

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю.

Кафедра біотехнології і мікробіології.

Освітній ступінь магістр.

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія».

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Промислова Біотехнологія».

(назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри біотехнології і мікробіології

Віктор СТАБНИКОВ

« 31 » жовтня 2022 року

ЗАВДАННЯ

НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Коваль Єлизаветі Вікторівні

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема проекту (роботи) « Вплив умов культивування *Bacillus subtilis* на цитотоксичну активність синтезованих позаклітинних лектинів»

керівник проекту (роботи) Красінько Вікторія Олегівна, к.т.н., доц.,

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затвержені наказом закладу вищої освіти від 31 жовтня 2022 року № 782-кв

2. Строк подання студентом проекту (роботи) _____

3. Вихідні дані до проекту (роботи) біологічний агент: *Bacillus subtilis*, цільовий продукт: лектин

4. Зміст розрахунково-пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити) РОЗДІЛ 1. ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК БІОЛОГІЧНИХ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛЕКТИНІВ І ЇХ ЦИТОТОКСИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ. РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.

5. Перелік графічного матеріалу

6. Дата видачі завдання « 01 » листопада 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
1.	Взаємозв'язок біологічних та фізико-хімічних властивостей лектину і їх цитотоксичний потенціал	01.10.2022- 15.10.2022	
2.	Матеріаль і методи досліджень	16.10.2022- 22.10.2022	
3.	Результати досліджень та їх обговорення	23.10.2022- 30.11.2022	
4.	Проект АНД	19.12.2022- 10.01.2023	

Здобувач _____ Єлизавета КОВАЛЬ

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Керівник роботи _____ Вікторія КРАСІНЬКО

(підпис)

(прізвище та ініціали)

РЕФЕРАТ

У даній кваліфікаційній роботі з'ясовано, що джерелом лектинів з цитотоксичною активністю, можуть бути всі царства живої природи, а саме тварини, рослини, гриби та бактерії.

У літературному огляді встановлено, що найкращим та найзручнішим є царство бактерій для виробництва лектина з цитотоксичними властивостями.

Тому, дана кваліфікаційна робота присвячена дослідженню впливу інтенсивності перемішування і аерації на зміни значень рН, оптичної густини та гемаглютинуючої активності культуральної рідини штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 при його вирощуванні у лабораторному ферментері.

У даній роботі було визначено і порівняно гемаглютинуючу активність, вуглеводну специфічність і цитотоксичні властивості відповідних зразків препарату, виділених з культуральної рідини продуцента.

Встановлено, що швидкий ріст штаму і збільшення гемаглютинуючої активності культуральної рідини при культивуванні у лабораторному ферментері відбувались в умовах максимального рівня масообміну із подачею повітря аерації у культуральну рідину через барботер до досягнення максимального значення оптичної густини культуральної рідини і наступного поступового обмеження масообміну при подальшому культивуванні.

Кваліфікаційна робота викладена на 60 стор. друкованого тексту, містить 1 таблицю, 4 рисунки і складається з вступу, трьох розділів, висновків, списку використаної літератури 80 джерел).

Ключові слова: позаклітинний бактеріальний лектин, *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724, цитотоксичні властивості, токсичність, вуглеводна специфічність, гемаглютинація.

ЗМІСТ

РЕФЕРАТ

ВСТУП

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК БІОЛОГІЧНИХ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛЕКТИНІВ І ЇХ ЦИТОТОКСИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ.....11

1.1. Біологічні властивості лектинів.....11

1.1.1. Рослинні лектини.....12

1.1.2. Грибні лектини13

1.1.3. Тваринні лектини.....14

1.1.4. Мікробні лектини.....16

1.2. Фізико-хімічні властивості та біологічна активність позаклітинних
лектинів.....18

1.3. Цитотоксичні лектини в онкології.....19

1.3.1 Оцінка токсичності лектину.....21

1.4. Огляд перспективних продуцентів для одержання позаклітинного
цитотоксичного бактеріального лектину22

1.5. Вплив умов культивування на бактеріальних лектинів23

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....26

2.1 Матеріали досліджень.....26

2.1.1.Штам мікроорганізму.....26

2.1.2 Клітинні лінії.....26

2.1.3 Експериментальна модель пухлинного росту.....26

2.1.4 Експериментальні тварини26

2.1.5.Отримання посівного матеріалу.....27

2.1.6.Отримання рідкого інокуляту.....27

2.1.7.Конструкція ферментера у якому відбувалося культивування.....27

2.1.8.Підготовка ферментера до процесу культивування.....28

2.1.9.Способи подачі аеруйочого повітря.....	28
2.2.Методи досліджень.....	30
2.2.1.Визначення метаболічної активності та нагромадження біомаси.....	30
2.2.2.Визначення гемаглютинуючої активності.....	30
2.2.3.Визначення вуглеводної специфічності.....	31
2.2.4.Отримання суспензії пухлинних клітин асцитного раку Ерліха.....	31
2.2.5.Визначення цитотоксичної активності (МТТ-тест) по відношенню до пухлинних клітин.....	31
2.2.6.Визначення специфічності до муцину підщелепної залози бика.....	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	33
3.1.Динаміка змін показників рН, ОГ та ГАА культуральної рідини штаму <i>Bacillus subtilis</i> ІМВ В-7724.....	33
3.1.1.Ферментації за 1-м і 2-м варіантами.....	33
3.1.2.Ферментація за 3-м варіантом.....	35
3.2.Дослідження препаратів лектину на цитотоксичну і гемаглютинуючу активність та вуглеводну специфічність.....	36
3.3.Обговорення.....	38
ВИСНОВКИ.....	42
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	
ДОДАТКИ	

ДОДАТКИ ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СИМВОЛІВ

ГАА – гемаглютинуюча активність

КР – культуральна рідина

РГА – реакція гемаглютинації

ОГ – оптична густина

ЦФКР – центрифугат культуральної рідини

ПЦЛ – позаклітинний цитотоксичний лектин

ГАО – гемаглютинуючі одиниці

ІНФ – інтерферон

ПК – пухлинні клітини

Щ – індекс цитотоксичності

ВСТУП

Лектини є специфічними білками, які здатні вибірково зв'язувати вуглеводи та вуглеводні компоненти глікокон'югатів різної природи. Лектинами прийнято вважати лише ті вуглеводзв'язувальні білки, які мають неіммунне походження (не є антитілами) та не володіють специфічною глікоферментативною активністю. Лектини присутні в будь-якій живій системі і завдяки своїй високій вуглеводній специфічності відіграють провідну роль у процесах вуглеводно-білкового розпізнавання та мають поліфункціональні властивості (мітогенні, імуномодулюючі, протипухлинні) [1].

Значну увагу дослідників у галузі не тільки імунології, але й онкології вже тривалий час привертають протипухлинні властивості багатьох лектинів. На сьогодні показано, що пряма протипухлинна дія лектинів може реалізовуватися через різні механізми: апоптоз, аутофагія, інгібування росту пухлини [2,3,4]. Найбільш вивченими з погляду протипухлинних та імуномодулюючих ефектів є лектини рослин. Виражений цитотоксичний ефект проти клітин різних пухлин (рак молочної залози, печінки, легені, меланома) продемонстрований для лектинів омели та квасолі звичайної [5, 6], канавалії мечоподібної та софори [7]. У дослідженнях *in vitro* та *in vivo* показана антипроліферативна активність лектинів, отриманих з деяких грибів [8, 9]. Меншою мірою досліджено цитотоксичні властивості тваринних лектинів [10].

Бактерії також можуть бути джерелом для отримання лектинів. Особливу увагу привертають позаклітинні лектини, оскільки їх виділення не потребує накопичення значної кількості мікробної біомаси. Серед речовин мікробного походження на сьогоднішній день найбільш вивченими є лектини сапрофітних штамів бактерій роду *Bacillus*, зокрема *B. subtilis*, які здатні накопичувати позаклітинні лектини в середовищі росту, що значно спрощує технологічний процес одержання лектину. Також бактеріальні лектини є термостабільні, стійкі до дії рН,

					НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Коваль Є.В.			ВСТУП	Лім.	Арк.	Акрушів
Керівник		Красінько В.О.					8	60
Консультант						Кафедра БТМ		
Зав.каф.		Стабніков В.Г.						
					8			

детергентів та тривалого зберігання. Бактеріальним лектинам притаманна рідкісна вуглеводна специфічність до сіалових кислот та сіаловмісних глікокон'югатів, що і обумовлює перспективність їх використання [1]. А з точки зору біотехнологічного виробництва, процес отримання бактеріальних лектинів досить простий і можливий для стандартизації.

Отримання біологічно активних речовин мікроорганізмів, здатних до специфічного впливу на імуногенез, імунну відповідь організму та контролю росту пухлин залишається вкрай актуальним. Зокрема, багаторічними дослідженнями позаклітинних сіалоспецифічних лектинів сапрофітних аеробних бактерій роду *Bacillus* показано, що вони характеризуються селективним впливом на пухлини різного генезу, є індукторами синтезу природного гамма-інтерферону [11,12,13,14], активними інгібіторами адсорбції та репродукції вірусів грипу, герпесу, гепатиту С та ВІЛ [15]. Також, на сьогоднішній день різні види раку виступають як основна причина смертності в усьому світі. На лікування раку витрачаються мільярди доларів. Всесвітня організація охорони здоров'я вважає, що кількість випадків захворювання на рак зростає у найближчі 20 років на 70% [16]. А наявність таких унікальних властивостей лектинів відкриває широкі перспективи щодо використання цих речовин у галузі медицини і біології.

Актуальність теми.

На теперішній час є актуальним пошук і розробка нових засобів для підвищення ефективності лікування онкологічних хворих оскільки, в Україні постійно зростає онкологічна захворюваність населення. Засоби хіміотерапевтичні та променева терапія мають агресивний вплив на організм пацієнтів, що призводить до розвитку імуносупресії. Імунна система хворого стає безсилою щоб забезпечити захист від розвитку рецидиву захворювання або виникнення метастазів. Для підтримання функціональної активності імунної системи на належному рівні сприяє формуванню у пацієнта повноцінної імунної відповіді на залишкові пухлинні клітини та покращенню результатів лікування, часто разом з препаратами хіміотерапії використовують – імунотерапевтичні засоби, а саме, цитокіни, синтетичні індуктори інтерферону, різні типи протипухлинних вакцин.

Є дослідження, [65] що штам *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 здатний продукувати позаклітинний цитотоксичний лектин і в результаті проведеного літературного огляду, було сформовано мету і завдання дослідження.

Мета роботи – дослідити найкращі умови для культивування бактеріального штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 у лабораторному ферментері.

Завдання дослідження:

– Дослідити зміни значень рН, вмісту біомаси та гемаглютинуючої активності культуральної рідини бактеріального штаму *B. subtilis* ІМВ В-7724 в залежності від умов вирощування в лабораторному ферментері.

– Визначити і порівняти гемаглютинуючу активність, вуглеводну специфічність позаклітинного цитотоксичного лектину, виділених із отриманої культуральної рідини продуцента.

– Встановити оптимальний спосіб аерації під час росту *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 при періодичному культивуванні штаму у лабораторному ферментері за різних варіантів аерації.

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

РОЗДІЛ 1. ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК БІОЛОГІЧНИХ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛЕКТИНІВ І ЇХ ЦИТОТОКСИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ

1.1. Біологічні властивості лектинів

Вивчення лектинів розпочалося більше сторіччя тому, коли вперше було виділено рослинні білки, які викликали аглютинацію еритроцитів та характеризувалися винятковою властивістю зв'язувати цукри. Власне термін «лектин» ввели в 1954 р. Вільямс Бойд та Елізабет Шаплей [17], об'єднавши під такою назвою рослинні аглютиніни (так звані фітогемаглютиніни) в одну групу. У подальшому дослідники у своїх роботах сфокусувалися на виділенні лектинів з різних організмів (рослин, тварин, мікроорганізмів (віруси, гриби, водорості, бактерії)), вивченні біологічної ролі і механізмів дії цих білків, можливості їх застосування в різних галузях людської діяльності [18]. Останні роки значно активізувалися дослідження щодо можливостей і перспектив використання лектинів в біотехнології, зокрема при розробці методів і заходів для діагностики та лікування пацієнтів зі злоякісними новоутвореннями.

Джерелом для виділення лектинів можуть слугувати різні об'єкти. Найбільш привабливими є ті, які мають технологічні переваги: біодоступність об'єкта, легкість у культивуванні, синтез лектинів у достатній для застосування кількості, стабільність синтезованого лектинів тощо. Найкращим джерелом отримання лектинів (з погляду практичності біотехнологічного процесу для промислового виробництва) є рослини або мікроорганізми тому, що отримання лектинів із тваринної сировини або свіжих плодівих тіл грибів обмежене необхідністю збільшення кількості вихідної сировини у зв'язку з низьким вмістом лектинів [17].

Серед лектинів бактеріального походження особливу увагу привертають позаклітинні лектинів (їх виділення не потребує накопичення значної кількості мікробної біомаси), а саме, отримані з середовища росту бактерій родини *Bacillus*

					НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Коваль Є.В.			РОЗДІЛ 1. ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК БІОЛОГІЧНИХ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЛЕКТИНІВ І ЇХ ЦИТОТОКСИЧНИЙ ПОТЕНЦІАЛ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Красінько В.О.					11	60
Консультант						11		
Зав.каф.		Стабніков В.Г.				Кафедра БТМ		

Так, за даними [18], у результаті скринінгу виділених із різних екологічних ніш (кров людини, шлунково-кишковий тракт людини, сільськогосподарських або лабораторних тварин, ґрунт, лікувальні грязі, гусінь шовкопряда, філосфера яблуні, музейні культури) 310 культур (15 видів) бацил позаклітинні лектинів продукували 90.

1.1.1. Рослинні лектини

Лектини рослин виробляються безліччю рослин і можуть бути виділені з різних частин рослин, таких як насіння, листя, квіти, стебла і кора тощо [19,20]. В цілому, лектини, виділені з рослин, широко використовуються в імунології та клітинній біології для діагностичних, терапевтичних цілей, а також як імунорегуляторний агент [22].

У фармацевтичній сфері лектини являють собою потенційні протипухлинні терапевтичні засоби. Зокрема, вони можуть розрізняти доброякісні та злоякісні новоутворення. Дійсно, більшість лектинів демонструють протиракові властивості в клітинах, що культивуються, і *in vivo*, при цьому деякі з них інгібують злоякісні клітини за допомогою апоптозу і аутофагії, регулюючи множинні шляхи. Екстракти омели широко застосовуються для лікування раку в Європі, маючи протипухлинні та індукуючі апоптоз властивості, а також імуностимулюючі та антиангіогенні властивості [23,24].

У дослідженнях [21,22] рослинні лектини показали протипухлинну активність *in vivo* та *in vitro*. Лектини, здатні викликати пригнічення росту пухлинних клітин, такі як Con A (конканавалін А) з квасолі Джека та лектини омели ML-I, в даний час проходять різні фази клінічних випробувань. Лектини рослин можуть змінювати експресію інтерлейкінів та деяких протеїназ і, таким чином, модулювати імунну систему [16]. Однак використання протеїну та пептидів як терапевтичних агентів обмежене через їх хімічну та фізичну нестабільність через ферментативну деградацію або деякі інші зміни навколишнього середовища [22].

Також, вченими доведено у роботах [25, 26] синергетичний терапевтичний ефект екстракту омели із звичайними протираковими препаратами. Оскільки омела звичайна росте на різних деревах, залежно від дерева-господаря, часу збору врожаю

та процедури екстракції, препарати розрізняються за активними компонентами та біологічними властивостями, що ускладнює оцінку протиракових ефектів і фармакологічних та молекулярних властивостей, що лежать в основі. Лектин ML-I омели білої є єдиним лектином омели білої, що рекомбінантно продукується в *E. coli* [25, 26].

На сьогоднішній день найбільш вивченим з точки зору імуномодельюючих та протипухлинних ефектів є лектин омели I типу. Цей лектин проявляє виражений антипроліферативний ефект шляхом індукування апоптозу по відношенню до різних пухлинних клітин: лейкемії, меланоми, раку молочної залози, раку легені, раку печінки.

Рослинні лектини також можуть активувати синтез інтерферону (ІФН) у організмі таврин та людини, шляхом стимулювання секреції ІФН клітинами імунної системи *in vivo* та *in vitro*. Зокрема, лектини омели при інкубуванні з Т-лімфоцитами активували синтез ІФН цими клітинами. Вважають, що під впливом лектинів синтез ІФН здійснює стимулюючу дію цитотоксичної активності природних кілерів [27, 28].

Але аналізуючи дослідження стає зрозуміло, що рослинні лектини незважаючи на їх протиракові властивості мають недоліки, що перешкоджають розвитку для лікування раку. Головною проблемою рослинних лектинів залишається їх висока токсичність. Наприклад, Con A викликає печінкову недостатність при внутрішньовенному введенні на моделях мишей, що наведено в дослідженнях [23]. Ще одним недоліком є відсутність відповідних методів очищення для великомасштабного виробництва рослинних лектинів.

1.1.2. Грибні лектини

Окрім рослинних лектинів існують ще грибні лектини і найбільша кількість лектинів була ідентифікована від *Lactarius*, за яким слідує *Pleurotus*, *Agaricus*, *Amanita* та *Boletus*.

За даними досліджень [30] Gal β 1,3GalNAc-зв'язуючий лектин їстівного гриба *Agaricus bisporus* пригнічує ріст клітин раку товстої кишки та раку грудей. Так само лектин *Volvariella volvacea*, який має антипроліферативну активність щодо клітин

Sarcoma S-180, також уповільнює зростання пухлинних клітин на мишачій моделі, продовжуючи тривалість життя мишей на 63-100% [31]. Лектин з *Grifola frondosa* він цитотоксичний щодо клітин HeLa при концентрації лектину 25 мкг/мл.

Але потенційне використання грибних лектинів у терапії також вимагатиме великомасштабного виробництва чистого, повністю функціонуючого лектину. Нині більшість потенційно корисних грибних лектинів очищено з плодових тіл, зібраних у природі. Це не тільки дає низький вихід, але також потребує багато часу та коштів, а також може призвести до зміни партії. Більше того, природне виділення лектинів із грибів може призвести до зміни партій через такі фактори навколишнього середовища, як сезон, місце та рік збирання врожаю, а також відмінностей у зрілості грибів та зростанні міцелію.

1.1.3. Тваринні лектини

Морські та прісноводні лектини виявляють протиракові властивості *in vitro* та *in vivo* завдяки зв'язуванню мембран ракових клітин, викликаючи цитотоксичність, апоптоз, інші форми регульованої загибелі клітин та пригнічення росту пухлини.

Що і доводять дослідження [32], де вивчали протипухлинну активність лектину строкатого амура (*Aristichthys nobilis*), відомого як GANL, який очищений від його зябер. Шість ліній пухлинних клітин людини були протестовані на антипроліферативну активність, і було виявлено, що лектин виявляв сильну протипухлинну активність проти лінії клітин HeLa зі значенням IC₅₀ 11,86 мкг/мл [32].

Також досліджували механізм індукції апоптозу у пухлинних клітинах людини з лектину морської губки. Виділили лектин з морської губки *Cinachyrella arion* (CaL) та вивчили його антипроліферативну активність щодо трьох ліній пухлинних клітин людини. Результати показали, що лектин виявляв найвищу антипроліферативну активність щодо клітин HeLa залежно від дози [32,33].

Дослідження [35] показали, що спостерігається цитотоксична активність лектину *Haliclona cratera* на клітинах HeLa (лабораторний штам раку шийки матки) та клітинах FemX (лабораторно культивованій штам меланоми людини) з використанням МТТ (3-(4,5-диілтіа) 2,5-дифенілтетразолійбромід) [35].

За словами авторів, найвищі концентрації лектину, які призвели до зниження виживання клітин на 50% (IC₅₀), становили 9 мкг/мл та 11 мкг/мл для клітин HeLa та FemX відповідно. *S. Varians* лектин також виявляв цитотоксичні ефекти щодо лінії клітин еритролейкемії K562 (отриманої з хронічного мієлоїдного лейкозу) та лінії клітин Jurkat (лінія клітин Т-клітинного лейкозу людини) (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD, USA) [35].

У статті [35] також описується про методи, що використовуються для дослідження лектинів губок та їх класифікації відповідно до їх біохімічних характеристик. Очищення лектинів губок зазвичай проводили за допомогою афінної хроматографії з подальшою фільтрацією гелю, навіть якщо були розроблені деякі оригінальні протоколи. Відповідно до їх зв'язувальної активності лектини Porifera були поділені на групи лектинів, включаючи галектини, лектини С-типу, F-типу та тахілектин-подібні лектини [35].

У джерелі [34] було продемонстровано, що морські губки є багатообіцяючим джерелом біоактивних лектинів, структурно різноманітних, багато з яких перебувають у формі глікопротеїнів. Часто вони мають властивості, що дозволяють витримувати високі температури. Ці білки мають великий потенціал для біотехнологічних застосувань, що проявляється в активності, що варіюється від здатності модулювати іонні канали до токсичності проти бактерій та пухлинних клітин [34].

У дослідженнях японських вчених [36,37] було показано, що лектин *Crenomytilus grayanus* (CGL), який виділений із двостулкових моллюсків, що належать до сімейства *Mytilidae*. CGL здатний блокувати проліферацію клітин та сприяє загибелі клітин пухлинних клітин таких як клітини Raji (лімфома Беркітта) і, меншою мірою, MCF-7 (карцинома грудей).

Закордонні дослідження показали, що ресурси лектинів із морських видів є відносно новими. Але на даному етапі дослідження важко зрозуміти, які з цих лектинів можуть мати успіх на ринку ліків. Багато які лектини можуть не пройти перевірку через проблеми з їхньою токсичністю, антигенністю та виробничими витратами, а також мати низьку стабільність у людському тілі.

На даний момент основною проблемою використання морських сполук у фармакологічних цілях є те, що лектини, як і всі морські метаболіти, не виробляються у великих кількостях. Щоб отримати їхню достатню кількість, необхідно зібрати велику кількість організмів. Таким чином, суттєвим обмежуючим фактором, що стоїть між лектинами та їх використанням як терапевтичні агенти, є їх доступність. Інакше кажучи, одне з найскладніших завдань, що з лектинами, - це перехід від лабораторного виробництва до масового виробництва.

Тому, найпростішим і ефективнішим способом одержання лектинів є використання мікроорганізмів.

Взявши всі ці дані разом стає зрозуміло, що потрібні подальші дослідження для того, щоб повністю зрозуміти дійсний протипухлинний потенціал лектинів на людях. Для досягнення цієї мети необхідні клінічні дослідження для прогресу досліджень раку при використанні лектинів для протипухлинної терапії.

1.1.4. Мікробні лектини

Вченими з Індії [38] було визначено наявність лектинів у видів *Aspergillus*, а саме *Aspergillus gorakhpurensis*. Культуру *Aspergillus gorakhpurensis* вирощували на скошених солодових агарах Czapek.

Очищали лектин за допомогою афінної хроматографії. Афінна хроматографія з вуглеводами є особливим методом афінної хроматографії, в якому адсорбенти вуглеводів використовуються для очищення гліканових зв'язувальних білків або лектинів.

Лектин *A. gorakhpurensis* як показали дослідження виявив мітогенну активність щодо спленоцитів миші. Ступінь активності був ідентичний такий у конканаваліну А (рослинний лектин) при концентрації лектину 100 мкг/мл. Було виявлено, що активність залежить від дози, показуючи оптимальну концентрацію 150 мкг/мл. При цій концентрації мітогенна активність була вищою, ніж у конканаваліну А [38, 39].

Очищений лектин показав велику антибактеріальну активність проти грампозитивних бактерій. Протигрибкова активність спостерігалася щодо

Saccharomyces cerevisiae ($9 \pm 0,25$ мм) порівняно з використовуваним стандартним протигрибковим антибіотиком ($30 \pm 0,012$ мм).

За даними досліджень [38] стає зрозуміло, що очищений лектин *Aspergillus gorakhpurensis* характеризується мітогенною, а також антимікробною властивістю.

Дослідження [40,41] показали, що утворюється лектин в процесі культивування семи видів *Fusarium*, а саме, *F. fujikuroi*, *F. beomiformii*, *F. begoniae*, *F. nisikadoi*, *F. anthophilum*, *F. incarnatum* і *F. tabacinum*, наявність лектинів у цих видів раніше не досліджувалися. Вченими Сінгхом та Такуром було описано, що лектини одержані з даних культур мали гемаглютинуючу активність до еритроцитів кроля, що піддержує що виділена речовина є лектинами. Але дане дослідження вимагає подальших досліджень, щоб встановити вуглеводну специфічність даних лектинів.

У дослідженнях вчених Федосова Н.І., Черемшенко Н.Л., Гетьман К.І., та інших [43] було досліджено ряду показників біологічної активності позаклітинного лектину *B. subtilis* ІМВ В-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.

Отримані результати досліджень свідчать про наявність в культуральній рідині *B. subtilis* ІМВ В-7724 лектиноподібної речовини, яка має суттєвий цитотоксичний та цитолітичний вплив на пухлинні клітини. Максимальну гемаглютинуючу (2048 титр-1 РГА) та цитотоксичну (ІЦ = $95,0 \pm 2,0\%$) активність виявляв лектин, отриманий з культуральної рідини на 4-ту добу росту штаму [43].

Результати даних досліджень підтверджують, що виділена 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 [43].

1.2. Фізико-хімічні властивості позаклітинних лектинів

Лектини є речовинами білкової природи, які здатні специфічно зв'язувати вуглеводні компоненти на мембранах клітин. Досліджено, що цитотоксичний лектин з високою протипухлинною активністю, що виділений з культуральної рідини штаму *B. subtilis* IMB B-7724, при визначенні ступеня спорідненості до вуглеводів встановлено, що найвищу спорідненість лектини бацил виявляли до муцину підщелепної залози бика, що містить найбільшу кількість двох типів сіалових кислот (N-ацетилнейрамінової та N-гліколілнейрамінової), D-глюкуронової кислоти та фруктозо-1,6-дифосфату.

Амінокислотний склад: лейцин (15 %), тірозин (12 %), фенілаланін (11 %), ізолейцин 10 (9 %), аланін (8 %), валін (8 %), метіонін (7 %), серин (7 %), аргінін (6 %), треонін (4 %), глютамінова кислота (4 %), лізин (3 %), гліцин (2 %), аспарагінова кислота (2 %), гістидин (2 %). Серед виявлених амінокислот до нейтральних належать 60,6 %, до ароматичних - 22,5 %, до основних - 11,0 %, до кислих - 5,9 %.

Елементний склад: С- 34,00 %; Н - 7,04 %; N-16,61 %; О - 42,35 %.

Гемаглютинуюча активність лектину в концентрації 1 мг/мл коливається в межах 1024-2048 титр-1 РГА.

Лектин проявляє *in vitro* цитотоксичну активність по відношенню до пухлинних клітин різного гістогенезу (саркома 37, аденокарцинома Ерліха, меланома В-16, карцинома легені Льюїс, клітини ліній L 1210, HL60, K562). Ця властивість лектину, що заявляється, може використовуватися при активній специфічній імунотерапії в онкології

Він добре зберігається при 0-5 °С без втрати цитотоксичної активності протягом 1-1,5 років, має високу термостабільність - прогрівання протягом 1 години в діапазоні температур від 20 до 90 °С не приводить до зниження гемаглютинуючої та цитотоксичної активності по відношенню до пухлинних клітин. Зміни рН середовища в діапазоні від 6,0 до 8,0 також суттєво не впливають на активність досліджуваної речовини, максимальну гемаглютинуючу активність спостерігають при значеннях рН 7,5-8,0.

Результати дослідження гострої токсичності *in vivo* та імунотоксичності *in vitro* дозволяють віднести досліджуваній лектин до малотоксичних речовин.

Результати електрофоретичного дослідження показали, що отримана речовина однорідна, має молекулярну масу 18,0-20,0 кДа. За хімічним складом ізольовані лектини є глікопротеїнами, які містять у своєму складі 86,0 % білка та 7,0 % вуглеводів. Максимум поглинання в УФ спектрі - 280 нм, максимальні частоти поглинання в ІЧ спектрі (КВч): 616, 1067, 1386, 1530, 1650, 2957, 3409 см⁻¹, що є типовим для білків і поліпептидів.

Бактеріальний лектин має вигляд аморфного порошку бурого кольору, який добре розчиняється у воді, буферних розчинах (забуференому фізіологічному розчині, Трис-НСІ), лугах та деяких органічних розчинниках (етанол, ацетон).

Лектин має позитивні кольорові реакції з амідочорним 10Б і кумасі діамантовим синім (які свідчать про присутність в зразку білків); негативні - з суданом чорним В (ліпопротеїди), шиф-йодною кислотою (мукополісахаріди, глікопротеїди), толуїдиновим синім (мукополісахаріди, нуклеопроїтеїди), дифеніламіном (ДНК) та метиленовим синім (РНК) [43].

1.3. Цитотоксичні лектини в онкології

Значну увагу дослідників у галузі не тільки імунології, але й онкології вже тривалий час привертають протипухлинні властивості багатьох лектинів. На сьогодні показано, що пряма протипухлинна дія лектинів може реалізовуватися через різні механізми: апоптоз, аутофагія, інгібування росту пухлини [44,45,46].

Найбільш вивченими з погляду протипухлинних та імуномодулюючих ефектів є лектини рослин. Виражений цитотоксичний ефект проти клітин різних пухлин (рак молочної залози, печінки, легені, меланома) продемонстрований для лектинів омели та квасолі звичайної [47, 48], канавалії мечоподібної та софори [44]. У дослідженнях *in vitro* та *in vivo* показана антипроліферативна активність лектинів, отриманих з деяких грибів [50, 51]. Меншою мірою досліджено цитотоксичні властивості тваринних лектинів [43].

Бактерії також можуть бути джерелом для отримання лектинів. Особливу увагу привертають позаклітинні лектини (їх виділення не потребує накопичення

значної кількості мікробної біомаси). Серед речовин мікробного походження на сьогоднішній день найбільш вивченими є лектини сапрофітних штамів бактерій роду *Bacillus*, зокрема *B. subtilis*. При дослідженні властивостей 223 штамів цієї бактерії показано, що 65 із них є лектинопродукуючими. Позаклітинні лектини *B. subtilis* являють собою термостабільні, металонезалежні глікопротеїни з молекулярною масою 25–50 кДа, стійкі до дії рН, детергентів і тривалого зберігання, мають рідкісну специфічність до сіалових кислот, сіаловмісних глікокон'югатів та проявляють різноманітну медико-біологічну активність: інтерферон-індукуючу, імунотропну, протипухлинну, антивірусну.

Деякі лектини виявляють токсичну активність. Це пов'язано з тим, що частина субодиноць, які складають лектин, є лектиновими, а інша – токсином.

Одержані дані щодо гемаглютинуючих властивостей позаклітинних лектинів *Bacillus* свідчать про те, що ці біополімери мають дуже вузьку вуглеводну специфічність та високий ступінь впізнавання певних структур і можуть успішно конкурувати з моноклональними антитілами як аналітичні й діагностичні реагенти [53,54,55]. Слід відзначити, що при використанні лектинів як протипухлинних засобів необхідно враховувати не лише можливість отримання цих білків у достатній кількості, але і збереження їх властивостей (в тому числі вуглеводної специфічності). Останнє залежить як від джерела отримання білків, так і від методів їх виділення та очистки. В аспекті біотехнологічного виробництва процес отримання бактеріальних лектинів досить простий і можливий для стандартизації. Проте фізико-хімічні та біологічні властивості бактеріальних лектинів змінюються залежно від штаму мікроорганізму та методу виділення. Тому в кожному окремому випадку при внесенні змін в умови культивування бактерій, зміні середовища росту або модифікації методу одержання речовини необхідно детально вивчати та охарактеризовувати властивості отриманого лектину.

У науковому дослідженні [1], була проведена оцінка *in vitro* цитотоксичної дії на пухлинні та імунокомпетентні клітини лектину, виділеного з фільтрату культуральної рідини *Bacillus subtilis* B-7724 за модифікованим методом.

Дані дослідження довели, що лектин, який виділений з середовища росту мікроорганізму *B. subtilis* B-7724, виявляє дозозалежну цитотоксичну активність щодо клітин різних модельних пухлин: мінімальну активність виявляє в концентрації 0,02 мг/мл, максимальну – 0,1 мг/мл. Серед клітин пухлинних ліній найбільш чутливою виявилася меланома В16: індекс цитотоксичності (ІЦ) становив 72,3% (0,02 мг/мл) та 97,2% (0,04 мг/мл). Практично нечутливими до цитотоксичної дії лектиноподібної речовини були клітини лінії К562 (суспензійна культура клітин еритромієлолейкозу людини): ІЦ = 13,4% (0,02 мг/мл) та 22,3% (0,04 мг/мл). Серед клітин імунокомпетентних органів найбільш чутливими до дії лектиноподібної речовини виявилися клітини тимусу. Більш резистентні клітини макрофагальної ланки: додавання лектиноподібна речовина в концентрації 0,02 мг/мл практично не мало цитотоксичного впливу: через 60 хв ІЦ = 14,8%, через 24 год — 60,9%. Імунотоксичну дію виявляла концентрація лектиноподібної речовини 0,1 мг/мл (ІЦ 90,2–99,5%) [1].

1.3.1 Оцінка токсичності лектину

Натепер найдослідженішими є протипухлинні й імуномодулюючі властивості рослинних лектинів. Описано дозозалежний ефект їхнього впливу: цитотоксичний – у разі застосування у високих концентраціях, імуномодулюючий – за використання малих концентрацій [56,57,58]. Механізми протипухлинної активності рослинних лектинів пов'язують як з прямою цитотоксичною дією на пухлинні клітини, так і з опосередкованим впливом внаслідок модулювання імунних реакцій [59, 60]. Проте всі відомі сьогодні рослинні лектини є достатньо токсичними речовинами, цитотоксичний вплив яких поширюється не тільки на пухлинні клітини, а й на клітини здорових тканин організму людини й тварин не залежно від шляху їхнього введення. Токсичний ефект рослинних лектинів відносно нормальних клітин продемонстрований в дослідженнях *in vitro* та *in vivo* після введення експериментальним тваринам [61, 62].

Бактеріальні лектини вивчені значно меншою мірою. Зокрема, перспективними для дослідження як протипухлинні засоби можуть виявитися бактеріальні лектини, які продукують сапрофітні бактерії роду *Bacillus*. Більшості

таких лектинів притаманна рідкісна вуглеводна специфічність до сіалових кислот і сіаловмісних глікокон'югатів, які в значній кількості представлені на поверхні пухлинних клітин, що й зумовлює їхній вибірковий вплив. Ці речовини характеризуються незначною токсичністю відносно нормальних клітин організму [53].

У дослідженнях [63] було експериментально доведено, що позаклітинний лектин *B. subtilis* ІМВ В-7724 відноситься до IV класу токсичності, тобто малотоксичних речовин. Оцінювання параметрів гострої токсичності лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724 проводилося за умови його одноразового введення мишам ліній Balb/c і C57Bl [63].

1.4. Огляд перспективних продуцентів для одержання позаклітинного цитотоксичного бактеріального лектину

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, як продуценти лектинів, на особливу увагу заслуговують представники роду *Bacillus*, які здатні накопичувати позаклітинні лектини в середовищі росту, що значно спрощує технологічний процес їх одержання.

Відомі бактерійні лектини з протипухлинною активністю, одержані з культуральної рідини штаму *B. subtilis* 316М, *B. polymyxa* 102 КДУ, *B. subtilis* В-7014 [53]. Однак дані лектини не можуть забезпечити необхідний рівень протипухлинної та цитотоксичної активності, яка в значній мірі залежить від штаму-продуцента.

Найбільш близьким аналогом до цитотоксичного лектину з протипухлинною активністю, що заявляється, є позаклітинний сіалоспецифічний лектин сапрофітних бактерій *B. subtilis* В-7025. Найближчий аналог характеризується тим, що це глікопротеїн з молекулярною масою 19- 26 кДа з високою гемаглютинуючою активністю та ступенем спорідненості до обох типів сіалових та уронових кислот, а також до фруктозо-1,6-дифосфату. Термостабільний, стійкий до дії рН в діапазоні 4,8-9,1. Належить до помірно й малотоксичних речовин з протипухлинною

активністю по відношенню до злоякісних пухлин різного гістогенезу. Однак цей бактерійний лектин (найближчий аналог) має меншу протипухлинну активність порівняно з лектином *B. subtilis* IMB B-7724 і також не має максимального ступеня очищення від речовин з ферментативною активністю. Відомо, що ефективність синтезу біологічно активних речовин, їх склад та властивості суттєво відрізняються у представників різних штамів, в тому числі, що належать до одного виду мікроорганізмів.

Цитотоксичний лектин з високою протипухлинною активністю, що виділений з культуральної рідини штаму *B. subtilis* IMB B-7724 має досить високу цитотоксичну активність до клітин пухлин різного гістогенезу. Завдяки цьому лектину розшириться арсенал біологічно активних речовин з цитотоксичною і протипухлинною активністю. Даний лектин аглютинує і девіталізує пухлинні клітини, а також аглютинує еритроцити миші і кроля. Про належність цієї речовини до класу лектинів свідчать її аглютинуюча активність по відношенню до еритроцитів, а також висока специфічність до певних вуглеводів [64].

1.5. Вплив умов культивування на бактеріальний лектин

Середовища росту для культивування продуцента лектину

У дослідженнях Черемшенко Н.Л [65] було визначено можливість застосування синтетичного середовища Гаузе для росту *B. subtilis* IMB B-7724 з метою отримання лектину з цитотоксичними властивостями.

Експериментальні дослідження проводилися в лабораторії онкоімунології та конструювання протипухлинних вакцин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Оцінювалась інтенсивність росту *B. subtilis* IMB B-7724 на двох поживних середовищах (м'ясопептонному бульйоні (МПБ) та модифікованому синтетичному середовищі Гаузе), морфологічні ознаки бактеріальних колоній та мікроорганізмів. Також визначалась цитотоксичну активність зразків культуральної рідини, отриманої на різні доби росту, по відношенню до трансформованих клітин лінії MDBK. Дані дослідження показали, що при культивуванні *B. subtilis* IMB B-7724 на обох середовищах бактерії проявили майже однакову активність росту: кількість клітин в

1 мл культуральної рідини складала 80×10^6 КУО/мл (середовище Гаузе) та 75×10^6 КУО/мл (МПБ).

У результаті дослідження показано, що *B. subtilis* ІМВ В-7724 при культивуванні на синтетичному середовищі Гаузе синтезує позаклітинний метаболіт – лектин, який володіє значною цитотоксичною активністю по відношенню до трансформованих клітин [65].

Аеробні спороутворювальні бактерії виду *Bacillus subtilis* широко використовують для промислового отримання ряду ферментів, білків та ін. завдяки їх здатності до екскреції значної кількості різноманітних позаклітинних метаболітів у середовище культивування [66]. Наявність серед них низькомолекулярних ліпопептидів із яскраво вираженими поверхнево-активними властивостями [67,68,69] обумовлює інтенсивне спінювання культуральної рідини при вирощуванні даного мікроорганізму у рідких поживних середовищах із глибинною аерацією, що суттєво ускладнює нормальне проведення процесу культивування. Зокрема, це шкідливе явище призводить до значних втрат клітин та їх метаболітів внаслідок виносу спіненої культуральної рідини із ферментера, підвищує ризик контамінації, вимагає значного зменшення корисного об'єму ферментеру і, відповідно, продуктивності процесу [70].

З даними [66], вирощування іншого штаму *B. subtilis* ІМВ В-7014 – продуцента позаклітинного лектину із противірусними властивостями у лабораторних ферментерах, зазначених вище, є досить проблемним. Зокрема, проведені серії культивувань без використання піногасника із коефіцієнтом заповнення 0,62 та мінімальним питомим рівнем аерації – 0,1 л/л/хв засвідчили, що втрати культуральної рідини перевищують половину її початкового об'єму за весь термін ферментації (21 год) внаслідок викидів спіненої фракції. Дана ситуація спровокувала зниження вмісту лектину у культуральній рідині та зниженні його активності [71]. Додавання хімічних піногасників різного хімічного складу дозволяє уникати утворення піни, однак їх присутність у культуральній рідині знижує активність бактеріального лектину перешкоджає утворенню осаду лектину при його висолюванні сульфатом амонію із надосадової рідини у подальшому виділення

бактеріального лектину [72]. Тому, важливо підібрати належні умови культивування продуцента лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724, оскільки від цього залежить його активність та подальше виділення цільового продукту.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали досліджень

Представлені у роботі дані одержано на експериментальному матеріалі. Дослідження проводилися в Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України та в Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України

2.1.1. Штам мікроорганізму

У роботі було використано сапрофітний штам *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 – продуцент позаклітинного цитотоксичного лектину з колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України [12].

2.1.2 Клітинні лінії

Для дослідження цитотоксичної активності лектину використовували клітини раку Ерліха – асцитний варіант недиференційованої пухлини молочної залози. Використані як первинні пухлинні клітини, отримані безпосередньо з пухлини мишей лінії Balb/C.

2.1.3 Експериментальна модель пухлинного росту

В якості клітин-мішеней для визначення цитотоксичного впливу лектину використовували клітини раку Ерліха (асцитний варіант недиференційованої пухлини молочної залози), отримані з асцитної рідини мишей Balb/C на 10 добу пухлинного процесу. Для індукції асцитної форми раку використовували пухлинні клітини, отримані з Національного банку тканин людини і тварин 32 ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Протягом експерименту штам підтримували пасажами на мишах лінії Balb/C.

2.1.4 Експериментальні тварини

Для отримання клітин асцитної форми раку Ерліха використовували мишей

Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ			
Розроб.		Коваль Є.В.			РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	Літ.	Арк.	Акрушіє
Керівник		Красінько В.О.					26	60
Консультант						26		
Зав.каф.		Стабніков В.Г.				Кафедра БТМ		

лінії Valb/C (рисунок 5) (самки віком 2,0-2,5 міс, вагою 20-23 г), які були одержані з розплідника віварію Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України (ІЕПОР ім. Р.Є.Кавецького НАН України). Утримання тварин та роботу з ними здійснювали у відповідності до міжнародних загальноприйнятих правил проведення робіт з експериментальними тваринами [81].

Valb/C це альбіносна, імунодефіцитна інбредна лінія. Миші характеризуються легкістю розведення і мінімальною різницею вагою між самками та самцями. Випадку утворення пухлин молочних залоз у данної лінії дуже рідкісні, проте вони чутливі до канцерогенів і пухлини легень, ретикулярні новоутворення пухлини нирок часто зустрічаються у мишей.

2.1.5.Отримання посівного матеріалу

Посівний матеріал отримували, вирощуючи штам *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 на скошеному агаризованому середовищі Громико (МПА: сусло-агар, 1:1) у термостаті при 37°C протягом 24 год [73].

2.1.6.Отримання рідкого інокуляту

Для отримання рідкого інокуляту використовували рідке середовище Гаузе, модифіковане для синтезу лектинів, до якого входить (г/л): галактоза – 10; бульйон Хоттінгера – 30,0 мл; пептон – 5,0; NaCl – 5,0 [73]. У подальшому середовище стерилізували під тиском пари 0,75 кг/см², протягом 30 хв, і з наступним охолодженням до кімнатної температури та встановленням його рН на рівні 7,0±0,1, в асептичних умовах, за допомогою 10%- ного розчину КОН) і засівали посівним матеріалом, який був знятий з агаризованого середовища. Засіяне рідке середовище вносили по 100 мл у колби ємністю 750 мл, які струшували на качалці (n = 160 об/хв) протягом 4 діб за температури 37 °С. Вирощену рідку культуру використовували як рідкий інокулят.

2.1.7.Конструкція ферментера у якому відбувалося культивування

Особливості росту і синтезу позаклітинного лектину в залежності від часу та умов ферментації досліджували за періодичного культивування штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 у двох однакових лабораторних ферментерах Biotec FL 103

(виробник Швеція) загальним об'ємом 4,0 л. Конструкція ферментера – скляний циліндр висотою 210 мм і внутрішнім діаметром 160 мм, затиснутий між плоскими днищем і кришкою через нижню і верхню ущільнюючі манжети. Кожен ферментер був обладнаний однією турбіною збільшених розмірів, закріпленою на валу мішалки (диск діаметром 90 мм, 6 радіальних лопатей шириною 24 мм і висотою 30 мм, на верхній стороні) відстань від днища до диску мішалки – 46 мм), чотирма вертикальними відбивними пластинами шириною 20 мм і висотою 134 мм, що відповідала висоті заповнення ємності рідиною. Барботер у вигляді вертикального патрубку із конічною вершиною і єдиним отвором діаметром 0,9 мм для виходу повітря аерації на відстані 6 мм нижче площини диску турбіни був закріплений у днищі.



Рис. 1. Лабораторний ферментер Biotec FL 103

2.1.8. Підготовка ферментера до процесу культивування

Стерильні ферментери заповнювали вищевказаним стерильним охолодженим середовищем у кількості 2,5 л, встановлювали його рН на рівні $7,0 \pm 0,1$ як вказано вище і нагрівали до температури культивування $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Рідкий інокулят (6%, за об'ємом) вносили у нагріте середовище і починали ферментації. Усі зазначені операції проводили в асептичних умовах.

2.1.9. Способи подачі аеруючого повітря

Досліджували ефективність застосування 3-х варіантів ферментації, що відрізнялись за способом введення повітря для аерації культуральної рідини та застосованими режимами зміни витрати повітря і значеннями швидкості перемішування. Коефіцієнт швидкості розчинення кисню (K_V), що характеризує систему аерації та інтенсивність розчинення кисню у рідкому середовищі, визначали для кожного способу подачі повітря і швидкості перемішування окремо за сульфітним методом [74].

За 1-м варіантом ферментації повітря вводили у культуральну рідину через барботер (1-й спосіб введення повітря) на рівні 0,25 л/хв (відповідний питомий рівень аерації – 0,1 л/л/хв) від початку до 30 год культивування. Надалі витрату повітря поступово зменшували: до 0,1 л/хв – від 30-ї до 42-ї год і до 0,05 л/хв – від 42-ї до 48-ї год, закінчення ферментації. Швидкість перемішування підтримували 400 об/хв протягом усього терміну ферментації. Значення K_V для даному варіанту становило $(4,0-4,2)\pm 0,4$ г л/год.

У 2-му варіанті ферментації повітря аерації також вводили у культуральну рідину за 1-м способом із рівнем витрати $0,25 \text{ л}\cdot\text{хв}^{-1}$ лише протягом перших 12 год культивування (у період інтенсивного росту). Надалі, повітря подавали лише у вільний простір ферментерів (2-й спосіб його введення) із витратою 0,4 л/хв – з 12-ї до 24-ї год та 0,1 л/хв – з 24-ї год до 72-ї год (закінчення процесу). Були застосовані такі режими швидкості перемішування: 250 об/хв – від початку до 3-ї год; 370–400 об/хв – від 3-ї до 24-ї год; із подальшим поступовим зменшенням до 350, 300, 250 і 200 об/хв, починаючи від 24-ї, 30-ї, 48-ї та від 54-ї год до завершення ферментації, відповідно. Зазначеним вище значенням витрати повітря аерації та швидкості перемішування відповідали наступні значення K_V : $1,0\pm 0,1$; $4,2\pm 0,2$; $4,0\pm 0,3$; $2,3\pm 0,2$; $1,2\pm 0,1$; $0,5\pm 0,1$ та $0,3\pm 0,1$ г л/год.

Пінний шар, що утворювався безперервно, за 1-го способу введення повітря у культуральну рідину через барботер (1-й і частково, 2-й варіанти ферментації, відповідно) руйнували одночасним введенням струменів стерильного повітря під тиском 0,005–0,008 МПа через спеціальні пристрої, встановлені всередині ферментерів.

За 3-м варіантом повітря аерації подавали тільки у вільний простір ферментерів, над поверхнею культуральної рідини (2-й спосіб його введення) на рівні 3,0 л/хв і підтримували швидкість перемішування 400 об/хв протягом усього терміну ферментації (48 год). Значення K_v за таких умов становило $4,0 \pm 0,3$ л/год.

Ферментації повторювали двічі для кожного варіанту, жодних хімічних піногасників для контролю рівня піни не використовували.

2.2.Методи досліджень

2.2.1.Визначення метаболічної активності та нагромадження біомаси

Метаболічну активність і нагромадження біомаси оцінювали, відповідно, за змінами активної кислотності (рН) та оптичної густини (ОГ) зразків культуральної рідини (іономір И-160МИ, фотоколориметр КФК-2, λ – 540 нм, l – 3 мм, відбір зразка – кожні 3 год ферментації). На основі отриманих даних розраховували максимальну питому швидкість росту культури (μ) у експоненційній фазі росту (від 3-ї до 6-ї год ферментації).

2.2.2. Визначення гемаглютинуючої активності

Темпи біосинтезу позаклітинного лектину визначали за гемаглютинуючою активністю (ГАА) супернатанту культуральної рідини. В цьому випадку зразки культуральної рідини відбирали із ферментерів і центрифугували (2500 g, 15 хв) кожні 6 год, починаючи з 12-ї год ферментації. Отримані супернатанти одразу ж заморожували і зберігали за температури (-17 °С). Визначення їх ГАА проводили одразу ж після розморожування.

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 [75]. ГАА визначали як останнє розведення, при якому спостерігається РГА, і виражали як титр-1 РГА. В якості контролю аутоаглютинації еритроцитів використовували 2% суспензію еритроцитів у забуференому фізіологічному розчині за відсутності ЦФ КР.

2.2.3. Визначення вуглеводної специфічності

Вуглеводну специфічність визначали методом інгібування гемаглютинуючої активності після взаємодії лектину з рядом цукрів: Д-галактозаміном, лактозою, Д-глюкозою, Д-глюкозаміном, фруктозо-1,6-дифосфатом, Д-глюкуроною кислотою, N-ацетілнейраміною кислотою, N-гліколілнейраміною кислотою (Sigma, США). Реакцію проводили у 96-лункових U-подібних планшетах, використовуючи 2% завись нативних еритроцитів кроля [76].

2.2.4. Отримання суспензії пухлинних клітин асцитного раку Ерліха

Штам пухлини підтримувався протягом всього терміну експерименту. На 10 добу після перещеплення пухлинних клітин в черевну порожнину мишей з асцитною формою раку вводили 2 мл стерильного фізіологічного розчину. Проводили масаж передньої стінки черевної порожнини. Після чого асцитну рідину відбирали за допомогою шприца. Пухлинні клітини відмивали центрифугуванням в стерильному 0,9% розчині NaCl. Проводили підрахунок кількості клітин в камері Горяєва і доводили концентрацію до 1×10^6 клітин в 1 мл.

2.2.5. Визначення цитотоксичної активності (МТТ-тест) по відношенню до пухлинних клітин

Суспензію ПК висаджували на 96-лункові планшети в концентрації 1×10^5 кл/на лунку в 100 мкл повного ростового середовища. Через 24 год у відповідні лунки вносили досліджувану речовину в різних концентраціях (0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 мг/мл) та інкубували клітини за стандартних умов протягом 30, 60 та 120 хв. В якості контролю використовували лунки з клітинами, в які не додавали досліджуваний препарат. Всі проби ставили в 3-х паралелях. Після завершення відповідного терміну інкубації планшети двічі відмивали 0,9% NaCl та додавали 200 мкл повного середовища RPMI-1640 (або DMEM) і 20 мкл розчину МТТ (SIGMA, США) в концентрації 5 мг/мл. Інкубували 4 год за стандартних умов, двічі відмивали фізіологічним розчином та додавали 140 мкл 50% розчину ДМСО (диметилсульфоксид; SERVA). Оптичну густину (ОГ) вимірювали при $\lambda=540$ нм на автоматичному *microELISA reader*. Індекс цитотоксичності (ІЦ) розраховували за формулою:

$$\text{Щ} = (1 - (\text{ОГПК} + \text{ЛЕКТИН} - \text{ОГПК}) / \text{ОГПК}) \times 100\%$$

де: ОГПК+ЛЕКТИНУ – оптична густина в лунках з ПК та лектином;

ОГПК – оптична густина в лунках з ПК без додавання лектину [75]

2.2.6. Визначення специфічності до муцину підщелепної залози бика.

Для проведення реакції необхідно такі реактиви:

а) розчин муцину підщелепної залози бика (10 мг муцину на 2 мл забуференого фізіологічного розчину);

б) розчин досліджуваного лектину;

в) 2% суспензія еритроцитів на забуференому фізіологічному розчині.

Спочатку готують робочий розчин лектину шляхом розведення його забуференим фізіологічним розчином до титру 1:4. Потім встановлюють природу взаємодіючого з лектином вуглеводу і його мінімальну концентрацію, що пригнічує реакцію гемаглютинації. Для цього готують серію послідовних розведень вуглеводу. У ряд лунок вносять по 0,05 мл забуференого фізіологічного розчину; у першу лунку додають 0,05 мл розчину муцину підщелепної залози бика, перемішують і потім переносять у наступні лунки по 0,05 мл розчину.

У кожен лунку з вуглеводом додають по 0,05 мл робочого розчину лектину і лишають на 15 хвилин. Після цього додають по 0,05 мл 2% суспензії еритроцитів і суміш лишають на 0,5–1,0 год. Обов'язковим є постановка контрольної проби, у якій замість розчину муцину підщелепної залози бика додають забуферений фізіологічний розчин. Облік результату реакцій проводять перевіряючи планшети зверху. Якщо відбулося блокування лектину вуглеводом, то на початку ряду лунок гемаглютинація відсутня, а потім по мірі падіння концентрації вуглеводу аглютинація з'являється у певній лунці. Відзначають лунку, у якій ще відсутня аглютинація, і розраховують концентрацію вуглеводу в цій лунці, виходячи з того, що концентрація вуглеводу в першій лунці ряду дорівнює 1,6 мг/мл, а коефіцієнт розведення в ряду дорівнює 2.

Таким чином, визначають мінімальну пригнічуючу концентрацію муцину підщелепної залози бика, що взаємодіє з лектином. Отримані дані є найважливішою характеристикою специфічності лектину до муцину підщелепної залози бика [75].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Виходячи з мети та завдання дослідження, було складено наступну послідовність проведення дослідження для визначення оптимального способу подачі аеруючого агенту. Схеми подачі аеруючого агенту проводилися за трьома варіантами, які описані у Розділі 2 (п.2.1.9), для культивування штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 в умовах лабораторного ферментеру Biotec FL 103.

Зокрема, у 1-му варіанті ферментації повітря вводили у культуральну рідину через барботер (1-й спосіб введення повітря), спостерігалися зміни рН та ОГ.

У 2-му варіанті ферментації повітря також вводили у культуральну рідину за 1-м способом із рівнем лише протягом перших 12 год культивування, далі повітря подавали лише у вільний простір ферментерів (2-й спосіб його введення) до закінчення процесу.

За 3-м варіантом повітря аерації подавали тільки у вільний простір ферментерів, над поверхнею культуральної рідини (2-й спосіб його введення).

Результуючими параметрами були зміна показників рН, ОГ та ГАА в процесі культивування штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724.

3.1.Динаміка змін показників рН, ОГ та ГАА культуральної рідини штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724

Досліджена динаміка змін показників рН, ОГ та ГАА культуральної рідини за трьох варіантів вирощування штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 в умовах лабораторного ферментеру дозволила виявити 2 періоди кислотоутворення протягом терміну культивування штаму, що відрізнялись за тривалістю та інтенсивністю зниження рН культуральної рідини, залежно від обраного варіанту.

3.1.1.Ферментації за 1-м і 2-м варіантами

Ферментація за подачі аеруючого повітря через барботер характеризувалася меншим рівнем кислотоутворення в цілому. Зокрема, перший період тривав від початку до 3-ї год, а другий – від 12-ї до 24-ї год ферментації (рис. 1-а, б).

					НУХТ БТЕК 02.01.03 КР ПЗ			
Зн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата				
Розроб.		Коваль Є.В.			РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	Літ.	Арк.	Акрушів
Керівник		Красінько В.О.					33	60
Консультант						33		
Зав.каф.		Стабніков В.Г.				Кафедра БТМ		

Мінімальні значення рН культуральної рідини, відмічені у першому і другому періодах кислотоутворення для 1-го і 2-го варіантів ферментації становили, відповідно, 7,0/6,8 од. і 6,7/6,3 од. Такі значення рН культуральної рідини є близькими до нейтральних, які вважаються оптимальними для накопичення біомаси даного виду бактерій.

Накопичення біомаси було швидким і досягало максимуму на 9-у год вирощування: значення ОГ культуральної рідини на цей момент склали 2,8 та 3,1 од. (збільшення у 28 та 20,7 разів до початкових значень), а значення μ – 0,33 і 0,41 год⁻¹ для ферментацій за 1-м і 2-м варіантами, відповідно. Рівень ГАА культуральної рідини досягав 4 log₂ титру⁻¹ РГА на 24-у год, однак надалі знижувався до 2 log₂ титру⁻¹ РГА від 36-ї год до кінця культивування за 1-м варіантом (рис. 1-а), а у випадку 2-го варіанту – зростав до 5 log₂ титру⁻¹ РГА від 54-ї год до завершення процесу (рис. 1-б).

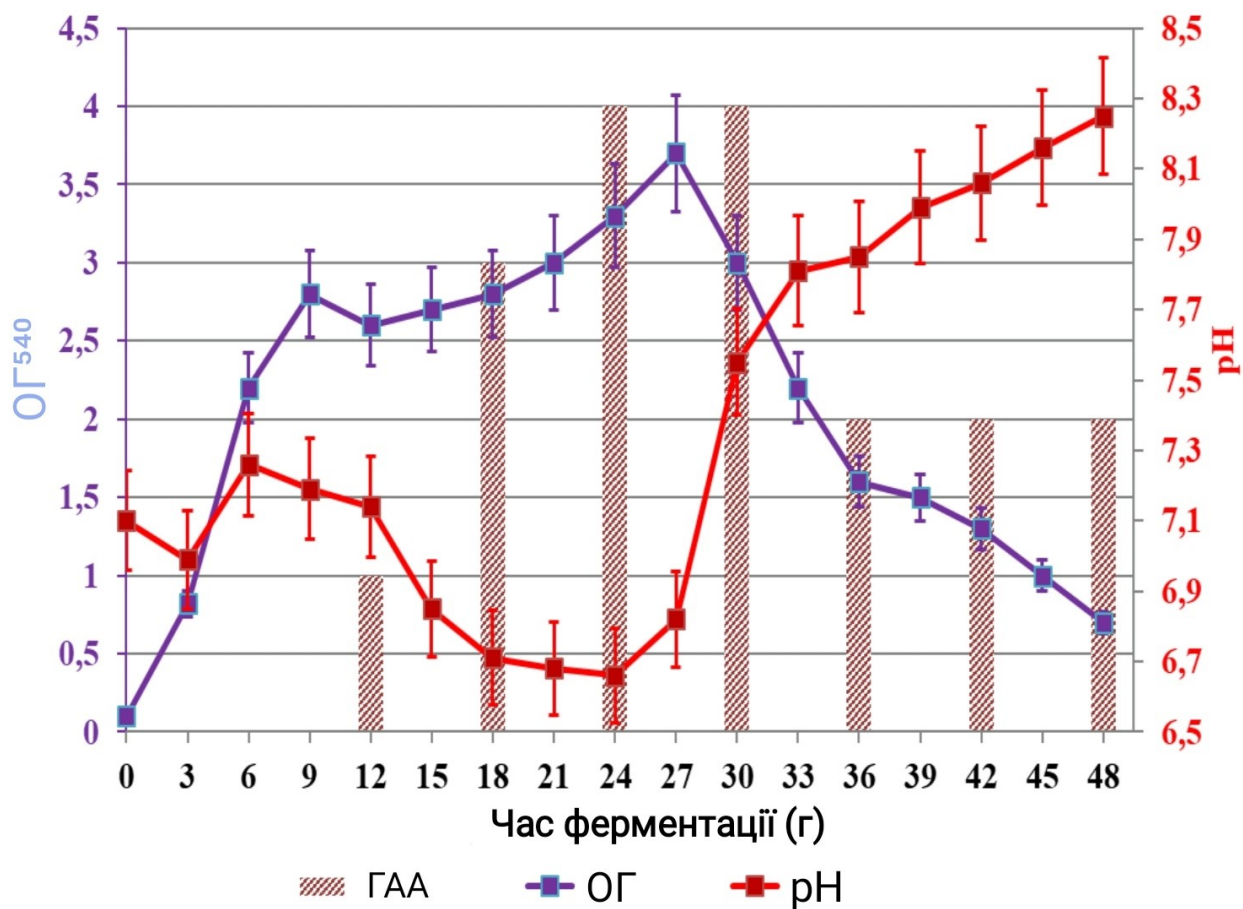


Рис. 1-а. Динаміка зміни рН, ОГ та ГАА КР під час 1-го варіанту ферментації штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 в лабораторних ферментерах

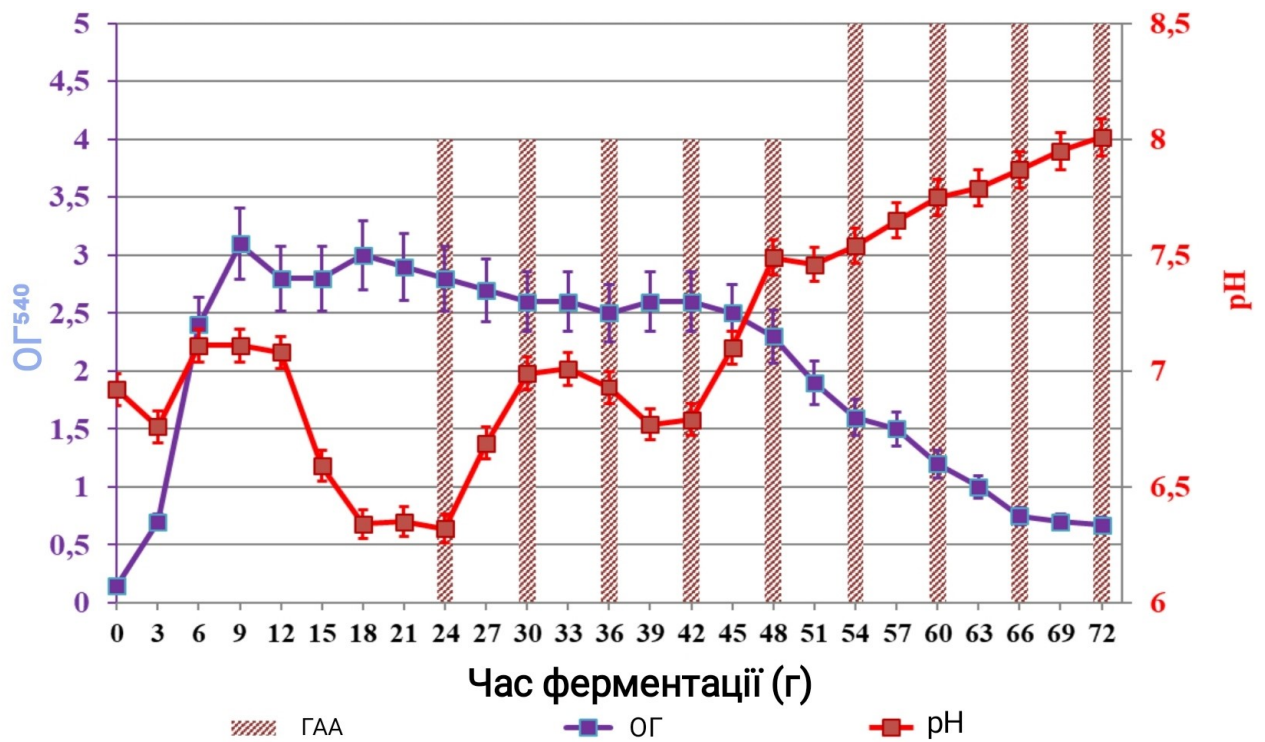


Рис. 1-б. Динаміка зміни рН, ОГ та ГАА КР під час 2-го варіанту ферментації штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 в лабораторних ферментерах

3.1.2. Ферментація за 3-м варіантом

Кислотоутворення було більш інтенсивним в цілому, а тривалість його першого періоду – відносно довшою (від початку до 6-ї год ферментації) за подачі аеруючого повітря лише у простір над культуральною рідиною. Зокрема, показник рН знижувався до 5,6 на 3,5–4 год. росту, після чого його корегували одноразово до значення 6,3 способом, зазначеним вище (рис. 1-в: час нейтралізації вказаний стрілкою). Далі, від 6-ї год до 21-ї год. рН КР повільно зростав і досягав 7,1, після чого починався другий, довший період кислотоутворення із поступовим зниженням показника до 5,8 на 36-у год. Нарешті, значення рН КР повторно підвищувались до 7,0 протягом останніх 12 год на момент завершення ферментації (48 год.).

Значення ОГ культуральної рідини на 9-у год становило лише 1,8, що відповідало її збільшенню до початкового значення у 15-разів; величина μ була $0,25 \text{ год}^{-1}$. ГАА для даного варіанту ферментації виявляли на мінімальному рівні $2 \log_2$ титру⁻¹ РГА лише у останні 6 год ферментації.

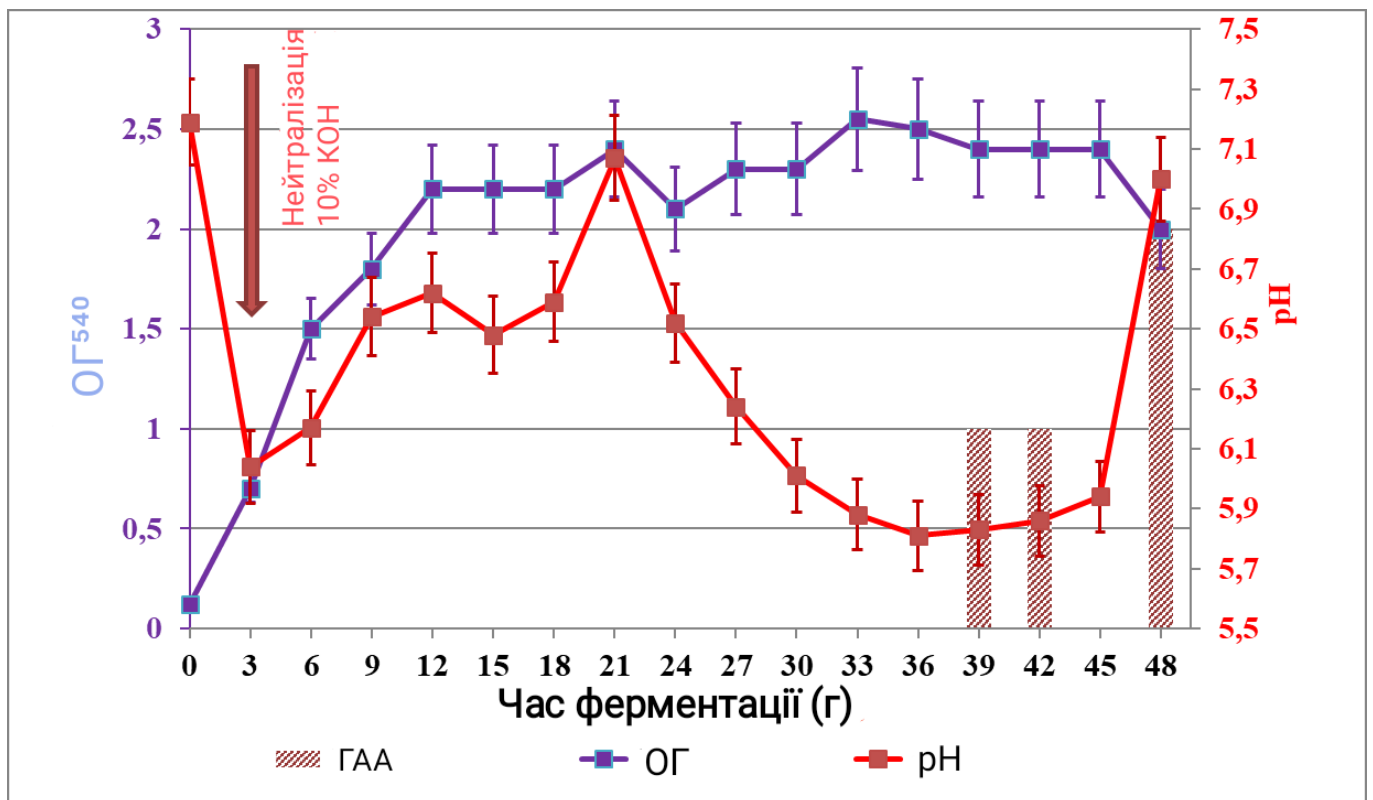


Рис. 1-в. Динаміка зміни рН, ОГ та ГАА КР під час 3-го варіанту ферментації штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 в лабораторних ферментерах

3.2. Дослідження препаратів лектину на цитотоксичну і гемаглютинуючу активність та вуглеводну специфічність

Основними біологічними характеристиками препаратів лектину є їх ГАА та вуглеводна специфічність. Характерною властивістю, яка свідчить про приналежність речовини до класу лектинів є здатність до аглютинації клітин завдяки специфічному зв'язуванню з вуглеводними детермінантами на їх поверхні. Вуглеводна специфічність надає лектинам унікальності і служить основою для їх класифікації.

Нами досліджені вказані характеристики дослідних зразків препаратів позаклітинних цитотоксичних лектинів, отриманих при різних умовах культивування штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 у лабораторних ферментерах (Табл. 1.)

Гемаглютинуюча і цитотоксична активність та вуглеводна специфічність лектину *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724

Умови вирощування штаму	ГАА*, титр⁻¹ РГА	Вуглеводна специфічність, ** мг/мл	Цитотоксична активність,*** IC₅₀, мг/мл
У лабораторному ферментері, 1-й варіант ферментації	32±8	0,2±0,1	0,43±0,01
У лабораторному ферментері, 2-й варіант ферментації	512±64	0,2±0,1	0,34±0,01
У лабораторному ферментері, 3-й варіант ферментації	0	0	0

Примітка: * – розчину лектину у концентрації 1 мг/мл

** – до муцину підщелепної залози бика

*** – проти клітин асцитичної аденокарциноми Ерліха in vivo

Як свідчать дані, наведені у табл. 1, ГАА активність зразків препарату, отриманих при використанні 1-го і 2-го варіантів ферментації, складала, відповідно, 32±8 од. та 512±64 од., тоді як у зразка препарату, виділеного з культуральної рідини при вирощуванні продуцента за 3-м варіантом ГАА була відсутня.

Найважливішою характеристикою сіалоспецифічного лектину є його вуглеводна специфічність, яку виражають у вигляді мінімальної концентрації конкретного вуглеводу – муцину підщелепної залози бика, що взаємодіє з лектином та інгібує реакцію гемаглютинації (РГА). Так, пригнічення РГА спостерігали за мінімальної концентрації даного вуглеводу 0,2±0,1 мг/мл для обох препаратів лектину виділених із культуральної рідини при вирощуванні продуцента за 1-м і 2-м варіантами ферментації.

Зразки препарату лектину, виділені з КР, отримані за 1-м і 2-м варіантами ферментації, також характеризувались наявністю цитотоксичної активності щодо пухлинних клітин (див. табл. 1). Так, IC₅₀ (концентрація речовини, при якій загинуло 50% клітин-мішеней) становила 0,43 та 0,34 мг/мл для згаданих варіантів відповідно.

3.3.Обговорення

Бактерії виду *Bacillus subtilis* широко використовують для промислового отримання ряду ферментів, білків та ін. через їх здатності до екскреції значної кількості різноманітних позаклітинних метаболітів у середовище культивування та наявності серед них низькомолекулярних ліпопептидів із яскраво вираженими поверхнево-активними властивостями обумовлює інтенсивне спінювання КР при вирощуванні даного мікроорганізму у рідких поживних середовищах із глибинною аерацією, що ускладнює проведення процесу культивування. Оскільки, спінювання призводить до значних втрат клітин та їх метаболітів внаслідок виносу спіненої КР із ферментера, підвищує ризик контамінації, вимагає значного зменшення корисного об'єму ферментеру і, відповідно, продуктивності процесу. Традиційним способом контролю рівня піноутворення є підбір і застосування відповідних хімічних піногасників. Але, відомо, що їх використання зменшує швидкість масообміну кисню у середовищі і може спричиняти зниження лектинової активності.

Попередній досвід вирощування іншого штаму *B. subtilis* ІМВ В-7014 – продуцента позаклітинного лектину із противірусними властивостями у лабораторних ферментерах, зазначених вище, виявився досить проблемним. Зокрема, проведені серії культивувань без використання піногасника із коефіцієнтом заповнення 0,62 та мінімальним питомим рівнем аерації – 0,1 л/л/хв засвідчили, що втрати КР перевищують половину її початкового об'єму за весь термін ферментації (21 год) внаслідок викидів спіненої фракції. Суттєво вищий вміст всіх білкових компонентів у піні і її лектинова активність порівняно із відповідними показниками для КР у ферментері [15] є додатковою підставою розглядати ці втрати як вкрай небажані. Спроби обмежити кількість і об'єм викидів шляхом періодичного зменшення рівня подачі повітря аерації, або його короткотермінового припинення

мали в результаті уповільнення, або зупинку росту із частковим лізисом популяції клітин продуцента. Додавання хімічних піногасників різного хімічного складу дозволяло уникати викидів піни, однак їх присутність перешкождала утворенню осаду лектину при його висолюванні сульфатом амонію із надосадової рідини у подальшому [72].

У даній роботі ми застосували два підходи для уникнення викидів піни при проведенні аеробних ферментацій без використання піногасників. У першому випадку введення повітря аерації у КР загальноприйнятим способом через барботер спричиняло постійне генерування шару піни, що, в свою чергу потребувало його безперервного руйнування струменями стерильного повітря. Такий прийом повністю усував викиди спіненої КР, хоча й призводив до втрати відносно незначної частини клітин, вивільнених із зруйнованої піни в результаті їх виносу потоком повітря із ферментеру. Інтенсивність накопичення біомаси для 1-го і 2-го варіантів ферментації була високою, а розраховані нами значення μ становили 0,33 і 0,41 год⁻¹ відповідно.

У другому випадку, за подачі повітря аерації лише над поверхнею КР у стані її інтенсивного перемішування (3-й варіант ферментації) утворений шар піни мав висоту приблизно 20–30 мм і не збільшувався протягом всього періоду культивування; викиди були відсутні. Однак, темп накопичення біомаси був уповільненим, а значення μ (0,25 год⁻¹) – помітно меншим, порівняно із відповідними значеннями для перших 2-х варіантів ферментації. На нашу думку, зазначений шар піни на поверхні КР був перешкодою і обмежував рівень масообміну між рідиною і повітрям у вільному просторі ферментеру. Як наслідок, потреба у кисні для швидкоростучої культури у фазі логарифмічного росту задовольнялась не повністю, незважаючи на високу швидкість перемішування. Іншим свідченням на користь цього припущення було зниження показника рН до значень 5,8 – 5,9 на 33 – 36 год культивування, обумовлене, на наш погляд, накопиченням надлишкового вмісту розчиненого СО₂, утвореного в результаті дихання.

Кисень є основним лімітуючим фактором аеробних ферментаційних процесів, оскільки його розчинність та коефіцієнт дифузії є низькими, а коефіцієнт споживання, навпаки, високим. Тому рівень масообміну визначається, головним

чином, переносом кисню із середовища до мікробних клітин та відведенням із них продуктів обміну [77]. Швидкість перемішування та витрата повітря аерації на одиницю об'єму ферментаційної рідини у ферментері за хвилину, об./об./хв є основними факторами, що впливають на рівень масообміну і баланс процесів сорбції кисню – десорбції діоксиду карбону у ній. Так, режим роботи і конструкція біореактора для культивування швидкоростучих бактерій ($\mu > 0,2 \text{ год}^{-1}$) повинні забезпечувати значення K_V на рівні 4–5 кг $O_2/m^3/\text{год}$ і більше [77]. Відомо, що використання загальноприйнятого сульфїтного методу для визначення K_V дає лише дані для порівняння швидкості поглинання кисню розчином сульфїту натрію в умовах перемішування і аерації, аналогічним умовам культивування [79].

Як зазначено вище, значення K_V , які були визначені нами сульфїтним методом для режиму із максимальною швидкістю обертання перемішуючого пристрою ($n=400 \text{ об/хв}$) майже не відрізнялись для глибинного і для поверхневого способів введення повітря аерації у ферментер і становили 4,0–4,2 г $O_2 /л/год$. Це можна пояснити тим, що робочий розчин сульфїту натрію у дистильованій воді, який традиційно використовують для визначення питомої швидкості масообміну кисню за загальноприйнятою методикою, не утворює піни. Висока турбулентність, спричинена інтенсивним перемішуванням, призводила до значного рівня розчинення і абсорбції кисню зі складу повітря у вільному просторі ферментеру над даним розчином. Шар піни, у випадку його наявності на поверхні розділу фаз, створював би перешкоди зазначеному процесу.

В той же час, відомо, що наявність розчинених ПАР та деяких речовин (спиртів, солей) в дуже малих концентраціях призводить до значного зростання рівня масообміну при перемішуванні і аерації таких розчинів [79,80]. Фізико-хімічні і, зокрема, поверхневі властивості ферментаційних рідин також змінюються протягом циклу культивування, що пов'язано із кількісними і якісними змінами диспергованих клітин, виділенням ними певних метаболітів із властивостями ПАР [80], як у випадку КР *B. subtilis*, про що згадано вище.

Таким чином, отримані результати свідчать, що використання способу глибинної аерації шляхом нагнітання повітря аерації у КР із одночасним постійним

руйнуванням пінного шару на її поверхні забезпечувало швидкий ріст штаму-продуцента *Bacillus subtilis* В-7724 у лабораторному ферментері і досягнення титрів ГАА КР 16–32 ГАО. Показники ГАА дослідних зразків препарату ПЦЛ становили 32 ± 8 та 512 ± 64 ГАО для 1-го і 2-го варіантів, відповідно, і мали вуглеводну специфічність на рівні $0,2 \pm 0,1$ мг/мл. Вирощування штаму за 3-м варіантом ферментації із подачею повітря аерації лише над поверхнею КР з метою попередження генерування піни суттєво уповільнювало темпи росту штаму і супроводжувалось істотним зниженням рН КР, ймовірно, за причини зниженого масообміну. В таких умовах ГАА у КР виявляли на мінімальному рівні 4 ГАО лише в кінці культивування, а у відповідних зразків препарату вона була відсутня.

У даній роботі представлений перший досвід вивчення особливостей росту штаму *Bacillus subtilis* В-7724 і синтезу ним позаклітинного цитотоксичного лектину в умовах лабораторного ферментеру. Отримані результати свідчать про необхідність проведення подальших досліджень з оптимізації способу культивування штаму з метою збільшення синтезу і накопичення цього метаболіту.

ВИСНОВКИ

1. За результатами проведеного літературного огляду, стає зрозуміло що джерелом цитотоксичного лектину можуть бути тварини, гриби, рослини та мікроорганізми. Але для виробництва найкращим варіантом є мікробні лектини, а саме позаклітинний цитотоксичний лектин штаму *Bacillus subtilis* В-7724. Оскільки, процес отримання бактеріальних лектинів досить простий і можливий для стандартизації. Адже, на виділення лектинів із грибів може призвести до зміни партій через такі фактори навколишнього середовища, як сезон, місце та рік збирання врожаю, а також відмінностей у зрілості грибів та зростанні міцелію, а тварині та рослині лектини мають досить високу токсичність.

2. У літературному огляді розглянуто, що на бактеріальний цитотоксичний лектин впливають умови культивування продуцента. Також, на активність лектину впливає піноутворення та використання піногасників.

3. За результатами досліджень, швидкий ріст штаму та підвищення рівня ГАА КР спостерігали під час культивування у ферментері лабораторного масштабу за рахунок підтримки максимального рівня масообміну кисню з подачею повітря в КР через розпилювач до максимального значення.

4. Встановлено, що зразки препарату лектину, виділені з КР, отримані за 1-м і 2-м варіантами ферментації характеризувались наявністю цитотоксичної активності щодо пухлинних клітин. Так, IC_{50} становила 0,43 та 0,34, у зразку препарату лектину за 3-м варіантом культивування – 0 мг/мл.

5. Досліджено, що ГАА зразків препарату, отриманих при використанні 1-го і 2-го варіантів ферментації, складала, відповідно, 32 ± 8 од. та 512 ± 64 од., тоді як у зразку препарату, виділеного з культуральної рідини при вирощуванні продуцента за 3-м варіантом ГАА була відсутня.

6. Ймовірно, що причиною таких відмінностей 3-го варіанту ферментації було обмеження масообміну, спричинене шаром піни, утвореним на поверхні культуральної рідини. Тому швидкий ріст і подальше накопичення позаклітинного цитотоксичного лектину штамом-продуцентом *Bacillus subtilis* В-7724 у

лабораторному ферментері були можливими у разі ферментації із пропусканням повітря аерації через культуральну рідину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Федосова Н.І., Караман О.М., Воєйкова І.М., Симчич Т.В., Іванченко А.В., Черемшенко Н.Л., Круць О.О., Діденко Г.В. Оцінка цитотоксичної активності лектиноподібної речовини *B. subtilis* В-7724 у системі In Vitro. *Онкологія*. – 2018. – Т. 20, № 3. – С. 218-224.
2. Pervin M.K., Isemura M., Nakamura Y. Plant lectins in therapeutic and diagnostic cancer research. *J Plant Biol Res.* – 2015. – Т. 3, № 2.
3. Korman D.B. Lectins of mistletoe white – antitumor properties and mechanisms of action. *Question Oncol.* – 2011. – Т. 57, № 6.
4. Lisyany N.I, Gnedkova I.A, Gnedkova M.A. Study of plant lectins anti-tumor action on glioma cells of different stages of anaplasia. *J Ukr Neurosurg* 2009.– Т.1
5. Fu L.L, Zhou C, Yao S. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *J Biochem Cell Biol.* – 2011.
6. Marvibaigi M, Supriyanto E, Amini N. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *Biomed Res.* – 2014. – С. 1-15.
7. Shi Z, Chen J, Li C.Y. Antitumor effects of concanavalin A and *Sophora flavescens* lectin in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin.* – 2014.
8. Singh R.S, Kaur H.P, Kanwar J.R. Mushroom lectins as promising anticancer substances. *Curr Protein Pept Sci.* – 2016.
9. Hassan M.A, Rouf R., Tiralongo E. Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *JMol Sci.* – 2015.
10. Ovcharenko Yu.S, Chikalovets I.V, Molchanova V.I, Chernikov O.V. Antibacterial activity of lectins from the assistance *Didemnun Ternatanum*. *Res J.* – 2018. DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2018.71.002>
11. Кудрявцева І.Г., Шарикіна Н.І., Коваленко Е.О., Хавич О.О., Павловська Г.П. Протипухлинна активність та токсичність сіалоспецифічних лектинів з бактерій. *Ліки*. – 2006. – С. 89–93.
12. Strain of bacteria *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 – producer of cytotoxic substances with antitumor activity. пат. №131824. Україна. Опубл. 25.01.2019. Бюл. № 2

13. Федосова Н.І., Черемшенко Н.Л., Гетьман К.І., Караман О.М., Симчич Т.В., Іванченко А.В., Данилюк О.І., Воєйкова І.М., Діденко Г.В. Біологічна активність позаклітинного лектину *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 *Mikrobiol. Z.* – 2019; DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.04.107>.
14. Fedosova N.I, Cheremshenko N.L, Hetman K.I, Symchych T.V, Chumak A.V, Shliahovenko V.O, Voyeykova I.M, Didenko G.V. Physicochemical and cytotoxic properties of *Bacillus subtilis* ІМВ В-7724 extracellular lectin. *Mikrobiol. Z.* – 2021; DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.01.039>.
15. Kisten O.G, Kovalenko E.O, Getman K.I, Sashchuk O.V, Pidgorsky V.S, Tyshchenko L.M. Extracellular lectin produced by *Bacillus subtilis* strain ІМВ В- 7014 depending on the culture conditions. *Mikrobiol. Z.* – 2019. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.04.003>
16. Онкологические заболевания в Украине под пристальным вниманием общественности. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.apteka.ua/article/278390>
17. Караман О.М., Федосова Н.І., Воєйкова І.М., Черемшенко Н.Л., Іванченко А.В., Савцова З.Д.. Перспективи використання лектинів для діагностики і лікування злоякісних новоутворень. *Онкологія.* – 2018. – Т. 20, № 1.
18. Федосова Н.І., Черемшенко Н.Л., Гетьман К.І., Симчич Т.В., Чумак А.В., Шляховенко В.О., Воєйкова І.М., Діденко Г.В.. Фізико-хімічні та цитотоксичні властивості позаклітинного лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724. *Мікробіол. журн.* – 2021. – Т. 83, № 1 DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj83.01.039>
19. Barroso L. C., Marcelino dos Santos Silva P., de Menezes Lima V. L, Pontual E. V., Guedes Paiva P. M., Napoleão T. H., dos Santos Correia M.T. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evid Based Complement Alternat Med. J.* – 2017. DOI: [10.1155/2017/1594074](https://doi.org/10.1155/2017/1594074)
20. Mishra A., Behura A., Mawatwal S., Kumar A., Naik L., Mohanty S. S., Manna D., Dokania P., Mishra A., Samir Patra K., Dhiman R. Structure-function and

application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food Chem Toxicol. J.* – 2019. DOI: [10.1016/j.fct.2019.110827](https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110827)

21. Lagarda-Diaz I., Guzman-Partida A. M., Vazquez-Moreno L.. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. *Mol Sci. J.* – 2017. DOI: [10.3390/ijms18061242](https://doi.org/10.3390/ijms18061242)

22. Yasin U., Bilal M., Bashir H., Imran Amirzada M., Sumrin A., Hassham M. Preparation and Nanoencapsulation of Lectin from *Lepidium sativum* on Chitosan-Tripolyphosphate Nanoparticle and Their Cytotoxicity against Hepatocellular Carcinoma Cells (HepG2). *Biomed Res. J.* – 2020. DOI: [10.1155/2020/7251346](https://doi.org/10.1155/2020/7251346)

23. Mazalovska M., Kouokam J. C.. Plant-Derived Lectins as Potential Cancer Therapeutics and Diagnostic Tools. *Biomed Res. J.* – 2020. DOI: [10.1155/2020/1631394](https://doi.org/10.1155/2020/1631394)

24. Zhou S.-M., Cheng L., Guo S. J. Lectin RCA-I specifically binds to metastasis-associated cell surface glycans in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research. J.* – 2015. DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25848723/>

25. Mazalovska M., Kouokam J. C.. Transiently Expressed Mistletoe Lectin II in *Nicotiana benthamiana* Demonstrates Anticancer Activity In Vitro. *Molecules. J.* – 2020. DOI: [10.3390/molecules25112562](https://doi.org/10.3390/molecules25112562)

26. Szurpnicka A., Kowalczyk A., Szterk A.. Biological activity of mistletoe: in vitro and in vivo studies and mechanisms of action. *Arch Pharm Res. J.* – 2020. DOI: [10.1007/s12272-020-01247-w](https://doi.org/10.1007/s12272-020-01247-w)

27. Estrada-Martínez L. E., Moreno-Celis U., Cervantes-Jiménez R., Augusto Ferriz-Martínez R., Blanco-Labra A., García-Gasca T.. Plant Lectins as Medical Tools against Digestive System Cancers. *Mol Sci. J.* – 2017. DOI: [10.3390/ijms18071403](https://doi.org/10.3390/ijms18071403)

28. Poiroux G., Barre A., Els J. M. van Damme, Benoist H., Pi. Rougé. Plant Lectins Targeting O-Glycans at the Cell Surface as Tools for Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Mol Sci. J.* – 2017. DOI: [10.3390/ijms18061232](https://doi.org/10.3390/ijms18061232)

29. Fohona S. Coulibaly , Bi-Botti C. Youan. Current status of lectin-based cancer diagnosis and therapy. *AIMS Molecular Science. J.* – 2017. DOI: [10.3934/molsci.2017.1.1](https://doi.org/10.3934/molsci.2017.1.1)

30. Ali Abol Hassan M., Rouf R., Tiralongo E., May T. W., Tiralongo J.. Mushroom Lectins: Specificity, Structure and Bioactivity Relevant to Human Disease. *Mol Sci. J.* – 2015. DOI: [10.3390/ijms16047802](https://doi.org/10.3390/ijms16047802)
31. Jiang S., Chen Y., Wang M., Yin Y., Pan Y., Gu B., Yu G., Li Y., Wong B.H., Liang Y. A novel lectin from *Agrocybe aegerita* shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine. *Biochem. J.*– 2017. DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22268569/>
32. Cheung R. C.F., Wong J. H., Pan W., Chan Y. S., Yin C., Dan X., Ng T. B. Marine lectins and their medicinal applications. *Appl Microbiol Biotechnol. J.*– 2015. DOI: [10.1007/s00253-015-6518-0](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6518-0)
33. Rabelo L, Monteiro N, Serquiz R, Santos P, Oliveira R, Oliveira A, Rocha H, Morais AH, Uchoa A, Santos E. A lactose-binding lectin from the marine sponge *Cinachyrella apion* (Cal) induces cell death in human cervical adenocarcinoma cells. *Mar Drugs. J.*– 2012. DOI: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22690140/>
34. Filho S. M. G., Cardoso J. D., Anaya K., do Nascimento E. S., Thalles J., de Lacerda J. G., Mioso R., Gadelha T. S., de Almeida Gadelha C. A. . Marine Sponge Lectins: Actual Status on Properties and Biological Activities. *Molecules. J.*– 2015. DOI: [10.3390/molecules20010348](https://doi.org/10.3390/molecules20010348)
35. Gardères J., Bourguet-Kondracki M., Hamer B., Batel R., Schröder H. C., Werner E. G. Porifera Lectins: Diversity, Physiological Roles and Biotechnological Potential. *Mar Drugs. J.*– 2015. DOI: [10.3390 / md13085059](https://doi.org/10.3390/md13085059)
36. Catanzaro E., Calcabrini C., Bishayee A., Fimognari C.. Antitumor Potential of Marine and Freshwater Lectins. *Mar Drugs. J.*– 2020. DOI: [10.3390/md18010011](https://doi.org/10.3390/md18010011)
37. Liao J., Chie C.H., Wu H., Huang K., Wang I., Ho M., Tu I., Lee I., Shih W. L, Y., Wu C., Lukyanov P. A., Danny S.H, Wu S.. A Multivalent Marine Lectin from *Crenomytilus grayanus* Possesses Anti-cancer Activity through Recognizing Globotriose Gb3. *Am. Chem. Soc. J.*– 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/jacs.6b00111>
38. Singh R. S., Kaur H. P., Singh J.. Purification and Characterization of a Mucin Specific Mycelial Lectin from *Aspergillus gorakhpurensis*: Application for

Mitogenic and Antimicrobial Activity. *PLoS One. J.*– 2016. DOI: [10.1371/journal.pone.0109265](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109265)

39. Singh R.S, Kaur H.P, Singh J. New lectins from aspergill and their carbohydrate specificity. *Biologia. J.*– 2014. DOI:<https://link.springer.com/article/10.2478/s11756-013-0293-0>

40. Bhari R., Kaur B., Singh R. S.. Lectin activity in mycelial extracts of *Fusarium* species. *Braz Microbiol. J.*– 2014. DOI: [10.1016/j.bjm.2016.04.024](https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.024)

41. Singh R., Thakur S.. Antimicrobial activity and carbohydrate specificity of new mycelial lectins from *Fusarium* sp. *Biologia J.*– 2014. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11756-014-0449-6>

42. Цитотоксичний лектин з протипухлинною активністю. Пат. № 141944. Україна. Оpub. 2020.

43. Pervin M.K.Y., Isemura M, Nakamura Y. Plant lectins in therapeutic and diagnostic cancer research. *Plant Biol Res J.*– 2015. –№ 3. С.1–6.

44. Korman D.B. Lectins of mistletoe white — antitumor properties and mechanisms of action. *Question Oncol J.*– 2011. Т 57–№ 6 С. 689–98.

45. Lisyany N.I, Gnedkova I.A, Gnedkova M.A. Study of plant lectins anti-tumor action on glioma cells of different stages of anaplasia. *Ukr Neurosurg J.*– 2011.

46. Fu L.L, Zhou C.C, Yao S. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Biochem Cell Biol J.*– 2011. № 43

47. Marvibaigi M., Supriyanto E, Amini N. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *Biomed Res J.*– 2014. С. 1–15.

48. Shi Z., Chen J., Li C.Y. Antitumor effects of concanavalin A and *Sophora flavescens* lectin in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin J.*– 2014. № 35. С.248

49. Singh R.S., Kaur H.P., Kanwar J.R. Mushroom lectins as promising anticancer substances. *Curr Protein Pept Sci J.*– 2016. № 17. С. 797–807.

50. Hassan M.A., Rouf R., Tiralongo E. Mushroom lectins: specificity, structure and bioactivity relevant to human disease. *Mol J.*– 2015. № 16: 7802–38.

51. Ovcharenko Yu.S., Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Chernikov O.V. Antibacterial activity of lectins from the assistance *Didemnum ternatanum*. *Int Res J.*– 2018. T 5–№ 71.
52. Podgorsky V.S., Kovalenko E.A., Karpova I.S. Extracellular lectins of saprophytic strains of bacteria of the genus *Bacillus*. *Applied Biochem Microbiol J.*– 2014. T 50–№ 3.
53. Savustyanenko A.V. Mechanisms of action of probiotics based on *Bacillus subtilis*. *Actual Infectology J.*– 2016. T 2–№11. C. 35–44
54. Roy A.A., Pasichnyk L.A., Tserkovniak L.S. Influence of bacteria of *Bacillus* genus on the agent of bacterial cancer of tomatoes. *Microbiol J.*– 2012; T 74–№5. C. 74–80
55. Wang P., Leng X. Functional component isolated from *Phaseolus vulgaris* lectin exerts in vitro and in vivo antitumor activity through potentiation of apoptosis and immunomodulation. *Molecules J.*– 2021. DOI:<https://doi.org/10.3390/molecules26020498>
56. Palharini J. G., Richter A. C., Silva M. F.. Eutirucallin: lectin with antitumor and antimicrobial properties. *Microbiol. J.*– 2017. DOI:<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00136>
57. Zhou J., Hu M., Li J.. Mannanbinding lectin regulates inflammatory cytokine production, proliferation, and cytotoxicity of human peripheral natural killer cells. *Mediators of Inflammation J.*– 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/6738286>
58. Ahmed F. R. S., Amin R., Hasan I.. Antitumor properties of amethyl β D-galactopyranoside specific lectin from *Kaempferia rotunda* against Ehrlich ascites carcinoma cells. *Biol Macromol. J.*– 2019.
59. Marvibaigi M., Supriyanto E., Amini N.. Preclinical and clinical effects of mistletoe against breast cancer. *Biomed Res J.*– 2019. C.1–15.
60. Estrada Martínez L. E., Moreno Celis U., Cervantes Jiménez R. Plant Lectins as Medical Tools against Digestive System Cancers. *Int. Mol. J.*– 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18071403>

61. Wang K., Liu C., Hou Y.. Differential apoptotic and mitogenic effects of lectins in zebrafish. *Front Endocrinol. J.*– 2019. DOI:<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00356>.
62. Федосова Н. І., Черемшенко Н. Л., Симчич Т. В., Чумак А. В., Воєйкова І. М.. Оцінка гострої токсичності лектину *B. subtilis* ІМВ В-7724. <https://pharmtox-j.org.ua/index.php/pharmtox-j/article/view/114>
63. Федосова А.О, Хитра З.М., Черемшенко Н.Л. Ефективність застосування модифікованого середовища Гаузе для культивування мікроорганізму *B. subtilis* ІМВ В-7724 з метою отримання речовин з цитотоксичною активністю. 2020. https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Upload/Shevchenkivska_vesna/2020/Shevchenkivska_vesna_2020_2.pdf
64. Su Y., Liu C., Fang H., Zhang D. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microb Cell Fact J.*– 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>.
65. Shih I-L., Lin C-Y., Wu J-Y., Hsieh C. Production of antifungal lipopeptide from *Bacillus subtilis* in submerged fermentation using shake flask and fermentor. *Korean Chem. Eng J.*– 2009 T 26–№6. DOI: 10.1007/s11814-009-0237-0.
66. Ha S., Kim H.M., Chun H.H., Hwang I.M., Lee J.H., Kim J.C., Kim I.S., Park H.W. Effect of oxygen supply on surfactin production and sporulation in submerged culture of *Bacillus subtilis* Y9. *Appl. J.*– 2018. DOI:10.3390/app8091660.
67. Takesono S., Onodera M. Biosurfactant production in stirred-tank fermenter under mechanical foam control. *Trends in Chemical Engineering J.*– 2019
68. Delvigne F., Lecomte J-P.. Foam formation and control in bioreactors. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: *Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology J.*– 2019. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470054581.eib326>
69. Kisten O.G., Kovalenko E.O., Getman K.I., Sashchuk O.V., Pidgorsky V.S., Tyshchenko L.M. Extracellular lectin produced by *Bacillus subtilis* strain IMV B- 7014 depending on the culture conditions. *Mikrobiol. J.*– 2019. DOI: <https://doi.org/10.15407/microbiolj81.04.003>
70. Звіт про НДР 04.05. «Розробка технологічних основ мікробного

протигерпесного препарату в умовах діючого виробництва», Київ, ІМВ НАН України, 2018 р. – 37 с.

71. Подгорский В.С., Коваленко Э.А., Симоненко И.А. Лектины бактерий – Киев: Наук. Думка, 1992. – 204 с.

72. Виноградова А.В., Анашкина Е.Н. Общая биотехнология: метод. указания к лабораторным работам. 2008. – 41 с

73. Stefanov A.V. Preclinical research of medicinal products: Methodical recommendations // К . – Avicenna. – 2002. – с.568.

74. Lutsik M.D. Lectins / M.D. Lutsik, E.N. Panasyuk, A. D. Lutsik // L'vov. – Vishcha shkola. – 1981. – с .155.

75. Волова Т.Г. Биотехнология. Новосибирск: Изд-во Сиб. отд. РАН; 1999.

76. Виестурс У, Лейте М. Некоторые новые биотехнологии и аппаратура для их осуществления. *Прикл. биохим. и микробиол. Ж.*– 1997.

77. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М.. *Академия.* 2005.

78. Владимирова И.С., Емельянов В.М., Филиппова Н.К., Кошкина Л.Ю. Интенсификация процессов аэробного культивирования микроорганизмов. *Вестн. Казанск. технол. ун-та.* 2009.

79. Виноградова А.В., Анашкина Е.Н. Общая биотехнология: руководство по лаб. работам. Изд-во Пермского государственного технического университета. 2008.

80. Кожем'якін Ю. М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко та інші // К. – 2002. – с. 179.

Додатки
ПРОЄКТ АНД

Аналітично-нормативна документація

Препарат «Бактеріальний лектин»

Ліофілізований порошок у флаконах по 7 г.

Склад одного флакону: 1 флакон містить ліофілізованого порошку бактеріального лектину по 7 г. Допоміжних речовин немає.

Фармакологічні властивості.

Фармакодинаміка. Протипухнний засіб, має цитотоксичну активність. Прямий цитотоксичний вплив зумовлений зв'язуванням лектину з цукровмісним рецептором на клітинній поверхні та індукцією каскаду внутрішньоклітинних процесів, наслідком яких є апоптоз, аутофагія, блокування клітинного циклу та інгібування проліферації пухлинних клітин.

Фармакокінетика.

Після підшкірного введення препарату кількість бактеріального лектину поступово зростає і максимальна концентрація в сироватці досягається через 4 години. Препарат після ін'єкції зберігається ще у сироватці і через 96 годин. Після підшкірного введення період напіввиведення з сироватки становить 13-14 годин. Шлях виведення препарату не встановлено.

Специфікація

Показники якості	Допустимі норми	Методи контролю
Опис препарату	Бактеріальний лектин має вигляд аморфного порошку бурого кольору, який добре розчиняється у воді, буферних розчинах (забуференому фізіологічному розчині, Трис-НСІ), лугах та деяких органічних розчинниках (етанол, ацетон). Випускається у флаконах у ліофілізованому вигляді.	П.1. АНД
Розчинність, прозорість, кольоровість	Визначається за який час розчиняється порошок у певному об'єму розчину. Препарат повинен протягом 5 хвилин утворювати прозорий розчин з відтінком бурого кольору.	П.2. АНД За п 2.9.3. Розчинення твердих лікарських форм. ДФУ 1.1., 2004 р.
Справжність, активність	Результати активності мають збігатися з даними зазначеними на етикетці.	П.3. АНД
рН	рН розчину має становити в межах 7,5-8,0.	П.4. АНД За п 2.2.3. Потенціометричне визначення рН,

		ДФУ 1.2., 2008р.
Стерильність, апірогенність	Посіви інкубують протягом 14 діб. Посіви переглядають кілька разів у період інкубації. Не має бути проросту мікроорганізмів. Апірогенність визначають за допомогою вимірювання підвищення температури тіла (кроля) введенням підшкірно стерильного розчину лікаоського засобу.	П.5. АНД За п. 2.6.1, 2.6.8. Стерильність, ДФУ 1.2., 2008р.
Механічні включення	Лікарський засіб витримує випробування, якщо середня кількість часток у випробовуваних одиницях не перевищує 6000 на один контейнер для часток розміром 10 мкм або більше і не перевищує 600 на один контейнер для часток розміром 25 мкм і більше.	П.6. АНД За п. 2.9.19. Механічні включення: невидимі частки, ДФУ 1.2., 2008 р.
Оптичні характеристики	Розглядається під оптичним мікроскопом, має бути пориста поверхня.	П.7. АНД За п. 2.9.37. Оптична мікроскопія, ДФУ 1.2., 2008 р.
Однорідність маси	Порошки для приготування ін'єкційних засобів мають	П.7. АНД За п. 2.9.5.

	витримувати випробування на однорідність маси на одиниці дозованого лікарського засобу.	Однорідність маси, ДФУ 1.2., 2008 р.
Однорідність вмісту	Порошки для приготування ін'єкційних лікарських засобів із вмістом діючої речовини менше 2 мг або менше 2% від загальної маси або з масою дозованої одиниці, що дорівнює 40 мг або менше, мають витримувати випробування на однорідність вмісту діючої речовини в одиниці дозованого лікарського засобу.	П.7. АНД За п. 2.9.6. Однорідність вмісту, ДФУ 1.2., 2008 р.
Маркування, пакування	На етикетці зазначають спосіб приготування ін'єкції. Кожен флакон пакується в окрему пачку.	Візуально

Методи контролю

1. Опис препарату. Препарат являє собою ліофілізат для розчину для ін'єкцій. Порошок ліофілізований бурого кольору. 1 флакон містить ліофілізованого бактеріального лектину по 7 г.

2. Розчинність, прозорість, кольоровість. При розчиненні препарату у 30-50 мл води кімнатної температури утворюється прозорий розчин з з бурим відтінком кольору. Визначення проводять візуально.

3. Справжність, активність. Ці параметри визначаються за допомогою спеціальної реакції гемаглютинації.

Принцип реакції гемаглютинації

Наявність лектинів характеризує аглютинуюча активність. В основу методу закладено принцип аглютинації, опосередкованої лектинами, а саме утворення агрегатів шляхом не ковалентного зворотнього зв'язування активного центру субодиниць білка лектину з комплементарними вуглеводами – рецепторами на мембранах еритроцитів.

Для приготування робочої суспензії еритроцитів: 0,1мл еритроцитарної маси дозатором вносять у пробірку з 5мл фізіологічного розчину і обережно збовтвувують.

Реакцію аглютинації проводять в імунологічному планшеті з U-подібними лунками при кімнатній температурі.

Інтенсивність реакції аглютинації еритроцитів оцінюють за титром або сумою умовних балів по окремих лунках. За наявності значної аглютинації еритроцити вистилають всю поверхню дна лунки. Про відсутність аглютинації еритроцитів свідчить чітка пляма в центрі дна луни.

4. Вимірювання рН. Потенціометричне визначення рН проводять шляхом вимірювання різниці потенціалів між двома відповідними електродами, зануреними у випробовуваний розчин: один з електродів чутливий до іонів водню (скляний електрод), другий – електрод порівняння (наприклад насичений каломельний електрод). Вимірювальним приладом є вольтметр з вхідним опором принаймні у сто раз більшим за опір використовуваних електродів. Прилад звичайно градується в

одиницях рН і повинен мати таку чутливість, щоб можна було виявити відмінність принаймні 0,05 одиниць рН або 0,003 В.

Усі виміри проводять при тій самій температурі в інтервалі від 20 до 25⁰С, якщо немає інших зазначень в окремій статті. Якщо необхідно враховують температурні поправки відповідно до інструкцій підприємства-виробника. Прилад калібрують за допомогою буферного розчину калію гідрофталату (первинний стандарт) і одного з буферних розчинів з іншим значенням рН. Показання приладу для третього буферного розчину з проміжним значенням рН не мають відрізнятись більше як на 0,05 одиниць рН від табличного значення рН цього розчину. Електроди занурюють у випробовуваний розчин і вимірюють рН у тих самих умовах, що і для буферних розчинів. Якщо прилад використовують часто, то його калібрування проводять регулярно У протилежному разі калібрування приладу має проводитись перед кожним виміром. Усі випробовувані розчини і стандартні буферні розчини мають бути приготовані на воді, вільній від діоксиду вуглецю, Р.

5. Стерильність. Випробування на стерильність проводять методом прямого висівання. Випробовуваний лікарський засіб вносять безпосередньо у готові живильні середовища. Для виявлення анаеробних та факультативно анаеробних бактерій використовують рідке тіогліколеве середовище, а для виявлення грибів, і також аеробних бактерій використовують соєво-казеїнове поживне середовище. Якщо немає інших зазначень в окремій статті, кількість лікарського засобу має становити не більше 10 % від об'єму середовища. Якщо для висівання необхідно використати велику кількість зразка, то краще застосовувати концентроване живильне середовище, приготоване з урахуванням подальшого розведення. Там, де це можливо, концентроване живильне середовище рекомендується додавати безпосередньо у контейнер з лікарським засобом. Посіви інкубують не менше 14 діб. Посіви переглядають кілька разів під час інкубації. Лікарський засіб витримує випробування на стерильність, якщо при візуальному обліку не виявляється ріст мікроорганізмів. При наявності росту мікроорганізмів вважають, що лікарський засіб не витримує випробування на стерильність, якщо не доведена невірність результатів випробування, викликана причинами, не

пов'язаними з випробовуванням лікарським засобом. Якщо результати випробування визнані невірними, його повторюють на тій самій кількості зразків, що і початкове.

Апірогенність. Випробування на пірогени полягає у вимірюванні підвищення температури тіла, спричиненого у кролів підшкірним введенням стерильного розчину випробовуваного лікарського засобу. Для забезпечення цієї вимоги ін'єкційні розчини готують на апірогенній воді для ін'єкцій (або маслах) з використанням лікарських речовин, які не містять пірогенів.

Підготовка та введення випробовуваного зразка. Реєстрація температури. Кількість одноразово відібраної проби випробовуваного зразка має бути достатньою для проведення випробування на вісьмох кролях. Випробовуваний зразок вводять без додаткового розведення, якщо немає інших зазначень в окремій статті. Розчин випробовуваного зразка, нагрітого перед ін'єкцією приблизно до температури 38.0 °С, вводять у крайову вену вуха кроля не пізніше як через 30 хв після вимірювання вихідної температури.

Розчин вводять підшкірно в об'ємі від 0.5 мл до 10 мл на 1 кг маси тіла повільно протягом від 2 хв до 4 хв. Доза випробовуваного зразка залежить від його біологічної активності та зазначається в окремій статті. Температурний датчик вводять у пряму кишку на глибину від 7 см до 9 см, і ця глибина має бути незмінною протягом усього випробування. Температуру тіла кролів реєструють кожні 30 хв протягом 3 год після ін'єкції випробовуваного зразка, визначаючи у кожного кроля макси - мальне підвищення температури. При використанні піроген-тестерів температурний датчик залишають у прямій кишці на весь час випробування.

6. Механічні включення. Порошки для парентерального застосування розчиняють у воді вільній від часток, Р, або у придатному розчиннику, вільному від часток, якщо вода, вільна від часток, Р, непридатна. Відбирають 4 проби не менше 5 мл кожна, і визначають кількість часток із розмірами, що дорівнюють або перевищують 10 мкм і 25 мкм. Виключають результат, одержаний для першої проби, і розраховують середню кількість часток у випробовуваному зразку. Якщо

середня кількість часток перевищує граничні значення, проводять випробування препарату на механічні включення методом мікроскопії. Препарат витримує випробування, якщо середня кількість часток ц випробовуваних одиницях не перевищує 6000 в 1 контейнері для часток розміром 10 мкм або більше і не перевищує 600 в одному контейнері для часток розміром 25 мкм або більше.

7. Оптичні характеристики. Для візуальної характеристики збільшення і числова апертура мають бути досить високими для відповідного розділення зображення часток, що характеризуються. Реальне збільшення визначають, використовуючи відкалібрований об'єкт-мікромметр для калібрування окулярного мікромметра. Якщо розмір часток потрібно визначати фотографічними методами, слід вжити заходів, що забезпечують різке фокусування на фотоплівці. Для характеристики кристалічності досліджують суміш, використовуючи поляризаційний мікроскоп; при повороті предметного столика мікроскопа частки виявляють подвійно променезаломлення(інтерференцію кольорів)і загасання позитронів.

Стан частинок може бути описаний такими параметрами:

Край:

- Загострені;
- Заокруглені;
- Гладкі;
- Гострі;
- Ламані.

Оптичні властивості:

- колір(використовуючи підхожі компенсуючи фільтри);
- прозорі;
- напівпрозорі;
- матові.

Дефекти:

- Оклюзії;
- Включення.

Поверхня часток може бути описана як:

- *Така, що розтріскана:* частково розрізна, з тріщинами або борозенками,
- *Гладка:* вільна від нерівностей, шорсткості або виступів,
- *Пориста:* що має отвори або канали,
- *Шорсткувата:* шишкоподібна, нерівна, негладка,
- *Зрита:* маленькі зазублини.

Однорідність маси та вмісту визначається за фармакопейними статтями 2.9.5 та 2.9.6.

8. Маркування, пакування. У якості первинної упаковки використовується скляні флакони. На кожному флаконі наноситься назва і дозування препарату латинськими та українськими буквами. Маркування здійснюється за допомогою лазера або чорнилами глибокої печаті. Кожен флакон пакується в індивідуальну коробку з інструкцією. На коробці українською мовою або іншою вказують виробника, товарний знак, адресу, назву препарату, кількість флаконів, умови зберігання, реєстраційний номер, контрольний номер ВБТК, номер серії, термін придатності, штриховий код. Зберігати препарат в захищеному від світла та недоступному для дітей місці при температурі від 0 до 5⁰С.

9. Транспортування. Всіма видами критого транспорту при температурі не вище 10⁰С.

10. Зберігання. В сухому темному місці при температурі від 0 до 5⁰С

11. Термін придатності. 1 рік.