

Введение Известно, что основными токсическими компонентами *B. thuringiensis* являются белковые дельта-эндотоксины [1,2]. Многочисленные подвиды *B. thuringiensis* продуцируют дельта-эндотоксины, гомологичные по составу, но различные по специфичности действия на насекомых. Так, синтез дельта-эндотоксинов генетически детерминирован [3] и токсины *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* являются продуктами генов *Cry1Ia10* и *Cry1Ba1* и патогенны для чешуекрылых [4]. Дельта-эндотоксины организованы в виде параспоральных кристаллов. Показано, что эндотоксины формируют в мембране ион-специфические поры, нарушают ионный транспорт через мембрану [5]. В последние годы значительный интерес в мировой науке уделяется спорообразующей кристаллофорной бактерии *Bacillus thuringiensis*, поражающей многие виды насекомых и используемой при получении инсектицидных препаратов для защиты растений. До недавнего времени *B. thuringiensis* рассматривали исключительно как энтомопатогенный микроорганизм. Однако в последние годы установлено, что помимо инсектицидного действия он проявляет цитотоксическую активность в отношении некоторых бактерий, фитопатогенных грибов и раковых клеток [1]. Известно, что *B. thuringiensis* продуцирует дельта-эндотоксин с молекулярной массой от 60 до 150 кДа, при этом наиболее представлены полипептиды около 70-90 кДа, до которых диссоциируют кристаллы в слабощелочной среде кишечника насекомого в присутствии специфических протеиназ (в том числе протеолитических ферментов бактерии-продуцента). Именно данные токсические компоненты обуславливают комплекс патологических проявлений, возникающих под его воздействием в различных клеточных культурах. Установлено, что строение и химические свойства токсинов, продуцируемых разными подвидами бактерии, имеют значительное сходство [2]. Токсины способны оказывать цитостатическое воздействие на мембраны клеток кишечного эпителия восприимчивых насекомых. Показано так же, что дельта-эндотоксин способен связываться с чувствительными рецепторами на цитоплазматических мембранах клеток кишечного эпителия насекомых, а затем проникать в них, формируя каналы-поры, приводящие к нарушению активного транспорта ионов через мембрану [3, 4]. Под влиянием дельта-эндотоксинов отмечали также активирование АТФаз клеток насекомых, уплотнение митохондриального матрикса, разрушение ядерного хроматина и, наконец, лизис клеток. Считают, что перечисленные нарушения метаболизма и последующий лизис клеток-мишеней могут являться следствием протонотропной активности белкового токсина [5]. Имеются данные, показывающие, что первичным действием дельта-эндотоксина является разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания в митохондриях чувствительных к нему клеток, обусловленное его протонотропными свойствами. Способность разобщать при этом не зависит от источника происхождения токсина (в пределах патотипа), но прямо пропорциональна его концентрации

[6]. Однако имеющиеся в литературе данные касаются только механизма действия дельта-эндотоксина на клетки насекомых. В доступной литературе имеется очень мало сведений, освещающих механизм действия дельта-эндотоксина на раковые клетки. Вместе с тем есть основания полагать, что оба механизма имеют общие черты. Целью настоящей работы являлось изучение действия дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* var. sotto 617 на активный транспорт ионов в клетках культуры HeLa (рака шейки матки человека). Материалы и методы исследования в работе использовали штамм 617 подвида *B. thuringiensis* subsp. sotto, полученный из ФГУП ГосНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Данный подвид продуцирует дельта-эндотоксин, токсичный для чешуекрылых (патотип А) и кодируемый генами Cry I - класса [7]. Поверхностное культивирование осуществляли в термостатах при 27°C в чашках Петри на агаризованной питательной среде РПА, pH = 7,2–7,5. Биомассу *B. thuringiensis*, содержащую кристаллы эндотоксинов и споры продуцента, отмывали дистиллированной водой от компонентов питательной среды и водорастворимых токсинов. Кристаллы предварительно выделяли в чистом виде, используя двухфазную систему: 1% водный раствор сульфата натрия – четыреххлористый углерод [8]. При этом кристаллы переходили в водную фазу, из которой их осаждали центрифугированием. Щелочную экстракцию дельта-эндотоксина выполняли по методу Кукси [9]. Затем раствор подвергали диализу и доводили водой до необходимой концентрации. pH раствора снижали до 7,8 осторожным титрованием 0,1 н. HCl. Разделение токсичных полипептидов проводили методом хроматографии на колонке Lephadex-G-200 размером 2,54´10 см. Поскольку компоненты низкомолекулярных фракций могут являться гидролизатами кристаллов, продуцирующих низкомолекулярные эндотоксины, для проведения экспериментов их исключали, подвергая исходные щелочные гидролизаты разделению методом колоночной хроматографии и собирая только фракции с Mr выше 60 кДа. Их масса составляла не менее 90% от общей массы белка. Соответствие полученных экстрактов эндотоксинам подтверждали электрофоретически с использованием следующих маркерных белков: бычий сывороточный иммуноглобулин G (Mr 150 кДа), трансферрин (Mr 80-90 кДа), альбумин (Mr 67 кДа), цитохром с (Mr 13,37 кДа). Очистку дельта-эндотоксинов завершали микрофильтрацией через бактериальные фильтры (диаметр пор 0,4 мкм), которая являлась одновременно и стерилизацией. В экспериментах использовали свежеприготовленные растворы дельта-эндотоксина [10]. Уровень белка определяли по методике Лоури [11]. Культуру перевиваемой линии клеток HeLa (рак шейки матки женщины) выращивали на питательной среде Грейса с добавлением телячьей сыворотки при pH=7.2. Титр культуры составлял 1 млн клеток на 1 мл суспензии [12]. Определение концентрации ионов проводили следующим образом. Для изучения действия дельта-эндотоксина на уровни концентрации ионов 0,1 мл клеточной

суспензии инкубировали в течение различных промежутков времени с раствором эндотоксина и отделяли центрифугированием в течение 5 мин при 5000 об/мин. Затем клетки растворяли в концентрированной HNO<sub>3</sub>. Концентрацию ионов K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup> измеряли с помощью атомно-адсорбционного спектрофотометра марки С-115 или Perkin-Elmer-360, Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в буфере 0,5% Cs<sub>2</sub>Cl<sup>+</sup>, а Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup> – 0,5% LnCl<sub>2</sub>. Натрий, калий и кальций определяли в режиме эмиссии, магний — в режиме абсорбции. Результаты выражали в мкмоль/л [13]. Активность Mg<sup>2+</sup>-зависимой АТФазы устанавливали по выделению неорганического фосфата (Фн) из АТФ в результате реакции ферментативного гидролиза [14]. Реакционная смесь содержала в конечном объеме 2 мл (в мМ): 5 MgCl<sub>2</sub>; 20 KCl; 100 NaCl; 5 АТФNa<sub>2</sub>; 40 трис-HCl, рН 7,4 и препарат клеток, содержащий 0,2-0,3 мг белка. Препарат фермента получали в результате размораживания клеток и последующей их гомогенизации. При изучении действия дельта-эндотоксина на АТФазу *in vitro* в реакционную смесь добавляли необходимое в опыте количество раствора токсина. В качестве контроля использовали смесь, содержащую все компоненты кроме препарата фермента, или содержащую его, но в этом случае трихлоруксусную кислоту приливали до введения в смесь ферментного препарата. После 20 мин инкубации при 37°С реакцию прекращали, приливая холодную трихлоруксусную кислоту до конечной концентрации 5%. Для определения содержания неорганического фосфата к исследуемому раствору приливали дистиллированную воду до 3,6 мл, добавляли 0,5 мл 6,6%-ного раствора молибдата аммония, 0,5 мл 7,5 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 0,4 мл раствора сульфата железа (II). Раствор сульфата железа готовят, растворяя 1г FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O в 10 мл H<sub>2</sub>O, затем добавляют 0,2 мл 7,5 н раствора H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. После добавления указанного раствора пробы перемешивали, оставляли при комнатной температуре на 40 мин. Концентрацию Фн регистрировали на спектрофотометре марки СФ-26 ЛОМО отечественного производства в кюветах кварцевого стекла с толщиной слоя 1 см при 625 нм по изменению интенсивности окраски раствора, вызванной образованием фосфорномолибденового комплекса. Делали поправку на спонтанный гидролиз АТФ и концентрацию начально присутствовавшего в растворе Фн. Активность фермента выражали в мг неорганического фосфата, выделившегося в течение 1 ч при действии на АТФ ферментного препарата, содержащего 1 мг белка (мг Фн·мг<sup>-1</sup> белка·ч<sup>-1</sup>). Количество неорганического фосфата определяли по калибровочному графику. Каждое определение проводили не менее, чем в трех повторностях. Содержание белка устанавливали по методу Лоури, как описано ниже. Во всех случаях оценивали достоверность полученных различий признаков в опыте по сравнению с контролем или пар признаков с использованием соответствующих алгоритмов. В лабораторных исследованиях использовали критерий достоверности Стьюдента [15]. Влияние хлорированных фуранонов на жизнеспособность бацилл Для разрешения

получения более полной картины действия дельта-эндотоксина на систему ионного транспорта через цитоплазматическую мембрану, было проведено измерение уровней концентрации ионов в различные моменты времени после начала действия токсина. Данные, представленные в таблицах 1 и 2, показывают, что, начиная с 15 минут после добавления токсина, значительно изменялась концентрация всех определяемых ионов в клетках HeLa. Наибольшие отклонения от нормы наблюдали в концентрации ионов Na<sup>+</sup>, причем степень повышения уровня зависела от количества добавляемого токсина. Максимальное увеличение составляло 203% через 30 мин для 100 мкг/мл токсина и 182% через 1 ч для 50 мкг/мл. Существенно снижалась концентрация ионов K<sup>+</sup>, достигая 61% от исходного значения через 30 мин для 100 мкг/мл и 60% через 1 ч для 50 мкг/мл. Для Mg<sup>2+</sup> отмечено снижение до 78% через 30 мин для 100 мкг/мл и 71% через 1 ч для 50 мкг/мл, соответственно. Концентрация ионов Ca<sup>2+</sup>, наоборот, повышалась через тот же период времени до 130 и 136%, соответственно. Наблюдения с помощью светового микроскопа показали, что в этот период (от 15 мин и далее) происходит нарастание процесса вакуолизации клеток, связанной с нарушением транспорта ионов через цитоплазматическую мембрану. Нарушение транспорта ионов, и в первую очередь нерегулируемый приток в клетки Na<sup>+</sup>, приводит к увеличению скорости пассивного транспорта воды в нее, что и является непосредственной причиной вакуолизации. Получены достоверные данные, показывающие значительное изменение концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>. Поддержание постоянства концентрации этих ионов чрезвычайно важно из-за высокой их биологической активности. Оба эти иона присутствуют в клетке не в свободном виде, а находятся в комплексе с другими веществами. Ca<sup>2+</sup>, вероятнее всего, связан с цитратом [16], а Mg<sup>2+</sup> с АТФ. Ca<sup>2+</sup> в основном находится в органеллах - митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, кальцисомах, а не в цитозоле.

Таблица 1 - Влияние дельта-эндотоксина (50 мкг/мл) на концентрацию ионов в клетках HeLa

Время после обработки, мин	Концентрация ионов (мкмоль x10 <sup>5</sup> клеток)	K <sup>+</sup> %	Na <sup>+</sup> %	Ca <sup>2+</sup> %	Mg <sup>2+</sup> %
исходная	127,7 ± 4,9	100	32,8±3,2	100	14,1±1,2
10	128,3 ± 3,9	101	35,8±2,1	109	13,7±1,7
15	104,7 ± 12,6	82	41,7±4,8	127	16,2±1,3
30	99,7 ± 4,6***	78	50,2±3,6***	153	17,3±1,0*
60	76,6 ± 10,4***	60	59,7±5,2***	182	19,2±0,9**
120	53,1±4,1***	41	76,6 ± 10,4***	162	18,4±1,1*

Примечание: \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001 при n = 20 (n - число пар измерений). Результаты, представленные в таблице 3, показывают значительное активирование K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> - АТФазы культур клеток HeLa. Активирование начиналось уже через 1 мин после добавления токсина и составляло 59%. Максимальных значений активность фермента достигала через 15 мин и составляла и 213%. Полученные данные показывают, что изменение активности

фермента предшествует изменению концентраций ионов в клетках и, следовательно, является первичным по отношению к ним. Такой эффект характерен для действия веществ, разобщающих процессы дыхания и окислительного фосфорилирования. Таблица 2 – Влияние дельта-эндотоксина (100 мкг/мл) на концентрацию ионов в клетках культуры HeLa

Время после обработки, мин	Концентрация ионов (мкмоль x10 <sup>5</sup> клеток)	K <sup>+</sup> %	Na <sup>+</sup> %	Ca <sup>2+</sup> %	Mg <sup>2+</sup> %
исходная	127,6±4,9	100	32,8±3,2	100	14,1±1,2
100	25,7±2,6	100	5	128,2±5,2	101
31,5±1,6	96	13,6±2,0	96	28,4±4,1	111
10	123,8±6,3	97	33,2±3,8	101	14,5±1,9
103	26,3±2,5	102	15	89,3±4,8***	70
59,7±4,0***	165	17,6±0,9**	125	24,2±2,8	94
30	77,8±5,2***	61	77,5±2,4***	203	18,3±1,3***
130	20,0±2,1***	78			

Примечание: \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001 при n = 20 (n - число пар измерений) Известно, что K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> - АТФазы ответственны за активный перенос ионов через цитоплазматическую мембрану и мембраны внутриклеточных структур [17, 18]. В описанных выше экспериментах показано, что наряду с изменением концентрации неорганических катионов в клетках, происходит существенное активирование Mg<sup>2+</sup> -зависимой K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-АТФазы, локализованной в различных мембранных структурах клетки, включая цитоплазматическую мембрану. Активирование фермента происходило раньше (1 мин), чем изменение концентрации неорганических катионов (15 мин). К моменту начала изменения концентрации ионов активность фермента достигала существенного значения (638% от исходного в клетках HeLa). Такое существенное увеличение активности фермента противоречит концепции прямого нарушения концентрации ионов за счет их пассивного транспорта по градиенту концентрации через образованные токсином водные поры. В этом случае следовало бы ожидать угнетение ферментативной активности из-за нарушения активного транспорта. Поскольку активность фермента характеризовала его способность к гидролизу субстрата (АТФ), и известно, что эта способность резко повышается в условиях разобщения окислительного фосфорилирования и дыхания, активирование данной ферментной системы фактически отражает степень деэнергизации клетки. Следствием деэнергизации является связанная с нарушением ионного транспорта и притоком в клетку воды вакуолизация, приводящая в конечном итоге к разрушению клетки. Таблица 3 – Влияние дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* (50 мкг/мл) на Mg<sup>2+</sup>-зависимую K<sup>+</sup>,Na<sup>+</sup> - АТФазу в клетках культуры HeLa

Время после обработки, мин	HeLa A (мг Рн x 10 <sup>5</sup> белка % от исходной А	исходная	0,058±0,007	100	1	0,085±0,013	147	5
0,285±0,018***	491	10	0,305±0,019***	526	15	0,370±0,032***	638	30
0,355±0,026***	612	6	0,299±0,028***	516	120	0,250±0,048***	431	

Примечание: \* – p ≤ 0,05; \*\* – p ≤ 0,01; \*\*\* – p ≤ 0,001 при n = 20 (n - число пар измерений). Для того чтобы выяснить, не является ли способность к гидролизу АТФ свойством самого дельта-эндотоксина, были проведены опыты по изучению его действия на этот субстрат в условиях, в которых обычно проводили ферментативную

реакцию, но в отсутствие фермента. Было обнаружено, что эндотоксин не способен катализировать гидролиз АТФ с высвобождением фосфата. Исследование же дельта-эндотоксина в отсутствие, как фермента, так и субстрата (АТФ) показало, что он не может являться поставщиком свободного (неорганического) фосфата в реакционную среду. Транспортные АТФазы выполняют две сопряженные функции: транспорт ионов и гидролиз АТФ, энергетически обеспечивающий транспорт. Согласно современным представлениям [19] процесс осуществляется согласно следующей схеме: где E - транспортная АТФаза, E1 ~ Ф и E2 ~ Ф - ее активированные фосфатом переходные комплексы. Как видно из схемы, торможение транспортной функции приводит к накоплению промежуточных продуктов реакции: АДФ и Фн (стадия (1)), что и регистрируется в наших экспериментах, как усиление гидролитической активности АТФазы. Повышение концентрации ионов Na<sup>+</sup> в клетке приводит к задержке в ней воды, которая вызывает значительную вакуолизацию. Положение усугубляется тем, что нарушение активного транспорта ионов приводит к нарушению зависимого от первого вторичного активного транспорта сахаров и аминокислот, согласно приведенной схеме. В результате происходит "набухание" клеток, цитоплазматические мембраны лопаются, клетки разрушаются. Для транспортных АТФаз очень характерны антипортные системы, в которых транспорт моновалентного иона в одну сторону сопровождается не транспортом другого иона металла в противоположную, а переносом протона [20].