

*Чмель*  
На правах рукописи

Чмель Ярослава Валентиновна

СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

03.00.23 – биотехнология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2005

Работа выполнена в Федеральном Государственном Унитарном Предприятии  
«Государственном Научном Центре по Антибиотикам»

**Научные руководители:**

доктор биологических наук,

с.н.с. Бибикова М. В.

доктор медицинских наук,

профессор Катлинский А. В.

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук,  
профессор Эль - Регистан Г.И.

кандидат биологических наук,  
Тренин А.С.

**Ведущая организация:**

Московский Государственный  
Университет им. М. В. Ломоносова,  
Биологический факультет

Защита диссертации состоится «21» июня 2005 года в 10<sup>30</sup> часов на заседании  
диссертационного совета ДМ 212.204.13 в РХТУ им. Д.И. Менделеева (125047  
Москва, Миусская пл., д.9) в аудитории 443

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно - библиотечном  
центре РХТУ имени. Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан «10» июня 2005 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

ДМ 212.204.13 кандидат технических наук



Шакир И.В.

2006-Ч  
6866

2117908

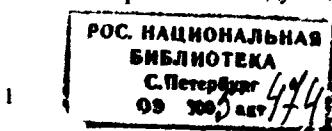
## **Общая характеристика работы.**

**Актуальность темы.** Во всём мире проводится широкий поиск природных препаратов, способных ингибиовать синтез и регулировать метаболизм холестерина. Нарушение обмена холестерина в организме человека приводит к развитию дислипидемии и дислипопротеидемии, что в свою очередь увеличивает риск возникновения атеросклероза. Атеросклероз лежит в основе многих сердечно-сосудистых заболеваний, характеризующихся высоким уровнем смертности; таких как ишемическая болезнь сердца и нарушение мозгового кровообращения. Несмотря на прогресс в диагностике, лечении и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний, они остаются наиболее частой причиной смертности в большинстве экономически развитых стран и в Российской Федерации. Гиполипидемическая терапия, а также поиск и создание гиполипидемических соединений рассматривается в настоящее время в качестве одной из важнейших задач здравоохранения. Представленные данные определили стратегию проводимого нами скрининга – отбор продуцентов природных гиполипидемических соединений. Разработка эффективной системы скрининга является необходимым условием для отбора перспективных продуцентов биологически - активных соединений.

Традиционно отбор продуцентов гиполипидемических соединений проводился среди грибных культур, однако известно, что актиномицеты и бактерии также являются продуцентами многих биологически-активных соединений. Ввиду слабого изучения этих групп микроорганизмов в качестве продуцентов гиполипидемических соединений и их явно большого потенциала в этой области, нами был проведен поиск гиполипидемических соединений, как среди грибных культур, так и среди культур актиномицетов и бактерий.

**Цель работы.** Целью данной работы было создание системы направленного поиска продуцентов гиполипидемических соединений и изучение воздействия отобранных соединений на метаболизм липидов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Для осуществления этой цели потребовалось решение следующих задач исследования:



1. Разработать систему скрининга продуцентов гиполипидемических соединений.

2. Провести скрининг продуцентов гиполипидемических соединений среди грибов, актиномицетов и бактерий, используя разработанную систему направленного поиска.

3. Изучить биологические свойства отобранных экстрактов из микроорганизмов.

4. Изучить морфологические и физиологические особенности отобранных культур продуцентов.

Научная новизна результатов. Была разработана и использована в практической работе система скрининга гиполипидемических соединений, состоящая из нескольких этапов:

1. Скрининг с использованием культуры клеток гепатомы Hep G2.

2. Скрининг с использованием в качестве тест – организма грибного штамма *Tolypocladium inflatum* 106.

3. Скрининг с использованием модели гиперлипидемии у кроликов.

Для проведения 2 этапа скрининга была разработана новая модельная тест – система отбора с использованием в качестве тест – организма грибного штамма *T. inflatum* 106. Эта культура была отобрана в результате поиска чувствительных к ловастатину культур среди штаммов Коллекции культур микроорганизмов ГНЦА. Были подобраны оптимальные условия для проведения экспериментов. Использование разработанной тест-системы скрининга позволило отобрать культуры продуцентов и получить экстракты, обладающие гиполипидемической активностью, сравнимой, а для некоторых экстрактов превосходящей контрольный препарат - ловастатин.

Проведен широкий поиск гиполипидемических соединений, в результате которого при изучении 702 штаммов почвенных актиномицетов, грибов и бактерий была выявлена способность почвенных микроорганизмов продуцировать гиполипидемические соединения. Причем этой способностью обладали не только мицелиальные грибы, но и культуры актиномицетов. В

результате отобраны 9 продуцентов новых природных гиполипидемических соединений: 2 из которых относятся к мицелиальным грибам и 7 продуцентов являются актиномицетами.

Научно-практическая значимость работы. Создана и использована в практической работе оригинальная и эффективная микробиологическая модель скрининга гиполипидемических соединений, с использованием грибного штамма *T. inflatum* 106. Использование в качестве модельного организма грибной культуры обусловлено тем, что, являясь эукариотами, они имеют системы регуляции синтеза стеринов близкие к таковым для клеток животных и человека. Разработанная модель скрининга позволяла на уровне простых в исполнении микробиологических методов выявлять продуценты гиполипидемических соединений. Важной практической характеристикой разработанного метода являются: высокая чувствительность метода, относительно короткие сроки проведения исследования и низкие экономические затраты, ввиду отсутствия использования дорогостоящего оборудования и реагентов.

В настоящее время эта модельная система активно используется в работе лаборатории по изысканию продуцентов новых антибиотиков сектора коллекции культур ФГУП ГНЦА. Результаты работы имеют значение для проведения скрининга аналогичных соединений. Практическая значимость заключается в отборе новых перспективных продуцентов гиполипидемических соединений и оценке их эффективности для лечения атеросклероза.

Апробация работы. Итоги научно-исследовательской работы, составляющие основу диссертации, были доложены на 2 Всероссийском Конгрессе по медицинской микологии (Москва 2004), 3 Международном Конгрессе «Биотехнология – состояние и перспективы развития». (Москва 2005), на семинарах и межлабораторных конференциях ФГУП ГНЦА. Основные результаты работы были представлены на конкурсе молодых ученых, проходившем в рамках 3 Международного Конгресса «Биотехнология – состояние и перспективы развития» Москва(2005), где работа была награждена дипломом за хорошую научно - исследовательскую работу.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения полученных результатов, обсуждения результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Материалы диссертации изложены на 145 страницах, включают 43 таблицы, 1 схему, 63 рисунка и 11 фотографий. Список цитируемых источников включает 149 наименований отечественной и иностранной литературы.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.**

### **Материалы и методы исследования.**

**Объекты исследования.** Объектами исследования были штаммы актиномицетов, грибов и бактерий, выделенные из почвенных образцов различных регионов РФ. Посев образцов почв проводили из разведений с последующим высевом на питательные среды: Гаузе 1 и Райстрика. Актиномицеты выращивали и хранили на агаризованной среде Гаузе 1, грибные культуры выращивали и хранили на агаризованной среде Райстрика.

**Культивирование микроорганизмов.** Засев среды проводили агаровым блоком выросшей культуры. В условиях глубинного культивирования штаммы актиномицетов выращивали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл, со 100 мл питательной среды М-1 в течение 120 часов(5 суток), при 28°C, на подвесной качалке с круговым вращением и оборотами от  $3,3\text{ c}^{-1}$  до  $4,3\text{ c}^{-1}$ (180 оборотов в минуту).

Для грибных культур использовали среду А-9, глубинное культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с объемом питательной среды 100 мл, при 24° С, в течение 6 и 14 суток, на подвесной качалке с круговым вращением и оборотами от  $3,3\text{ c}^{-1}$  до  $4,3\text{ c}^{-1}$ .

**Выделение активных начал из биомассы продуцентов.** Биомассу микроорганизмов отделяли центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 минут. Мицелий дважды экстрагировали 5 объемами ацетона в течение 30 мин. Ацетоновые экстракты объединяли и удаляли растворитель до водного остатка. Водный остаток встраивали в делительной воронке с равным объемом

хлороформа и отделяли реэкстракт в хлороформе от водной фазы. Растворитель удаляли в вакууме на вакуум-выпарной установке (ИР-1) при температуре 45°C, затем сушили полученные осадки в вакуум-сушильном шкафу при температуре 45°C. Для эксперимента на клеточной линии гепатоцитов Нер G2 использовали спиртовые экстракты мицелия; для этого к осадку биомассы приливали 3-х кратный избыток этанола(95%). Экстракцию проводили при постоянном перемешивании в течение 30 минут.

**Определение антифунгальной активности** экстрактов из биомассы проводили методом диффузии в агар. Для этого в лунки или на диски вносили экстракты в количестве 1, 10 и 100 мкг. В качестве тест - организмов для определения антифунгальной активности использовали *Aspergillus niger* 137 а, *Candida albicans* ATCC 885-653. В качестве препарата сравнения при определении активности в отношении *C. albicans* ATCC 885-653 был использован клотримазол ("Акрихин") в концентрации 0,05 мкг/мл. Действие изучаемых экстрактов оценивали, измеряя диаметр зон подавления роста тест-организма. Проводили оценку биологической активности контрольного препарата – ловастатина и изучаемых экстрактов из мицелия, путем сравнения диаметра зон подавления роста *A. niger* 137 а.

**Определение антибактериальной активности** проводили в соответствии с методикой, рекомендованной Государственной фармакопеей СССР. Активность в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* Var *mycoides luteus* 537, исследуемых образцов определяли методом диффузии в агар. При определении antimикробной активности концентраты экстрактов из мицелия разводили в спирте и вносили в лунки, вырезанные в агаре с тест-культурой в количестве 1, 10 и 100 мкг. О величине МПК каждого исследуемого экстракта судили по диаметру зон подавления роста соответствующего тест - микроорганизма.

**Изучение культурально - морфологических свойств** продуцентов гиполипидемических соединений проводили в соответствии с принятыми методами используемыми при таксономии актиномицетов и грибов.

Микроморфологический анализ культур осуществляли с помощью микроскопирования свежих препаратов в виде суспензии при использовании микроскопа МБИ-15 У 4.2. А. Осуществляли микроскопирование окрашенных метиленовой синью мазков при увеличении в 40-900 раз. Для грибных культур исследовали характер роста и форму мицелия, конидиофоры, фиалиды и конидии. Споры и вид спороносцев исследовали методом сканирующей электронной микроскопии совместно со с.н.с. лаборатории электронной микроскопии МГУ им. М.В.Ломоносова Камзолкиной О.В. (микроскоп «Hitachi»(S-405 A)) при увеличении до 30000 раз.

**Изучение гиполипидемической активности с использованием культуры клеток гепатоцитов Нер G2** проводили совместно с сотр. Государственного научного центра кардиологии д.б.н. Тёртовым В.В.. Клетки Нер G2 культивировали в 75 см<sup>2</sup> флаконах в минимальной среде Игла ("Flow", Великобритания), к которой добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл канамицина, 4 mM L-глутамина при 37 °C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в атмосфере 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки переносили в 24-луночные планшеты ("Flow", Великобритания) с плотностью 2x10<sup>5</sup> клеток на лунку и выращивали до достижения ими состояния субконфлюентного монослоя, дальнейшую инкубацию клеток проводили в среде Игла, содержащей 5 мкКи/мл <sup>3</sup>H -ацетата натрия (удельная активность 40,6 Ки/моль) в присутствии или в отсутствии тестируемых экстрактов из мицелия. Исследуемые препараты вносили одновременно с радиоактивным предшественником из расчета 2,5 мкл на 0,5 мл среды. Контрольным препаратом служил ловастатин (фирмы CBL, Индия). Продолжительность инкубации составила 3 ч, затем клетки дважды промывали холодным фосфатным буфером Дюльбекко. Липиды экстрагировали смесью гексан - изопропанол (3:2), полученные растворы упаривали. Измерение радиоактивности проводили в диоксановом сцинтилляторе ЖС-8.

**Исследование гиполипидемической активности отобранных экстрактов с использованием разработанной микробиологической модели скрининга.** Для приготовления посевного материала в колбу Эрленмейера объемом 750 мл с

50 мл жидкой питательной среды А-9 вносили агаровый блок с культурой *T. inflatum* 106, выращенной на скошенном агаре Райстрика в течение 14 суток при 24 °C. Вегетативный посевной мицелий культивировали в течение 48 ч при 24 °C на качалках при 180 об/мин ( $3,6 \text{ с}^{-1}$ ). Культивирование проводили в той же среде и при тех же условиях, что и при подготовке посевного материала. Объем посевного материала составлял 5% от объема питательной среды в колбе. В момент засева ферментационной среды в колбы вносили ловастатин в концентрации от  $10^{-6}$  до 1 мкг/мл ( $2,5 \times 10^{-9}$  до 0,0025 моль/л). Изучаемые экстракты вносили в момент засева ферментационной среды в диапазоне концентраций от 1 до  $1 \times 10^{-7}$  мкг/мл среды. Контролем служила культуральная жидкость *T. inflatum* 106, без каких либо добавок. Через 2 суток роста определяли количество эргостерина в клетках тест-культуры и выражали в мкг/мг сухой биомассы. Для этого по окончании культивирования из опытной колбы отбирали 2 пробы по 10 мл – для определения биомассы по весу сухого мицелия и для определения содержания эргостерина в мицелии. Биомассу отделяли центрифугированием в режиме 2000 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную жидкость отбрасывали. Для определения количества биомассы мицелий сушили в заранее взвешенных пробирках до постоянного веса при температуре 100-110 °C в течение 4 - 7 часов. Для определения содержания эргостерина, влажную биомассу из 10 мл культуральной жидкости, отделенную от жидкости подвергали щелочному гидролизу. Для этого 1 мл спиртового раствора 1N KOH приливали к осажденному мицелию и выдерживали в течение 1 часа на масляной бане при температуре 80 °C. По окончании гидролиза в пробирки вносили 5 мл петролейного эфира и экстрагировали в течение 1 часа. Содержание эргостерина в полученном экстракте определяли, используя метод спектрофотометрии, при длине волны 282 нм, что соответствует максимуму поглощения эргостерина; используя спектрофотометр СФ – 46.

Качественную и количественную оценку образования эргостерина проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Silufol UV 254, в системе растворителей гексан - ацетон 2:1. На пластинку наносили

гидролизованный экстракт опытного образца и контрольный препарат эргостерина. После хроматографирования экспериментальных образцов наличие эргостерина определяли по Rf в сравнении с контролем. Для количественного определения эргостерина в экспериментальных образцах предварительно проводили построение калибровочной кривой со стандартным препаратом эргостерина, используя спектрофотометрический метод. Расчет количественного содержания эргостерина проводили по формуле:

$$C = \frac{E * 160}{X}, \text{ где}$$

E – экстинкция при 282 нм, в единицах оптической плотности, 160 – коэффициент пересчета при экстракции в 5 мл петролейного эфира, X – вес сухого мицелия (мг), C – кол-во эргостерина (мкг/мг сухого веса мицелия)

Изучение гиполипидемической активности отобранных экстрактов в экспериментах *in vivo* на кроликах проводили совместно с сотр. вивария ФГУП ГНЦА Долговой Г.В. и Померанцевой Т.Я.. Работу проводили на кроликах породы шиншилла; животных получали из питомника ОПХ «Монихино» и содержали на стандартном рационе вивария. Для испытаний было отобрано 6 кроликов с исходной массой тела  $2,1 \pm 0,12$  кг. Кроликам ежедневно в течение 57 дней вводили внутрь холестерин (содержание основного компонента = 95%), в дозе 300 мг/кг в 2 мл 2 % крахмального геля. На 14-ый, 30-ый и 48 день этого периода в сыворотке крови животных определяли содержание общего холестерина (ОХ), триглицеридов (ТГ) и холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП) с использованием коммерческих наборов для определения. Оценку липидных показателей сыворотки крови кроликов проводили при помощи автоматического анализатора (Spekol 221, ГДР). Концентрацию ОХ определяли энзиматическим колориметрическим методом с применением набора реактивов фирмы «Ольвекс Диагностикум» (кат.№013.012), концентрацию ТГ определяли с применением набора реактивов фирмы «Витал Диагностикс СПб» (кат.№017.022), а концентрацию ХС ЛПВП с применением набора реактивов

фирмы Pointe Scientific, Inc.(кат. №Р803-H7507-01)США. Содержание холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП) определяли по формуле Фридвальда.

За 18 часов до опыта у животных отбирали корм, оставляя свободный доступ к воде. Утром животным вводили однократно внутрь ловастатин в дозе 4 мг/кг в 2 мл 2% крахмального геля (эта доза при пересчете по поверхности тела эквивалентна максимальной суточной дозе препарата для человека). Отбор венозной крови проводили до введения препарата и через 0,5; 1, 1,5; 2, 3 и 5 часов после его введения. Опытные экстракты вводили кроликам в 2% крахмальном геле, концентрацию которых определяли из сопоставления концентраций, вызывающих снижение синтеза эргостерина в культуре *T. inflatum* 106, и концентраций ловастатина, вызывающих на этой модели снижение синтеза эргостерина с последующим пересчетом на действующую дозу ловастатина у кроликов. В каждом опыте экстракты исследовали на 3 кроликах, с параллельной оценкой влияния ловастатина в качестве контроля также на 3 кроликах. В течение всего периода кролики продолжали получать холестерин. Статистическую обработку полученных результатов проводили методами математической статистики с помощью статистических программ Excel 97.

#### **Результаты исследования и обсуждение.**

Разработанная нами система скрининга, состояла из нескольких этапов.

1 этап скрининга: На первом этапе скрининга в процессе поиска продуцентов гиполипидемических соединений спиртовые экстракты из мицелия выделенных штаммов исследовали на модельной системе - клеточной линии гепатоцитов Нер G2, проводили оценку включения меченного ацетата в стерины и белки. Область поиска включала в себя 702 штамма грибов, актиномицетов и бактерий, выделенных из почвенных образцов различных регионов нашей страны. В качестве контроля использовали препарат - ловастатин. Одной из основных задач первого этапа скрининга было быстрое и эффективное изучение влияния большого числа экстрактов из микроорганизмов на синтез стеринов и белков.

Таблица 1.

**Влияние экстрактов из микроорганизмов на синтез стеринов клеточной линии гепатоцитов Нер G2.**

| Продуценты   | Общее число исследованных штаммов | Не оказывали влияния на синтез стеринов | Стимулировали синтез стеринов | Снижали уровень образования стеринов на 15-55% | Снижали уровень образования стеринов на 56-79% | Снижали уровень образования стеринов более чем 80% |
|--------------|-----------------------------------|---|-------------------------------|--|--|--|
| Актиномицеты | 506                               | 127                                     | 94                            | 157  | 91   | 41   |
| Микромицеты  | 164                               | 66                                      | 26                            | 38   | 26   | 4  |
| Бактерии     | 32                                | 32                                      | -                             | -  | -  | -  |

На основании полученных данных производили первичный отбор продуцентов гиполипидемических соединений. Способность образовывать ингибиторы синтеза стеринов была выявлена у 357 штаммов(50,87%); причем культуры актиномицетов проявляли способность производить гиполипидемические соединения с такой же частотой, что и грибные культуры. Исходя из полученных данных, изученные экстракты из культур условно были разделены на три группы:

в первую группу вошли экстракты из культур, подавляющие синтез стеринов на 15-55%, что сравнимо с действием ловастатина на этой модели. Процент культур обладающих таким действием составил - 27,78% от всех изученных культур.

Вторая группа включала в себя экстракты из культур, активность в снижении синтеза стеринов у которых была выше, чем у ловастатина, т.е. на 56-79%. Таких культур было - 16,6% от всех изученных культур.

В третью группу вошли экстракты из культур, которые оказывали значительный гиполипидемический эффект, снижая синтез стеринов более чем на 80%. Однако большинство из экстрактов этой группы оказывали влияние и на синтез белка, т.е. проявляли цитотоксическое действие и в дальнейшем они не изучались в качестве гиполипидемических соединений. Число культур, вошедшее в эту группу, составляло 6,4% от всех изученных. Наибольший интерес для дальнейшего изучения представляла вторая группа отобранных экстрактов из

мицелия культур, которая проявляла большую активность в подавлении синтеза стеринов, не оказывая влияния на синтез белка у клеточной линии гепатоцитов Нер G2, что свидетельствует в пользу низкой цитотоксичности этих соединений. В результате проведенных исследований на первом этапе скрининга было отобрано 117 продуцентов гиполипидемических соединений.

2 этап скрининга. Для проведения второго этапа скрининга продуцентов гиполипидемических соединений нами была разработана микробиологическая модель отбора, которая позволяла изучать отобранные на первом этапе скрининга экстракты. Разработка новой микробиологической модели отбора продуцентов гиполипидемических соединений была обусловлена необходимостью создания эффективной, простой в исполнении и быстрой в оценке полученных результатов, микробиологической модели скрининга.

С целью поиска чувствительной к ловастатину культуры нами были изучены штаммы из Коллекции культур микроорганизмов ГНЦА. В качестве тест - организма для скрининга продуцентов гиполипидемических соединений была отобрана грибная культура *T. inflatum* 106, т. к. было установлено, что эта культура обладает высокой чувствительностью к ловастатину

Таблица 2.  
Чувствительность *Tolypocladium inflatum* 2223 и *T. inflatum* 106 к антибиотикам с антрафунгальной активностью и ловастатину, определенная методом диффузии в агар.

| Антибиотик    | МПК в мкг/мл                       |                                   |
|---------------|------------------------------------|-----------------------------------|
|               | <i>Tolypocladium inflatum</i> 2223 | <i>Tolypocladium inflatum</i> 106 |
| Ловастатин    | 200                                | 3-5                               |
| Амфотерицин В | 8-10                               | 8-10                              |
| Нистатин      | 6-8                                | 6-8                               |
| Клотrimазол   | 1-2                                | 1-2                               |

Были подобраны оптимальные условия для проведения экспериментов и проведено изучение влияния контрольного препарата – ловастатина на синтез эргостерина у этой грибной тест-культуры.

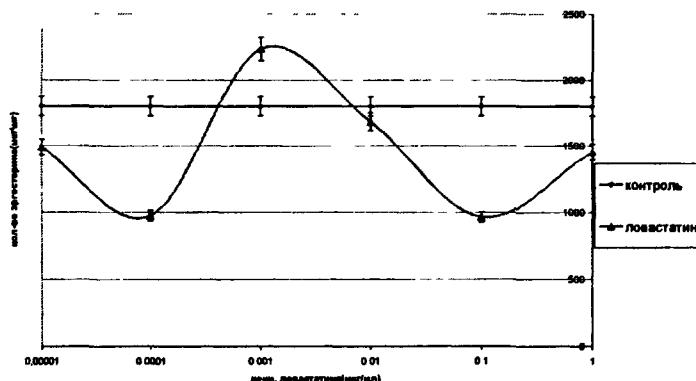


Рис.1. Влияние ловастатина на синтез эргостерина у культуры *T. inflatum* 106.

Впервые было показано выраженное влияние дозы ловастатина на эффект оказываемый этим препаратом на синтез эргостерина у грибной тест – культуры *T. inflatum* 106 (рис.1). В концентрации 0,1 и 0,0001 мкг\мл ловастатин значительно подавлял синтез эргостерина, в концентрации 0,001 мкг\мл стимулировал синтез эргостерина у культуры *T. inflatum* 106.

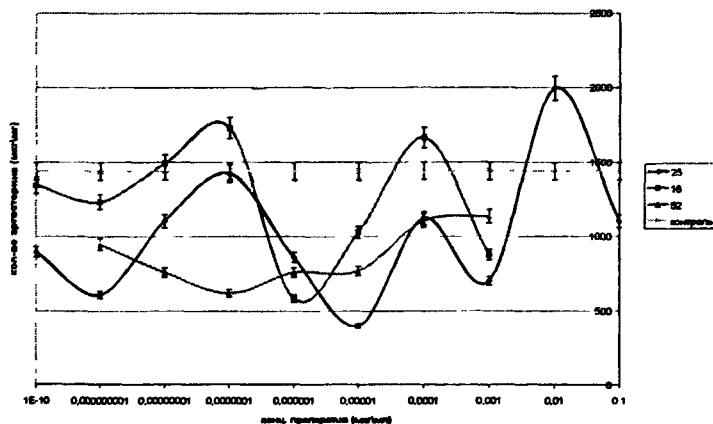


Рис. 2. Влияние экстрактов из грибных культур №№16,25 и 52 на синтез эргостерина культурой *T. inflatum* 106.

Было показано, что большинство отобранных экстрактов также как и ловастатин, оказывали бимодальное влияние на синтез эргостерина у грибной тест – культуры, установлены концентрации, при которых эти экстракты активно подавляли синтез эргостерина (рис.2). В других концентрациях (для продуцентов №16, 25 и др.) эти же экстракты проявляли свойства стимуляторов синтеза эргостерина. Этот факт является подтверждением регуляторной природы действия этих соединений.

Предложенная микробиологическая модель позволяла в относительно короткие сроки без использования дорогостоящего оборудования и реагентов изучать воздействие природных и синтетических соединений на синтез эргостерина у грибной тест - культуры *T. inflatum* 106. С использованием предложенной нами микробиологической модели отбора было проведено изучение гиполипидемической активности 40 экстрактов из мицелия культур, проявивших наибольшую активность при исследовании на 1 этапе скрининга, с подробным изучением концентрационных зависимостей отобранных соединений.

Разработанная нами микробиологическая модель оказалась очень чувствительной и позволила установить концентрации изучаемых препаратов, необходимые для максимального проявления их гиполипидемического действия. В дальнейшем производили расчет дозировок отобранных экстрактов, обладающих гиполипидемической активностью, для эксперимента *in vivo*, опираясь на данные, полученные в ходе исследования этих же препаратов на микробиологической модели.

3 этап скрининга. На 3 этапе скрининга экстракты из культур микроорганизмов, отобранные с последовательным использованием 2 систем скрининга, исследовали на кроликах, находящихся на высокохолестериновой диете. В условиях *in vivo* на модели гиперлипидемии у кроликов исследовали 12 экстрактов; 9 экстрактов проявили высокую активность в снижении уровня общего холестерина, триглицеридов и ХС ЛПНП. Было проведено изучение влияния контрольного препарата – ловастатина в максимальной рекомендованной для человека суточной дозе, пересчитанной на вес кроликов = 4 мг\кг.

Максимальное снижение ОХ в сыворотке крови кроликов составило 53,5% по сравнению с исходной величиной, и было отмечено уже в первый час после введения препарата. В результате проведенных экспериментов было установлено, что наиболее перспективным является грибной продуцент №16.

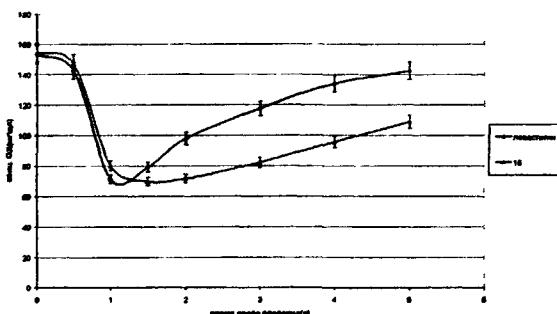


Рис. 3. Влияние экстракта №16 и ловастатина на уровень общего холестерина в сыворотке крови кроликов.

Из данных, представленных на рис.3 видно, что через 1,5 часа после введения экстракта №16 кроликам, его активность в снижении уровня ОХ превышает таковую при воздействии ловастатина. Через 5 часов после введения ловастатина уровень ОХ практически возвращается к исходному значению (снижен на 7,1%), а экстракт №16 и через 5 часов после его введения продолжает оказывать гиполипидемическое действие в снижении уровня ОХ (снижен на 29,6%).

Особого внимания заслуживает экстракт из культуры №25, который исследовали в двух концентрациях 0,4 и 0,0004 мг\кг. С использованием микробиологической модели было установлено, что экстракт №25 ингибировал синтез эргостерина у тест-культуры в концентрации 0,00001 и 0,00000001 мкг\мл. При изучении воздействия экстракта №25 на уровень липидов в сыворотке крови кроликов было установлено, что этот экстракт проявляет своё действие в дозе 0,4 и 0,0004 мг\кг. При этом в дозе 0,0004 мг\кг экстракт №25 слабо снижает лишь уровень ОХ, а на уровень ТГ этот экстракт оказывает влияние сравнимое с

влиянием этого экстракта в дозе 0,4 мг/кг. Эти данные характеризуют экстракт №25 как активный в низких дозах.

Таблица 3

Максимальное влияние экстрактов из микроорганизмов и ловастатина на уровень ОХ, ТГ, ЛПНП и ЛПВП в сыворотке крови кроликов.

| №№ экстракта | Конц экстракта (мг/кг) | Максимальное снижение уровня ОХ (%) | Максимальное снижение уровня ТГ (%) | Максимальное Увеличение уровня ХС ЛПВП(%) | Максимальное снижение уровня ХС ЛПНП(%) |
|--------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|---|---|
| ловастатин   | 4                      | 53,5                                | 45,8                                | 17,7                                      | 97,1                                    |
| Г-16         | 0,04                   | 54,9                                | 39,3                                | 30,1                                      | 98,6                                    |
| Г-25         | 0,4                    | 39,2                                | 19,3                                | 22,1                                      | 75,1                                    |
| Г-25         | 0,0004                 | 6,3                                 | 18,8                                | 18,2                                      | 17,9                                    |
| 281          | 0,004                  | 52,7                                | 39,9                                | 11,4                                      | 92,4                                    |
| 31           | 4                      | 51,9                                | 23,9                                | 20,2                                      | 98,7                                    |
| 59           | 0,04                   | 36,1                                | 33,4                                | 5,3                                       | 61,8                                    |
| 221          | 0,4                    | 54,1                                | 37,1                                | 13,6                                      | 97,4                                    |
| 62           | 0,04                   | 38,9                                | 45,2                                | 6,4                                       | 67,3                                    |
| 108          | 0,04                   | 28,3                                | 20,9                                | 21,1                                      | 45,1                                    |
| 17           | 0,04                   | 38,6                                | 32,6                                | 26,4                                      | 41,4                                    |

Следует учитывать, что значительное гиполипидемическое действие изученные экстракты оказывали, являясь неочищенными экстрактами из мицелия. Кроме того, некоторые из изучаемых экстрактов проявляли активность в дозах в 100 - 1000 раз более низких, чем контрольный препарат – ловастатин.

Полученные данные демонстрируют эффективность предложенных методов поиска продуцентов гиполипидемических соединений, поскольку отобранные последовательно с использованием клеточной линии гепатоцитов и микробиологической модели экстракты проявили выраженный гиполипидемический эффект в опытах *in vivo*.

#### Изучение дополнительных биологических свойств отобранных соединений.

При изучении антимикробного спектра каждого из отобранных экстрактов, установлено, что экстракты, полученные из мицелия грибных культур №25, 52 не обладают антибактериальной и антивандальной активностью, экстракт №16 обладает очень слабой антимикробной активностью. Экстракты, полученные из культур актиномицетов, характеризовались широким антимикробным спектром.

Изучение физико-химических свойств экстракта из мицелия продуцента №16 с помощью метода тонкослойной хроматографии выявило наличие двух компонентов. С использованием колоночной хроматографии, было проведено разделение исходного экстракта №16 на 2 фракции. Методом ГЖХ и масс-спектрометрии совместно с сотрудником ГНЦА Москалёвой Н.Е. установлено, что 1 фракция, содержит смесь ненасыщенных жирных кислот, а 2 фракция - эргостерин и редкие стероидные структуры. Установлено, что гиполипидемическая активность этого экстракта, обусловлена активностью фракции, содержащей ненасыщенные жирные кислоты.

При изучении структур соединений продуцируемых актиномицетами №17 и №31 проведенном научным сотрудником Института Биохимической Физики им. Н.М. Эммануэля Даниленко А.Н. и др. было установлено, что они содержат олигомицины. Мицелиальный экстракт №17 состоит из олигофусцина и олигомицина G в соотношении 10:1, а №31 состоит из 3 компонентов - олигомицинов В, А и F в соотношении 6:72:22. Гиполипидемическая активность для этих антибиотиков ранее не описывалась.

Изучение морфологических особенностей грибных культур №16, 25 и 52. Для изучения таксономии было проведено исследование конидиогенной структуры продуцентов методами световой и сканирующей электронной микроскопии. Грибной продуцент №16 ориентировочно отнесен к порядку *Mucorales*. При изучении морфологии продуцента №25 было установлено отсутствие спор в исследуемом материале, поэтому грибной продуцент №25 является стерильным (неспопрообразующим) грибом. По особенностям строения спор продуцент №52 отнесен к роду *Fusarium*.

#### **Выводы.**

1. Разработана эффективная система скрининга продуцентов гиполипидемических соединений, включающая 3 этапа:

-1 этап. Отбор продуцентов гиполипидемических соединений с применением клеточной линии гепатоцитов Нер G2 ,

-2 этап. Отбор продуцентов гиполипидемических соединений с использованием новой высокоэффективной микробиологической модели, где в качестве тест – организма используется грибная культура *Tolyocladium inflatum* №106.

-3 этап. Изучение отобранных экстрактов в условиях *in vivo* с использованием модели гиперлипидемии у кроликов.

2. На первом этапе скрининга продуцентов гиполипидемических соединений среди 702 штаммов почвенных микроорганизмов были отобраны 117(16,6%) культур актиномицетов и мицелиальных грибов, для которых была установлена высокая способность подавлять синтез стеринов без влияния на синтез белка.

3. Разработанная микробиологическая модель скрининга позволила отобрать из 40 изученных 12 наиболее перспективных продуцентов и определить концентрационные зависимости применения данных экстрактов для экспериментов *in vivo*.

4. На 3 этапе скрининга в условиях эксперимента *in vivo* на модели гиперлипидемии у кроликов была подтверждена высокая гиполипидемическая активность для 9 из 12 исследованных экстрактов из культур.

5. Отобран перспективный грибной продуцент №16, мицелиальный экстракт из которого при исследовании в условиях *in vivo* не уступает, а в некотором отношении превосходит действие контрольного препарата ловастатина.

6. Впервые установлена гиполипидемическая активность для макролидных соединений олиgomицинового ряда: олигофусцина и олиномицина F, выделенных из культур актиномицетов №17 и №31.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации.**

- 1.Бибикова М.В., Чмель Я.В., Спиридонова И.А., Катлинский А.В.. Влияние ловастатина на рост и образование эргостерола культурой *Tolyocladium inflatum* №106 //Антибиотики и химиотерапия. М.–2004.-Т.49,№4.-С. 3-6.
- 2.Бибикова М.В., Грамматикова Н.Э., Тертов В.В., Пинегин Б.В., Чмель Я.В., Катлинский А.В.. Отбор природных иммуносупрессоров по способности

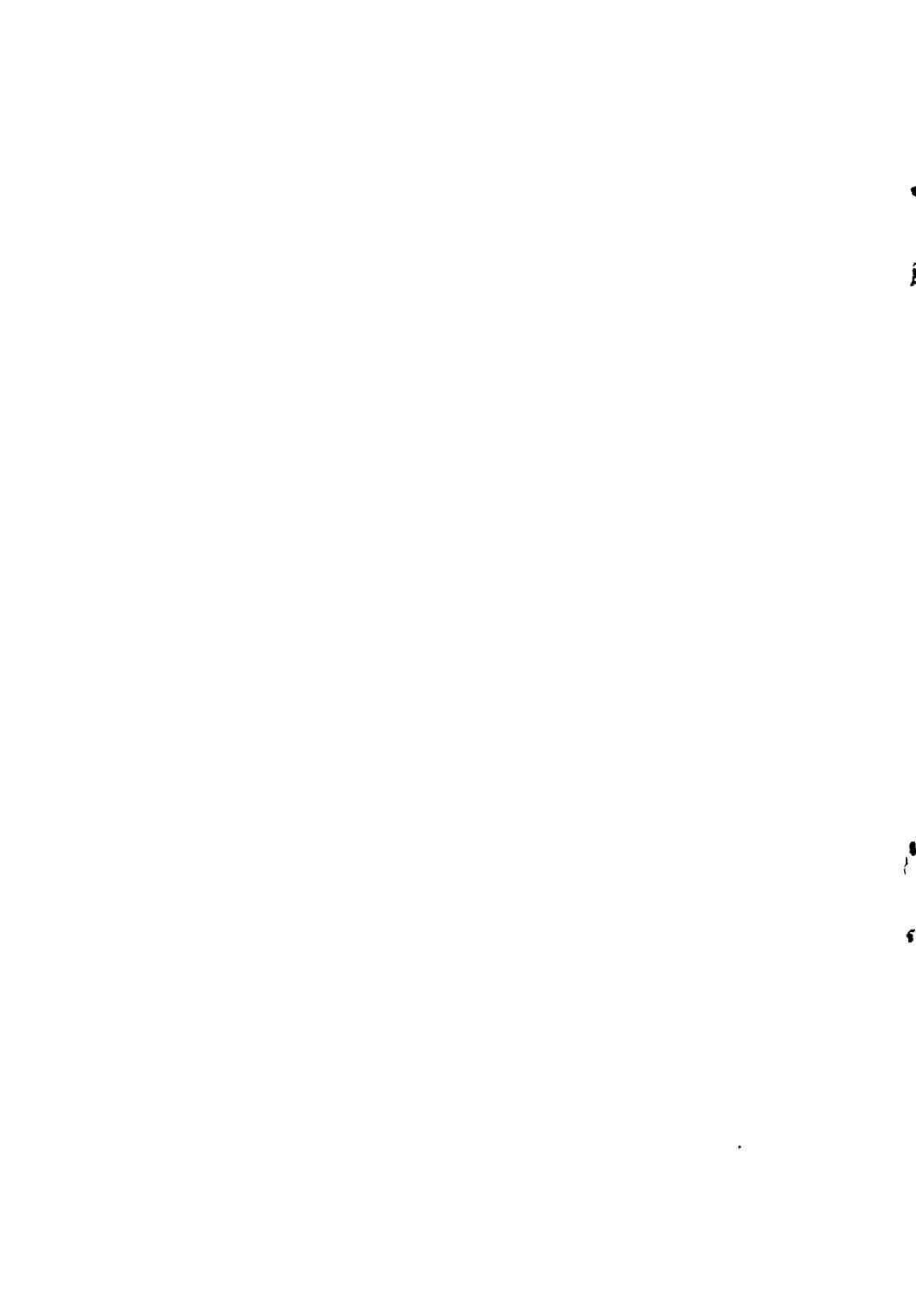
- изменять уровень стеролов клетками гепатоцитов.//Антибиотики и химиотерапия. М.-2003.-Т.48, №8.-С.3-6.
- 3.Бибикова М.В., Носик Д.И., Лобич О.А., Чмель Я.В., Катлинский А.В.. Влияние новых природных гиполипидемических соединений на вирус иммунодефицита человека.//Антибиотики и химиотерапия.М.-2004.-Т.49, №1.-С.14-16.
- 4.Бибикова М.В., Согонов М.В., Грамматикова Н.Э., Чмель Я.В., Тертов В.В.. Образование регуляторов синтеза стеролов грибными культурами.//Микология и фитопатология-2003.-Т.37, вып.6-С.83-86.
- 5.Бибикова М.В., Грамматикова Н.Э., Чмель Я.В.. К вопросу о специфике действия антибиотика БСК-14.//Успехи медицинской микологии: Материалы 1 всероссийского конгресса по медицинской микологии.-М.-2003.-Т1-С.233.
- 6.Бибикова М.В., Спиридонова И.А., Согонов М.В., Чмель Я.В., Тертов В.В.. Образование регуляторов синтеза стеролов грибными культурами.//«Современная микология в России». Тез. докладов 1 съезда микологов России. М.-2002г.-С.250.
- 7.Бибикова М.В., Грамматикова Н.Э., Чмель Я.В., Катлинский А.В.. Взаимосвязь между регуляцией иммунного ответа и функционированием липидтранспортной системы: возможности воздействия с помощью грибной биотехнологии. //Иммунопатология, аллергология, инфектология.-2004-№1-С.21-26.
- 8.Чмель Я.В., Бибикова М.В., Спиридонова И.А. Долгова Г.В., Померанцева Т.Я., Катлинский А.В.. Изучение в опытах *in vivo* отобранных биологически активных веществ грибного происхождения, обладающих гиполипидемическими свойствами. //Успехи мед. микологии: Мат-лы 2 всероссийского конгресса по мед. микологии-М.-2004-Т3-С.137.
- 9.Чмель Я.В.. Скрининг природных гиполипидемических соединений.//III московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития ».М.-2005г.Материалы конгресса, ч. 1-С.96-99.
- 10.Чмель Я. В., Бибикова М.В., Спиридонова И.А., Тертов В.В., Катлинский А. В. Скрининг природных соединений с гиполипидемической активностью. //Антибиотики и химиотерапия. М.-2004-Т.49, № 8-9-С. 8-12.

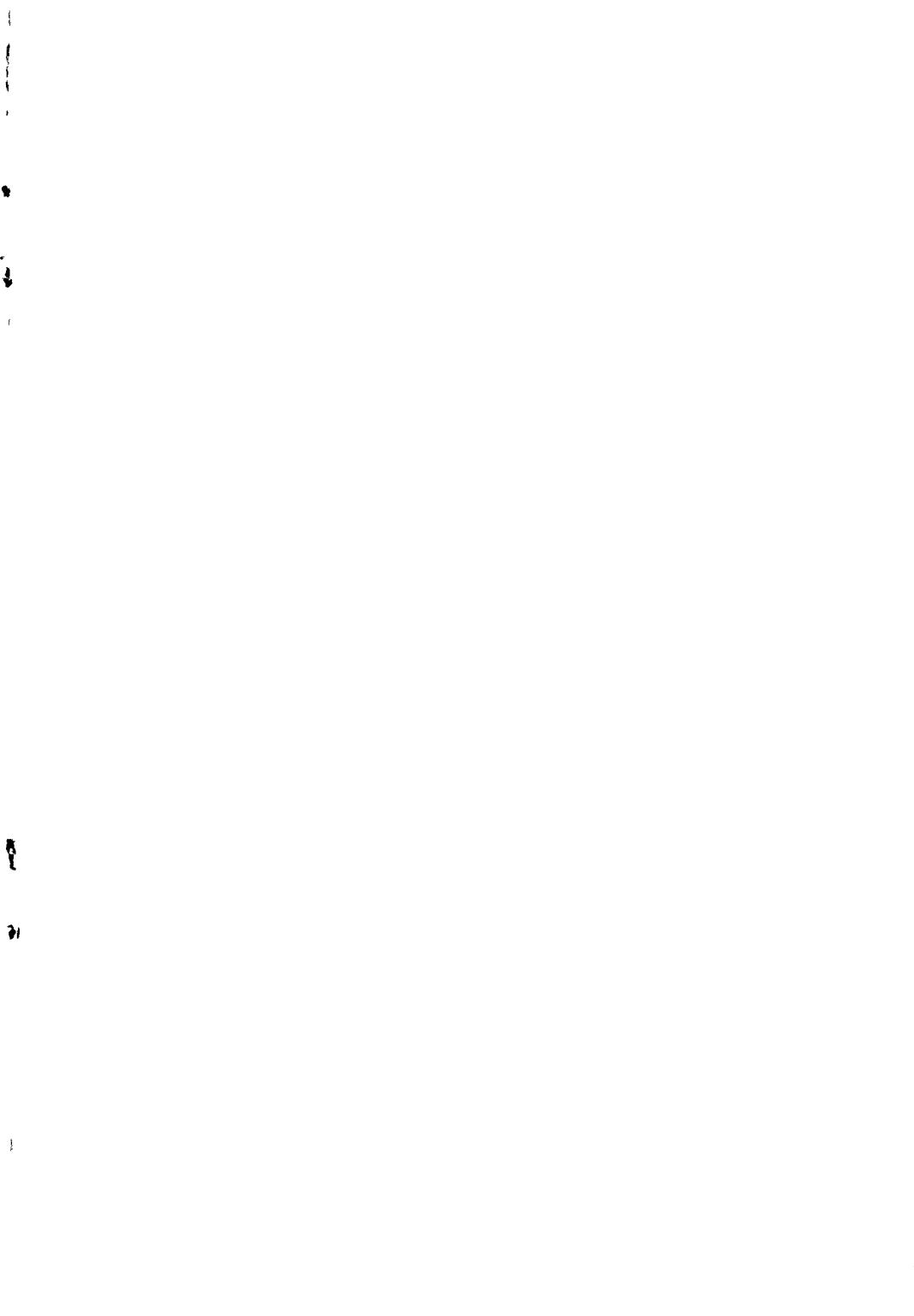
Отпечатано в типографии ФГУП «Минатома России»

113105 Москва, ул Нагатинская д. 4А

Тел 111-24-48

Зак 30 Тираж 100 экз





~~11830~~

РНБ Русский фонд

2006-4  
6866