

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА БИОСИНТЕЗ АНТИБИОТИКА ТИЛОЗИНА ШТАММОМ STREPTOMYCES FRADIAE

Т.Воейкова, к.б.н., **Б.Тяглов**, к.х.н., **Л.Новикова**, к.б.н., **К.Лобанов**, к.б.н., **С.Антонова**, к.х.н.,
ФГУП "ГосНИИгенетика"

В.Ильин, д.м.н., Институт медико-биологических проблем РАН
antonovasvetlanavladimirovna@gmail.com

Факторы космического полета, такие как микрогравитация, изменение электромагнитных полей, различные виды излучений могут оказывать значительное воздействие на метаболизм и стабильность генетического материала микроорганизмов. В работе изучено влияние факторов космического полета на синтез тилозина у штамма *Streptomyces fradiae* методом количественной тонкослойной хроматографии. Показано, что у полетных образцов происходит суммарное снижение уровня тилозиновых антибиотиков на 30%. Разработана и валидирована методика количественного определения тилозина и дезмикозина.

Космическая микробиология в течение многих лет изучает влияние факторов космического полета (ФКП) на микрофлору человека и среды обитания в космических кораблях и орбитальных станциях. Особо актуальны исследования, направленные на выяснение механизмов изменения метаболизма, уровня патогенности микрофлоры, поскольку от этого зависит инфекционная безопасность членов экипажей действующих орбитальных станций, а также стратегия лечения заболеваний на борту. Эксперименты по оценке особенностей синтеза биологически активных веществ (БАВ) необходимы для понимания причин высокой изменчивости и адаптивности микрофлоры к условиям космического полета, а также для выработки методов защиты космонавтов, материалов и оборудования космического корабля.

В качестве объекта для исследования влияния стрессовых факторов космического полета на про-

цессы биосинтеза биологически активных веществ микроорганизмами был выбран штамм - продуцент антибиотика тилозина, принадлежащий к роду *Streptomyces*. Штаммы рода *Streptomyces* - это классическая модель для изучения процессов биосинтеза вторичных метаболитов. Стрептомицеты являются продуцентами большого числа БАВ - антибиотиков, пигментов, витаминов, аминокислот, биосинтез которых чувствителен к различным факторам внешней среды. Известно, что изменение таких факторов как компонентный состав сред, температура, условия культивирования существенно влияют на уровень выхода продукта и его компонентный состав. Поэтому ФКП, представляющие собой уникальные и практически не воспроизводимые в земных лабораториях условия проведения экспериментов, могут быть хорошим инструментом для изучения процессов биосинтеза БАВ и получения веществ с новыми физико-химическими характе-

ристиками. Длительное состояние невесомости, совокупное воздействие невесомости и ионизирующих излучений, отсутствие привычной циркадной ритмики могут изменить продуктивность штаммов, компонентный состав БАВ и привести к появлению веществ с новыми свойствами. В результате возможно появление штаммов с новыми адаптивными характеристиками, способными к утилизации необычных пищевых субстратов и освоению новых экологических ниш. Ранее в экспериментах на "Фотоне-М3" на примере *Streptomyces lividans* (pIJ 702) – продуцента пигмента меланина – показано, что в условиях полета у штамма изменяются ростовые характеристики, процессы биосинтеза и структура метаболитов. В частности, обнаружено изменение уровня синтеза меланина и его фракционного состава. В результате образовался пигмент с качественно новыми характеристиками [1].

Цель работы состояла в исследовании влияния ФКП на биосинтез тилозина, синтезируемого штаммом *Streptomyces fradiae*. Эксперимент проводили на борту Российского беспилотного аппарата "Бион-М1" по программе международных космических исследований. Продолжительность полета составляла 30 суток, температура инкубации штамма 30°C.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Органические растворители очищали согласно методикам [2]. Воду получали на установке Super Q (Millipore, США).

Использовали стандарт тилозина фирмы Sigma, США. Стандартные растворы в концентрациях 0,5; 1,0; 2,0 и 3,0 мг/мл готовили в воде и хранили при температуре 4°C. Срок хранения растворов составлял две недели. Дополнительный контроль концентрации стандартных растворов тилозина проводили методом спектрофотометрии [3].

Согласно программе биологических испытаний по изучению процессов метаболизма у микроорганизмов в условиях космического полета, в частности, синтеза антибиотика тилозина культурой *Streptomyces fradiae* эксперимент проводили на чашках Петри с агаризованной средой. Диаметр чашек составлял 40,0 мм. Штамм *Streptomyces fradiae* засеивали на питательные среды за 7 суток перед полетом в условиях лаборатории ФГУП "ГосНИИгенетика" и хранили при 4°C до передачи на борт космического корабля "Бион-М1", где в течение 30 суток полета они находились в аппаратном модуле "Биоконт-Б" при температуре окружающей среды. Синхронный эксперимент проходил при тех же температурных режимах и длительности культивирования штамма,

Список сокращений:

- ФКП – факторы космического полета;
- БАВ – биологически активные вещества;
- ТСХ – тонкослойная хроматография;
- ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография;
- S/N – signal/noise – соотношение уровней сигнала и фона;
- ϵ – относительная погрешность;
- ΔR_f – различие хроматографической подвижности пятен тилозина и дезмикозина.

что и полетный эксперимент, в условиях микробиологической лаборатории ФГУП "ГосНИИгенетика". В лабораторном контроле штамм культивировали при 30°C в течение 10 суток, то есть в условиях оптимальных для роста и развития штамма.

По окончании полета для выделения тилозина и сопутствующих ему антибиотиков использовали схему экстрагирования тилозина из агаризованной среды, переведенной в жидкую фазу, с последующим извлечением тилозина с помощью бутилацетата. Согласно этой методике гель измельчали и растворяли в 6М-водном растворе иодида калия (KI) в течение 5 мин при 55°C при интенсивном перемешивании. Весовое соотношение: гель-6М-водный раствор KI составляло 1 : 3 [4]. Следует отметить, что используемый KI должен иметь квалификацию "ОСЧ" и не содержать свободного йода (тест "крахмальный индикатор"). Йод в кристаллическом йодиде калия образуется в присутствии атмосферной влаги под воздействием кислорода воздуха. Присутствие свободного йода в 6М-водном растворе KI недопустимо также и по другой причине: при 55°C в результате диспропорционирования молекулы свободного йода образуются йодид и йодат-ионы [5].

В качестве контрольного использовали гель, в который вносили стандартный раствор тилозина (Sigma) из расчета 4 мг на 1,0 г геля. Этот гель хранили при температуре 4°C в течение 30 суток.

Для извлечения тилозина из агаризованной среды после культивирования на ней штамма *S. fradiae* получали суспензию, согласно описанной выше методике. Затем суспензию фильтровали от мицелия на воронке Бюхнера; мицелий на фильтре промывали дважды 6М-водным раствором йодида калия. Полученный водный раствор доводили 2н-водным раствором КОН до величины pH 9,0, затем трижды экстрагировали бутилацетатом, при этом соотношение водной и органической фазы состав-

ляло 1 : 1. Бутилацетат широко используется для экстракции тилозина из культуральной жидкости (КЖ) в промышленных условиях, а присутствие в КЖ растворимых неорганических солей увеличивает степень извлечения тилозина из водной фазы [6]. Бутилацетатный раствор упаривали под вакуумом при 45°C досуха, а образовавшийся осадок растворяли в 50%-ном водном этаноле, при этом объем последнего раствора был фиксирован. Этот раствор использовали для анализа тилозина.

Для ТСХ применяли стандартные пластинки "Сорбфил" ПТСХ-АФ-В-УФ, размером 10 × 15 см, ТУ 26-11-17-89, АО "Сорбполимер" (Краснодар), изготовленные по технологии, разработанной в НПЦ "Ленхром" (Санкт-Петербург). ТСХ-пластинки промывали смесью хлороформ-метанол (1 : 1 об/об) и активировали в течение 30 мин при 110–115°C в сушильном шкафу.

Растворы стандартных образцов и испытуемых проб наносили на пластинки с помощью автоматического аппликатора ATS-4 фирмы САМАГ (Швейцария). Объем наносимых проб – 2,0 мкл.

Хроматографию осуществляли восходящим методом в стеклянной камере (22,5 × 29,0 × 16,0 см) производства НПЦ "Ленхром" (Санкт-Петербург). Подвижная фаза состояла из этилацетата и диэтиламина 95 : 5, об/об. Насыщение камеры – 1,0 час. Время разделения составляло 15 мин. После элюирования хроматограмму выдерживали в течение 10 мин при 20°C. Для визуализации пятен тилозина использовали трансиллюминатор модели UVP-300 фирмы Ultraviolet Products Inc. (США).

Количественное определение тилозина проводили на денситометрах CS-920 фирмы Shimadzu (Япония) и TLC Scanner 3 фирмы САМАГ при длине волны 282 нм. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли согласно методике [7].

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИЛОЗИНА МЕТОДОМ ТСХ

В эксперименте исследовано влияние ФКП на уровень синтеза антибиотика тилозина и его фракционный состав у штамма *S. fradiae*. Известно, что тилозин образуется в результате микробиологического синтеза при культивировании штамма *S. fradiae* и состоит из трех основных фракций с различной антибактериальной активностью. Так, наряду с тилозином синтезируются дезмикозин, макроцин, а также реломицин. Есть еще ряд компонент, которые синтезируются в незначительных количествах, имеют одинаковый спектр антимикробной

активности и являются токсичными. Наиболее высокую антибактериальную активность "in vivo" показывает тилозин [8]. Тилозин является бактериостатическим антибиотиком. Спектр его действия охватывает большинство грамположительных и грамотрицательных бактерий, а именно: стрептококки, стафилококки, лептоспиры, коринебактерии, клостридии, эризипелотрикссы, пастереллы, хламидии, трепонемы, хиодизентерии, спирохеты и микоплазмы. Этот антибиотик применяют в сельском хозяйстве в качестве лечебно-профилактического средства при заболеваниях сельскохозяйственных животных и птицы [8]. По своей структуре тилозин относится к группе макролидных антибиотиков и включает в свою молекулу макролактонное кольцо, связанное с аминосахарами – микаминозой, микарозой и мицинозой. Показано, что для проявления антимикробной активности антибиотика присутствие микарозы и мицинозы не обязательно.

Оптимальное время культивирования штамма на агаризованных средах – 10 суток при температуре 28–30°C. Ранее установлено, что в этих условиях величина активности дезмикозина, реломицина и макроцина составляют 0,95±0,05; 0,4±0,05 и 0,2±0,05 соответственно, за единицу была принята активность тилозина [9].

Выделение тилозина и сопутствующих ему фракций проводили с помощью экстрагирования антибиотика бутилацетатом из агаризованной среды, переведенной в жидкую фазу. Полнота экстракции тилозина из геля была подтверждена данными модельного эксперимента "введено – получено". Так, при выделении тилозина из контрольного геля, содержащего 4 мг антибиотика на 1,0 г геля, установлено, что при трех циклах экстракции степень извлечения тотальной фракции антибиотика составляет 97%. Аналогичным образом проводили выделение тилозина из агаризованных гелей лабораторного, синхронного и полетного образцов, после чего анализировали с помощью метода ТСХ. Установлено, что лабораторный, синхронный и полетный образцы содержат только тилозин, $R_f = 0,67 \pm 0,03$ ($n = 5$; $P 0,95$) и дезмикозин $R_f = 0,59 \pm 0,03$ ($n = 5$; $P 0,95$). Количественное определение антибиотиков проводили на денситометрах CS-920 фирмы Shimadzu (Япония) и TLC Scanner 3 фирмы САМАГ (Швейцария) при длине волны 282 нм. Полученные результаты (табл.1) обрабатывали статистически [7].

Лабораторный образец содержит суммарно 7,0 мг/г тилозина и дезмикозина, содержание

тилозина составляет 83,5%, а дезмикозина – 16,5% на десятые сутки культивирования. Эта концентрация антибиотиков соответствует характеристике штамма, который может синтезировать 6–8 мг/мл антибиотика в процессе культивирования. При культивировании штамма до 30 суток (синхронный контроль) суммарное количество антибиотиков увеличивается до 8,0 мг/г, однако снижается доля тилозина и возрастает доля дезмикозина. В этом случае, скорее всего, происходит конверсия основной фракции тилозина в дезмикозин [9]. В полетном образце суммарное содержание антибиотиков снижено и составляет 5,6 мг/г, при этом также снижается доля тилозина и возрастает доля дезмикозина.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИЛОЗИНА МЕТОДОМ ХРОМАТОДЕНСИТОМЕТРИИ

Согласно нормативам ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 неотъемлемой частью современного количественного анализа является валидация (оценка пригодности) используемых аналитических методик, которая включает в себя следующие характеристики: специфичность, линейную зависимость, правильность (точность), предел обнаружения, предел количественного определения, пригодность системы [10–12]. Молекула тилозина имеет тиланолитный цикл, который может быть нестабильным из-за следующих причин: взаимодействие растворителя с молекулой тилозина, фотохимическое разложение в растворе, деструкция молекулы тилозина, обусловленная разложением на активной поверхности слоя силикагеля [12]. Известно, что тилозин устойчив в водных и водно-спиртовых растворах в течение нескольких суток при комнатной температуре [8]. Для доказательства устойчивости тилозина на слое сили-

кагеля были проведены предвалидационные тесты в одинаковых условиях: элюент – этилацетат-диэтиламин, $t = 20^{\circ}\text{C}$, насыщение камеры 1 ч, содержание тилозина в пятне 2,5 мкг.

Проведена двумерная хроматография тилозина, показано, что он после двумерного элюирования дает только одно пятно.

Проведена хроматография растворов одних и тех же проб тилозина в следующие промежутки времени: 5, 30, 60, 180, 240 и 360 мин. Установлено, что тилозин элюируется одним пятном, при этом интенсивность пятен не меняется.

Проведена хроматография нанесенных на пластинки проб тилозина через 5, 30, 60, 180, 240 и 360 мин после нанесения. Перед проведением элюирования пластинки выдерживались в лабораторном помещении при комнатной температуре $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$ в незащищенном от света месте. Обнаружено, что тилозин проявляется одним пятном, интенсивность которого не изменяется. Полученные таким образом экспериментальные данные свидетельствуют о том, что тилозин устойчив на тонких слоях силикагеля в течение 360 мин.

Разработанная нами подвижная фаза для разделения тилозина является весьма селективной, величины $\Delta R_f \gg 0,05$ (для пятен тилозина и дезмикозина). Таким образом, показана специфичность разработанной методики, поскольку она позволяет достоверно определять как тилозин, так и дезмикозин. Установлено, что аналитическая область методики, в пределах которой соблюдается линейная зависимость, охватывает интервал для тилозина от 0,5 до 3,0 мкг в пятне (включая эти пределы), $r = 0,9986$. Правильность (точность) разработанной методики, в пределах аналитической области, иллюстрируют результаты, представленные в табл.2. Кроме того, данные из этой

Таблица 1. Содержание тилозина и дезмикозина в лабораторном, синхронном и полетном образцах (мг на 1 г геля), погрешность определения в % ($n = 5$; $P 0,95$)

| Образец | Лабораторный | | Синхронный | | Полетный | |
|-------------------------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|---------------|
| | 10 суток | | 30 суток | | 30 суток | |
| Время культивирования штаммов | | | | | | |
| Антибиотик | Содержание мг/1 г геля | \bar{x} , % | Содержание мг/1 г геля | \bar{x} , % | Содержание мг/1 г геля | \bar{x} , % |
| Тилозин | 5,8 | 4,1 | 6,2 | 3,8 | 4,1 | 3,1 |
| Дезмикозин | 1,2 | 4,9 | 1,8 | 3,5 | 1,5 | 4,4 |

Таблица 2. Погрешности результатов анализа стандартных растворов тилозина (%), выполненных в течение одного дня – (I) и через пять дней – (II), денситометр Shimadzu CS-920, $\lambda = 282$ нм

| C*, мкг | | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 3,0 |
|----------------------|----|---------------------------|-----|-----|-----|
| $\bar{\epsilon}$, % | I | 4,8 | 2,3 | 2,9 | 2,4 |
| | II | 3,1 | 3,6 | 3,8 | 3,2 |
| r (I и II) | | n = 5, P 0.95; r = 0.9974 | | | |

* C – содержание тилозина в пятне, мкг.

Таблица 3. Погрешности измерения содержания стандартных образцов тилозина (%), выполненных в различных лабораториях в разное время. I – денситометр Shimadzu CS-920; II – денситометр Camag TLC scanner 3, $\lambda = 282$ нм

| C*, мкг | | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 3,0 |
|----------------------|----|---------------------------|-----|-----|-----|
| $\bar{\epsilon}$, % | I | 3,9 | 4,1 | 3,2 | 2,8 |
| | II | 2,9 | 2,4 | 2,4 | 1,7 |
| r (I и II) | | n = 5, P 0.95; r = 0.9884 | | | |

* C – содержание тилозина в пятне, мкг

таблицы демонстрируют хорошую внутрилабораторную воспроизводимость.

Результаты проверки межлабораторной воспроизводимости (табл.3) показали, что полученные в разных лабораториях данные хорошо согласуются друг с другом.

Предел обнаружения тилозина составляет 0,3 мкг. Предел количественного определения тилозина 0,5 мкг в пятне (S/N = 20).

Проведено исследование зависимости селективности разделения от величины объемного содержания этилацетата и диэтиламина, входящих в состав подвижной фазы. Установлено, что величины ΔR_f пятен тилозина и дезмикозина практически не изменяются ($\pm 0,05$, n = 5, P 0,95) в интервале содержания этилацетата от 93,5 до 96,5% (по объему) и диэтиламина от 6,5 до 3,5% (по объему). Температура в интервале от 15 до 25°C и время насыщения камеры от 30 до 120 мин также не оказывают влияния на величины ΔR_f ($\pm 0,05$; n = 5, P 0,95) тилозина и дезмикозина. Использование ВЭТСХ пластинок "Сорбфил" (предварительно промытых и активированных) различных партий также не вызывает изменений селективности разделения (robustness, ruggedness).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о пригодности разработанной методики для количественного определения тилозина и дезмикозина.

Исследования выполнены при поддержке Федерального космического агентства, ГНЦ РФ – Института медико-биологических проблем РАН. Работа проведена с использованием оборудования ЦКП ФГУП "ГосНИИгенетики и селекции промышленных микроорганизмов".

ЛИТЕРАТУРА

1. **Воейкова Т., Тяглов Б., Новикова Л., Емельянова Л., Антонова С.** Исследование воздействия факторов космического полета на продукцию меланина штаммом *Streptomyces lividans* 66 (piJ 702). – Аналитика, 2013, № 1, с. 18-23.
2. **Perrin D.D.**, Purification of Laboratory Chemicals – N-Y-London – Pergamon Press, 1988.
3. **Досон Р., Эллиот Д., Джонс К.** Справочник биохимика, М.: Мир, 1991. С. 14.
4. **Vogelstein B., Gillespie D.** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 1979, v. 76(2), p. 615-619.
5. **Карякин Ю.В., Ангелов И.И.** Чистые химические вещества. – М.: Химия, 1979. 406 с.
6. **Аксенова И.А.** Тилозин. Производство и применение продуктов микробиологических производств. – М.: ВНИИСЭНТИ Медминпрома СССР, 1988, вып. 2, с. 8-17.
7. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. – М.: Медицина, 1987. С. 163-187.
8. **Biot A.** Biotechnology of Industrial Antibiotics /ed: Van-Damme. – N.-Y.: Marcel Dekker, 1984. 720 p.
9. **Huber G.** Antibiotics / ed: HahuF –E. – Berlin: Springer Verlag, 1989. 284 p.
10. **Sun S.W., Fabry H.** Test procedure validation for the TLC assay of degradation products in pharmaceutical formulation // Journal Liquid Chromatography, 1994, 17, p. 2495-2509.
11. **Renger B., Vegh Z.** Validation of thin layer and high performance thin layer chromatographic methods // Journal of Chromatography, 2011, 1218, p. 2712-2721.
12. **Красиков В.Д.** Основы планарной хроматографии. – СПб.: Химиздат, 2005. 232 с.