

## БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОЗАКЛІТИННОГО ЛЕКТИНУ *BACILLUS SUBTILIS* IMB B-7724

*Н.І. Федосова<sup>1</sup>, Н.Л. Черемшенко<sup>1</sup>, К.І. Гетьман<sup>2</sup>,  
О.М. Караман<sup>1</sup>, Т.В. Симчич<sup>1</sup>, А.В. Іванченко<sup>1</sup>,  
О.І. Данилюк<sup>1</sup>, І.М. Воєйкова<sup>1</sup>, Г.В. Діденко<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології  
ім. Р.Є. Кавецького НАН України,

вул. Васильківська, 45, Київ, 03022, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

e-mail: [immunomod@ukr.net](mailto:immunomod@ukr.net)

**Мета.** Дослідження *in vitro* ряду показників біологічної активності позаклітинного лектину *B. subtilis* IMB B-7724. **Методи.** В якості продуцента позаклітинного лектину вивчали штаму *B. subtilis* IMB B-7724. Бактерії культивували на середовищі Гаузе глибинним способом на качалках. *In vitro* досліджували показники активності (гемаглютинуючої, цитотоксичної, цитолітичної) культуральної рідини та виділеного з неї лектину. Статистичну обробку результатів проводили з використанням *t*-критерію Ст'юдента. **Результати.** Отримані результати свідчать про наявність в культуральній рідині *B. subtilis* IMB B-7724 лектиноподібної речовини, яка має суттєвий цитотоксичний та цитолітичний вплив на пухлинні клітини. Максимальну гемаглютинуючу (2048  $\text{титр}^{-1}$  РГА) та цитотоксичну ( $\text{ІЦ} = 95,0 \pm 2,0\%$ ) активність виявляв лектин, отриманий з культуральної рідини на 4-ту добу росту штаму. **Висновки.** Значна гемаглютинуюча активність речовини, отриманої з культуральної рідини *B. subtilis* IMB B-7724, вказує на її приналежність до класу лектинів. Отриманий позаклітинний бактеріальний лектин *in vitro* володіє суттєвою цитотоксичною активністю по відношенню до пухлинних клітин.

**Ключові слова:** *B. subtilis* IMB B-7724, культуральна рідина, лектин, гемаглютинуюча активність, цитотоксична активність, пухлинні клітини.

Відомо, що мікроорганізми є джерелом отримання низки біологічно активних сполук. В процесі росту вони продукують і накопичують в культуральному середовищі вторинні метаболіти – екзополісахариди, антибіотики, ферменти, амінокислоти, вітаміни, регулятори росту, пігменти. Продукти синтезу мікроорганізмів знайшли застосування в різних сферах діяльності людини: харчовій промисловості, сільському господарстві, ветеринарії, медицині, фармацевтичній галузі [1–4]. Серед вторинних метаболітів є речовини з антимікробною [5, 6], антифунгальною [7], інсектицидною [8,9] активністю та ін. Привертає увагу можливість застосування речовин мікробного походження (зокрема, лектинів) як засобів біотерапії раку. Лектини – речовини білкової природи, які здатні специфічно зв'язувати вуглеводні компоненти на мембранах клітин (в т.ч. і пухлинних). Джерелом виділення лектинів можуть бути практично всі живі організми: рослини, тварини, мікроорганізми. Серед бактерій в якості продуцентів лектинів на особливу увагу заслуговують представники роду *Bacillus*, які здатні накопичувати позаклітинні лектини в середо-

вищі росту, що значно спрощує технологічний процес їх одержання [10]. Проведені раніше співробітниками Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАНУ експериментальні дослідження показали, що позаклітинні лектини штаму *B. subtilis* B-7025 володіють цитотоксичними властивостями по відношенню до пухлинних клітин (ПК) [11]. На основі цих лектинів була створена протипухлинна вакцина, ефективність якої підтверджена як в експериментальних [12], так і в клінічних [13–15] дослідженнях.

Однак відомо, що ефективність синтезу біологічно активних речовин, їх склад та властивості суттєво відрізняються у представників різних штамів [10, 16], в тому числі і тих, що належать до одного виду мікроорганізмів. Тому завданням нашої роботи стало визначення ряду біологічних характеристик лектину, отриманого з КР іншого штаму бактерій – *B. subtilis* ІМВ В-7724, та оцінка можливості подальшого використання лектину як речовини з протипухлинною активністю.

**Мета роботи:** дослідження *in vitro* ряду показників біологічної активності позаклітинного лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724.

**Матеріали і методи.** Як продуцент позаклітинного лектину використовували штам *B. subtilis*, депонований в колекції Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером ІМВ В-7724 (Свідоцтво про первісне депонування штаму мікроорганізму від 12.03.2018 р.) [17].

Культивування мікроорганізмів здійснювали в оптимізованому для синтезу лектинів напівсинтетичному середовищі Гаузе: бульйон Хоттінгера – 30 мл; пептон – 5,0 г; NaCl – 5,0 г; галактоза – 10,0 г, вода дистильована – 1 л, рН – 6,8–7,0.

Як посівний матеріал використовували культуру в логарифмічній фазі росту, яку вирощували на скошеному агаризованому середовищі Громико (МПБ:суло-агар у співвідношенні 1:1) при температурі 37°C протягом 24 год. Гомогенну культуру посівного матеріалу стерильною піпеткою вносили у колби Ерленмейера (робочий об'єм 0,75 л) із середовищем Гаузе в кількості 7–10% від об'єму середовища.

Бактерії вирощували протягом 6 діб при 37°C глибинним способом на качалках (швидкість струшування 160 об/хв). Проби КР для визначення гемаглютинуючої та цитотоксичної активності відбирали кожні 24 год протягом всього терміну культивування. Бактеріальні клітини відокремлювали центрифугуванням при 6000 об/хв протягом 30 хв. Для подальшої роботи використовували надосадову рідину. Контроль чистоти центрифугату КР здійснювали мікроскопічно.

Процес виділення з КР і очищення активної речовини за методом [18] включав наступні етапи: *осадження сульфатом амонію* – проводили насичення (до 70%) КР сульфатом амонію, витримували при температурі +4°C протягом 20 год, центрифугування при 5000 об/хв.; *діаліз осаду* проти дистильованої води – проводили при температурі +4°C протягом 24–30 год; *звільнення від баластних термолабільних білків* – при нагріванні до 70°C протягом 30 хв; *стерилізація через бактеріальний фільтр* з розміром пор 0,2–0,45 мк; *ліофілізація фільтрату* в діапазоні температур від

–32 до +24°C. Готовий препарат у вигляді порошку підлягає тривалому зберіганню при –20°C.

Гемаглютинуючу активність (ГАА) оцінювали за допомогою реакції гемаглютинації (РГА) з використанням 2% суспензії оброблених трипсином і фіксованих глутаровим альдегідом еритроцитів кроля методом двократних серійних розведень в полістирольних мікропланшетах з U-подібними лунками при кімнатній температурі [19]. ГАА визначали як останнє розведення, при якому спостерігається РГА, і виражали як титр<sup>-1</sup> РГА. Контролем аутоаглютинації еритроцитів була 2% їх суспензія у забуференому фізіологічному розчині за відсутності досліджуваної речовини.

Для дослідження *in vitro* цитотоксичної і цитолітичної активності використовували клітини асцитної форми аденокарциноми Ерліха. Цитотоксичну активність визначали в МТТ-тесті [20, 21]. Суспензію пухлинних клітин (ПК) висаджували на 96-лункові планшети в концентрації  $1 \times 10^5$  кл/на лунку в 100 мкл повного ростового середовища: RPMI-1640 («SIGMA», США), 10% сироватки ембріонів теляти («SIGMA», США), 40 мкг/мл гентаміцину. Через 24 год в лунки вносили отриманий на різні доби культивування центрифугат КР, після чого клітини інкубували за стандартних умов (при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>). Як контроль використовували лунки лише з середовищем культивування або лише з ПК. Всі проби ставили в 3-х паралелях. Після завершення інкубації вносили в лунки по 20 мкл розчину МТТ (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue; SIGMA, США) в концентрації 5 мг/мл на 4 год. Для візуалізації результатів реакції середовище RPMI-1640 видаляли і додавали по 140 мкл 50% розчину ДМСО (диметилсульфоксид; SERVA). Вимірювання проводили на автоматичному імуноферментному планшетному аналізаторі StatFax 2100 (США) при  $\lambda=540$  нм проти  $\lambda=630$  нм. Індекс цитотоксичності (ІЦ) розраховували за формулою:

$$\text{ІЦ} = 1 - \frac{\text{ОГ}_{\text{ПК+ЦФ КР}} - \text{ОГ}_{\text{С}}}{\text{ОГ}_{\text{ПК}} - \text{ОГ}_{\text{С}}} \times 100\%$$

де:  $\text{ОГ}_{\text{ПК+ЦФ КР}}$  – оптична густина в лунках з ПК та центрифугатом КР;  
 $\text{ОГ}_{\text{ПК}}$  – оптична густина в лунках з ПК без додавання центрифугату КР;  
 $\text{ОГ}_{\text{С}}$  – оптична густина в лунках лише з середовищем культивування.

Для оцінки цитолітичної активності планшети з пухлинними клітинами ( $1 \times 10^5$  клітин/на лунку в 100 мкл повного ростового середовища) та центрифугатом КР (цільний та в розведеннях 1:2, 1:4) інкубували протягом 2 год при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>, після чого проводили підрахунок загальної кількості клітин в камері Горяєва [22] та обраховували відносну кількість (%) лізованих клітин.

Визначення гемаглютинуючої та цитотоксичної активності лектину, отриманого з КР на відповідні доби росту *B. subtilis* ІМВ В-7724, здійснювали, як описано вище для центрифугату КР. В усіх дослідженнях використовували концентрацію активної речовини 1 мг/мл.

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики [23]. Вірогідність різниці між контрольними та дослідними вимірами оцінювали за *t*-критерієм Ст'юдента. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними показниками при  $p < 0,05$ .

**Результати.** Характерною властивістю, яка свідчить про приналежність речовини до класу лектинів, є здатність до аглютинації різних типів клітин завдяки специфічному зв'язуванню з вуглеводними детермінантами на їх поверхні. Тому першим етапом нашого дослідження було вивчення ГАА зразків центрифугату КР, отриманих на різні доби росту *B. subtilis* ІМВ В-7724.

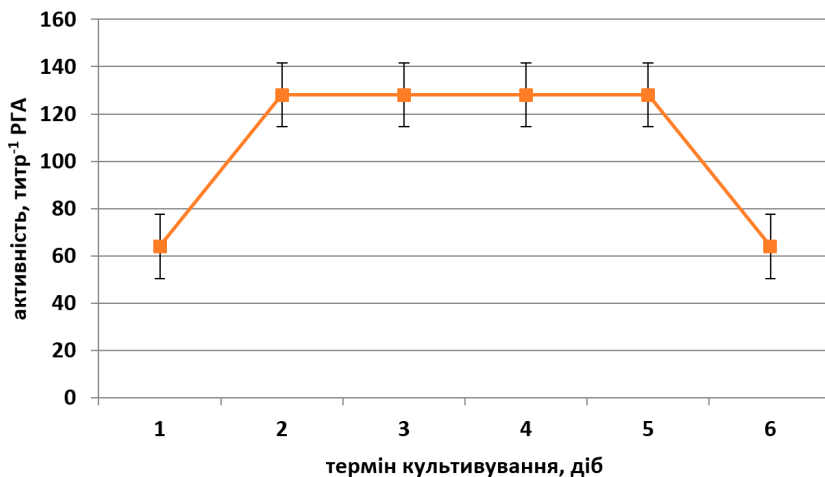


Рис. 1. Динаміка гемаглютинуючої активності культуральної рідини *B. subtilis* ІМВ В-7724

Як видно з рисунку 1, в культуральній рідині *B. subtilis* ІМВ В-7724 присутня речовина з суттєвою ГАА. Динаміка накопичення такої лектиноподібної речовини значною мірою залежала від термінів культивування штаму. На 1-у добу росту активність КР складала 64 титр<sup>-1</sup>РГА. Максимальну ГАА (128 титр<sup>-1</sup>РГА) спостерігали в зразках КР, отриманої на 2–5 доби росту *B. subtilis* ІМВ В-7724.

Враховуючи відомості щодо протипухлинної активності лектинів, зокрема і бактеріального походження [11, 18], наступним етапом нашого дослідження стало визначення *in vitro* цитотоксичної активності отриманих зразків КР *B. subtilis* ІМВ В-7724 по відношенню до клітин аденокарциноми Ерліха. Показано, що речовина, яка знаходилася в КР, призводила до загибелі більшої частини пухлинних клітин вже протягом 1 год: значення ІЦ коливались в межах 78,4–94,3% залежно від доби росту мікроорганізму (рис. 2). Подовження терміну інкубації до 2-х год сприяло зростанню ІЦ в 1,1–1,2 рази (хоча і статистично недостовірному). Подальше збільшення (до 24 год) часу впливу КР на пухлинні клітини не супроводжувалось суттєвим підвищенням показників цитотоксичної активності. При збільшенні терміну інкубації відмічали загибель практично всіх пухлинних клітин незалежно від того, на яку добу росту мікроорганізму отримували КР: показники ІЦ коливались в діапазоні 92,5–97,4% (2 год інкубації) та 94,1–97,9% (24 год інкубації). Максимальну цитотоксичну активність незалежно від тривалості терміну інкубації виявляла КР, отримана на 4-у добу росту *B. subtilis* ІМВ В-7724 (ІЦ = 94,3, 97,4 та 97,9% відповідно) (рис. 2).

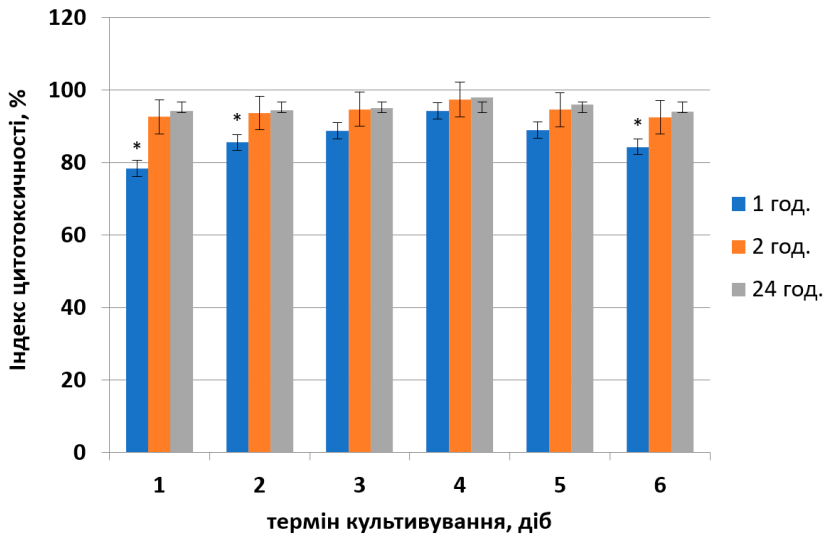


Рис. 2. Динаміка цитотоксичної активності культуральної рідини *B. subtilis* ІМВ В-7724 по відношенню до пухлинних клітин  
Примітки: \*  $p < 0,05$  – при порівнянні з показниками індексу цитотоксичності КР, отриманої на 4-у добу росту.

Потрібно відмітити, що КР *B. subtilis* ІМВ В-7724 крім цитотоксичного виявляла і цитолітичний вплив на пухлинні клітини (табл. 1). Інкубація клітин аденокарциноми Ерліха протягом 1 год з цільним центрифугатом КР призводила до лізису практично всіх пухлинних клітин. Зниження концентрації активної речовини в КР (шляхом її розведення у співвідношенні 1:2 та 1:4) дещо зменшувало цитолітичну активність, але на загальну динаміку змін показників не впливало (табл. 1).

Таблиця 1  
Цитолітична активність культуральної рідини *B. subtilis* В-7724 по відношенню до пухлинних клітин (кількість лізованих клітин, %)

Доба росту	Розведення культуральної рідини		
	нерозведений	1:2	1:4
1	62,5±1,9	8,7±0,5	7,5±1,8
2	80,0±1,5	20,0±2,9	32,5±2,4
3	85,5±1,0	69,0±3,6	35,1±1,8
4	94,1±0,9	80,0±2,0	49,5±1,1
5	93,8±2,7	76,5±3,2	46,5±3,1
6	92,0±6,3	76,0±1,5	39,5±2,0

Таким чином, результати проведеного дослідження свідчать про те, що в КР штаму *B. subtilis* ІМВ В-7724 присутня лектиноподібна речовина, яка здійснює суттєвий цитотоксичний та цитолітичний вплив на пухлинні клітини. Це дає можливість говорити про перспективність проведення подальшого дослідження – виділення позаклітинного бактеріального лектину та оцінки його біологічних властивостей.

Лектин з КР *B. subtilis* ІМВ В-7724 отримували за методом [18], який був розроблений і стандартизований для виділення сіалоспецифічних лектинів та дозволяє отримати препарат з високим ступенем очищення. Отриманий готовий препарат мав вигляд аморфного порошку бурого кольору, який добре розчиняється у воді та буферних розчинах (забуференому фізіологічному розчині, Трис-НСІ).

З метою визначення оптимального терміну культивування мікроорганізму для отримання достатньої кількості лектину була проведена оцінка динаміки його накопичення в процесі росту *B. subtilis* ІМВ В-7724. Як видно з рисунку 3, кількість отриманої речовини поступово зростала до 4-ї доби росту штаму (80 мг/л), в подальшому відмічали поступове її зменшення до 45 мг/л (на 6-у добу).

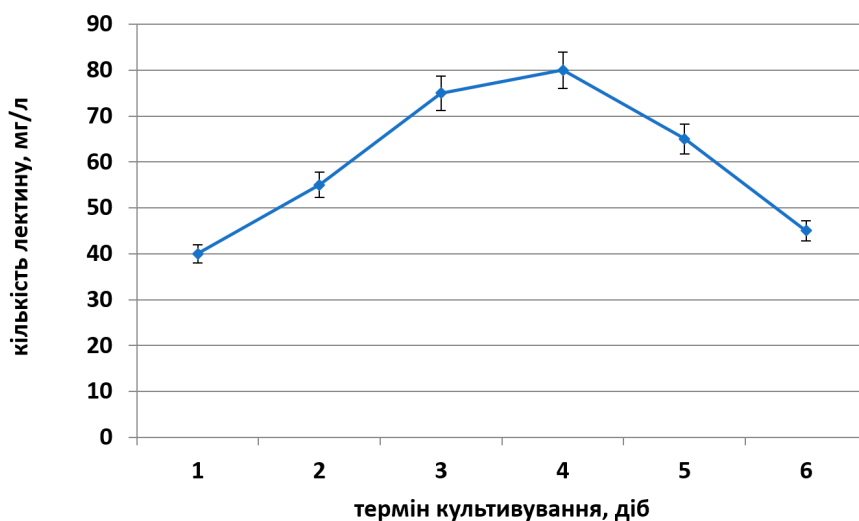


Рис. 3. Динаміка синтезу лектину в процесі росту штаму *B. subtilis* ІМВ В-7724

Проведена оцінка гемаглютинуючої та цитотоксичної активності отриманої речовини показала, що з КР *B. subtilis* ІМВ В-7724 дійсно був виділений лектин з вираженою протипухлинною активністю (табл. 2). Незважаючи на те, що показники ГАА очищеного лектину суттєво перевищували такі для центрифугату КР на відповідні доби росту штаму, динаміка наростання і спаду активності була схожою: максимальні значення характерні для речовини, синтезованої бактеріями на 3–4 доби росту (2048 титр<sup>-1</sup>РГА). Аналогічними були і зміни показників цитотоксичного впливу на клітини аденокарциноми Ерліха (табл. 2). Потрібно відмітити, що виділений нами лектин виявляв лише цитотоксичні по відношенню до пухлинних клітин властивості. Визначення цитолітичної активності показало, що вплив жодного з досліджених зразків отриманого лектину не призводив до значного лізису пухлинних клітин (табл. 2).

Таким чином, отримані результати підтверджують, що виділена нами з КР речовина є лектином; максимальну кількість найбільш активного за ГАА та цитотоксичною активністю позаклітинного бактеріального лектину (80 мг/л) можна отримати на 4-у добу росту *B. subtilis* ІМВ

В-7724. Тому, для подальшого дослідження його фізико-хімічних властивостей доцільно використовувати лише речовину, отриману з культуральної рідини на 4-у добу росту штаму.

Таблиця 2

**Динаміка показників біологічної активності лектину (1 мг/мл), отриманого з культуральної рідини *B. subtilis* ІМВ В-7724**

Доба росту	Показники біологічної активності		
	гемаглютинуюча, титр <sup>-1</sup> РГА	цитотоксична, %	цитолітична, %
1	1024	48,7±0,5*	2,5±0,6
2	1024	73,4±2,1*	2,7±0,4
3	2048	85,0±1,9	4,1±1,5
4	2048	95,0±2,0	4,2±0,1
5	1024	87,3±3,2	3,3±0,8
6	1024	69,5±0,5*	2,5±1,0

Примітки: \* –  $p < 0,05$  в порівнянні з відповідним показником активності на 4-ту добу росту.

**Обговорення.** Цитотоксична активність по відношенню до трансформованих клітин різного походження позаклітинних лектинів представників різних штамів роду *Bacillus* продемонстрована в роботах [10–12, 24]. Таку властивість бактеріальних лектинів було використано, зокрема, при розробці і створенні протипухлинних вакцин для імунотерапії онкологічних хворих [25, 26]. Було встановлено, що інкубація як КР бактерій *B. subtilis* В-7025, так і виділеного з неї лектину з клітинами різних штамів експериментальних пухлин приводила до аглютинації та подальшого лізису останніх. Вивчення динаміки накопичення лектину в КР в процесі росту мікробної культури дозволило виявити наявність двох піків гемаглютинуючої та цитотоксичної активності. При визначенні ГАА та цитотоксичної активності відмічали їх максимуми на 1-у та 3–5-у доби. Таку динаміку автори пов'язували з двофазним циклом розвитку *B. subtilis* В-7025, при якому спочатку відбувається інтенсивне накопичення біомаси та незначна продукція біологічно активних речовин. В другій фазі розвитку культури зменшення кількості поживних речовин в середовищі обумовлює уповільнення накопичення біомаси та збагачення КР продуктами життєдіяльності мікроорганізмів. Саме ця фаза супроводжується максимальним накопиченням речовини з гемаглютинуючими і цитотоксичними властивостями [11]. Подібні результати були отримані і при дослідженні динаміки синтезу екзогенних лектинів сульфатредуючими бактеріями *Thermodesulfobacterium mobile* ВКМ-1128: показана пряма кореляція між наростанням біомаси і синтезом екзогенних лектинів в період експоненціальної та на початку стаціонарної фази росту популяції [27].

За результатами наших досліджень динаміка накопичення біологічно активної речовини (лектину) в КР *B. subtilis* ІМВ В-7724 аналогічна описаній раніше для *B. subtilis* В-7025 [11]. Максимальні показники ГАА та цитотоксичної активності отриманого лектину відмічали, зокрема, на 4-ту добу росту штаму. Однак, потрібно відмітити, що при цьому кількість синтезованого лектину була значно більшою при дослідженні штаму *B. subtilis* ІМВ В-7724 (60–80 мг/л) порівняно з *B. subtilis* В-7025

(10–13 мг/л). Це свідчить про перспективність використання *B. subtilis* ІМВ В-7724 в якості продуцента позаклітинного бактеріального лектину.

В наших дослідженнях культуральна рідина *B. subtilis* ІМВ В-7724 по відношенню до пухлинних клітин виявляла окрім цитотоксичної, ще й цитолітичну активність. Остання, вірогідно, обумовлена здатністю бактерій роду *Bacillus* продукувати не тільки лектиноподібні речовини, але й сполуки з ферментативною активністю, зокрема, протеолітичною [28–30] та фібринолітичною [31]. Виходячи з викладеного, в процесі виділення з КР *B. subtilis* ІМВ В-7724 лектину з перспективою його використання не тільки *in vitro*, але і в умовах організму необхідно враховувати, що даний мікроорганізм здатен продукувати позаклітинні речовини з ферментативними властивостями та приділяти пильну увагу процесу очищення готового препарату.

Таким чином, виділена з культуральної рідини *B. subtilis* ІМВ В-7724 речовина виявляє значну гемаглютинуючу активність, що вказує на її приналежність до класу лектинів. Водночас ця речовина справляє цитотоксичну дію по відношенню до пухлинних клітин. Динаміка змін показників біологічної активності (гемаглютинуючої, цитотоксичної) свідчить про доцільність виділення лектинів з культуральної рідини *B. subtilis* ІМВ В-7724 саме на 4-ту добу росту мікробної культури.

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ЛЕКТИНА *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7724

*Н.И. Федосова<sup>1</sup>, Н.Л. Черемшенко<sup>1</sup>, Е.И. Гетьман<sup>2</sup>,  
О.М. Караман<sup>1</sup>, Т.В. Симчич<sup>1</sup>, А.В. Иванченко<sup>1</sup>,  
О.И. Данилюк<sup>1</sup>, И.М. Воейкова<sup>1</sup>, Г.В. Диденко<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии  
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины,  
ул. Васильковская, 45, Киев, 03022, Украина

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

### Резюме

**Цель.** Изучение *in vitro* ряда показателей биологической активности внеклеточного лектина *B. subtilis* ІМВ В-7724. **Методы.** В качестве продуцента лектина использовали штамм *B. subtilis* ІМВ В-7724. Бактерии культивировали на среде Гаузе глубинным способом на качалках. *In vitro* изучали показатели активности (гемаглютинирующей, цитотоксической, цитолитической) как культуральной жидкости, так и выделенного из нее лектина. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента. **Результаты.** Полученные результаты свидетельствуют о присутствии в культуральной жидкости *B. subtilis* ІМВ В-7724 лектиноподобного вещества, которое оказывает существенное цитотоксическое и цитолитическое влияние на опухолевые клетки. Максимальную гемаглютинирующую (2048 титр<sup>-1</sup> РГА) и цитотоксическую (ИЦ=95,0±2,0%) активность проявлял лектин, полученный на 4-е сутки роста культуры. **Выводы.** Значительная гемаглютинирующая активность вещества, выделенного из культуральной жидкости *B. subtilis* ІМВ В-7724, указывает на его принадлежность к классу лектинов. Полученный внекле-



точный бактериальный лектин обладает существенной цитотоксической активностью *in vitro* по отношению к клеткам экспериментальной опухоли.

*Ключевые слова:* *B. subtilis* IMB B-7724, культуральная жидкость, лектин, гемагглютинирующая активность, цитотоксическая активность, клетки опухоли.

## BIOACTIVITY OF THE *BACILLUS SUBTILIS* IMV B-7724 EXTRACELLULAR LECTIN

*N.I. Fedosova*<sup>1</sup>, *N.L. Cheremshenko*<sup>1</sup>, *K.I. Getman*<sup>2</sup>,  
*O.M. Karaman*<sup>1</sup>, *T.V. Symchych*<sup>1</sup>, *A.V. Ivanchenko*<sup>1</sup>,  
*O.I. Danyliuk*<sup>1</sup>, *I.M. Voeykova*<sup>1</sup>, *G.V. Didenko*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine,  
45 Vasylkivska Str., Kyiv, 03022, Ukraine*

<sup>2</sup>*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine*

### Summary

**Aim:** to evaluate *in vitro* bioactivity of extracellular lectin of *B. subtilis* IMV B-7724. **Methods.** The strain *B. subtilis* IMV B-7724 was used as a lectin producer. *B. subtilis* IMV B-7724 was cultured in stirred liquid Gause medium. Bioactivity (hemagglutinating, cytotoxic and cytolytic) of both the samples of the culture broth and lectin was studied *in vitro*. The statistical analysis was made using Student's t-test. **Results.** The results indicate the presense in the *B. subtilis* IMB B-7724 culture broth of lectins-like substanses with the pronounced cytotoxic and cytolytic effect on tumor cells. Lectin obtained on the 4th day of the culture growth had the highest hemagglutinating (2048 titer<sup>-1</sup>) and cytotoxic (IC = 95.0 ± 2.0%) activity. **Conclusion.** The significant hemagglutinating activity of substance isolated from the *B. subtilis* IMB B-7724 culture broth indicates its belonging to the class of lectins. The extracellular bacterial lectin has significant cytotoxic activity *in vitro* against the experimental tumor cells.

**Keywords:** *B. subtilis* IMV B-7724, culture broth, lectin, hemagglutinating activity, cytotoxic activity, cancer cells.

1. Tkachenko A.F., Beyko N.E., Khomenko A.I., et al. [Mutant strain of *Bacillus subtilis* IFBG MK-1 with increased tryptophan synthesis]. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(6):105–12. Russian.
2. Zabokritskiy N.A. [The biologically active substances produced probiotic microorganisms of the genera *Bacillus* and *Lactobacillus*]. *Health and Education Millennium*. 2015; 17(3):80–90. Russian.
3. Nikitenko T.G., Zubareva I.M., Zhernosekova IV, Vinnikov A.I. [Influence of *Streptomyces* metabolites on the physiological activity of corn]. *Bull. Biology and Medicine*. 2017; 1(135):242–6. Ukrainian.
4. Pyroh T.P., Shulyakova M.O., Shevchuk T.A., Sofilkanych A.P. [Biotechnological potential of bacteria of the genus *Rhodococcus* and their metabolites]. *Biotechnology*. 2012; 5(2):51–67. Ukrainian.
5. Polishchuk L.V., Bambura O.I., Lukyanchuk V.V. [Antibiotic activity of streptomycetes]. *Mikrobiol. Z.* 2012; 74(4):45–51. Ukrainian.

6. Mikhaylova N.A., Grinko O.M. [Bacteria of the genus *Bacillus* - producers of biologically active substances with antimicrobial action]. J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2010; 3:85–9. Russian.
7. Elkahoui S., Djébalin N., Karkouch I., et al. Mass spectrometry identification of antifungal lipopeptides from *Bacillus sp.* BCLRB2 against *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Appl. Biochem. Microbiol. 2014; 50(2):161–5.
8. Ennouri K., Ben Ayed R., Ben Hassen H., et al. Improvement of the production of entomopathogenic proteases of *Bacillus thuringiensis*. Tunisian J. Plant Protect. 2015; 10:95–103.
9. Boyko M.V., Patyka N.V., Patyka T.I. [Estimation of *Bacillus thuringiensis* performance on different nutrient media]. Microbiology and Biotechnology. 2017; 1(37):16–22. Ukrainian.
10. Podgorsky V.S., Kovalenko E.A., Karpova I.S., et al. [Extracellular lectins of saprophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus* (review)]. Applied Biochem. Microbiol. 2014; 50(3):256–63. Russian.
11. Potebnya G.P., Tanasienko O.A., Lisovenko G.S., Savtsova Z.D. [Use of cytotoxic lectins of bacterial origin in immunotherapy of experimental tumors]. In: Structure and biological activity of bacterial biopolymers. Ed. VK Pozur. K: Vyd-polygr Center «Kyiv University». 2003:235–304. Ukrainian.
12. Tanasienko O.A., Rudyk M.P., Pozur V.V., Potebnya G.P. [Influence of bacterial lectins on some reactions of nonspecific immunity in sarcoma 37 transplanted mice]. Exp Oncol. 2010; 32(4):254–257. Ukrainian.
13. Shalimov S.A., Kolesnik E.A., Grinevich Y.A., et al. [Adjuvant immunotherapy in treatment of patients with colorectal cancer]. Oncology. 2003; 5(2):101–6. Russian.
14. Zajciuk V.V., Vereshchako R.I., Cheshuk V.E., et al. [Efficacy of combination of anticancer autovaccine with standard anticancer treatment in breast cancer (analysis of 10-year surveillance data)]. Oncology. 2015; 17(1):47–54. Russian.
15. Chorny V.O., Potebnya G.P., Lisovenko G.S., et al. [Outlooks of use of an anticancer autovaccine in the treatment of patients with extensive stomach cancer]. Oncology. 2003; 5(2):107–10. Ukrainian.
16. Lakhtin V.M., Lakhtin M.V., Pospelova V.V., Shenderov B.A. Lactobacilli and bifidobacteria lectins as possible signal molecules regulating intra- and inter-population bacteriobacteria and hostbacteria relationships. Part I. Methods of bacterial lectin isolation, physico-chemical characterization and some biological activity investigation. Microbial Ecology in Health and Disease. 2006; 18:55–60.
17. Chekhun V.F., Didenko G.V., Cheremshenko N.L., et al. [Strain of bacteria *Bacillus subtilis* IMB B-7724 – producer of cytotoxic substances with antitumor activity (Pat. №131824 UA)]. Publ. 25.01.2019. Bul. №2. Ukrainian.
18. Podgorsky V.S [The method for the obtainmen of bacterial lectin, specific to sialic acids (Pat. № 1791 UA)]. Publ. 23.01.1991. Bul. №1. Ukrainian.
19. Stefanov A.V. Preclinical research of medicinal products: Methodical recommendations. K. : Avicenna, 2002. 568 p. Russian.
20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol Methods 1983; 65:55–63.
21. Wilson A.P. Cytotoxicity and viability assays in animal cell culture: A practical approach. 3rd ed. Ed. JRW Masters. Oxford University Press: Oxford; 2000. 165 p.

22. Claus J. *Lymphocytes Methods*. M.: Mir; 1990. 395 p.
23. Sidenko A.B., Vishnyakov V.V., Isaev S.M. *Theory of statistics*. M.: MAX-Press; 2011. 343 p. Russian.
24. Podgorsky V.S., Kovalenko E.A., Getman E.I., et al. [Lectin activity of antitumor substances synthesized by *Bacillus subtilis* B-7025]. *Mikrobiol. Z.* 2002; 64(5):10–16. Russian.
25. Tanasienko O.A., Rudik M.P., Titova G.P., Potebnya G.P. [The induction of antitumor resistance in mice by cytotoxic lectin of bacterial origin]. *Microbiology and Biotechnology*. 2010; 2(10):59–65. Ukrainian.
26. Potebnya G.P., Tanasienko O.A., Titova G.P., et al. [Specificity and biological activity of cytotoxic lectins synthesized by *Bacillus subtilis* B-7025]. *Exp. Oncol.* 2002; 24(2):150–2. Ukrainian.
27. Kobelev A.V., Vdovina T.V., Bagaeva T.V. [Dependence of lectin biosynthesis on the growth of sulphate-reducing bacteria and nutrient medium components]. *Bull. Univ. Technol.* 2017; 20(11):125–129. Russian.
28. Vanitha N., Rajan S., Murugesan A.G. Optimization and production of alkaline protease enzyme from *Bacillus subtilis* 168 isolated from food industry waste. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2014; 3(6):36–44.
29. Contesini F.J., Melo R.R., Sato H.H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2018; 38(3):321–34.
30. Mina Kim, Jin-Beom Si, Lebaka Veeranjaneya Reddy, Young-Jung Wee. Enhanced production of extracellular proteolytic enzyme excreted by a newly isolated *Bacillus subtilis* FBL-1 through combined utilization of statistical designs and response surface methodology. *RSC Adv.* 2016; 6:51270–8.
31. Nydyalkova N.A., Matselyukh O.V., Varbanets L.D. [Optimization of the medium for the synthesis of fibrinolytic peptidase *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324]. *Biotechnologia Acta.* 2012; 5(4):74–81. Ukrainian.

Отримано 27.02.2019