

Таблица - Коллекционные штаммы клубеньковых бактерий

Наименование штамма	Растение – хозяин	Количество штаммов	%
Rhizobium leguminosarum	Горох	8	25,8
	Чечевица	4	12,9
	Бобы	2	6,4
	Нут	4	12,9
Итого		18	58,1
Rhizobium phaseoli	Фасоль	7	22,6
Rhizobium meliloti	Люцерна	4	12,9
Rhizobium trifoli	Клевер	2	6,5
Итого		31	100

На все штаммы коллекции оформлены карты WFCC и паспорта. Исследована антагонистическая активность коллекционных штаммов *Bac.subtilis* по отношению к фитопатогенным грибам *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium* (*F.sporotrihiella*, *F.graminearum*, *F.oxisporum*), *Alternaria tenuis*, которая варьирует в широких пределах (1–20 мм). Наибольшей антагонистической активностью обладал штамм *B.subtilis* 149. Этот штамм депонирован в РКМ под номером *Bac. subtilis* В-РКМ 0270. Штамм относится к 4-му классу патогенности (заключение ТОО «Нутритест», Казахская академия питания № 1 – 16/93 от 23.09.2008.). На штамм подана заявка о выдаче инновационного патента. В настоящее время на основе штамма *Bac.subtilis* осуществляется разработка биопрепарата против корневой гнили растений. Для выбора оптимальных условий культивирования продуктивного моноизолята штамма проведены посеы на различные твердые и жидкие питательные среды и инкубирование при соответствующих параметрах. Для наращивания биомассы выбран моноизолят М14 с высокой продуктивностью и фунгицидной активностью к фитопатогенным грибам.

Заклучение

Созданная коллекция включает 160 штаммов, относящихся к трем таксономическим группам микроорганизмов: мицелиальные грибы, клубеньковые бактерии и бациллы. Потенциальной способностью продуцировать биологически активные вещества обладают свыше 90 штаммов, которые могут быть основой при разработке биопрепаратов для инновационного развития Агропромышленного комплекса.

Литература

1. Budapest Treatu on the International Recognition of the Deposit of Purposes of Patent Procudure and Regulations, Word Intellectual Propertu Organization. – Geneva, 1981.
2. Рудаков О.Л. Коллекции культур микроорганизмов в СССР // Микология и фитопатология, 1976
3. Anuai on preservatijn. Freezing and freeze- drying applied to algae, bacteria, fungi and protozoa/Edby НН. Nati-Rocviiic, Marylfnd, 1998.
4. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для вузов /А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. под ред. А.И. Нетрусова – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.

Түйін

Агроөндіріс кешеніне арналған биопрепараттарды жасау үшін арналған Қазақстанның астық тұқымдастардың микроорганизмдер қалыптастыру және дамыту бойынша зерттеу нәтижелері ұсынылған.

Summary

Presents the results of studies on the formation and development of the collection of microorganisms of crops Kazakhstan as a basis for the development of biologics for Agro-industrials complexes.

¹Сабырбек Ж. Б., ¹Тулеханов С.Т., ²Ким Ю.А.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКЗОЦИТОЗА И ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА МЕМБРАН В КЛЕТКАХ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА В УСЛОВИЯХ ГИПОКСИИ

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, *S.zhanna-kz@mail.ru*

²Институт биофизики клетки РАН, г. Пущин, Россия. *Yuk01@rambler.ru*

Опухолевые клетки в условиях недостатка кислорода секретируют вещества, способствующие их адгезии на кровеносных сосудах. Этот процесс ведет к повышению вероятности метастазирования [1]. Кроме того, одной из проблем лечения онкологических заболеваний является устойчивость малигнизированных клеток к действию лекарственных препаратов за счет выброса последних в экстраклеточную среду. Этот процесс осуществляется при участии гликопротеина Р, присутствующего в липидных мембранах опухолевых клеток [2]. Взаимосвязь между физико-химическим составом мембран опухолевых клеток и факторами, способствующими малигнизации нормальных клеток (гипоксия, длительное перевозбуждение) является еще недостаточно исследованной областью. Одним из подходов в этой сфере является изучение механизмов экзоцитоза в контексте условий, способствующих малигнизации клеток. Исследование взаимосвязи механизмов экзоцитоза опухолевых клеток с физико-химическими свойствами клеточных мембран с нашей точки зрения очень актуально, т. к. возможно открывает новые перспективы профилактики и терапии рака.

Клетки асцитной карциномы Эрлиха являются подходящей моделью для такого исследования, что объясняется удобством экспериментирования с клеточной суспензией и относительной простотой культивирования по сравнению с культурой ткани и большинством перевиваемых опухолей [3]. Кроме того, было показано [4], что данный тип клеток обладает развитыми митохондриями, которые, как известно, являются пулами кальция в клетке. Кальций в свою очередь является одним из вторичных мессенджеров, участвующих в запуске регулируемого экзоцитоза. Массированный вход кальция в клетку рассматривается и как одно из наиболее ярких проявлений гипоксии [5,6].

Целью данной работы являлось исследование экзоцитоза и физико-химических свойств мембран клеток асцитной карциномы Эрлиха в условиях гипоксии.

Материалы и методы

Выделение клеток асцитной карциномы Эрлиха

Средами выделения и инкубации клеток являлись HENKS [7] и HEPES (20 мМ) рН 7.2 ($t=2^{\circ}\text{C}$) и 7.4 ($t=37^{\circ}\text{C}$) соответственно. Асцитную опухоль отбирали на 7 день после перевивки мышам и производили промывку клеточной суспензии согласно методике [3].

Флуоресцентные измерения проводили на спектрофлуориметре PERKIN ELMER MPF-44В в кварцевой кювете при температуре 37°C и постоянном перемешивании.

В качестве индукторов экзоцитоза использовали иономицин, компонент 48/80, А23187 и АТФ. Изменение формы и размеров клеток в результате процессов связанных с экзоцитозом регистрировали по изменению интенсивности флуоресценции гидрофобного красителя ТМА-DRH ($\lambda_{\text{ex}}=360$ нм, $\lambda_{\text{em}}=430$ нм) [8], а также по рассеянию света в суспензии клеток под прямым углом на длине волны $\lambda=620$ нм.

В качестве флуоресцентного зонда для регистрации экзоцитоза по изменению концентрации секретируемых продуктов был использован акридиновый оранжевый ($\lambda_{\text{ex}}=490$ нм, $\lambda_{\text{em}}=530$ нм) [9]. Клетки предварительно инкубировали с красителем (2 мкМ) при 37°C в течение 20 минут, затем отмывали средой инкубации 2 раза и удаляли над осадочную жидкость центрифугированием при 900 об/мин. Визуально клеточный ответ на стимуляцию экзоцитоза наблюдали и регистрировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 510 Carl Zeiss Jena GERMANY. Высвобождение АТФ из клеток при стимуляции экзоцитоза регистрировали с помощью люциферин-люциферазного теста [10] на хемилюминометре LKB 1250 Luminometer.

В ходе окислительно–восстановительной реакции субстрат люциферин окислялся кислородом воздуха при участии фермента люциферазы и АТФ, переходя при этом в возбужденное состояние. Переход в основное состояние сопровождался выделением квантов видимого света с длиной волны 562—565 нм. При избытке люциферина и люциферазы интенсивность свечения определялась концентрацией АТФ. В ячейку объемом 400 мкл вносили 100 мкл среды инкубации, 100 мкл клеток (10^9 /мл) и 200 мкл люциферазы. Стимуляцию клеток проводили иономицином 0,16 мМ; АТФ 10^{-6} М и сульфитом натрия 1 мг/мл.

В качестве блокаторов кальциевых каналов были использованы нифедипин и верапамил в концентрации 10 мкМ.

Моделирование гипоксии

Гипоксическими считаются условия, в которых содержание кислорода в среде составляет не более 10% [11,12]. В литературе описано несколько способов создания гипоксических условий [12]. В работе использовали предварительную продувку среды инкубации клеток аргоном (Ar) в течение 1 часа и обработку среды инкубации клеток дитионитом ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) и сульфитом натрия, являющихся, согласно литературным данным, эффективными поглотителями кислорода [13] часто используемыми для создания гипоксии [14]. Вследствие быстрой потери кислород-поглощающего действия при взаимодействии с водой, растворы дитионита и сульфита натрия (40 мг/мл) готовили непосредственно перед введением аликвоты в рабочую кювету.

Для создания гипоксических условий применяли 2 способа – удаление кислорода из среды инкубации клеток посредством прокачивания аргона в течение часа и использование химических поглотителей кислорода – сульфита и дитионита натрия. Содержание кислорода в среде инкубации и кинетику удаления кислорода из раствора при помощи химических поглотителей измеряли с помощью кислородного электрода. Характер ответа кислородного электрода при введении аликвоты поглотителя существенно отличался для сульфита и дитионита натрия. Удаление кислорода из среды инкубации при вводе сульфита натрия происходило не мгновенно, как в случае с дитионитом натрия, а в течение нескольких минут. Для работы нами использовались насыщающие концентрации поглотителей, определенные по калибровочным зависимостям – 20 и 0,4 мг/мл для сульфита и дитионита натрия соответственно. Количество удаленного из среды инкубации кислорода при прокачивании аргона в течение часа было эквивалентно введению в среду инкубации аликвоты сульфита натрия с концентрацией 6,6 мг/мл (рассчитано по калибровочной зависимости). С методической точки зрения использование химических поглотителей кислорода представлялось нам более удобным, поскольку не требовало значительных временных затрат. Однако, введение этих веществ в среду инкубации, возможно, оказывает модифицирующее действие на мембраны клеток. В этом случае продувка Ar может выступать в качестве метода сравнения в экспериментах с закрытой ячейкой.

Тонкослойная хроматография

К образцам клеток АКЭ добавляли по 20 мкл 10% ЭДТА и 30% метабисульфита натрия и встряхивали 50 раз. Затем образцы центрифугировали на холоду при 1500 об/мин. Удаляли над осадочную жидкость и к осадку добавляли аликвоту изопропанола объемом 2 мл и многократно встряхивали. Изопропанольный экстракт отделяли от осадка центрифугированием при 1500 об/мин. К осадку повторно добавляли 2 мл изопропанола и повторяли вышеописанную процедуру. К полученному супернатанту добавляли ЭДТА, метабисульфит и сульфат натрия для удаления оставшейся воды. Полученные образцы высушивали. Состав фосфолипидов определяли методом двумерной хроматографии в тонком слое. Разделение липидов проводили в следующих системах растворителей:

- 1) хлороформ – гексан 75:25 (по объему);
- 2) хлороформ – метанол – метилацетат - вода – 53: 34:9:4 (по объему);
- 3) хлороформ – гексан 75:25 (по объему);
- 4) четыреххлористый углерод.

Высушенные пластины выдерживали в концентрированной соляной кислоте в течение 40 минут, а затем в термостате при 70⁰С в течение часа. Окрашивание производили йодом. Обработку пластин производили с помощью программы «ТСХ-менеджер». Статистическую обработку данных проводили по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение

При введении аликвоты химических поглотителей в суспензию клеток наблюдали различия в изменении интенсивности флуоресценции ТМА-DPH в случае сульфита натрия и отсутствие ответа клеток на дитионит натрия (рис. 1)

Такие различия могут быть обусловлены разными механизмами действия данных веществ на исследуемый объект.

Было обнаружено, что дитионит натрия одновременно с кислород-поглощающим действием обладает способностью индуцировать окислительный стресс клеток, способствуя образованию супероксидных радикалов и перекиси водорода [15], а, следовательно, воздействует на клеточные мембраны, повреждая их. Поэтому при изучения механизма экзоцитоза в клетках АКЭ в условиях гипоксии этот поглотитель кислорода нами не использовался.

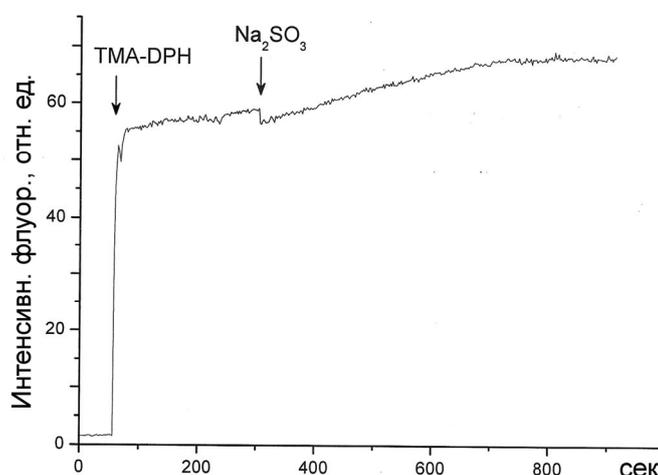


Рисунок 1 - Изменение флуоресценции ТМА-DPH (0,2 мкМ) при введении сульфита натрия (20 мг/мл) в суспензию клеток с красителем (указано стрелками). Концентрация клеток 10⁷ / мл, $\lambda_{\text{возб}}=350$ нм $\lambda_{\text{фл}}=428$ нм

Сульфит натрия, согласно литературным данным, в концентрации 0.01–10 мМ вызывает тирозиновое фосфорилирование и активацию эпителиальных клеток легкого A549, а также является агонистом нейтрофилов [16]. Нами не было найдено данных о воздействии этого вещества на клеточные мембраны.

При помощи люциферин-люциферазного теста было выявлено, что при взаимодействии сульфита натрия с суспензией клеток происходит высвобождение АТФ (рис. 2). Удаление экстраклеточного Ca²⁺ посредством введения в среду инкубации 1 мМ ЭГТА приводило к падению ответа на сульфит натрия в несколько раз (рис. 3). Такое уменьшение ответа свидетельствует о том, что сульфит натрия вызывает секрецию, запуская Ca²⁺-зависимый экзоцитоз за счет входа экстраклеточного Ca²⁺. В пользу этого предположения также свидетельствуют данные о том, что секреторный ответ на химический поглотитель кислорода значительно уменьшался в присутствии блокаторов Ca²⁺-каналов L-типа – нифедипина и верапамила (10 мМ).

Введение сульфита натрия в среду инкубации клеток не сопровождалось ростом концентрации K⁺ в экстраклеточной среде, что наблюдалось при стимуляции клеток АТФ.

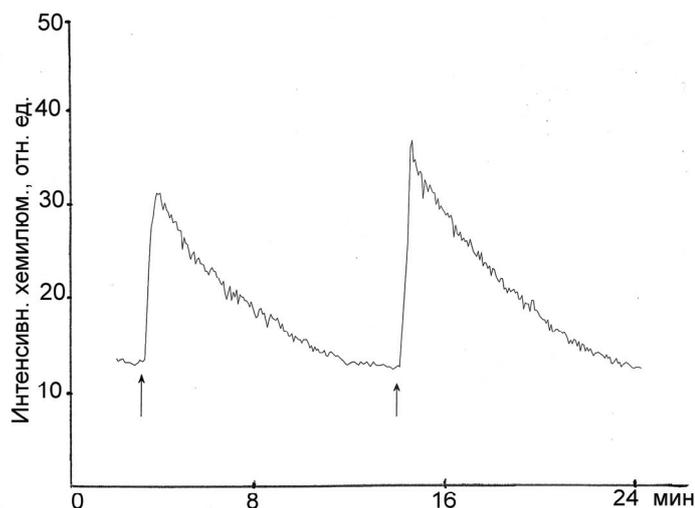


Рисунок 2 - Изменение интенсивности хемилюминисценции в суспензии клеток, наблюдаемое при добавлении сульфита натрия (20 мг/мл, указано стрелками). Концентрация клеток - 10^8 /мл

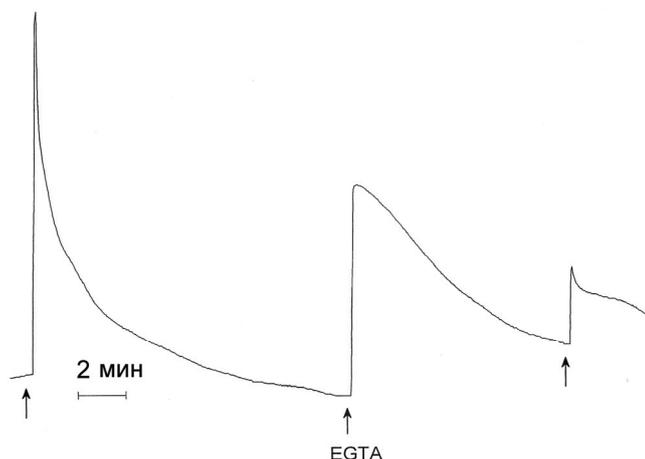


Рисунок 3 - Изменение интенсивности хемилюминисценции в суспензии клеток АКЭ (10^8 /мл), индуцированное сульфитом натрия 20 мг/мл (указано стрелками) до и после введения ЭГТА (1 мМ)

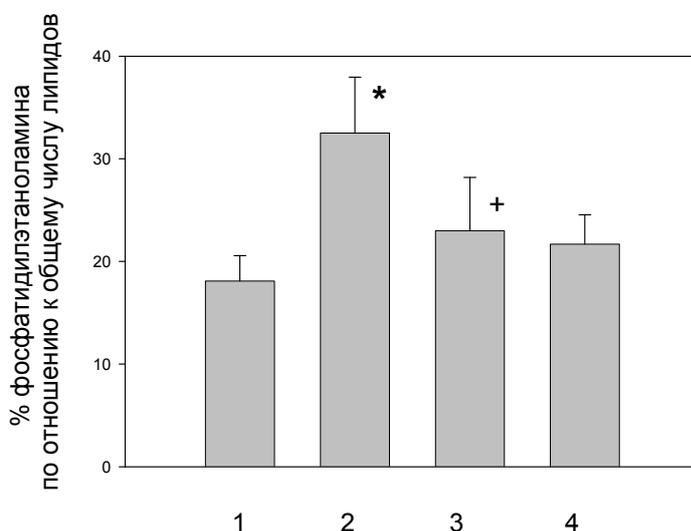
Существует несколько возможных объяснений полученного результата. Так, известно, что АТФ и специфичный ионофор А23187 вызывают высвобождение разных количеств ионов калия из клетки [17], поэтому одной из причин полученного результата может быть недостаточная чувствительность электрода при детекции малых изменений концентрации иона. Другая возможная причина данного результата - малая скорость увеличения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . В этом случае уровень Ca^{2+} в цитоплазме может быть недостаточным для активации K^+ каналов. Отсутствие выхода ионов калия в ответ на увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} может быть также связано с зависимостью калиевых каналов, задействованных в этом процессе, от концентрации кислорода в среде инкубации клеток.

Из полученных данных, однако, не было ясно, выступает ли сульфит натрия в качестве агониста какого-либо рецептора или повреждающим образом действует на мембрану клетки, что и приводит к запуску процесса входа кальция. Для ответа на этот вопрос был проанализирован общий липидный состав мембран клеток через 0, 3, 7 и 10 минут после введения в суспензию клеток сульфита натрия в концентрации 20 мг/мл, использовавшейся нами ранее при индуцировании экзоцитоза.

Наиболее выраженные изменения в концентрации липидов было выявлено в случае фосфатидиэтаноламина. Было получено, что в течение первых 3-х минут после обработки

образца сульфитом натрия происходит достоверное ($P < 0,05$) повышение уровня фосфатидилэтаноламина, которое затем сопровождается падением его концентрации практически до исходного уровня в течение последующих 7 минут (рис. 4).

Предположительно, подобное резкое увеличение содержания фосфатидилэтаноламина в мембранах клетки в течение 3-х минут после обработки обусловлено действием поглотителя кислорода. Согласно данным хемилюминесцентного анализа (рис.2,3), время ответа клеток на введение сульфита натрия также составляет около 3 минут. Как мы уже отмечали, из полученных данных трудно заключить, выступает ли сульфит натрия в качестве агониста какого-либо рецептора или повреждающим образом действует на мембрану клетки, приводя к запуску процесса входа кальция. Можно сделать предположение, что выброс АТФ, инициированный сульфитом, становится источником энергии, необходимой для синтеза фосфатидилэтаноламина, в том числе путем АТФ-зависимого ацилирования лизофосфатидилэтаноламина. Возможно, также образование фосфатидилэтаноламина путем декарбоксилирования фосфатидилсерина. Последний процесс не нуждается в энергии. Интересно, что в ходе роста опухоли асцитной карциномы Эрлиха происходит 2-3 кратное увеличение концентрации фосфатидилэтаноламина в течении суток [18].



Время пробоотбора после введения химического поглотителя кислорода
 1 - 0 минут (контроль)
 2 - 3 минуты
 3 - 7 минут
 4 - 10 минут

* - Достоверное отличие выборок 1-2, $P=0,029$

+ - Достоверное отличие выборок 2-3, $P=0,02$

Рисунок 4 - Изменение концентрации фосфатидилэтаноламина по отношению к общему количеству липидов при обработке клеток сульфитом натрия

Для полного понимания изменений в метаболизме липидов, происходящих в клетке в присутствии этого поглотителя кислорода, необходимы дальнейшие более детальные исследования.

Литература

1. Koike T., Kimura N., Miyazaki K., et al. (2004). Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates//Proc Nat Acad Sci U S A, 25;101(21):8132-8137
2. Breuninger LM, Paul S, Caughan K, Miki T, Chan A, Aaronson SA, Kruh CD (). Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution // Cancer Research. – 1995. - №55. – P. 5342-5347.

3. Инжеваткин Е.И. Практикум по экспериментальной онкологии на примере клеток асцитной карциномы Эрлиха. – Красноярск, 2004.
4. Митюшин В.М. Ультраструктура раковой клетки на примере клеток асцитной карциномы Эрлиха. - М., 1964.
5. Carini R, de Cesaris MG, Bellomo G, Albano E. Role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in preventing Na⁺ overload and hepatocyte injury: opposite effects of extracellular and intracellular Ca²⁺ chelation//Biochem Biophys Res Commun. – 1997. - № 232(1). P. 107-110.
6. Carini R., Bellomo G., Grazia De Cesaris M., Albano E. Glycine protects against hepatocyte killing by KCN or hypoxia by preventing intracellular Na⁺ overload in the rat // Hepatology. – 1997. - № 26(1). – P. 107-112.
7. Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К./Справочник биохимика. - М., 1991.
8. Johan W.M., Heemskerk, Marion A.H. Feijge et all. // Function of intracellular [Ca²⁺]_i in exocytosis and transbilayer movement in human platelets surface-labeled with the fluorescent probe 1-(4-trimethylammonio)phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene// Biochimica et Biophysica Acta. -1993. - № 1147. – P. 194-204.
9. Zoccarto F., Cavalli L., Alexandre. The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes// J. Neurochem. – 1999. - № 72. – P. - 625-633.
10. Ладыгина М.Е., Рубин А.Б. Биофизические методы в физиологии растений. - М.: Издательство «Наука», 1971.
11. Green K.N., Boyle J.P., Peers C. Hypoxia potentiates exocytosis and Ca²⁺ channels in PC12 cells via increased amyloid β peptide formation and reactive oxygen species generation // Journal of Physiology. - 2002. - № 541(3). – P. 1013-1023.
12. Sausen K.P., Bower E.A., Stiney M.E., et all. Effects of intermittent hypoxia training on the electroencephalogram complexity and saturation of blood oxygen of high performance fighter pilots//Aviat Space Environ. Med. – 2003. - № 74(11). – P. 1190-1197.
13. Gebhardt C., Heinemann U. Anoxic decrease in potassium outward currents of hippocampal cultured neurons in absence and presence of dithionite//Brain Res. – 1999. - №7; 837(1-2). - P. 270-276.
- Carpenter E., Hatton C.J., Peers C. Effects of hypoxia and dithionite on catecholamine release from isolated type I cells of the rat carotid body//J. Physiol. – 2000. - №15;523 (3). – P. 719-729.
14. Archer S.L., Hampl V., Nelson D.P. et all. Dithionite Increases Radical Formation and Decreases Vasoconstriction in the Lung // Circ Res. – 1995. - № 77 (1). – P. 174 – 181.
15. Pelletier M., Lavastre V., Girard D. Activation of Human Epithelial Lung A549 Cells by the Pollutant Sodium Sulfite: Enhancement of Neutrophil Adhesion //Toxicological Sciences. - 2002. № 69. – P. 210-216.
16. Abdrasilov B.S., Kim Yu.A., Nurieva R.I., et all. The effect of total saponins from Panax Ginseng C.A. Meyer on the intracellular signaling system in Ehrlich ascites tumor cells//Biochemistry and Molecular Biology International. – 1996. - №38 (3). – P. 519-526.
17. Пальмина Н.П., Мальцева Е.Л. Состав фосфолипидов ядер клеток печени и опухоли в процессе роста асцитной карциномы Эрлиха и при облучении животных-опухоленосителей // Биохимия. – 1982. № 47 (1). – P. 115-125.

Түйін

Асцитті карциномды Эрлих жасушасының тіршілік етуіне перфтордекалиннің гипоксия жағдайындағы әсері зерттелді. Перфтордекалиннің гипоксия және гиперкалий ортасы жағдайында болуы жасушалардың тіршілік етуінің процентін арттырған. Гиперкалий ортасы лизофосфолипидтер құрамының артуын және перфтордекалин үлгілеріндегі осфатидилэтаноламиннің құрамының азаюын туындатады.

Summary

This investigation deals with the perftordecalin influence to the Ehrlich's ascites tumor cells viability under the hypoxia. It was found that the cell survival fraction was increased in the perftordecalin presence in the hypoxia and hyperpotassium combination conditions. The hyperpotassium nutrient caused the enhancement of lysophospholipids content at the cells. And at the samples that the perftordecalin contained the phosphatydyethanolamine level was decreased.

Савицкая И.С.

ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СОРБИРОВАННЫХ ПРОБИОТИКОВ КАК БИОКОРРЕКТОРОВ МИКРОЭКОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ

Кафедра микробиологии КазНУ им. аль-Фараби

Нарушения биологического равновесия нормофлоры кишечника, встречающиеся практически у каждого в определенный жизненный период, обуславливают интенсивное развитие пробиотической микробиологии и биотехнологии. К настоящему времени в этой отрасли наметились две основные проблемы, решение которых будет способствовать