

Микробные модели для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов

А. С. ТРЕНИН

ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе» РАМН, Москва

Microbial Models in Screening of Inhibitors of Sterol Biosynthesis

A. S. TRENIN

Gause Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia (GINA RAMS)

На основе ранее разработанных микробных моделей предлагается высокоэффективная схема поиска ингибиторов биосинтеза стеролов (ИБС). Она основана на использовании галофильной бактериальной культуры *Halobacterium salinarum* (по прежней классификации *Halobacterium halobium*), обладающей мевалонатным путём биосинтеза стеролов, и модели грибной культуры *Acremonium fusidioides* (по прежней классификации *Fusidium coccineum*), образующей фузидиевую кислоту (фузидин) — антибиотик стероидной структуры, биосинтез которого в организме гриба-продуцента имеет значительное сходство с биосинтезом холестерина в организме человека. В модели *H. salinarum* ИБС выявляются как соединения, подавляющие рост тест-культуры, а в модели *A. fusidioides* — как соединения, резко снижающие продукцию фузидина при отсутствии заметного влияния на рост продуцента. Внесение мевалоновой кислоты — одного из ключевых интермедиатов биосинтеза стеролов, снимает ингибирующее действие многих микробных метаболитов и, таким образом, служит доказательством их влияния на ранние этапы биосинтеза стеролов, включая этап работы ГМГ-КоА редуктазы. Оба теста разработаны в виде микрометодов, легко поддаются механизации благодаря миниатюризации микробиологических процессов, выращиванию культур в стерильных 96-луночных планшетах и использованию автоматических микропипеток. Сравнивается результативность обоих тестов, их чувствительность, трудоёмкость, а также способность давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты в поиске ИБС. Предложенная схема поиска ИБС, включает в себя использование обеих микробных моделей на ранних этапах поисковых работ и культуры клеток Нер G2 на поздних этапах, а также обязательный отбор на начальном этапе микробных метаболитов, обладающих противогрибковой активностью. Рассматриваются вопросы миниатюризации и механизации микробиологических работ, а также способы очистки культуральной жидкости продуцентов путём микро- и ультрафильтрации.

Ключевые слова: ингибиторы биосинтеза стеролов, противоогрибковые и противоопухолевые антибиотики, микробные модели поиска антибиотиков, фузидин, холестерин, мевалоновая кислота, ГМГ-КоА редуктаза, Нер G2, миниатюризация микробиологических процессов, микро- и ультрафильтрация.

On the base of previously developed microbial models high effective scheme for screening of inhibitors of sterol biosynthesis (ISB) is proposed. It is based on cultivation of halophilic bacteria *Halobacterium salinarum* (former *Halobacterium halobium*), possessing mevalonate pathway of sterol biosynthesis, and cultivation of fungus *Acremonium fusidioides* (former *Fusidium coccineum*), that is producer of steroid antibiotic fusidin (fusidic acid), which biosynthesis has great similarity (with coincidence of its initial steps till squalene formation) to cholesterol biosynthesis in human organism. In *H. salinarum* model ISB are revealed as compounds that inhibit test-culture growth, whereas in *A. fusidioides* test-system they are revealed as compounds that strongly reduce fusidin production without any visible influence on producer's growth. Mevalonate that is one of the crucial intermediates of sterol biosynthetic pathway, including HMG-CoA reductase step. Both test-systems are developed as micromethod and could be easily mechanized due to miniaturization of microbiological procedures, cultivation in sterile 96-well plates and usage of automatic micropipettes and dispensers. Effectiveness of both test-systems, as well as their sensitiveness, laboriousness and ability to give false-positive or false-negative results in ISB screening work is compared. The proposed scheme of screening of ISB includes microbial models at early steps of screening procedures and Hep G2 test-system at the late step. The preliminary screening of microbial metabolites possessing antifungal activity at initial step is compulsory. Miniaturization and mechanization of microbial processes and purification of producers' culture broth with micro- and ultrafiltration are under consideration as well.

Введение

Микробные вторичные метаболиты — ингибиторы биосинтеза стеролов (ИБС), в первую

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 119021 г. Москва, Большая Пироговская, 11. ФГБУ НИИНА

очередь статины — ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы (ГМГ-КоА редуктазы), хорошо зарекомендовали себя в лечении и профилактике атеросклероза, показали высокую эффективность в лечении ряда онкологических заболеваний [1—4]. Ингибиторы более поздних этапов биосинтеза стеролов, в частности, инги-

биторы сквален-сингазы, сквален-эпоксидазы и сквален-монооксигеназы, также могут оказаться эффективными препаратами для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [5, 6], а ингибиторы Р-450 зависимой деметилазы ланостерола, являются, по-видимому, единственным средством лечения грибковых инфекций [7]. В настоящее время развернут широкий поиск ИБС среди продуктов жизнедеятельности различных микроорганизмов, как грибов, так и актиномицетов [8, 9].

Успех поисковых работ во многом зависит от эффективности применяемых тест-систем, в особенности на начальном этапе отбора. Поскольку требования, предъявляемые к тест-системам, весьма разнообразны, создание единой универсальной модели поиска метаболитов, обладающих специфической биологической активностью, отвечающей всем этим требованиям, становится, как правило, невозможным. Необходима разработка не только специальных тестов, обладающих различной эффективностью на разных этапах поиска, но и соответствующей схемы поисковых работ.

Использование на начальных этапах поиска ферментных систем [10–12] не гарантирует того, что отобранные соединения, активно подавлявшие соответствующую реакцию *in vitro*, смогут достичь природную мишень и, соответственно, проявить свои потенциальные качества в реальных условиях [13, 14]. Кроме того, отбор, основанный на использовании биохимических реакций, как правило, требует анализа высокоочищенных соединений и плохо применим на ранних этапах поиска природных метаболитов, содержащих большое количество примесей [15, 16].

Более целесообразным является применение моделей, основанных на использовании целых клеток, включая как одноклеточные, так и многоклеточные организмы, в т. ч. фруктовую мушку *Drosophila melanogaster*, нематоды *Caenorhabditis elegans* и др. [14, 17], а также культуры клеток млекопитающих [12, 18, 19]. Особый интерес в качестве модельных тест-систем для поиска биологически активных микробных метаболитов, в т. ч. ИБС, представляют различные микробные культуры [12, 19, 20–23].

Предложенные нами методы поиска ИБС основаны на использовании культуры клеток млекопитающих — гепатобластомы G2 (Нер G2), а также микробных культур — грибной культуры *Acremonium fusidioides* и бактериальной культуры *Halobacterium salinarum* [24–26].

В основу метода отбора ИБС с помощью культуры клеток Нер G2 положена количественная оценка включения радиоизотопных предшественников в холестерин (ХС) и отдельные фракции липидов и выявление соединений, подавляющих это включение [24]. В teste с культурой *A.fusid-*

oides ИБС выявляются как соединения, резко снижающие продукцию фузидина при отсутствии заметного влияния на рост продуцента [25]. В модели *H.salinarum* ИБС выявляются как соединения, подавляющие рост тест-культуры [26]. Тесты с *A.fusidioides* и *H.salinarum* разработаны в виде микрометодов. Серьёзное внимание удалено также миниатюризации микробиологических методов работы с микробными продуцентами и использованию микро- и ультрафильтрации для очистки их культуральной жидкости.

Указанные модели показали свою высокую эффективность, поскольку в ходе развёрнутого в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе РАМН широкого поиска ИБС они позволили обнаружить ряд соединений, обладающих способностью к подавлению биосинтеза стеролов [27–30]. Выявление ИБС и образующих их микроорганизмов стало возможным благодаря применению специальной схемы поиска, разработанной на основе детального сравнения применяемых моделей, в т. ч. при сопоставлении их надёжности, чувствительности, трудоёмкости, а также способности давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты.

Материал и методы

Реактивы и материалы. В работе использовали препараты антибиотиков зарубежных и отечественных компаний, а также антибиотики, полученные в НИИНА им. Г. Ф. Гаузе, РАМН. Используемый в тест-системе препарат лактона D,L-мевалоновой кислоты («Sigma», США) подвергали сапонификации — выдерживали в слабощелочной среде для получения кислотной формы: 1 М раствор лактона в 0,1 н NaOH инкубировали при 50°C в течение 2 ч, либо при 37°C в течение 4 ч.

Контрольным препаратом при выявлении ИБС служил ловастатин («MSD», США).

Для стерилизации проб культуральной жидкости применяли одноразовые стерильные фильтры Sterivex (диаметр пор 0,22 мкм) фирмы «Millipore», США. В целях концентрирования препаратов культуральной жидкости проводили их лиофилизацию на лиофилизационной установке SUE 300 Q («Нето», Швеция).

Условия культивирования, среды, определение биологической активности. Культуры актиномицетов и грибов выделяли из образцов почвы и выращивали при температуре 28°C на агаризованных средах: актиномицеты — на среде Гаузе 1 и Гаузе 2, грибы — на сусло-агаре и кислом агаре Чапека [24–26].

Выращивание культур в жидких питательных средах проводили на средах: Гаузе 2, 2663 (соево-глицериновой), 5339, T, A4 (соево-глюкозной), 11654, AM, соево-сахарозной и кукурузно-крахмальной в колбах Эрленмейера ёмкостью 750 мл с наполнением 50–200 мл на качалках при 28°C в течение 3–11 суток, как описано ранее [25, 26], а также в стерильных плоскодонных 6- и 24-луночных пластиковых планшетах («Flow», Великобритания; «Costar», Франция; «Медполимер», С-Пб.) без встряхивания в термостате при 28°C в течение 3–9 суток. Для создания условий асептики при разливе микробиологических сред и пересеве микробных культур применяли микрофильтры. Объём проб составлял 0,5 мл при использовании 24-луночных планшетов и 1 мл при использовании 6-луночных планшетов. В качестве инокулята использовали выращенные на агаризованных средах 7–10-суточные культуры.

Рост культур в жидкой среде контролировали с помощью инвертированного микроскопа непосредственно в лунках планшета, фотометрическими методами по уровню поглощения света при 490 и 540 и 570 нм, а также по сухому весу мицелия.

Для фотометрического определения биомассы мицелиальных организмов проводили предварительную дезинтеграцию мицелия продуцентов ультразвуком с использованием генератора «Dawe Sonuprobe», Англия, непосредственно в ячейках 6-луночных планшетов. Фотометрическое определение роста проводили с помощью ручных и автоматизированных микроплейт-спектрофотометров вертикального сканирования «Uniscan», «Multiscan» (Германия), «ИФКО-2» (Россия).

Для получения сухого мицелия накопившуюся в лунках планшетов биомассу помещали в полимерные центрифужные пробирки объёмом 1,5 см³ («Eppendorf», Германия; «Медполимер», С-Пб.), осаждали центрифугированием и высушивали при температуре 80°C в течение 2 ч, после чего взвешивали на аналитических весах.

Антибиотическую активность определяли методом штриха на агаровой среде при выращивании продуцентов на плотных питательных средах и методом диффузии в агаре при выращивании в жидких средах — в отношении различных бактериальных тест-микроорганизмов и грибов: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 21027, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus humicolus* ATCC 9949, *Aspergillus niger* ATCC 16404 и *Fusarium oxysporum* VKM F-140 (=CMI, IMI 90473).

Выделение и очистка антибиотиков проведены, как описано ранее [24–26]. Культуральную жидкость и мицелий продуцентов разделяли фильтрацией или центрифугированием. Выделение антибиотиков из фильтрата культуральной жидкости проводили сорбцией на смоле Амберлит XAD-2, или экстракцией этилацетатом при кислом (4,0) и нейтральном значениях pH. Полученный после упаривания в вакууме осадок растворяли в небольшом объёме 60% EtOH. Экстракцию антибиотиков из мицелия проводили 80% EtOH.

Хроматографическую очистку и разделение компонентов перспективных препаратов проводили методом колоночной хроматографии. Определяли физико-химические характеристики полученных соединений. Для идентификации выделенных антибиотических веществ использовали компьютерную базу данных природных биологически активных веществ (BNPD), разработанную Я. Берди (Венгрия).

Микро- и ультрафильтрационная очистка культуральной жидкости продуцентов. Для очистки методом ультрафильтрации применяли предварительное дифференциальное центрифугирование культуральной жидкости с отсечением фрагментов, превышающих 1000 S (центрифуга «Beckman JB-21», Австрия, ротор JA-20, 18 тыс. об/мин, 60 мин) и 6 S (ультрацентрифуга «Beckman L 5-65», Австрия, ротор Ti 50.2, 40 тыс. об/мин, 19 ч, 10°C). При получении проб, объём которых не превышал 1 мл, использовали микроцентрифугу «ELMI MF-05», Латвия (10.000 об/мин, 2 раза по 25 мин).

Ультрафильтрацию под давлением проводили с использованием ультрафильтров с НПМВ, от 100 тыс. до 10 тыс. Д («Millipore», США; «Владипор», РФ). Ультрафильтрацию с применением центрифугирования проводили в центрифуге «Beckman JB-21», Австрия (ротор JA-20, 18 тыс. об/мин, 60 мин) в патронах UFC-2 и в микроцентрифуге «ELMI MF-05», Латвия (10.000 об/мин, 40 мин) в патронах UFC-3 TTK 00 и UFC-3 TGC 00 с НПМВ 30.000 и 10.000 Д («Millipore», США).

Прошедшую ультрафильтрационную обработку к.ж. стерилизовали фильтрацией через фильтры Sterivex («Millipore», США) с диаметром пор 0,22 мкм и концентрировали лиофилизацией на установке SUE 300 Q («Нето», Швеция).

Тест-системы для выявления ИБС. Работу с культурой клеток гепатобластомы Нер G2, а также бактериальной культурой *Halobacterium salinarum* (по прежней классификации *Halobacterium halobium* ATCC 29341) и грибной культурой

Acremonium fusidoides (*Fusidium coccineum* Fuckel ATCC 14700) проводили, как описано ранее [24—26].

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием компьютерных программ Statgraf и Microsoft Excel, рассчитывая средние арифметические значения, доверительные интервалы и стандартное отклонение. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием t-критерия Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Миниатюризация микробиологических исследований в работе с микробными продуцентами и микробными тест-культурами. Стремление к использованию микрометодов — заметная тенденция в современной микробиологии. В последнее время культивирование микробных штаммов в микропробах с объёмом питательной среды, не превышающим 750—1000 мкл, получает всё большее распространение в исследовании продуцентов антибиотиков [31, 32].

В наших исследованиях выращивание культур свежевыделенных из почвы микробных продуцентов, а также микроорганизмов, используемых в качестве тест-культур, проводилось в стерильной пластиковой посуде импортного или отечественного производства, предназначенной для проведения иммунологических тестов или культивирования клеток млекопитающих. Объём проб в эксперименте составлял 1 мл и менее (вплоть до 50 мкл). Культивирование микроорганизмов в минимальных объёмах питательной среды позволило резко снизить расход питательных сред и отказаться от использования специальных аэрирующих приборов (качалки и пр.). Малый объём проб, их компактное расположение на планшете позволило использовать автоматические дозаторы, в т. ч. многоканальные, для разлива питательных сред, содержащих микробный инокулум, и внесения испытуемых веществ, что способствовало значительному ускорению постановки экспериментов, а также увеличению числа повторов в опыте. Появилась возможность резкого увеличения числа тестируемых метаболитов. В целом, трудоёмкость процесса изучения штаммов-продуцентов значительно уменьшилась.

Количественная оценка роста таких продуцентов, как актиномицеты и плесневые грибы, представляет определённую сложность, в силу способности этих микроорганизмов к образованию нитевидного мицелия, затрудняющего фотометрическое определение роста культуры. В связи с этим наиболее часто используемым методом оценки роста мицелиальных культур традиционно является измерение сухой массы мицелия.

Результаты, представленные на рис. 1, демонстрируют возможность замены указанного метода на фотометрическое определение роста при условии предварительной обработки мицелия продуцента ультразвуком с помощью ультразву-

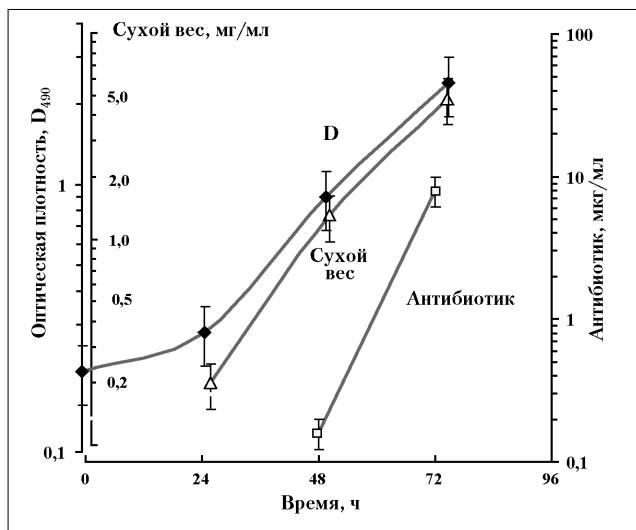


Рис. 1. Рост и продукция антибиотика культурой *Fusidium* sp.

По оси абсцисс – время, ч; по оси ординат левая (1): оптическая плотность (D_{490}); по оси ординат левая (2): сухой вес, мг/мл; по оси ординат правая: антибиотик, мкг/мл.

кового дезинтегратора непосредственно в ячейках 6-луночных планшетов. Результаты, полученные при использовании такого подхода, не уступают данным трудоёмкого метода определения биомассы по сухому весу мицелия. Указанное наблюдение практически значимо, особенно если учесть, что традиционные методы определения роста мицелиальных организмов с трудом поддаются автоматизации [33, 34].

Успешное выращивание микробных продуцентов в пластиковой посуде с использованием микрообъёмов питательной среды показывает целесообразность использования микрометодов в разработке новых микробных тест-систем. Новые микробные тест-системы, необходимые для поиска ИБС, разработаны нами в виде микрометодов [25, 26].

Использование микро- и ультрафильтрационной очистки микробных метаболитов. Очистку биологически активных соединений от высокомолекулярных примесей, препятствующих их определению в специальных тестах, проводили ультрафильтрацией в сочетании со скоростным центрифugированием. Предложены две основные схемы частичной очистки культуральной жидкости продуцентов без применения химических методов (рис. 2).

Первая схема включала в себя подготовительные процедуры в виде осаждения крупных механических примесей центрифугированием с отсе-чением частиц крупнее 1 тыс. С и последующую микрофильтрацию (0,17 мкм) в установке «Millipore» 1225 (США) с одновременной обработкой до 12 микро-проб культуральной жидкости различных продуцентов.

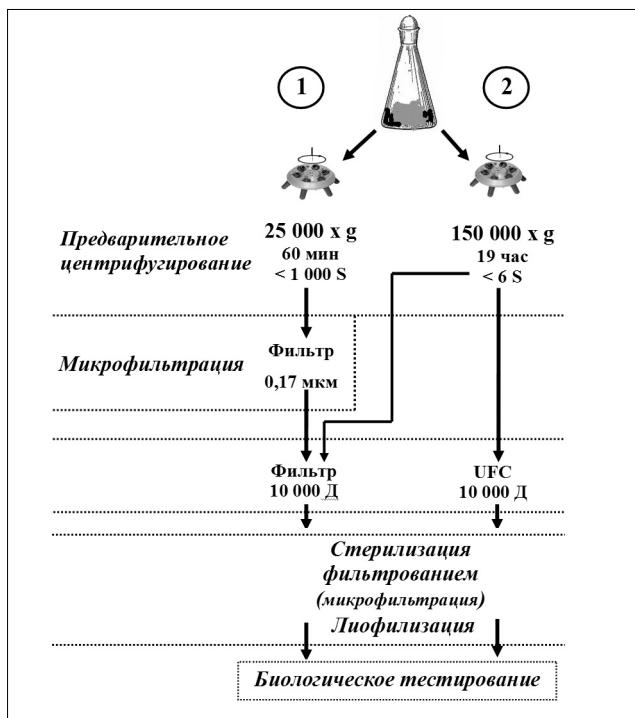


Рис. 2. Очистка культуральной жидкости микробных продуцентов.

В дальнейшей очистке была использована ультрафильтрация под давлением. В результате последовательного применения ультрафильтров с НПМВ от 100 тыс. до 10 тыс. Д проводили отсечение всех высокомолекулярных соединений.

По второй схеме, благодаря отсечению фрагментов крупнее 6 S, появлялась возможность применения центрифужных фильтрующих патронов с НПМВ 30000 и 10000, позволяющая избежать работы под давлением и, таким образом, существенно ускоряющая процесс очистки.

При отсутствии необходимости получения препаратов в значительном объёме на начальном этапе очистки применяли лабораторную микропрепараторную центрифугу. Проведённое с её помощью предварительное центрифугирование позволяло избавиться от осадка и сразу перейти к ультрафильтрации с использованием миниатюрных ультрафильтрационных центрифужных патронов, обладающих, соответственно, НПМВ 30.000 и 10.000. Подобная обработка, применяемая с целью получения очищенных препаратов в количестве, не превышающем 0,5 мл, давала возможность проведения всей очистки, включая начальное скоростное центрифугирование и последующую ультрафильтрацию, с использованием одного прибора — микропрепараторной центрифуги. При этом обрабатывали пробы культуральной жидкости одновременно нескольких продуцентов.

Благодаря проведённой на конечном этапе очистки стерилизационной фильтрации и лиофилизации устраивалась микробная контаминация, что поз-

Таблица 1. Распределение активных и неактивных штаммов в микробных тестах в сравнении с результатами их испытания в модели Hep G2

№ п/п	Модель поиска		Число штаммов-продуцентов					
	наименование модели	отбор ингибиторов биосинтеза	активные	неактивные	всего	% активных в teste Hep G2 от числа активных в микробном teste	% ложноположительных результатов	
1	<i>A.fusidioïdes</i> Hep G2	стеролов холестерин	34 24 (34–10)	68 78 (68+10)	102	— 71	— —	29 —
2	<i>H.salinarum</i> Hep G2	стеролов холестерин	65 25 (65–40)	45 85 (45+40)	110	— 38	— —	62 —

воляло проводить анализ полученных проб методами, чувствительными к микробному заражению.

Лиофилизация помогает провести концентрирование биологически активных микробных метаболитов, способствуя, тем самым, их более уверенному выявлению в микробных и биохимических тестах *in vitro*, и увеличивает сроки хранения полученного материала.

С помощью описанных выше методов проведена очистка культуральной жидкости свыше 300 новых микробных продуцентов ИБС, в т. ч. штаммов 4281, F-13 и F-86, а также микробных метаболитов — потенциальных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ [35]. Концентраты, полученные из культуральной жидкости с помощью ультрафильтрационной обработки, обнаруживали высокую активность при испытании в культурах клеток и в биохимических тестах.

Таким образом, применение известных методов в новой схеме очистки биологически активных микробных метаболитов способствовало не только ускорению процесса очистки, но и увеличению эффективности дальнейшего тестирования препаратов. Предложенный подход может быть рекомендован в качестве эффективного дополнения к классическим методам химического выделения и очистки антибиотиков.

Оценка эффективности разработанных моделей, схема поиска ИБС. Специальные модели, необходимые для поиска биологически активных соединений, должны отвечать ряду требований, в частности:

- позволять делать корректные выводы о характере биологической активности тестируемых метаболитов;
- обладать достаточно высокой чувствительностью;
- не давать ложноотрицательных результатов¹;
- не давать большого числа ложноположительных результатов²;
- применяться на разных этапах скрининга, в т. ч. на начальных этапах работы с продуцентами (желательно на уровне тестирования культуральной жидкости и грубоочищенных препаратов);

- быть относительно недорогими и простыми в использовании;
- обладать высокой пропускной способностью;
- быть перспективными для дальнейшей механизации и автоматизации.

Очевидно, что при поиске метаболитов, обладающих специфической биологической активностью, практически невозможно создание универсальной модели, отвечающей всем перечисленным выше критериям в равной степени. Необходима разработка и использование комплекса тестов, обладающих различной эффективностью на разных этапах поисковой работы, т. е. необходима разработка не только специальных тестов, но и соответствующей схемы их применения.

В создании эффективной схемы поиска биологически активных соединений необходимо строго оценивать все позитивные и негативные качества разработанных моделей, в т.ч. уровень их надёжности, чувствительности, трудоёмкости, а также возможность использования на ранних этапах отбора.

Большинство предложенных нами моделей применимы для оценки грубоочищенных препаратов культуральной жидкости и мицелия продуцентов и, таким образом, могут использоваться на начальных этапах отбора. Вместе с тем предложенные модели обладают серьёзными отличиями.

Модель с применением клеток Hep G2 широко используется в мировой практике для оценки синтеза ХС, обладает высокой точностью благодаря количественному анализу биосинтеза липидов в клетке. Она демонстрирует высокую надёжность. С её помощью можно не только эффективно отбирать собственно ингибиторы биосинтеза ХС и ингибиторы АХАТ, но также проводить детальный анализ механизма действия таких метаболитов [24]. Вместе с тем указанная модель предъявляет повышенные требования к очистке тестируемых препаратов и, в силу достаточно высокой трудоёмкости, не позволяет проводить скрининг одновременно большого числа соединений.

Значительно удобнее для поиска ИБС, особенно на начальном этапе исследований, оказы-

¹ В противном случае при проведении отбора будут в большом количестве отсеиваться ценные метаболиты.

² В противном случае отбор теряет свою эффективность, поскольку осуществляется слишком малый отсев ненужных веществ.

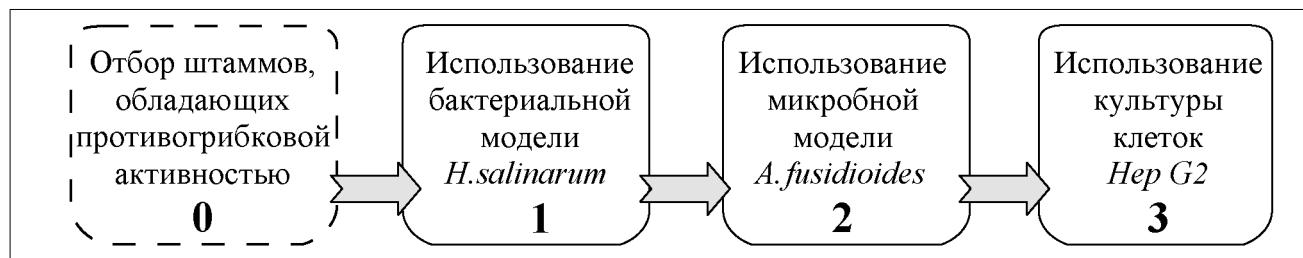


Рис. 3. Биологические модели в поиске ИБС.

ваются микробные модели, практически не дающие ложноотрицательных результатов, однако различающиеся по своей способности к отсеву соединений, не имеющих гиполипидемической активности.

Для выявления этих отличий было проведено сопоставление активности микробных метаболитов, проверенных одновременно в микробных моделях и в культуре Hep G2 (табл. 1).

Микробные модели проявили высокую надёжность: все метаболиты, активные в тесте Hep G2, оказались активными в микробных моделях, а среди метаболитов, неактивных в микробных моделях (68 — в модели *A. fusicoides* и 45 — в модели *H. salinarum*), не было ни одного, который бы проявил свою активность в тесте Hep G2. Следовательно, микробные модели *A. fusicoides* и *H. salinarum* не дают ложноотрицательных результатов, их применение практически не вызывает неправомерного отсева потенциально перспективных культур.

Из 34 штаммов, активных в микробной модели *A. fusicoides*, способностью к подавлению биосинтеза ХС в клетках Hep G2 обладали метаболиты 24 штаммов. Экстракти 10 штаммов, активных в микробном teste, не подавляли включения ¹⁴C-ацетата в ХС фракцию в клетках Hep G2. Таким образом, при оценке биосинтеза ХС число ложноположительных результатов теста *A. fusicoides* составило 29%.

Из 65 штаммов, активных в микробной модели *H. salinarum*, способностью к подавлению биосинтеза ХС в клетках Hep G2 обладали метаболиты 25 штаммов. Активность 40 штаммов в teste Hep G2 не подтвердилась. Таким образом, у значительно более простой с точки зрения технического исполнения бактериальной модели *H. salinarum* процент ложноположительных результатов выше и составляет 62%. Следовательно, тест *H. salinarum* способствует отбору большого числа разнообразных соединений, не имеющих прямого отношения к ингибированию биосинтеза ХС.

В сравнении с тестом Hep G2 обе микробные модели позволяют отбирать не только ингибиторы биосинтеза ХС, но и ингибиторы биосинтеза других стеролов. Кроме того, модель *H. salinarum* позволяет проводить отбор противоопухолевых антибиотиков [26].

Таким образом, несмотря на то, что обе микробные модели могут быть использованы на начальных этапах отбора, их тщательное сопоставление позволяет вскрыть серьёзные различия между ними и прийти к выводу о целесообразности использования бактериальной модели *H. salinarum* на более ранних, по сравнению с *A. fusicoides*, этапах отбора (рис. 3). В таком случае достигается значительная экономия ресурсов, а главное — возникает возможность проведения одновременного отбора как ИБС, в том числе ингибиторов поздних этапов синтеза, среди которых могут быть потенциальные противогрибковые препараты, так и противоопухолевых антибиотиков.

При отборе ингибиторов ранних этапов биосинтеза ХС оба микробных теста обладают равной ценностью, поскольку в варианте использования мевалоновой кислоты позволяют дать быстрый и обоснованный ответ относительно способности испытуемых метаболитов подавлять ранние этапы биосинтеза стеролов (включая ГМГ-КоА редуктазу) без привлечения дополнительных дорогостоящих методов.

Проявление противогрибковой активности культур в отношении хотя бы одного из трёх грибных штаммов: *A. niger*, *F. oxysporum* или *C. albicans* позволяет повысить вероятность обнаружения ИБС до 28—42% (табл. 2). Без предварительного определения противогрибковой активности выделяемых штаммов, вероятность обнаружения среди них продуцентов ИБС не превышает 2—5%.

Приведённые факты свидетельствуют о целесообразности использования в первичном скрининге ИБС специального предварительного эта-

Таблица 2. Способность к подавлению биосинтеза стеролов у микробных штаммов, обладающих противогрибковой активностью

Микроорганизмы	Число штаммов с противогрибковой активностью	Из них продуцентов ИБС
Грибы	127	54 (42%)
Актиномицеты	110	31 (28%)

Примечание. Общее число протестированных штаммов грибов и актиномицетов 5000.

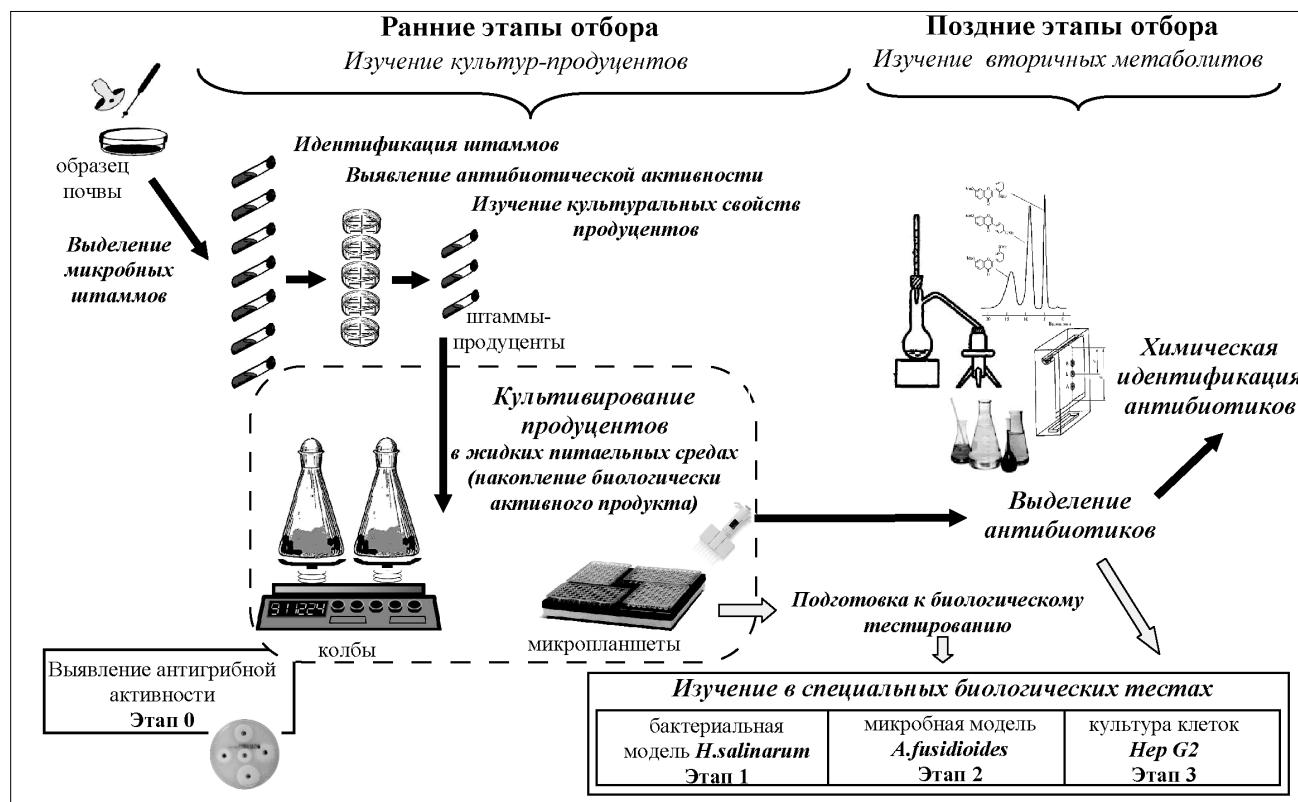


Рис. 4. Схема поиска штаммов-продуцентов ИБС.

па (этап 0) (рис. 3), основанного на выявлении у продуцентов противогрибковой активности и внесении в схему поиска ИБС соответствующих изменений (рис. 4).

Модели, необходимые для поиска ИБС, предложенные другими исследователями, весьма разнообразны. Такие антибиотики, как компактин и ловастатин (мевинолин), а также их производные правастатин и симвастатин были открыты как ингибиторы ГМГ-КоА редуктазы с использованием модели, основанной на анализе подавляющей ими биохимической реакции [10, 11, 36].

Ингибитор ГМГ-КоА синтазы β -лактонный антибиотик 1233А был обнаружен при использовании другого подхода — в качестве основной модели его поиска была применена культура клеток млекопитающих линии Vero [37]. Антибиотик 1233А вызывал заметное подавление роста опухолевых клеток, однако, в отличие от противоопухолевых антибиотиков, переставал действовать при добавлении препарата экзогенной мевалоновой кислоты, что позволило выявлять ИБС, подавляющие ранние этапы биосинтеза ХС. Модель, основанная на использовании культуры клеток, продемонстрировала высокую пропускную способность, для выявления с её помощью антибиотика 1233А потребовалось проведение анализа 11 тыс. культур почвенных микроорганизмов.

Несколько иная модель поиска ИБС разработана на основе подавления роста дрожжевых культур, вызываемого компактином и его аналогами и

снимаемого в присутствии мевалоновой кислоты [38]. Отечественные исследователи для поиска ИБС применили штамм *Toxopocladium inflatum*, обладающий повышенной чувствительностью к ловастатину. О действии ИБС судили по подавлению в культуре биосинтеза эргостерола [19, 39].

В других исследованиях поиск ИБС микробного происхождения проводили с использованием чувствительной к ловастатину дрожжевой культуры *Rhodotorula rubra*. О наличии ИБС в экстрактах, полученных из культуральной жидкости и мицелия различных коллекционных микробных культур, судили по подавлению ими роста дрожжевой тест-культуры, а также по снижению содержания в её клетках эргостерола [40].

Используемая нами культура *H. salinarum*, в силу особенностей метаболизма архебактерий, обладает целым рядом важных преимуществ перед описываемыми моделями, в частности, высокой специфической чувствительностью к ингибиторам биосинтеза стеролов, а также простотой в использовании и возможностью визуальной оценки подавляющего действия отбираемых ингибиторов. Использование указанной модели в варианте с применением мевалоновой кислоты позволяет провести широкий поиск ингибиторов как ранних, так и поздних этапов биосинтеза стеролов.

Применение модели на ранней стадии поисковых исследований позволяет проводить одновременно отбор антибиотиков, обладающих противоопухолевым действием.

Сочетание указанной модели с другими специально разработанными моделями (*A.fusidiooides* и Нер G2) дает возможность при проведении дальнейшего отбора с большей уверенностью судить о механизме действия отобранных соединений, их принадлежности к группе ИБС.

Применение культуры Нер G2 для поиска ингибиторов биосинтеза ХС, причём на ранних этапах отбора, было проведено также другими исследователями [19, 41]. Тестированию подвергали экстракты, полученные из мицелия микробных продуцентов — грибов, актиномицетов и эубактерий, выделенных из почвы. Отбор препаратов проводили в соответствии с их способностью к подавлению включения в ХС радиоактивного предшественника — ^3H -ацетата. В результате проведённой работы из 702 штаммов почвенных организмов удалось отобрать 25 штаммов, которые продуцировали соединения, ингибирующие синтез стеролов [18, 19].

Применяемая в нашей схеме отбора модель Нер G2 подразумевала использование в качестве радиоактивного предшественника ^{14}C -ацетата. Анализу подвергали не только экстракты, получаемые из мицелия свежевыделенных из почвы продуцентов, но и экстракты, получаемые из их культуральной жидкости. Оценивали подавление биосинтеза не только ХС, но и других липидов, что позволило применять указанную модель как для отбора, так и для анализа механизма действия отобранных соединений, их способности к подавлению биосинтеза липидов разных классов.

Модель Нер G2 была использована нами на поздних этапах отбора. Ранние этапы отбора в наших экспериментах связаны с использованием более простых, не требующих применения радиоизотопов, менее чувствительных к присутствию посторонних примесей микробных моделей.

Тот факт, что компактин и его аналоги обладают противогрибковым действием [38], был положен нами в основу тщательного анализа противогрибковой активности самих потенциальных штаммов-продуцентов. Отбор продуцентов, обладающих противогрибковой активностью, проводился на самых ранних этапах скрининговых исследований (рис. 3, 4). В целом, такой подход позволил резко повысить вероятность обнаружения ИБС.

Заключение

Таким образом, разработанные нами модели поиска ИБС оригинальны и принципиально отличаются от моделей поиска, предложенных другими исследователями [10, 19, 37–41]. Используемая нами культура *H.salinarum*, в силу особенностей метаболизма архебактерий, обладает целым рядом важных преимуществ, в частности, высокой чувствительностью к ИБС, а также простотой в использовании и возможностью визуальной оценки подавляющего действия от-

биемых ингибиторов. Её сочетание с моделями *A.fusidiooides* и Нер G2 дает возможность судить о механизме действия отбиемых соединений.

Скрининг, проведённый с помощью разработанной нами схемы поиска ИБС, включающей на начальном этапе обязательный отбор штаммов, обладающих противогрибковой активностью, показал, что способностью к продукции ИБС обладают различные микроорганизмы: не только несовершенные грибы, но также многие актиномицеты и отдельные представители высших базидиальных грибов [24–26, 42, 43].

Многие микроорганизмы образуют ингибиторы ранних этапов мевалонатного синтеза (вплоть до этапа работы ГМГ-КоА редуктазы включительно). Испытание таких метаболитов в микробных моделях (*H.salinarum*, *A.fusidiooides*) показало, что их действие снимается при добавлении мевалоновой кислоты [25, 26]. Актиномицеты, обладающие такой способностью, прежде были неизвестны. Как показали результаты наших исследований, среди ИБС актиномицетного происхождения доля ингибиторов ранних этапов биосинтеза стеролов достигает 38%.

Препараты, выделенные в ходе поиска ИБС, относятся к разным классам химических соединений и могут быть условно разделены на три основные группы: линейные, циклические и поликонденсированные. Среди них такие антибиотики, как аскофуранон (199/89) [27], энниатин В (86/88) [28], антибиотики стероидной (55-А) и монаколиновой структуры (13/88-2) [26], хлоротрицин (1132/93) [29], а также обладающий высокой противогрибковой активностью антибиотик 1278 из группы ирумамицина [30].

Выводы

- Предложена новая современная методология поиска микробных метаболитов — ИБС, обладающих гиполипидемическим и противогрибковым действием, основанная на использовании оригинальных тест-моделей — микроорганизмов *Acremonium fusidiooides*, *Halobacterium salinarum* и культуры клеток гепатобластомы G2 с обязательным предварительным отбором на начальном этапе микробных метаболитов, обладающих противогрибковой активностью.

- На основе созданной схемы изыскания ИБС проведён широкий поиск антибиотиков, обладающих гиполипидемическим и противогрибковым действием, среди различных штаммов грибов и актиномицетов. Установлено, что способностью к образованию ИБС обладают не только несовершенные грибы, но и актиномицеты. Выделены ИБС, принадлежащие к различным классам химических соединений. Изучен механизм действия препаратов, подавляющих как ранние (включая действие ГМГ-КоА редуктазы), так и поздние этапы биосинтеза стеролов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тренин А. С., Катруха Г. С. Антибиотики — ингибиторы биосинтеза холестерина. Хим-фарм журн 1997; 31: 9: 5—16.
2. Тренин А. С. Вторичные метаболиты грибов — ингибиторы биосинтеза стеролов. Прикл биохим микробиол 1998; 34: 2: 131—138.
3. Trapani L., Segatto M., Pallottini V. Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: the liver as a metabolic «power station». World J Hepatol 2012; 4: 6: 184—190.
4. Garcia-Ruiz C., Morales A., Fernandez-Checa J. C. Statins and protein prenylation in cancer cell biology and therapy. Anticancer Agents Med Chem 2012; 12: 4: 303—315.
5. Seiki S., Frishman W. H. Pharmacologic inhibition of squalene synthase and other downstream enzymes of the cholesterol synthesis pathway: a new therapeutic approach to treatment of hypercholesterolemia. Cardiol Rev 2009; 17: 2: 70—76.
6. Belter A., Skupinska M., Giel-Pietraszuk M. et al. Squalene monooxygenase — a target for hypercholesterolemic therapy. Biol Chem 2011; 392: 12: 1053—1075.
7. Kathiravan M. K., Salake A. B., Chothe A. S. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. Bioorg Med Chem. 2012; 20: 19: 5678—5698.
8. Hatori H., Sato B., Sato I. et al. FR901512, a novel HMG-CoA reductase inhibitor produced by an agonomycetous fungus No. 14919. II. Taxonomy of the producing organism, fermentation, isolation and physico-chemical properties. J Antibiot (Tokyo) 2004; 57: 4: 264—270.
9. Donadio S., Maffioli S., Monciardini P. et al. Antibiotic discovery in the twenty first century: current trends and future perspectives. J. Antibiot (Tokyo) 2010; 63: 8: 423—430.
10. Endo A., Monacolin K. A new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. J Antibiot (Tokyo) 1980; 33: 3: 334—336.
11. Alberts A. W., Chen J., Kuron G. et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. Proc Natl Acad Sci U S A 1980; 77: 7: 3957—3961.
12. Iwasaki S., Omura S. Search for protein farnesyltransferase inhibitors of microbial origin: our strategy and results as well as the results obtained by other groups. J Antibiot (Tokyo) 2007; 60: 1: 1—12.
13. Brötz-Oesterhelt H., Sass P. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. Future Microbiol 2010; 5: 10: 1553—1579.
14. Zanella F., Lorens J. B., Link W. High content screening: seeing is believing. Trends Biotechnol 2010; 28: 5: 237—245.
15. Сазыкин Ю. О., Бибикова М. В., Иванов В. П. и др. Технология скрининга вторичных микробных метаболитов: к эволюции методологии. Антибиотики и химиотер 2002; 47: 10: 25—31.
16. Koehn F. E. High impact technologies for natural products screening. Prog Drug Res 2008; 65: 177—210.
17. Moy T. I., Conery A. L., Larkins-Ford J. et al. High throughput screen for novel antimicrobials using a whole animal infection model. ACS Chem Biol 2009; 4: 7: 527—533.
18. Бибикова М. В., Грамматикова Н. Э., Тертов В. Б. и др. Отбор природных иммуносупрессоров по способности к модификации синтеза стеролов клетками гепатоцитов. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 8: 3—6.
19. Чмель Я. В., Бибикова М. В., Спиридонова И. А. и др. Скрининг природных соединений с гиполипидемической активностью. Антибиотики и химиотер 2004; 49: 8—9: 8—12.
20. DeVito J. A., Mills J. A., Liu V. G. et al. An array of target-specific screening strains for antibacterial discovery. Nat Biotechnol 2002; 20: 5: 478—483.
21. Борисова Н. А., Чмель Я. В., Бибикова М. В., Катлинский А. В. Антимикробная активность природных гиполипидемических соединений. Антибиотики и химиотер 2005; 50: 12: 12—15.
22. Бибикова М. В., Грамматикова Н. Э., Катлинский А. В. и др. Влияние природных гиполипидемических соединений на формирование биоплёнок штаммами рода *Pseudomonas*. Антибиотики и химиотер 2009; 54: 1—2: 10—13.
23. Hu Y., Shamaei-Tousi A., Liu Y., Coates A. A new approach for the discovery of antibiotics by targeting non-multiplying bacteria: a novel topical antibiotic for staphylococcal infections. PLoS One 2010; 5: 7: e11818.
24. Тренин А. С., Терехова Л. П., Толстых И. В. и др. Отбор микробных вторичных метаболитов — ингибиторов биосинтеза холестерина с помощью культуры клеток гепатобластомы G2. Антибиотики и химиотер 2003; 48: 1: 3—8.
25. Тренин А. С. Микробная тест-система для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов. Антибиотики и химиотер 2013; 58: 3—4: 3—9.
26. Тренин А. С. Микробная модель *Halobacterium salinarum* для поиска ингибиторов биосинтеза стеролов. Антибиотики и химиотер 2013; 58: 5—6: 3—10.
27. Терехова Л. П., Тренин А. С., Озерская С. М. и др. Образование акофуранона культурой гриба *Raecilomyces variotii* Bainier 199. Микробиология 1997; 66: 5: 611—615.
28. Тренин А. С., Толстых И. В., Терехова Л. П. и др. Гиполипидемическое действие антибиотика 86/88 (эннатина В) в культуре клеток гепатобластомы G2. Антибиотики и химиотер 2000; 45: 4: 6—9.
29. Терехова Л. П., Галатенко О. А., Тренин А. С. и др. Выделение и изучение антибиотика ИНА-1132 (хлоротрицина), образуемого штаммом *Streptomyces baarmensis*. Антибиотики и химиотер 2008; 53: 7—8: 3—7.
30. Shashkov A. S., Tsvetkov D. E., Lapchinskaya O. A. et al. Structure, ¹H and ¹³C NMR spectra, and biological activity of the antibiotic INA-1278 related to irumamycin and produced by the experimental *Streptomyces* sp. strain No. 1278. Russ Chem Bull Int Ed 2011; 60: 11: 2412—2417.
31. Duetz W. A., Witholt B. Effectiveness of orbital shaking for the aeration of suspended bacterial cultures in square-deepwell microtiter plates. Biochem Eng J 2001; 7: 113—115.
32. Genilloud O., González I., Salazar O. et al. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. J Ind Microbiol Biotechnol 2011; 38: 3: 375—389.
33. Meletiadis J., Meis J. F., Mouton J. W., Verweij P. E. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. J Clin Microbiol 2001; 39: 2: 478—484.
34. Joubert A., Calmes B., Berruyer R. et al. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. Biotechniques 2010; 48: 5: 399—404.
35. Тренин А. С., Дудник Ю. В. Твердофазная система РНК-зависимой ДНК-полимеразы в поиске антибиотиков — потенциальных ингибиторов ВИЧ. Антибиотики и химиотер 2005; 50: 10—11: 4—12.
36. Endo A., Kuroda M., Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterolgenesis produced by *Penicillium citrinum*. J Antibiot (Tokyo) 1976; 29: 12: 1346—1348.
37. Kumagai H., Tomoda H., Omura S. Method of search for microbial inhibitors of mevalonate biosynthesis using animal cells. J Antibiot (Tokyo) 1990; 43: 4: 397—402.
38. Ikeura R., Murakawa S., Endo A. Growth inhibition of yeast by compactin (ML-236B) analogues. J Antibiot (Tokyo) 1988; 41: 8: 1148—1150.
39. Бибикова М. В., Чмель Я. В., Спиридонова И. А., Катлинский А. В. Влияние ловастатина на рост и образование эргостерола культуры *Tolyphocladium inflatum* 106. Антибиотики и химиотер 2004; 49: 4: 3—6.
40. Барanova Н. А., Крейер В. Г., Ландай Н. С., Егоров Н. С. Метаболиты микромицетов — ингибиторы роста и биосинтеза стеринов у дрожжей. Антибиотики и химиотер 2002; 47: 1: 3—6.
41. Чмель Я. В., Бибикова М. В., Долгова Г. В. и др. Оценка эффективности отобранных природных гиполипидемических веществ на модели гиперхолестеринемии у кроликов. Антибиотики и химиотер 2004; 49: 11: 3—6.
42. Тренин А. С., Цвигун Е. А., Соболева Н. Ю. и др. Антимикробная и гиполипидемическая активность штаммов *Lentinus edodes* и *Ganoderma lucidum*. Иммунопатология, аллергология, инфектология: Труды междисципл микол форума: Грибные биотехнологии в медицине и промышленности. 2010; 1: 270.
43. Trenin A. S., Lapchinskaya O. A., Pogozheva V. V. et al. Antifungal activity of natural compounds produced by mutant strains of *Amycolatopsis orientalis* subsp. *eremomycini* and *Streptoallefeichus cremeus* subsp. *tobramycini*. Abstr 7th Int. Congress «Biotechnology: State of the Art and prospects of development». M.: 2013; 1: 74.