

На правах рукописи

КАМЕНЕК ДМИТРИЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

ДЕЙСТВИЕ ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНА *BACILLUS THURINGIENSIS* НА ПЕРЕВИВАЕМЫЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

Специальность
03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань, 2009

Работа выполнена на кафедре общей и биологической химии Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования Ульяновский государственный университет

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор,
член-корр. АН Татарстана
Ильинская Ольга Николаевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Алимова Фарида Кашифовна
(зав.кафедрой биохимии Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова - Ленина, г. Казань).

доктор биологических наук, профессор
Васильев Дмитрий Аркадьевич
(зав.кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии, ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии)

Ведущая организация: ФГОУ ВПО Саратовский государственный университет им. Н.Г.Чернышевского

Защита диссертации состоится «__» _____ 2009 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ГОУ Казанский государственный университет имени В.И. Ульянова-Ленина, по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлёвская, 18, аудитория 211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова

Автореферат разослан «__» _____ 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор

З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: *Bacillus thuringiensis* является широко распространенной в природе кристаллофорной спорообразующей бактерией. Известны ее энтомопатогенные свойства и промышленные препараты на основе бактерии являются наиболее важными средствами биологического контроля численности насекомых во многих странах.

Известно, что основным действующим началом *B. thuringiensis*, ответственным за комплекс патологических проявлений в организме чувствительного насекомого, является дельта – эндотоксин, продуцируемый ею. Показана также антимикробная активность дельта-эндотоксинов *B.thuringiensis* для различных бактерий и микроскопических грибов (Юдина и Бурцева, 1997; Климентова, 2001; Тюльпинева, 2003; Каменек и соавт., 2005). Отмечали кроме того селективное ингибирующее действие белков кристаллов *subsp. thuringiensis* на развитие опухолевых клеток млекопитающих, в том числе человека (Prasad & Shethna, 1976; Ito et al., 2004). Эндотоксины предпочтительно убивали раковые клетки *HeP*, не оказывая влияния на развитие нормальных клеток. Все это дает основание предположить, что *B. thuringiensis* и её кристаллический дельта-эндотоксин являются важным универсальным высокоизбирательным природным регулятором численности самых различных организмов.

Создание и применение средств на основе дельта-эндотоксина позволило бы не только обеспечить максимальную эффективность и экологическую безвредность мероприятий по защите растений от вредных насекомых и фитопатогенных микроорганизмов, но и, возможно, решить целый ряд медицинских и ветеринарных проблем. Прежде всего, разработать препаративные формы, обладающие антимикробной и противораковой активностью и не токсичные для нормальных клеток. Их разработке должны предшествовать исследования, выполненные на культурах клеток.

В мировой литературе накоплен обширный материал, описывающий строение, состав, физико-химические свойства кристаллов. Установлено, что дельта-эндотоксины способны связываться с чувствительными рецепторами на цитоплазматических мембранах клеток кишечного эпителия, а затем проникать в них, формируя каналы-поры (Hodgman & Ellar, 1990; Smith & Ellar, 1994). Изучены особенности механизма действия на насекомых, включая клеточные культуры. Отмечается нарушение транспорта ионов, активирование АТФаз, снижение синтеза АТФ на фоне усиления потребления кислорода, разобщение процессов окислительного фосфорилирования и дыхания (Heimpel, 1977; Faust, 1984; Aronson et al., 1986; Gill et al., 1992; Nimeno et al., 1985; Каменек, 1998). Проведены также исследования влияния на млекопитающих кристаллов белкового дельта-эндотоксина, которые подтвердили, что эти белки и продукты их расщепления не токсичны и не аллергенны для теплокровных организмов (Киль и Надыкта, 2002). Вышесказанное позволило определить цель и задачи исследования.

Цель настоящего исследования – охарактеризовать по морфологическим и биохимическим параметрам этапы действия дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis subsp. sotto* и выявить особенности механизма его действия на клетки перевиваемых линий *HeLa*, *B16* и *L1210*.

Основные задачи исследования:

1. Выявить общее цитопатическое действие дельта-эндотоксина и охарактеризовать силу его эффекта по отношению к клеткам перевиваемых линий *HeLa*, *B16* и *L1210*.

2. Определить влияние дельта-эндотоксина на ионный гомеостаз клеточных линий, установив факт нарушения транспорта основных неорганических ионов (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+}) вследствие изменения активности основного ионного транспортера - K^+ , Na^+ -АТФазы.

3. Установить возможность действия дельта-эндотоксина как агента, разобщающего дыхание и фосфорилирование в клетках перевиваемых культур

4. Проанализировать влияние дельта-эндотоксина на процесс гликолиза в клетках *HeLa* согласно показателям активности основных ферментов гликолиза – 3-фосфоглицерат дегидрогеназы и лактат дегидрогеназы.

5. Охарактеризовать ранние и поздние этапы действия дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis subsp. sotto*

Научная новизна результатов исследований. Впервые проведено изучение влияния дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* на клетки перевиваемых культур (*HeLa*, *L1210*, *B16*). Показано, что изученные культуры отличаются по чувствительности к токсину. Установлена прямо пропорциональная зависимость их чувствительности от времени контакта с токсином и его концентрации.

Показано, что действие дельта-эндотоксина на культуры раковых клеток, аналогично таковому для клеток кишечника и культур насекомых. Установлено нарушение работы ион транспортирующей Mg^{2+} -зависимой АТФазной системы, результатом которого является пассивный нерегулируемый приток ионов натрия и воды в клетку и, как следствие, вакуолизация мембранных структур. Показана первичность активирования фермента (в течение первых 10 мин) по отношению к изменению концентраций ионов, которое начиналось только через 10-15 мин.

Установлено, усиление клеточного дыхания в течение первых 10 минут воздействия дельта-эндотоксина на фоне резкого снижения синтеза АТФ, которое, вероятно, связано с разобщением окислительного фосфорилирования и дыхания, приводящего к дезэнергизации митохондрий и клеток в целом.

Установлено начальное усиление гликолиза, очевидно связанное с необходимостью компенсации снижения синтеза АТФ в ходе окислительного фосфорилирования, за счет аэробной, а при дальнейшей дезэнергизации клетки, и снижении потребления кислорода анаэробной стадии гликолиза. Это подтверждает динамика изменения активности 3-фосфоглицерат

дегидрогеназы и лактат дегидрогеназы, ферментов катализирующих из ключевых стадий гликолитического процесса.

Установлено, что нарушение транспортных функций клеточных мембран и, вслед за этим, их целостности вызывает выход лактатдегидрогеназы во внеклеточную жидкость и значительное повышение содержания лактата в ней.

Практическая значимость работы. Полученные результаты могут быть использованы при разработке препаративных форм для лечения различных форм онкологических заболеваний человека и домашних животных, а так же при оценке безопасности применения эндотоксинсодержащих пестицидов. Полученные результаты могут быть использованы в учебном процессе как вносящие вклад в представления о механизмах действия бактериальных токсинов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Цитопатический эффект дельта-эндотоксина *B. thuringiensis subsp. sotto* связан с изменением структуры клеток (нарастающая вакуолизация с последующим разрушением), пропорционален его концентрации и времени контакта с клетками перевиваемых культур. Эффективность действия токсина различается по силе для разных клеточных линий: чувствительность клеток *HeLa* значительно выше, чем клеток *B16* и *L1210*.

2. Действие дельта-эндотоксина характеризуется нарушением транспорта ионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} через цитоплазматическую мембрану клеток, которому предшествует значительная (до 6,8 раз) активация Mg^{2+} -зависимой K^+ , Na^+ - АТФазы.

3. Дельта-эндотоксин угнетает синтез АТФ на фоне активации дыхания, действуя на культуры клеток аналогично разобщителям процессов окислительного фосфорилирования и дыхания.

4. Проявлением действия дельта-эндотоксина является интенсификация гликолиза в клетках *HeLa* на начальном этапе и активация 3-фосфоглицерат дегидрогеназы с последующим ее угнетением, сменяемым активацией характерного для анаэробного режима гликолиза фермента – лактат дегидрогеназы.

5. Разрушению клеток под действием дельта-эндотоксина предшествует, дезэнергизация митохондрий, снижение потребления кислорода, активация анаэробного пути гликолиза, нарушение целостности мембран и выход лактат дегидрогеназы во внеклеточную среду.

Апробация работы. Основные результаты исследований докладывались на симпозиуме с международным участием «Актуальные проблемы адаптации к природным и экосоциальным условиям среды» (Ульяновск, 2002), XIII Международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение» (Казань, 2005); Всероссийской школе-семинаре молодых ученых и специалистов по актуальным проблемам «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2004 - 2006); Всероссийской конференции молодых ученых и специалистов (Москва, МГУ, 2007); Регионального научного семинара Министерства образования

РФ « Геозкологические проблемы Среднего Поволжья» (Ульяновск, 2008), Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008), межкафедральных семинарах экологического факультета Института медицины, экологии и физической культуры Ульяновского госуниверситета (2003 – 2008).

Публикации результатов исследований. Основные положения опубликованы в 14 работах.

Объем диссертационной работы. Диссертационная работа изложена на 131 странице компьютерного набора, включает 12 таблиц и 12 рисунков. Диссертация состоит из введения, 3 глав, включающих обзор литературы, материалов и методов исследований результаты исследований и их обсуждение с учетом существующих в литературе данных, заключения, выводов и списка литературы. Список цитируемой литературы содержит 270 источников, в том числе 91 на русском языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В соответствии с поставленной задачей нами были изучено действие дельта-эндотоксинов различных штаммов *B. thuringiensis subsp. galleriae, alesti, kurstaki, thuringiensis, sotto, dendrolimus*, (Cry IA класса), на клетки *HeLa, L1210, B16* и *SCLd-135*.

Кристаллы растворяли 0,04 М NaOH, затем рН снижали до 7,8 осторожным титрованием 0,1 М HCl. Кристаллы предварительно отделяли от спор в двухфазной системе: хлороформ – водный раствор Na₂SO₄ (Cooksey, 1968). Разделение полипептидов проводили методом хроматографии на колонке Sephadex-G-200 размером 2,54×10 см. Уровень белка определяли по методике. Для дальнейшей работы собирали фракции с M_r выше 60000 Д. Очистку дельта-эндотоксинов завершали микрофильтрацией через бактериальные фильтры, которая являлась одновременно и стерилизацией.

Для световой микроскопии препараты фиксировали в фиксаторе Карнуа и окрашивали кристаллическим фиолетовым (Пирс, 1962). Содержание неорганического фосфата определяли по методу Самнера (1989).

Концентрацию ионов измеряли с помощью атомно-адсорбционного спектрофотометра марки С-115. Поглощение кислорода изучали микроманометрическим методом (Travers et al., 1976).

Активность ферментов определяли спектрофотометрически после экстракции 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,3 (лактат дегидрогеназа) или 0,1М карбонатным буфером, рН 9,8 (3-фосфолицерат дегидрогеназа) при -4°С в течение 30 мин (Клунова и Банников, 1980). Активность Mg²⁺-зависимой АТФазы устанавливали по выделению неорганического фосфата (Ф_n) из АТФ в результате реакции ферментативного гидролиза (Писарева, 1968).

Достоверность всех полученных результатов оценивали методами математической статистики с помощью электронных таблиц Microsoft Excel.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Цитопатическая активность дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis*

Согласно данным литературы, оптимальными концентрациями, позволяющими выявить различия в действии токсина, являются 5-15 мкг/мл. Нами была выбрана минимальная из указанных концентрация, заведомо не приводящая к полному разрушению клеток. Инкубацию в присутствии токсина осуществляли в течение 60 мин.

Как показали результаты, растворы дельта-эндотоксинов *B. thuringiensis subsp. galleriae, alesti, kurstaki, thuringiensis, sotto, dendrolimus* в концентрации 5 мкг/мл оказывают воздействие на клетки *HeLa, L1210, B16* и *SCLd-135*. При этом существенных различий в способности токсинов различного происхождения разрушать клетки не было отмечено. В результате для дальнейших исследований была выбрана культура, обладающая максимальной продукцией дельта-эндотоксина. Количественный анализ способности штаммов продуцировать дельта-эндотоксин показал, что в наибольшей степени она выражена у штаммов *sotto 617* (129,7 мг/г сухой массы культуры).

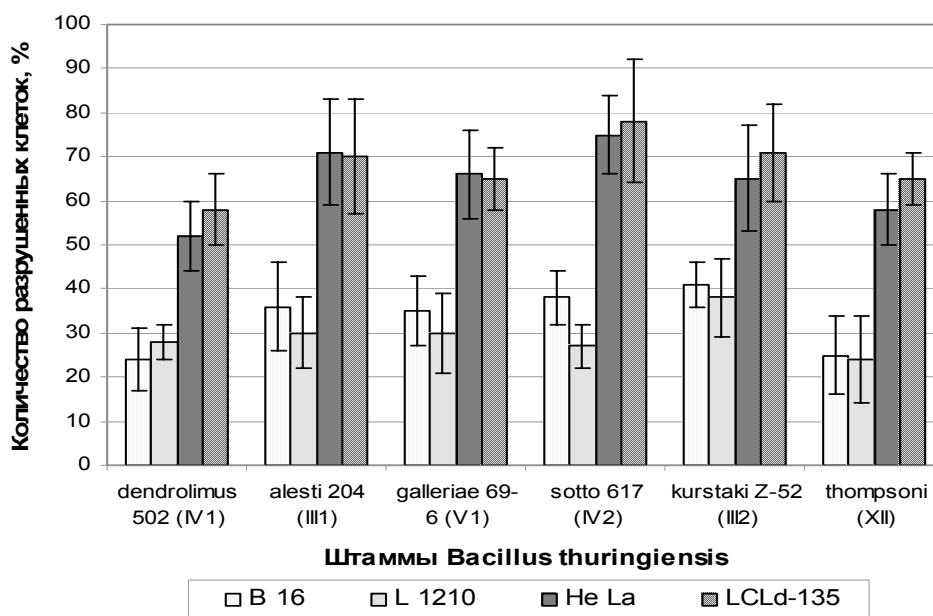


Рис. 1. Цитопатическое действие различных концентраций дельта-эндотоксинов *B. thuringiensis subsp. sotto*

Сравнение цитопатической активности дельта-эндотоксина на изучаемые культуры показало, что наблюдается выраженная зависимость ее от концентрации токсина (рис. 1). Концентрация 20 мкг/мл не оказывала действия на клетки меланомы мышей – *B 16* и лимфоидной лейкемии кроликов – *L 1210* и приводила к разрушению 17 – 20% клеток рака шейки

матки человека – *HeLa* и клетки кишечного эпителия непарного шелкопряда - *SCLd-135*.

Концентрация 100 мкг/мл вызывала разрушение несколько более половины клеток *B16* и *L1210* (57 и 69%, соответственно) и большей части клеток *HeLa* и *SCLd-135* (90 – 95%, соответственно) Полное разрушение клеток первых двух культур наблюдали только в случае действия 200 мкг/мл токсина.

Полученные данные показывают не только выраженную зависимость цитопатического эффекта от концентрации дельта-эндотоксина, но и существенные различия в чувствительности изучаемых культур к нему.

На рисунках 2 и 3 представлены результаты изучения влияния продолжительности времени инкубации на цитопатическое действие дельта-эндотоксина в двух концентрациях: 50 и 100 мкг/мл. При действии эндотоксина в концентрации 50 мкг/мл (рис. 2) разрушение клеток *L1210* начиналось через 10 мин (3,2%) и через 120 мин достигало максимальной величины в 64,6%. В случае *B16* разрушение 12,5% отмечено через 15 мин. Для *HeLa* и *SCLd-135* отмечен значительный цитопатический эффект уже после 5 мин инкубации с токсином (17,0 и 18,1%, соответственно). Через 120 мин оказались разрушенными 86,6 и 84,0% клеток, соответственно.

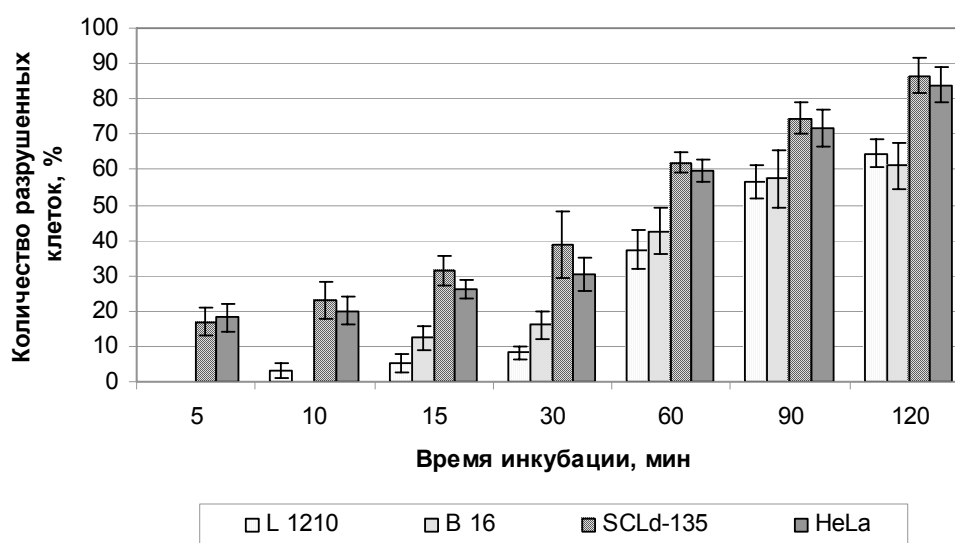


Рис. 2. Влияние времени инкубации на цитопатическое действие дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* subsp. *sotto* (концентрация 50 мкг/мл)

Действие дельта-эндотоксина в концентрации 100 мкг/мл приводило к более значительному цитолитическому действию (рис. 3). Уже в первые 5 мин во всех изученных образцах отмечено наличие разрушенных клеток, достигавшее 8,6% для *L 1210*; 5,0 для *B 16*; 27, 5 для *SCLd-135* и 27,1 для *HeLa*. Через 30 мин количество лизированных клеток составило 57,0; 69,1; 90,9 и 94,9%, соответственно. Через 60 мин клетки *SCLd-135* и *HeLa* оказались полностью разрушены, и в случае *B16* аналогичный эффект наблюдали только через 120 мин. Для клеток *L 1210* через 120 мин инкубации отмечено 91,2% разрушенных клеток.

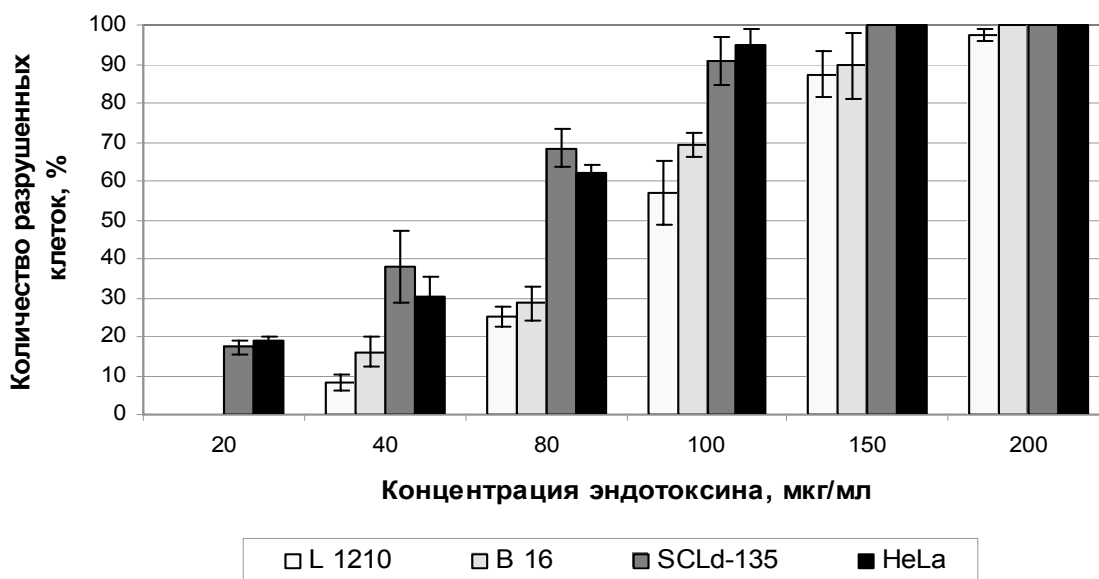


Рис. 3. Влияние времени инкубации на цитопатическое действие дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* subsp. *sotto* (концентрация, 100 мкг/мл)

Таким образом, полученные результаты указывают на способность дельта-эндотоксинов *B. thuringiensis* subsp. *sotto*, штамм 617 оказывать цитолитическое действие на клетки исследованных культур. При этом отмечена выраженная прямо пропорциональная зависимость оказываемого эффекта от концентрации дельта-эндотоксина. Цитотоксическое действие было тем более значительным, чем продолжительнее была инкубация. Следует отметить, что изученные культуры различаются по степени чувствительности к данному токсину: для *SCLd-135* и *HeLa* ее можно характеризовать как высокую, тогда как для *L 1210*; и *B16* – среднюю. Для сравнения была использована культура клеток кишечного эпителия непарного шелкопряда – *SCLd-135*, высокая чувствительность которой к токсину *subsp. galleriae* была отмечена ранее (Каменек, 1989).

2.2. Микроскопическое изучение действия дельта-эндотоксина на клеточные культуры

В ходе исследования, проведенного на клетках культуры *HeLa*, было установлено, что первые изменения клеток по сравнению с нормой наблюдались уже через одну минуту после начала инкубации с раствором дельта-эндотоксина (рис. 4.2). Клетки начинали вакуолизироваться через этот промежуток времени, при чем степень вакуолизации возрастала с увеличением продолжительности инкубации и была пропорциональна концентрации дельта-эндотоксина. Так, если при использовании концентрации 100 мкг/мл через 1 мин было вакуолизировано до 90% всех клеток и появились первые разрушенные, то при 50 мкг/мл до 50% .

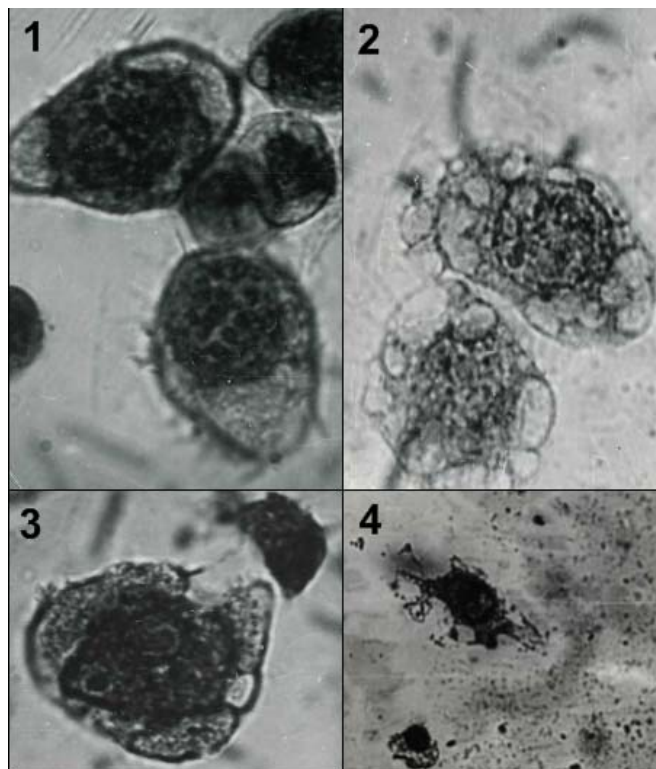


Рис. 4. Действие дельта-эндотоксина на культуру клеток *HeLa*: 1 – нормальные клетки (контроль), 2 – вакуолизация через 1 мин инкубации (100 мкг/мл), 3 – вакуолизация и признаки разрушения клеток через 15 мин, 4 – разрушение клеток (через 30 мин инкубации при концентрации 100мкг/мл или через 2 ч – 50 мкг/мл), световая микроскопия, увеличение в 400 раз.

Через 15 мин во всех сериях опытов вакуолизация достигала 100 % , и размеры клеток значительно увеличились (рис. 4.3). В это же время нарастают признаки разрушения клеток. Через 30 мин инкубации с токсином в концентрации 100 мкг/мл не обнаруживается ни одной целой клетки (рис. 4.4).

На представленных микрографиях видно, что кроме появления большого числа вакуолей, наблюдаются и такие признаки нарушения структуры клеток, как истончение клеточной мембраны и зернистость ядер.

В контроле, где клетки инкубировались в том же растворе, что и в опытах, только в отсутствие дельта-эндотоксина, каких-либо изменений в структуре клеток обнаружено не было (рис. 4.1).

Столь значительная вакуолизация клеток вероятнее всего является следствием нарушения активного транспорта ионов и, прежде всего, натрия, концентрация которого в норме во внутриклеточной среде должна быть ниже, чем во внеклеточной.

2.3. Действие дельта-эндотоксина на содержание ионов в клетках

Для получения более полной картины действия дельта-эндотоксина было проведено изучение концентраций ионов в различные моменты времени. Данные, представленные на рисунках 4 и 5, 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^+ , причем степень повышения уровня зависела от количества токсина.

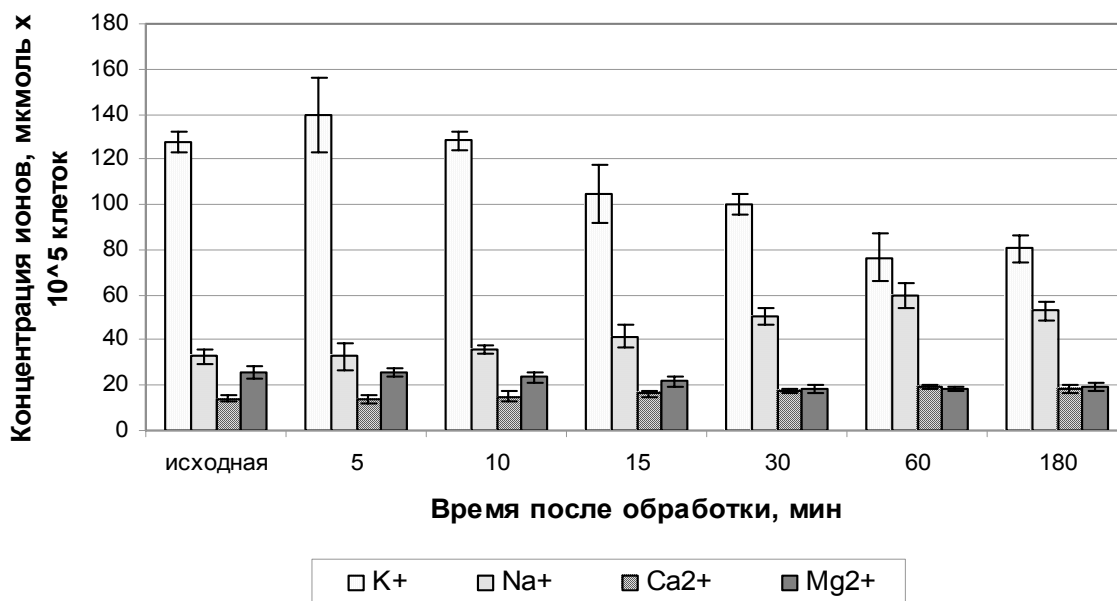


Рис. 4. Влияние дельта-эндотоксина (50 мкг/мл) на концентрацию ионов в клетках *HeLa*

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^+ , достигая 61% от исходного значения через 30 мин для 100 мкг/мл и 60% через 1 ч для 50 мкг/мл.

Для Mg^{2+} отмечено снижение до 78% через 30 мин для 100 мкг/мл и 71% через 1 ч для 50 мкг/мл, соответственно. Концентрация ионов Ca^{2+} , наоборот, повышалась через тот же период времени до 130 и 136%, соответственно.

Изменение концентраций ионов, хотя и менее значительное, отмечено и в случае менее чувствительных к дельта-эндотоксину культур и Максимальное увеличение концентрации ионов Na^+ при использовании 100 мкг/мл токсина составляло через 1 час 179% для *L1210* и 167% для *B16*. Существенно снижалась концентрация ионов K^+ , достигая 76 и 72%, соответственно, от исходного значения через 30 мин. Для Mg^{2+} отмечено снижение до 78 и 83% через 30 мин. Концентрация ионов Ca^{2+} , наоборот, повышалась через тот же период времени до 130% в обоих случаях.

Поддержание постоянства концентраций ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} чрезвычайно важно из-за высокой их биологической активности. Ca^{2+} в основном находится в органеллах – митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, кальцисомах, а не в цитозоле.

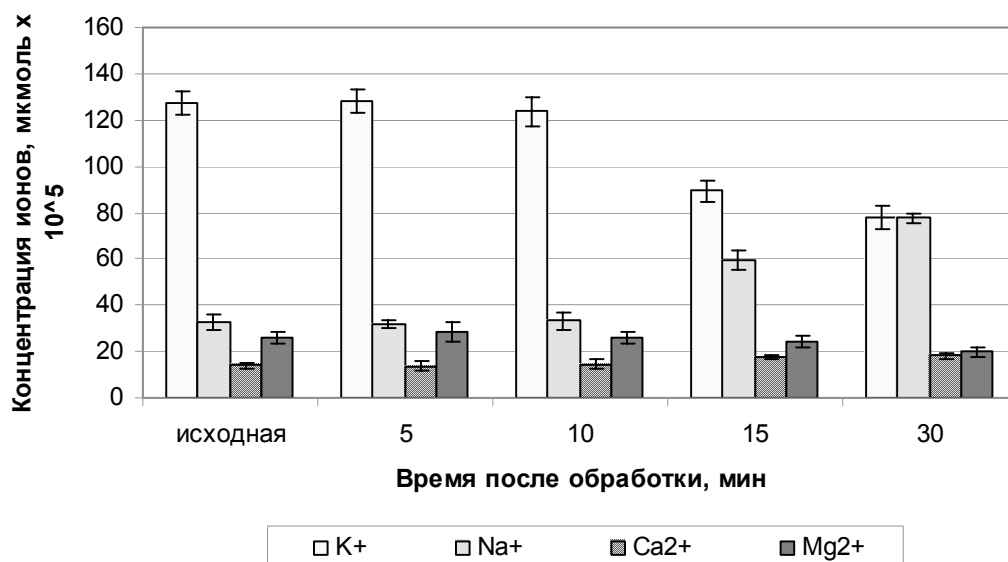


Рис. 5. Влияние дельта-эндотоксина (100 мкг/мл) на концентрацию ионов в клетках культуры *HeLa*

Полученные результаты согласуются с ранее приведенными по вакуолизации клеток. В период (от 15 мин и далее) происходит нарастание вакуолизации, связанной с нарушением транспорта ионов через цитоплазматическую мембрану, и в первую очередь это относится к ионам Na^+ , транспорт которого неразрывно связан с транспортом воды.

Результаты, представленные на рисунке 6, показывают значительное активирование K^+ , Na^+ -АТФазы культур клеток *L1210* и *HeLa*. Активирование начиналось уже через 1 мин после добавления токсина и составляло 47 и 59%, соответственно. Максимальных значений активность фермента достигала через 15 мин и составляла 638 и 213%, соответственно.

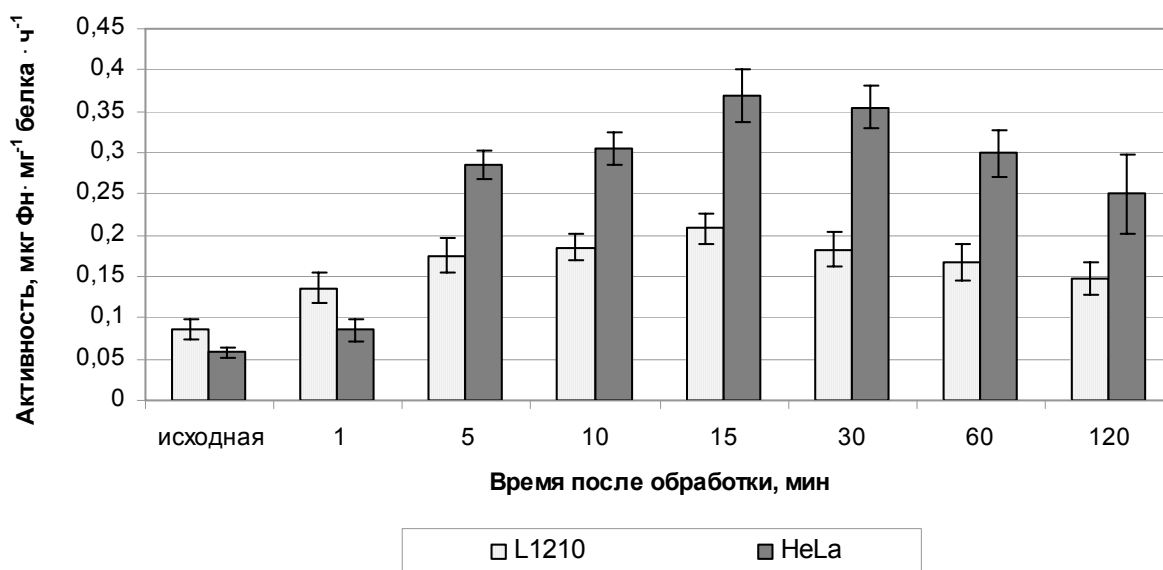


Рис. 6. Влияние дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* (50 мкг/мл) на Mg^{2+} -зависимую K^+ , Na^+ -АТФазу культур клеток

Изменение активности данного фермента наблюдается как при нарушении целостности мембраны, так и при действии веществ, разобщающих процессы дыхания и окислительного фосфорилирования.

Поскольку активность фермента характеризует его способность гидролизовать субстрат (АТФ), и известно, что эта способность резко повышается как в условиях разобщения окислительного фосфорилирования и дыхания, так и при нарушении целостности мембраны, активирование данной ферментной системы фактически отражает степень дезэнергизации клетки. Торможение транспортной функции приводит к накоплению промежуточных продуктов реакции: АДФ и Φ_n , что и регистрируется в наших экспериментах, как усиление гидролитической активности АТФазы.

Было показано, что способность гидролизовать АТФ не является свойством самого эндотоксина катализировать гидролиз АТФ с высвобождением фосфата. Он также не может являться поставщиком свободного (неорганического) фосфата в реакционную среду.

2.4. Действие дельта-эндотоксина на дыхательную активность и синтез АТФ в клетках

Нами было выполнено изучение влияния дельта-эндотоксина на дыхание и окислительное фосфорилирование в клетках наиболее чувствительной культуры *HeLa*.

Полученные данные (рис. 7) демонстрируют стимулирование поглощения кислорода клетками *HeLa* на 74% через 1 мин инкубации с токсином в концентрации 150 мкг/мл. Далее 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 O_2 усиливается в более ранние периоды, что мы не можем зарегистрировать, используя имеющиеся в распоряжении методики.

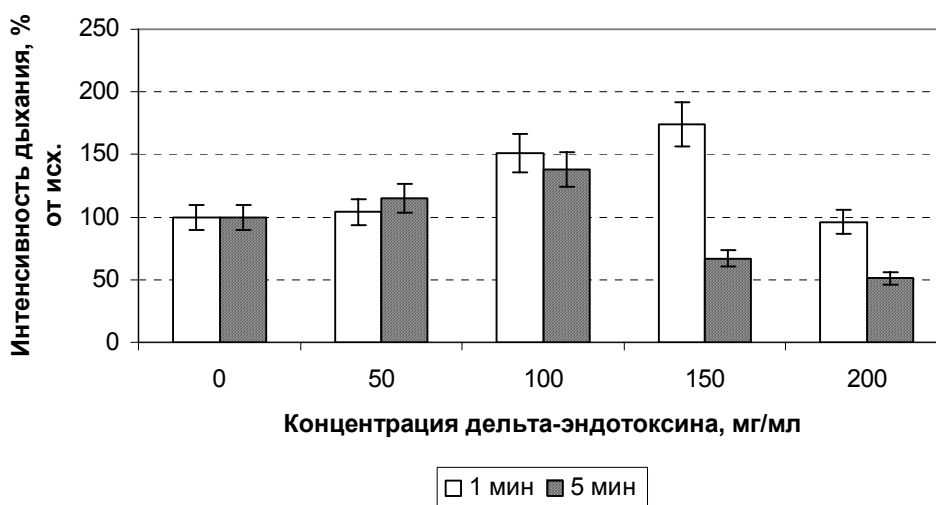


Рис. 7. Действие дельта-эндотоксина на потребление кислорода клетками

При небольшой 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.

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.

Был проведен анализ временной последовательности описанных выше явлений, с целью дальнейшей конкретизации механизма. 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 при наблюдении эффекта. Параллельно измеряли уровень продукции АТФ и рассчитывали коэффициент фосфорилирования (Р/О). 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 Φ_n (неорганического фосфата) в окружающей среде, а не концентрациями субстратов дыхания, например, пирувата. тем выше, чем выше концентрация АДФ и Φ_n и ниже – АТФ. Это явление носит название дыхательного (акцепторного) контроля. Математически это выражается отношением Р/О, где Р представляет концентрацию АДФ. В условиях эксперимента на интактных митохондриях при постоянстве начальных концентраций АДФ и Φ_n в окружающей среде убыль концентрации АДФ пропорциональна приросту Φ_n , что и будет являться мерой скорости синтеза АТФ в митохондрии.

Эффект начального стимулирования поглощения кислорода в течение первых 10 мин воздействия дельта-эндотоксина утрачивается к 15 мин его воздействия (рис. 8). При этом как стимулирование, так и угнетение потребления кислорода митохондриями пропорциональны концентрации токсина.

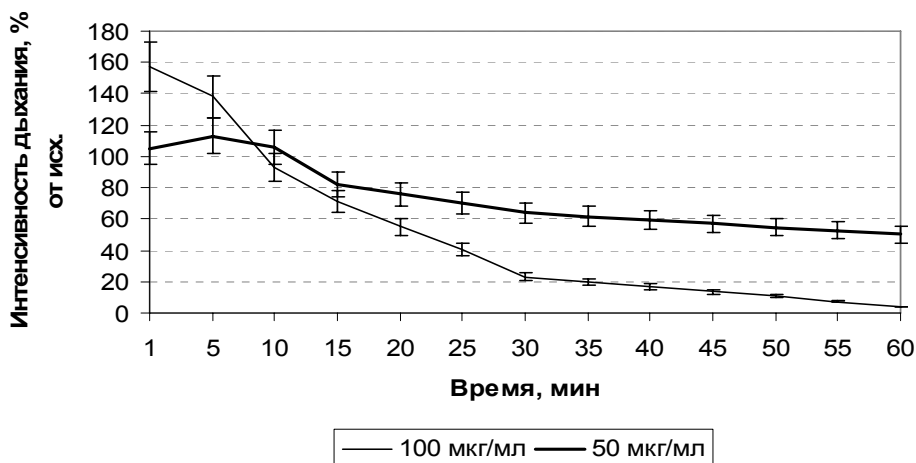


Рис. 8. Изменение потребления кислорода клетками под действием дельта-эндотоксина

Начальное стимулирование под действием концентрации 100 мкг/мл составляет через 1 мин около 51 % от исходной, тогда как 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 возвращается к норме, тогда как для 50 мкг/мл остается на 6 % выше нормы. В конечный момент эксперимента (60 мин) эти значения составляют 4 и 48 % от контроля, соответственно. Уровень поглощения O_2 митохондриями в норме, при этом составлял $15-16 \text{ мкМ}/10^6$ клеток в 1 мин.

Уже в первую минуту воздействия эндотоксина происходит резкое снижение потребления АДФ и Φ_n , а, следовательно, и синтеза АТФ (рис. 9). Так концентрация 100 мкг/мл снижает этот показатель почти в 5,4, а 50 мкг/мл – в 2,9 раз.

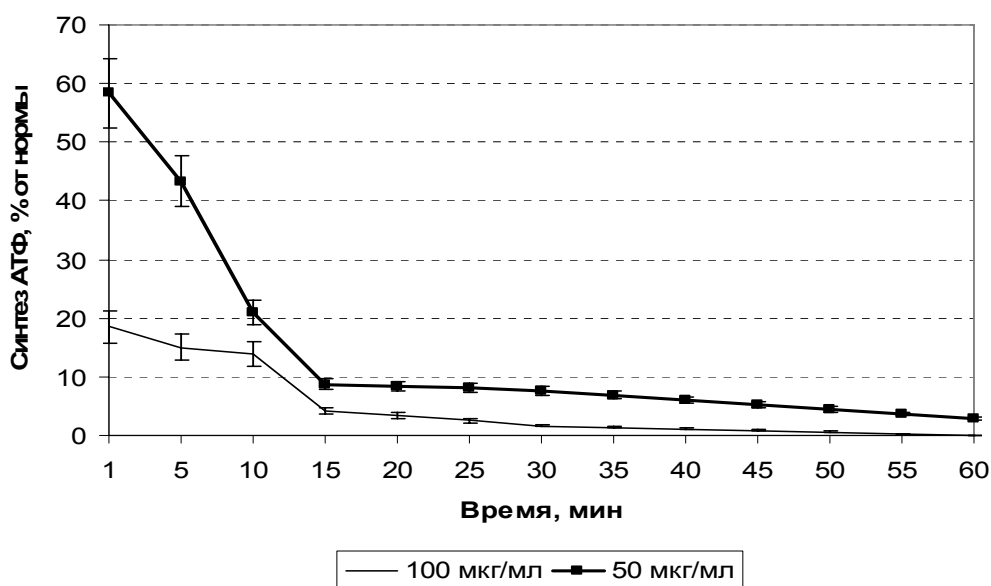


Рис. 9. Влияние дельта-эндотоксина на синтез АТФ в клетках *HeLa*

В течение первых 10 мин синтез АТФ постепенно снижается в 7,2 и 4 раза, соответственно, а затем резко падает через 15 мин в 22 и 11,4 раза, соответственно. Через 60 мин инкубации потребление АДР составляет только 0 % (100 мкг/мл) и 0,4 % от нормы.

Результаты показывают, что наряду с первоначальным стимулированием поглощения кислорода (рис. 9) наблюдается значительное снижение синтеза АТФ. Наиболее полно этот эффект выражается в изменении коэффициента фосфорилирования Р/О (табл. 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 первые 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.

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 отсутствие токсина)
100	потребление O 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
	P/O	0,23 ± 0,03 ***	0,23 ± 0,03 ***	0,25 ± 0,03 ***	0,11 ± 0,01 ***	0,13 ± 0,02 ***	0	1,68
50	потребление O 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
	P/O	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: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ при $n = 20$ (n – число пар измерений)

Эффект начального стимулирования дыхания является компенсаторной реакцией, связанной с разобщением. 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.

2.5 Влияние дельта-эндотоксина на процесс гликолиза

В условиях повышенного потребления кислорода увеличивается и потребность митохондрии в восстановительных эквивалентах, поставляемых субстратами дыхательной цепи. Это должно привести к ускорению гликолиза в цитозоле. Однако, поскольку процессы дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондрии разобщены, прекращается синтез АТФ, происходит деэнергизация митохондрии, что приводит к торможению работы дыхательной цепи и снижению потребности в субстратах – продуктах гликолиза. В результате прекращается приток в митохондрии метаболитов глюкозы. Вероятно, вследствие дальнейшего снижения дыхательной активности гликолиз переключается на анаэробный режим, приводя к повышению активности лактат дегидрогеназы и концентрации лактата в цитозоле.

Для проверки этих предположений нами было предпринято экспериментальное исследование, включающее анализ активности ключевых ферментов гликолиза клеток *HeLa*: 3-фосфоглицерат дегидрогеназы (3-ФГДГ) и лактат дегидрогеназы (ЛДГ). В течение первых 10 мин действия эндотоксина активность 3-ФГДГ превышает ее уровень в интактных клетках (норма). При этом в случае концентрации токсина 100 мкг/мл активирование на 25% начиналось уже через 1 мин и достигало максимума (60%) через 5 мин. Через 10 мин активность фермента оставалась высокой и составляла 46% от нормы. Затем начиналось снижение активности, которая достигла через 15 мин 80% исходной. Снижение активности продолжалось до конца опыта, и через 60 мин ее значение составило 15% от нормы.

В случае концентрации 50 мкг/мл активирование было менее значительным и максимум (32%) отмечали через 10 мин. Также более медленно происходило и снижение активности, достигая через 60 мин 32% исходной.

Эти данные согласуются с представленными на рисунке 8, демонстрирующими динамику изменения потребления кислорода клетками под действием тех же концентраций дельта-эндотоксина. Сопоставление этих результатов показывает, что начальное стимулирование дыхания приводит к ускорению катаболизма глюкозы с образованием пирувата и 3 – фосфоглицерата, и как следствие, субстратов дыхательной цепи. Однако в периоды времени более 10 мин для концентрации 100 мкг/мл и 15 мин для 50 мкг/мл происходит снижение интенсивности дыхания, и вслед за этим угнетается гликолиз. Фактически происходит затухание процесса в течение 60 мин. Это связано не только с практически полным прекращением синтеза АТФ в митохондриях, но и с тем, что к этому времени происходит достаточно интенсивное разрушение клеток с освобождением их содержимого в культуральную среду. Как видно из данных, представленных на рисунке 8 и 9, через 15 мин действия дельта-эндотоксина начинается нарастающее снижение интенсивности дыхания и синтеза АТФ. Однако к этому времени остается еще много не разрушенных клеток. Возможно, что в таких анаэробных условиях клетки переключаются на преимущественное образование в ходе гликолиза лактата.

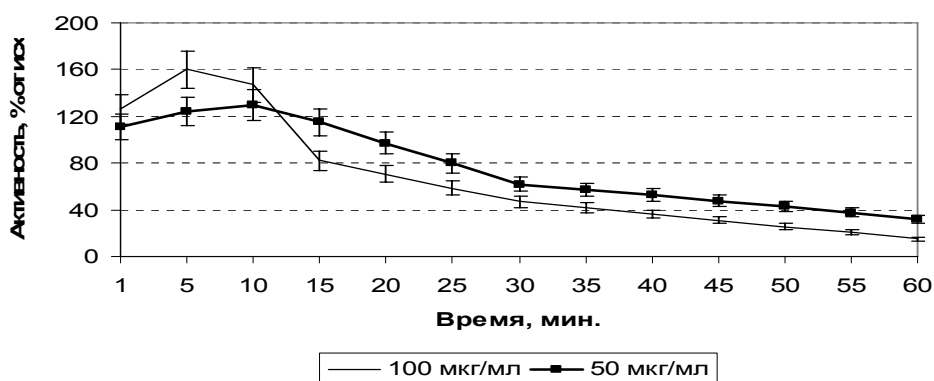


Рис. 10. Изменение активности 3-фосфоглицерат дегидрогеназы в цитозоле клеток под действием дельта-эндотоксина в концентрации 100 мкг/мл и 50 мкг/мл

Было отмечено активирование ЛДГ в клетках *HeLa* (рис. 11) в период времени от 15 до 30 мин, то есть в условиях наблюдаемого уменьшения потребления кислорода. Через 5-15 мин, напротив, отмечено практическое отсутствие активности ЛДГ. Это объясняется подавлением образования лактата в условиях повышенной аэробности.

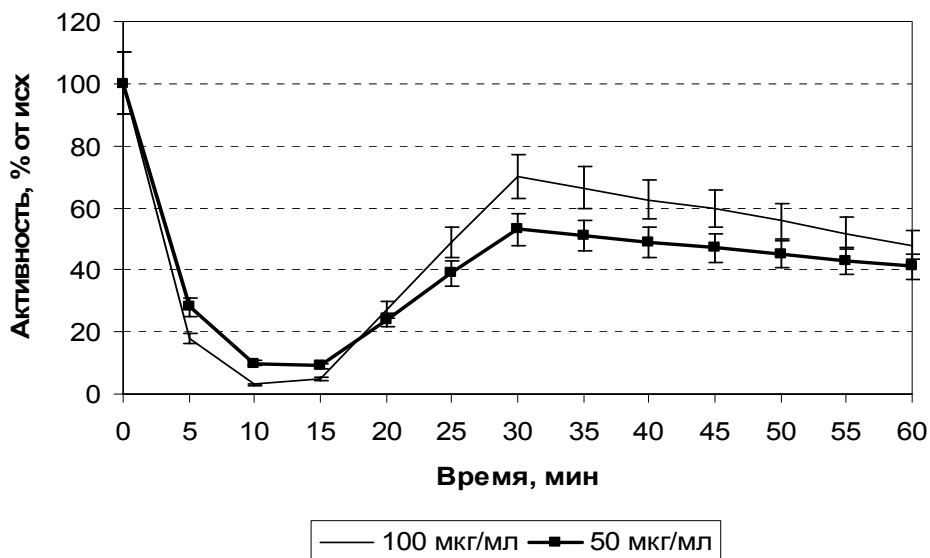


Рис. 11. Изменение активности лактат дегидрогеназы в клетках *HeLa* в результате действия дельта-эндотоксина

В период времени после 15 мин, когда резко снижается поглощение кислорода, гликолиз переключается на анаэробный режим с образованием лактата, о чем свидетельствует увеличение активности ЛДГ.

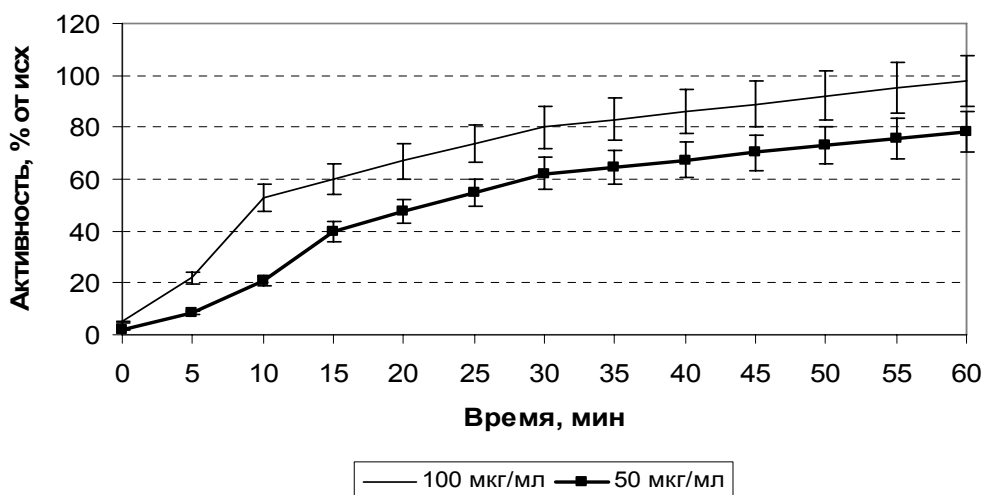


Рис. 12. Изменение активности лактат дегидрогеназы в супернатанте в результате действия на клетки *HeLa* дельта-эндотоксина

Нами регистрировалась активность ЛДГ во внесклеточной (культуральной) среде через разные промежутки времени действия токсина. Выход ЛДГ в культуральную среду под действием дельта-эндотоксином (рис. 12) регистрировался уже спустя 5 мин после начала инкубации. При

этом активность фермента была выше при концентрации токсина 100 мкг/мл (21% общей активности) по сравнению с 50 мкг/мл (8%). Далее активность ЛДГ возрастала практически линейно при обеих концентрациях и достигала 100% (100 мкг/мл) и 79% (50 мкг/мл) через 60 мин инкубации.

Таким образом, усиление клеточного дыхания приводит к ускорению процесса гликолиза в клетках культуры в течение всего периода усиленного дыхания (1-15 мин). Это связано с возросшими потребностями митохондрий в субстратах цепи переноса электронов (дыхательной цепи). Синтез АТФ в то же время значительно снижается в результате разобщения, что приводит к деэнергизации митохондрии и нарушению транспорта веществ через ее мембрану. В результате происходит снижение интенсивности дыхания, по-видимому, в результате резкого снижения поступления в митохондрии субстратов для цитратного цикла и прекращения вследствие этого выработки восстановительных эквивалентов. Далее, как следует из представленных выше данных, происходит переключение гликолиза преимущественно на анаэробный механизм с образованием лактата и активированием ЛДГ (через 10 мин инкубации). Однако в этот же период появляются нарушения в проницаемости цитоплазматической мембраны, которые проявляются в наибольшей степени после 15 мин инкубации. Результатом этого является нарастающий во времени и зависящий от концентрации токсина выход ЛДГ во внеклеточную среду.

Следует отметить, что, по-видимому, определение уровня ЛДГ в культуральной жидкости может служить удовлетворительным и простым тестом для установления чувствительности клеток к дельта-эндотоксину.

Разобщающая способность дельта-эндотоксина подтверждена методами ИК - и ЯМР-спектроскопии. Показано, что он обладает лабильными протонами, которые способен легко отдавать после растворения. Большое количество «кислых» протонов обусловлено доминирующим содержанием в составе белкового дельта-эндотоксина аспарагиновой и глутаминовой аминокислот. Вещества природного или синтетического происхождения, обладающие лабильными протонами, могут являться разобщителями процессов окислительного фосфорилирования (синтеза АТФ), происходящего в митохондриях, если они обладают способностью проникать через биологические мембраны. Возможность этого подтверждает действие дельта-эндотоксина, полученного методом щелочного гидролиза, на искусственную азолектиновую мембрану, который в концентрации 50 и 100 мкг/мл вызывал падение ее сопротивления в 2-5 раз.

ВЫВОДЫ

1. Цитопатическое действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis subsp. sotto* пропорционально его концентрации и времени контакта с клетками; связано с изменением структуры клеток, проявляющимся как нарастающая вакуолизация с последующим разрушением клеток, и различается по силе эффекта для разных клеточных линий: чувствительность клеток *HeLa* значительно выше, чем клеток *B16* и *L1210*.

2. При действии дельта-эндотоксина после 15 мин выявлено нарушение транспорта ионов K^+ , Na^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+} через цитоплазматическую мембрану клеток *HeLa*, *B16* и *L1210* вслед за ранней активацией Mg^{2+} -зависимой K^+ , Na^+ - АТФазы. Обнаружена общая для всех типов клеток закономерность уменьшения внутриклеточной концентрации K^+ , и Mg^{2+} при возрастающей концентрации Na^+ и Ca^{2+} .

3. Установлено, что дельта-эндотоксин в первые минуты действия угнетает синтез АТФ на фоне активации дыхания, действуя на культуры клеток аналогично разобщителям процессов окислительного фосфорилирования и дыхания.

4. Дельта-эндотоксин на первых этапах действия (до 15 мин) вызывает интенсификацию процесса гликолиза в клетках *HeLa*, повышая активность 3-фосфоглицерат дегидрогеназы; затем ее уровень постепенно снижается, уступая место активации лактат дегидрогеназы – фермента, характерного для анаэробного режима гликолиза.

5. Финальные этапы действия дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis subsp. sotto*, предшествующие разрушению клеток, связаны с деэнергизацией митохондрий, снижением потребления кислорода, активацией анаэробного пути гликолиза, нарушением целостности мембран и выходом лактат дегидрогеназы во внеклеточную среду.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Каменек, Д. В. Дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis* как природный ионофор: анализ методами ИК- и ЯМР-спектроскопии / Д. В. Каменек, О. Н. Ильинская, Л. М. Цофина, Л. К. Каменек, // Ученые записки Казанского государственного университета. Сер. Естеств. Науки. – 2008. – Т. 150. – Кн. 1. – С. 69–76.
2. Каменек, Д. В. Влияние дельта эндотоксина *Bacillus thuringiensis subsp. sotto* на процесс гликолиза в перевиваемых линиях клеток / Д. В. Каменек, М. С. Феклина, Л. К. Каменек, УлГУ. – Ульяновск, 2008. – 17 с. – Деп. в ВИНТИ 12.05.08 №406-В2008.
3. Феклина, М. С. Действие дельта-эндотоксина на активность клеток периферической крови *in vivo* и *in vitro* / М. С. Феклина, Д. В. Каменек, Э. К. Юнусова, Л. К. Каменек, УлГУ. – Ульяновск, 2008. – 17 с. – Деп. в ВИНТИ 12.05.08 №407-В2008.
4. Морозова, Е. П. Действие экологически-безопасного дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на интенсивность поглощения кислорода фитопатогенными бактериями / Е. П. Морозова, Д. В. Каменек, Т. А. Луковенко // Материалы симпозиума с международным участием «Актуальные проблемы адаптации к природным и экосоциальным условиям среды», Ульяновск 24-26 сентября 2002 г. – Ульяновск: – 2002. – С. 81–83.
5. Каменек, Л. К. Действие дельта эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на культуру раковых клеток / Л. К. Каменек, Д. В. Каменек // Сборник тезисов 8-й Пущинской международной школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». – Пущино, 2004. – С.114 – 115.
6. Каменек, Л. К. Органеллы клетки /Учебно-методическое пособие // Л. К. Каменек, О. Ю. Шроль, А. А. Тюльпинева, Д. В. Каменек – Ульяновск: Изд-во УлГУ, 2001. – 42 с.
7. Каменек, Д. В. Действие дельта эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на дыхательную активность раковых клеток в культуре / Д. В. Каменек, Л. К. Каменек // Материалы

- ХIII Международной научной конференции «Ферменты микроорганизмов: структура, функции, применение». – Казань, 2005. – С. 40.
8. **Каменек, Д. В.** Действие дельта эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на культуры раковых клеток. / Д. В. Каменек, Л. К. Каменек // Сборник тезисов 9-й Пушинской международной школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». – Пушино. – 2005.– С.114.
 9. **Каменек, Д. В.** Действие дельта эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на ионный транспорт в клетках HeLa и HeP / Д. В. Каменек, Л. К. Каменек, О. Н. Ильинская // Сборник тезисов 9-й Пушинской международной школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». – Пушино, 2006. – С. 374.
 10. **Каменек, Д. В.** Особенности действия дельта эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на раковые культуры клеток / Д. В. Каменек, М. А. Горшкова // Сборник материалов Международной конференции молодых ученых «Ломоносов – 2007». – Москва: Изд-во МГУ, 2007.– С. 77.
 11. . Феклина, М. С. Влияние дельта-эндотоксина на клетки периферической крови мышей *in vivo* и *in vitro* / М. С. Феклина, **Д. В. Каменек**, С. В. Куркин, Л. Д. Терехина, Д. А. Терехин // Сборник тезисов 11-й Пушинской международной школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». – Пушино, 2007. – С. 116.
 12. Феклина, М. С. Оценка влияния дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на нейтрофилы крови мышей *in vivo* и *in vitro* / М. С. Феклина, **Д. В. Каменек**, С. В. Куркин, Л. Д. Терехина, Д. А. Терехин // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Медико-физиологические проблемы экологии человека». – Ульяновск, 2007. – С. 269.
 13. Феклина, М. С. Оценка влияния дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на нейтрофилы крови мышей *in vivo* и *in vitro* / М. С. Феклина, Л.К. Каменек, О.В. Столбовская, **Д. В. Каменек** С. В. Куркин, Л. Д. Терехина // Материалы IV Всероссийской научно-технической конференции «Проблемы экологии и охраны природы. Пути их решения» , – Ульяновск: УлГУ, 2007.–С 102 – 105.
 14. **Каменек, Д. В.** Действие дельта эндотоксина *Bacillus thuringiensis* на культуры раковых клеток / Д. В. Каменек, Л. К. Каменек // Материалы II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии». – Казань: КГУ, 2008. – С. 47-48.

Просьба отзывы отправлять почтой на имя Ученого секретаря диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой З.И. (420008, Казань, Кремлевская,18, отдел аспирантуры), по факсу : (843)238-71-21 или на e-mail: zina.abramova@mail.ru.