

Введение Спорообразующая кристаллофорная бактерия *Bacillus thuringiensis*, поражающая многие виды насекомых, используется 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, который обуславливает комплекс патологических проявлений, возникающих под его воздействием в различных клеточных культурах. Установлено, что строение и химические свойства токсинов разного происхождения имеют значительное сходство [2]. 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]. Однако известно, что такие каналы обладают сродством к самим токсичным полипептидам или их фрагментам в 20-30 раз более высоким, чем к электролитам [4]. 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 [5]. В доступной литературе имеется очень мало сведений, касающихся механизма действия дельта-эндотоксина на раковые клетки. Вместе с тем есть основания полагать, что механизмы действия на клетки насекомых и раковые клетки имеют общие черты. Целью настоящей работы являлось изучение действия дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* var. *sotto* 617 на дыхательную активность и синтез АТФ (окислительное фосфорилирование) в клетках культуры HeLa (рака шейки матки человека). Постановка задачи В работе использовали штамм 617 подвида *B. thuringiensis* subsp. *sotto*, полученный из ФГУП ГосНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов. Данный подвида продуцирует дельта-эндотоксин, токсичный для чешуекрылых (патотип А) и кодируемый генами Cry I класса [6]. 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 [7]. При этом кристаллы переходили в водную фазу, из которой их осаждали центрифугированием. Щелочную экстракцию дельта-

эндотоксина выполняли по методу Кукси [8]. 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 [9]. Уровень белка определяли по методике Лоури [10]. 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 [11]. Для определения скорости фосфорилирования (образования АТФ) устанавливали снижение количества неорганического фосфата в инкубационной среде. Для этого через определенные промежутки времени, равные тем, через которые регистрировали интенсивность дыхания, к инкубационной среде состава, описанного выше, добавляли 1 мл 10% ТХУ [12]. Концентрацию Рн 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 АТР и концентрацию начально присутствовавшего в растворе Рн. Поглощение кислорода изучали микроманометрическим методом в аппарате Баркрофта по изменению давления газа в замкнутом пространстве [13]. Среда для изучения интенсивности дыхания содержала в конечном объеме 3 мл: 1 мл суспензии клеток; 0,1 мл раствора гексокиназы (20 Е/мл) в 2% глюкозе; 0,1 мл 1 М глюкозы и 0,1 мл раствора, содержащего 0,3 мМ MgCl₂; 0,3 мМ ЭДТА; 1 мМ сукцината; 10 мкМ Na-ортофосфат-HCl-буфера, pH 7,4 [14]. Выражали в процентах от нормального уровня. Контролем служила суспензия клеток без добавления токсина. 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].

Результаты и обсуждение Известно, что для веществ, проявляющих способность

разобщать процессы клеточного дыхания и окислительного синтеза АТФ, характерно начальное (в первые минуты действия разобщителя) стимулирование дыхания наряду со снижением интенсивности синтеза АТФ с последующим угнетением обеих функций [16]. Нами было выполнено изучение влияния дельта-эндотоксина на дыхание и окислительное фосфорилирование в клетках чувствительной к дельта-эндотоксину культуры HeLa. Для установления факта начального стимулирования дыхания было предпринято измерение параметров в период между 1 и 5 мин инкубации. Результаты представлены на рисунке 1. Полученные данные демонстрируют, что из использованных концентраций дельта-эндотоксина максимальное стимулирование поглощения кислорода клетками в течение первой минуты действия отмечено для 150 и 100 мкг/мл. Концентрация 150 мкг/мл вызывала стимулирование на 74% через. Далее в течение 5 мин следовало быстрое снижение дыхательной активности до величины ниже контрольной (67%). При концентрации токсина 100 мкг/мл начальное стимулирование дыхания на 51% далее снижалось, достигая к 5 мин 38%. Очевидно, что при концентрациях, превышающих 150 мкг/мл, поглощение O₂ усиливается в периоды времени намного меньше 1 мин и не может быть зарегистрировано с использованием имеющейся в распоряжении методики. При концентрации токсина 50 мкг/мл нами зарегистрирован незначительно нарастающий во времени эффект 4 и 15 % через 1 и 5 мин, соответственно. В случае 20 мкг/мл вообще не удалось зарегистрировать эффекта. Вероятно, это связано с разрешающей способностью метода определения, ввиду малой величины изменения параметра. Полученные данные указывают на зависимость действия дельта-эндотоксина от его концентрации и времени воздействия на респираторную активность клеток. При этом, чем больше концентрация токсина, тем раньше наблюдается начальное стимулирование и последующее угнетение потребления клетками кислорода. С целью дальнейшей конкретизации механизма была изучена временная последовательность описанных выше явлений. Для этого были выбраны две концентрации эндотоксина (100 и 50 мкг/мл), которые вызывают умеренный разобщающий эффект, а следовательно позволяют охватить более значительный промежуток времени. Параллельно измеряли уровень продукции АТФ и рассчитывали коэффициент фосфорилирования (P/O). Известно, что в дышащих митохондриях скорость переноса электронов в дыхательной цепи, а следовательно, и скорость синтеза АТФ, определяется в первую очередь относительными концентрациями АДФ, АТФ и Фн (неорганического фосфата) в окружающей среде, а не концентрациями субстратов дыхания, например, пирувата. В условиях избытка субстрата дыхания скорость этого процесса тем выше, чем выше концентрация АДФ и Фн и ниже – АТФ. Это явление носит название дыхательного (акцепторного) контроля. Математически это выражается отношением P/O, где P представляет концентрацию АДФ. Рис. 1 – Влияние дельта-эндотоксина на потребление

кислорода клетками HeLa В условиях эксперимента на интактных митохондриях при постоянстве начальных концентраций АДФ и Фн в окружающей среде убыль концентрации АДФ пропорциональна приросту Фн, что и будет являться мерой скорости синтеза АТФ в митохондрии [17]. На графиках, представленных на рис. 2 и 3 и таблице 1 представлены данные о влиянии дельта-эндотоксина в концентрациях 50 и 100 мкг/мл на потребление кислорода, синтез АТФ (через изменение концентрации Фн в среде инкубации) и отношение Р/О в различные моменты времени после начала инкубации с токсином в течение 30 мин. Из графика, представленного на рисунке 2, видно, что эффект начального стимулирования поглощения кислорода в течение первых 10 мин воздействия дельта-эндотоксина утрачивается к 15 мин его воздействия. При этом как стимулирование, так и угнетение потребления кислорода митохондриями пропорциональны концентрации токсина. Начальное стимулирование под действием концентрации 100 мкг/мл через 1 мин воздействия составляло около 51 % от исходной величины, тогда как концентрация 50 мкг/мл стимулирования не вызывала. Скорость же снижения поглощения кислорода более значительна в случае концентрации 100 мкг/мл по сравнению с 50. Так, уже через 10 мин воздействия она практически возвращалась к норме, тогда как для 50 мкг/мл оставалась на 6 % выше нормы. В конечный момент эксперимента (60 мин) эти значения составили 4 и 48 % от контроля, соответственно. Уровень поглощения O_2 митохондриями в норме, при этом составлял 15-16 мкМ/105 клеток в 1 мин.

Рис. 2 – Изменение потребления кислорода клетками HeLa под действием дельта-эндотоксина На рис. 3 представлены данные, демонстрирующие изменение прироста Фн в инкубационной среде под действием изучаемых концентраций дельта-эндотоксина во времени. Уже в первую минуту воздействия эндотоксина происходит резкое снижение потребления АДФ и неорганического фосфата, а следовательно и синтеза АТФ. Так концентрация 100 мкг/мл снижает этот показатель почти в 5,4, а 50 мкг/мл - в 2,9 раз. В течение первых 10 мин синтез АТФ постепенно снижается до 7,2 и 4 раза, соответственно, а затем резко падает через 15 мин в 22 и 11,4 раза, соответственно. Через 60 мин инкубации при концентрации токсина 100 мкг/мл потребление АДФ практически полностью прекращается (составляет 0 %). А при концентрации токсина 50 мкг/мл составляет всего 0,4 % от нормы, что также соответствует практически полному прекращению потребления АДФ клетками. Результаты показывают, что наряду с первоначальным стимулированием поглощения кислорода (рис.2) наблюдается значительное снижение синтеза АТФ. Наиболее полно этот эффект выражается в изменении коэффициента фосфорилирования Р/О (табл. 1). Как показывают данные таблицы 1, значение Р/О заметно снижается в 10,5-38 раза в случае использования дельта-эндотоксина в концентрации 100 мкг/мл и в 2 -9,5 раза – 50 мкг/мл. С учетом того, что дыхание в течение первых 10 мин остается даже более интенсивным,

чем в норме, следует констатировать, что произошло разобщение процессов окислительного фосфорилирования и дыхания. Причем наиболее вероятно его действие как переносчика протонов. Рис. 3 – Изменение концентрации Фн в инкубационной среде под действием дельта-эндотоксина на клетки HeLa В свете современных представлений [16] Н⁺-АТФаза рассматривается как ферментная система, ответственная и за гидролиз АТФ и за его синтез. Гидролиз АТФ осуществляется с внешней стороны внутренней «сопрягающей» мембраны митохондрии, затем происходит активный транспорт протона из матрикса наружу, через протонный канал Н⁺-АТФазы. Это является движущей силой для синтеза на внутренней поверхности мембраны молекулы АТФ. Одновременно происходит перенос (антипорт) АТФ из матрикса и АДФ и Фн в матрикс, при этом роль антипортера выполняет сама Н⁺-АТФаза и сопряженные с ней белковые каналы и переносчики. С точки зрения этих представлений ясно, что блокирование работы Н⁺-АТФазы приводит в конечном итоге к утрате способности транспортировать АДФ в матрикс и АТФ из него. Очевидно, этот процесс заканчивается уже в первые 10 мин воздействия токсина, что в дальнейшем вызывает деэнергизацию митохондрий, а следовательно и клетки, и всю последующую цепь событий, важнейшим из которых является нарушение транспорта ионов и неэлектролитов в клетке. Полученные нами результаты подтверждаются данными ряда других авторов, которые в случае клеток кишечного эпителия насекомых не только отмечали стимулирование поглощения кислорода митохондриями с одновременным снижением синтеза АТФ и Р/О в результате действия дельта-эндотоксина, но и проводили аналогию между его действием и влиянием 2,6-динитрофенола, для которого однозначно установлена роль разобщителя типа протонного ионофора [10]. Эффект начального стимулирования дыхания является компенсаторной реакцией, связанной с разобщением. Ингибирование синтеза АТФ клетки кишечного эпителия насекомых под влиянием дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* отмечался так же в ряде других работ [18-20].

Таблица 1 – Влияние дельта-эндотоксина на интенсивность дыхания и синтез АТФ клетками HeLa

Концентрация токсина, мкг/мл	Эффект 1 мин	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	60 мин															
Норма (в отсутствии токсина)	100	потребление О ₂ 2,28 ± 0,26 ***	1,88 ± 0,25	1,60 ± 0,08	1,20 ± 0,16 ***	0,40 ± 0,09 ***	0,06 ± 0,02 ***	1,70 ± 0,27	синтез АТФ 0,53 ± 0,07 ***	0,43 ± 0,06 ***	0,40 ± 0,08 ***	0,13 ± 0,03 ***	0,05 ± 0,02 ***	0	2,86 ± 0,08						
50	потребление О ₂ 1,69 ± 0,08	1,88 ± 0,19	1,80 ± 0,21	1,40 ± 0,15	1,10 ± 0,26	0,82 ± 0,12 **	1,70 ± 0,27	синтез АТФ 1,67 ± 0,17 ***	1,29 ± 0,06 ***	0,77 ± 0,08 ***	0,25 ± 0,09 ***	0,22 ± 0,03 ***	0,08 ± 0,03 ***	2,86 ± 0,08	Р/О 0,99 ± 0,06 ***	0,66 ± 0,04 ***	0,43 ± 0,03 ***	0,18 ± 0,01 ***	0,20 ± 0,01 ***	0,10 ± 0,01 ***	1,68

Примечание: Р/О – величина безразмерная