певні недоліки (низький вихід білоквмісних компонентів, недостатній рівень поділу на окремі компоненти). Виділені компоненти були більш чистими, їх осаджували в кількості, достатній для проведення подальших експериментів (рис. 1). При насиченні розчину ФКР *B. subtilis* B-7025 сульфатом амонію до 40% було отримано фракцію, збагачену протеїдом з молекулярною масою близько 18,5 кДа — компонент 18,5 кДа. При насиченні розчину ФКР сульфатом амонію від 40 до 70% утворювалася лише суміш білків з різною молекулярною масою. При

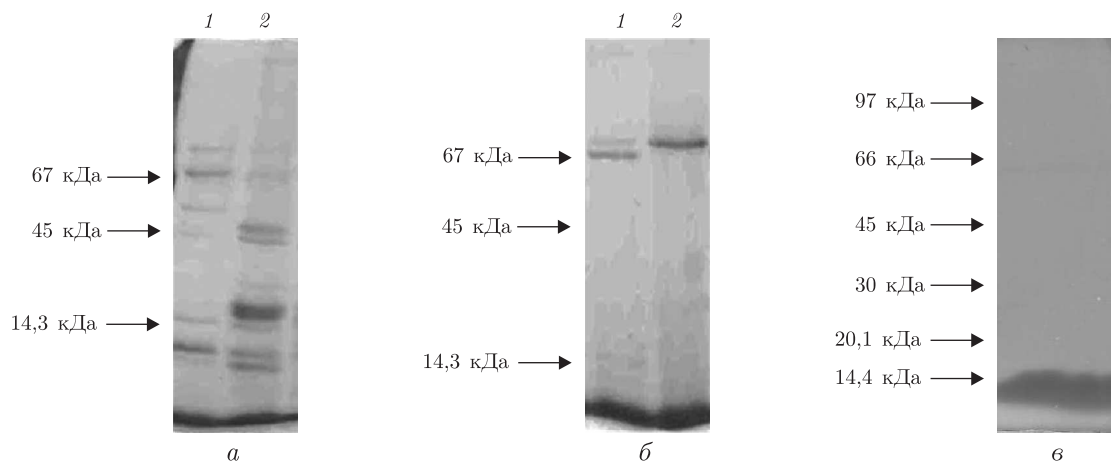


Рис. 2. Електрофореграма пептидів, отриманих з ФКР *B. subtilis B-7025* шляхом висолювання сульфатом амонію при насиченні в межах від 50% (1) до 90% (2) і рН = 4,4 (а — до термообробки, б — після термообробки) та лектину (в)

подальшому насиченні розчину до 80% — виділено високомолекулярні білки майже в чистому вигляді з молекулярною масою близько 70 кДа — компонент 70 кДа.

Ми спробували оптимізувати процес виділення високомолекулярних білків. Для цього було поєднано метод осадження білків солями сульфату амонію з подальшою термообробкою (рис. 2). Досягнувши насичення ФКР сульфатом амонію до 50% та відібравши всі попередні фракції, ми знижували рН розчину до 4,4 (1 М розчином НСІ) і доводили насичення розчину ФКР сульфатом амонію до 90%. Збирали останню фракцію і піддавали її термообробці (доводили до кипіння). Таким чином, незалежно від середовища, на якому вирощували *B. subtilis B-7025*, за допомогою даного методу ми позбавлялися від більшості низькомолекулярних білків та майже вдвічі збільшували вихід високомолекулярних протеїдів, які мали молекулярну масу близько 70 кДа.

Як видно з рис. 3, фракція, отримана при насиченні ФКР солями сульфату амонію до 40%, містила в переважній кількості протеїд з молекулярною масою 18,5 кДа та протягом 1 год інкубації з пухлинними клітинами викликала загибель майже 100% клітин. При цьому пухлинні клітини збільшувались в розмірах, відбувалося полярне зміщення ядра відносно цитоплазми, мембрана пухлинних клітин залишалась гладкою. Фракція, виділена при насиченні розчину ФКР *B. subtilis B-7025* солями сульфату амонію до 70%, майже не виявляла цитотоксичного впливу на пухлинні клітини протягом 4 год інкубації. Фракція, отримана при насиченні розчину ФКР *B. subtilis B-7025* солями амонію в межах від 70 до 90% та піддана термообробці (компонент 70 кДа), протягом годинної інкубації з пухлинними клітинами викликала утворення на їх поверхні кулеподібних структур. Клітини тривалий час залишалися живими (до 3 год інкубації). Загибель 100% пухлинних клітин спостерігали при їх інкубації з препаратом протягом 4 год. Третім компонентом із цитотоксичною дією, виділеним із ФКР *B. subtilis B-7025*, був лектин. Його цитотоксичну та протипухлинну дію детально проаналізовано в ряді робіт [12, 13]. Важливим, на нашу думку, було охарактеризувати виділений лектин. Як видно з одержаної електрофореграми (див. рис. 2), молекулярна маса лектину становила приблизно 7 кДа, що значно відрізняло його за цим показником від виділених із фільтрату культуральної рідини *B. subtilis B-7025* компонентів 18 та 70 кДа.

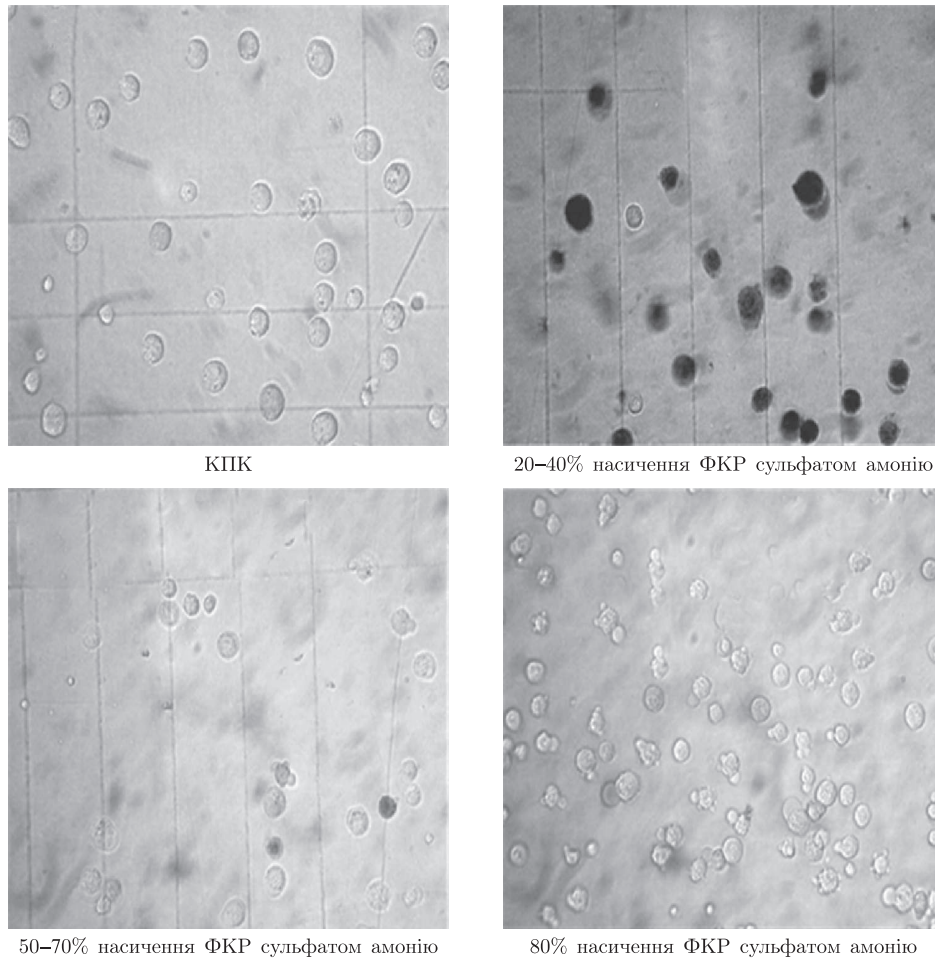


Рис. 3. Цитотоксична дія компонентів, отриманих при насиченні розчину фільтрату культуральної рідини *B. subtilis B-7025* різними концентраціями сульфату амонію (КПК — контроль пухлинних клітин)

Оцінка протипухлинної ефективності виділених фракцій показала (табл. 1), що імунізація тварин сприяє збільшенню середньої тривалості життя, особливо у випадку карциноми легені Льюїс ( $P < 0,05$ ).

Таким чином, проведені дослідження вказують на те, що у фільтраті культуральної рідини *B. subtilis B-7025* існує три компоненти з вираженим цитотоксичним ефектом. Це

Таблиця 1. Середня тривалість життя (СТЖ) та індекс збільшення тривалості життя (ЗТЖ) мишей з пухлинами за умов імунізації цитотоксичними компонентами ФКР *B. subtilis B-7025*

Пухлина	Варіант досліджу	Кількість тварин	СТЖ, доба	ЗТЖ, %
Карцинома	Контроль	10	$28,7 \pm 1,6$	—
Ерліха	18,5 кДа	12	$32,2 \pm 2,6$	12,19
	70 кДа	11	$32,7 \pm 4,7$	13,93
Карцинома	Контроль	13	$27,2 \pm 0,7$	—
легені	18,5 кДа	13	$35,8 \pm 0,8^*$	31,44
Льюїс	70 кДа	11	$40,5 \pm 2,3^*$	48,78

\*  $P < 0,05$  порівняно з контролем.

компоненти з молекулярною масою 18, 70 та 7 кДа (лектин). Досліджувані компоненти мають не тільки прямиий цитотоксичний вплив на пухлинні клітини *in vitro*, але й дають можливість збільшити тривалість життя мишей з карциномою Ерліха та карциномою легені Льюїс. Ймовірно, що протиухлинний ефект досліджених компонентів фільтрату культуральної рідини *B. subtilis B-7025 in vivo* обумовлений впливом на систему клітинного та гуморального імунітету тварин. Одержані результати вказують на перспективність застосування цитотоксичних компонентів із фільтрату культуральної рідини *B. subtilis B-7025* для вдосконалення і стандартизації технології конструювання протиухлинних вакцин.

1. Van de Velde A. L., Berneman Z. N., Van Tendeloo V. F. Immunotherapy of hematological malignancies using dendritic cells // Bull. Cancer. – 2008. – **95**. – P. 320–326.
2. Cheever M. A. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers // Immunol. Rev. – 2008. – **222**. – P. 357–368.
3. Sundstedt A., Celandner M., Hedlund G. Combining tumor-targeted superantigens with interferon-alpha results in synergistic anti-tumor effects // Int. Immunopharmacol. – 2008. – **8**, No 3. – P. 442–452.
4. Galsky M., Eisenberger M., Moore-Cooper S. et al. Phase I trial of the prostate-specific membrane antigen-directed immunoconjugate MLNo 2704. – in patients with progressive metastatic castration-resistant prostate cancer // J. Clin. Oncol. – 2008. – **26**, No 13. – P. 2147–2154.
5. Potebnya G. P. Cancer autovaccine (CAV) – new specific active antitumor agent // Science and innovation. – 2006. – **4**. – P. 26–27.
6. Яжук С. И., Потєбня Г. П. Биотерапия опухолей. – Киев: Книга Плюс, 2010. – 472 с.
7. Чехун В. Ф., Щепотін І. Б., Потєбня Г. П. та ін. Застосування протиухлинної аутовакцини в комплексному лікуванні онкологічних хворих: Метод. рекомендації. – Київ, 2008. – 23 с.
8. Lisovenko G. S., Potebnya G. P., Kolesnik E. A. et al. Application of tumor marker antigens on immunotherapy of patients with colorectal cancer // Exp. Oncol. – 2002. – **24**, No 4. – P. 258–264.
9. Пастер Е. У., Овод В. В., Позур В. К. и др. Иммунология. Практикум. – Київ: Вища шк., 1989. – 304 с.
10. Barnard E. A. Hexokinase from yeast // Meth. Enzymol. – 1975. – **42**. – P. 6–20.
11. Скоупс Р. Методы очистки белков. – Москва: Мир, 1985. – 358 с.
12. Potebnya G., Cheremshenko N., Lisovenko G. et al. Tumor efficacy of vaccines prepared from chemoresistant tumor cells with the use of lectin of *B. subtilis B-7025* // Exp. oncol. – 2007. – **29**, No 4. – P. 277–280.
13. Агеенко А. И. Новая диагностика рака: теория, диагностика, лечение, реабилитация. – Москва: Медицина XXI, 2004. – 408 с.

Інститут експериментальної патології,  
онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького  
НАН України, Київ  
Луганський обласний онкологічний диспансер

Надійшло до редакції 27.01.2012

Г. В. Диденко, А. П. Кузьменко, Е. Г. Шпак, И. А. Тавровская,  
Н. А. Надирашвили, И. О. Блюм, Г. П. Потєбня

**Оптимизация методов выделения, электрофоретическая характеристика и противоопухолевая эффективность цитотоксических метаболитов из фильтрата культуральной жидкости *Bacillus subtilis B-7025***

Оптимизирован процесс выделения белков из фильтрата культуральной жидкости *Bacillus subtilis B-7025* путем объединения методов осаждения белков солями сульфата аммония разной концентрации с дальнейшей термообработкой. Выявлены три компонента с разной молекулярной массой, обладающие выраженной цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток (18 кДа, 70 кДа и лектин 7 кДа) не только *in vitro*, но и *in vivo*.

G. V. Didenko, A. P. Kuzmenko, E. G. Shpak, I. A. Tawrovska,  
N. A. Nadirashvili, I. O. Blum, G. P. Potebnya

**Optimization of the methods of isolation, electrophoretic  
characterization, and antitumor efficacy of cytotoxic metabolites from  
the culture filtrate *Bacillus subtilis* B-7025**

*The separation of proteins from the culture filtrate *Bacillus subtilis* B-7025 by combining the methods of protein precipitation by ammonium sulfate salt at various concentrations with a further heat treatment is optimized. Three components with different molecular weights and a strong cytotoxicity against tumor cells (18 kDa, 70 kDa, and 7 kDa (lectin)) not only in vitro, but in vivo, are identified.*