

Окасов А., Калимагамбетов А.,
Китада С., Африкян Э.,
Ильин А.

***In vitro* канцеролитическая
активность параспоральных
включений, выделенных из
B. thuringiensis spp. *israelensis***

В статье представлены результаты скрининговой программы по поиску новых противоопухолевых белковых агентов, имеющих потенциальное диагностическое и клиническое применение в области онкологии. Проведен поиск новых канцеролитических параспоральных включений, полученных из бактерий рода *Bacillus*, имеющих узкоспецифическое действие на отдельные линии опухолевых клеток. Результатом текущего исследования является обнаружение 8 новых продуцентов канцеролитических параспоральных включений, относящихся к штамму *B. thuringiensis* spp. *israelensis* различных H-серотипов. Противоопухолевая активность полученных параспоральных включений была подтверждена на культурах опухолевых клеток Hep G2 (гепатокарцинома) и MiaPaca-2 (панкреатическая карцинома). Сравнительный анализ отсутствия цитотоксического действия на нормальные клетки проводился посредством воздействия равного количества активной субстанции на клеточную линию MDCK (клетки почек).

Ключевые слова: параспоральные включения, *B. thuringiensis*, онкология, опухолевые клетки, противоопухолевая активность.

Okasov A., Kalimagambetov A.,
Kitada C., Afrikjan Je.,
Ilyin A.

***In vitro* cancerolytic activity of
parasporal inclusions extracted
from *B. thuringiensis* spp.
*israelensis***

The article presents the results of a screening program to find new anticancer proteinous agents having the potential diagnostic and clinical applications in the field of oncology. Searching for new cancerolytic parasporal inclusions derived from bacteria of the genus *Bacillus*, having narrowly specific effect on certain tumor cell lines was provided. The result of this study is the discovery of 8 new producers of cancerolytic parasporal inclusions related to the strain *B. thuringiensis* spp. *israelensis* different H-serotypes. Activity of these parasporal inclusions was proved on cultures of tumor cells Hep G2 (hepatocellular carcinoma) and MiaPaca-2 (pancreatic carcinoma). Comparative analysis of the lack of cytotoxic activity on normal cells was carried out by the impact of an equal amount of the active substance in the cell line MDCK (kidney cell).

Key words: parasporal inclusions, *B. thuringiensis*, oncology, tumor cells, anticancer activity.

Окасов А., Калимагамбетов А.,
Китада С., Африкян Э.,
Ильин А.

***B. thuringiensis* spp. *israelensis*
бөлініп алынған
параспоральды
қосымшалардың *in vitro*
канцеролитті белсенділігі**

Мақала жаңа ісікке қарсы агенттер анықтау үшін скринингтік бағдарлама, онкология саласындағы әлеуетті диагностикалық және клиникалық қосымшаларымен белок нәтижелері ұсынады. *Bacillus* түріндегі бактериядан алынған, қатерлі өспе ісік жасушаларының жеке бағыттарына арнайы әсер ететін жаңа канцеролитті параспоральды қосымшалары зерттелген. Бұл жұмыстың нәтижесінде әртүрлі H-серотиптерінің *B. thuringiensis* spp. *israelensis* штаммаларына жататын канцеролитті параспориндердің 8 жаңа продуценттері табылды. Берілген параспоральды қосымшалары белсенділігі Hep G2 (гепатокарцинома) және MiaPaca-2 (панкреатитті карцинома) қатерлі өспе ісік жасушаларының культураларына көрсетілді. Қалыпты жасушаларында цитотоксикалық белсенділігін болмауына салыстырмалы талдау клеткалық желісі MDCK (бүйрек ұяшық) белсенді субстанцияның тең соманы әсер жүргізілді.

Түйін сөздер: параспоральды қосымшалары, *B. thuringiensis*, онкология, ісік жасушалары, ісікке қарсы қызмет.

¹Научный центр противоиных препаратов,
Республика Казахстан, г. Алматы²Казахский национальный университет имени аль-Фараби,
Республика Казахстан, г. Алматы³Технологический Институт Кюсю, Япония, г. Иизука⁴Центр депонирования микробов, Армения, г. Ереван

*E-mail: 16x4@mail.ru

**IN VITRO
КАНЦЕРОЛИТИЧЕСКАЯ
АКТИВНОСТЬ
ПАРАСПОРАЛЬНЫХ
ВКЛЮЧЕНИЙ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
B. THURINGIENSIS SPP.
ISRAESENSIS**

Введение

Областью интересов фундаментальной и прикладной онкологии является получение эффективных противоопухолевых лекарственных средств, разработка диагностических молекулярных комплексов, определение поверхностных антигенных детерминант опухолевых клеток. В 1911 г. Берлинер впервые описал новый штамм бацилл – *Bacillus thuringiensis*, выделенный из средиземноморской моли *Anagastakuehniella* [1]. Он назвал его в честь провинции Тюрингия в Германии, где была найдена зараженная им моль. Первое коммерческое производство пестицидного препарата «Sporeine» на основе данного штамма началось во Франции в 1938 г [2]. Позже, в 1956 канадский микробиолог Ангус показал, что кристаллические белковые включения, формирующиеся в процессе споруляции, ответственны за инсектицидное действие [3].

Инсектицидные бактерии *Bacillus thuringiensis* являются аэробными грамположительными спорообразующими бактериями, способные производить белковые включения во время споруляции [4]. Эти включения могут быть различимы в качестве четко сформированных кристаллов посредством фазово-контрастной микроскопии. Включения состоят из белков, известных как Сгу-белки или δ-эндотоксины, которые обладают высокой токсичностью для широкого спектра важных сельскохозяйственных и связанных со здоровьем человека насекомых-вредителей, а также других беспозвоночных (в основном специфичных к насекомым и нематодам) [4].

В настоящее время известно, что инсектицидная активность Сгу-белков индуцируется после их специфического связывания с рецептором, расположенном на плазматической мембране эпителиальных клеток средней кишки восприимчивых насекомых [5]. Это свойство делает *B. thuringiensis* экологически безопасным и экологически чистым микробным агентом в борьбе с сельскохозяйственными насекомыми-вредителями [5].

Мизуки и др. в 1999 г. впервые провели исследование параспоральных белковых включений, выделенных из штамма 1744 *B. thuringiensis*, для определения цитотоксической ак-

тивности против человеческих Т-клеток лейкемии и гемолитической активности в отношении эритроцитов овец [6]. Очищенные параспоральные включения, выделенные из 3-х выбранных штаммов, были определены как: 84-HS-1-11, 89-T-26-17 и 90-F-45-14. Эти штаммы не продемонстрировали гемолитическую и инсектицидную активности против двукрылых и чешуекрылых насекомых, но были высокотоксичны против Т-клеток лейкемии и других человеческих раковых клеток. Была выявлена различная степень цитотоксичности активности по выраженности действия и времени экспозиции. Кроме того, белки от 84-HS-1-11 и 89-T-26-17 были в состоянии различать лейкемические и нормальные Т-клетки, в частности, убивая лейкозные клетки. Был сделан вывод о том, что белковые включения *B. thuringiensis* могут быть использованы для медицинских целей [6].

Мизуки и др. (1999г.), продолжая исследование необычных свойств параспоральных включений *B. thuringiensis* и их способности распознавать человеческие лейкозные клетки, нашли белок, названный параспорин, ответственный за канцеролитическую активность. Впоследствии они клонировали его [7].

Позже различными исследовательскими группами были найдены новые штаммы-продуценты канцеролитических параспоральных включений и охарактеризованы их параспорины [8-12].

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования

В работе использовались серотипированные штаммы бактерий *B. thuringiensis*, полученные из коллекции Центра депонирования микробов Армении (г. Ереван). Бактериальные штаммы проращивались на питательном агаре МПА, pH 7 при 30°C до завершения споруляции (примерно 48-72 часа). Для инактивации вегетативных клеток и стимуляции спор к прорастанию, полную петлю спорулированных *B. thuringiensis* помещали в 0,5 мл стерильную деионизированную воду, затем нагревали на водяной бане при 75°C 30 минут. 0,5 мл аликвоты активированных спор помещали в 250 мл питательного бульона МБП (pH 7). Данную культуру инкубировали около 48 часов при 30°C при постоянном перемешивании 250 об/мин. К этому времени более чем 95% культуры была представлена в виде спор.

*Приготовление споро-кристаллической смеси из культур *B. thuringiensis**

Кристаллический NaCl был добавлен к спорулированной культуре *B. thuringiensis* в концентрации 1М для инициации лизиса. Культуры центрифугировали при 6000 x g в течение 10 минут при 4°C, далее полученный спорово-кристаллический осадок был один раз промыт 1М NaCl, ресуспендировали в соответствующем объеме Трис/KCl буфера (50 мМ Трис/HCl, 10 мМ KCl, pH 7,5). Споро-кристаллическую смесь разделили на аликвоты и хранили при -20°C до дальнейшего использования.

Растворение и активация параспоральных белковых включений.

Параспоральные белковые включения выделяли из культур путем растворения споро-кристаллической смеси в 50 мМ Na₂CO₃, 10 мМ дитиотреитола, pH 10,5 в течение одного часа. Нерастворенные споры и другие артефакты осаждали центрифугированием 13000 x g в течение 5 минут. Полученный осадок отбрасывали, а надосадочную (растворенные параспоральные включения) забирали. Далее обрабатывали протеолитическими ферментами: протеаза К в соотношении 1:10 протеолитических ферментов к параспоральным включениям в течение одного часа при 37°C с последующим центрифугированием 13000 x g в течение 5 минут. Полученный супернатант содержал растворенные параспоральные включения.

Культуры опухолевых клеток и условия культивирования

Культуры опухолевых клеток Нер G2 (гепатокарцинома) и MiaPaca-2 (панкреатическая карцинома) выращивались на RPMI и DMEM средах с добавлением 10% FBS в присутствии ампициллина 100 мкг/мл, 37°C, 5% CO₂.

Результаты и их обсуждение

В ходе проведения скрининга цитотоксического действия параспоральных включений, было протестировано 38 образцов, выделенных из спорулирующих штаммов бактерий *B. thuringiensis* (рисунок 1).

Результаты исследования показали, что из 38 штаммов бактерий, у 8 были выявлены параспоральные включения, обладающие канцеролитическими свойствами против опухолевых культур клеток Нер G2 (гепатокарцинома) и MiaPaca-2 (панкреатическая карцинома) (таблица 1).

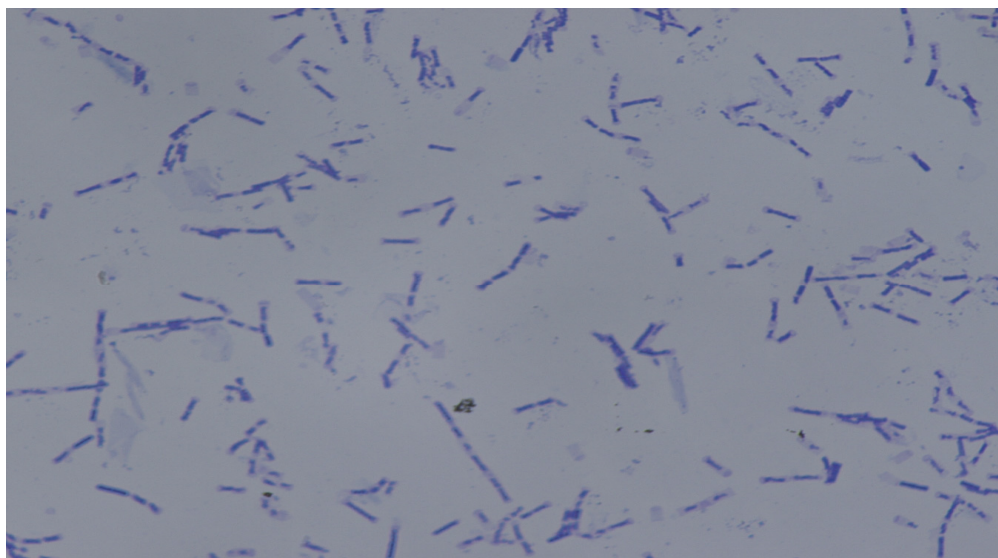


Рисунок 1 – Окраска спорулирующих *B. thuringiensis* с Сгу-белками методом Ожешко (60х).

Таблица 1 – Цитотоксическое действие параспоральных включений на клеточные культуры Hep G2, MiaPaca-2 и MDCK

№	Название штамма	Hep G2	MiaPaca-2	MDCK
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>Sottodendrolimus</i> , serovar H4 INMIA 657	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>thuringiensis</i> , serovar H1 INMIA 745	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>caucasicus</i> , serovar H10 INMIA 837	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>morrisoni</i> , serovar H8 INMIA 920	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>darmstadiensis</i> , serovar H10 INMIA 950	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>alesti</i> , serovar H3 INMIA 1014	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , serovar H14 (B) INMIA 1147	+	+	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , serovar H14 (B) INMIA 1169	+	+	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , serovar H14 (B) INMIA 2511	+	+	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , serovar H14 (B) INMIA 2515	+	+	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , serovar H14 (B) INMIA 2664	+	+	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , serovar H14 (B) INMIA 2680	+	+	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , serovar H14 (B) INMIA 2732	+	+	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , serovar H14 (B) INMIA 2912	+	+	-
	<i>Bacillus sphaericus</i> INMIA 2914	-	-	-
	<i>Bacillus sphaericus</i> INMIA 2728	-	-	-
	<i>Bacillus sphaericus</i> INMIA 2948	-	-	-
	<i>Bacillus sphaericus</i> INMIA 16170	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>tenebrionis</i> INMIA 15343	-	-	+
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>tenebrionis</i> INMIA 15814	-	-	+
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>tenebrionis</i> INMIA 15375	-	-	+
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , serovar H14 INMIA 858	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , serovar H14 INMIA 1151	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <i>israelensis</i> , serovar H14 INMIA 1147	-	-	-

Продолжение таблицы 1

№	Название штамма	Нер G2	MiaPaca-2	MDCK
	<i>Bacillus thuringiensis ssp. israelensis, serovar H14 INMIA 1159</i>	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis ssp. israelensis, serovar H14 INMIA 1165</i>	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis ssp. israelensis, serovar H14 INMIA 2477</i>	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis ssp. israelensis, serovar H14 INMIA 2823</i>	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis ssp. israelensis, serovar H14 INMIA 2848</i>	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis ssp. israelensis, serovar H14 INMIA 2850</i>	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis ssp. israelensis, serovar H14 INMIA 2824</i>	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis ssp. caucasicus, serovar H10 INMIA 844</i>	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis ssp. galerae H5 INMIA 2665</i>	-	-	-
	<i>Bacillus thuringiensis ssp. galerae H5 INMIA 2861</i>	-	-	-
	<i>Brevibacillus laterosporus INMIA 814</i>	-	-	-
	<i>Lysinibacillus sphaericus (Bacillus sphaericus) INMIA 2602</i>	-	-	-
	<i>Lysinibacillus sphaericus (Bacillus sphaericus) INMIA 2606</i>	-	-	-
	<i>Lysinibacillus sphaericus (Bacillus sphaericus) INMIA 2904</i>	-	-	-

Определение токсического эффекта проводилось посредством анализа морфологического изменения клеток под действием параспораль-

ных включений через 12, 24, 48 часов. Результаты морфологических изменений культур опухолевых клеток на рис. 2-3.

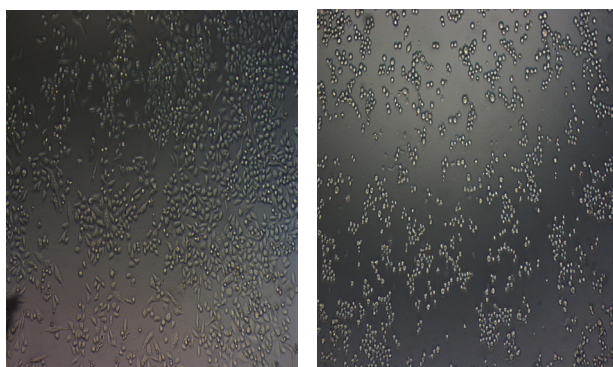


Рисунок 2 – Цитотоксическое действие в отношении Нер G2: Слева – нормальная морфология (клетки вытянутые, равномерно образуют монослой, плотно прилегают к друг-другу). Справа – мертвые клетки (клетки округлились, отсутствие монослойного распределения, значительно уменьшились в размерах, распределены группами) (20x)

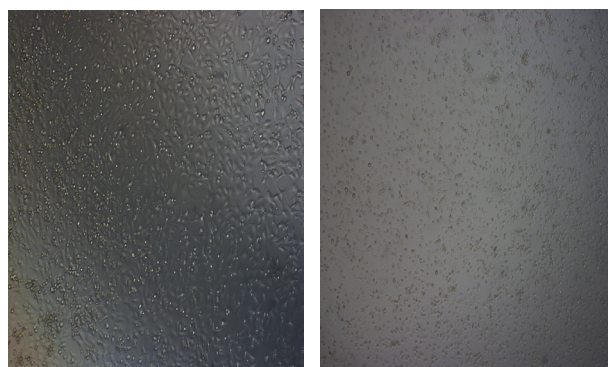


Рисунок 3 – Цитотоксическое действие в отношении Mia Paca-2: Слева – нормальная морфология (клетки вытянутые, равномерно образуют монослой, плотно прилегают к друг-другу). Справа – мертвые клетки (клетки округлились, отсутствие монослойного распределения, значительно уменьшились в размерах, распределены группами) (20x)

Наличие цитотоксического действия в отношении нормальных клеток определялась на клеточной линии MDCK (клетки почек). В ходе эксперимента было определено токсическое действие неканцеролитических параспоральных включений, выделенных из 3 штаммов *Bacillus*

thuringiensis ssp. tenebrionis против клеток MDCK (таблица 1).

Планируется дальнейшее определение активной субстанции и изучение действующего вещества для определения соответствия критериям кандидата в лекарственные средства.

Литература

- 1 Berliner E. Uber de schlaffsucht der Mehlmottenraupe. // Zeischift für das Gesamtstadt. – 1911. – №252. – С. 3160- 3162.
- 2 Lambert B, Peferoen M, Insecticidal promise of Bacillus thuringiensis Facts and mysteries about a successful biopesticide // BioScience. – 1992. – №42. – С. 112-122.
- 3 Angus TA. Association of toxicity with protein-crystalline inclusions of Bacillus sotto Ishiwata Can // J Microbiol. – 1956. – №2. – С. 122-131.
- 4 Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. Bacillus thuringiensis as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. // J Microbiol Biotechnol – 2007. – №17. – С.547-559.
- 5 Ohba M, Mizuki E, Uemori A. Parasporin, a new anticancer protein group from Bacillus thuringiensis. // Anticancer Res. – 2009. –№29. – С. 427-433.
- 6 Mizuki E, Ohba M, Akao T, Yamashita S, Saitoh H, Park YS. Unique activity associated with non-insecticidal Bacillus thuringiensis parasporal inclusions: in vitro cell-killing action on human cancer cells. // J Appl Microbiol. – 1999. – №86. – С. 477-486.
- 7 Mizuki E, Park YS, Saitoh H et al. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of Bacillus thuringiensis // Clin Diagn Lab Immunol. – 2000. – №7. – С. 625-634.
- 8 Ito A, Sasaguri Y, Kitada S et al. A Bacillus thuringiensis crystal protein with selective cytotoxic action to human cells. // J Biol Chem. – 2004. –№279. – С. 21282-21286.
- 9 Brown KL, Whiteley HR. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from Bacillus thuringiensis subsp. Thompsoni. // J Bacteriol. – 1992. – №174. – С. 549- 557.
- 10 Saitoh H, Okumura S, Ishikawa T. Investigation of a novel Bacillus thuringiensis gene encoding a parasporal protein, parasporin-4, that preferentially kills human leukemic T cells. // Biosci Biotechnol Biochem. – 2006. – №70. – С. 2935-2941.
- 11 Nagamatsu Y, Okamura S, Saitou H, Akao T, Mizuki E. Three Cry toxins in two types from Bacillus thuringiensis strain M019 preferentially kill human hepatocyte cancer and uterus cervix cancer cells. // Biosci Biotechnol Biochem. – 2010. –№74. – С. 494-498.
- 12 Okumura S, Akao T, Higuchi K et al. Bacillus thuringiensis serovar shandongiensis strain 89-T-34-22 produces multiple cytotoxic proteins with similar molecular masses against human cancer cells. // Lett Appl Microbiol. – 2004. –№39. – С. 89-92.