

УДК 579.864.1:615.331

И. А. Евтушенко, И. Е. Соколова

Днепропетровский национальный университет

АВЕРМЕКТИНЫ – БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА СТРЕПТОМИЦЕТОВ

Проаналізовано літературні відомості про авермектини – біологічно активні речовини стрептоміцетів. Охарактеризовано склад і властивості авермектинів. Описані оптимальні умови культивування продуцентів, методи визначення та екстракції авермектинового комплексу. Наведені приклади перспективного застосування авермектинів у ветеринарії та медицині.

The survey includes analysis of literature data on avermectins – biological active substances of streptomyces. Its structure and properties, optimal conditions of cultivation, methods of avermectin-complex determination and extraction are described. Examples of perspective application of avermectins in veterinary and medicine are presented.

Введение

Значительная часть стрептомицетов является продуцентами биологически активных веществ, таких как антибиотики, витамины, ферменты, иммуномодуляторы и др. Стрептомицеты представляют большой интерес в связи с их значением для промышленного приготовления разных антибиотиков и ряда биологически активных веществ. Особое значение в последнее время приобрели поликетидные соединения, которые успешно используются в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве как антибактериальные, противоопухолевые и антигельминтные препараты. Недавно стало известно о способности почвенных стрептомицетов синтезировать новый класс веществ под общим названием авермектины, которые действуют не только подобно поликетидным антибиотикам, но и имеют более широкий спектр биологического действия [4].

Классификация авермектинов

В настоящее время авермектины, продукты жизнедеятельности *S. avermitilis*, признаны самым эффективным средством борьбы с эндо- и эктопаразитами растений, животных и человека. Авермектины принадлежат к классу 16-членных макролидов, которые в положении C_{13} имеют дисахарид, состоящий из *L*-олеандрозы (2,6-дидезокси-3-*O*-метил-*L*-арабиногексозы). Культура продуцента синтезирует комплекс из восьми авермектинов, среди которых выделяют четыре мажорных (A_{1a} , A_{2a} , B_{1a} , B_{2a}) и четыре минорных (A_{1b} , A_{2b} , B_{1b} , B_{2b}) компонентов [3]. Известна также полусинтетическая форма авермектинов – ивермектин, который представляет собой смесь, состоящую из авермектинов B_{1a} и B_{1b} , подвергнутых гидрогенизации в положении 22 и 23. Авермектины группы *B* обладают инсектицидным, аскарицидным и нематодоцидным действием, а группы *A* – противоопухолевым, особенно авермектин A_1 , который оказывает цитотоксическое действие на клетки опухолей. Главным преимуществом антипаразитарных препаратов, созданных на основе авермектинов, является отсутствие негативного влияния на организм теплокровных животных. Проникая в организм паразита через кишечник или контактным путем, авермектины влияют на его нервную систему и вызывают паралич, а потом гибель. Препараты авермектинов широко применяются в ветеринарии и растениеводстве. В почве препараты инактивируются за 7–14 суток [4].

Для авермектинового комплекса характерны структурные модификации в трех позициях: C_5 , C_{22-23} и C_{26} . Авермектины фракций *a* и *b* различаются тем, что старто-

© И. А. Евтушенко, И. Е. Соколова, 2006

вой единицей при биосинтезе агликона авермектинов *a* является 2-метилбутират, а авермектинов *b* – изобутират. При дальнейшей сборке макроцикла в позиции C_{22-23} или совершается гидратация (авермектины фракции 1: $B1_a$ и $B1_b$), или нет (авермектины фракции 2: $B2_a$, $B2_b$). Предполагается, что эта реакция катализируется дегидратазой, кодируемой геном *ave C*. Мутация этого гена ведет к образованию только компонентов фракции 2. По окончании процесса образования агликона происходит метилирование гидроксила при C_5 (авермектины *A*). Компоненты, не содержащие CH_3 – радикала при C_5 , относятся к авермектинам *B*. Активность метилирования снижается в ряду: $B2_a$ агликон > $B2_a$ моносахарид > $B1_a$ агликон > $B1_a$ моносахарид > $B2_a$ > $B1_a$. Компонент $B1_a$ практически не метилируется. Компоненты 2 метилируются быстрее, чем компоненты 1, а компоненты *b* – быстрее, чем компоненты *a*.

Другой биохимической особенностью трансформации компонентов комплекса является закономерность, согласно которой компоненты *a* дегидратируются в позиции C_{22-23} с эффективностью 50 %, а компоненты *b* с эффективностью 67 %. Таким образом, компоненты *a* превращаются в авермектины 1 и 2 в соотношении 1 : 1, а компоненты *b* – в соотношении 2 : 1.

Из всех восьми компонентов комплекса авермектины фракции $B1$ обладают наибольшей антипаразитарной активностью. Выделенный в чистом виде авермектин $B1$ получил название абамектин. На его основе и на основе его дигидропроизводного – ивермектина, фирмой Merck, Sharp & Dohme разработан ряд препаратов как ветеринарного назначения, так и для защиты растений. В России фирмой «Фармбио-мед» разработан ряд препаратов для ветеринарии и растениеводства, действующим началом которых является природный авермектиновый комплекс, названный аверсектином *C* [2]. Ввиду сложности разделения компонентов $B1_a$ и $B1_b$ ветеринарные препараты содержат оба компонента, однако доля авермектина $B1_a$ в них составляет 80 %. Путем многочисленных исследований было выяснено, что экономичность процедуры очистки и получения препаратов с высоким содержанием авермектина $B1_a$ во многом зависит от компонентного состава комплекса, образуемого в процессе ферментации.

Физиолого-биохимические условия образования авермектинов

Причиной изменений композиции авермектинового комплекса являются, по мнению В. А. Миронова и соавторов, изменения в углеводном обмене актиномицета, которые, в свою очередь, определяются доступностью источника углерода. Снижение углерода в среде лимитирует метаболизм клетки по углероду скорее не прямо, а косвенно, так как уменьшает соотношение углерода и азота, вызывая повышение включения углерода в азотсодержащие соединения, а не в безазотистые метаболиты, какими являются, например, авермектины. Поэтому изучение условий ферментации, определяющих повышенное содержание авермектинов $B1$ и, прежде всего, компонента $B1_a$ в комплексе, представляет значительный практический интерес.

Ввиду выгоды использования препарата с преобладанием компонента $B1$ проводились опыты со штаммом *S. avermitilis* на средах с глюкозой в различных концентрациях. Было отмечено, что увеличение концентрации углевода ведет к следующим изменениям в комплексе: повышаются доли компонентов *B* и *I*, но снижается доля компонентов *a*. Увеличение доли компонентов *B* сопровождалось снижением степени метилирования всех четырех компонентов фракции *B* ($B1_a$, $B1_b$, $B2_a$, $B2_b$). В соответствии с данными литературы степень метилирования компонентов *B* уменьшается в ряду: $B1_a$ > $B1_b$ > $B2_a$ > $B2_b$. В увеличении доли компонентов *I* основной вклад вносит повышение доли компонентов I_b . При этом наблюдается снижение доли компонентов *a* и *b* по фракциям компонентов 1 и 2. Компоненты *a* распределяются по фракциям 1 и 2 поровну, а компоненты *b* – в соотношении близком 2 : 1, соответственно. В то же время недостаток углевода в среде ведет к повышению доли

компонентов A в комплексе. Что касается такого параметра в композиции комплекса как степень распределения компонентов a во фракции 1 и 2, то изменения его возможны только посредством генетических методов, поэтому исследования последних лет сосредоточены на решении этой практически важной проблемы. К настоящему времени геном *S. avermitilis* охарактеризован почти полностью, что позволяет решать задачу создания авермектиновых препаратов с заданной композицией методами генной инженерии и протеомики [2].

В связи с недостаточной изученностью авермектинов существуют проблемы в регуляции их биосинтеза, подборе сред и индукторов для их получения. Все эти вопросы были детально проработаны Т. В. Петрук и соавторами [4]. Объектом исследования для проверки авермектинсинтезирующей активности был вариант *S. avermitilis* УКМ Ас 2161 № 288. Этот вариант отобран путем предварительных исследований, проводимых в отделе общей и почвенной микробиологии Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Исследуемый в дальнейшем вариант выделен из черноземной почвы Попильнянского района Житомирской области.

Для сохранения культуры и накопления спорового материала авторами использовалась среда ISP-3 такого состава (г/л): овсяные хлопья – 20,0; солевой раствор ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 0,1; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1) – 1 мл/л; агар-агар (Difco) – 15,0; pH 7,2. Культуру инкубировали при температуре +28°C на протяжении 14 суток.

Для определения активности при поверхностном культивировании варианты выращивали при температуре +28°C на протяжении 10 суток на модифицированном картофельно-глюкозном агаре (КГА) (г/л): отвар 200 г очищенного картофеля; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,15; $CaCO_3$ – 3,0; глюкоза – 20,0; агар-агар (Difco) – 15,0; pH 7,2. При глубинном культивировании маточную культуру выращивали на протяжении суток на среде следующего состава (г/л): соевая мука – 15,0; сухие дрожжи – 5,0; глюкоза – 20,0; pH 6,2. Процесс ферментации проводили в такой среде (г/л): соевая мука – 16,0; сухие дрожжи – 4,0; растворимый крахмал – 23,0; $CaCO_3$ – 4,0; K_2HPO_4 – 1,0; глюкоза – 60,0 %; pH 6,2. К 50 мл ферментационной среды добавляли 2 % маточной культуры, выращивали на качалках при 240 об./мин в колбах объемом 500 мл. Авермектинсинтезирующую активность проверяли на 7-е сутки. Кроме того путем индуцированного мутагенеза нитрозогуанидином (НГ) удалось повысить биосинтетическую активность в 6,0–6,4 раза. Непосредственно перед экспериментом НГ растворяли в 0,1 М цитратном буфере (pH 5,5). Конечная концентрация НГ в мутагенной смеси составила 2 мг/мл. Споровую суспензию актиномицета готовили путем смывания спор с поверхности газона на среде ISP-3 раствором 20 %-го глицерина в воде. Полученная таким образом суспензия считалась рабочей. Титр спор в суспензии равен $1,8 \cdot 10^8$ КОЕ/мл.

После обработки спор мутагеном отбор вариантов для их последующей проверки на авермектинсинтезирующую активность осуществляли при уровнях выживания 0,10–0,01 % (экспозиция 90 мин). Известно, что именно в этих условиях наибольшая вероятность получения вариантов актиномицетов с повышенной биосинтетической активностью. Биосинтетическую активность оценивали по количеству авермектинов (мкг) в 1 см³ этанольного экстракта из мицелия стрептомицета. Для выделения авермектинов из мицелия 10 мл КЖ центрифугировали на протяжении 20 минут при 4000 об./минуту. К осадку добавляли 10 мл охлажденной дистиллированной воды, перемешивали и центрифугировали 10 минут при 4000 об./минуту. Отмывание проводили 3–4 раза. К осадку добавляли 5 мл этанола и при постоянном перемешивании осуществляли экстракцию авермектинов при комнатной температуре 30 минут. Центрифугировали 10 минут при 4000 об./минуту. Качественный состав авермектинов определяли методом тонкослойной хроматографии в системе гексан – ацетон – этанол; в качестве контроля использовали стандартный раствор авермектинов «Аверсектин С» [4].

Методы определения авермектинов

Актуальной проблемой в связи с необходимостью организации промышленного производства авермектинов и соответствующим контролем за процессом ферментации, а также с первичным скринингом культуры продуцента является разработка простого и высокоточного метода определения авермектинов, так как описанные в литературе методы тонкослойной и высокоэффективной хроматографии мало пригодны для этих целей [5].

В. А. Мосиным и соавторами [3] разработан колориметрический метод определения авермектинов, основанный на измерении оптической плотности продукта взаимодействия авермектинов с орцином в органической фазе при λ 630–640 нм. Этот метод применим для определения авермектинов в экстрактах культуральной жидкости *Streptomyces avermitilis* и в кристаллических препаратах. Относительная погрешность данного метода составляет 4–8 %. В качестве стандарта в работе использовали препарат авермектина производства фирмы Merck (США). В состав авермектинов входит дидезоксисахар, представленный дисахаридом *L*-олеандрозой. Описано много цветных реакций на дезоксисахара, однако все реакции адаптированы для проведения анализа в водной фазе. Так как авермектины отличаются малой растворимостью в воде, для их экстракции из мицелия применяют органические растворители, смешивающиеся с водой: ацетон, метанол и этанол. Поэтому с целью разработки колориметрического метода определения авермектинов необходимо осуществить выбор химической реакции на углеводный компонент, дающий цветной комплекс с авермектинами; подбор органической фазы для проведения цветной реакции; подбор оптимальных условий проведения цветной реакции.

В результате проведенных исследований установлено, что оптимальной органической фазой для проведения реакции Биала с авермектинами является *n*-бутанол, а оптимальными условиями – нагревание в течение 15–20 минут при +75...+80°C. Реакция оказалась очень чувствительной к низким концентрациям авермектинов, что позволяет определять их содержание до 1 мкг/мл. Проведенные исследования показывают, что метод определения содержания авермектинов включает в себя следующие этапы: получение влажного осадка мицелия путем центрифугирования при 3000 об./минуту в течение 20 минут; промывание осадка мицелия дистиллированной водой при +7...+10°C в количестве, соответствующем количеству культуральной жидкости, взятой для анализа, в течение 5 минут; осаждение промытого мицелия центрифугированием при 3000 об./минуту в течение 10 минут; получение этанольного или ацетатного экстрактов авермектинов при комнатной температуре в течение 20 минут при постоянном перемешивании; разведение экстрактов до концентрации авермектинов 2–20 мкг/мл в 2–50 %-ном этаноле или 0,2–2 %-ных ацетоне или *n*-бутаноле; проведение цветной реакции в пробирках, содержащих по 2 мл стандартного раствора авермектинов, 2 мл орцинового реактива и 1 мл *n*-бутанола. Пробирки тщательно перемешивали. Одновременно готовили контрольный раствор, где вместо авермектинов использовали *n*-бутанол. Пробирки помещали на водяную баню (+75...+80°C) и выдерживали 15–20 минут. После инкубации при указанных условиях, определяли величину оптической плотности на ФЭК 56-М. Содержание авермектинов оценивали по величине оптической плотности с помощью калибровочного графика.

Данный метод пригоден для использования в отношении кристаллических препаратов и культуральной жидкости. Преимуществом этого метода перед известными является низкая себестоимость проведения анализа образцов. Это представляется особенно ценным при оперативном контроле процесса промышленной ферментации, направленной селекции продуцентов и т. д. Предлагаемый метод испытан на ряде заводов при наработке опытных партий антипаразитарных препаратов на основе авермектинов [3].

Методы выделения авермектинов

На сегодняшний день в патентной и научной литературе описан ряд способов извлечения авермектинов из биомассы с использованием органических растворителей, как смешивающихся (низшие спирты, ацетон), так и не смешивающихся с водой (хлористый метилен, хлороформ). Большинство описанных способов касаются извлечения авермектинового комплекса либо из цельной культуральной жидкости продуцентов, либо из отфильтрованной сырой биомассы. Кроме того, был предложен способ выделения авермектинового комплекса из высушенной мицелиальной биомассы продуцента *Streptomyces avermitilis*. В опытах по экстракции использовали этиловый, изопропиловый спирты и ацетон.

При сравнении компонентного состава авермектиновых комплексов, извлеченных из биомассы этиловым, изопропиловым спиртами и ацетоном, между ними не было обнаружено каких-либо существенных различий. Все они содержали высокий процент авермектина B_{1a} и соответствующее этанолу количество авермектинов A_{1a} , A_{2a} и B_{2a} . Однако анализ экстрактов свидетельствует о том, что степень извлечения авермектинового комплекса и удельная активность экстрактов, полученных с помощью этилового спирта, были заметно выше, чем при использовании изопропилового спирта или ацетона. При исследовании сравниваемых экстрактов методом тонкослойной хроматографии отмечено, что в экстрактах, полученных при использовании изопропилового спирта и ацетона, содержится большее количество липофильных примесей, чем в экстракте, полученном с помощью этилового спирта. Сопоставление удельной активности авермектинового комплекса в экстрактах с активностью сухой биомассы показало, что степень чистоты в этанольном экстракте повысилась в 6 раз, в изопропиловом спирте – в 4,5 раза, а в ацетоновом экстракте в 3,5 раза. Таким образом, предпочтительным оказалось использование 96 %-ного этилового спирта. По сравнению с исходной биомассой экстракция этиловым спиртом обеспечивает повышение чистоты авермектинового комплекса в 6 раз. Состав авермектинового комплекса полностью соответствовал составу описанного ранее авермектина С.

В процессе работы обнаружена нестандартность сырья по показателю экстрагируемости из него авермектинового комплекса: степень извлечения действующего вещества варьировала от 36 до 70 %. Так, проведение повторной экстракции с одновременным продлением времени экстракции до 1,5 ч позволило в производственных условиях достичь практически 100 %-ного извлечения авермектинового комплекса. Наиболее высокий процент выхода авермектинового комплекса обеспечивается при использовании 75 %-ного этилового спирта. Однако при этом ухудшается качество экстракта по показателям удельной активности и цветности, что усложняет дальнейшую очистку авермектинового комплекса. Следует отметить, что при повторной экстракции 75 %-ным спиртом можно добиться практически полного выхода авермектинового комплекса даже для низкоактивных партий. Однако, в противоположность высокоактивным партиям, чья удельная активность при повторной экстракции несколько повысилась, для «низкоактивных» партий наблюдалось снижение активности, что свидетельствует о наличии в препарате авермектинового комплекса посторонних примесей.

Заключение

Авермектины стрептомицетов – достаточно разнородная как по структуре, так и по функциям группа биологически активных веществ. Они являются эффективными средствами борьбы с эндо- и эктопаразитами животных и вредителями растений, а также представляют интерес в связи с их противоопухолевым действием. Дальнейшее изучение авермектинов является перспективным и дает возможность более детально изучать потенциальные возможности различных продуцентов стрептомицетной природы в плане их биосинтеза.

Библиографические ссылки

1. Давыдова Е. М. Изучение условий экстракции авермектинового комплекса из высушенной мицелиальной биомассы *Streptomyces avermitilis* / Е. М. Давыдова, Е. Б. Кругляк // Биотехнология. – 2000. – № 6. – С. 66–74.
2. Миронов В. А. Зависимость состава авермектинового комплекса *Streptomyces avermitilis* от содержания глюкозы в среде / В. А. Миронов, А. В. Сергеева // Прикл. биохим. и микробиол. – 2003. – № 2. – С. 208–212.
3. Мосин В. А. Авермектины: колориметрический метод определения в культуральной жидкости *Streptomyces avermitilis* и кристаллических препаратах / В. А. Мосин, В. А. Дриняев // Биотехнология. – 2004. – № 1. – С. 9–12.
4. Петрук Т. В. Підвищення біосинтезу авермектинів *Streptomyces avermitilis* УКМ Ас 2161 під впливом N-метил-N-нітро-N-нітрозогуанідину / Т. В. Петрук, Л. О. Белявська // Мікробіол. журн. – 2004. – № 6. – С. 24–29.
5. Черменский Д. Н. Авермектины: биотехнологические особенности штамма продуцента *Streptomyces avermitilis* ВКМ Ас 1301 / Д. Н. Черменский, В. А. Аданин // Прикл. биохим. и микробиол. – 1991. – № 6. – С. 838–844.

Надійшла до редколегії 04.01.06.

УДК 57.017.67

Д. Д. Жерносеков, А. С. Трушенко, А. И. Руденко

Днепропетровский национальный университет
Институт гастроэнтерологии АМН Украины

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ СЛИЗИ И ЭНТЕРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Розглянуто питання зміни складу слизу, протективних властивостей слизової оболонки, а також ентеральної нервової системи шлунково-кишкового тракту ссавців при старінні. Наведені експериментальні та клінічні дані свідчать про наявність різних механізмів, що забезпечують репаративні властивості слизової оболонки. Збільшення із віком вразливості слизової оболонки до дії пошкоджувальних факторів пов'язане зі змінами кількості мукозальних простагландинів. Нейродегенеративні процеси в ентеральній нервовій системі з віком посилюються, при цьому у різних типах нейронів відбуваються різні типи дегенеративних змін. Причини цього на поточний момент залишаються недостатньо вивченими.

In the review questions of changes of mucus structure and protective properties of mucosa as well as those of enteric nervous system (ENS) of mammalian gastrointestinal tract are discussed at aging. The resulted experimental and clinical data testify to presence of the various mechanisms providing reparative properties of mucosa. Enlarged susceptibility of mucosa to disturbing factors observed with the years is connected with changes of mucosal prostaglandins amount. Neurodegenerative processes in ENS strengthen with the years, thus various types of neurones are exposed to various kinds of degenerative changes. The causes of the latter remain insufficiently investigated by the present time.

Введение

Проблема старения приобрела в последнее время особую актуальность в связи с увеличением средней продолжительности жизни при отсутствии высоких показателей рождаемости. В европейских государствах сложилась ситуация, когда значительную часть населения представляют люди, чей возраст превышает 65 лет. При амбулаторном наблюдении таких индивидуумов необходимо проводить разгра-

© Д. Д. Жерносеков, А. С. Трушенко, А. И. Руденко, 2006