

На правах рукописи

Гиззатуллина Светлана Вадимовна

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS*
ИБ-54 К ДЕРМАТОМИЦЕТАМ И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В РАЗРАБОТКЕ
АНТИМИКОТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

Специальность: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)
03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2012

Работа выполнена в филиале «Иммунопрепарат» Федерального государственного унитарного предприятия научно-производственного объединения «Микроген» Министерства здравоохранения и социального развития РФ и в Институте биологии Уфимского научного центра Российской Академии наук.

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
старший научный сотрудник
Лукманова Клара Абдулловна

кандидат биологических наук
Актуганов Глеб Эдуардович

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится «___» _____ 2012 г. в 16.00 часов на заседании Объединенного диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Учреждении Российской Академии наук Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054 г. Уфа, Проспект Октября, 69, тел: 8 (347) 235-33-62, e-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Уфимского научного центра Российской академии наук и на официальном сайте:
<http://www.anrb.ru/inbio/dissovet.html>.

Автореферат разослан «___» _____ 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент



Р. В. Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время, в связи с резким увеличением заболеваемости микозами, возросла потребность в разработке новых эффективных и безопасных антимикотических средств. Одно из ведущих мест среди микотических инфекций занимают дерматомикозы [Сергеев, 2003]. Основную роль в терапии дерматомикозов играют достаточно токсичные синтетические препараты, интенсивное применение которых приводит к побочным эффектам и возникновению резистентности патогенных грибов. Таким образом, целесообразность поиска новых методов и подходов к лечению дерматомикозов очевидна. В практическом здравоохранении все более широко применяются биопрепараты (пробиотики) на основе бактерий рода *Bacillus* [Смирнов, 1998; Похиленко, Перелыгин, 2007]. Значительный интерес представляет опыт использования бацилл в составе наружных препаратов для заживления ран и ожогов [Горшевикова, 1992; Bolton and Fattu, 1994; Klasen, 2000; Мельникова и др., 2001; Копылов и др. 2001; Лукманова и др., 2004; Янгирова, 2004; Забокрицкий, 2005]. Данный аспект, в сочетании со способностью некоторых штаммов *B. subtilis* подавлять развитие дерматомицетов, представляется перспективным для разработки наружных средств профилактики и лечения дерматомикозов.

В связи с этим **целью** настоящей работы являлось изучение антимикотической активности штамма *Bacillus subtilis* ИБ-54 к дерматомицетам и его потенциала в создании биопрепарата для профилактики и лечения дерматомикозов.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Исследовать антимикотическую активность и особенности антагонистического взаимодействия штамма *B. subtilis* ИБ-54 с клиническими штаммами дерматомицетов различной таксономической принадлежности - *Trichophyton rubrum*, *T. gypseum* и *Microsporum canis*.

2. Выявить факторы антимикотического действия *B. subtilis* ИБ-54 и охарактеризовать их физико-химические и биологические свойства.

3. Изучить влияние ряда параметров культивирования на особенности роста и продукции антимикотических соединений штаммом *B. subtilis* ИБ-54.

4. Разработать на основе *B. subtilis* ИБ-54 состав (рецептуру) лекарственной формы для наружного применения при дерматомикозах и оценить ее биологическую активность в доклинических испытаниях.

5. Изучить токсико-фармакологические свойства штамма *B. subtilis* ИБ-54 и биопрепарата на его основе.

Научная новизна. Впервые показана высокая конститутивная антимикотическая активность штамма *B. subtilis* ИБ-54 в отношении клинических штаммов дерматомицетов. Обнаружена специфичность в синтезе антимикотических веществ *B. subtilis* ИБ-54 при взаимодействии с дерматомицетами *in vitro*, тогда как проявление его действия на различные виды грибов имеет сходный характер. Установлена ключевая роль циклических липопептидов в антагонизме *B. subtilis* ИБ-54 к дерматомицетам. Выявлено, что одним из факторов устойчивости грибов рода *Trichophyton* к действию *B. subtilis* ИБ-54 является способность к синтезу антибактериальных веществ. Обнаружена антибактериальная активность *B. subtilis* ИБ-54 к клиническим штаммам патогенных и условно патогенных бактерий. Впервые разработана экспериментальная лекарственная форма препарата на основе штамма *B. subtilis* ИБ-54 для профилактики и лечения дерматомикозов. Обоснован состав компонентов гелевого препарата и экспериментально доказана его эффективность в отношении дерматомицетов.

Практическая значимость работы. Изучены условия максимального роста и продукции антигрибных соединений в глубинной периодической культуре *B. subtilis* ИБ-54, которые могут быть использованы в разработке технологии создания многофункциональных биопрепаратов на основе этого штамма. Высокие продукционные характеристики исследуемого штамма позволяют применять его для направленного получения циклических липопептидов, относящихся к различным гомологическим группам (сурфактины, итурины и т.д.).

Обоснована возможность создания нового препарата наружного применения для профилактики и комплексного лечения поверхностных

дерматомикозов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Штамм *B. subtilis* ИБ-54 проявляет высокую антагонистическую активность к клиническим штаммам дерматомицетов различных таксономических групп, показывая сходство в общем механизме их подавления.

2. Антимикотическая активность *B. subtilis* ИБ-54 к дерматомицетам обусловлена в основном синтезом липопептидных веществ, близких по строению к циклическим липопептидам класса сурфактина с присутствием других функционально активных компонентов.

3. Продукция антимикотических соединений *B. subtilis* ИБ-54 имеет конститутивный характер, но может специфически усиливаться при непосредственном взаимодействии с различными видами дерматомицетов.

4. Источники органического азота способствуют значительному повышению синтеза антимикотических соединений в периодической культуре *B. subtilis* ИБ-54.

5. Опытная лекарственная форма на основе жидкой культуры *B. subtilis* ИБ-54 показывает высокую активность в подавлении дерматомицетов *in vitro*, стабильна при хранении и сравнима по эффективности *in vivo* с коммерческим синтетическим препаратом.

6. Штамм *B. subtilis* ИБ-54 и препарат на его основе не проявляют вирулентности, токсичности, токсигенности и сенсибилизирующих свойств в доклинических испытаниях.

Работа выполнена в филиале «Иммунопрепарат» ФГУП НПО «Микроген» МЗ и СР РФ и в Институте биологии Уфимского научного центра РАН.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на Пятом Всероссийском конгрессе по медицинской микологии (Москва, 2007), Всероссийской научно-практической конференции «Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов» (Пермь, 2008), Пятой конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» (Москва, 2008), Втором международном экологическом форуме «Окружающая среда и здоровье

человека» (Санкт-Петербург, 2008) и Втором съезде микологов России «Современная микология в России» (Москва, 2008).

Публикации. По материалам исследований опубликовано 8 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), объектов и методов исследований (глава 2), результатов и их обсуждения (глава 3), заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 205 ссылок, из них 83 - на русском языке. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста и содержит 24 рисунка и 21 таблицу.

Автор выражает благодарность сотрудникам лабораторий прикладной микробиологии и экологии растительных ресурсов Института биологии Уфимского научного центра РАН Галимзяновой Н.Ф., Гильвановой Е.А., Шендель Г.В. за неоценимую помощь в проведении исследований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве основного объекта исследования использовали штамм из коллекции Института биологии Уфимского научного центра РАН *Bacillus subtilis* ИБ-54, депонированный во Всероссийской Коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под номером В-9795. Тест-объектами служили клинические штаммы дерматомицетов - *Microsporum canis* Bodin, выделенный в Уфимском городском кожно-венерологическом диспансере и любезно предоставленный к.м.н. О.Р. Мухамадеевой, а также *Trichophyton rubrum* (Castell.) Sabour. и *T. gypseum* (Robin) Blanchard, предоставленные д.м.н., проф. Ю.А. Медеведевым. Культуры грибов поддерживали пересевами на агаризованной среде Сабуро и КГА.

Штамм *B. subtilis* ИБ-54 поддерживали на картофельном агаре (КА). Глубинное выращивание бактерий осуществляли в питательной среде следующего состава (г×л⁻¹): КН₂РО₄ - 1,0; К₂НРО₄·3Н₂О - 0,5; (NH₄)₂НРО₄ - 0,5; MgSO₄·7Н₂О - 0,5; пептон ферментативный - 2,0; дрожжевой экстракт - 5,0; кукурузный экстракт - 5,0; глицерин - 5,0. Значение рН в среде перед

автоклавированием – 6,6-6,7. Культивирование проводили на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 при 170 об⁻¹ и 36,0±0,5°С в течение 72 ч.

Для оценки влияния природы источников углерода на рост и синтез антимикотических соединений штамма *B. subtilis* ИБ-54 глицерин в базовой питательной среде заменяли другими источниками углерода (D-глюкоза, сахароза, лактоза, D-сорбит, крахмал картофельный, инулин, пектин свекловичный, Na-КМЦ, пуллулан, хитин) в той же концентрации. Изучение влияния концентрации источников углерода и азота на рост и активность бактериальной культуры проводили, варьируя концентрации глицерина (0, 0,25, 0,50, 0,75, 1,00, 1,50, 2,00%) и источников азота по отдельности.

Рост бактериальной культуры оценивали по оптической плотности при длине волны 630 нм на спектрофотометре СФ-46, а также по титру, определяемому методом предельных разведений на КА.

Концентрацию суммарного белка в КЖ *B. subtilis* ИБ-54 определяли методом Кристиана – Варбурга по поглощению при 280 нм, с учетом коэффициента поправки на поглощение нуклеиновых кислот при 260 нм.

Таксономическую принадлежность штамма *B. subtilis* ИБ-54 уточняли на основе филогенетического анализа последовательности гена 16S рРНК. Амплификацию гена 16S рРНК осуществляли методом ПЦР с использованием универсальных праймеров 16SF27 и 16SR1512. Плазмидный профиль *B. subtilis* ИБ-54 изучали в ГНЦ ГосНИИгенетика.

Морфологические характеристики вегетативных клеток и спор *B. subtilis* ИБ-54, а также влияние бактериальных экзометаболитов на дерматомицеты изучали с помощью световой микроскопии на микроскопах “Amplival” 30-G048a (“Carl Zeiss Jena”, Германия) и “Leica DL1000” (“Leica Microsystems”, Германия).

Антагонистическую активность *B. subtilis* ИБ-54 оценивали по диаметру зон подавления дерматомицетов вокруг колоний штамма на КГА. Уровень продукции антимикотических метаболитов в глубинной культуре бактерий определяли методом диффузии в агар [Егоров, 2004]. Для изучения специфичности антимикотического действия *B. subtilis* ИБ-54 штамм выращивали совместно с дерматомицетами в среде Сабуро при статических условиях и 28°С в течение 7 суток.

Вторичные метаболиты *B. subtilis* ИБ-54 выделяли методом кислотного осаждения и экстракции 60% (o/o) метанолом [Шульга и др., 1990]. Грубый экстракт дополнительно очищали с помощью препаративной обратнофазовой хроматографии на гидрофобном сорбенте Silica C-18. Аминокислотный анализ очищенных метаболитов проводили стандартным методом постколоночной дериватизации на анализаторе Т339М.

Восходящую тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на пластинах (5×10 см) модифицированного силикагеля Kieselgel 60 F₂₅₄ (“Merck”) в системе растворителей н-бутанол: ледяная уксусная кислота: вода (12:4:6). Активные компоненты на хроматограмме выявляли с помощью биоавтографии [Блинов, Хохлов, 1970; Hyun et al., 1999].

Биологическую безопасность *B. subtilis* ИБ-54 изучали на лабораторных животных, полученных из питомника пос. Горный Чишминского р-на Республики Башкортостан. Вирулентность, токсичность и токсигенность оценивали на белых мышах массой 15-17 г, в соответствии с ВФС 42-2904-97 на «Бактиспорин сухой». Сенсибилизирующее действие КЖ *B. subtilis* ИБ-54 и препарата на его основе исследовали в тесте активной кожной анафилаксии на 30 белобоких морских свинках массой 200-250 г. Реакцию гиперчувствительности «замедленного» типа (ГЗТ) изучали на группе мышей путем их сенсибилизации [Хабриев, 2005]. ГЗТ оценивали по индексу воспалительной реакции. Острую и хроническую токсичность КЖ *B. subtilis* ИБ-54 определяли по стандартным методикам.

В качестве экспериментальной лекарственной формы использовали препарат в виде геля на основе карбопола (Ultres 21, “В.Ф. Goodrich Chemical Co.”, Бельгия) с оптимизированным составом, содержащий жидкую культуру бактерий (титр $\geq 10^8$ КОЕ/г). Активность разработанной формы в отношении дерматомицетов *in vitro* определяли методом предельных разведений. Оценку эффективности препарата *in vivo* проводили на модели дерматомикоза морских свинок в соответствии с методическими указаниями по изучению противогрибковой активности фармакологических веществ [Хабриев, 2005].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ ORIGIN 7.0 SR0 и STATISTICA 6.1, используя параметрические и непараметрические методы анализа. Значимость различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни для малых выборок и t-критерия

Стьюдента. Достоверными считали различия между сравниваемыми выборками при уровне достоверной вероятности 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штамм *B. subtilis* ИБ-54 был выделен и идентифицирован до вида в лаборатории прикладной микробиологии Института биологии УНЦ РАН. На основе рациональной фенотипической классификации бацилл штамм был отнесен к первой морфологической группе, включающей виды с эллипсоидными спорами, не раздувающими клетку [Gordon, 1973]. Результаты дифференциально-диагностических тестов показали наибольшее сходство штамма с видом *B. subtilis*. Филогенетический анализ на основе ПЦР и секвенирования гена, кодирующего 16S рРНК (1470 п.о.), позволил выявить высокую степень сходства (99%) с последовательностями представителей *B. subtilis*, доступными из банка данных EMBL/GenBank (NCBI). Прочитанная последовательность гена 16S рРНК *B. subtilis* ИБ-54 депонирована в генбанке EMBL под номером AM765842.

Анализ плазмидного профиля *B. subtilis* ИБ-54 с использованием стандартных методик [Манниатис, 1984] показал отсутствие у штамма плазмид, что исключает возможность горизонтального переноса нетипичных свойств представителям аборигенной микробиоты кожи человека.

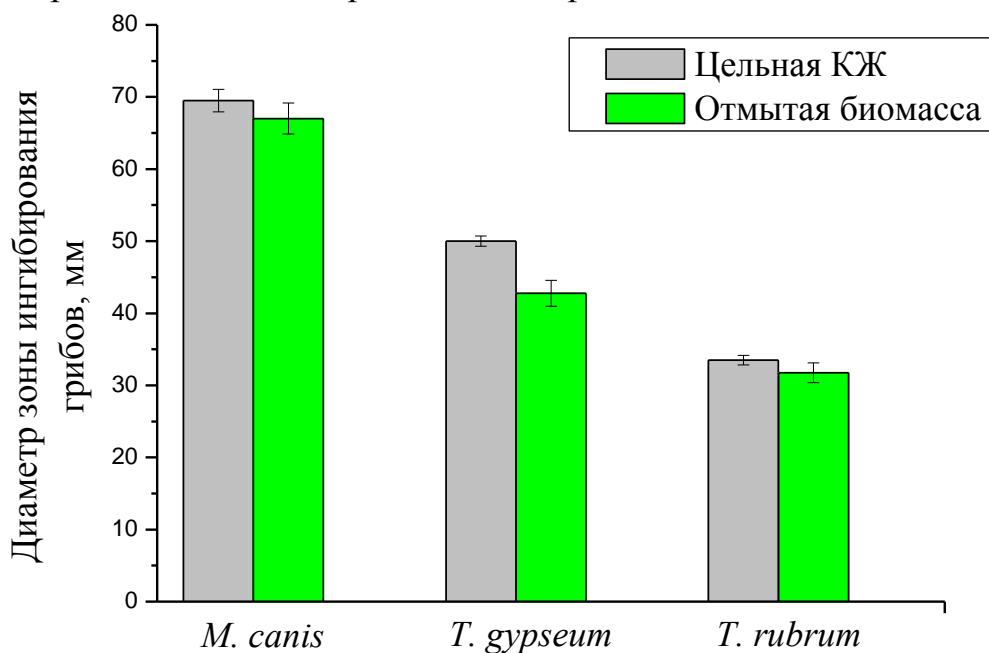


Рис. 1. Антимикотическая активность *B. subtilis* ИБ-54 и его экзометаболитов *in vitro*.

Штамм проявлял высокую антагонистическую активность в отношении тестируемых видов дерматомицетов *in vitro*. При глубинном выращивании бактерий в синхронной культуре с дерматомицетами отмечалось полное подавление роста грибов. Высокие показатели активности *B. subtilis* ИБ-54 наблюдались и в условиях совместного роста с дерматомицетами на плотных питательных средах (рис. 1). Специфические особенности действия *B. subtilis* ИБ-54 заключались в задержке или подавлении развития *M. canis* и *T. gypseum* на стадии прорастания спор и формирования ростковых трубок, тогда как у *T. rubrum* – на стадии ветвления. При микроскопии отмечался сходный характер реакции грибов, заключающийся в нарушении прорастания спор и ветвления гиф, апикальном и интеркалярном формировании сферопластоподобных структур, отсутствии спорообразования у развившихся гиф (рис. 2).

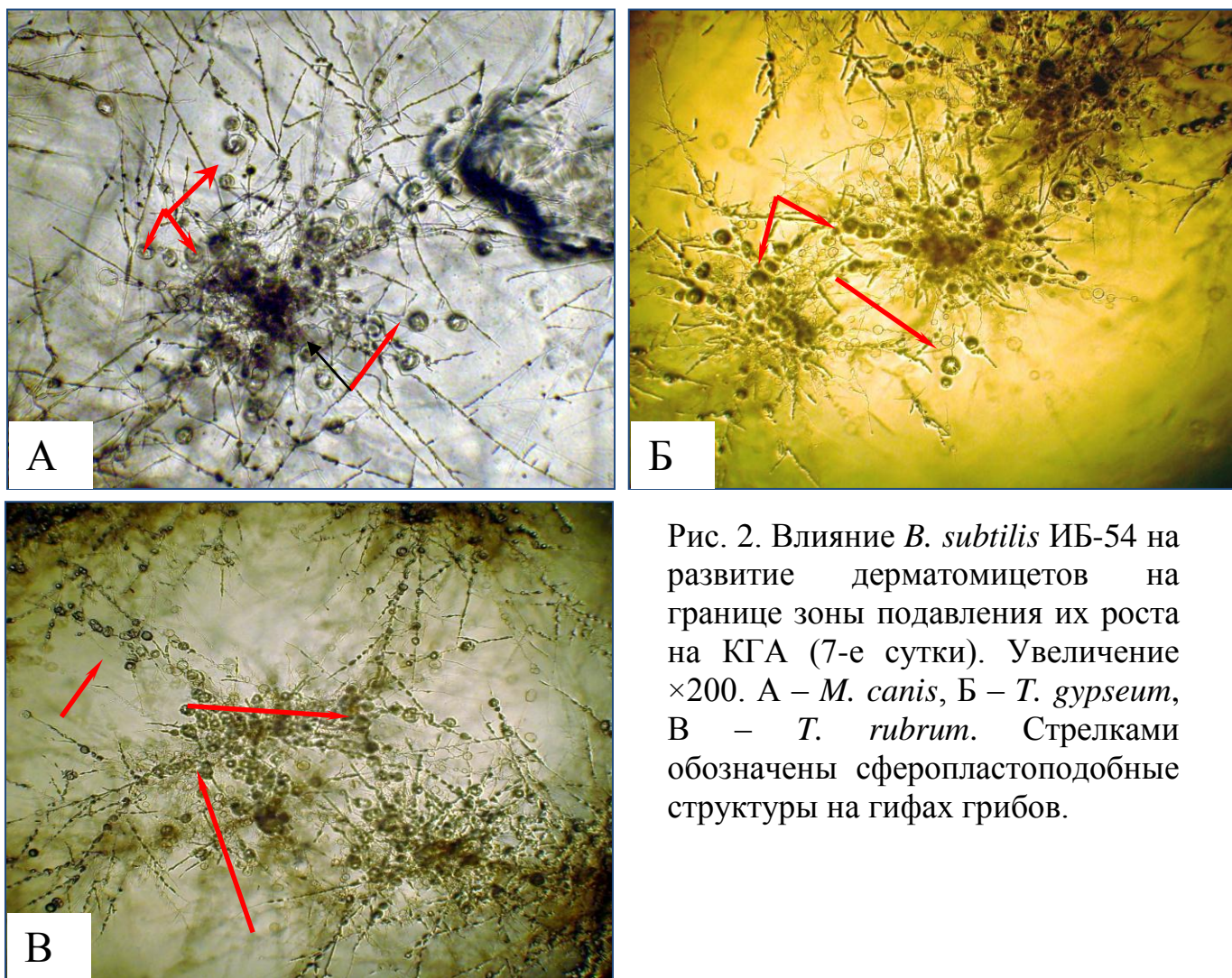


Рис. 2. Влияние *B. subtilis* ИБ-54 на развитие дерматомицетов на границе зоны подавления их роста на КГА (7-е сутки). Увеличение $\times 200$. А – *M. canis*, Б – *T. gypseum*, В – *T. rubrum*. Стрелками обозначены сферопластоподобные структуры на гифах грибов.

Характер цитоморфологических изменений дерматомицетов свидетельствует о сходном механизме действия метаболитов штамма на различные виды этих грибов, приводящего к нарушениям структурно-функциональной целостности ЦПМ. Основными метаболитами бацилл, проявляющими такие свойства, являются соединения амфифильной природы, в особенности, циклические липопептиды [Maget-Dana et al., 1985; Sedlova, Svobodova, 2008], что предполагает их существенную роль в антимикотической активности *B. subtilis* ИБ-54.

При глубинном культивировании *B. subtilis* ИБ-54 его титр достигал максимального значения ($>10^9$) в интервале 18-24 ч, незначительно снижаясь в дальнейшем. Антимикотические соединения обнаруживались в среде через 12 ч от начала роста, однако существенное возрастание их концентрации начиналось после 36 ч и затем продолжалось в ходе всего дальнейшего цикла культивирования (рис. 3). Кривая накопления активных метаболитов в среде совпадала с началом процесса споруляции в бактериальных клетках.

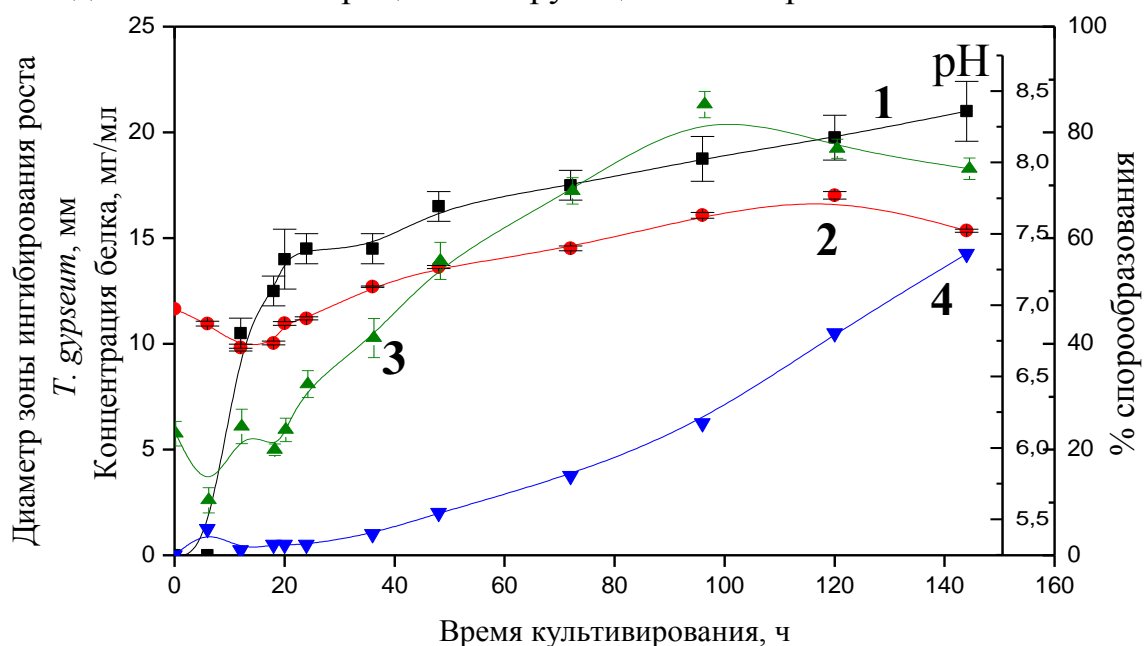


Рис. 3. Динамика секреции антимикотических соединений (1), образования суммарного внеклеточного белка (2), pH культуральной среды (3) и процесса спорообразования клеток (4) в культуре *B. subtilis* ИБ-54.

При статичном культивировании штамма его титр не превышал 10-20% от значений, достигаемых в условиях интенсивной аэрации (рис. 4). Уровень антимикотической активности экзометаболитов из КЖ *B. subtilis* ИБ-54 снижался, по меньшей мере, в два раза по сравнению с активно аэрируемой

культурой. Таким образом, в условиях глубинной культуры аэрация способствует интенсификации роста и активности штамма.

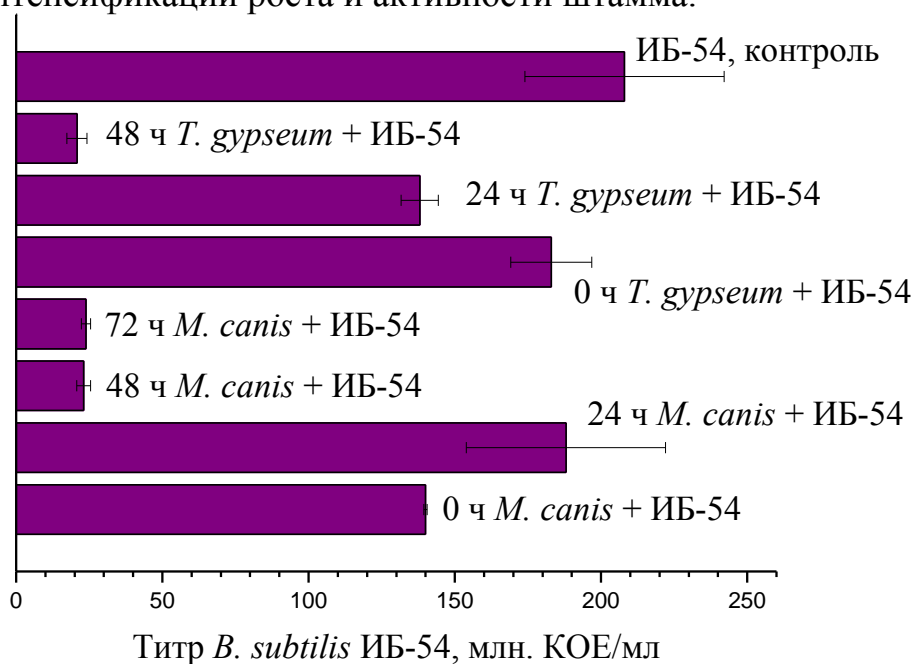


Рис. 4. Интенсивность роста *B. subtilis* ИБ-54 в монокультуре и в смешанных культурах с дерматомицетами при статическом выращивании. Начальный титр штамма составлял $\sim 2,36 \times 10^7$ КОЕ на 1 мл среды.

Нами были изучены также особенности роста *B. subtilis* ИБ-54 и биосинтеза им антимикотических соединений в бинарных культурах с рядом дерматомицетов (рис. 4-5). Оценка активности штамма показала практически полное подавление роста дерматомицетов в синхронной культуре и при внесении бактерий после 24 ч предварительного роста грибов.

Как и в тестах на КГА (рис. 1), *T. gypseum* был более устойчив к действию антагониста по сравнению с *M. canis*, что выражалось в резком увеличении роста мицелия в варианте, предварительно инкубированном в течение 2-х суток перед внесением *B. subtilis* ИБ-54. Показатели роста самого штамма в целом снижались 10-кратно с увеличением возраста и устойчивости дерматомицетов в бинарных культурах (рис. 4), что может быть обусловлено накоплением в среде антибактериальных метаболитов, либо истощением источников углерода и энергии. В бинарных культурах штамма с дерматомицетами отмечалось некоторое повышение антимикотической активности метаболитов по сравнению с контролем, в особенности, против *T. rubrum* (рис. 5). Инокуляция антагониста в более зрелые культуры дерматомицетов (48-72 ч) сопровождалась резким

снижением и элиминацией синтеза антимикотических экзометаболитов, несмотря на продолжающееся ингибирование роста дерматомицетов.

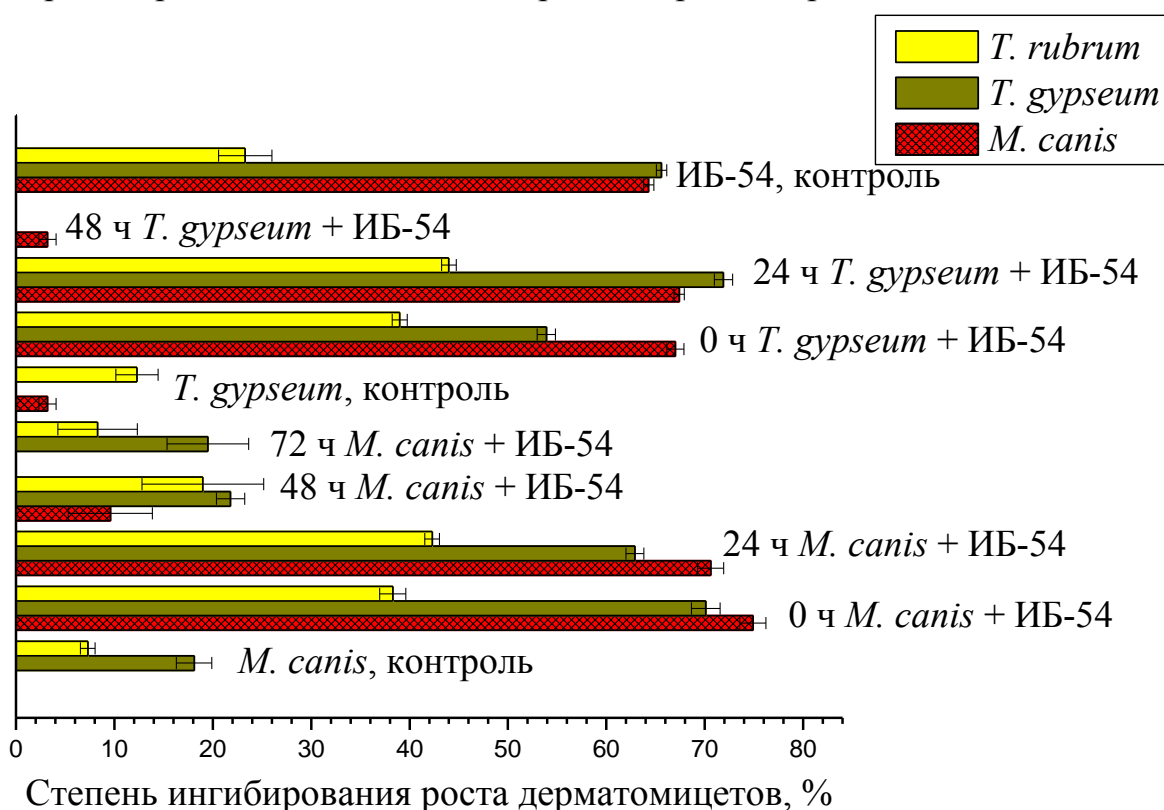


Рис. 5. Антимикотическая активность экзометаболитов в бинарных и монокультурах *B. subtilis* ИБ-54 и дерматомицетов.

Уровень антимикотической активности метаболитов, образуемых в бинарных культурах, в значительной степени коррелировал с количественным выходом фракций липопептидов, выделяемых из КЖ кислотным осаждением (рис. 6). Таким образом, синтез антимикотических веществ в монокультуре исследуемого штамма был напрямую связан с показателями его роста. В то же время, в бинарных культурах штамма с грибами, несмотря на снижение титра бактерий, продукция активных метаболитов возрастала, что указывает на специфичность взаимодействия *B. subtilis* ИБ-54 с дерматомицетами.

Резкое снижение роста и активности исследуемого штамма при взаимодействии со зрелыми культурами дерматомицетов может объясняться накоплением в среде активных грибных метаболитов. Нами была изучена антибактериальная активность метаболитов из контрольных и бинарных культур дерматомицетов, выращенных в жидкой среде Сабуро, в отношении *B. subtilis* ИБ-54.

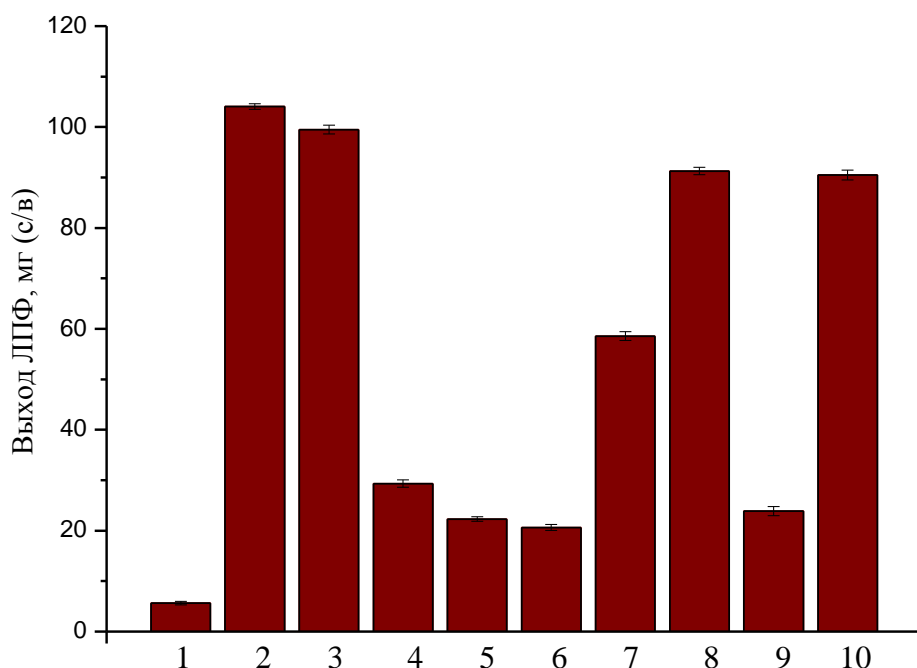


Рис. 6. Выход фракций метаболитов липопептидной природы при раздельном и смешанном культивировании дерматомицетов и *B. subtilis* ИБ-54. Обозначения: 1 – *M. canis*, контроль; 2 – 0 ч *M. canis* + ИБ-54; 3 – 24 ч *M. canis* + ИБ-54; 4 – 48 ч *M. canis* + ИБ-54; 5 – 72 ч *M. canis* + ИБ-54; 6 – *T. gypseum*, контроль; 7 – 0 ч *T. gypseum* + ИБ-54; 8 – 24 ч *T. gypseum* + ИБ-54; 9 – 48 ч *T. gypseum* + ИБ-54; 10 – *B. subtilis* ИБ-54, контроль.

Как видно из табл. 1, дерматомицеты в монокультуре продуцировали антибактериальные метаболиты, при этом *M. canis* показывал более слабую активность, чем *T. gypseum*. Внесение *B. subtilis* ИБ-54 на ранних стадиях развития *T. gypseum* (0-24 ч) приводило к подавлению активности гриба; успевшая же развиться более зрелая культура (48 ч), по всей видимости, аккумулировала антибактериальные вещества, приводящие к частичному подавлению роста и активности антагониста.

Таблица 1. Активность внеклеточных метаболитов из контрольных и смешанных культур дерматомицетов в подавлении роста *B. subtilis* ИБ-54

Культура	Диаметр зоны ингибирования <i>B. subtilis</i> ИБ-54, мм
<i>M. canis</i> , контроль	11,1±0,5
0 ч <i>M. canis</i> + ИБ-54	нет активности
24 ч <i>M. canis</i> + ИБ-54	нет активности
48 ч <i>M. canis</i> + ИБ-54	нет активности
72 ч <i>M. canis</i> + ИБ-54	нет активности
<i>T. gypseum</i> , контроль	16,8±1,7
0 ч <i>T. gypseum</i> + ИБ-54	нет активности
24 ч <i>T. gypseum</i> + ИБ-54	нет активности
48 ч <i>T. gypseum</i> + ИБ-54	14,0±0,6

Слабо выраженная активность *M. canis* полностью подавлялась в присутствии антагониста вне зависимости от времени его внесения (табл. 1). Тестирование поверхностных культур дерматомицетов, выросших на КГА, методом агаровых блоков подтвердило синтез метаболитов, активных в отношении *B. subtilis* ИБ-54, исследуемыми штаммами *T. gypseum* и *T. rubrum*, в то время как *M. canis* таких веществ не продуцировал. Полученные данные свидетельствуют о наличии слабой антибактериальной активности у *T. gypseum* и *T. rubrum*, что может обуславливать их более высокую устойчивость к действию *B. subtilis* ИБ-54 по сравнению с *M. canis*.

Для сравнительной оценки состава активных вторичных метаболитов, осаждаемых кислотой из совместных культур, мы проводили их ТСХ (рис. 7). Совместные культуры штамма с *M. canis* характеризовались присутствием двух сходных пептид-содержащих компонентов со значениями коэффициентов относительной подвижности 0,60-0,63 и 0,54-0,56, соответственно. В совместных культурах *B. subtilis* ИБ-54 с *T. gypseum*, как и в контроле бактерий, обнаруживались аналогичные два пептид-содержащих компонента, проявляемые в виде четко дифференцируемых пятен с соответствующими коэффициентами подвижности $R_f \sim 0,60-0,61$ и $0,52-0,53$ (рис. 7). Интенсивность и размер этих пятен были сопоставимы с уровнем продукции антимикотических соединений бациллами в бинарных культурах.

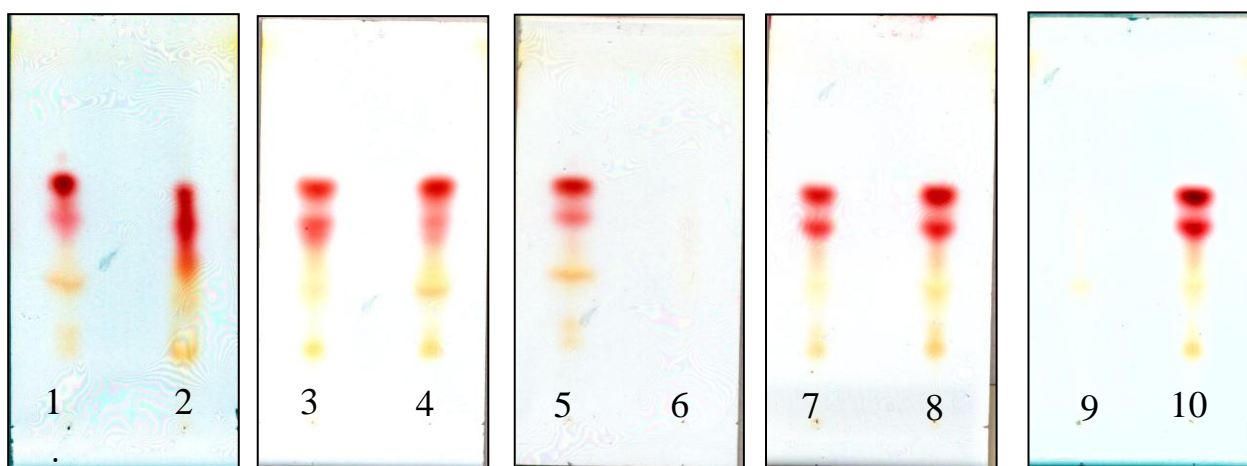


Рис. 7. ТСХ липопептидных фракций активных метаболитов, выделяемых из контрольных и бинарных культур *B. subtilis* ИБ-54 и дерматомицетов. 1 – контроль *M. canis*; 2-5 – соответственно 0, 24, 48 и 72 ч *M. canis*+ИБ-54; 6 – контроль *T. gypseum*; 7-9 – соответственно 0, 24 и 48 ч *T. gypseum* +ИБ-54; 10 – контроль *B. subtilis* ИБ-54.

При взаимодействии штамма с 48-ч культурой *T. gypseum* пептид-содержащие метаболиты не обнаруживались, как и в контроле гриба, что подтверждается отсутствием роста и активности *B. subtilis* ИБ-54 в этих условиях (рис. 7). Полученные результаты свидетельствуют о сходстве в природе активных метаболитов, образуемых *B. subtilis* ИБ-54 при росте в монокультуре и при взаимодействии с дерматомицетами.

С целью достижения высоких показателей титра и активности штамма *B. subtilis* ИБ-54 при глубинном культивировании мы оценивали влияние источников углерода и азота на его рост. Наиболее высокая плотность клеток в КЖ *B. subtilis* ИБ-54 наблюдалась при его выращивании в базовой синтетической среде с глицерином и достигала свыше 2 млрд. КОЕ/мл. Другие легкоусвояемые источники углерода обеспечивали заметно более низкие значения титра бактерий. Оценка влияния концентрации глицерина в питательной среде на рост и продукцию антимикотических соединений *B. subtilis* ИБ-54 не выявила четко прослеживаемой зависимости. Максимальный рост культуры наблюдался при концентрациях субстрата 0,5-1,0%, тогда как секреция активных метаболитов продолжала, хотя и незначительно, возрастать с увеличением его содержания вплоть до 4,0% масс. При изучении влияния источников азота *B. subtilis* ИБ-54 выращивали в средах с 0,5% глицерина и варьируемым содержанием пептона, дрожжевого и кукурузного экстрактов. Наиболее интенсивный рост бактерий (\lg [КОЕ/мл]~ 9,8) наблюдался при суммарной концентрации источников органического азота в интервале 1,0-3,0% масс. Продукция штаммом активных метаболитов достигала максимума в диапазоне 1,0-2,0% источников азота. Замена органических источников азота на минеральные (двухзамещенный фосфорнокислый аммоний или нитрат калия) приводила к прекращению роста штамма и элиминации его активности. Полученные результаты демонстрируют существенное влияние природы и концентрации источников азота на синтез антимикотических соединений *B. subtilis* ИБ-54.

Фракцию активных метаболитов из культуральной среды *B. subtilis* ИБ-54 выделяли, используя известную методику, основанную на кислотном осаждении липопептидов и биоПАВ. По результатам первичного осаждения удавалось выделить 60-70% от первоначального объема активных веществ. Однократная экстракция промытого осадка 60%-ным (о/о) раствором

метанола позволяла получить не менее 2/3 суммарного объема активных компонентов. ТСХ-анализ метанольного экстракта показывал присутствие в нем от 3 до 4 четко различимых пептид-содержащих компонентов, выявляемых нингидрином. При препаративной обратнофазовой хроматографии экстракта в системе метанол – вода (60:40) антигрибные вещества полностью связывались с сорбентом, тогда как вещества с антибактериальной активностью выходили с элюентом (рис. 8). Дальнейшее ступенчатое повышение содержания метанола до соотношения 90:10 приводило к элюции адсорбированных соединений (рис. 8).

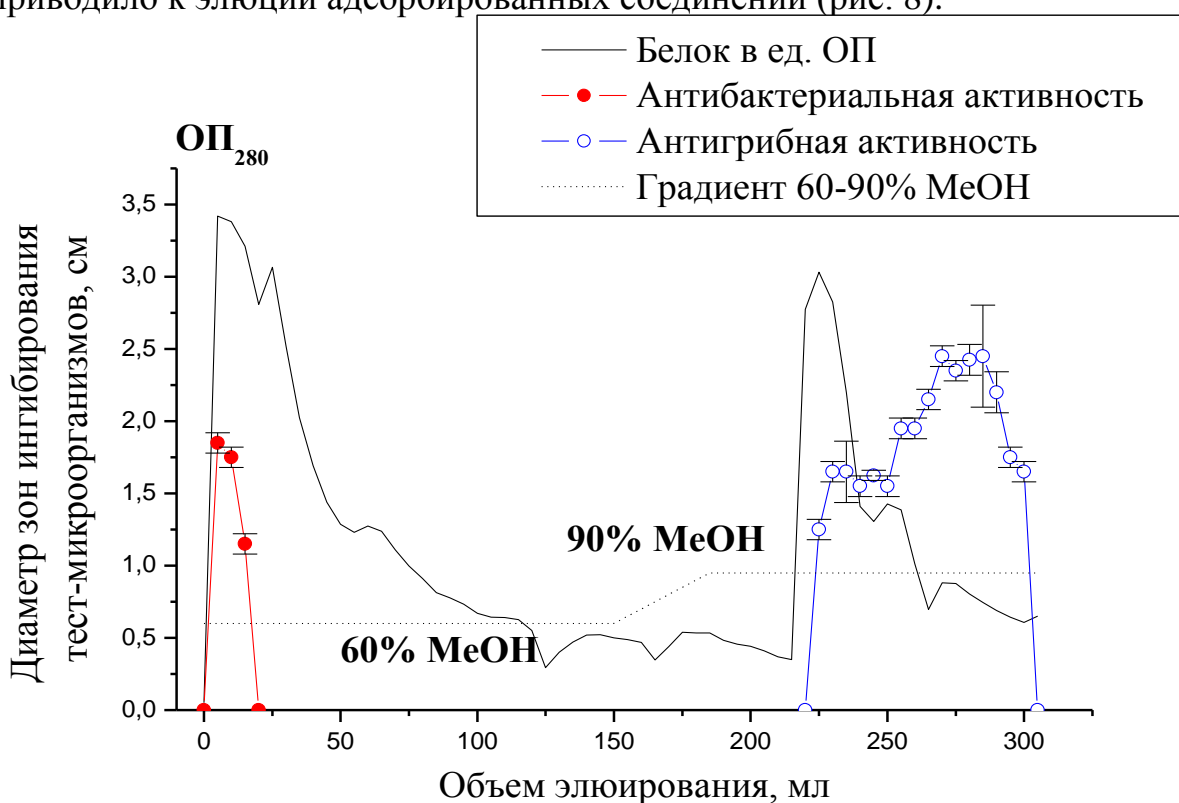


Рис. 8. Препаративная жидкостная гидрофобная хроматография метанольного экстракта (60%) фракции метаболитов, осажденных 2 М HCl из КЖ *B. subtilis* ИБ-54 на колонке (1,5 × 20 см) с Silica C-18.

Оценка устойчивости антигрибных соединений к протеолитическим ферментам показала, что они не могут быть отнесены к антибиотикам чисто белковой или пептидной природы, многие из которых чувствительны к действию протеаз [Katz and Demain, 1977; Lisboa et al., 2006; Захарченко и др., 2007]. Метаболиты *B. subtilis* ИБ-54 практически полностью сохраняли активность при обработке различными протеазами. Следует отметить, что пептидный компонент циклических липопептидов может быть устойчив к протеолизу в силу жесткости пептидного цикла и наличия в нем как

необычных аминокислот, так и стереоизомеров аминокислот в D-конфигурации [Stein, 2005]. В отличие от многих соединений полипептидной природы, антимикотические метаболиты *B. subtilis* ИБ-54 были стабильны при повышенной температуре. Рост-ингибирующая активность метанольного экстракта из КЖ штамма достоверно возрастала после 1 ч инкубации при 100°C, дальнейшее его выдерживание в течение 5 ч приводило к снижению оригинальной активности лишь на 25-30%. Результаты аминокислотного анализа очищенной фракции показали присутствие в ней посторонних примесей, поскольку содержание суммы аминокислот в гидролизате исследуемого препарата в пересчете на сухой вес составляло около 16,3%-масс. По соотношению доминирующих аминокислот (лейцин: глутаминовая кислота: валин: треонин: фенилаланин: аспарагиновая кислота, 2:1,01:0,91:0,61:0,58:0,51) метаболиты *B. subtilis* ИБ-54 близки к сурфактинам и лихенизинам [Yakimov, 1999; Seydlova, Svobodova, 2008], однако большие количества треонина и фенилаланина указывают на присутствие в этой смеси и других пептидных соединений, поскольку эти аминокислоты не были выявлены ранее у всех известных классов циклических липопептидов бацилл. Общая молекулярная масса обнаруженных аминокислот, характерных для структуры известных липопептидов бацилл, составляет 1150,24 Да, что близко среднему значению Mw смеси различных циклических липопептидов (~1015 Да).

Анализ концентрационных кривых ингибирования различных видов дерматомицетов суммарной изолированной фракцией липопептидов из монокультуры *B. subtilis* ИБ-54 выявил наиболее высокую чувствительность у *T. gypseum* с дальнейшим ее снижением у *M. canis* и *T. rubrum* (рис. 9). Минимальная ингибирующая концентрация выделенных метаболитов *B. subtilis* ИБ-54 находилась в интервалах 2,5-5, 5-10 и 22-25 мкг/мл для *T. gypseum*, *M. canis* и *T. rubrum*, соответственно. Существенно разнились и показатели эффективной концентрации 50%-ного ингибирования (ЭД₅₀), составляя 10-12, 50-55 и 220-240 мкг/мл для тех же грибов.

На этапе доклинических испытаний *B. subtilis* ИБ-54 предваряющим шагом являлась его стандартная токсико-фармакологическая характеристика [Хабриев, 2005]. Проведенные испытания показали, что введение различных доз живой культуры и ее метаболитов, не вызывало у животных каких-либо

признаков патологических изменений регистрируемых клинически, что свидетельствует об отсутствии у штамма вирулентных, токсичных и токсигенных свойств (табл. 2).

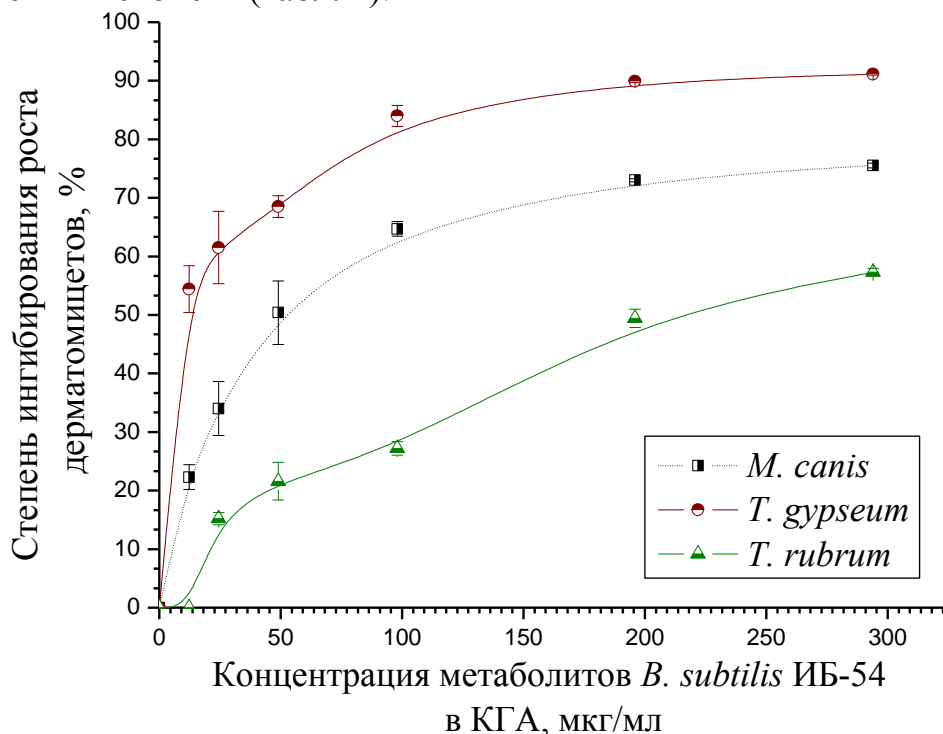


Рис. 9. Зависимость степени подавления дерматомицетов от содержания липопептидных метаболитов *B. subtilis* ИБ-54 в плотной питательной среде.

Таблица 2. Токсико-фармакологические характеристики *B. subtilis* ИБ-54

Вирулентность		Токсичность		Токсигенность	
Титр вводимой дозы, $\times 10^9$ КОЕ/ мл	Кол-во живых/ павших мышей	Титр вводимой дозы $\times 10^9$ КОЕ/ мл	Кол-во живых/ павших мышей	Вводимая доза супернатанта, мл	Кол-во живых/ павших мышей
1	5/0	0,5	5/0	0,5	5/0
5	5/0	1,0	5/0	1,0	5/0
10	5/0	2,0	5/0		5/0

В экспериментах по определению острой токсичности при однократном внутрибрюшинном введении терапевтической и 100-кратной терапевтической дозы КЖ *B. subtilis* ИБ-54 гибели животных не наблюдалось. Общее состояние и масса тела мышей опытных и контрольных групп не отличались. Двигательная активность и исследовательский рефлекс у испытуемых животных оставались в пределах нормы. В гемограмме животных отклонений не было выявлено.

Результаты изучения хронической токсичности свидетельствуют о том, что введение препаратов на основе *B. subtilis* ИБ-54 в форме накожных аппликаций в терапевтической дозе не вызывает существенных отклонений в физиологическом состоянии животных. Изучение реакции гиперчувствительности «замедленного» типа показало, что в контроле индекс реакции составил 1,5%, в опыте - 2,8 %. В обеих группах индекс воспалительной реакции не выходил за рамки положительной реакции (5,0 %), что свидетельствует об отсутствии аллергического действия у штамма.

Экспериментальная гелевая лекарственная форма на основе *B. subtilis* ИБ-54 показывала высокую активность против дерматомицетов *in vitro*, например, при 10-кратном разведении геля наблюдалось полное подавление роста всех тестируемых грибов. Препарат сохранял высокие показатели активности при разведениях до 10^{-7} – 10^{-8} (табл. 3). По оценке жизнеспособности клеток ИБ-54 в геле после 1 года хранения при +5°C отмечено общее снижение их титра на один порядок, что не является критичным для активности препарата (табл. 3).

Эффективность экспериментальной лекарственной формы на основе *B. subtilis* ИБ-54 изучали *in vivo* – на модели зоофильной трихофитии морских свинок, используя в качестве возбудителя *T. gypseum*.

Таблица 3. Динамика изменения титра и антимикотической активности гелевого препарата на основе *B. subtilis* ИБ-54

Тест-объект	Титр культуры <i>B. subtilis</i> ИБ-54 в геле, lg КОЕ/г					
	0 мес.	1 мес.	2 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.
	8,00	7,97	8,00	7,50	7,81	7,24
	Диаметр зоны подавления роста грибов при разведении геля в 10^7 , мм					
	0 мес.	1 мес.	2 мес.	3 мес.	6 мес.	12 мес.
<i>M. canis</i>	НР*	НР*	НД**	27,5±3,5	25,0±2,8	21,5±2,1
<i>T. gypseum</i>	НР*	31,5±0,7	НР*	35,0±1,4	31,5±2,1	27,5±3,5
<i>T. rubrum</i>	НР*	23,0±1,4	32,5±3,5	37,5±3,5	29,0±1,4	23,5±3,5

*Нет роста гриба; **Нет данных.

В течение срока наблюдения в группах, получавших профилактическое лечение исследуемым препаратом и экзодерилом, больные животные не были выявлены. В контрольной группе заболели все животные. Лечение препаратами начинали через 7 суток от начала заражения, при

возникновении и развитии инфекционного процесса (табл. 4). В группах, получавших лечение гелем на основе *B. subtilis* ИБ-54 и экзодерилом, на 21-е сутки (от начала лечения) наступало излечение всех животных, тогда как в группе плацебо больные животные оставались до 30 суток (табл. 4).

Результаты доклинических испытаний свидетельствуют, что эффективность гелевой формы на основе *B. subtilis* ИБ-54 сравнима с результатами применения коммерческого синтетического препарата Экзодерил. Препарат, содержащий жидкую культуру антагониста, проявляет противогрибковую активность *in vitro* и *in vivo*. Штамм, высеваемый из препарата, сохраняет основные признаки и уровень антагонистической активности в отношении дерматомицетов.

Таблица 4. Сроки выздоровления животных, зараженных *T. gypseum*

Группа животных	7-е сутки, 02.06.09	14-е сутки, 09.06.09	21-е сутки, 16.06.09	28-е сутки, 23.06.09	30-е сутки, 25.06.09
	больные/здоровые	больные/здоровые	больные/здоровые	больные/здоровые	больные/здоровые
1-я контрольная	8/0	8/0	6/2	4/4	4/4
2-я опытная	8/0	5/3	3/5	0/8	0/8
3-я сравнения (экзодерил)	8/0	4/4	4/4	0/8	0/8

Результаты проведенной работы подтверждают биологическую безопасность штамма *B. subtilis* ИБ-54 и его потенциал в разработке технологии получения отечественного антимикотического средства, что позволяет рекомендовать препараты на его основе для дальнейшего изучения и внедрения в медицинскую практику.

Выводы

1. Штамм *B. subtilis* ИБ-54 проявляет конститутивную способность к синтезу антимикотических соединений, специфически изменяющемуся при взаимодействии с различными видами дерматомицетов. Одним из факторов снижения чувствительности в ряду *M. canis*, *T. gypseum* и *T. rubrum* к *B. subtilis* ИБ-54 является их способность к продукции антибактериальных веществ.

2. Основную роль в подавлении дерматомицетов штаммом *B. subtilis* ИБ-54 играет комплекс амфифильных соединений липопептидной природы, содержащий вещества по химическому строению пептидного компонента близкие к сурфактинам.

3. Наиболее высокий уровень роста и продукции антимикотических соединений *B. subtilis* ИБ-54 наблюдается в присутствии 0,5-1,0% масс. глицерина и 1,0-2,0% масс. дрожжевого и кукурузного экстрактов.

4. Разработан состав экспериментальной лекарственной формы на основе *B. subtilis* ИБ-54, которая стабильна при хранении в течение 12 месяцев и по лечебной эффективности *in vivo* сравнима с коммерческим синтетическим препаратом.

5. Штамм *B. subtilis* ИБ-54 и экспериментальный препарат на его основе не обладают токсическими, токсигенными и аллергизирующими свойствами.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Лукманова К.А., **Гизатуллина С.В.**, Магазов Р.Ш., Мелентьев А.И., Галимзянова Н.Ф., Актуганов Г.Э. Антагонистическая активность бактерий рода *Bacillus* в отношении грибов дерматофитов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2008. - № 4. – С. 21-23.

2. **Гизатуллина С.В.**, Лукманова К.А., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э., Ефимов Г.Е., Салихова Н.Х., Кайданек Т.В. Оценка токсико-фармакологических свойств нового противогрибкового средства, содержащего штамм *Bacillus subtilis* ИБ-54 // Медицинский вестник Башкортостана. – 2010. - № 6. – С. 92-95.

3. Усманов В.И., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И., Актуганов Г.Э., **Гизатуллина С.В.**, Лукманова К.А. Особенности биосинтеза антимикотических соединений штаммом *Bacillus subtilis* ИБ-54 – антагонистом грибов-дерматофитов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2010. - № 1. – С. 231.

Публикации в других изданиях и материалах конференций

4. Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И., Лукманова К.А., **Гиззатуллина С.В.** Исследование влияния источника углерода в питательной среде на проявление антагонистических свойств штамма *Bacillus subtilis* ИБ-54 к грибам – возбудителям дерматомикозов // Успехи медицинской микологии: материалы пятого всероссийского конгресса по медицинской микологии. – Москва, 2007. – С. 274-276.

5. **Гиззатуллина С.В.**, Лукманова К.А. Разработка биопрепарата для профилактики и лечения дерматомикозов на основе *Bacillus subtilis* ИБ-54 и изучение его безопасности // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: материалы всероссийской научно-практической конференции. – Пермь, 2008. – С. 149-151.

6. **Гиззатуллина С.В.**, Зайнутдинова Ф.Н., Салихова Н.Х. Новые лекарственные формы иммунобиологических препаратов // Материалы научно-практической конференции молодых ученых ММА им. И.М. Сеченова. Приложение к журналу «Вестник РАМН», 2008, № 6, С. 106.

7. Галимзянова Н.Ф., Актуганов Г.Э., **Гиззатуллина С.В.**, Гильванова Е.А, Лукманова К.А., Мелентьев А.И. Использование бактерий-антагонистов *Bacillus subtilis* в качестве основы антимикотического препарата для лечения дерматомикозов // Материалы II Санкт-Петербургского международного экологического форума «Окружающая среда и здоровье человека», 01-04.07.2008. – СПб.: Вестник Российской военно-медицинской академии, 2008, № 3, Вып. 23. Приложение 2. Часть 2. С. 306-307.

8. Лукманова К.А., **Гиззатуллина С.В.**, Галимзянова Н.Ф, Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Трофимов В.А. Изучение безопасности антимикотического штамма *Bacillus subtilis* // «Современная микология в России». Материалы 2-го Съезда микологов России. Том 2 (548 с.). М.: Национальная академия микологии, 2008. С. 296-297.