

СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 5, 2022

Лекарственная устойчивость бактерий к действию наносеребра: молекулярные механизмы и возможные пути преодоления	
<i>Ю. А. Крутяков, А. Г. Хина</i>	419
Антигрибные поверхности (обзор)	
<i>С. Ю. Филиппович, Г. П. Бачурина</i>	434
Модуляция каталитических свойств иммобилизованной рекомбинантной липазы из <i>Thermotusces lanuginosus</i> в реакции этерификации путем выбора адсорбента	
<i>Г. А. Коваленко, Л. В. Перминова, А. Б. Беклемишев, М. Б. Пыхтина, М. Г. Холявка, В. А. Бучельникова, В. Г. Артюхов</i>	446
Влияние нитроксила на клетки <i>Escherichia coli</i> , выращенные в условиях карбонильного стресса	
<i>Э. И. Насыбуллина, И. С. Пугаченко, О. В. Космачевская, А.Ф. Топунов</i>	459
Роль биосинтеза кадаверина в адаптации <i>Escherichia coli</i> к действию пероксида водорода	
<i>А. В. Ахова, А. Г. Ткаченко</i>	467
Галотолерантные бактерии рода <i>Glutamicibacter</i> – деструкторы терефталевой кислоты	
<i>О. В. Ястребова, А. А. Малышева, Е. Г. Плотникова</i>	476
Биодеструкция эфиров фталевой кислоты грибами белой гнили	
<i>О. С. Савинова, А. В. Шабаетов, О. А. Глазунова, С. А. Еремин, Т. В. Фёдорова</i>	484
Ферментативно синтезированный полианилин, допированный ионами меди: физико-химические и антимикробные свойства	
<i>И. С. Васильева, Г. П. Шумакович, О. В. Морозова, А. И. Ярополов</i>	500
Способ получения нанокомпозитов серебро-сукцинил хитозан и их антимикробная активность	
<i>В. А. Александрова, А. М. Футорянская, В. С. Садыкова</i>	507
Фаговые антитела как биорецепторы для определения ампициллина	
<i>О. И. Гулий, А. К. М. Алсовэйди, А. С. Фомин, К. П. Габалов, С. А. Староверов, О. А. Караваева</i>	513
Лактобациллы: правовое регулирование и перспективы создания препаратов нового поколения	
<i>Р. А. Юнес, Е. У. Полуэктова, Т. В. Белкина, В. Н. Даниленко</i>	520

CONTENTS

Vol. 58, No. 5, 2022

Bacterial Resistance to Nanosilver: Molecular Mechanisms and Possible Ways to Overcome <i>Yu. A. Krutyakov and A. G. Khina</i>	419
Antifungal Surfaces <i>S. Yu. Filippovich and G.P. Bachurina</i>	434
Modulation of the Catalytic Properties of Immobilized Recombinant Lipase from <i>Thermomyces lanuginosus</i> in the Reaction of Esterification by the Selection of the Adsorbent <i>G. A. Kovalenko, L. V. Perminova, A. B. Beklemishev, M. B. Pykhtina, M. G. Holyavka, V. A. Buchelnikova, and V. G. Artyukhov</i>	446
Influence of Nitroxyl on <i>Escherichia coli</i> Cells Grown under Carbonil Stress Conditions <i>E. I. Nasybullina, I. S. Pugachenko, O. V. Kosmachevskaya, and A. F. Topunov</i>	459
Cadaverine Biosynthesis in <i>Escherichia coli</i> Adaptation to Hydrogen Peroxide <i>A. V. Akhova and A. G. Tkachenko</i>	467
Halotolerant Terephthalic Acid-Degrading Bacteria of the Genus <i>Glutamicibacter</i> <i>O. V. Yastrebova, A. A. Malysheva, and E. G. Plotnikova</i>	476
Biodestruction of Phtalic Acid Esters by White Rot Fungi <i>O. S. Savinova, A. V. Shabaev, O. A. Glazunova, S. A. Eremin, and T. V. Fedorova</i>	484
Enzymatically Synthesized Polyaniline Doped with Copper Ions: Physico-Chemical and Antimicrobial Properties of the Product <i>I. S. Vasil'eva, G. P. Shumakovich, O. V. Morozova, and A. I. Yaropolov</i>	500
The Method of Obtaining Nanocomposites Silver-succinyl Chitosan and Their Antimicrobial Activity <i>V. A. Aleksandrova, A. M. Futoryanskaya, and V. S. Sadykova</i>	507
Phage Antibodies as Bioreceptors for Ampicillin Detection <i>O. I. Guliy, A. K. M. Alsowaidi, A. S. Fomin, K. P. Gabalov, S. A. Staroverov, and O. A. Karavaeva</i>	513
Lactobacilli: Legal Regulation and Prospects for Creating New Generation Drugs <i>R. A. Yunes, E. U. Poluektova, T. V. Belkina, and V. N. Danilenko</i>	520

УДК 579.6

ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ К ДЕЙСТВИЮ НАНОСЕРЕБРА: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ И ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ

© 2022 г. Ю. А. Крутяков^{1, 2, *}, А. Г. Хина¹¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 199991 Россия²Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

*e-mail: sir_yurii@mail.ru

Поступила в редакцию 18.03.2022 г.

После доработки 01.04.2022 г.

Принята к публикации 22.04.2022 г.

В обзоре обобщены результаты экспериментальных исследований последних лет, направленных на изучение лекарственной устойчивости бактерий к действию наноразмерного серебра, и описаны возможные молекулярные механизмы ее развития. Особый акцент сделан на изучении работ, посвященных механизмам устойчивости бактерий к действию ионов серебра, являющихся основным фактором бактерицидности наночастиц. Предложены направления дальнейших исследований, связанных с поиском путей преодоления проблемы резистентности отдельных бактерий к действию наносеребра и способов предотвращения ее дальнейшего распространения.

Ключевые слова: коллоидное серебро, наночастицы серебра, бактерицидное действие, антибактериальный эффект, множественная лекарственная устойчивость

DOI: 10.31857/S0555109922050105

Массовое медицинское применение антибиотиков, начавшееся в конце 40 гг. XX в., уже через 20 лет привело к широкому распространению штаммов бактерий с лекарственной устойчивостью к ним [1, 2]. Активная ротация антибактериальных препаратов, выводимых из резерва в попытках поиска более эффективных терапевтических схем лечения пациентов, в конце 80 гг. прошлого века—начале 2000 гг. стала причиной значительного роста числа штаммов бактерий, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), в том числе к фторхинолонам, карбопенемам и даже колистину [3–6]. Проблема существенно усугубилась в 2000 гг., когда стала очевидной неэффективность подававшей надежды стратегии высокопроизводительного генетического скрининга ДНК бактерий, направленного на поиск новых молекул, пригодных для медицинского применения. Большинство крупных фармацевтических компаний свернуло программы поиска новых антибиотиков по причине экономической нецелесообразности [7]. В настоящее время МЛУ микроорганизмов находится в числе критических вызовов, представляющих, в соответствии с резолюцией Генеральной ассамблеи ООН, наибольшую угрозу для человечества наряду с глобальным потеплением и неинфекционными болезнями [8].

Согласно современным представлениям развитие МЛУ у комменсальных бактерий продолжается по причине широкого применения антибиотиков. Кроме того, многократное повторение разовых антибактериальных терапевтических схем в популяции также является причиной эволюции МЛУ [9]. Одним из путей решения проблемы МЛУ является рациональное применение антибактериальных препаратов — исключительно в случаях прямых показаний, после идентификации возбудителя и постановки точного диагноза. В этой связи для остальных случаев особую актуальность приобретает разработка лекарственных средств, содержащих альтернативные традиционным антибиотикам действующие вещества. Так, в последнее время большой интерес вызывает перспектива использования в схемах местной терапии инфекционных и ожоговых поражений кожных покровов и слизистых оболочек наночастиц (НЧ) металлов и их оксидов, которые обладают высокой антибактериальной активностью, в том числе в отношении штаммов с МЛУ [10–12]. Эффективность НЧ в подавлении роста бактерий связана с их особыми физико-химическими свойствами. В частности, небольшой диаметр (менее 100 нм) и высокая удельная площадь поверхности НЧ позволяет им непосредственно связываться с бактериальной клеткой химически или электростатически [13]. Это, в свою

очередь, приводит к значительным изменениям в структуре клеточной стенки, увеличению проницаемости мембраны, нарушению транспортной и дыхательной функций клетки, а также генерации активных форм кислорода, повреждающих внутриклеточные компоненты, такие как рибосомы и ДНК [14].

Среди НЧ различных металлов широко применяется серебро, про антибактериальные свойства которого было известно уже в начале нашей эры [15, 16]. Высокая антимикробная активность НЧ серебра в отношении вирусов [17–19], бактерий [20, 21], грибов [22–24] и паразитарных организмов [25, 26] продемонстрирована в многочисленных современных исследованиях. Наличие у НЧ серебра способности подавлять рост широкого спектра патогенов привело к их использованию в ветеринарии и медицине [27] в качестве основного компонента медицинских изделий и лекарственных препаратов для местной антибактериальной терапии с различным способом применения. В частности, НЧ серебра входят в состав некоторых перевязочных материалов, предназначенных для терапии бактериально осложненных ран и ожогов [28–31], а также могут применяться для лечения воспалительных стоматологических [32] и гинекологических [33] заболеваний, конъюнктивита, ринита [34], мастита [35] и даже туберкулеза [36]. Другим применением наносеребра является создание на его основе биологически совместимых антибактериальных покрытий на поверхности имплантов и других медицинских изделий для предотвращения развития инфекций, вызываемых госпитальными возбудителями [37, 38]. Кроме того, достижения в области материаловедения и коллоидной химии сделали возможным включение стабилизированных различными соединениями НЧ серебра не только в медицинские препараты и изделия медицинского назначения, но и в другие продукты, предназначенные для профессионального и бытового использования, такие как пестициды [39–41], косметические [42], дезинфицирующие и моющие средства [43], упаковочные материалы для пищевой продукции [44, 45], фильтры для очистки воды [46–48], компоненты микроэлектронных схем и даже одежду и детские игрушки [49, 50].

Резистентность некоторых бактерий к действию ионного серебра, которая в основном сформировалась за счет широкого медицинского применения сульфадиазина серебра в терапии ожоговых поражений кожных покровов, известна уже давно [51]. Долгое время считалось, что ввиду большого количества клеточных мишеней, подвергаемых действию НЧ серебра, бактериям будет чрезвычайно сложно эволюционировать в устойчивый к их действию фенотип. Однако, в свете увеличения числа бактериальных штаммов с МЛУ, бесконтрольное применение НЧ серебра и появление первых сообще-

щений о развитии резистентности к действию НЧ серебра *in vitro* как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий вызывает определенную озабоченность [52, 53].

Цель настоящей обзорной статьи – обобщение известных молекулярных механизмов МЛУ к ионному серебру (Ag^+) и обсуждение возможности развития устойчивости бактерий к действию НЧ серебра. Понимание перспектив широкого распространения штаммов бактерий с МЛУ к НЧ серебра будет полезно для продолжения научных исследований, направленных на поиск новых антибактериальных агентов, способных к преодолению существующей устойчивости к антибиотикам.

Механизм антибактериального действия НЧ серебра. Механизм действия НЧ серебра на бактерии изучался в ряде оригинальных работ [54–59], результаты которых были обобщены в недавно опубликованных обзорах [32, 60], поэтому здесь сведения о нем приводятся в краткой форме, достаточной для понимания потенциальных путей развития устойчивости к действию НЧ серебра у бактерий.

Частицы коллоидного серебра, как и НЧ других металлов, способны связываться с бактериальной мембраной [55]. Это может происходить за счет высокого сродства серебра к азоту и сере – элементам, присутствующим в белках внешней мембраны [61–63], а также электростатического притяжения между отрицательно заряженной мембраной бактериальной клетки [64] и адсорбированными на поверхности НЧ положительно заряженными ионами Ag^+ [65]. Связываясь с мембраной, нарушая ее структуру, НЧ серебра вызывают необратимые нарушения транспортной и барьерной функции бактериальной клетки, что приводит к утечке внутриклеточных компонентов из цитоплазмы во внешнюю среду (лизису) и, в результате, клеточной гибели [66]. С другой стороны, антибактериальное действие НЧ серебра тесно связано с эффектом ионов Ag^+ , выделяющихся с поверхности НЧ в результате окислительного растворения нульвалентного металла в непосредственной близости от поверхности клетки [65, 67–69]. Образовавшиеся при окислении серебра ионы Ag^+ взаимодействуют с тиол-содержащими остатками цистеина [70] и глутатионом [61, 62], а также флавиновыми группами [63], являющимися компонентами мембранных белков, в том числе, белков электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) [71]. Это препятствует протеканию мембранного фосфорилирования и приводит к нарушениям дыхательной функции клетки [72]. Другим следствием воздействия ионов серебра на белки цитоплазматической мембраны (ЦПМ), является увеличение ее проницаемости, что приводит к нарушениям в трансмембранном транспорте, а также коллапсу протонной движущей силы [54]. Известно, что помимо воздействия

на мембранные белки и ферменты, ионы серебра способны проникать в цитоплазму без повреждения клеточной мембраны [56]. Вероятно, это происходит через системы активного транспорта ионов меди [73], которые имеют с ионами серебра схожую электронную структуру и необходимы для работы ферментов участвующих в электронном транспорте и дыхании, а также поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза бактерий [74, 75]. Попадая внутрь бактериальной клетки, Ag^+ могут взаимодействовать с большим количеством биологических мишеней, такими как белки и ферменты [65, 71], структурные составляющие рибосом [56], ДНК и РНК [59, 76], что, в свою очередь, может влиять на протекание многих жизненно важных для клетки процессов. Другим механизмом антибактериального действия НЧ серебра является окислительный стресс, вызываемый увеличением концентрации АФК в цитоплазме в результате воздействия Ag^+ на ферменты ЭТЦ, стимуляции дыхания, вызванной потерей трансмембранного градиента концентрации протонов, а также запуском реакции Фентона в цитоплазматическом пространстве, вызванным высвобождением ионов Fe^{2+} при воздействии Ag^+ на Fe-S кластеры, что приводит к повреждениям белков, липидов и ДНК [77–79].

В целом, биологическая активность дисперсий наносеребра, как правило, существенно превышает активность чистого ионного серебра в концентрациях, сравнимых с равновесными концентрациями Ag^+ в дисперсиях НЧ. В связи с этим, можно считать, что НЧ серебра обладают особыми, связанными не только с действием ионов Ag^+ , механизмами антибактериального действия. Ассоциируясь с мембраной бактерии, вызывая нарушения в ее структуре, а также увеличивая локальную концентрацию ионов Ag^+ , НЧ увеличивают внутриклеточную концентрацию Ag^+ , что делает именно ее, а не концентрацию Ag^+ в питательной среде основным фактором токсичности НЧ серебра. По этой причине, хотя основные мишени в бактериальной клетке для ионов и НЧ серебра совпадают, НЧ влияют, в первую очередь, на внутриклеточные процессы, такие как трансляция и синтез необходимых для поддержания жизни бактерий биомолекул, например, жирных кислот [60].

Механизмы развития устойчивости бактерий к действию ионов серебра. Как было показано выше, механизм антибактериального эффекта НЧ серебра тесно связан с ионами Ag^+ , генерирующимися на поверхности НЧ при их взаимодействии с кислородом воздуха или другими окислителями. Действительно, в ряде работ установлено, что в присутствии избытка восстановителя, сводящего к минимуму равновесную концентрацию Ag^+ в среде, НЧ серебра не проявляют антибактериальную активность. Напротив, в присут-

ствии окислителя (избыток кислорода воздуха, пероксид водорода) активность наносеребра заметно возрастает [80, 81]. Становится очевидным, что для развития МЛУ к действию НЧ серебра, бактериальным клеткам, как минимум, необходимо выработать резистентность к действию Ag^+ .

В общем, механизмы развития устойчивости у бактерий могут быть разделены на три основные группы:

- защита молекулярной мишени от действия антибиотика путем ее модификации или замены;
- снижение концентрации антибиотика в цитоплазматическом пространстве за счет изменений в структуре клеточной стенки и мембраны (например, за счет остановки биосинтеза некоторых поринов), появления нового или дополнительной активации действующего механизма эффлюкса антибиотика за пределы клетки;
- инактивация (например, ферментативная или хелатирующая) антибиотика за счет образования менее токсичной формы [82, 83].

Ионы серебра, как уже было замечено, действуют одновременно на большое число молекулярных мишеней, находящихся как в цитоплазме, так и на мембране бактериальной клетки, что делает маловероятным развитие устойчивости к их действию по механизму модификации или защиты отдельных сайтов связывания. Однако, достоверно известно, что как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии способны развивать устойчивый к действию ионов Ag^+ фенотип, используя системы активного эффлюкса с использованием механизма инактивации путем связывания Ag^+ с помощью низкомолекулярных белков с высокой хелатирующей способностью [84–86].

Впервые молекулярные механизмы и генетические основы активного эффлюкса ионов серебра, приводящего к развитию устойчивости к действию Ag^+ у бактерий, были описаны в работе [84]. Объектом исследования в ней являлась *Salmonella enterica* (серовар *Typhimurium*) – грамотрицательная бактерия с МЛУ к нитрату серебра, хлориду ртути(II), несколькими антибиотикам, изолированная из клинической среды в 1975 г. и вызвавшая гибель трех человек в ожоговом отделении больницы [51]. При секвенировании определяющей МЛУ *S. typhimurium* плазмиды, отнесенной к HI-2 группе несовместимости (IncHI-2) и получившей название pMG101, было установлено, что она имеет размер около 180 т. п. о. и содержит область, определяющую резистентность к действию Ag^+ , сокращенно – *sil*. Она включает в себя 9 открытых рамок считывания (*silE*, *silS*, *silR*, *silC*, *silF*, *silB*, *silA*, *silG*, *silP*), находящихся в трех единицах транскрипции *silCFBAGP*, *silRS* и *silE*. Примечательно, что плазида pMG101 до настоящего времени является самой распространенной

(и наиболее изученной) последовательностью, обуславливающей устойчивость бактерий к серебру, и, помимо этого, также обуславливает устойчивость к меди и некоторым другим антибиотикам [51, 84]. Механизмы и молекулярное обоснование путей экспрессии отдельных генов *sil* были впервые обобщены в работах Сильвера [85, 86], а затем дополнены другими авторами.

В первой единице транскрипции *sil*-системы находится ген *silE*, кодирующий небольшой Ag(I)-связывающий периплазматический белок SilE. По своей первичной структуре он на 48% гомологичен периплазматическому медь-связывающему белку PcoE [87] и, потому, так же как и PcoE, — обладает высокой селективностью связывания с моновалентными металлами (Ag^+ и Cu^+). Связывание SilE с ионами Ag^+ происходит за счет содержания в его составе десяти гистидиновых остатков, восемь из которых расположены в виде четырех пар в последовательностях HisX₆His [88]. Методом обратного титрования совместно со спектроскопией кругового дихроизма (КД) было показано, что оптимальное количество ионов Ag^+ , связанных с одной молекулой — 6. Однако другим методом — масс-спектрометрией с ионизацией методом электроспрея (ESI-MS), показано, что широко распространены также комплексы, содержащие 5 и 7 ионов металла, а максимальное их количество может доходить до 8 [89]. Следует отметить, что SilE является внутренне неупорядоченным белком (IDP) в своей апо-форме, которая приобретает α -спиральную структуру только при связывании с ионами Ag^+ , что также было показано в работе [89] с использованием метода КД-спектроскопии. Таким образом, благодаря способности связывать большое количество ионов Ag^+ за счет образования с ними прочных комплексов, SilE представляет собой первую линию защиты от их токсического действия.

Вторая единица транскрипции *sil*-системы состоит из генов *silRS*, которые кодируют двухкомпонентную систему регулирования экспрессии *silE*. Она гомологична другим подобным двухкомпонентным системам, регулирующим гены, обуславливающие устойчивость бактерий к действию тяжелых металлов [90]. SilRS состоит из SilS-сенсора — мембраносвязанной киназы, меняющей конформацию при взаимодействии с ионами Ag^+ , находящимися в периплазматическом пространстве, и SilR — регулятора ответа, являющимся, собственно, фактором транскрипции гена *silE* [84]. Наиболее вероятно, что SilRSE система развилась из существовавшей ранее гомологичной Pco системы регуляции меди, которая также включает в себя двухкомпонентную систему *pcoRS* регулируемую транскрипцию *pcoE* [91].

Транскрипция генов *silCFBAGP*, находящихся в третьей единице транскрипции *sil*-системы, не зависит от *silRSE*. Гены *silCBA* кодируют HME-RND (heavy metal efflux resistance-nodulation-cell

division) систему эффлюкса ионов серебра, состоящую из трех белков и работающую аналогично другим HME-RND системам эффлюкса ионов металлов [92], обуславливающим эффлюкс ионов одно- и двухвалентных металлов у прокариот [92–95]. Первым компонентом данной системы является белок SilA из суперсемейства RND. Такие белки располагаются на цитоплазматической мембране, отличаются большим размером и обуславливают эффлюкс токсичных ионов из цитоплазмы. Они функционируют по принципу антипорта: катионы металлов перекачиваются из цитоплазматического пространства по ионному каналу расположенному внутри белка, для чего используется энергия протонного градиента получаемая при перекачке в противоположном направлении (в цитоплазматическое пространство) протонов выделенных в периплазму при дыхании. RND-белки состоят из 4 доменов, два из которых являются гидрофильными, а два гидрофобными, при этом гидрофобные домены этих белков пересекают ЦПМ, закрепляя на ней белок, а гидрофильные домены располагаются в периплазме и могут контактировать с другими субъединицами эффлюксного комплекса [92, 96]. Такая структура создает воронку для прохождения субстрата (катиона Ag^+) из цитоплазматического региона ко второму компоненту системы — SilC, фактору внешней мембраны (OMF), обеспечивающего эффлюкс ионов серебра из периплазматического пространства [97]. Третий белок, SilB, принадлежит к классу белков слияния мембран (MFP) [98]. Он закрепляется на внутренней мембране за счет SilA, а также связан с белком SilC на внешней мембране. Такая трехкомпонентная система обеспечивает движение ионов Ag^+ из цитоплазматического пространства сразу за пределы клетки [92, 95] без их выброса в периплазматическое пространство. Принцип действия SilCBA HME-RND системы эффлюкса ионов серебра схематично изображен на рис. 1.

Важной для углубленного понимания роли работы всей Sil-системы, стала работа [99] в которой методом исследования модельных пептидов, представляющих собой структурные мотивы ранее описанного периплазматического белка SilE, были определены константы связывания белка с ионами Ag^+ . Они оказались на 1–2 порядка ниже, чем соответствующие константы связывания Ag^+ с белком SilB, определенные ранее в работе [100]. Исходя из этих данных предполагается следующий механизм действия. Белок SilE в своей голоформе может обладать высоким сродством к другим компонентам Sil-системы, в частности, белкам SilCBA, аналогично другим внутренне неупорядоченным белкам [101]. В свою очередь, различия в константах связывания Ag^+ между SilE и SilB позволяют белку SilE эффективно “выгружать” собранные ранее ионы в эффлюксный транспортер SilCBA, которые затем выводятся им за преде-

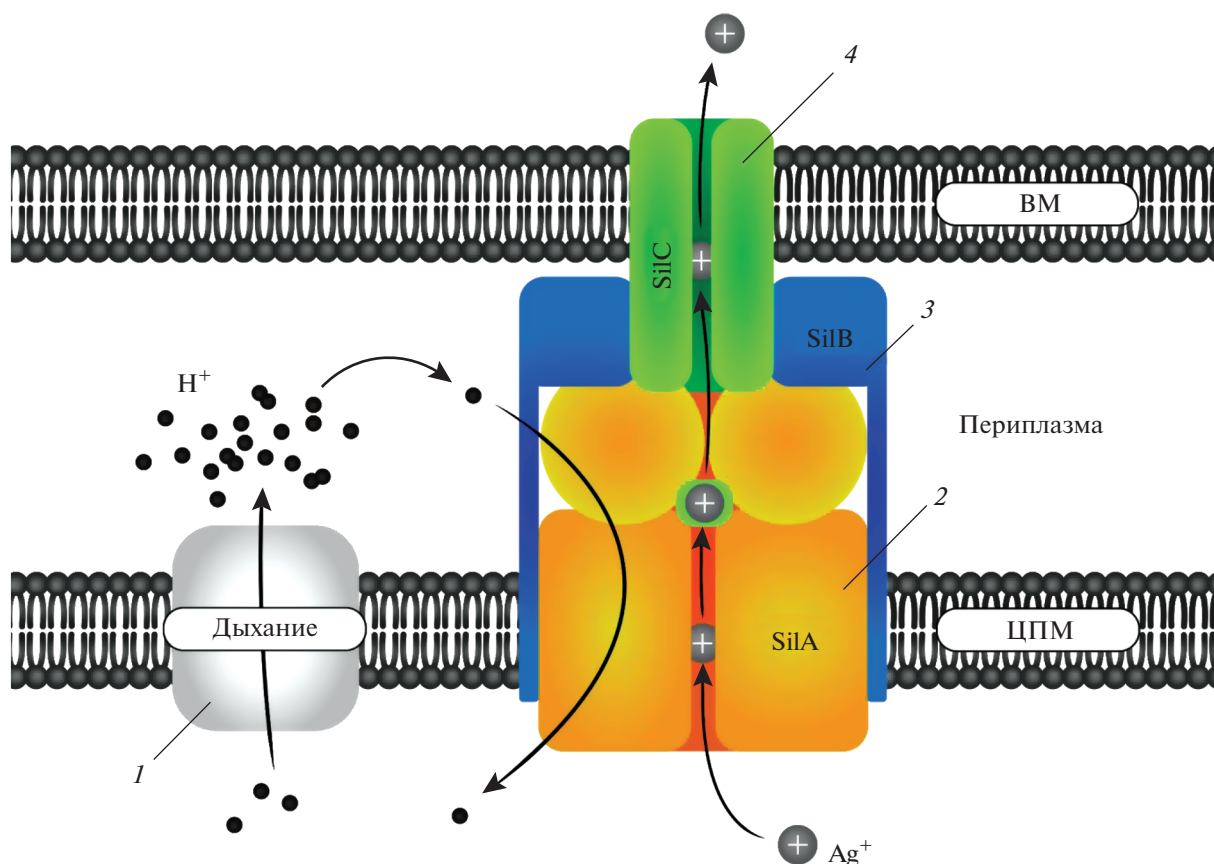


Рис. 1. Схематическое изображение работы системы эффлюкса ионов серебра HME-RND SilCBA: 1 – протонный насос; 2 – RND эффлюксный насос SilA, 3 – белок слияния мембран SilB, 4 – фактор внешней мембраны SilC.

лы бактериальной клетки. Таким образом, SilE представляет собой не только “молекулярную губку” являющуюся первой линией защиты от токсического действия ионов Ag^+ , но и действует как эффективный молекулярный переносчик ионов Ag^+ к SilCBA-эффлюксной системе.

Другим компонентом Sil системы является белок SilP, являющийся мембранной эффлюксной АТФ-азой Р-типа. Данный класс белков представляет собой ионные насосы, расположенные на ЦПМ и обеспечивающие активный эффлюкс катионов металлов из цитоплазматического пространства, с использованием энергии, выделяющейся при гидролизе связанной с белком молекулы АТФ с образованием одного или двух остатков фосфорной кислоты [92]. SilP гомологичен другим эффлюксным АТФ-азам, обуславливающим устойчивость к тяжелым металлам, таким как Cu^+ and Zn^{2+} [102, 103], закодированным в хромосоме *E. coli* [104]. Он обеспечивает перенос катионов серебра из цитоплазмы в периплазматическое пространство, откуда они могут быть выведены за пределы клетки с помощью других компонентов Sil-системы по описанным ранее механизмам.

Что касается оставшихся SilF и SilG-белков, то их роль до конца не изучена. Однако, основываясь на последовательностях аминокислот схожих де-

терминант устойчивости тяжелым металлам (например, систем Pco, Czc, Cus), предполагается, что они, также как и SilE, являются периплазматическими Ag-связывающими белками (шаперонами), сопровождающими ионы серебра, попавшие в периплазматическое пространство из внешней среды или из цитоплазмы за счет действия SilP, к системе SilCBA и, таким образом, способствующими их эффлюксу [85, 105]. Принцип действия плазмидной Sil-системы схематично показан на рис. 2.

Активный эффлюкс ионов серебра у грамотрицательных бактерий также может быть обусловлен генами, находящимися в хромосомной ДНК. Так, в ДНК *Escherichia coli* K12 содержится 6 участков, кодирующих белки близко гомологичные продуктам экспрессии генов *sil*. Эти гены были названы *cus* из-за их роли в гомеостазе меди [92], однако белки данной системы также способны использовать в качестве субстрата и ионы серебра, поскольку ионы Ag^+ и Cu^+ имеют одинаковую электронную конфигурацию d^{10} , одинаковый заряд и схожий ионный радиус [106]. Участие Cus системы в развитии у *E. coli* устойчивости к действию ионов серебра было доказано в работе [107] с помощью протеомных исследований. Методами двумерного электрофореза и масс-спектро-

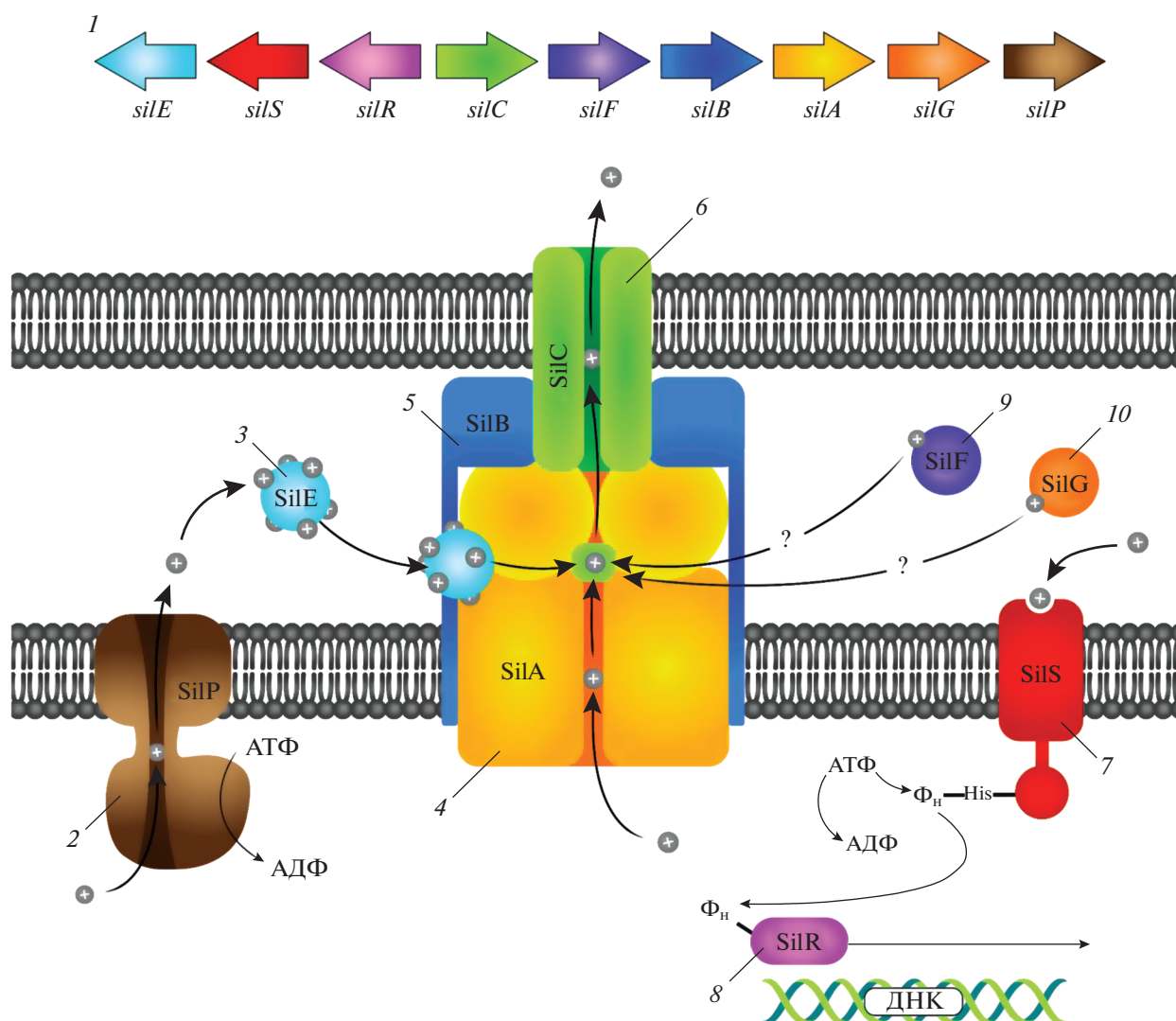


Рис. 2. Схематическое изображение работы плазмидной Sil-системы обуславливающей развитие устойчивости бактерий к действию ионов серебра: 1 – генетическая архитектура *sil*-оперона; 2 – мембранная эффлюксная АТФ-аза SilP; 3 – Ag^+ -связывающий периплазматический белок SilE; 4 – RND эффлюксный насос SilA; 5 – белок слияния мембран SilB; 6 – фактор внешней мембраны SilC; 7 – мембраносвязанная киназа SilS; 8 – регулятора ответа SilR; 9, 10 – SilF и SilG, предположительно: периплазматические Ag^+ -связывающие белки.

метрии показано, что компоненты белковой системы CusCFBA подвергаются сверхэкспрессии у невосприимчивого к действию ионного серебра штамма *E. coli*. Напротив, делеции генов *cus* приводят к увеличению чувствительности бактерий к действию серебра во много раз [84]. Например, делеция *cusF* приводит к уменьшению минимальной ингибирующей концентрации на три порядка (с 1 мМ до 12 мкМ) [107]. Важно отметить, что наличие детерминанты устойчивости Cus не уникально для *E. coli*, она также присутствует в широком ряде других видов патогенных грамотрицательных бактерий [108].

В отличие от *sil* генов, гены *cus* располагаются только в 2 оперонах. В первом находятся гены *cusCFBA*, кодирующие трехкомпонентный эффлюксный насос CusCBA, а также небольшой периплаз-

матический металлсвязывающий белок CusF. Во втором находится двухкомпонентная регуляторная система *cusRS*. Гены *cusCFBA* и *cusRS* транскрибируются разнонаправленно из общей промоторной области, вероятно, с участием σ -фактора (белка, необходимого для инициации транскрипции у бактерий), зависящего от наличия катионов тяжелых металлов [107, 109]. При этом, в *cus*-системе отсутствуют гомологи белков SilP, SilG и SilE.

CusRS является двухкомпонентной системой регуляции трансляции CusCFBA эффлюксного транспортера с положительной обратной связью [110]. Она кодирует сигнальную сенсорную гистидиновую киназу CusS и регулятор транскрипционного ответа CusR. Также *cusRS* может регулировать другие системы участвующие в гомеостазе меди,

такие как *cop* и *psc*, так как они содержат гомологичные ДНК-связывающие мотивы [91, 110, 111].

Аналогично системе SilCBA, CusCBA представляет собой CBA эффлюксную систему, состоящую из трех белков [92, 109]. CusA является связанным с ЦПМ транспортером протонного типа из суперсемейства RND [92, 96], CusB – периплазматический белок слияния мембран [98], а CusC – белок внешней мембраны, через который производится эффлюкс ионов серебра и меди из периплазмы за пределы клетки [97]. CusCBA гомологична системам устойчивости к кадмию, цинку и кобальту (*Czc*) у *Ralstonia* и системе множественной лекарственной устойчивости *Acr* у *E. coli* [92–95].

Между генами *cusC* and *cusB* располагается ген *cusF*, кодирующий периплазматический металлсвязывающий белок CusF. В отличие от SilF, механизмы образования комплексов металлов с CusF и пути их эффлюкса были подробно изучены. В работе [109] показано, что каждая молекула CusF способна связывать один ион металла, а также, что в этот процесс вовлечены остатки метионина (серосодержащая аминокислота в составе белка CusF). Следует отметить, что CusF обладает даже более высоким сродством к Ag, чем к Cu, что было определено методом изотермического калориметрического титрования в работе [106]. Далее, специфически связываясь с CusB и CusC, данный белок позволяет выводить ионы серебра и меди за пределы клетки через эффлюксный насос CusCBA. Более подробно механизмы связывания между компонентами системы CusCFBA, а также молекулярные механизмы эффлюкса были исследованы в работах [112–116] с помощью методов изучения кристаллической структуры этих белков. Принципиальная схема действия хромосомной Cus системы изображена на рис. 3.

Другим способом снижения внутриклеточной концентрации токсичных для бактерий ионов Ag⁺ является модификация клеточной мембраны. В частности, грамотрицательные бактерии в ответ на действие ионов Ag⁺, способны уменьшать количество поринов – малоселективных транспортных белков внешней мембраны грамотрицательных бактерий, способствующих осуществлению пассивного транспорта [117]. Например, *E. coli* K12 обладает как минимум двумя видами поринов – OmpC и OmpF, имеющих размер пор превышающий диаметр ионов серебра [118]. Регулируя экспрессию поринов, бактерии способны снижать или увеличивать проницаемость внешней мембраны и, следовательно, регулировать поступление Ag⁺ в периплазматическое пространство. Так, в работе [117] показано, что отсутствие генов обоих указанных поринов или же гена, регулирующего их транскрипцию, приводит к развитию устойчивого к действию серебра фенотипа у *E. coli*. При этом делеция только одного из указанных генов не приводит к развитию резистентности у бактерии, что косвенно свидетель-

ствует о возможности проникновения Ag⁺ в периплазму через любой из двух белков.

Для некоторых штаммов бактерий встречаются особенные механизмы развития резистентности к действию ионов серебра, связанные, например, с их инактивацией за счет химического восстановления. Так, *Pseudomonas aeruginosa* способны развить устойчивость к действию ионов серебра за счет синтеза пиоцианина [119], способствующего восстановлению серебра ионной формы в нетоксичную металлическую. Пиоцианин – окислительно-восстановительный метаболит, имеющий характерную голубую окраску и использующийся *P. aeruginosa* подавления других бактерий, так как обладает антибиотическими свойствами [120]. Кроме того, пиоцианин является фактором патогенности *P. aeruginosa* для клеток человека за счет его действия на глутатион [121]. В работе [119] показано, что при наличии в среде ионов серебра, именно они, а не молекулярный кислород, выступают в качестве приоритетного конечного электронного акцептора в электронной цепи при окислении восстановленной формы пиоцианина. Таким образом, может происходить восстановление ионов серебра до нетоксичной металлической формы Ag⁰.

Подводя итог, несмотря на наличие большого количества сайтов потенциального связывания ионов серебра с различными биомолекулами, у бактерий существует достаточно эволюционных механизмов для развития устойчивых к действию ионов серебра фенотипов. В табл. 1 представлены МИК нитрата серебра, которые вызывают торможение роста патогенных микроорганизмов, развившим различную степень устойчивости к ионам серебра.

Развитие устойчивости к действию НЧ серебра у бактерий. Впервые о развитии устойчивости бактерий к действию нанодисперсного серебра сообщалось в работе [129], в которой исследовали продолжительное воздействие НЧ оксида серебра (НЧ Ag₂O) диаметром 2 нм, закрепленных на поверхности НЧ диоксида титана, на модельную систему, содержащую *E. coli*. В ходе эксперимента авторы обнаружили в культуральной среде грамположительную бактерию *Bacillus subtilis*, сохраняющую способность к росту в присутствии Ag в форме НЧ Ag₂O в концентрациях вплоть до 7 мкг/мл, в то время как штамм *E. coli* терял эту способность в присутствии уже 3 мкг/мл Ag₂O. Кроме того, максимальная концентрация НЧ Ag₂O, при которой сохранялся рост *B. subtilis*, возрастала до 10 мкг/мл при предварительном воздействии на бактерии НЧ серебра в металлической или оксидной форме в сублетальных концентрациях в течение 13 дней, что может свидетельствовать о появлении устойчивых мутантов. В другой работе [130] сообщается о развитии устойчивости к действию НЧ Ag₂O, закрепленным на TiO₂, у *S. aureus* – грамположительной бактерии, некоторые штаммы которой

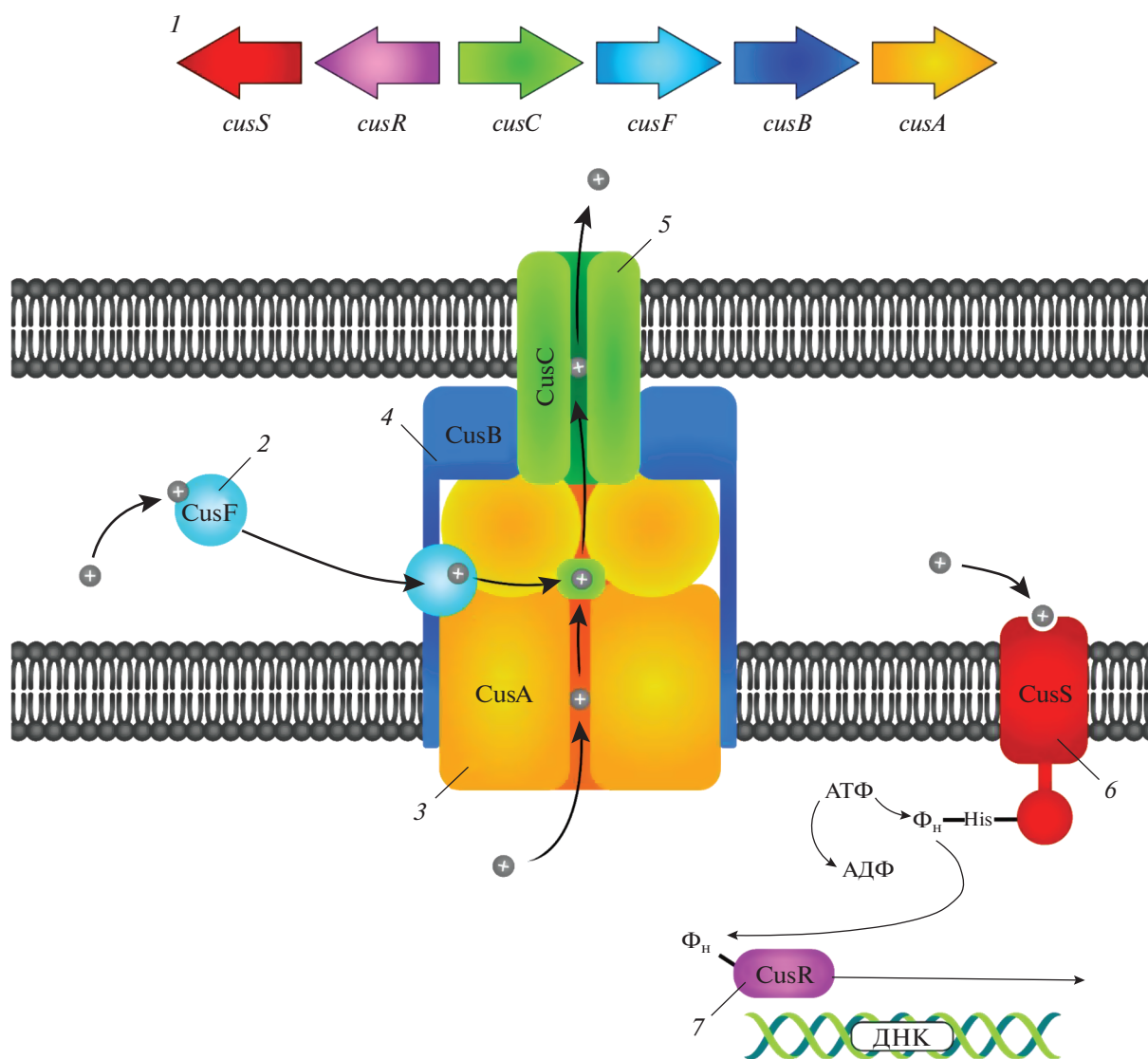


Рис. 3. Схематическое изображение работы хромосомной Cus-системы обуславливающей развитие устойчивости бактерий к действию ионов серебра: 1 – генетическая архитектура *cus*-оперона; 2 – Ag^+ -связывающий периплазматический белок CusF; 3 – RND эффлюксный насос CusA; 4 – белок слияния мембран CusB; 5 – фактор внешней мембраны CusC; 6 – мембраносвязанная киназа CusS; 7 – регулятора ответа CusR.

широко известны своей устойчивостью к действию большинства антибиотиков, в том числе к метициллину и ванкомицину (MRSA и VRSA соответственно), и являющейся одним из возбудителей нозокомиальных инфекций [131]. В рамках исследования клетки *S. aureus* подвергались воздействию НЧ Ag_2O в увеличивающихся от 2.5 до 11 мкг/мл концентрациях в течение 50 дней, что привело к росту минимальной ингибирующей концентрации НЧ Ag_2O в 5–7 раз до 15–20 мкг/мл. Методом секвенирования генома *S. aureus* было показано, что выработанная резистентность обусловлена появлением двух мутаций в ДНК бактерии. Первая из них произошла в гене *purR*, кодирующем ДНК-связывающий белок (репрессор), регулирующий биосинтез пурина. Предположительно, данная мутация снижает связывающую способ-

ность PurR, что приводит к увеличению синтеза пуриновых нуклеотидов [132], играющих важную роль в репликации и репарации ДНК, а также синтезе аминокислот [133]. Вторая мутация была обусловлена делецией одного нуклеотида в гене *tsuA*, кодирующем L-цистин-связывающий белок (TsuA), являющийся импортером цистина для его последующего восстановления до аминокислоты цистеина. Помимо прочего, цистеин способен восстанавливать ионы трехвалентного железа (Fe^{3+}) до двухвалентного (Fe^{2+}), которые в свою очередь вступают в реакцию Фентона с содержащимся в бактериальной клетке пероксидом водорода (H_2O_2), высвобождая высокореактивные гидроксильные радикалы ($\cdot\text{OH}$) [134]. Таким образом, обнаруженные мутации способны снизить антибактериальный эффект наночастиц

Таблица 1. МИК AgNO₃ по отношению к различным изолятам патогенов, обладающих устойчивостью к действию ионов серебра

Патоген, вид	Штамм	МИК AgNO ₃ (µg/mL)	Источник выделения	Ссылка
Грамотрицательные бактерии				
<i>Acinetobacter baumannii</i>	BL88	108	Окружающая среда	[122]
	–	≥512	Клинический изолят из ожоговых ран	[123]
<i>Citrobacter freundii</i>	–	27.2	Клинический изолят	[124]
<i>Enterobacter cloacae</i>	S4279/06 и S0707396	>512	Клинический изолят из хронических язв на ногах, подвергшийся воздействию AgNO ₃	[125]
	–	≥512	Клинический изолят из ожоговых ран	[123]
	–	540	Клинический изолят из ожоговых ран, подвергавшихся лечению сульфадиазином серебра	[126]
	–	595	Клинический изолят	[124]
<i>Escherichia coli</i>	J53	>256	Селекция в результате воздействия AgNO ₃ в субингибирующих концентрациях	[105]
	S0506373	>512	Клинический изолят из хронических язв на ногах, подвергшийся воздействию AgNO ₃	[125]
	–	≥512	Клинический изолят из ожоговых ран	[123]
	–	>512	Клинический изолят из людей и птиц	[127]
	–	>540	Клинический изолят из ожоговых ран, подвергавшихся лечению сульфадиазином серебра	[126]
	116, 496, B1	>1024	Селекция, в результате воздействия на устойчивые клинические штаммы нитрата или сульфадиазина серебра в ступенчато возрастающих концентрациях	[117]
<i>Klebsiella aerogenes</i>	–	32.4	Клинический изолят	[124]
	–	>64	Клинический изолят из крови пациентов	[128]
<i>Klebsiella oxytoca</i>	–	32.4	Клинический изолят	[124]
	–	>64	Клинический изолят из крови пациентов	[128]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	≥512	Клинический изолят из ожоговых ран	[123]
	CCUG 54718	>512	Клинический изолят из хронических язв на ногах, подвергшийся воздействию AgNO ₃ .	[125]
	–	540	Клинический изолят из ожоговых ран, подвергавшихся лечению сульфадиазином серебра	[126]
	–	594	Клинический изолят	[125]
<i>Pantoea agglomerans</i>	–	<64	Клинический изолят из крови пациентов	[128]
<i>Proteus mirabilis</i>	–	<27	Клинический изолят из ожоговых ран, подвергавшихся лечению сульфадиазином серебра	[126]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	27.2	Клинический изолят	[124]
	–	≥512	Клинический изолят из ожоговых ран	[123]
<i>Salmonella typhimurium</i>	pMG101	1080	Клинический изолят из ожоговых ран, вызвавший гибель трех человек	[51]
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	–	32.4	Клинический изолят	[124]

Таблица 1. Окончание

Патоген, вид	Штамм	МИК AgNO ₃ (µg/mL)	Источник выделения	Ссылка
Грамположительные бактерии				
<i>Enterococcus species</i>	—	32.4	Клинический изолят	[124]
	—	3.24	Клинический изолят	[124]
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	16–32	Клинический изолят из хронических язв на ногах, подвергшийся воздействию AgNO ₃	[125]
	—	≥512	Клинический изолят из ожоговых ран	[123]

Ag₂O за счет более активного синтеза белков, подвергающихся его негативному воздействию и снижения индуцированного окислительного стресса. Авторы работы также отмечают, что за аналогичный период времени предварительного воздействия ципрофлоксацина (антибиотика из группы фторхинолонов) в увеличивающихся сублетальных концентрациях, его минимальная ингибирующая рост *S. aureus* концентрация возросла значительно сильнее — более чем в 64 раза. Это может говорить о том, что развитие устойчивости бактерий к действию наносеребра происходит не так активно как к действию некоторых традиционных антибиотиков.

Что касается НЧ металлического серебра, то развитие устойчивости у бактерий к его воздействию также может быть обусловлено появлением мутаций. Доказательством этого факта может служить работа [135], в которой изучалось продолжительное воздействие НЧ серебра (размером ~10 нм и стабилизированных цитратом) на *E. coli* K-12 MG1655 — граммотрицательную бактерию, не имеющую плазмидных элементов устойчивости к серебру *Sil*, но имеющую *Cus* оперон в хромосомной ДНК (см. выше). В результате воздействия наносеребра в увеличивающихся от 50 до 125 мкг/л концентрациях в течение времени, необходимого для смены 225 поколений бактерий, минимальная ингибирующая рост *E. coli* концентрация НЧ серебра увеличилась в три раза (с 250 до 750 мкг/л Ag), что говорит о развитии резистентности.

В результате полного секвенирования ДНК исследованных *E. coli*, подвергшихся воздействию НЧ серебра, были обнаружены три точечные мутации в генах *cusS*, *purL* и *rpoB*. PurL — фермент фосфорибозил-формилглицинамид синтаза, играющий важную роль в биосинтезе пуриновых нуклеотидов [132]. RpoB — бета-субъединица РНК-полимеразы, адаптивные мутации в которой часто обнаруживаются в экспериментах по эволюции *E. coli*, поскольку изменение ее активности оказывает большое влияние на паттерны экспрессии большого количества генов [136, 137]. CusS — сигнальная сенсорная гистидиновая киназа, регулирующая транскрипцию CusCFBA эффлюксного транспортера ионов серебра. Кроме

того, было обнаружено 3 различные мутации в гене *ompR*, кодирующем ДНК-связывающий белок OmpR, регулирующий экспрессию поринов OmpC и OmpF. Авторы работы [135] также отмечают развитие у *E. coli* кросс-устойчивости к действию, как ионов, так и НЧ серебра, что представляется закономерным, учитывая упомянутые ранее механизмы бактерицидного действия наносеребра, связанные с действием Ag⁺, и роль мутировавших Cus и Omp систем при адаптации бактерий к воздействию ионов серебра.

Однако, помимо воздействия токсичных ионов Ag⁺, НЧ серебра за счет малого размера (менее 100 нм), высокого химического сродства к белковым компонентам мембраны, а также электростатического притяжения НЧ способны связываться с клеточной стенкой, вызывая нарушения ее структуры [55]. Одним из механизмов противодействия бактерий указанному свойству может стать выделение во внешнюю среду химических соединений различной природы, вызывающих агрегацию НЧ, и приводящих к потере их дисперсности и, следовательно, способности эффективно связываться с бактериальной мембраной. Так, в работе [138] с помощью метода динамического светорассеяния (ДРС) было показано, что развившаяся повышенная устойчивость *E. coli* K-12 MG1655 к действию НЧ серебра (диаметром 27 нм, стабилизированных метилполиэтиленгликольтиоловым эфиром) обусловлена не только мутациями (в частности, как и в предыдущей рассматриваемой работе, в гене *cusS*), но и увеличением гидродинамического диаметра НЧ с 60 до 110–160 нм. Однако авторы данной работы отмечают, что развитие устойчивости к действию наносеребра у *E. coli* происходит значительно медленнее по сравнению с традиционными антибиотиками, такими как гентамицин, ампициллин, тетрациклин и хлорамфеникол [139, 140], что согласуется с результатами, полученными в работе [130]. Близкие результаты были получены в работе [141], в которой исследовалась возможность развития устойчивости к действию НЧ серебра (6.2 нм, стабилизатор цитрат) у трех видов бактерий: *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*. Было обнаружено, что *P. aeruginosa* способны развить устойчи-

вость в результате воздействия наносеребра в последовательно увеличивающихся сублетальных концентрациях. При этом, как и в работе [138], появление резистентности сопровождалось увеличением гидродинамического диаметра НЧ и снижением (по модулю) их ζ -потенциала с -30 до -13 мВ. При этом другие исследованные штаммы бактерий оказались неспособны развить устойчивость к действию НЧ серебра, а появившаяся у *P. aeruginosa* устойчивость не влияла на их устойчивость к бактерицидному действию AgNO_3 . Это указывает на то, что развивавшаяся у *P. aeruginosa* резистентность к действию НЧ сопровождалась агрегацией НЧ во внеклеточной среде, а не развилась по механизму устойчивости клеток к воздействию ионов, выделяющихся при окислении НЧ и штамм-специфичности возможности развития такой резистентности. Причина специфического развития устойчивости к действию наносеребра у некоторых видов бактерий кроется в их способности выделять во внешнюю среду веществ, способствующих агрегации НЧ. Так, в работе [142] было показано, что развитие устойчивости к действию НЧ серебра (диаметр 28 нм, стабилизированы мальтозой) у *P. aeruginosa* и *E. coli*, вызванное агрегацией НЧ, сопровождается увеличением концентрации в питательной среде флагеллина — белка, формирующего внеклеточные филаменты жгутиков, которые обеспечивают подвижность бактерий [143, 144]. При этом резистентность к действию НЧ развивалась без каких-либо нуклеотидных изменений в ДНК, в том числе, в генах связанных с синтезом флагеллина.

Возможные пути преодоления устойчивости бактерий к НЧ серебра Одним из возможных способов преодоления резистентности бактерий к действию НЧ серебра может стать их совместное использование с веществами, ингибирующими синтез белков, вызывающих агрегацию НЧ. Так, в работе [142] показано, что развившуюся устойчивость возможно устранить, вводя в питательную среду экстракт кожуры граната, подавляющий синтез флагеллина [145]. Однако в обсуждаемой ранее работе [138] было показано, что агрегация НЧ происходит даже при отсутствии у *E. coli* гена *flhD*, активирующего оперон *flhDC*, ответственный за продуцирование флагеллина [146, 147]. Это указывает на существование и других белков, способных вызывать агрегацию НЧ, что существенно ограничивает возможность преодоления устойчивости методом ингибирования их биосинтеза.

Другим способом повышения коллоидной стабильности НЧ серебра и, следовательно, снижения риска развития устойчивости к их действию, может стать целенаправленное использование стабилизаторов НЧ определенных химических классов. Такие стабилизаторы могут во-первых, существенно увеличивать коллоидную стабильность препаратов наносеребра и их устойчивость к действию дестабилизирующих агентов [148], во-вторых, обладать собственной активностью в отношении

бактерий, например, по механизму разрыхления клеточной стенки или снижения внешнего мембранного потенциала [27, 149, 150], и, в-третьих, усиливать биологическое действие ионов и частиц серебра путем влияния на их ζ -потенциал и увеличивая сродство НЧ к клеточной стенке бактерии [81, 148]. Действительно, все стабилизаторы (среди которых могут быть использованы биологически активные катионные ПАВ, катионные полимеры, амфотерные и неионогенные ПАВ) с одной стороны снижают свободную энергию на поверхности раздела НЧ с дисперсионной средой, а с другой, создают на поверхности частиц электростатический заряд, препятствующий их агрегации, что в результате приводит к увеличению коллоидной устойчивости стабилизированных НЧ. В работе [148] было показано, что биологическая активность НЧ серебра коррелирует с их способностью сохранять коллоидную стабильность в растворах электролитов, а наиболее эффективными в этом отношении являются амфотерные ПАВ, содержащие в своем составе головные карбоксильные группы. При этом, ни в одной из опубликованных работ в настоящее время не был исследован вопрос развития у бактерий устойчивости к действию НЧ серебра, в качестве стабилизатора в которых использовались биологически активные ПАВ.

Снижения риска развития МЛУ у бактерий также возможно добиться, прибегая к комбинированию в терапевтических схемах двух или более активных веществ. Так, в работе [151] в результате исследований препарата на основе гибридных НЧ серебра и нитрида бора, допированных гентамицином, было обнаружено, что они обладают выраженным антибактериальным эффектом, в том числе, в отношении бактерий, обладающих лекарственной устойчивостью к действию гентамицина и других антибиотиков. Кроме того, в ряде работ было показано, что НЧ серебра демонстрируют синергетический эффект при совместном применении с традиционными антибиотиками [152–156], что свидетельствует о перспективности использования такой стратегии для расширения спектра антибактериального действия НЧ серебра в отношении патогенов и преодоления МЛУ.

* *

Несмотря на широкий набор биологических мишеней в бактериальной клетке, которые потенциально могут подвергаться действию НЧ серебра, у бактерий существует возможность выработки механизмов адаптации, при реализации которых активация существующих генов может привести к развитию устойчивых фенотипов. Действительно, бактериальные клетки способны как противостоять воздействию токсичных ионов серебра за счет их активного эффлюкса, связывания и восстановления ионов до металлической формы, так и вызывать внеклеточную агрега-

цию НЧ, выделяя во внешнюю среду некоторые белки, например, флагеллин. В совокупности, это может привести к резкому снижению антибактериальной активности НЧАг.

Тем не менее, основываясь на опубликованных экспериментальных данных, можно сделать вывод о том, что развитие МЛУ к действию НЧ серебра пока возможно лишь у ограниченного круга бактериальных штаммов и формируется значительно дольше, по сравнению со временем возникновения этого свойства при действии традиционных антибиотиков. Кроме того, биологическая активность наносеребра в значительной степени является следствием набора физико-химических параметров частиц, особенно таких, как их коллоидная стабильность, восстановительный потенциал по отношению к кислороду воздуха и ζ -потенциал. Эти параметры, в свою очередь, определяются химической природой используемого стабилизатора и структурой формируемого им поверхностного слоя НЧ.

Перспективным направлением для дальнейших исследований в данной области, на наш взгляд, может стать изучение биологических свойств НЧ серебра, стабилизированных поверхностно-активными веществами или полимерами, обладающими одновременно двумя ключевыми характеристиками, обеспечивающими высокую коллоидную стабильность НЧ, в том числе, в реальных биологических средах, и при этом проявляющими собственную биологическую активность. В этой связи можно предположить, что принципиальная возможность и скорость развития резистентности могут быть существенно снижены за счет модифицирования поверхности НЧ целенаправленно выбранными эффективными стабилизаторами, которые приведут к получению материалов с требуемыми физико-химическими и биологическими характеристиками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Medernach R.L., Logan L.K.* // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2018. V. 32. № 1. P. 1–17.
2. *Goudarzi M., Navidinia M.* // *Arch. Clin. Infect. Dis.* 2019. V. 14. № 2. <https://doi.org/10.5812/archcid.65744>
3. *Battah B.* // *J Infect Dev Ctries.* 2021. V. 15. № 2. P. 179–184.
4. *Stachelek M., Zalewska M., Kawecka-Grochocka E., Sakowski T., Bagnicka E.* // *Annals of Animal Science.* 2021. V. 21. № 1. P. 63–87.
5. *Elshamy A.A., Aboshanab K.M.* // *Future Sci. OA.* 2020. V. 6. № 3. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0098>
6. *Gonzalez-Avila L.U., Loyola-Cruz M.A., Hernández-Cortez C., Bello-López J.M., Castro-Escarpulli G.* // *J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 11. Article № 5974. <https://doi.org/10.3390/ijms22115974>
7. *Durand G.A., Raoult D., Dubourg G.* // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2019. V. 53. № 4. P. 371–382.
8. *Vaithinathan A.G., Vanitha A.* // *Perspect. Public Health.* 2018. V. 138. № 2. P. 87–88. <https://doi.org/10.1177/1757913917743881>
9. *Jacopin E, Lehtinen S, Débarre F, Blanquart F.* // *J. R. Soc. Interface.* 2020 V. 17. Article № 20200105. <https://doi.org/10.1098/rsif.2020.0105>
10. *Xu X.L., Kang X.Q., Qi J., Jin F.Y., Liu D., Du Y.Z.* // *Curr. Pharm. Des.* 2019. V. 25. № 44. P. 4717–4724.
11. *Shkodenko L., Kassirov I., Koshel E.* // *Microorganisms.* 2020. V. 8. № 10. Article № 1545.
12. *Sánchez-López E., Gomes D., Esteruelas G., Bonilla L., Lopez-Machado A.L., Galindo R. et al.* // *Nanomaterials (Basel).* 2020 V. 10. № 2. Article № 292.
13. *Pachaiappan R., Rajendran S., Show P.L., Manavalan K., Naushad M.* // *Chemosphere.* 2021 V. 272. Article № 128607. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128607>
14. *Gharpure S., Ankamwar B.* // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2020. V. 20. № 10. P. 5977–5996.
15. *Russell A.D., Hugo W.B.* // *Prog. Med. Chem.* 1994. V. 31. № 1. P. 351–370.
16. *Klasen H.J.* // *Burns.* 2000. V. 26. № 2. P. 117–130.
17. *Tortella G.R., Pieretti J.C., Rubilar O., Fernández-Baldo M., Benavides-Mendoza A., Diez M.C., Seabra A.B.* // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2021. V. 7. P. 1–19.
18. *Das C., Paul S.S., Saha A., Singh T., Saha A., Im J., Biswas G.* // *Int. J. Nanomedicine.* 2020. V. 15. P. 9301–9315.
19. *Akbarzadeh A., Kafshdooz L., Razban Z., Dastranj Tbr-i zi A., Rasoulpour S., Khalilov R. et al.* // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018. V. 46. № 2. P. 263–267.
20. *Bruna T., Maldonado-Bravo F., Jaran P., Caro N.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 13. Article № 7202.
21. *Crisan C.M., Mocan T., Manolea M., Lasca L.I., Tăbăran F.A., Mocan L.* // *Applied Sciences.* 2021. V. 11. № 3. Article № 1120.
22. *Elmer W., White J.C.* // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2018. V. 25. № 56. P. 111–133.
23. *Malandrakis A.A., Kavroulakis N., Chrysikopoulos C.V.* // *Sci. Total. Environ.* 2020. V. 747. Article № 141287.
24. *Huang W.D., Wang C.J., Duan H.M., Bi Y.L., Wu D.G., Du J.L., Yu H.B.* // *Int. J. Agricult. and Biol.* 2018. V. 20. № 5. P. 1225–1229.
25. *Nafari A., Cheraghipour K., Sepahvand M., Shahrokhi G., Gabal E., Mahmoudvand H.* // *Parasite Epidemiol Control.* 2020. V. 10. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00156>
26. *Sharma G., Kalra S.K., Tejan N., Ghoshal U.* // *Exp. Parasitol.* 2020. V. 218. Article № 108008.
27. *Krutiyakov Yu., Klimov A., Violin B., Kuzmin V., Ryzhikh V., Gusev A., Zakharova O., Lisichkin G.* // *Europ. J. Nanomed.* 2016. V. 8. № 4. P. 185–194.
28. *Ahmed M.K., Zayed M.A., El-Dek S.I., Hady M.A., El Sherbiny D.H., Uskoković V.* // *Bioact. Mater.* 2021. V. 6. № 7. P. 2070–2088. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.12.026>
29. *Mishra M., Kumar H., Tripathi K.* // *Digest J. Nanomaterials and Biostructures.* 2008. V. 3. № 2. P. 49–54.
30. *Nadworny P.L., Wang J.F., Tredget E.E., Burrell R.E.* // *J. Inflamm.* 2010. V. 7. Article № 13. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-13>

31. Boucher W., Stern J.M., Kotsinyan V., Kempuraj D., Papaliadis D., Cohen M.S., Theoharides T.C. // *J. Urology*. 2008. V. 179. № 4. P. 1598–1602. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.11.037>
32. Yin I.X., Zhang J., Zhao I.S., Mei M.L., Li Q., Chu C.H. // *Int. J. Nanomedicine*. 2020. V. 15. P. 2555–2562.
33. Симонов П.Г., Ашенбрэннер А.И., Виолин Б.В., Федотов С.В., Малышев А.А., Крутяков Ю.А. // *Ветеринария*. 2015. № 10. С. 42–45.
34. Коробкова Е.А., Кузьмин В.А., Лунегов А.М., Савенков К.С., Виолин Б.В., Загоруйко Е.Н., и др. // *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2015. № 3. С. 153–156.
35. Симонов П.Г., Ашенбрэннер А.И., Хаперский Ю.А., Виолин Б.В., Крутяков Ю.А. // *Аграрная наука*. 2016. № 6. С. 17–21.
36. Kalmantaeva O.V., Firstova V.V., Grishchenko N.S., Rudnitskaya T.I., Potapov V.D., Ignatov S.G. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020. V. 56. № 2. P. 226–232.
37. Ponomarev V.A., Shvindina N.V., Permyakova E.S., Slukin P.V., Ignatov S.G., Sirota B., Voevodin A.A., Shtansky D.V. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019. V. 173. P. 719–724.
38. Permyakova E.S., Manakhov A.M., Kiryukhantsev-Korneev P.V., Sheveyko A.N., Gudz K.Y., Kovalskii A.M. et al. // *Applied Surface Science*. 2021. V. 556. Article № 149751.
39. Zhao L., Lu L., Wang A., Zhang H., Huang M., Wu H., Xing B., Wang Z., Ji R. // *J. Agric. Food Chem.* 2020. V. 68. № 7. P. 1935–1947.
40. Kutuzova I.A., Kokaeva L.Y., Pobendinskaya M.A., Krutyakov Y.A., Skolotneva E.S., Chudinova E.M., Elansky S.N. // *J. Plant. Path.* 2017. V. 99. № 3. P. 635–642.
41. Gusev A.A., Kudrinsky A.A., Zakharova O.V., Klimov A.I., Zhrebina P.M., Lisichkin G.V. et al. // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2016. V. 62. P. 152–159.
42. Pulit-Prociak J., Grabowska A., Chwastowski J., Majka T.M., Banach M. // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2019. V. 183. Article № 110416.
43. Deshmukh S.P., Patil S.M., Mullani S.B., Delekar S.D. // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2019. V. 97. P. 954–965.
44. He Y., Li H., Fei X., Peng L. // *Carbohydr. Polym.* 2021. V. 252. Article № 117156.
45. Edwards-Jones V. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2009. V. 49. № 2. P. 147–152.
46. Qumar U., Hassan J., Naz S., Haider A., Raza A., Ul-Hamid A., Haider J., Shahzadi I., Ahmad I., Ikram M. // *Nanotechnology*. 2021. V. 32. № 25. Article № 255704.
47. Gangadharan D., Harshvardan K., Gnanasekar G., Dixit D., Popat K.M., Anand P.S. // *Water Res.* 2010. V. 44. № 18. P. 5481–5487.
48. Krutyakov Y.A., Zhrebina P.M., Kudrinsky A.A., Zubavichus Y.V., Presniakov M.Y., Yaprntsev A.D. et al. // *J. Physics D – Applied Physics*. 2016. V. 49. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/37/375501>
49. Quadros M.E., Marr L.C. // *Environ. Sci. Technol.* 2011. V. 45. № 24. P. 10713–10719.
50. Marambio-Jones C., Hoek E.M.V. // *J. Nanopart.* 2010. V. 12. P. 1531–1551.
51. Mchugh G.L., Moellering R.C., Hopkins C.C., Swartz M.N. // *The Lancet*. 1975. V. 305. № 7901. P. 235–240.
52. McNeilly O., Mann R., Hamidian M., Gunawan C. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. Article № 652863.
53. Niño-Martínez N., Salas Orozco MF, Martínez-Castañón GA, Torres Méndez F, Ruiz F. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 11. <https://doi.org/10.3390/ijms20112808>
54. Dibrov P., Dzioba J., Gosink K.K., Häse C.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 8. P. 2668–2670.
55. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramírez J.T., Yacaman M.J. // *Nanotechnology*. 2005. V. 16. № 10. P. 2346–2353.
56. Yamanaka M., Hara K., Kudo J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. V. 71. № 11. P. 7589–7593.
57. Ivask A., Elbadawy A., Kaweeteerawat C., Boren D., Fischer H., Ji Z., Chang C.H., Liu R., Tolaymat T., Telesca D., Zink J.I., Cohen Y., Holden P.A., Godwin H.A. // *ACS Nano*. 2014. V. 8. № 1. P. 374–386.
58. McQuillan J.S., Infante H.G., Stokes E., Shaw A.M. // *Nanotoxicology*. 2012. V. 6. № 8. P. 857–866.
59. Sadoon A.A., Khadka P., Freeland J., Gundampati R.K., Manso R.H., Ruiz M., Krishnamurthi V.R., Thallapuram S.K., Chen J., Wang Y. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2020. V. 86. № 6. <https://doi.org/10.1128/AEM.02479-19>
60. Khina A.G., Krutyakov Y.A. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. P. 683–693.
61. Masip L., Veeravalli K., Georgiou G. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2006. V. 8. № 5. P. 753–762.
62. Fenoglio I., Corazzari I., Francia C., Bodoardo S., Fubini B. // *Free Radic. Res.* 2008. V. 42. № 8. P. 437–745.
63. Zeiri L., Bronk B.V., Shabtai Y., Eichler J., Efrima S. // *Appl. Spectrosc.* 2004. V. 58 № 1. P. 33–40.
64. Abbaszadegan A., Ghahramani Y., Gholami A., Hemmateenejad B., Dorostkar S., Nabavizadeh M. // *J. Nanomaterials*. 2015. V. 2015. Article № 720654.
65. Liu J., Hurt R.H. // *Environ. Sci. Technol.* 2010. V. 44. № 6. P. 2169–2175.
66. Du J., Hu Z., Dong W., Wang Y., Wu S., Bai Y. // *Microchemical J.* 2019. V. 147. P. 333–338.
67. Matai I., Sachdev A., Dubey P., Kumar S.U., Bhushan B., Gopinath P. // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2014. V. 115. P. 359–367.
68. Smetana A.B., Klabunde K.J., Marchin G.R., Sorensen C.M. // *Langmuir*. 2008. V. 24. № 14. P. 7457–7464.
69. Klimov A.I., Zhrebina P.M., Gusev A.A., Kudrinsky A.A., Krutyakov Y.A. // *IOP Conf. Ser.: Materials Science and Engineering*. 2015 V. 98. № 012034. P. 1–9.
70. Liao S.Y., Read D.C., Pugh W.J., Furr J.R., Russell A.D. // *Lett. Appl. Microbiol.* 1997. V. 25. № 4. P. 279–283.
71. Gordon O., Vig Slenters T., Brunetto P.S., Villaruz A.E., Sturdevant D.E., Otto M., Landmann R., Fromm K.M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. V. 54. № 10. P. 4208–4218.
72. Yudkin J. // *Enzymologia*. 1937. V. 2. P. 161–170.
73. Bertinato J., Cheung L., Hoque R., Plouffe L.J. // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2010. V. 24. № 3. P. 178–184.
74. Silva J.J.R.F.D., Williams R.J.P. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. N.Y.: Oxford University Press, 1991. 561 p.

75. Argüello J.M., Raimunda D., Padilla-Benavides T. // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2013. V. 5. № 3. Article № 73.
76. Arakawa H., Neault J.F., Tajmir-Riahi H.A. // *Biophys J.* 2001. V. 81. № 3. P. 1580–1587.
77. Sies H. // *Exp. Physiol.* 1997. V. 82. № 2. P. 291–295.
78. Cabisco E., Tamarit J., Ros J. // *Int. Microbiol.* 2000 V. 3. № 1. P. 3–8.
79. Morones-Ramirez J.R., Winkler J.A., Spina C.S., Collins J.J. // *Sci. Transl. Med.* 2013. V. 5. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006276>
80. Liu J., Sonshine D.A., Shervani S., Hurt R.H. // *ACS Nano.* 2010. V. 4. № 11. P. 6903–6913.
81. Krutyakov Y., Kudrinskiy A., Zherebin P., Lisichkin G. // *J. Nanopart. Res.* 2019. V. 21. № 69. <https://doi.org/10.1007/s11051-019-4495-4>
82. Reygaert W.C. // *AIMS Microbiol.* 2018. V. 4. № 3. P. 482–501.
83. Munita J.M., Arias C.A. // 2016. V. 4 № 2. Article № 10.1128.
84. Gupta A., Phung L.T., Taylor D.E., Silver S. // *Microbiology.* 2001. V. 147. № 12. P. 3393–402.
85. Silver S. // *FEMS Microbiol Rev.* 2003. V. 27. № 2–3. P. 341–353.
86. Silver S., Phung le T., Silver G. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 33. № 7. P. 627–634.
87. Zimmermann M., Udagedara S.R., Sze C.M., Ryan T.M., Howlett G.J., Xiao Z., Wedd A.G. // *J. Inorg. Biochem.* 2012. V. 115. P. 186–197.
88. Mirolo L., Schmidt T., Eckhardt S., Meuwly M., Fromm K.M. // *Chemistry.* 2013. V. 19. № 5. P. 1754–1761.
89. Asiani K.R., Williams H., Bird L., Jenner M., Searle M.S., Hobman J.L., Scott D.J., Soutianas P. // *Mol. Microbiol.* 2016. V. 101. № 5. P. 731–742.
90. Nies D.H., Silver S. // *J. Ind. Microbiol.* 1995. V. 14. № 2. P. 186–199.
91. Brown N.L., Barrett S.R., Camakaris J., Lee B.T., Rouch D.A. // *Mol. Microbiol.* 1995. V. 17. № 6. P. 1153–1166.
92. Nies D.H. // *Microbiol. Rev.* 2003. V. 27. № 2–3. P. 313–339.
93. Nies D.H., Nies A., Chu L., Silver S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 19. P. 7351–7355.
94. Nies D.H. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. № 10. P. 2707–2712.
95. Murakami S., Nakashima R., Yamashita E., Yamaguchi A. // *Nature.* 2002. V. 419. № 6907. P. 587–593.
96. Tseng T.T., Gratwick K.S., Kollman J., Park D., Nies D.H., Goffeau A., Saier M.H. Jr. // *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1999. V. 1. № 1. P. 107–125.
97. Paulsen I.T., Park J.H., Choi P.S., Saier M.H. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1997. V. 156. № 1. P. 1–8.
98. Saier M.H. Jr., Tam R., Reizer A., Reizer J. // *Mol. Microbiol.* 1994. V. 11. № 5. P. 841–847.
99. Chabert V., Hologne M., Sénèque O., Crochet A., Walker O. // *Chem. Commun. (Camb).* 2017. V. 53 № 45. P. 6105–6108.
100. Urbina P., Bersch B., De Angelis F., Derfoufi K.M., Prévost M., Goormaghtigh E., Vandebussche G. // *Biochemistry.* 2016. V. 55 № 20. P. 2883–2897.
101. Kosol S., Contreras-Martos S., Cedeño C., Tompa P. // *Molecules.* 2013. V. 18. № 9. P. 10802–10828.
102. Rensing C., Grass G. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. V. 27. № 2–3. P. 197–213.
103. Blencowe D.K., Morby A.P. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. V. 27. № 2–3. P. 291–311.
104. Rensing C., Fan B., Sharma R., Mitra B., Rosen B.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 2. P. 652–656.
105. Randall C.P., Gupta A., Jackson N., Busse D., O'Neill A.J. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2015. V. 70. № 4. P. 1037–46.
106. Kittleson J.T., Loftin I.R., Hausrath A.C., Engelhardt K.P., Rensing C., McEvoy M.M. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 37. P. 11096–11102.
107. Lok C.N., Ho C.M., Chen R., Tam P.K., Chiu J.F., Che C.M. // *J. Proteome. Res.* 2008. V. 7. № 6. P. 2351–2356.
108. Staehlin B.M., Gibbons J.G., Rokas A., O'Halloran T.V., Slot J.C. // *Genome Biol. Evol.* 2016. V. 8. № 3. P. 811–826.
109. Franke S., Grass G., Rensing C., Nies D.H. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. № 13. P. 3804–3812.
110. Munson G.P., Lam D.L., Outten F.W., O'Halloran T.V. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 82. № 20. P. 5864–5871.
111. Mills S.D., Lim C.K., Cooksey D.A. // *Mol. Gen. Genet.* 1994. V. 244. № 4. P. 341–351.
112. Xue Y., Davis A.V., Balakrishnan G., Stasser J.P., Staehlin B.M., Focia P., Spiro T.G., Penner-Hahn J.E., O'Halloran T.V. // *Nat. Chem. Biol.* 2008. V. 4. № 2. P. 107–109.
113. Kulathila R., Indic M., van den Berg B. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 1. Article № e15610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015610>
114. Su C.C., Long F., Zimmermann M.T., Rajashankar K.R., Jernigan R.L., Yu E.W. // *Nature.* 2011. V. 470. № 7335. P. 558–562.
115. Bagai I., Rensing C., Blackburn N.J. // *Biochemistry.* 2008. V. 47. P. 11408–11414.
116. Mealman T.D., Bagai I., Singh P., Goodlett D.R., Rensing C., Zhou H., Wysocki V.H., McEvoy M.M. // *Biochemistry.* 2011. V. 50. № 13. P. 2559–2566.
117. Li X.Z., Nikaido H., Williams K.E. // *J. Bacteriol.* 1997. V. 179. P. 6127–6132.
118. Nikaido H. // *J. Bacteriol.* 1999. V. 181. № 1. P. 4–8.
119. Muller M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018. V. 62. № 8. Article № e00672–18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00672-18>
120. Hassan H.M., Fridovich I. // *J. Bacteriol.* 1980. V. 141. № 1. P. 156–163.
121. Muller M. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 33. № 11. P. 1527–1533.
122. Deshpande L.M., Chopade B.A. // *Biometals.* 1994. V. 7. № 1. P. 49–56.
123. Hosny A.E.M., Rasmy S.A., Aboul-Magd D.S., Kashef M.T., El-Bazza Z.E. // *Infect. Drug Resist.* 2019. V. 12. P. 1985–2001.
124. Finley P.J., Norton R., Austin C., Mitchell A., Zank S., Durham P. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. № 8. P. 4734–4741.
125. Sütterlin S., Tano E., Bergsten A., Tallberg A.B., Melhus A. // *Acta. Derm. Venereol.* 2012. V. 92. № 1. P. 34–39.
126. Hendry A.T., Stewart I.O. // *J. Microbiol.* 1979. V. 25. № 8. P. 915–921.

127. Sütterlin S., Edquist P., Sandegren L., Adler M., Tängdén T., Drobní M., Olsen B., Melhus A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2014. V. 80. № 22. P. 6863–9.
128. Sütterlin S., Dahlö M., Tellgren-Roth C., Schaal W., Melhus A. // *J. Hosp. Infect.* 2017. V. 96. № 3. P. 256–261.
129. Gunawan C., Teoh W.Y., Marquis C.P., Amal R. // *Small.* 2013. V. 9. № 21. P. 3554–3560.
130. Valentin E., Bottomley A.L., Chilambi G.S., Harry E.J., Amal R., Sotiriou G.A., Rice S.A., Gunawan C. // *Nanoscale.* 2020. V. 12. № 4. P. 2384–2392.
131. Cong Y., Yang S., Rao X. // *J. Adv. Res.* 2019. V. 21. P. 169–176.
132. Sinha S.C., Krahn J., Shin B.S., Tomchick D.R., Zalkin H., Smith J.L. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. № 14. P. 4087–4098.
133. Gardner S.G., Marshall D.D., Daum R.S., Powers R., Somerville G.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017. V. 62. № 1. Article № e01608–17.
134. Park S., Imlay J.A. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. № 6. P. 1942–1950.
135. Graves J.L. Jr., Tajkarimi M., Cunningham Q., Campbell A., Nonga H., Harrison S.H., Barrick J.E. // *Front. Genet.* 2015. V. 6. 42. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00042>
136. Conrad T.M., Frazier M., Joyce A.R., Cho B.K., Knight E.M., Lewis N.E., Landick R., Palsson B.Ø. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 47. P. 20500–20505.
137. Conrad T.M., Lewis N.E., Palsson B.Ø. // *Mol. Syst. Biol.* 2011. V. 7. № 509. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.42>
138. Stabryla L.M., Johnston K.A., Diemler N.A., Cooper V.S., Millstone J.E., Haig S.J., Gilbertson L.M. // *Nat. Nanotechnol.* 2021. V. 16. № 9. P. 996–1003.
139. Adam M., Murali B., Glenn N.O., Potter S.S. // *BMC Evol. Biol.* 2008. V. 8. № 52. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-52>
140. George A.M., Levy S.B. // *J. Bacteriol.* 1983. V. 155. № 2. P. 531–540.
141. Ellis D.H., Maurer-Gardner E.I., Sulentic C.E.W., Hussain S.M. // *Biomed. Phys. Eng. Express.* 2019. V. 5. № 1. Article № 015013.
142. Panáček A., Kvítek L., Smékalová M., Večeřová R., Kolář M., Röderová M., et al. // *Nat. Nanotechnol.* 2018. V. 13. № 1. P. 65–71.
143. Bardy S.L., Ng S.Y.M., Jarrell K.F. // *Microbiology.* 2003. V. 149. № 2. P. 295–304.
144. Metlina A.L. // *Biochemistry.* 2004. V. 69. № 11. P. 1203–1212.
145. Asadishad B., Hidalgo G., Tufenkji N. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2012. V. 334. № 2. P. 87–94.
146. Gauger E.J., Leatham M.P., Mercado-Lubo R., Laux D.C., Conway T., Cohen P.S. // *Infect. Immun.* 2007. V. 75. № 7. P. 3315–3324.
147. Barker C.S., Prüss B.M., Matsumura P. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 22. P. 7529–7537.
148. Kudrinskiy A., Zherebin P., Gusev A., Shapoval O., Pyee J., Lisichkin G., Krutyakov Y. // *Nanomaterials (Basel).* 2020. V. 10. № 8. Article № 1459.
149. Kaur A., Preet S., Kumar V., Kumar R. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2019. V. 176. P. 62–69.
150. Krutyakov Y.A., Kudrinsky A.A., Gusev A.A., Zakharova O.V., Klimov A.I., Yapyrnisev A.D., Zherebin P.M., Shapoval O.A., Lisichkin G.V. // *Materials Research Express.* 2017. V. 4. № 7. P. 1–16.
151. Gudž K.Y., Antipina L.Yu., Permyakova E.S. et al. // *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2021. V. 13. № 20. P. 23452–23468.
152. Mazur P., Skiba-Kurek I., Mrowiec P., Karczewska E., Drożdż R. // *Int. J. Nanomedicine.* 2020. V. 15. P. 3551–3562.
153. Surwade P., Ghildyal C., Weikel C., Luxton T., Pelouquin D., Fan X., Shah V. // *J. Antibiot. (Tokyo).* 2019. V. 72. № 1. P. 50–53.
154. Awad M., Yosri M., Abdel-Aziz M.M., Younis A.M., Sidkey N.M. // *Biol. Trace Elem. Res.* 2021. V. 199. № 11. P. 4225–4236.
155. Yu. H., Sun H., Yin C., Lin Z. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2019. V. 181. P. 43–48.
156. Volova T.G., Shumilova A.A., Shidlovskiy I.P., Nikolaeva E.D., Sukovaty A.G., Vasiliev A.D., Shishatskaya E.I. // *Polymer Testing.* 2018. V. 65. P. 54–68.

Bacterial Resistance to Nanosilver: Molecular Mechanisms and Possible Ways to Overcome

Yu. A. Krutyakov^{a, b, *} and A. G. Khina^a

^a Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Moscow, 119991 Russia

^b National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

*e-mail: sir_yurii@mail.ru

The review contains the results of experimental studies of recent years dedicated to the resistance of bacteria to the action of nanosized silver and describes the putative molecular mechanisms of its development. Emphasis is placed on the study of works devoted to investigation of the mechanisms of the resistance of bacteria to silver ions which are the main factor of the bactericidal action of nanoparticles. The review also contains suggestions for further research aimed at development of ways to overcome the problem of resistance of individual bacteria to the action of nanosilver and to prevent its further spread.

Keywords: colloidal silver, silver nanoparticles, silver ions, bacterial resistance, antimicrobial resistance, multidrug resistance, antibacterial effect

УДК 577.21

АНТИГРИБНЫЕ ПОВЕРХНОСТИ (ОБЗОР)

© 2022 г. С. Ю. Филиппович¹, *, Г. П. Бачурина¹¹Институт биохимии им. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: syf55@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.03.2022 г.

После доработки 15.04.2022 г.

Принята к публикации 26.04.2022 г.

В обзоре приводятся данные последних лет о различных типах противогрибковых поверхностей (наноструктурированных, функционализированных, с измененной смачиваемостью), применяемых в медицине, пищевой промышленности и других сферах. Особое внимание уделено функционализации поверхностей такими фунгицидами как амфотерицин В, анидулафунгин, флуконазол, зирам и каспофунгин, а также разработке биоразлагаемых пищевых пленок на основе хитозана, гидроксипропилметилцеллюлозы, альгината и желатина, содержащих нетоксичные противогрибковые соединения.

Ключевые слова: функционализированные поверхности, фунгициды, амфотерицин В, флуконазол, хитозан, альгинат

DOI: 10.31857/S0555109922050075

Как известно, царство грибов представлено эукариотическими организмами, обладающими уникальными свойствами. Согласно последним данным, на Земле существует около 4 млн видов грибов. Большинство видов грибов могут быть патогенами, эндофитами, сапробионтами или эпифитами для широкого круга хозяев как в наземных, так и в водных средах обитания [1]. Повсеместное распространение грибов обусловлено высокими адаптационными способностями к окружающим условиям и возможностью роста и размножения в разнообразных условиях на различных поверхностях. В связи с этим разработка поверхностей, которые уменьшают или предотвращают колонизацию грибов с последующим образованием биопленки может быть полезна во многих областях. Так, в медицинской практике создание разного типа фунгицидных поверхностей предотвращает загрязнение грибами медицинского оборудования, защитной одежды в больницах, хирургических инструментов и имплантатов, причем следует учесть, в последнем случае инфицирование грибами может быть причиной их отторжения [2]. Разработка фунгицидных покрытий стала особенно актуальной в последнее время, так как наблюдается рост заболеваний, вызываемых грибами, при этом отдельной проблемой является распространение резистентных к используемым антигрибным средствам патогенных штаммов грибов. В кораблестроении грибы могут принимать участие в образовании

био пленок на поверхности, индуцируя их образование. В строительстве производство фотоактивного цемента предотвращает образование грибных наростов [3]. Важным направлением в пищевой промышленности является разработка упаковочного материала для предотвращения заражения грибами и увеличения сроков хранения продуктов [4, 5]. Антигрибные покрытия применяются и в быту при кондиционировании воздуха [6].

В настоящее время выделяют 4 больших класса антимикробных поверхностей, различающихся рельефом (“patterned”), химическими свойствами (“functionalized”), комбинацией физических и химических особенностей (супергидрофильные и супергидрофобные) и переключаемой способностью убивать и высвобождать микробы (“умные” поверхности) [7]. Все они, за исключением последнего класса, применяются для борьбы с грибами. Поверхности и реагенты, входящие в их состав, могут обладать как фунгицидным (убивающим клетки), так и фунгистатическим (ингибирующим адгезию, рост и образование репродуктивных структур грибов) действием.

Клетки грибов способны прикрепляться к поверхности за счет сил Ван-дер-Ваальса, гидрофобных и электростатических взаимодействий. В благоприятных условиях грибные споры после прикрепления к поверхности образуют трубку прорастания, затем гифы и формируют биопленку. Через некоторое время такая биопленка становится многослойной и происходит выделение

внеклеточного матрикса (ВМ). ВМ участвует во взаимодействии клеток с поверхностью и между собой, а также в развитии трехмерной структуры биопленок. Он может использоваться в качестве защитного слоя от антимикробных агентов и способен усиливать силы сцепления как в биопленке, так и с поверхностью. Значительная часть патогенных микроорганизмов способна образовывать биопленки, что многократно повышает устойчивость патогенов к лекарственным препаратам по сравнению с планктонными аналогами. Причиной грибных инфекций человека могут быть представители родов *Candida*, *Aspergillus*, *Trichophyton*, *Blastomyces*, *Saccharomyces*, *Histoplasma* и *Cryptococcus* [8].

Одними из преобладающих внутрибольничных грибковых возбудителей являются грибы, принадлежащие к роду *Candida* [9]. Установлено, что целостность биопленки у *Candida albicans* зависит от таких соединений, входящих в состав ВМ, как β -1,3 глюкан, хитин, белок и ДНК [10]. Поверхностный заряд и смачиваемость определяют степень взаимодействия клетки с поверхностью. Клеточный заряд многих грибов зависит от наличия маннопротеинов, обнаруженных на клеточной стенке. Маннопротеины связаны с β -глюканами через фосфатные группы, которые создают отрицательный заряд на поверхности клеточной стенки грибов [11]. Другим фактором, влияющим на прикрепление грибов, таких как *C. albicans*, к поверхности, является гидрофобность клеточной поверхности. Известно, что организмы, клетки которых содержат миколиновую кислоту, более гидрофобны, причем с увеличением длины цепи миколиновой кислоты увеличивается гидрофобность клеток [12].

Нанорельефные поверхности. Нанотопографические особенности некоторых поверхностей у растений, насекомых и амфибий приводят к проявлению у них биоцидных свойств, выявляемых в процессе адгезии микроорганизмов.

Было изучено фунгицидное действие наноструктурированных поверхностей (НСП), полученных из крыльев различных цикад [13]. Определяющими свойствами во взаимодействии *Saccharomyces cerevisiae* с этими покрытиями являются сила адгезии клетка-субстрат и жесткость клеточной стенки дрожжей. Показано, что более сильная адгезия между дрожжами и НСП приводит к разрывам клеток и снижению жизнеспособности. Выявлена взаимосвязь между смертью клеток и геометрией наноструктуры поверхностей.

Американские исследователи [14] использовали биомиметическое (по аналогии с крылом цикады) полимерное нанопиллярное покрытие, полученное методом спин-коатинга с последующей нанопечатной литографией для ингибирования роста грибов *Aspergillus fumigatus* и *Fusarium oxysporum*. Полимером служил полиметилметакрилат.

Споры грибов отделялись от нановыступов через 8 ч у *F. oxysporum* и 16 ч у *A. fumigatus*. Кроме того, по данным сканирующей электронной микроскопии (SEM) многие споры на нанопиллярных поверхностях оказались проколотыми, в то время как споры на плоских поверхностях оставались сферическими и неповрежденными. Авторы провели сравнение воздействия поверхностей с различной нанопиллярной периодичностью — 200, 300 и 500 нм. Покрытия с наибольшей периодичностью обладали максимальным фунгицидным действием.

Функционализированные поверхности. Химически активные функционализированные поверхности обычно содержат поликатионы, обеспечивающие эффективную биоцидную активность через прямой контакт с микроорганизмами. Примером такой поверхности может служить ткань (хлопок, шерсть, полиэстер, нейлон), содержащая ковалентно связанный N-алкилированный 750-кДа полиэтиленимин (PEI), которая в результате такой модификации стала обладать фунгицидными свойствами как против модельного гриба *S. cerevisiae*, так и против патогенного гриба *C. albicans* [15]. Другим примером покрытия на основе PEI может служить антимикробная краска на основе четвертичных солей аммония, которую использовали для защиты поливинилхлорида, нейлона, резины и алюминия [16]. Данная краска обладала высокой растворимостью в различных органических растворителях, включая дихлорметан, хлороформ и смеси хлороформ : диметилсульфоксид (1 : 1). На полученной поверхности было отмечено полное ингибирование роста лекарственно-устойчивых штаммов *Candida* spp. Гош с соавт. [17] разработали катионное полимерное покрытие способное убивать как клетки грибов, так и бактерии, и вирус гриппа. Авторы использовали для синтеза покрытия 2 молекулы — эфир и амид на основе бензофенона, которые могут сшиваться на поверхностях под действием УФ-облучения. После облучения бензофенон может отрывать атом водорода от соседней алифатической группы —C—H— с образованием новой связи C—C. Несмотря на то, что данный способ является простым и одноэтапным, он позволяет получить ковалентное сопряжение с поверхностью. Хлопчатобумажная подложка с этим покрытием эффективна против роста патогенных штаммов *C. albicans* ATCC10231, *C. albicans* AB226 и *C. albicans* AB399 (последние два устойчивы к флуконазолу).

Модификация поверхности необязательно должна быть ковалентно-связанной. Такой является нековалентная иммобилизация водонерастворимых и органорастворимых катионных полимеров на покрытии [18]. Водонерастворимые и органорастворимые производные PEI получали путем метилирования PEI по Эшвайлеру-Кларку и последующей кватернизации N-метило-

вых PEI с алкилбромидами. Была проведена оценка антигрибной активности всех разветвленных и линейных катионных полимеров в отношении патогенных грибов — *Candida* spp. и *Cryptococcus* spp. Поверхности, покрытые этими полимерами, полностью подавляют рост всех протестированных видов грибов, причем линейные полимеры были более активны по сравнению с разветвленными. Полученные катионные гидрофобные полимеры обладали не только фунгистатическим, но и фунгицидным действием. По результатам использования флуоресцентного метода с красителями SYTO 9 и йодидом пропидия авторы заключили, что катионные полимеры взаимодействуют с клеточной мембраной грибов, нарушая ее целостность, что, вероятно, и приводит к гибели клеток. Применение таких покрытий может помочь в уменьшении распространения внебольничных и внутрибольничных инфекций.

Известно, что импрегнирование TiO_2 -пленок ионами цинка и меди способно усилить их противомикробное действие. Ли с соавт. [19] выявили фунгицидные свойства нанокристаллических мезопорowych TiO_2 -пленок модифицированных $[\text{M}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ ($\text{M} = \text{Cu}, \text{Zn}$). Бамбук, покрытый данной пленкой, не поражается *Trichoderma viride* и *Penicillium citrinum* при инкубации в темноте и 85% влажности в течение 4 недель.

Поверхности, полученные с использованием суспензии частиц $\text{Ca}(\text{OH})_2$, смешанной с наночастицами окислов металлов TiO_2 или ZnO , обладают фунгицидными свойствами [20]. Данные поверхности могут применяться для защиты и реставрации памятников из известняка. Они были протестированы в темноте и при имитации естественных фотопериодических циклов против заражения грибами *Penicillium oxalicum* и *Aspergillus niger*. При этом покрытие $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - ZnO было более эффективно как в темноте, так и при освещении, а поверхность $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - TiO_2 действовала лишь при фотоэкспозиции. Методами рентгеновской дифракции и SEM было показано, что распределение минеральных зерен и пористость покрытий сказываются на их противогрибковой активности.

Химическая модификация поверхности может также осуществляться путем включения в нее специфического фунгицида. Одним из наиболее распространенных препаратов такого рода является макролидный полиеновый антибиотик — амфотерицин В (AmB), применяемый для лечения широкого спектра грибковых инфекций. К недостаткам AmB следует отнести его побочные действия на организм человека, прежде всего нефротоксичность, а также низкая водорастворимость. После связывания этого соединения с эргостеролом клеточных мембран грибов происходит их деполяризация, сопровождающаяся увеличением

проницаемости, что приводит к выходу одновалентных ионов и последующей гибели клеток. Вриенс с соавт. [21] исследовали кинетику накопления радикалов супероксида и активных форм азота (АФА) при действии AmB на *S. cerevisiae*. Авторы обнаружили усиление фунгицидного действия AmB за счет ингибирования NO-зависимого пути. Действие ингибитора NO-синтазы, метилового эфира N-нитро-L-аргинина (L-NAME), приводило к увеличению и ускорению индуцированного AmB накопления супероксид-радикалов и снижению пролиферативной способности клеток гриба. Донор NO — S-нитрозоглутатион, оказывал противоположное действие. Это указывает на потенциальную роль образования АФА в обеспечении толерантности к AmB у дрожжей. L-NAME может увеличивать фунгицидный эффект AmB, что может свидетельствовать о действии АФА через эргостерол-зависимый путь.

В результате двухстадийного синтеза, состоящего из включения донора NO, S-нитрозо-N-ацетилпенициллина (SNAP), в полидиметилсилоксан (PDMS) и последующей ковалентной иммобилизации AmB, был образован SNAP-AmB-PDMS полимер [22]. При помощи использования смеси 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида и N-гидроксисукцинимиды удалось иммобилизовать AmB (361.70 ± 12.72 мкг/см²) на PDMS. Изображения SEM подтверждают, что добавление AmB и SNAP существенно не изменяет морфологию поверхности PDMS. Комбинация ингибитора активации тромбоцитов, NO, с иммобилизованным фунгицидом, AmB, привела к созданию поверхности, которая наряду с фунгицидными и бактерицидными свойствами обладала антитромботическим действием, что особенно важно при применении имплантатов. Данный материал был эффективен в отношении гриба *C. albicans* и бактерий *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Известно, что для успешной борьбы с грибами требуются поверхности, выделяющие NO в более высоких концентрациях по сравнению с теми, которые необходимы для подавления бактерий [23, 24]. Синтезированная поверхность обладала стабильным выходом NO, составляющим 0.31 моль · см⁻² · мин⁻¹ к 10 сут инкубации, но при этом не оказывала цитотоксического действия на фибробласты человека [22].

Наноструктурированные покрытия на основе гексагонального нитрида бора (h-BN), содержащие многочисленные нанолиты, насыщенные AmB (100 мкг/см²), оказались эффективны против различных штаммов *Neurospora crassa* — дикого типа wt-987 и мутантов по азотному метаболизму — nit-2 и nit-6 [25].

Родригес и Хенрикс [26] установили, что липосомальная композиция AmB (LAmB) более эффективна для уничтожения биопленок 4 видов

рода *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* и *C. tropicalis*) и менее токсична для млекопитающих по сравнению с дезоксихолатом AmB. Другая группа португальских исследователей [27] получила поверхность, включающую LAmB, используя покрытие, содержащее адгезив, аналогичный адгезиву мидий. Подложкой служил PDMS, покрытый тонкой липкой пленкой полидофамин (PDA) с иммобилизованным LAmB. Разработанный метод нанесения покрытия позволил получить поверхность PDMS-PDA-LAmB, способную предотвращать прикрепление *C. albicans* и убивать клетки грибов без проявления токсичности по отношению к клеткам млекопитающих.

Показано, что AmB может быть ковалентно иммобилизован при помощи аминокислотных групп на поверхности кремниевых наночастиц [28]. Противогрибковая активность конъюгатов наночастиц сохранялась при их иммобилизации на поверхность с использованием адгезива PDA. Полученные конъюгаты обладали большим фунгистатическим и фунгицидным действием по сравнению с наночастицами серебра размером 10 нм против нескольких штаммов *Candida* sp., причем такая поверхность могла использоваться по крайней мере пятикратно без потери активности. Авторы полагают, что противогрибковые наночастицы могут обеспечивать более длительную эффективность AmB.

Салданха с соавт. [29] разработали наноконструкцию, состоящую из AmB, нанесенного на поверхность магнетита, предварительного покрытого двойным слоем лауриновой кислоты. Такой комплекс был эффективен против патогенного гриба *Paracoccidioides brasiliensis* Pb18. AmB, конъюгированный с магнитными наночастицами, не был токсичен по отношению к клеткам мочевыводящих путей человека и обнаруживал низкую цитотоксичность по отношению к перитонеальным макрофагам.

Шу с соавт. [30] изучили свойства AmB-конъюгированных полипептидных гидрогелей для борьбы с грибными инфекциями. Пептидные гидрогели – мягкий наноматериал с уникальными физико-химическими свойствами. Они образуются в результате самосборки аминокислот в водном растворе. Гидрогелаторы связываются друг с другом только через нековалентные взаимодействия. Авторы использовали 3 типа соединений: 2-нафталин уксусную кислоту (Nap), напроксен (Nrx) и дексаметазон (Dex), а также полипептидную последовательность (Phe-Phe-Asp-Lys-Tyr, FFDKY) и синтезировали Nap-FFDK(AmB)Y, Nrx-FFDK(AmB)Y и DexFFDK(AmB)Y гели. С помощью криоэлектронной и сканирующей электронной микроскопии показано, что гидрогели состоят из нановолокон шириной 20–50 нм. Гидрогели Nap-FFDK(AmB)Y и Nrx-FFDK(AmB)Y случайным образом собираются в дендритные кластеры,

в то время как гидрогели DexFFDK(AmB)Y напоминают по виду водные растения или перьевые структуры. Эти морфологические различия гидрогелей указывают на то, что разные головные группы (Nap-, Nrx- и Dex-) на N-концах гидрогелаторов способны влиять на их самосборку. Фунгистатическую и фунгицидную активности AmB, Dex, гидрогелей-носителей и AmB-конъюгированных гидрогелей оценивали по действию на *C. albicans* по величинам минимальной ингибиторной концентрации (MIC) и минимальной биоцидной концентрации (MBC). AmB проявляет противогрибковую активность со значением MIC 0.00406 мг/мл и значением MBC 0.130 мг/мл. Nap-FFDK(AmB)Y, NrxFFDK(AmB)Y и Dex-FFDK(AmB)Y гидрогели характеризуются значениями MIC равными 0.0107, 0.0437 и 0.0401 мг/мл и значениями MBC 0.171, 0.349 и 0.643 мг/мл соответственно. Высвобождение антибиотика *in vitro* предполагает, что гидрогели, конъюгированные с AmB, могут быть использованы в качестве носителей с контролируемым высвобождением противогрибкового агента.

Помимо AmB, функционализация поверхностей может проводиться с применением других фунгицидов – флуконазола или анидулафунгина [31–33]. Для предотвращения протезно-суставных инфекций, вызываемых различными видами рода *Candida*, разработано золь-гелевое покрытие, содержащее фунгициды [31, 32]. Показано, что данный тип органополисилоксановой поверхности, содержащей 3-метакрилоксипропилтриметоксисилан и 2-тетраметилортосиликат с добавлением трис(триметилсилил)фосфита, обладает повышенной адгезией по отношению к металлическим поверхностям и приводит к увеличению пролиферации остеобластов [33]. Известно, что патогены *C. albicans* и *C. parapsilosis* способны образовывать биопленку на поверхности имплантата, вызывая воспаление [31]. Золь-гель покрытие с анидулафунгином обладало большей ингибирующей рост *C. albicans* активностью, тогда как поверхность с флуконазолом более эффективно предотвращала образование биопленки *C. parapsilosis*. Эффективность данного типа золь-геля, нагруженного анидулафунгином, была продемонстрирована *in vivo* для предотвращения протезно-суставных инфекций, вызванных *C. albicans*, с использованием мышинной модели [32]. Освобождение фунгицида из полисилоксановой сетки было пропорционально деградации покрытий, при этом кинетика деградации покрытий с флуконазолом отличалась от таковой с анидулафунгином и зависела от выбранных прекурсоров и их молярного соотношения, а также молекулярной массы и концентрации фунгицида [34].

Еще один фунгицид, используемый для изменения химического состава поверхности, – диметилдитиокарбамат цинка (зирам). Хитозан, полу-

Таблица 1. Функционализация поверхностей фунгицидами

Фунгицид	Состав поверхности	Гриб-мишень	Ссылки
AmB	SNAP-AmB-PDMS	<i>C. albicans</i>	[22]
LAmB	PDMS-PDA-LAmB	<i>C. albicans</i>	[27]
AmB	AmB- аминосодержащие силаны-, кремниевые наночастицы	<i>Candida</i> sp.	[28]
AmB	Кремний-h-BN- AmB	<i>N. crassa</i>	[25]
AmB	Магнетит- лауриновая кислота- AmB	<i>P. brasiliensis</i>	[29]
AmB	AmB- полипептидные гидрогели	<i>C. albicans</i>	[30]
Анидулафунгин	Золь-гелевый органополисилоксан-анидулафунгин	<i>C. albicans</i>	[31, 32]
Флуконазол	Золь-гелевый органополисилоксан-флуконазол	<i>C. parapsilosis</i>	[31]
Зирам	Хитозан креветки-зирама	<i>F. oxysporum</i>	[35]
Каспофунгин	Плазменный полимер пропионового альдегида-каспофунгин	<i>C. albicans</i>	[39]

ченный из креветок использовали в качестве покрытия для семян фасоли *Phaseolus vulgaris* L. методом погружения [35]. Созданное хитозан-зирамовое покрытие не влияло на прорастание семян, при этом наблюдали постепенное высвобождение фунгицида на поверхности и его ингибирующее воздействие на рост мицелия *Fusarium oxysporum*. Необходимо учитывать, что хитозановые пленки обладают собственной биологической активностью и могут проявлять противогрибковые свойства; при этом введение в их состав полифенолов растительного происхождения, обладающих антиоксидантными свойствами, способно улучшить функциональные свойства пленок [36–38].

Грейссер с соавт. [39] иммобилизовали на поверхности фунгицидный липопептид каспофунгин, используя плазменно-полимерную прослойку. Предполагают, что его боковая цепь жирных кислот взаимодействует с фосфолипидами клеточной мембраны и ингибирует ферменты синтеза β -1,3-глюкана, приводя к лизису клетки гриба. Плазменную полимеризацию пропаналя использовали для осаждения 20 нм-межфазного слоя, альдегидные группы которого образовывали ковалентные связи с аминогруппами каспофунгина. Образованный поверхностный слой был способен обеспечить долговременную защиту от образования биопленки *C. albicans*. Учитывая отсутствие цитотоксичности для фибробластов человека, данный метод покрытия можно считать перспективным для различных биомедицинских устройств.

Результаты по функционализации поверхностей фунгицидами суммированы в табл. 1.

Функционализация поверхностей может осуществляться также за счет физического взаимодействия, основанного на образовании локального тепла фототермическим агентом. Действие тепла и света определенной длины волны способно приводить к гибели гриба. Например, после облучения ближним ультрафиолетовым светом нанопокрывтия из PDA (толщина – 20–30 нм), по-

лученного путем самополимеризации дофамина, выделяется значительное количество тепла, которое за считанные минуты приводит к эффективному уничтожению гриба *C. albicans* [40].

Поверхности с измененной смачиваемостью (superwetable) – супергидрофобные и супергидрофильные. Смачиваемость поверхности влияет на возможность образования на ней биопленки. Для супергидрофобной поверхности краевой угол смачивания воды (WCA) должен быть выше 150° (капли воды просто скатываются с поверхности), а для супергидрофильной поверхности он равен или меньше 5° (вода образует на покрытии тончайшую антиадгезивную пленку) [7]. Супергидрофобные поверхности способны значительно уменьшать адгезию микроорганизмов. Кроме того, учитывая важность воды для развития биологических форм жизни, удаление ее с поверхности также должно остановить рост грибов. Корейские исследователи [6] показали, что специально разработанная алюминиевая поверхность может препятствовать прилипанию и распространению 3 распространенных, переносимых по воздуху грибов, *Penicillium implicatum*, *Cladosporium cladosporioides* и *Aspergillus fumigatus*. Необработанный алюминий является слабогидрофобным, однако после анодизации в 0.3 М щавелевой кислоте с последующим покрытием (гептадекафтор-1,1,2,2-тетрагидродецил)трихлорсиланом он становится супергидрофобным (WCA 169°). При сравнении супергидрофильного, слабогидрофобного, гидрофобного и супергидрофобного покрытия на испарителе системы кондиционирования только последний тип поверхности обладал противогрибковым действием.

Другой тип тонкой супергидрофобной поверхности, аналогичной той, которая наблюдается на листьях лотоса, был разработан для покрытия лучшего наполнителя текстильных изделий – гусяного пуха [41]. Тонкие пленки были получены с использованием кремнийорганических прекур-

соров, гексаметилдисилоксана (HMDSO) и гексаметилдисилазана (HMDSN), путем плазмохимического газофазного осаждения. После плазменной обработки поверхность гусиного пуха стала супергидрофобной (WCA до 161°) и обнаружена очень высокую устойчивость к грибам *Aspergillus flavus*, *A. niger* и *A. fumigatus*.

Для увеличения эффективности действия гидрофобных поверхностей против грибных клеток их покрывают наночастицами, содержащими металлы или оксиды металлов. Изменение нанорельефа поверхности может приводить к смерти находящихся на ней микроорганизмов. Введение нанопил, полученных копреципитацией ZnO в структуру белого цементного композита, является примером такого действия [3]. На фотографиях, полученных методом автоэмиссионной сканирующей электронной микроскопии, ZnO-иглы выглядят в виде пучков цветов, в которых один цветок состоит из большого количества игольчатых лепестков, выходящих из центра. Длина игл – 100–300 нм. Данные иглы ZnO в различной концентрации (0–15%) использовали в качестве наполнителя белого цемента. Добавление ZnO в цемент увеличивает гидрофобность композитного материала, изменяя WCA от 46.9 в контроле до 88.0° в присутствии 15% ZnO-игл. В условиях повышенной влажности на поверхности цементных конструкций может наблюдаться рост грибов, многие из которых вредят здоровью человека. На примере модельного гриба *A. niger* показано, что фунгицидное действие композитов цемент-ZnO возрастает дозо-зависимым образом при внесении до 15% ZnO и усиливается при солнечном освещении. Возрастание фунгицидной активности может быть связано с увеличением гидрофобности ZnO-композита и высокой окислительной способностью ZnO, генерирующего активные формы кислорода (АФК), индуцирующие окислительный стресс в грибных клетках. Избыточное производство этих АФК приводит к необратимому повреждению мембран, митохондрий и ДНК.

Применение нанотехнологии может изменить гидрофобность покрытия. Гамез-Эспиноза с соавт. [42] получили золь-гелевое покрытие, модифицированное наночастицами серебра, синтезированными из $AgNO_3$ и водного экстракта таннина из схинопсиса (*Schinopsis balansae*), для защиты акриловых красок от грибковых поражений. Показано, что WCA возрастает до $84.2 \pm 0.5^\circ$ при использовании золь-гель покрытия с добавлением Ag-наночастиц поверх краски по сравнению с $76.6 \pm 0.7^\circ$ в контроле без наночастиц. Данный тип покрытия полностью ингибировал образующие пленки грибов *A. niger* MN371276, *Penicillium commune* MN371392, *Cladosporium sphaerospermum* MN371394 и *Lasiodiplodia theobromae* MN371283 в течение 30 сут. Предполагают, что фунгицидное действие может быть вызвано комбинированным действием Ag-наночастиц в (3-аминопро-

пил)триэтоксисилановой матрице, которые взаимодействуют с некоторыми ферментами грибной клетки и аминокислотными группами силана, что изменяет гидрофобные характеристики покрытия. При помощи золь-гель процесса также были получены противогрибковые покрытия с добавками диоксида кремния и ацетата серебра, которые оказались эффективны против *Chaetomium globosum* и *Alternaria alternata* [43].

Применение наночастиц Ag, стабилизированных галловыми кислотами (ГК), для аэрозольного покрытия кожи, полученной методом хромового дубления, также сопровождалось увеличением WCA до 123.2° , что явно выше, чем 96.3° для необработанной кожи [44]. ГК, экстрагированные из растений, были выбраны в качестве стабилизатора для синтеза наночастиц Ag *in situ* из-за наличия у них карбоксильных и катехиновых групп. После распыления таких наночастиц происходила их химическая иммобилизация на коллагеновых волокнах кожи за счет поперечного сшивания хромом (III). При этом наблюдали изменение поверхностного ζ -потенциала с положительного заряда ($+6.8 \pm 1.8$ mV) на отрицательный (-6.4 ± 0.9 mV), что сопровождалось изменением поверхности в сторону приобретения высокой антиадгезивной способности в отношении широкого спектра микробов благодаря двойному гидрофобному и электростатическому отталкиванию. Химический тип иммобилизации наночастиц обеспечивал кожу длительными фунгицидными свойствами, при этом эффективность против клеток *S. albicans* составила 99%. Данный тип покрытия перспективен для изготовления кожи для обуви, предназначенной для лиц, страдающих диабетом.

Супергидрофильные поверхности также, как и супергидрофобные препятствуют прикреплению к ним микроорганизмов. Комбинация PDA и наночастиц Ag на подложке из нержавеющей стали позволила получить микро/наноструктурную поверхность, супергидрофильные свойства которой были увеличены после модификации метоксиполиэтиленгликоль-тиолом (WCA около 0°) [45]. Такая поверхность оказалась высокоэффективной против гриба *Penicillium F2-1*. Бицидные свойства концентрированных ионов серебра в сочетании с антиадгезионными свойствами слоя связанной воды и стерическими препятствиями, которые формирует полиэтиленгликоль, привели к усилению фунгицидной активности покрытия в атмосфере 90% влажности.

Учитывая также высокую эффективность наночастиц Ag против *A. niger*, *A. fumigatus*, *Fusarium solani* [46], *A. flavus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus parasiticus* [47], *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida auris* [48, 49], *Paecilomyces variotii*, *Penicillium pinophilum*, *Chaetomium globosum*, *Trich-*

oderma virens, *Yarrowia lipolytica* и *Aspergillus brasiliensis* [50] представляется перспективным их включение в состав фунгицидных поверхностей. При этом необходимо принимать во внимание размер, концентрацию и окислительно-восстановительный потенциал наночастиц, а также состав поверхности и специфические видовые особенности грибных клеток. С использованием ТЕМ на примере *P. variotii* и *P. pinophilum* обнаружено, что наночастицы Ag размером 20 нм мигрировали в клетки с последующей агрегацией в более крупные частицы (50–100 нм) внутри клеток. [50]. Вместе с тем, наночастицы были способны накапливаться в клеточной стенке *A. brasiliensis* без какой-либо агрегации. У *S. cerevisiae* наибольшую чувствительность к наночастицам Ag проявляли гены, участвующие в транскрипции и процессинге РНК, клеточном дыхании, эндоцитозе и везикулярном транспорте [51]. Возможными механизмами биоцидного действия наночастиц Ag являются образование АФК, а также повреждение РНК, ДНК и белков, что приводит к снижению транскрипции, уменьшению эндоцитоза и дыхания [46, 50–54].

Пищевые пленки с противогрибковым эффектом.

Использование пищевой пленки на основе природных полимеров является хорошей альтернативой оказывающим негативное воздействие на окружающую среду и здоровье человека синтетическим покрытиям [55]. Такие покрытия не только защищают пищевые продукты, но и обладают такими уникальными свойствами, как биоразлагаемость, биосовместимость и отсутствие токсичности. Актуально включение в их состав нетоксичных противогрибковых соединений, которые могут контролировать грибковое поражение, являющееся одной из основных причин потерь фруктов, овощей и других продуктов при хранении.

Полисахариды наиболее часто используются в качестве компонентов пищевых пленок благодаря их высокой стабильности, особенно в условиях высокой относительной влажности [56].

Хитозан. В последнее время наблюдается увеличение количества публикаций о применении покрытий из хитозана или хитозана в сочетании с другими биополимерами с фунгицидным и бактерицидным действием на различных пищевых продуктах в качестве метода консервирования [57]. Хитозан, полученный путем деацетилирования хитина, способен образовывать пленки. Популярность этого природного линейного полимера связана с его нетоксичностью и способностью к биodeградации. При этом качество покрытия, его противогрибковая активность зависит от источника хитозана, степени его деацетилирования [58], молекулярной массы и вязкости, а также микроструктуры пищевого продукта и взаимодействия с материалом покрытия. Предполагают,

что этот полимер при значениях рН ниже рКа связывается с отрицательно заряженными карбоксильными группами липополисахаридов и пептидогликана на поверхности клеточной стенки, проникает в клетку гриба и вызывает перфорации в клеточных мембранах, ядре и внутриклеточных структурах, приводя к их разрыву и лизису [57, 59]. Действие хитозана часто проявляется в отношении грибов, содержащих значительное количество полиненасыщенных жирных кислот [60].

Для улучшения химических и физических характеристик хитозановых пленок можно использовать различные биоактивные функциональные добавки, что является перспективным методом увеличения срока хранения пищевых продуктов [61, 62]. Включение эфирных масел значительно повышает противогрибковую эффективность хитозановых пленок и покрытий *in vitro* [63]. Такие пищевые пленки значительно ингибировали рост грибов по сравнению с контрольными. Гуэрра с соавт. [64] успешно применили в качестве добавки эфирные масла из *Mentha piperita* L. или *Mentha × villosa* Huds. Полученное покрытие оказало эффективное против заражения томатов черри грибами *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* и *Rhizopus stolonifer* при их хранении при комнатной и пониженной температурах. Покрытие, образованное хитозаном и эфирными маслами *Mentha*, применили для борьбы с антракнозом, вызываемым *Colletotrichum gloeosporioides* и *Colletotrichum brevisporum* на плодах папайи [65]. О сходном действии пленок на основе хитозана с добавлением эфирных масел *Zataria multiflora* или *Cinnamomum zeylanicum*, вызывающих ингибирование роста мицелия *B. cinerea* в картофельно-декстрозном агаре и на искусственно зараженной клубнике, сообщили Мохаммеда с соавт. [66]. Алоуи с соавт. выявили 87–90%-ное ингибирование прорастания конидий *A. flavus* на финиках при помощи покрытия, состоящего из хитозана и камеди рожкового дерева в сочетании с различными эфирными маслами цитрусовых [67]. Бразильские авторы [68] описали эффективность комбинации хитозана и эфирного масла из *Symbopogon citratus* для ингибирования роста гриба *Paramyothecium roridum*, вызывающего гниль дыни. Пакистанские исследователи [69] установили, что гелевое покрытие из хитозана в комбинации с алоэ вера задерживает послеуборочное разложение манго. Компоненты алоэ вера эффективны против гриба *C. gloeosporioides* [70].

Усилителем противогрибного действия хитозановых покрытий является лактопероксидазная система, генерирующая гипотиацианит (OSCN⁻) и гипотиацианат (HOSCN), которые проникая в клетку, взаимодействуют с SH-группами различных белков [71], приводя к ингибированию роста гриба. Мохамед с соавт. [71] изучили действие такого пищевого покрытия для защиты плодов

манго от грибов *Phomopsis* sp. RP257 и *Pestalotiopsis* sp. Действие такого типа поверхности было видоспецифичным. В условиях *in vivo* покрытие 1.0- или 1.5%-ным хитозаном с или без ферментной системы приводило к 100%-ному ингибированию роста *Pestalotiopsis* sp. Вместе с тем, однокомпонентное покрытие с 1.0- или 1.5%-ным хитозаном вызывало 60%-ное подавление роста *Phomopsis* sp. RP257, но при добавлении в него лактопероксидазной системы наблюдали полное ингибирование роста этого гриба.

Установлено, что антагонистические дрожжи *Candida saitoana*, выделенные с поверхности плодов, в сочетании с химически модифицированным хитозаном могут ингибировать рост ряда патогенов на различных фруктах [72]. Показано, что действие комбинации этих дрожжей с гликольхитозаном в покрытии (“биоактивное покрытие”) было сравнимо или превосходило действие синтетических фунгицидов в борьбе с гниением яблок и цитрусовых. Данное покрытие было эффективно против таких возбудителей как *B. cinerea*, *P. expansum*, *Diplodia natalensis*, *Phomopsis citri*, *Penicillium italicum* и *Geotrichum candidum*.

Для усиления противогрибного действия хитозановых покрытий применяются нанотехнологии. Мело с соавт. [73] сравнили эффективность хитозана, представленного в виде геля, наночастиц или нанокомпозита против фитопатогенных грибов *B. cinerea*, *R. stolonifer* и *A. niger*, поражающих клубнику. В работе использовали коммерческий хитозан из мицелия *A. niger*. Наночастицы хитозана были получены методом ионного гелеобразования, имели средний размер 331.1 нм и ζ -потенциал +34 мВ. Наиболее эффективным покрытием на основе хитозана против фитопатогенных грибов *in vivo* оказался гель, обогащенный наночастицами (нанокомпозит), который ингибировал рост патогенов даже в низких концентрациях. Алотайби с соавт. [74] создали покрытие для защиты финиковых плодов от токсикогенных грибов *A. flavus*, *A. ochraceus* и *Fusarium moniliforme*. В его состав вошли хитозан *A. niger*, наночастицы хитозана размером от 35 до 65 нм, экстракт кожуры граната (ЭКГ) и их композиты. Наибольший эффект был достигнут при применении пищевой пленки, содержащей нанохитозан + ЭКГ.

Альгинат. Одним из наиболее изученных материалов для пленочного покрытия является природный полисахарид, который получают из морских бурых и красных водорослей, – альгинат. Он устойчив, биосовместим, биоразлагаем и, кроме того, обладает низкой токсичностью. Наир с соавт. [75] показали, что нанесение покрытий на основе 2% альгината с добавлением 1% ЭКГ на стручковый перец привело к ингибированию роста грибкового патогена *C. gloeosporioides*. Это ингибирование достигалось за счет присутствия пуникалагина,

основного фенола, присутствующего в ЭКГ. Альгинатная пищевая пленка с добавлением экстракта ревеня успешно защищала плоды персиков от гниения, вызванного *P. expansum* [76]. Ксу с соавт. [77] добавили циклолипопептиды (ЦЛП) из *Bacillus subtilis* в альгинатное противогрибковое легко смываемое покрытие для сохранения ягод черники. Амфифильные ЦЛП обладают фунгицидными свойствами за счет присутствия в них сурфактинов, итуринов и фенгицинов [78]. Противогрибковые свойства пленки тестировали диск-диффузионным методом против *A. niger*, гриба наиболее часто поражающего чернику [77]. ЦЛП характеризуется наличием гидрофильной пептидной петли, связанной с гидрофобной цепью жирной кислоты [79]. Это обеспечивает встраивание ЦЛП в липидный слой клеточной мембраны гриба. Для увеличения механической прочности альгинатного покрытия пленки пропитывали 5%-ным CaCl_2 [77]. Взаимодействие ионов и водородных связей между ЦЛП и альгинатом натрия стабилизировало сеть покрывающей пленки. Добавление 3% ЦЛП снизило паропроницаемость пленки до 398.1 г/м²/сут и содержание гриба до 2.5×10^3 КОЕ/г в конце хранения.

Гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ). Для борьбы с грибковыми поражениями при хранении фруктов и овощей разработаны пищевые пленки сложного состава. Милло и др. [80] показали высокую эффективность ГПМЦ-покрытий, содержащих пчелиный воск и бензоат натрия, для защиты гранатов от поражения *B. cinerea* и *Penicillium spp.* при упаковке в модифицированной атмосфере. Многие GRAS (generally recognized as safe) соли могут служить заменой синтетическим фунгицидам. Противогрибная активность ГПМЦ-липидных покрытий, дополненных бензоатом натрия или бикарбонатом калия, была показана для помидор черри [81–83] и слив [84]. Пищевая ГПМЦ-пленка, содержащая пчелиный воск и GRAS, уменьшала степень грибкового поражения при искусственной инокуляции *Lasiodiplodia theobromae* на мандаринах [85].

Примеры пищевых пленок на полисахаридной основе с добавлением противогрибных агентов приведены в табл. 2.

Микро- и наноэмульсии на основе полисахарида. В последнее время широкое применение получили микро- (размер капель 20–1000 нм) и наноэмульсии (размер капель 5–100 нм) в качестве носителей активных соединений в покрытиях на основе полисахаридов [86]. Основное различие между микроэмульсиями и наноэмульсиями заключается в их стабильности: микроэмульсии термодинамически стабильны, а наноэмульсии нет. Для улучшения стабильности эмульсионной системы необходимо наличие сурфактанта или эмульсификатора. Введение в такие эмульсии добавок с противогриб-

Таблица 2. Примеры пищевых пленок на полисахаридной основе с добавлением противогрибковых агентов

Основа	Добавка	Патоген	Объект	Ссылки
Хитозан	Эфирные масла <i>M. piperita</i> L. или <i>M. × villosa</i> Huds.	<i>A. niger</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>P. expansum</i> и <i>R. stolonife</i>	Томаты черри	[64]
Хитозан	Эфирные масла <i>Z. multiflora</i> или <i>C. zeylanicum</i>	<i>B. cinerea</i>	Земляника	[66]
Хитозан	Эфирное масло <i>C. citratus</i>	<i>P. roridum</i>	Дыня	[68]
Хитозан + камедь рожкового дерева	Эфирные масла <i>Citrus bergamia</i> и <i>Citrus aurantium</i>	<i>A. flavus</i>	Финики	[67]
Хитозан	алоэ вера	<i>C. gloeosporioides</i>	Манго	[69, 70]
Хитозан	Лактопероксидазная система	<i>Phomopsis</i> sp. RP257 и <i>Pestalotiopsis</i> sp.	Манго	[71]
Гликоль-хитозан	<i>Candida saitoana</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>P. expansum</i> , <i>D. natalensis</i> , <i>P. citri</i> , <i>P. italicum</i> , <i>G. candidum</i>	Яблоки, апельсины, лимоны	[72]
Альгинат	Экстракт кожуры граната	<i>C. gloeosporioides</i>	Стручковый перец	[75]
Альгинат	Экстракт ревеня	<i>P. expansum</i>	Персики	[76]
Альгинат	ЦЛП из <i>B. subtilis</i>	<i>A. niger</i>	Черника	[77]
ГПМЦ	Пчелиный воск и бензоат натрия	<i>B. cinerea</i> и <i>Penicillium</i> spp.	Гранаты	[80]
ГПМЦ	Бензоат натрия или бикарбонат калия	<i>B. cinerea</i> , <i>A. alternate</i> , <i>Monilinia fructicola</i>	Томаты черри, сливы	[81–83] [84]
ГПМЦ	Пчелиный воск и GRAS	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Мандарины	[85]

ными, антибактериальными и антиоксидантными свойствами улучшает качества свеженарезанных фруктов и овощей. Так, Робледо с соавт. [87] оценили противогрибное действие наноэмульсий тимола, включенных в покрытия из белка киноа и хитозана, на помидорах черри. Нанесение этих покрытий на томаты, инокулированные *B. cinerea*, выявило уменьшение грибного роста после 7 сут хранения при 5°C. Ковальчик с соавт. [88] разработали покрытие для предотвращения заражения груш на основе карбоксиметилцеллюлозы, канделильского воска и эмульсии сорбата калия и Tween 40. Эффективность эмульгированных пленок зависела от скорости роста грибных патогенов – ингибирование роста *A. alternata* и *B. cinerea* со временем усиливалось, а у быстрорастущих грибов (*Rhizopus nigricans* и *Monilinia fructigena*) отмечена противоположная тенденция. Вместе с тем, такой тип пищевой пленки оказался неэффективным для консервации, так как изменение газопроницаемости приводило к потере качества плодов.

Помимо полисахаридных покрытий, перспективным биоразлагаемым кандидатом для производ-

ства пищевых пленок/покрытий является желатин [89]. Он представляет собой частично гидролизованный белок коллагена и других нерастворимых белков, его главные компоненты – аминокислоты Pro, Nur и Gly. Как и в случае хитозана, добавление ментолового масла к желатиновому покрытию способно улучшить его химические и физические характеристики [90]. Оно снижает паропрооницаемость пленок, предотвращая потерю воды при хранении фруктов и овощей. При этом при выборе состава пленки следует учитывать баланс между физико-химическими и противогрибными свойствами. Авторы обнаружили, что 0.38% является наиболее перспективной концентрацией для ментолового масла, добавленного при приготовлении желатинового покрытия, которое используют для защиты продуктов от *B. cinerea* и *R. stolonifer*.

**

Разнообразие как типов поверхностей, обладающих противогрибной активностью, так и обла-

стей их применения чрезвычайно велико. Разработка таких поверхностей стала особенно актуальной в последнее время в медицине, так как отмечен рост заболеваний, вызванных грибами, причем наиболее это заметно у людей с пониженным иммунитетом и пациентов больниц. Прогнозируется, что частота внутрибольничных инфекций, вызываемых грибами, будет продолжать расти в ближайшие десятилетия. Кроме того, биомедицинские устройства, которые обеспечивают жизненно важное лечение пациента, колонизируются патогенными микроорганизмами, в том числе и грибами. Другим направлением, где необходимы противогрибковые поверхности, безусловно является пищевая отрасль. Из-за увеличивающегося загрязнения окружающей среды во всем мире и растущего потребительского спроса на безопасные продукты питания, растет интерес к разработке пищевых пленок, содержащих нетоксичные соединения, обладающие противогрибным действием. Съедобные пленки становятся здоровой альтернативой классической пищевой упаковке. Надо отметить, что ранее основные усилия исследователей были направлены на борьбу с бактериями, а стратегия борьбы с грибами разработана в гораздо меньшей степени. Применение фунгицидных агентов нетоксичных для человека по сравнению с бактерицидными осложняется тем, что грибы принадлежат к эукариотам и имеют некоторое сходство клеточных структур и метаболических процессов с клетками млекопитающих.

Основное направление современной стратегии получения высокоэффективных противогрибных поверхностей основано на модификации их наноструктурных и химических свойств, смачиваемости для ингибирования адгезии, роста и размножения клеток грибов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wanasinghe D.N., Mortimer P.E., Bezerra J.D.P.* // *Front. Microbiol.* 2022. V. 12. Article 827725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.827725>
2. *Giles C., Lamont-Friedrich S.J., Michl T.D., Griesser H.J., Coad B.R.* // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. № 1. P. 264–280.
3. *Singh V.P., Sandeep K., Kushwaha H.S., Powar S., Vaish R.* // *Constr. Build. Mater.* 2018. V. 158. P. 285–294.
4. *Sun X., Wu Q., Picha D.H., Ferguson M.H., Ndukwe I.E., Azadi P.* // *Carbohydr. Polym.* 2021, V. 259. Article 117764. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117764>
5. *Zhang W., Rhim J-W.* // *Food Control.* 2022. V. 133. Article 108670. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108670>
6. *Kim Y., Hwang W.* // *Mater. Lett.* 2015. V. 161. P. 234–239.
7. *Mahanta U., Khandelwal M., Deshpande A.S.* // *J. Mater. Sci.* 2021. V. 56. № 32. P. 17915–17941.
8. *Velazco-Medel M.A., Camacho-Cruz L.A., Lugo-González J.C., Bucio E.* // *Med. Devices Sens.* 2020. V. 4. <https://doi.org/10.1002/mds3.10134>
9. *Perlroth J., Choi B., Spellberg B.* // *Med. Mycol.* 2007. V. 45. P. 321–346.
10. *The Fungal Kingdom.* / Eds. J. Heitman, B.J. Howlett, P.W. Crous, E.H. Stukenbrock, T.Y. James, N.A.R. Gow. American Society for Microbiology. 2017. <https://doi.org/10.1128/9781555819583>
11. *Lipke P.N., Ovalle R.* // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 3735–3740.
12. *Krasowska A., Sigler K.* // *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2014. V. 4. P. 1–7.
13. *Nowlin K., Boseman A., Covell A., LaJeunesse D.* // *J. R. Soc. Interface.* 2015. V. 12. Article 20140999. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0999>
14. *Rosenzweig R., Marshall M., Parivar A., Van Ly K., Pearlman E., Yee A.F.* // *ACS Appl. Bio. Mater.* 2019. V. 2. P. 3159–3163.
15. *Lin J., Qiu S., Lewis K., Klibanov A.M.* // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. V. 83. P. 168–172.
16. *Ghosh S., Jolly L., Haldar J.* // *MRS Commun.* 2021. V. 9. P. 1–9.
17. *Ghosh S., Mukherjee R., Basak D., Haldar J.* // *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020. V. 12. № 25. P. 27853–27865.
18. *Hoque J., Akkapeddi P., Yadav V., Goutham B. Manjunath C.B., Uppu D.S.S.M. et al.* // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2015. V. 7. P. 1804–1815.
19. *Li J., Wu Z., Su M., He S., Chen Y., Qin D.* // *Vacuum.* 2020. V. 176. Article 109346. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2020.109346>
20. *Gómez-Ortiz N., De la Rosa-García S., Gonzalez-Gómez W., Soria-Castro M., Quintana P., Oskam G., Ortega-Morales B.* // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2013. V. 5. № 5. P. 1556–1565.
21. *Vriens K., Kumar P.T., Struyfs C., Cools T.L., Spince-maille P., Kokalj T. et al.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. V. 2017. Article ID 4064628. <https://doi.org/10.1155/2017/4064628>
22. *Devine R., Douglass M., Ashcraft M., Tayag N., Handa H.* // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2021. V. 13. № 17. P. 19613–19624.
23. *Stasko N., McHale K., Hollenbach S.J., Martin M., Doxey R.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018. V. 62. № 7. Article e01026–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01026-17>
24. *Филиппович С.Ю., Бачурина Г.П.* // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2021. Т. 57. № 6. С. 536–548.
25. *Gudz K.Y., Permyakova E.S., Matveev A.T., Bondarev A.V., Manakhov A., Sidorenko D. et al.* // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2020. V. 12. № 38. P. 42485–42496.
26. *Rodrigues C., Henriques M.* // *Pathogens.* 2017. V. 6. P. 62. <https://doi.org/10.3390/pathogens6040062>
27. *Alves D., Vaz A.T., Grainha T., Rodrigues C.F., Pereira M.O.* // *Front. Chem.* 2019. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00431>
28. *Paulo C.S.O., Vidal M., Ferreira L.S.* // *Biomacromolecules.* 2010. V. 11. № 10. P. 2810–2817.

29. *Saldanha C.A., Garcia M.P., Iocca D.C., Rebelo L.G., Souza A.C.O., Bocca A.L. et al. // PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016. V. 10. P. 6. Article e0004754. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004754>
30. *Shu C., Li T., Yang W., Li D., Ji S., Ding L. // R. Soc. Open Sci.* 2018. V. 5. Article 171814. <https://doi.org/10.1098/rsos.171814>
31. *Romera D., Toirac B., Aguilera-Correa J.-J., García-Casas A., Mediero A., Jiménez-Morales A. et al. // Materials (Basel).* 2020. V. 13. P. 3144.
32. *Garlito-Díaz H., Esteban J., Mediero A., Carias-Cálix R.A., Toirac B., Mulero F. et al. // Antibiotics (Basel).* 2021. V. 10. № 6. P. 711. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060711>
33. *García-Casas A., Aguilera-Correa J., Mediero A., Esteban J., Jimenez-Morales A. // Colloids Surf. B. Biointerfaces.* 2019. V. 181. P. 973–980.
34. *Toirac B., García-Casas A., Cifuentes S., Aguilera-Correa J.J., Esteban J., Mediero A. et al. // Prog. Org. Coat.* 2020. V. 146. Article 105681. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2020.105681>
35. *Ruiz de la Cruz G., Mancilla C.L.A., Godínez-Garrido N.A., Osornio-Flores N.M., Castillo J.A.T. // Inter-ciencia.* 2017. V. 42. № 5. P. 307–312.
36. *Lunkov A.P., Ilyina A.V., Varlamov V.P. // Appl. Biochem. Microbiol.* 2018. V. 54. P. 449–458.
37. *Liu Y., Sun Z., Xiu L., Huang J., Zhou F. // J. Food Biochem.* 2018. V. 42. № 6. P. 26–58.
38. *Riaz A., Aadil R.M., Amoussa A.M.O., Bashari M., Abid M., Hashim M.M. // J. Food Process. Preserv.* 2021. V. 45. № 1. Article e15018. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15018>
39. *Griesser S.S., Jasieniak M., Coad B.R., Griesser H.J. // Biointerphases.* 2015. V. 10. Article 04A307. <https://doi.org/10.1116/1.4933108>
40. *Lei W., Ren K., Chen T., Li B., Chang H., Ji J. // Adv. Mater. Interfaces.* 2016. V. 3. P. 1–6.
41. *Kapica R., Markiewicz J., Tyczkowska-Sieroń E., Fronczak M., Balcerzak J., Sielski J. et al. // Coatings.* 2020. V. 10. № 9. P. 904.
42. *Gámez-Espinosa E., Deyá C., Cabello M., Bellotti N. // Nano-Struct. Nano-Objects.* 2021. V. 27. Article 100770. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2021.100770>
43. *Arreche R., Bellotti N., Deyá C., Vázquez P. // Prog. Org. Coat.* 2017. V. 108. P. 36–43.
44. *Xia Q., Yang L., Hu K., Li K., Xiang J., Liu G., Wang Y. // ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2019. V. 11. № 2. P. 2352–2363.
45. *Qian H., Yang J., Lou Y., Rahman O., Li Z., Ding X. et al. // Appl. Surf. Sci.* 2019. V. 465. P. 267–278.
46. *Khan T., Yasmin A., Townley H.E. // Colloids Surf. B.* 2020. V. 194. Article 111156. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111156>
47. *Bocate K.P., Reis G.F., de Souza P.C., Junior A.G.O., Durán N., Nakazato G. et al. // Int. J. Food Microbiol.* 2019. V. 291. P. 79–86.
48. *Jalal M., Ansari M., Alzohairy M., Ali S., Khan H., Almatroudi A., Raees K. // Nanomaterials.* 2018. V. 8. № 8. P. 586.
49. *Gudz K.Y., Antipina L.Yu., Permyakova E.S., Kovalskii A.M., Konopatsky A.S., Filippovich S.Yu. et al. // ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2021. V. 13. № 20. P. 23452–23468.
50. *Żarowska B., Koźlecki T., Piegza M., Jaros-Koźlecka K., Robak M. // Polish J. Microbiol.* 2019. V. 68. P. 515–525.
51. *Galván Márquez I., Ghiyasvand M., Massarsky A., Babu M., Samanfar B., Omid K. et al. // PLoS One.* 2018. V. 13. № 3. Article e0193111. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193111>
52. *Macro Micro, Nano-Biosensors.* / Eds. M. Rai, A. Reshetilov, Y. Plekhanova, A.P. Ingle, Springer Nature Switzerland AG, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-55490-3>
53. *Шемякин И.Г., Фирстова В.В., Фурсова Н.К., Абаев И.В., Филиппович С.Ю., Игнатов С.Г. и др. // Биохимия.* 2020. Т. 85. № 11. С. 1615–1632.
54. *Калмантаева О.В., Фирстова В.В., Грищенко Н.С., Рудницкая Т.И., Потапов В.Д., Игнатов С.Г. // Прикл. биохимия и микробиология.* 2020. Т. 56. № 2. С. 190–197.
55. *Iñiguez-Moreno M., Ragazzo-Sánchez J.A., Calderón-Santoyo M. // Polymers.* 2021. V. 13. P. 3271.
56. *Marín A., Atarés L., Chiralt A. // Biocontrol Sci. Technol.* 2017. V. 27. № 10. P. 1220–1241.
57. *Salgado-Cruz M.P., Salgado-Cruz J., García-Hernández A.B., Calderón-Domínguez G., Gómez-Viquez H., Oliver-Espinoza R. et al. // Membranes.* 2021. V. 11. P. 421.
58. *Zhang Y., Zhang X., Ding R., Zhang J., Liu J. // Carbohyd. Polym.* 2011. V. 83. P. 813–817.
59. *Kabanov V.L., Novinyuk L.V. // Food Systems.* 2020. V. 3. № 1. P. 10–15.
60. *Palma-Guerrero J., Lopez-Jimenez J.A., Pérez-Berná A.J., Huang I.-C., Jansson H.-B., Salinas J. et al. // Mol. Microbiol.* 2010. V. 75. № 4. P. 1021–1032.
61. *Nair M.S., Tomar M., Punia S., Kukula-Koch W., Kumar M. // Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 164. P. 304–332.
62. *Punia Bangar S.P., Chaudhary V., Thakur N., Kajla P., Kumar M., Trif M. // Foods.* 2021. V. 26. № 10. P. 2282.
63. *Yuan G., Chen X., Li D. // Food Res. Int.* 2016. V. 89. № 1. P. 117–128.
64. *Guerra I.C.D., de Oliveira P.D.L., de Souza Pontes A.L., Lúcio A.S.S.C., Tavares J.F., Barbosa-Filho J.M. et al. // Int. J. Food Microbiol.* 2015. V. 214. P. 168–178.
65. *Braga S.P., Lundgren G.A., Macedo S.A., Tavares J.F., Vieira W.A. et al. // Int. J. Biol. Macromol.* 2019. V. 139. P. 631–639.
66. *Mohammadi A., Hashemi M., Hosseini S.M. // J. Food Sci. Technol.* 2015. V. 52. № 11. P. 7441–7448.
67. *Aloui H., Khwaldia K., Licciardello F., Mazzaglia A., Muratore G., Hamdi M., et al. // Int. J. Food Microbiol.* 2014. V. 170. P. 21–28.
68. *El-Mohamedy R.S., El-Gamal N.G., Bakeer A.R.T. // Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 2015. V. 4. P. 629–643.
69. *Shah S., Hashmi M.S. // Hortic. Environ. Biotechnol.* 2020. V. 61. P. 279–289.
70. *Raksha B., Pooja S., Babu S. // J. Plant Sci.* 2014. V. 2. P. 102–107.

71. *Mohamed C., Elise N.G., Etienne T.V., Loiseau G., Montet D.* // J. Food Saf. 2020. V. 40. № 3. Article e12785. <https://doi.org/10.1111/jfs.12785>
72. *El-Ghaouth A., Smilanick J.L., Brown G.E., Ippolito A., Wisniewski M., Wilson C.L.* // Plant Dis. 2000. V. 84. P. 243–248.
73. *Melo N.F.C.B., de Lima M.A.B., Stamford T.L.M., Galembeck A., Flores M.A., Takaki G.M.D.C. et al.* // Int. J. Food Sci. Technol. 2020. V. 55. P. 3381–3391.
74. *Alotaibi M.A., Tayel A.A., Zidan N.S., El Rabey H.A.* // J. Sci. Food Agric. 2019. V. 99. P. 4338–4343.
75. *Nair M.S., Saxena A., Kaur C.* // Food Bioprocess Technol. 2018. V. 11. № 7. P. 1317–1327.
76. *Li X.Y., Du X.L., Liu Y., Tong L.J., Wang Q., Li J.L.* // Scientia Hort. 2019. V. 257. Article 108685. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108685>
77. *Xu L., Zhang B., Qin Y., Li F., Yang S., Lu P. et al.* // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 143. P. 602–609.
78. *Zhang B., Li Y., Zhang Y., Qiao H., He J., Yuan Q. et al.* // Food Chem. 2019. V. 286. P. 541–549.
79. *Yi Y., Wang K., Zhou G., Lu H., Zhang J.* // J. Henan Univ. Technol. (Natural Science Edition). 2018. V. 39. P. 127–134.
80. *Di Millo B., Martínez-Blay V., Pérez-Gago M.B., Argentine-Sanchis M., Grimal A., Baraldi E. et al.* // Coatings. 2021. V. 11. P. 308.
81. *Fagundes C., Pérez-Gago M.B., Monteiro A.R., Palou L.* // Int. J. Food Microbiol. 2013. V. 166. P. 391–398.
82. *Fagundes C., Palou L., Monteiro A.R., Pérez-Gago M.B.* // Sci. Hort. 2015. V. 193. P. 249–257.
83. *Rodsamran P., Sothornvit R., Palou L., Pérez-Gago M.B.* // Acta Hort. 2018. V. 1194. P. 241–247.
84. *Karaca H., Pérez-Gago M.B., Taberner V., Palou L.* // Int. J. Food Microbiol. 2014 V. 179. P. 72–79.
85. *Guimarães J.E.R., de la Fuente B., Pérez-Gago M.B., Andradas C., Carbó R., Mattiuz B.-H. et al.* // Int. J. Food Microbiol. 2019. V. 301. P. 9–18.
86. *Ramos M., Mellinas C., Solaberrieta I., Garrigós M.C., Jiménez A.* // Foods. 2021. V. 10. P. 665.
87. *Robledo N., Vera P., López L., Yazdani-Pedram M., Tapia C., Abugoch L.* // Food Chem. 2018. V. 246. P. 211–219.
88. *Kowalczyk D., Kordowska-Wiater M., Zięba E., Baraniak B.* // Sci. Hort. (Amsterdam). 2017. V. 218. P. 326–333.
89. *Avramescu S.M., Butean C., Popa C.V., Ortan A., Moraru I., Temocico G.* // Coatings. 2020. V. 10. №7. P. 687.
90. *Scartazzini L., Tosati J.V., Cortez D.H.C., Rossi M.J., Flores S.H., Hubinger M.D. et al.* // J. Food Sci. Technol. 2019. V. 56. P. 4045–4056.

Antifungal Surfaces

S. Yu. Filippovich^{a,*} and G. P. Bachurina^a

^a *Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center Fundamentals of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: syf55@yandex.ru*

The review presents recent data about various types of antifungal surfaces (nanostructured, functionalized, and with modified wettability) used in medicine, the food industry, and other areas. Particular attention is paid to the functionalization of surfaces with fungicides such as amphotericin B, anidulafungin, fluconazole, ziram and caspofungin, as well as the development of biodegradable edible films based on chitosan, hydroxypropyl methylcellulose and alginate containing non-toxic antifungal compounds.

Keywords: functionalized surfaces, amphotericin B, anidulafungin, fluconazole, chitosan, alginate

УДК 577.154.2+542.952+579.22

МОДУЛЯЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЛИПАЗЫ ИЗ *Thermomyces lanuginosus* В РЕАКЦИИ ЭТЕРИФИКАЦИИ ПУТЕМ ВЫБОРА АДсорбЕНТА

© 2022 г. Г. А. Коваленко^{1, *}, Л. В. Перминова¹, А. Б. Беклемишев^{1, 2}, М. Б. Пыхтина², М. Г. Холявка^{3, 4}, В. А. Бучельникова⁴, В. Г. Артюхов³

¹Федеральный исследовательский центр “Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, 630090 Россия

²Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины (ФИЦ ФТМ), НИИ биохимии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, 630117 Россия

³Воронежский государственный университет, Воронеж, 394018 Россия

⁴Севастопольский государственный университет, Севастополь, 299053 Россия

*e-mail: galina@catalysis.ru

Поступила в редакцию 30.01.2022 г.

После доработки 05.04.2022 г.

Принята к публикации 26.04.2022 г.

Биокатализаторы с активностью липазы (БКЛ) были приготовлены путем адсорбционной иммобилизации рекомбинантной липазы (*rPichia/lip*) из термофильных микроскопических грибов *Thermomyces lanuginosus*, продуцируемой генно-инженерным штаммом метилотрофных дрожжей *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). В качестве адсорбентов использовали различные по физико-химическим свойствам носители: мезопористый гидрофильный силикагель (SiO_2) и макропористый гидрофобный аэрогель (МУА). Ферментативная активность, субстратная специфичность и операционная стабильность БКЛ были исследованы в реакции этерификации жирных насыщенных кислот и алифатических спиртов с количеством атомов углерода в молекуле от 2 до 18. Были составлены матрицы относительных активностей для более 60 пар субстратов – кислоты и спирта, путем сравнения скоростей реакции этерификации в идентичных условиях, что позволило выявить различия в специфичности БКЛ в зависимости от химической природы носителя. Было обнаружено, что для обоих типов биокатализаторов, “*rPichia/lip* на SiO_2 ” (PLSi) и “*rPichia/lip* на МУА” (PLC) максимальная скорость реакции наблюдалась при этерификации гептановой кислоты (C_7) бутиловым спиртом (C_4). В одинаковых условиях синтеза сложных эфиров ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, 1 бар, органический растворитель – смесь гексана и диэтилового эфира), в том числе, бутилгептаноата, *rPichia/lip*, адсорбированная на силикагеле, проявляла на порядок меньшую активность, чем липаза, адсорбированная на углеродном аэрогеле. Каталитические константы, равные соответственно 3.7 c^{-1} и $1.1 \times 10^2 \text{ c}^{-1}$, различались в 30 раз. Было обнаружено, что эфиры короткоцепочечных жирных кислот C_4 – C_7 и этилового спирта синтезировались в 2–3 раза быстрее с помощью гидрофобного БКЛ типа PLC, чем с участием гидрофильного БКЛ типа PLSi. В то же время, эфиры высокомолекулярных C_9 , C_{10} , C_{18} кислот и C_8 – C_{16} спиртов, обладающих выраженной гидрофобностью, синтезировались в 1.5–2 раза быстрее с участием БКЛ типа PLSi. Операционная стабильность приготовленных биокатализаторов была достаточно высокой: приготовленные БКЛ сохраняли 82–99% первоначальной активности после проведения более 30 реакционных циклов, при этом продолжительность каждого цикла до достижения конверсии кислоты выше 85% составила несколько часов (4–6 ч).

Ключевые слова: рекомбинантная липаза из *Thermomyces lanuginosus*, адсорбция липазы, силикагель, углеродный аэрогель, биокатализаторы, каталитические свойства, этерификация

DOI: 10.31857/S0555109922050099

Функциональные свойства иммобилизованных ферментов, такие как каталитическая активность, субстратная специфичность и стабильность, определяются, как показали исследования, физико-химическими свойствами носителей-адсорбентов, используемых для их иммобилизации, например,

текстурой и полярностью/гидрофобностью поверхности. В последние десятилетия интенсивно развивается направление под названием “ферментная инженерия путем выбора способа иммобилизации”, которое изучает изменение (модуляцию) функциональных свойств ферментов при

иммобилизации. По мнению авторов обзора [1] “ферментная инженерия” полностью совместима с другими химическими и/или биологическими подходами, используемыми для улучшения функциональных свойств ферментов, и успех данной “инженерной” работы определяется доступностью широкого набора протоколов (способов) иммобилизации. Несомненно, управление (модуляция) функциональными свойствами ферментов с помощью ферментной инженерии является интересным и перспективным направлением в развитии гетерогенного биокатализа.

В своих ранних работах авторы, обобщив многочисленные результаты по адсорбционной иммобилизации ферментов класса оксидоредуктаз (лактат- и алкогольдегидрогеназы, глюкозооксидаза, тирозиназа) на пироуглерод-содержащих неорганических носителях, в том числе, мезопористом θ -оксиде алюминия, сделали вывод, что для приготовления активных и стабильных биокатализаторов необходимым условием являлось взаимное геометрическое и химическое соответствие физико-химических свойств фермента и поверхности адсорбента [2]. Например, геометрическое соответствие подразумевало соответствие размеров пор, преобладающих в текстуре адсорбента, размеру гидратированной молекулы фермента (в среднем 10 нм). Это значило, что мезопоры, размером выше 10–15 нм являлись оптимальными: в таких порах фермент взаимодействовал со стенками поры многоточечно, его конформация становилась более жесткой и, как результат, повышалась его стабильность. Химическое соответствие подразумевало, прежде всего, наличие оптимального гидрофильно-гидрофобного баланса между свойствами фермента и поверхностью адсорбента. Например, для глюкозооксидазы максимальный стабилизирующий эффект наблюдали при адсорбции данного фермента на мезопористом θ - Al_2O_3 , содержащем 7–15 мас. % пироуглерода. Поверхность такого адсорбента напоминала “шахматную доску”: черные кластеры гидрофобного пироуглерода образовывались на сильных кислотно-основных центрах оксида алюминия и блокировали их. Оставшиеся участки незауглероженного Al_2O_3 белого цвета обладали слабокислыми полярными (гидрофильными) свойствами [2]. С другой стороны, при адсорбции на данных носителях алкогольдегидрогеназы и тирозиназы, наблюдали практически полную инактивацию этих ферментов, оптимальные носители содержали 0.5–3.0 мас. % углерода [2]. Задача выбора оптимального адсорбента решалась индивидуально для каждого конкретного фермента.

Липазы (гидролазы эфиров глицерина, КФ 3.1.1.3) катализируют разнообразные реакции – как прямые (гидролиз триглицеридов), так и обратные (синтез эфиров), последние протека-

ют в неводных средах, где содержание воды не превышает 1 об. %. Биокатализаторы с активностью липазы (БКЛ) как в гомогенном (растворимом), так и в гетерогенном (иммобилизованном) состоянии находят широкое применение в различных отраслях промышленности, таких как:

1. производство “умных” стиральных порошков, удаляющих масляные и жировые пятна путем ферментативного гидролиза триглицеридов;

2. получение метиловых/этиловых эфиров жирных кислот (ЖК), входящих в состав растительных масел и отработанных кулинарных отходов, для производства биодизеля в качестве добавки к моторному топливу путем ферментативного алкоголиза (метанолиза, реже этанолиза) триглицеридов [3–5];

3. крупномасштабное производство ценных пищевых ингредиентов для получения спредов и маргаринов, заменителей масла какао и молочных жиров, не содержащих нежелательных *транс*-изомеров ЖК и обладающих заданными органолептическими и физико-химическими свойствами (температурой плавления, пластичностью, консистенцией, сливочным вкусом) путем ферментативной переэтерификации масложировых смесей при повышенных температурах (60–80°C) [6–9];

4. синтез сложных эфиров (СЭ) путем ферментативной этерификации в очень мягких условиях (20–50°C, 1 бар).

Известно, что СЭ пользуются значительным спросом на рынке ароматизаторов, смягчающих и увлажняющих компонентов (эмоллиентов), поверхностно-активных веществ и эмульгаторов в пищевой и косметической промышленности. Биокатализаторы, приготовленные на основе иммобилизованных липаз, интенсивно исследуются для проведения “зеленых” процессов в органической химии [9–12].

Возможность управлять функциональными свойствами липаз с помощью ферментной инженерии, а именно, путем выбора носителя для иммобилизации, можно продемонстрировать несколькими примерами. Так, каталитические свойства липазы В из *Candida antarctica* в реакции гидролитического разделения R- и S-изомеров (\pm)-2-О-бутирил-2-фенилуксусной кислоты изменяли (модулировали) иммобилизацией на носителях, обладающих гидрофобными свойствами, таких как бутил-(C_4)-агароза, октил-(C_8)-агароза и октадецил-(C_{18})-Sepabeads [13]. С ростом гидрофобности модифицирующих фрагментов ($\text{C}_4 \rightarrow \text{C}_{18}$) скорость реакции увеличивалась приблизительно в 2 раза, при этом также изменялась стереоспецифичность биокатализа [13].

В работе [14] авторы исследовали свойства липазы из *Penicillium* sp., иммобилизованной на описанных выше носителях. Для данного фермента

также было обнаружено, что с ростом гидрофобности модифицирующих фрагментов начальная скорость гидролиза *p*-нитрофенил-(С16)-пальмитата в буферном растворе и масла сардины в двухфазной системе с циклогексаном многократно увеличивались (в 4.1 и 2.3 раза соответственно) [14]. Авторы предположили, что носители, различающиеся по гидрофобности, оказывают влияние на конформацию активного центра фермента и, как результат, обуславливают гиперактивацию липазы и все наблюдаемые различия в функциональных свойствах фермента при его иммобилизации. В работе [15] было показано, что скорость этанолиза масла и региоселективность реакции в полностью безводной среде зависели от природы носителей, используемых для иммобилизации липазы из *Thermomyces lanuginosus*. Так, при использовании C_{18} -Sepabeads и C_{18} -Purolite были получены неселективные биокатализаторы, тогда как при использовании носителей, модифицированных дивинил бензольными группами, наблюдалась 1,3-селективность по отношению к триглицеридам [15].

Современным направлением в биокатализе является компьютерное моделирование (КМ) 3D-структуры молекул ферментов, в том числе TLL (*Thermomyces Lanuginosus* Lipase), расчет и предсказание влияния мутаций, вносимых в первичную структуру на функциональные свойства ферментов, прежде всего, на термостабильность [16]. Последующее проведение генно-инженерного конструирования штаммов-продуцентов и получение рекомбинантных ферментов с измененными функциональными свойствами является логичным продолжением таких работ. Очевидно, что дополнение экспериментальных методик современными методами КМ позволяет решать не только практические, но и фундаментальные задачи: выявлять механизмы процесса иммобилизации фермента на твердых носителях; проводить глубокий анализ возможных конформационных перестроек в молекуле фермента при его иммобилизации, а также структурно-функциональных особенностей комплекса фермент-носитель.

Авторы данной статьи ранее провели исследование БКЛ, приготовленных путем адсорбции рекомбинантной липазы *rPichia/lip* на неорганических носителях, в том числе, на различных углеродных нанотрубках (УНТ) [17], а также изучили процессы ферментативного низкотемпературного синтеза сложных эфиров с участием приготовленных биокатализаторов, включая выбор органического растворителя для реакционной среды [18–23]. В настоящей работе авторы продолжили систематическое изучение БКЛ и реакций этерификации ЖК, проанализировали все полученные результаты, дополнив работу современными методами компьютерного моделирования для анализа струк-

турно-функциональных особенностей комплекса липаза-носитель.

Цель работы – продолжить сравнительные исследования функциональных свойств рекомбинантной липазы TLL (активности, субстратной специфичности, стабильности) в реакции синтеза высокомолекулярных СЭ, в зависимости от химической природы неорганических адсорбентов, а также проанализировать полученные результаты с целью поиска корреляционных зависимостей и закономерностей иммобилизации. Для выяснения механизма взаимодействия молекулы липазы TLL с углеродной нанотрубкой провести компьютерное моделирование с помощью жесткого и гибкого молекулярного докинга.

МЕТОДИКА

Рекомбинантная липаза из *Thermomyces lanuginosus* (обознач. *rPichia/lip*) продуцировалась штаммом метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* X-33, специально сконструированным с помощью генно-инженерных манипуляций, как описано в работе [18]. Для приготовления БКЛ использовали буферные растворы *rPichia/lip* (0.02 М фосфатный буфер, рН 7.0) с концентрацией белка 2–15 мг/мл.

Концентрацию белка в растворе измеряли методом [24] с использованием красителя Coomassie G-250 (“Sigma”, США). Растворы бычьего сывороточного альбумина (“Sigma”, США) использовали для построения градуировочного графика.

Коммерческий силикагель (SiO_2) марки КСК-Г (АО “Химический завод им. Л.Я. Карпова, Россия) имел следующие текстурные параметры: удельная поверхность ($S_{удБЭГ}$) – $160 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$, объем пор (V_{Σ}) – $0.76 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$. Пористость составляла 58%, мезопоры диаметром 20 нм преобладали в пористой структуре силикагеля. Размер гранул SiO_2 , взятых для приготовления БКЛ, составил 0.5–2 мм. Макропористый углеродный аэрогель (МУА) был получен в результате высокотемпературного пиролиза этилена на нанесенном катализаторе Fe:Co/CaCO₃ [25, 26]. Насыпной вес составил $0.06 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$. Гранулы МУА представляли собой легкие шарики черного цвета, образованные в результате хаотичного переплетения УНТ [19, 25]. МУА имел следующие текстурные параметры: $S_{удБЭГ} - 100 \pm 20 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$, $V_{\Sigma} - 12 \pm 3 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$, пористость составила 98%. Макропоры диаметром более 1 мкм преобладали в пористой структуре МУА, объем мезопор диаметром 2–20 нм не превышал 0.2% от V_{Σ} . Гранулы МУА диаметром 3–4 мм использовали для приготовления БКЛ. Для измерения текстурных параметров носителей использовали методы азотной и ртутной порометрии на оборудовании AutoPore 9200 и ASAP 2400 V3.07 (“Micromeritics Instrument Corpora-

tion”, США). Для проведения электронно-микроскопических исследований МУА и биокатализаторов PLC типа использовали сканирующий электронный микроскоп (СЭМ) JSM 6460 LV (“JEOL”, Япония) и просвечивающий электронный микроскоп высокого разрешения (ПЭМ) JSM 2100 (“JEOL”, Япония).

Все реагенты: субстраты липазы (жирные кислоты и спирты), органические растворители (гексан, диэтиловый эфир) – реактивы производства России. Исходные реагенты и продукты реакции анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) на приборе Agilent 7000B GC/MS (“Agilent”, США) [23]. Для всех анализов была использована высокополярная колонка на основе ионной жидкости N-пропил-6-метил-хинолиний-бис(трифторметил-сульфонил)имида ($10 \text{ м} \times 0.25 \text{ мм} \times 0.2 \text{ мкм}$). Условия хроматографического анализа были следующими: сначала колонки выдерживались 3 мин при 100°C , затем температура повышалась со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 280°C ; температура испарителя – 280°C . Скорость потока газа-носителя (гелия) составляла 1 мл/мин. Условия работы масс-спектрометра: электронная ионизация – 70 эВ, температура источника ионизации – 230°C , температура переходной линии – 250°C . Спектр регистрировали в режиме сканирования в диапазоне $40\text{--}450 \text{ m/z}$.

Биокатализаторы с активностью липазы “*rPichia/lip* на силикагеле” (PLSi) и “*rPichia/lip* на углеродном аэрогеле” (PLC) получали путем адсорционной иммобилизации рекомбинантной липазы на соответствующих носителях. Для приготовления биокатализаторов типа PLSi, гранулы силикагеля предварительно высушивали при 115°C в течение 4 ч. Высушенные гранулы (1.0 г) пропитывали по влагоемкости буферным раствором липазы (рН 7.0) с концентраций белка $10 \pm 4 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, помещали в плотно закрытый бюкс и выдерживали 5 ч при комнатной температуре ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). Затем пропитанные раствором липазы гранулы высушивали в течение 1–2 сут в условиях окружающей среды до суховоздушного состояния. Количество иммобилизованной липазы (в $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$) рассчитывали с учетом концентрации белка и объема порпиточного раствора, равного V_Σ силикагеля ($0.8 \text{ см}^3 \cdot \text{г}^{-1}$).

Биокатализаторы типа PLC были приготовлены следующим образом. Гранулы МУА размером 3–4 мм заливали раствором липазы в буфере (рН 7.0) с концентраций белка $2 \pm 1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$, в соотношении вес носителя : об. раствора = 1 : 100 и выдерживали в течение 1 сут при $20 \pm 2^\circ\text{C}$ при периодическом перемешивании. Затем раствор липазы декантировали, биокатализаторы многократно промывали буферным раствором (0.02 М фосфатный буфер, рН 7.0), помещали на бумажный фильтр для удаления избытка воды, и высу-

шивали в течение 1–2 сут в условиях окружающей среды до суховоздушного состояния. Величину адсорбции (в $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$) рассчитывали с учетом концентрации белка до адсорбции и после ее завершения.

Приготовленные БКЛ исследовали в реакции этерификации различных пар субстратов – насыщенной монокарбоновой кислоты (S_1) и первичного алифатического спирта (S_2), различающихся длиной углеродного скелета с количеством атомов углерода от 2 до 18. Этерификацию субстратов (более 60 пар $S_1 + S_2$) проводили в следующих условиях: $22 \pm 2^\circ\text{C}$; 1 бар; начальные концентрации S_1 и S_2 соответственно $0.25 \pm 0.03 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$ и $0.50 \pm 0.04 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$; растворитель – смесь гексана и диэтилового эфира в соотношении 1 : 1 (об./об.). Навески биокатализаторов заливали раствором S_1 и определяли начальную концентрацию кислоты, затем в реакционную среду добавляли S_2 в двукратном молярном избытке. Содержание биокатализаторов в реакционной среде составило 20.8 мас. % для “*rPichia/lip* на SiO_2 ” и 0.8 мас. % для “*rPichia/lip* на МУА”. Начальную скорость реакции определяли по линейному участку кинетической кривой убыли слабой органической кислоты (S_1), концентрацию которой анализировали методом титриметрии с помощью этанольного раствора NaOH с известной молярностью ($0.0256 \pm 0.0006 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$) с применением фенолфталеина как индикатора точки эквивалентности. Скорость реакции и ферментативную активность биокатализаторов рассчитывали и выражали, соответственно, в $\text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и в единицах активности (EA) на 1 г сухого биокатализатора (1 EA = $\text{мкмоль} \cdot \text{мин}^{-1}$). Результаты титриметрического и хроматографического анализов совпадали в пределах экспериментальной ошибки, равной 10%.

Активность биокатализаторов измеряли в периодических реакционных циклах, продолжительность каждого определялась временем достижения конверсии кислоты не ниже 85%. В первом цикле биокатализаторы проходили стадию кондиционирования, при этом их активность увеличивалась в 2–4 раза. Это было обусловлено тем, что внутри биокатализатора аккумулировалась вода, образующаяся в ходе этерификации, и формировалось благоприятное водное микроокружение для адсорбированной липазы, поддерживающее структуру молекул фермента в функциональной гидратированной форме. После окончания этерификации реакционную смесь, содержащую сложный эфир, а также небольшое количество субстратов S_1 и S_2 , декантировали. Биокатализаторы многократно промывали растворителем – смесью гексана и диэтилового эфира, затем дополнительно выдерживали в этом же растворителе в течение не менее 20 ч. Следующий реакционный

цикл проводили с отмытым биокатализатором в условиях, описанных выше.

Статистическую обработку результатов проводили по критерию Стьюдента с доверительной вероятностью 0.95, количество измерений $n = 3-6$. Относительная ошибка не превышала 10% (минимум 6%).

Для расчета геометрии молекул субстратов липазы S_1 и S_2 использовали метод молекулярной механики (Силовое поле MM+) в пакете программ HyperChem 7 (Hypercube Inc., США).

Компьютерное моделирование взаимодействия молекулы TLL с одностенной углеродной нанотрубкой было проведено с помощью молекулярного докинга. Кристаллическая структура TLL с разрешением 2.3 Å была взята из базы данных PDB (PDB ID: 4ZGB). Для моделирования использовали форму липазы, у которой активный центр находился в закрытой конформации [27]. Структуры УНТ различного размера были получены в программе *Nanotube Modeler* и оптимизированы в *Avogadro*. Молекулярная стыковка мономера и димера липазы с нанотрубками различной длины и диаметра была проведена с помощью программного пакета *AutoDock Vina* 1.1.2, позволяющего провести гибкий докинг (flexible docking) с учетом подвижности боковых остатков аминокислот, в частности, GLU1A, LEU6A, LYS24A, LYS24B, ASN26B, PRO29A, ARG84A, ARG84B, PRO136A, ASP137A, LYS237A. Боковые остатки этих аминокислот считались “гибкими” после проведения жесткого докинга, во время которого были оценены наиболее вероятные места связывания УНТ с липазой. Размер бокса, в который была помещена липаза, составил: $x = 126$; $y = 118$; $z = 126$. Пространственный центр липазы располагался в точке с координатами: $x = 20.489$; $y = 49.005$; $z = 0.215$. Расчет был сведен к автоматическому перебору пространственных конформаций и ориентаций нанотрубок в сайте связывания с липазой, чтобы получить комплекс липаза-УНТ с минимальной свободной энергией системы. Визуализация результатов моделирования проводилась в программах *MGLTools* и *PyMol*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования биокатализаторов PLC типа методом сканирующей электронной микроскопии показали, что морфология поверхности исходного МУА и БКЛ были практически одинаковыми: отчетливо наблюдались хаотически переплетенные УНТ, аналогично описанному в работе [19]. После адсорбции липазы “ажурность” 3D-структуры углеродного аэрогеля уменьшалась; переплетение УНТ, более утолщенных по сравнению с исходным носителем, уплотнялось; образовывались гладкие пленки, вероятно, белкового происхождения. Как видно из изображений, по-

лученных с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ), на стыках от переплетения УНТ наблюдались аморфные отложения, очевидно, образованные адсорбированной липазой *rPichia/lip* (рис. 1). Гранулы биокатализаторов PLC после высушивания уменьшались в диаметре 1.5–2 раза по сравнению с исходными гранулами МУА, полученными в каталитической установке высокотемпературного пиролиза этилена. После проведения первых двух-трех реакционных циклов этерификации гранулы БКЛ набухали из-за образования и аккумуляции воды, образующейся в ходе реакции, внутри данных биокатализаторов.

Учитывая текстурные параметры носителей – силикагеля и углеродного аэрогеля, а также размер гидратированной молекулы липазы, были рассчитаны величины поверхности, доступной для адсорбции *rPichia/lip*, с учетом того, что поры диаметром 20 нм и выше доступны для иммобилизации. Величина доступной поверхности ($S_{\text{доступ}}$) силикагеля, равная $77 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$, составила 51% от $S_{\text{удБЭТ}}$. Для макропористого углеродного аэрогеля, как видно из текстурных параметров, вся поверхность $S_{\text{удБЭТ}}$, равная $100 \text{ м}^2 \cdot \text{г}^{-1}$, доступна для адсорбции липазы. Несмотря на близкие величины $S_{\text{доступ}}$, величины адсорбции липазы на изученных носителях различались на порядок. Биокатализаторы PLSi содержали от 6.2 – 14.0 мг · г⁻¹ (количество мг белка на 1 г носителя). Величина адсорбции *rPichia/lip* на МУА составила $100 \pm 20 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$.

Каталитические свойства иммобилизованной липазы, рассчитанные ранее из полной кинетической кривой Михаэлиса-Ментен с помощью программного обеспечения Origin® (OriginLab Corp., США), такие как максимальная скорость реакции, константы Михаэлиса, каталитические константы (k , с⁻¹), зависели от химической природы носителей: для липазы, иммобилизованной на силикагеле, каталитическая константа, была в ~30 раз меньше, чем для *rPichia/lip*, адсорбированной на МУА, а именно, значения k были равны 3.7 с⁻¹ и $1.1 \times 10^2 \text{ с}^{-1}$ соответственно. Максимальные активности приготовленных БКЛ, измеренные в реакции этерификации гептановой кислоты *n*-бутанолом, составили 22.3 ± 2.0 и $513.9 \pm 44.4 \text{ ЕА} \cdot \text{г}^{-1}$ для биокатализаторов PLSi и PLC соответственно [18].

Результаты систематического исследования субстратной специфичности адсорбированной *rPichia/lip* в зависимости от химической природы носителя – гидрофильного силикагеля и гидрофобного углеродного аэрогеля, представлены в виде матриц относительных активностей ($A_{\text{отн}}$) в работах [20, 21], а также в настоящей работе, в которой наиболее подробно и полно изучена субстратная специфичность биокатализаторов типа PLC по

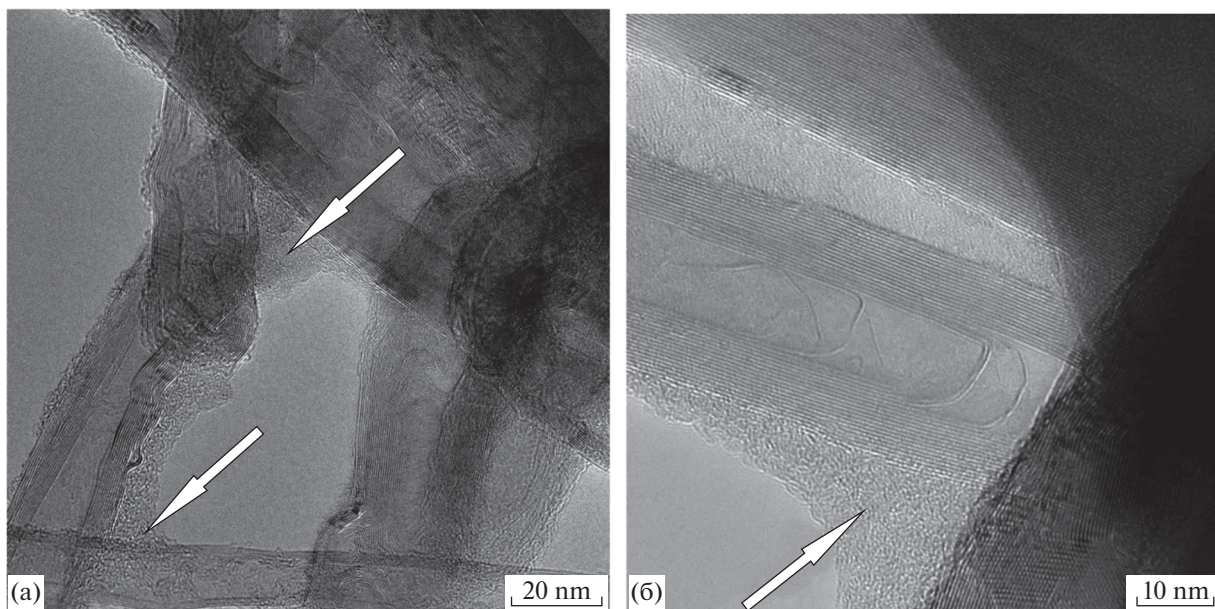


Рис. 1. ПЭМ изображения участков биокатализатора PLC типа при различных увеличениях $\times 20$ (а), $\times 10$ нм (б). Стрелками показаны аморфные отложения белковой природы (адсорбированной липазы).

отношению к высокомолекулярным субстратам S_1 (C_7 и выше). Было показано, что для обоих типов БКЛ характерной является широкая субстратная специфичность в реакции синтеза широкого набора сложных эфиров насыщенных монокарбоновых (жирных) кислот и первичных алифатических спиртов в очень мягких условиях ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, 1 бар), при этом за 2–4 ч достигалась конверсия кислоты не ниже 85%.

Сравнительный анализ полученных результатов также показал, что общими для двух типов БКЛ были следующие свойства: 1) скорость синтеза эфира гептановой кислоты с *n*- или *iso*-бутанолом (бутилгептаноата) была максимальной и в расчетах $A_{\text{отн}}$ принималась за 1 ед.; 2) в большинстве случаев скорость синтеза этиловых эфиров (S_2 – этанол, C_2) была минимальной по сравнению со скоростью этерификации с участием более высокомолекулярных спиртов, в том числе, пропанола, C_3 и бутанола, C_4 ; 3) скорость синтеза сложных эфиров изомеров *iso*- C_4 – C_5 кислот была на 1–2 порядка ниже по сравнению с их линейными молекулами, в то же время изомерия C_4 – C_5 спиртов практически не влияла на скорость этерификации [22]; 4) скорость реакции этерификации с участием вторичных спиртов была на порядок ниже по сравнению с первичными; третичные спирты в реакции этерификации не участвовали [20, 21].

Масштабные сравнительные исследования двух типов приготовленных биокатализаторов с использованием широкого набора пар субстратов S_1 и S_2 (более 60 пар) позволили получить многочисленные экспериментальные результаты, провести их

анализ и сделать вывод о том, как химическая природа носителей изменяет (модулирует) субстратную специфичность иммобилизованной рекомбинантной липазы. Поскольку иммобилизованная липаза более “чувствительна” к субстрату S_1 , то жирные кислоты C_7 , C_9 , C_{10} , C_{12} , C_{18} рассматривались индивидуально, а субстраты S_2 (спирты) были разделены на три группы в зависимости от их полярности, характеристикой которой является $\log P$ [28]: **группа 1** ($\log P < 1$) – это C_2 (этанол), C_3 (пропанол), C_4 (бутанол), **группа 2** ($1 < \log P < 4$) – это C_5 (пентанол), C_8 (октанол), **группа 3** ($\log P > 4$) – это C_{10} (деканол), C_{11} (ундеканол), C_{12} (додеканол), C_{16} (гексадеканол).

Наблюдаемые различия в субстратной специфичности БКЛ в зависимости от химической природы (гидрофильности/гидрофобности) носителей, используемых для адсорбционной иммобилизации *rPichia/lip*, представлены на рис. 2, где серые колонки соответствуют – биокатализаторам типа PLSi, черные колонки – типа PLC. Сравнение высоты колонок, соответствующих $A_{\text{отн}}$, позволило обнаружить следующее. Значительные различия между биокатализаторами разных типов наблюдались при синтезе этиловых эфиров (S_2 – этанол, C_2H_5OH) различных по длине ЖК: скорости реакций этерификации были значительно выше для биокатализаторов PLC типа (“*rPichia/lip* на MVA”), а именно, в 2.4–2.8 раза – для C_{4-6} кислот [21] и 1.2–1.6 раз – для C_{7-18} кислот (рис. 2). Известно, что этанол способен инактивировать различные ферменты, в том числе, иммобилизованную *rPichia/lip* [29]. Поскольку гидрофоб-

ность исходного МУА в присутствии этанола значительно уменьшалась за счет адсорбции молекул этилового спирта на УНТ, то, по-видимому, этот адсорбент обладал способностью проявлять “защитный” эффект, уменьшая локальную концентрацию C_2H_5OH в микроокружении липазы. Для другого спирта из группы 1 – бутанола, такого защитного эффекта уже не наблюдали. При сравнении величин $A_{отн}$, например, в реакции синтеза бутиловых эфиров гептановой C_7 (рис. 2а) и стеариновой C_{18} кислот (рис. 2г), оказалось, что относительная активность БКЛ типов PLSi и PLC уменьшилась в 1.3 (для C_7) и 3.5 (для C_{18}). Если S_2 относился к группе 2, то относительная скорость этерификации C_{7-18} кислот с участием БКЛ типа PLC была также существенно, в 1.5–2 раза, ниже (рис. 2), что было весьма неожиданным результатом. Если S_2 относился к группе 3, то особых различий в относительных скоростях синтеза СЭ, в большинстве случаев, не наблюдалось (рис. 2), что также являлось неочевидным фактом. Общеизвестно, что гидрофобные высокомолекулярные субстраты S_1 и S_2 обладают более высоким сродством к углеродной поверхности УНТ по сравнению с SiO_2 , их приповерхностная концентрация увеличивалась за счет гидрофобных взаимодействий с поверхностью, что могло приводить к увеличению скорости их этерификации. Однако эти же взаимодействия могли уменьшить локальную концентрацию субстратов вблизи иммобилизованной липазы или затруднять распад фермент-субстратного комплекса, или препятствовать десорбции СЭ как более высокомолекулярного и более гидрофобного по сравнению с S_1 и S_2 продукта реакции. В результате, скорость процесса этерификации в целом не увеличивалась. Таким образом, гидрофильный PLSi являлся более эффективным биокатализатором синтеза высокомолекулярных СЭ по сравнению с гидрофобным PLC.

В настоящей работе были сделаны попытки обнаружить корреляции между этерифицирующей активностью БКЛ и физико-химическими характеристиками субстратов липазы. Как видно на рис. 3а, полярность алифатических спиртов (S_2), характеризуемая величиной $\log P$, линейно возростала по мере удлинения углеродной цепи их молекул. В то же время, для изученных C_7 , C_9 и C_{12} кислот (S_1) монотонной или корреляционной зависимости активности биокатализатора от полярности S_2 не наблюдалось (рис. 3б). В результате многократных экспериментов было обнаружено, что скорость синтеза эфиров бутанола C_4 для всех изученных кислот была максимальной, а эфиров деканола C_{10} – воспроизводимо минимальной (рис. 3б). Было также показано, что деканол (дециловый спирт, C_{10}) оказывал негативное влияние как на

активность, так и на стабильность биокатализаторов типа PLSi: так, в течение семи реакционных циклов этерификации гептановой C_7 кислоты деканолом первоначальная активность БКЛ типа PLSi упала в среднем в 3 раза (рис. 4а), тогда как активность биокатализатора типа PLC за шесть реакционных циклов уменьшилась в 1.4 раза (рис. 4б). Биокатализаторы обоих типов проявляли высокую активность и стабильность в реакции синтеза бутилгептаноата (рис. 4).

Выраженное негативное влияние деканола (S_2) на функциональные свойства иммобилизованной липазы *Pichia/lip* не зависело ни от природы субстрата-кислоты (S_1), ни от физико-химических свойств адсорбентов: для БКЛ обоих типов наблюдались аналогичные зависимости, включая, минимумы в скоростях реакции этерификации с участием деканола C_{10} (рис. 3б). Наиболее “глубокий” минимум был характерен для реакции этерификации додекановой кислоты (лауриновой, C_{12}) деканолом C_{10} : так, этерифицирующая активность БКЛ в реакции синтеза децил додеканоата (рис. 3б, 2) была в 3.2 раза ниже по сравнению со скоростью синтеза бутиловых эфиров этой кислоты. Для энантовой (гептановой, C_7) и нонановой (пеларгоновой, C_9) кислот (рис. 3б, 1 и 3), различия в скоростях синтеза дециловых эфиров этих кислот составило 2.2 раза. Интересным оказался тот факт, что добавление одной CH_2 -группы в молекулу деканола приводит к 2–4-кратному увеличению активности биокатализатора (рис. 3б). Эти данные можно попытаться объяснить топологией активного центра фермента (E), а также процессами образования и распада фермент-субстратного комплекса (ES_1S_2). Расчеты с помощью программы HyperChem[®] показали, что молекулы деканола и додекановой кислоты в “растянутом” виде имеют близкие по величине размеры, равные 1.3 ± 0.2 нм. По-видимому, углеродные цепи этих субстратов взаимодействуют друг с другом наиболее эффективно за счет дисперсионных (гидрофобных) взаимодействий между метиленовыми ($-CH_2-$) группами. Это может приводить как к специфической блокаде активного центра, так и к затруднениям распада комплекса ES_1S_2 . Как показали исследования, максимальные скорости этерификации наблюдали для гептановой кислоты и бутанола, возможно, из-за небольших размеров их молекул, 0.95 и 0.6 нм соответственно. При увеличении длины молекул субстратов липазы эффективность биокатализа падала. Более широкая специфичность иммобилизованной липазы по отношению к спиртовому субстрату указывала на то, что S_2 -связывающий сайт активного центра липазы по размеру более широкий, чем S_1 -связывающий, что позволило подтвердить выводы о строении активного центра липазы из *T. lanuginosus*, сле-

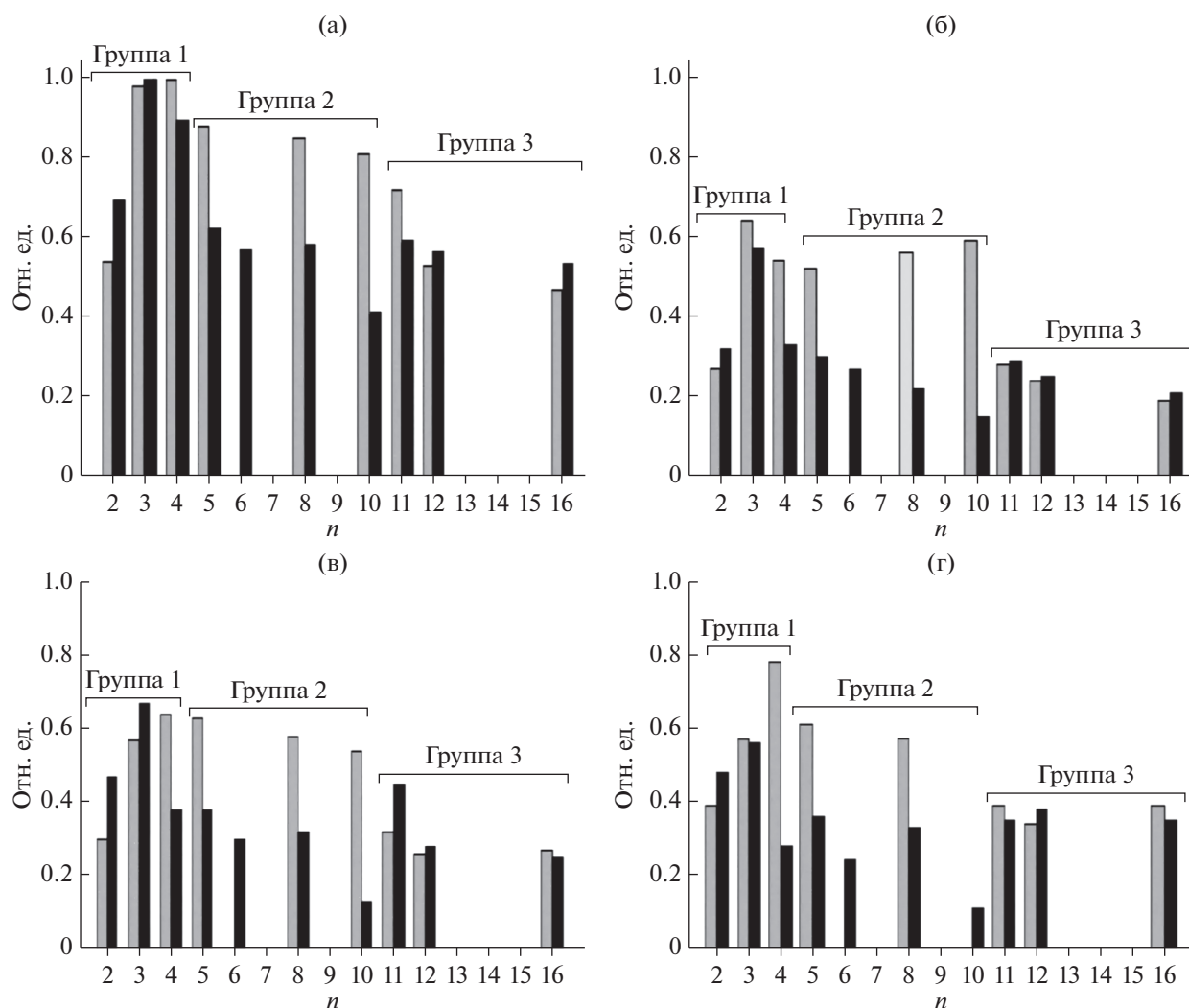


Рис. 2. Относительная активность (отн. ед.) биокатализаторов типа PLSi (серые колонки) и PLC (черные колонки) и в реакции этерификации насыщенных жирных кислот: а – гептановой (энантовой, C_7), б – нонановой, пеларгоновой, C_9), в – декановой (каприновой, C_{10}), г – октадекановой (стеариновой, C_{18}) алифатическими спиртами с различной длиной углеродного скелета (n – количество атомов углерода).

ланные в работах [27, 30–33]: активный центр липазы типа RML, к которому относится TLL, расположен близко к поверхности глобулы фермента и имеет узкую щель для S_1 (кислоты), и более широкую – для S_2 (спирта).

С целью выяснения механизма взаимодействия липазы из *T. lanuginosus* с УНТ было проведено компьютерное моделирование. Для моделирования были выбраны следующие объекты: мономер и димер TLL, одностенные углеродные нанотрубки диаметром 6.785 и 7.834 Å, длиной 50 и 100 Å. Были получены следующие результаты: 1) липаза TLL взаимодействовала с УНТ посредством гидрофобных взаимодействий остатков следующих аминокислот – лизина, аргинина, аспарагина, пролина, и π -катионных взаимодействий с остатком лизина (табл. 1, рис. 5); 2) энер-

гия взаимодействия между димером липазы и нанотрубкой не зависела от длины УНТ и составила -28 ккал \cdot моль $^{-1}$; 3) энергия взаимодействия мономера TLL с углеродной нанотрубкой в 2 раза меньше, чем димера, поскольку число связей уменьшается пропорционально; 4) учет *in silico* подвижности боковых остатков аминокислот приводил к снижению энергии на 3 ккал \cdot моль $^{-1}$ (в расчете на мономер); 5) УНТ связывалась в щели между двумя мономерами липазы (рис. 6); 6) активные центры димера TLL, состоящего из мономеров А и Б, находились на расстоянии на 6.6 и 25.8 Å (0.66 и 2.58 нм) от УНТ (рис. 6). В этом случае для объяснения наблюдаемых максимума и минимума на кривых рис. 3б, можно также предположить, что для низкомолекулярных C_{4-7} субстратов доступны оба активных центра иммобилизованной

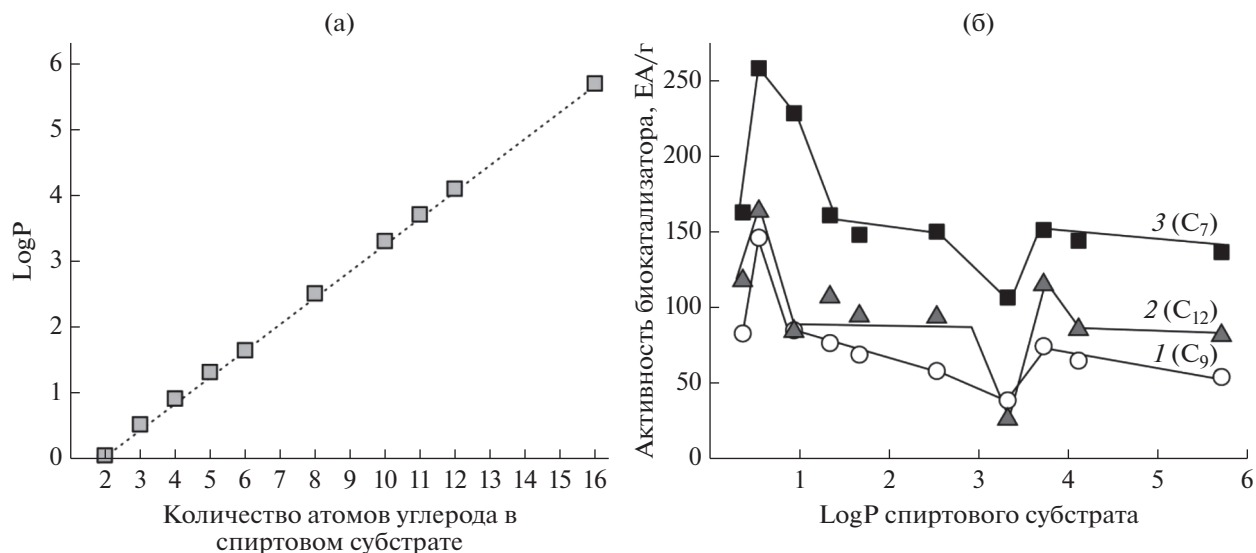


Рис. 3. Полярность (logP) спиртовых субстратов S_2 в зависимости от количества атомов углерода в молекуле (а), зависимость активности биокатализатора “*rPichia/lip* на МУА” от параметра logP (б) в реакции синтеза сложных эфиров: 1 – нонановой (пеларгоновой, C₉), 2 – додекановой (лауриновой, C₁₂), 3 – гептановой (энтановой, C₇) кислот.

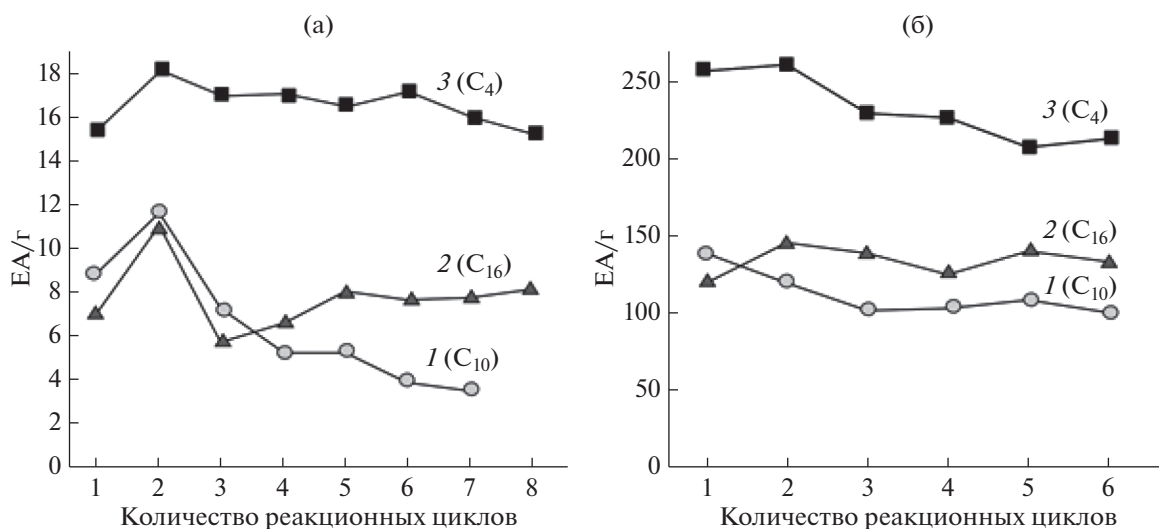


Рис. 4. Зависимость активности (EA · г) биокатализаторов “*rPichia/lip* на силикагеле” (PLSi) (а) и “*rPichia/lip* на МУА” (PLC) (б) от количества реакционных циклов этерификации гептановой C₇ кислоты спиртами: 1 – дециловым (C₁₀), 2 – гексадециловым (цетиловым, C₁₆), 3 – бутиловым (C₄).

липазы, тогда как для высокомолекулярных субстратов с количеством атомов углерода выше 10, доступен преимущественно один активный центр, находящийся на расстоянии 25.8 нм от УНТ (рис. 6а).

Таким образом, в данной работе было установлено, что функциональные свойства иммобилизованной рекомбинантной липазы *rPichia/lip*, такие как активность и субстратная специфичность, изменялись (модулировались) в зависимости от химической природы носителя. Приготовленные БКЛ существенно различались по каталитическим

свойствам: активность и каталитическая константа для биокатализатора “*rPichia/lip* на SiO₂” (тип PLSi) были в 20–30 раз ниже, чем для “*rPichia/lip* на МУА” (тип PLC). Несмотря на широкую субстратную специфичность обоих типов БКЛ, синтез этиловых эфиров насыщенных монокарбоновых кислот протекал более эффективно с участием гидрофобного БКЛ типа PLC, тогда как синтез высокомолекулярных эфиров с выраженной гидрофобностью – с участием гидрофильного типа PLSi. Для обоих типов приготовленных

Таблица 1. Взаимодействия между димером TLL, состоящим из двух мономеров А и В, и одностенной УНТ*

Аминокислотный остаток	Длина связи	Атом УНТ		Атом белка
Гидрофобные взаимодействия				
24А	LYS	3.43	5195	226
24А	LYS	3.22	5150	227
24В	LYS	3.34	5117	2763
29А	PRO	3.67	5508	277
84А	ARG	3.83	5226	761
84В	ARG	3.54	5437	3295
Взаимодействие с аспарагином				
26В	ASN	3.92	5428	2786
π-Катионные взаимодействия				
24В	LYS	5.38	5118, 5119, 5120, 5121, 5163, 5165	

* Длина углеродной нанотрубки 50 Å.

биокатализаторов максимальная скорость реакции наблюдалась при этерификации гептановой C_7 кислоты бутиловым спиртом, а минимальная – бутановой кислоты дециловым C_{10} спиртом. Приготовленные активные и стабильные биокатализаторы PLSi и PLC типов, несомненно, обладают высоким практическим потенциалом для “зеленых” процессов низкотемпературного синтеза разнообразных сложных эфиров.

Авторы благодарят Кузнецова В.Л. за предоставленные образцы МУА, Рудину Н.А. и Ищен-

ко А.В. за проведение электронно-микроскопических исследований биокатализаторов PLC типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания Института катализа СО РАН (проект НИР 0239-2021-0005).

Работы по молекулярному моделированию проведены в рамках государственного задания Севастопольского государственного университета (проект НИР FEFM-2020-0003).

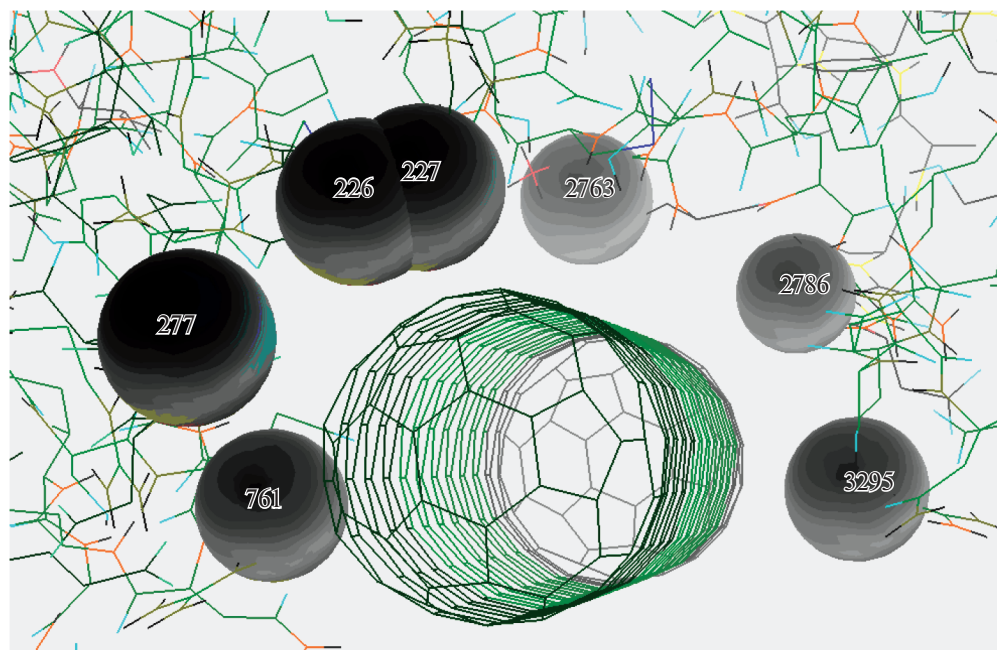


Рис. 5. Докинг димера TLL с одностенной УНТ длиной 50 Å, диаметром 7.834 Å ($n = 10, m = 0$). Указаны атомы, которые непосредственно взаимодействуют с УНТ. Атомам 226, 227, 761, 2763, 2786, 3295 (из табл. 1) соответствуют атомы углерода в CH_2 , 277 – атом углерода в CH .

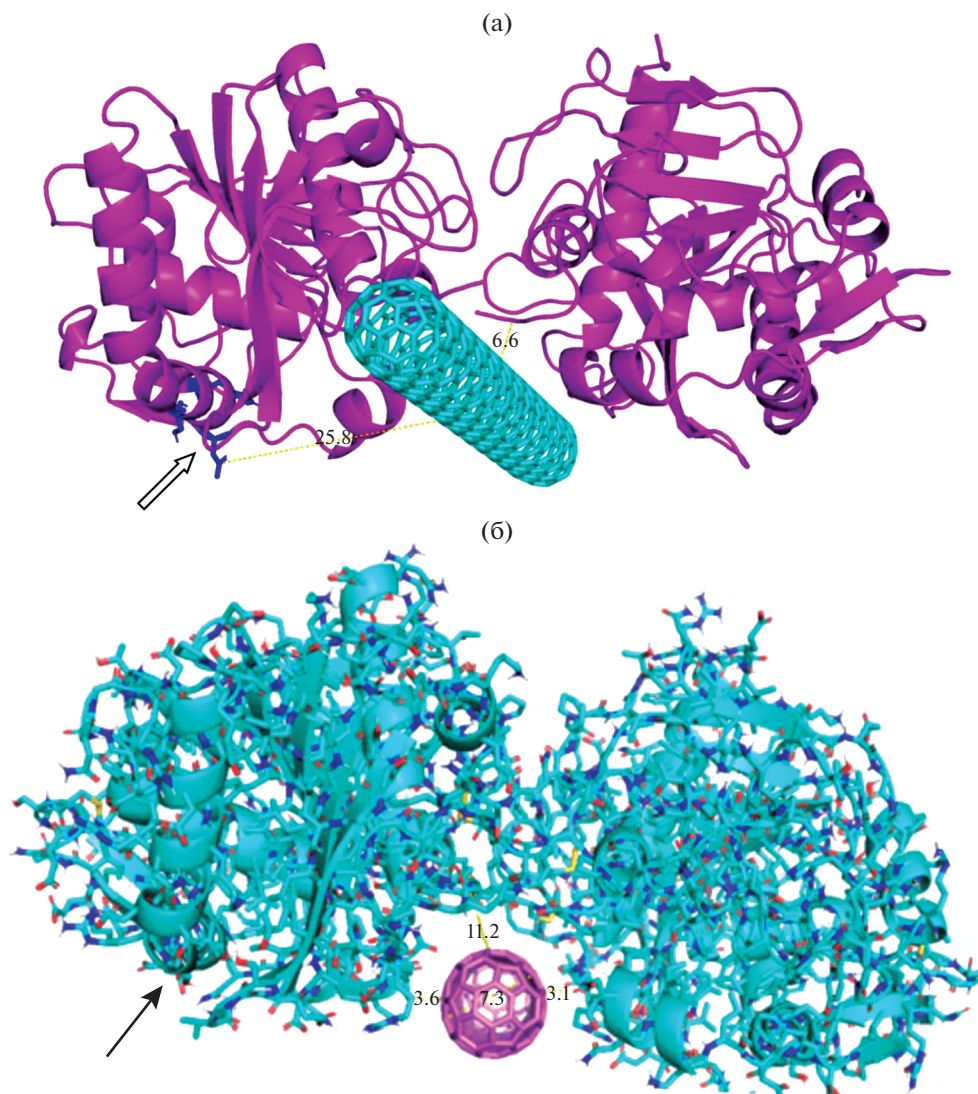


Рис. 6. Докинг димера TLL с одностенной УНТ длиной 50 Å, диаметром 7.834Å ($n = 10, m = 0$). Стрелка указывает на активный центр фермента. Указаны расстояния между активным центром липазы (Asp96-His110-Ser115) и УНТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. // *Enzyme and Microbial Technology*. 2007. V. 40. P. 1451–1463.
- Sokolovskii V.D., Kovalenko G.A. // *Biotechnol. Bioeng.* 1988. V. 32. P. 916–919.
- Stoytcheva M., Montero G., Toscano L., Gochev V., Valdez B. / Ed. Stoytcheva M., Montero G. // *Biodiesel – Feedstocks and Processing Technol. InTech*, 2011. P. 397–410.
- Luna C., Garson-Perez V., Lopez-Tenllado F.J., Baustista F.M., Verdugo-Escamilla C., Aguado-Dedlas L. et al. // *Catalysts*. 2021. V. 11. P. 1350–1362. <https://doi.org/10.3390/catal11111350>
- Hernandez-Martin E., Otero C. // *Bioresource Technol.* 2008. V.99. P. 277–286.
- Li D., Adhikari P., Shin J.-A., Lee J.-H., Kim Y.-J., Zhu X.-M., et al. // *Food Sci. Technol.* 2010. V. 43. P. 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.09.013>
- Lopez-Hernandez A., Otero C., Hernandez-Martin E., Garcia H. S., Hill C. G., Jr. // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2007. V. 109. P. 1147–1159.
- Osorio N.M., Gusmao J.H., Manuela da Fonseca M., Ferreira-Dias S. // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2005. V. 107. P. 455–463.
- Handbook of Industrial Catalysis*. /Ed. C.T. Hou. Boca Raton: CRC Press, 2005. 500 p.
- Bucholdz K., Kasche V., Bornscheuer U.T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2005. 447 p.
- Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*. Ed. J. Tao, R. Kazlauskas. John Wiley & Sons, 2011. 479 p.

12. Безбородов А.М., Загустина Н.А., Понов В.О. // Прикл. биохимия микробиология. 2014. Т. 50. № 4. С. 347–373.
13. Cabrera Z., Fernandez-Lorente G., Palomo J.M., Fernandez-Lafuente R., Guisan J. M. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2009. V. 57. P. 171–176.
14. Turati D.F.M., Morais W.G. Jr., Terrasan C.R.F., Moreno-Perez S., Pessela B.C., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Carmona E. C. // Molecules. 2017. V. 22. P. 339–353.
15. Silveira E.A., Moreno-Perez S., Basso A., Serban S., Mamede R.P., Tardioli P.W., Farinas C.S. et al. // BMC Biotechnol. 2017. V. 17. P. 88–101.
16. Bohr S.S., Lund P.M., Kallenbach F.S., Pinholt Y., Thomsen J., Iversen L. et al. // Scientific Reports. 2019. V. 9. P. 16169–16180. doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-019-52539-1
17. Нуруллина П.В., Перминова Л.В., Коваленко Г.А. // Вестн. Моск. ун-та. сер. 2. Химия. 2020. Т. 61. № 2. С. 134–140. https://doi.org/10.3103/S0027131420020108
18. Беклемишев А.Б., Пыхтина М.Б., Перминова Л.В., Коваленко Г.А. // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 5. С. 5–19. https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-5-5-62
19. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Krasnikov D.V., Kuznetsov V.L. // J. Porous Mater. 2018. V. 25. P. 1017–1026. DOI: 10.1007/s10934-017-0512-0
20. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Beklemishev A.B. // Reac. Kinet. Mech. Catal. 2019. V. 128. P. 479–491. https://doi.org/10.1007/s11144-019-01648-z
21. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Pykhina M.B., Beklemishev A.B. // Biocatal. Agr. Biotechnol. 2021. V. 36. 102124. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102124
22. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Pykhina M.B., Beklemishev A.B. // Catalysis Today. 2021. V. 379. P. 36–41. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.11.018
23. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Шашков М.В., Беклемишев А.Б. // Кинетика и катализ. 2022. Т. 63. № 2. С. 212–222. https://doi.org/10.31857/S0453881122020046
24. Bearden J. // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 533. P. 525–529.
25. Kuznetsov V.L., Suslyayev V.I., Dorofeev I.D., Kazakova V.F., Moseenkov S.I., Smirnova T.E., Krasnikov D.V. // Phys. Status Solidi B. 2015. V. 252. № 11. P. 2519–2523. https://doi.org/10.1002/pssb.201552254
26. Патент RU 2 577 273 С1. Бюл. № 7. 2016.
27. Kumar M., Mukherjee J., Sinha M., Kaur P., Sharma S., Gupta M.N., Singh T.P. // Sustain Chem Process. 2015. V. 3. 10 p. https://doi.org/10.1186/s40508-015-0042-5
28. Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C. // Biotechnol. Bioeng. 1987. V. 30. P. 81–87.
29. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Яковлева Е.Ю., Пыхтина М.Б. // Катализ в промышленности. 2014. № 6. С. 71–79.
30. Palomo J.M., Ortiz C., Fuentes M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. // J. Chromatogr. A. 2004. V. 1038. P. 267–273. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.03.058
31. Naik S., Basu A., Saikia R., Madan B., Paul P., Chatterjee R., Brask J., Svendsen A. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 65. P. 18–23. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.01.002
32. Fernandez-Lafuente R. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 62. P. 197–212. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.010
33. Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 66. P. 15–32. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.03.008

Modulation of the Catalytic Properties of Immobilized Recombinant Lipase from *Thermomyces lanuginosus* in the Reaction of Esterification by the Selection of the Adsorbent

G. A. Kovalenko^{a, *}, L. V. Perminova^a, A. B. Beklemishev^{a, b}, M. B. Pykhtina^b,
M. G. Holyavka^{c, d}, V. A. Buchelnikova^d, and V. G. Artyukhov^c

^a Boreskov Institute of Catalysis, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, 630090 Russia

^b Research Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, 630117 Russia

^c Voronezh State University, Voronezh, 394018 Russia

^d Sevastopol State University, Sevastopol, 299053 Russia

*e-mail: galina@catalysis.ru

Biocatalysts with lipase activity (BLA) were prepared by adsorptive immobilization of recombinant lipase (designated rPichia/lip) from thermophilic microscopic fungi *Thermomyces lanuginosus* produced by a genetically engineered strain of methylotrophic yeast *Komagataella phaffia* (*Pichia pastoris*). Supports with different physicochemical properties such as hydrophilic mesoporous silica (SiO₂) and hydrophobic macroporous carbon aerogel (MCA) were used as adsorbents. The enzymatic activity, substrate specificity, and operational stability of BLA have been systematically studied in the esterification of saturated fatty acids and aliphatic alcohols with the number of carbon atoms in the molecule from 2 to 18. Matrices of relative activities were compiled for more than 60 pairs of substrates – acid and alcohol, by comparing the rates of the esterification un-

der similar conditions, which made it possible to identify differences in the specificity of BLA depending on the chemical nature of the adsorbents. It was found that for both types of biocatalysts, “*rPichia*/lip on SiO_2 ” (denoted PLSi) and “*rPichia*/lip on MCA” (denoted PLC), the maximum reaction rate was observed when heptanoic acid (C7) was esterified with butyl alcohol (C4). Under the same conditions for the synthesis of esters ($20 \pm 2^\circ\text{C}$, 1 bar, an organic solvent – a mixture of hexane and diethyl ether), in particular, butyl heptanoate, *rPichia*/lip adsorbed on silica showed an order of magnitude lower activity than lipase adsorbed on carbon aerogel. The catalytic constants, equal to 3.7 s^{-1} and $1.1 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$, respectively, differed by a factor of 30. It was found that esters of short chain fatty acids $\text{C}_4\text{--}\text{C}_7$ and ethyl alcohol were synthesized 2–3 times faster with the hydrophobic PLC type biocatalysts than with the hydrophilic PLSi type. At the same time, esters of high molecular weight $\text{C}_9, 10, \text{C}_{18}$ acids and $\text{C}_8\text{--}\text{C}_{16}$ alcohols, which exhibit pronounced hydrophobicity, were synthesized 1.5–2 times faster with PLSi type biocatalysts. The operational stability of the prepared biocatalysts was quite high: the prepared BLAs retained 82–99% of their initial activity after more than 30 reaction cycles, and the duration of each cycle to reach an acid conversion above 85% was several hours (4–6 h).

Keywords: recombinant lipase from *Thermomyces lanuginosus*, silica, carbon aerogel, adsorption of lipase, biocatalysts, esterification, catalytic properties

УДК 546.173+547.514.47:579.842.11

ВЛИЯНИЕ НИТРОКСИЛА НА КЛЕТКИ *Escherichia coli*, ВЫРАЩЕННЫЕ В УСЛОВИЯХ КАРБОНИЛЬНОГО СТРЕССА

© 2022 г. Э. И. Насыбуллина¹, И. С. Пугаченко¹, О. В. Космачевская¹, А.Ф. Топунов¹, *¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: aftopunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.04.2022 г.

После доработки 22.04.2022 г.

Принята к публикации 26.04.2022 г.

Карбонильный стресс – повышение концентрации моносахаридов и активных дикарбонильных соединений (глиоксаля и метилглиоксаля, **MG**), которое приводит к увеличению скорости образования конечных продуктов гликирования (**КПГ**). **MG**, добавленный в культуру *Escherichia coli*, тормозил рост бактерий, при этом возрастало количество флуоресцирующих КПГ, связанных с белками. Действие нитроксила (**HNO**) на клетки зависело от степени аэрации бактериальной культуры. Нитроксила снижал токсическое действие **MG** на бактериальную культуру, что выражалось в увеличении жизнеспособности клеток, оцениваемой по МТТ-тесту, и снижению автофлуоресценции связанных с белками продуктов неферментативного гликирования. В условиях пониженной аэрации цитопротекторное действие донора нитроксила – кислоты Пилюти, было более выражено. Цитопротекторный эффект **HNO** в условиях карбонильного стресса может быть связан с его антиоксидантным и антигликирующим действием. Результаты исследования важны для понимания механизмов защитного и регуляторного действия **HNO** в клетках.

Ключевые слова: нитроксила, метилглиоксаль, карбонильный стресс, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109922050117

Понятие “карбонильный стресс” в биологическую науку ввел Бейнс в 1991 г. [1]. Оно аналогично понятию “окислительного стресса”. Под карбонильным стрессом понимают повышение концентрации сахаров (глюкозы, дезокси-глюкозы, фруктозы, рибозы и триозофосфатов) и активных карбонильных соединений (**АКС**), которое приводит к увеличению скорости образования конечных продуктов гликирования (**КПГ**).

В биологических образцах идентифицировано более 20 активных альдегидов и кетонов, основными из которых являются глиоксаль, метилглиоксаль (**MG**), 3-деокси-глюкозон и малоновый диальдегид. Наибольшей гликирующей активностью обладают α,β -дикарбонильные соединения – глиоксаль и **MG**. Особого внимания заслуживает метилглиоксаль, для которого также используют такие названия, как: 2-оксопропаналь, пировиноградный альдегид, пировальдегид. Токсичное действие **MG** обусловлено его способностью вступать в реакции с amino- и SH-группами аминокислотных остатков белков, формируя ковалентно связанные КПГ (**AGEs**, Advanced Glycation End products): карбокси-этиллизин (CEL, N^ε(carboxyethyl)lysine), карбокси-метиллизин (CML, N^ε(carboxymethyl)lysine), ими-

дазолон, аргпиримидины и кросс-сшитые димеры лизина с **MG** (**MOLD**, methylglyoxal-derived lysine dimers) [2, 3]. Такие модификации изменяют структуру, заряд и конформацию белка, вследствие чего нарушается функция белка и его способность к протеолитической деградации. Отметим также, что наряду с термином “карбонильный стресс” в литературе используется и термин “дикарбонильный стресс”, подчеркивающий тот факт, что некоторые **АКС**, например, тот же **MG**, содержат две карбонильные группы [4].

Карбонильному стрессу подвержены и бактериальные клетки в условиях резкого перехода на субстраты с высокой концентрацией углеводов или в стационарной фазе [5]. Избыточное образование активных форм кислорода (**АФК**) может быть еще одним механизмом развития карбонильного стресса в прокариотической клетке. Впервые неферментативное гликирование белков в бактериях было показано в работах Мироновой с соавт. [6, 7]. Гликировался γ -интерферон человека, экспрессируемый в клетках *Escherichia coli*. Пеппер с соавт. [8] обнаружили увеличение количества гликированных белков при выращивании *E. coli* в стационарной фазе и при добавлении глюкозы в среду LB. В работе [9] удалось выделить неферментативно

гликированный леглобин (гемоглобин бобовых растений) из клеток *E. coli*, содержащих плазмиду с геном этого белка. И в работах группы Мироновой [6, 7], и в ранее опубликованной работе авторов [9] неферментативному гликированию подвергались рекомбинантные белки, которые экспрессируются в большом количестве и накапливаются внутри клетки.

Карбонильный стресс тесно связан с окислительным [10–12]. При взаимодействии аминокислот с МГ образуются свободнорадикальные интермедиаты: катион-радикал основания Шиффа и анион-радикал МГ (семидион) [11]. При наличии кислорода в среде анион-радикал МГ может восстанавливать кислород до супероксиданиона ($O_2^{\cdot-}$) [11]. Образующийся в аэробной среде

$O_2^{\cdot-}$ инициирует цепные реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), в результате которых образуются новые АКС [11, 13, 14]. Таким образом, карбонильный стресс способствует развитию окислительного стресса и, наоборот, окислительный стресс усиливает карбонильный.

В настоящее время ведется поиск новых препаратов, которые могли бы ингибировать реакции неферментативного гликирования. Считается, что основными механизмами ингибирования гликирования могут быть удаление карбонильных и радикальных соединений, которые увеличивают образование КПП, а также хелатирование ионов металлов, таких, как железо и медь.

В различных экспериментальных системах *in vitro* и *in vivo* было показано, что оксид азота (NO) и его доноры ингибируют образование КПП и, тем самым, минимизируют негативные последствия их образования [12, 15–18]. Антигликирующее действие NO во многом обусловлено его антиоксидантными и антирадикальными свойствами [19, 20]. Еще более сильным антиоксидантом является нитроксил (HNO) – продукт одноэлектронного восстановления и протонирования NO. Этот метаболит NO может влиять на реакции неферментативного гликирования биомолекул, выступая в роли антигликирующего вещества.

Цель работы – выяснение, может ли нитроксил оказывать защитное действие на клетки *E. coli*, культивируемые в условиях, моделирующих карбонильный стресс.

МЕТОДИКА

В работе были использованы следующие реактивы: цитохром *c* из сердца лошади, метилглиоксаль, NERES, МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) – “Sigma-Aldrich” (США); среда LB – “AppliChem” (Германия); соль Ангели (Angeli’s salt, триоксодинитрат

натрия), кислота Пилоти (Piloty’s acid, N-гидроксibenзолсульфонамид) – “Cayman Europa” (Эстония).

Определение антигликирующей активности нитроксила. Антигликирующую активность нитроксила изучали в реакции с МГ. Реакционная смесь содержала 0.6 мМ цитохрома *c* в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7.4), 55 мМ МГ. В качестве донора нитроксила использовали соль Ангели в концентрациях 2, 4, 6, 8, 10 мМ. В качестве стандартного антигликирующего соединения (положительный контроль) использовали аминогуанидин. Оценивали способность различных концентраций антигликирующих веществ подавлять развитие флуоресценции, обусловленной образованием КПП в ходе инкубации цитохрома с МГ. Реакционную смесь инкубировали в течение 24 ч при 37°C. За накоплением КПП следили по изменению флуоресценции при $\lambda_{возб} = 320$ нм, $\lambda_{исп} = 440$ нм. Перед измерением образцы белка диализовали против 50 мМ К-фосфатного буфера (рН 7.4). Измерение проводили на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5302 PC (“Shimadzu”, Япония) в 0.5 мл микрокювете при средней скорости сканирования, высокой чувствительности (по маркировке прибора), ширине щели возбуждающего света 5 нм и испускаемого света 10 нм.

Выращивание клеток *E. coli*. В работе были использованы клетки *Escherichia coli* штамм ТВ-1. Клеточную суспензию (1 мл), хранившуюся в растворе глицерина при температуре -70°C , высевали в жидкую среду LB и культивировали в течение 15 ч при 37°C на термошейкере фирмы “Биоком” (Россия) с частотой 200 об./мин до оптической плотности 0.096 ед. при 600 нм (OD_{600}). Полученную культуру использовали для засева серии колб объемом 350 и 150 мл с 60 мл жидкой среды LB, коэффициент заполнения колбы 0.17 и 0.43 соответственно до $OD_{600} = 0.02–0.03$. В начале логарифмической фазы роста ($OD_{600} = 0.12–0.15$), через 2 ч после начала культивирования вносили раствор МГ (до концентрации 3 мМ) и/или кислоту Пилоти (до концентрации 1 мМ), длительно высвобождающую HNO. Концентрацию клеток в культуре измеряли через каждые 2 ч по величине OD_{600} в 0.1 см кювете на спектрофотометре Cary 300 (“VarianBio”, США). Через 8 ч (середина логарифмической фазы роста) отбирали пробы культуры для оценки жизнеспособности клеток. Через 24 ч (стационарная фаза) отбирали клетки для получения белкового экстракта для оценки флуоресцирующих продуктов неферментативного гликирования.

Получение белкового экстракта из клеток *E. coli*. Белковый экстракт получали из 24-часовой культуры клеток. Бактериальную суспензию (1 мл) отмывали от компонентов питательной среды трехкратным центрифугированием (10000 g, 5 мин) в

0.1 М К-фосфатном буфере (рН 7.4) и нормировали до $OD_{600} = 0.24$. К отмытой суспензии клеток добавляли лизоцим (20 мкг/мл) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем клетки разрушали ультразвуком (три цикла по 1 мин) на ультразвуковом дезинтеграторе Soniprep 150 ("MSE", Великобритания) при мощности 3 кГц, охлаждающая образцы между циклами. Суспензию разрушенных клеток центрифугировали в течение 20 мин при 15000 g для получения фракции растворимых белков.

Измерение флуоресценции растворимых белков. В супернатанте, полученном, как описано выше, регистрировали автофлуоресценцию при $\lambda_{возб} = 325$ нм и $\lambda_{исп} = 490$ нм. Измерения проводили на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5302 PC в микрокювете на 0.5 мл при низкой скорости сканирования, высокой чувствительности (по маркировке прибора), ширине щели возбуждающего и испускающего света 5 нм.

Определение жизнеспособности клеток *E. coli*. Жизнеспособность клеток оценивали по скорости восстановления МТТ в нерастворимый формазан. К 100 мкл культуры клеток (8 ч роста) в 400 мкл среды LB добавляли 100 мкл МТТ (5 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение часа. Образовавшиеся кристаллы формазана отделяли центрифугированием при 13000 g в течение 5 мин и растворяли в 0.5 мл изопропанола. Количество формазанов определяли спектрофотометрически, используя коэффициент молярной экстинкции $\epsilon_{560} = 7.2 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Перед регистрацией образцы разбавляли в 10 раз в изопропаноле. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Cary 300 в кювете с длиной оптического пути 1 см.

Статистический анализ. Все результаты представляли в виде средних значений 4–6 измерений \pm стандартное отклонение. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Антигликирующее действие нитроксила в реакции цитохрома *c* с метилглиоксалем. Поскольку в литературе отсутствуют данные о влиянии нитроксила на процессы неферментативного гликирования и модификацию белков метилглиоксалем, было исследовано антигликирующее действие нитроксила в экспериментальной системе, моделирующей карбонильный стресс.

В качестве объекта использовали цитохром *c* – модельный гемовый белок, поскольку белки этого класса содержатся и в прокариотах. Антигликирующую активность оценивали в реакции с МГ. МГ был выбран в качестве гликирующего агента, поскольку это наиболее активное дикар-

бонильное соединение, образующееся во всех живых организмах, в том числе и в бактериях [5]. В качестве донора нитроксила использовали соль Ангели [21], которая в настоящее время является одним из наиболее часто используемых доноров HNO/NO^- , особенно в фармакологических исследованиях. Соль Ангели высвобождает нитроксил, спонтанно разлагаясь в диапазоне рН 4–8. Антигликирующую активность нитроксила сравнивали с амингуанидином.

Поскольку некоторые КПП (пентозидин, гидроимидазолон) активно флуоресцируют, это свойство использовали для регистрации их накопления в реакционной среде. На рис. 1 представлены кривые, отражающие уровень КПП, образованных в реакции МГ с цитохромом *c* через 24 ч. В присутствии донора нитроксила (соли Ангели) образование КПП замедлялось. Соль Ангели показала значения концентрации полумаксимального ингибирования $IC_{50} = 1.7 \text{ мМ}$. Антигликирующая активность амингуанидина в данной реакционной системе оказалась ниже, чем у донора HNO/NO^- . Это объясняется принципиально разными механизмами действия данных соединений на реакции неферментативного гликирования. Амингуанидин является хорошей ловушкой МГ, образуя нереакционноспособные аддукты. Действие нитроксила, вероятно, связано с его способностью снижать уровень свободнорадикальных интермедиатов реакции неферментативного гликирования, поскольку в данной системе он может выступать в качестве восстановителя свободных радикалов.

В литературе имеются данные о взаимодействии NO с продуктами неферментативного гликирования [15, 16]. В то же время в работе [16] показано, что различные доноры NO ингибировали образование пентозидинов. Это обусловлено способностью NO перехватывать свободные радикалы, возникающие в реакциях неферментативного гликирования (анион-радикал МГ, катион радикал диалкилимина, основания Шиффа, супероксидный анион-радикал), которые формируются в ходе реакций аминокислот или белков с МГ [11, 14].

Влияние нитроксила и метилглиоксала на рост клеток *E. coli*. Учитывая, что в экспериментах *in vitro* нитроксил проявил себя как антигликирующий агент, было проверено его влияние на клетки *E. coli*, выращенные в присутствии МГ. В качестве донора HNO/NO^- использовали кислоту Пилоти, которая медленно ($k_{\text{max}} \sim 10^{-3} - 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ при 25°C) выделяет HNO [21]. МГ (конечная концентрация 3 мМ) и кислоту Пилоти (конечная концентрация 1 мМ) вносили в среду культивирования в начале логарифмической фазы роста. Предварительно было показано, что кислота Пилоти в концентрации 1 мМ не ингибирует рост бактерий.

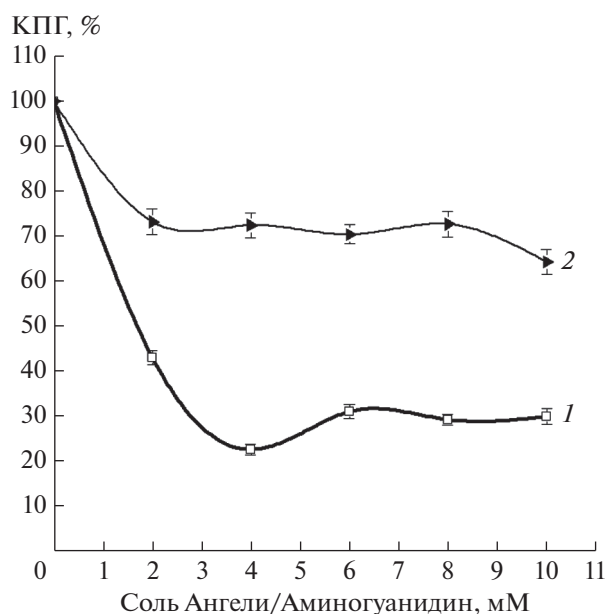


Рис. 1. Влияние различных концентраций антигликирующих веществ на флуоресценцию конечных продуктов гликирования (КПГ, %), образованных в реакции цитохрома *c* с МГ: 1 – донор нитроксила (соль Ангели), 2 – аминокуанидин.

Поскольку биологический эффект нитроксила зависит от концентрации кислорода [22], в эксперименте использовали два типа культур: растущие в условиях нормальной аэрации (коэффициент заполнения колбы 0.17) и растущие в условиях с пониженной аэрацией (коэффициент заполнения колбы 0.43). Известно, что снижение содержания кислорода в среде культивирования способствует развитию карбонильного стресса в клетках бактерий из-за активации гликолиза [5].

Добавление МГ приводило к полному подавлению роста бактерий, выращенных при сниженном уровне аэрации, в период с 2 до 10 ч (рис. 2а), в то время как в хорошо аэрируемых культурах происходило лишь замедление роста (рис. 2б). Также различалось и влияние кислоты Пилоти на эти культуры. В первом случае HNO/NO^- оказывал цитопротекторное действие (рис. 2а), во втором случае эффект был незначительным (рис. 2б).

Флуоресценция растворимой фракции белков клеток *E. coli*. В клетках *E. coli* помимо добавленного МГ, в процессе культивирования образуются собственные активные карбонильные соединения, участвующие в реакциях неферментативного гликирования клеточных белков. Особенно активно эти процессы протекают в культурах, находящихся в стационарной фазе [8, 9]. Поэтому было изучено влияние нитроксила на накопление связанных с белками КПГ через 24 ч культивирования, когда клетки находятся в стационарной

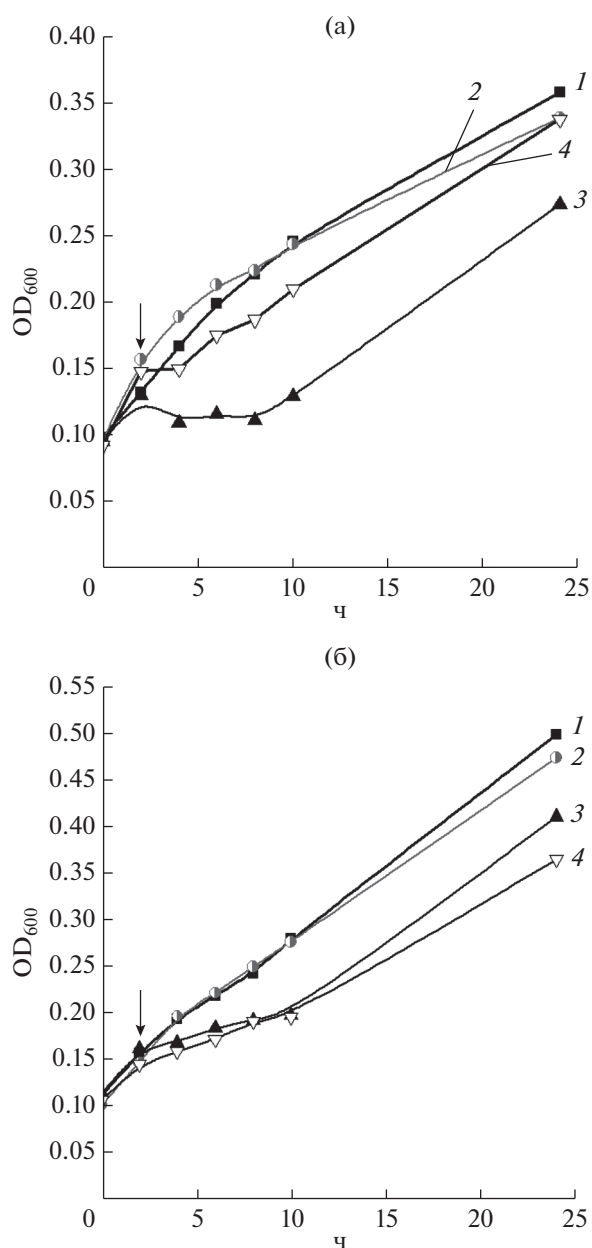


Рис. 2. Влияние МГ и донора нитроксила (кислота Пилоти) на рост клеток *E. coli* в условиях пониженной (а) и нормальной аэрации (б): 1 – без добавок, 2 – кислота Пилоти, 3 – МГ, 4 – МГ и кислота Пилоти. Стрелками отмечено добавление МГ и/или кислоты Пилоти.

фазе. Образование КПГ оценивали по их флуоресценции.

В слабо аэрируемых культурах уровень КПГ практически в 2 раза превышал их уровень в нормально аэрируемых культурах (рис. 3). Это объясняется активацией гликолиза и связанной с этим повышенной продукцией МГ. Добавка МГ к обоим типам культур усиливала образование КПГ ~ на 25%, в то время как добавка нитрокси-

ла – снижала ~ на 15%. Антигликирующее действие нитроксила на клетки *E. coli* было более выражено в присутствии MG. В слабоаэрируемых культурах нитроксил снижал содержание КПП до уровня контрольного варианта (без добавок) (рис. 3а).

Жизнеспособность клеток *E. coli*. Цитотоксическое и цитопротекторное действие MG и HNO/NO^- на бактерии оценивали по восстановлению МТТ цитоплазматическими дегидрогеназами до нерастворимого формазана, количество которого коррелировало с метаболической активностью клеток и способностью к делению (МТТ-тест). Показатели МТТ-теста у слабо аэрируемых культур *E. coli* были на 20% ниже, чем у нормально аэрируемых (рис. 4). При действии MG количество формазанов в обоих типах культур было ниже, чем в контрольном варианте: на 40% в слабо аэрируемых и на 20% в нормально аэрируемых. Нитроксил оказывал цитопротекторное действие только на бактериальные культуры, выращенные в условиях пониженной аэрации (рис. 4). Эти результаты подтверждаются также кривыми роста бактерий на рис. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Карбонильный стресс у прокариотов протекает отлично от эукариотов. Подробно особенности карбонильного стресса у бактерий описаны в обзоре [16]. Основные факторы, способствующие его развитию у прокариотов – интенсивный метаболизм углеводных субстратов и избыточное образование АФК (окислительный стресс). Большие количества АФК часто образуются в стационарной фазе роста, когда бактерии испытывают дефицит питательных веществ и переходят в состояние с пониженной метаболической активностью, образуя так называемые переживающие формы – некультивируемые, но жизнеспособные (VBNC – Viable But Non-Culturable) [23]. Неспособность таких клеток к делению в сочетании с замедленным метаболизмом и окислительным стрессом благоприятствует накоплению гликированных аддуктов [8].

В бактериях помимо ферментативного пути генерации MG, его источником может быть неферментативная дегградация триозофосфатов (дигидроксиацетон фосфата и глицеральдегид-3-фосфата) [5]. При длительной стационарной фазе неферментативный путь образования MG может превалировать над ферментативным. Если в активно делящихся клетках в экспоненциальной фазе происходит “разбавление” концентрации гликированных белков в последующих поколениях клеток, то клетки в стационарной фазе являются своего рода аккумуляторами повреждений, вызванных MG и другими АКС.

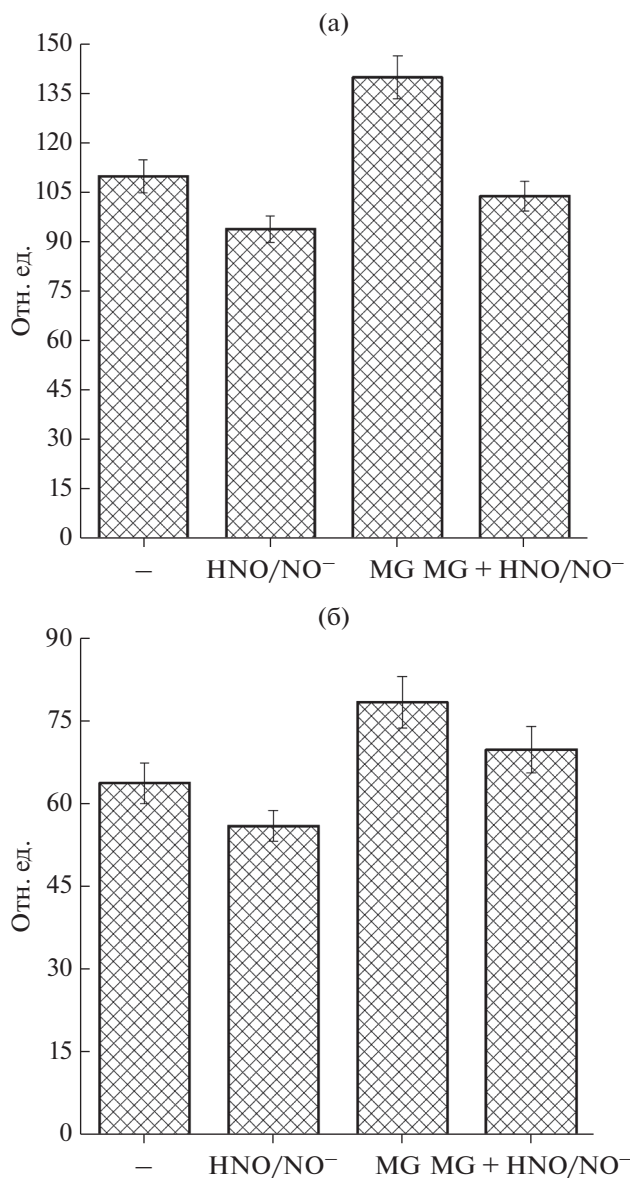


Рис. 3. Флуоресценция (отн. ед.) растворимой фракции белков клеточного экстракта *E. coli*, выращенной в условиях пониженной аэрации (а) и нормальной аэрации (б).

Показано, что в некультивируемых клетках *E. coli* повреждена ферментативная антиоксидантная система, поэтому такие клетки характеризуются высоким уровнем окислительно модифицированных белков и других биомолекул [24], низким уровнем экспрессии универсального стрессового белка А (UspA) [25] и повышенным уровнем экспрессии стрессовых регулонов: Rpos, SoxRS, RpoH, RpoE, CpxR [23]. Это объясняет 3-4-кратное повышение уровня неферментативно гликированных белков и нуклеиновых кислот в VBNC культуре *E. coli* по сравнению с клетками экспоненциальной фазы [8, 9].

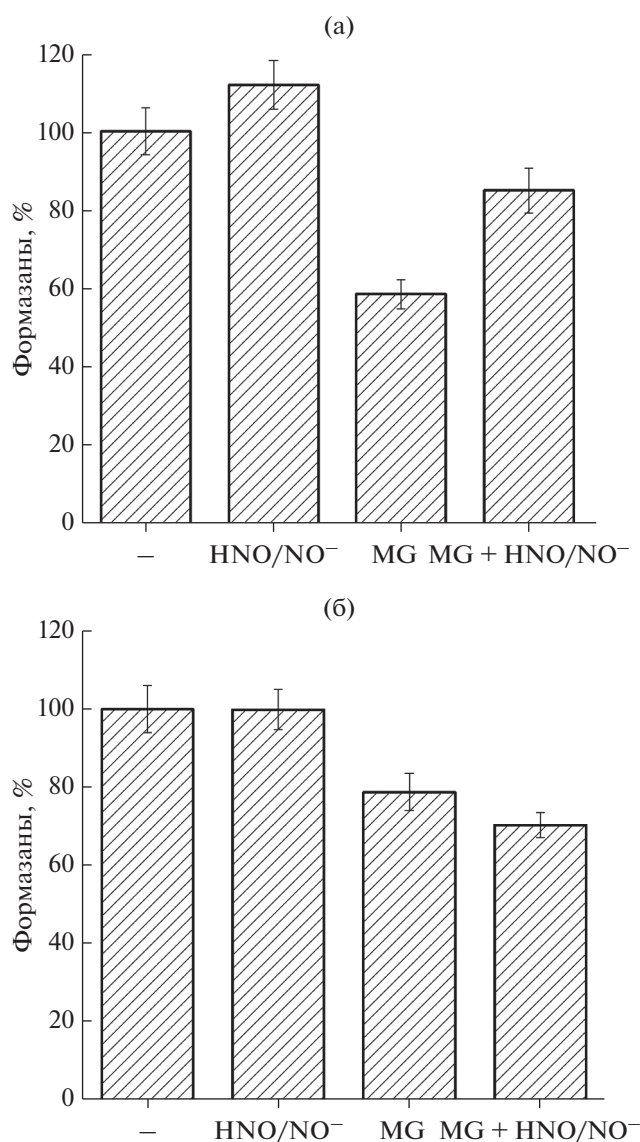


Рис. 4. Количество формазанов (%), образованных после 1-часовой инкубации с МТТ клеток *E. coli*, выращенных в условиях пониженной аэрации (а) и нормальной аэрации (б).

Карбонильный стресс тесно связан не только с АФК, но и с активными метаболитами NO (нитрозативный стресс). В бактериях может работать несколько путей образования NO и HNO/NO⁻: первый – восстановление нитратов до аммиака через нитрит и второй – окисление аммиака до нитрита через гидросиламин. В анаэробных условиях гидросиламиноредуктаза (КФ 1.7.3.4) окисляет NH₂OH до NO₂⁻ через промежуточные продукты – HNO и NO, диссоциирующие от фермента. Если второй путь присущ почвенным денитрифицирующим бактериям [26], то первый характерен и для кишечной микрофлоры, вклю-

чая *E. coli* [27, 28]. Еще один путь генерации NO – неферментативное восстановление нитритов при подкислении среды, например, при продукции молочной кислоты, а *E. coli* может превращать нитрит в NO и при нейтральном pH за счет работы различных нитритредуктаз [28, 29]. *E. coli* может также использовать нитрат в качестве конечного акцептора электронов при недостатке кислорода в среде [28].

У денитрификаторов и некоторых патогенов описаны редуктазы NO, катализирующие образование HNO, быстро превращающегося в N₂O [30]. Такой же процесс возможен и при восстановлении NO бактериальным флавогемоглобином (Hmp) [31], причем синтез самого Hmp при аноксии запускается через нитрозилирование кластеров 4Fe-4S в транскрипционном регуляторе FNR. Нитроксил может образовываться при перекисном окислении азотсодержащих субстратов (гидросиламина, гидросимочевина, гидросамовых кислот), катализируемом гемовыми белками [32], в ходе неферментативных реакций NO с тиолами [33] и за счет распада динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) – физиологических доноров NO [34, 35].

Нитроксил – короткоживущее соединение, которое сложно детектировать в организмах. В бактериях обнаружены метаболиты различной структуры, к которым присоединена нитроксильная группа. Многие такие метаболиты существуют как нитроксильные радикалы. Например, у *Micrococcus luteus* идентифицированы гидросиламинные соединения (лизодектоза и аммонигенин), переходящие в долгоживущие нитроксильные радикалы [36]. В биологических системах нитроксильный анион может функционировать и как антиоксидант, и как прооксидант. При повышении концентрации кислорода происходит инверсия антиоксидантных свойств нитроксила в прооксидантные, а в гипоксических условиях значительно снижается токсичность этого соединения [22, 37, 38].

Имеются многочисленные сведения об антиоксидантном и антирадикальном действии нитроксила. Так, в условиях окислительного стресса HNO/NO⁻ повышает выживаемость дрожжевых клеток, дефицитных по коэнзиму Q, и ингибирует перекисное окисление липидов (ПОЛ) [39], что, по-видимому, обусловлено восстановлением липидных свободных радикалов. Доноры нитроксила – соль Ангели и кислота Пилоти количественно ингибируют ПОЛ в гомогенизированном препарате сердечной мышцы крыс [40]. Нитроксил может снижать продукцию супероксида как за счет ингибирования НАДН-оксидазы [41], так и за счет ингибирования активности I и II комплексов дыхательной цепи митохондрий [42]. Антиоксидантное действие нитроксила может быть

связано и с образованием ДНКЖ [34, 35], поскольку нитрозильные комплексы гемового и негемового железа являются эффективными антиоксидантами [19, 20].

Прооксидантное действие HNO/NO^- прежде всего определяется его реакцией с кислородом, в которой образуется пероксинитрит (ONOO^-) — сильный окислитель, вызывающий необратимую модификацию белков, мутации и разрыв ДНК [22, 37, 38, 43]. В отличие от реакции NO с супероксидом, эта реакция не контролируется супероксиддисмутазой (КФ 1.15.1.1). Автоокисление HNO обычно происходит в клеточных мембранах, где концентрация антиоксидантов низка. К тому же NO^- восстанавливает ионы металлов переменной валентности, катализирует образование гидроксильного радикала в реакции Фентона. Это объясняет отсутствие положительного эффекта нитроксила на хорошо аэрируемую бактериальную культуру. В этом случае повышение концентрации кислорода в культуральной среде способствует как образованию пероксинитрита, так и появлению супероксида в реакциях неферментативного гликирования. Нитроксил способен подавлять дыхание, ингибируя цитохромы за счет модификации специфических остатков цистеина [27, 42] и образования железонитрозильных комплексов с гемом в реакции восстановительного нитрозилирования [43]. Также нельзя исключить ингибирующее действие HNO на ключевой фермент гликолиза — 1,3-дифосфоглицератдегидрогеназу (КФ 1.1.1.95) [44]. Причем токсичность HNO выше для микроорганизмов, у которых существенный вклад в получение энергии вносит гликолиз [45].

Цитопротекторное действие нитроксила на бактерии при пониженной аэрации можно объяснить проявлением его антиоксидантных и антигликирующих свойств. Помимо непосредственного антиоксидантного или прооксидантного действия, HNO/NO^- может влиять на метаболизм клетки за счет модификации железо-гемовых белков, а также белков, содержащих реакционноспособные тиолы и Fe-S-кластеры [27, 46]. Эти белки выполняют сигнальную и регуляторную функцию, что приводит к изменению экспрессии генов и синтезу защитных ферментов. Причем HNO , в отличие от NO , может непосредственно взаимодействовать с тиолами, тиолсодержащими белками и окисленным гемовым железом. Влияние нитроксила на метаболизм может быть также связано с NO , который образуется либо в результате окисления HNO двухэлектронными окислителями, (например, ФАД), либо при восстановительном нитрозилировании гемопротеидов HNO .

Таким образом, нитроксил защищал слабо аэрируемые клетки *E. coli* от карбонильного стресса, индуцированного MG. Этот цитопротектор-

ный эффект может быть обусловлен снижением уровня ассоциированных с белками свободных радикалов и продуктов неферментативного гликирования, возникающих при взаимодействии аминокислотных остатков с MG. Нитроксил также может выполнять сигнально-регуляторную функцию в клетке. Полученные результаты могут быть полезны при разработке новых фармакологических препаратов на основе доноров нитроксила.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baynes J.W. // *Diabetes*. 1991. V. 40. № 4. P. 405–412.
2. Rabbani N., Thornalley P.J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1126. P. 124–127.
3. Rabbani N., Thornalley P.J. // *Amino Acids*. 2012. V. 42. № 4. P. 1087–1096.
4. Thornalley P.J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005. V. 1043. № 2. P. 111–117.
5. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Topunov A.F. // *Biochemistry (Moscow)*. 2015. V. 80. № 13. P. 1655–1671.
6. Mironova R., Niwa T., Hayashi H., Dimitrova R., Ivanov I. // *Mol. Microbiol.* 2001. V. 39. № 4. P. 1061–1068.
7. Mironova R., Niwa T., Dimitrova R., Boyanov M., Ivanov I. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 51. P. 51068–51074.
8. Pepper E.D., Farrell M.J., Nord G., Finkel S.E. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76. № 24. P. 7925–7930.
9. Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2010. V. 46. № 3. P. 297–302.
10. Rosca M.G., Mustad T.G., Kinter M.T., Ozdemir A.M., Kern T.S., Szweda L.I., Brownlee M., Monnier V.M., Weiss M.F. // *Am. J. Physiol. Renal.* 2005. V. 289. P. 420–430.
11. Shumaev K.B., Gubkina S.A., Kumskova E.M., Shepel'kova G.S., Ruuge E.K., Lankin V.Z. // *Biochemistry (Moscow)*. 2009. V. 74. № 4. P. 568–574.
12. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Topunov A.F. // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2014. V. 52. № 1. P. 161–168.
13. Yim H.S., Kang S.O., Hah Y.C., Chock P.B., Yim M.B. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 47. P. 28228–28233.
14. Lee C., Yim M.B., Chock P.B., Yim H.S., Kang S.O. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 39. P. 25272–25278.
15. Bucala R., Cerami A., Tracey K.J. // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 87. P. 432–438.
16. Asahi K., Ichimori K., Nakazawa H., Izuhara Y., Inagi R., Watanabe T., Miyata T., Kurokawa K. // *Kidney International*. 2000. V. 58. № 4. P. 1780–1787.
17. Kosmachevskaya O.V., Shumaev K.B., Nasybullina E.I., Gubkina S.A., Topunov A.F. // *Hemoglobin*. 2013. V. 37. № 3. P. 205–218.
18. Насыбуллина Э.И., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. // Труды Карельского научного центра РАН. 2018. № 4. С. 93–104.
19. Shumaev K.B., Gorudko I.V., Kosmachevskaya O.V., Grigoryeva D.V., Panasenko O.M., Vanin A.F. et al. //

- Oxid. Med. Cell. Longev. 2019. V. 2019. e2798154. <https://doi.org/10.1155/2019/2798154>
20. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Grachev D.I., Timoshin A.A., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. // Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry. 2021. V. 15. № 4. P. 313–319.
 21. DuMond J.F., King S.B. // Antioxid. Redox Signal. 2011. V. 14. № 9. P. 1637–1648.
 22. Shoman M.E., Aly O.M. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2016. V. 2016. e4867124. <https://doi.org/10.1155/2016/4867124>
 23. Desnues B., Cuny C., Grégori G.J., Dukan S. // EMBO Reports. 2003. V. 4. № 4. P. 400–404.
 24. Dukan S., Nyström T. // Genes Dev. 1998. V. 12. P. 3431–3441.
 25. Nyström T., Neidhardt F.C. // Mol. Microbiol. 1994. V. 11. № 3. P. 537–544.
 26. Caranto J.D., Lancaster K.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 31. P. 8217–8222.
 27. Sobko T., Reinders C.I., Jansson E., Norin E., Midtvedt T., Lundberg J.O. // Nitric Oxide. 2005. V. 13. № 4. P. 272–278.
 28. Tiso M., Schechter A.N. // PLoS One. 2015. V. 10. № 3. e0119712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119712>
 29. Cole J. // FEMS Microbiol. Lett. 1996. V. 136. № 1. P. 1–11.
 30. Hendriks J., Oubrie A., Castresana J., Urbani A., Ge-meinhardt S., Saraste M. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1459. № 2–3. P. 266–273.
 31. Hausladen A., Gow A., Stamler J.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 18. P. 10108–10112.
 32. Reisz J.A., Bechtold E., King S.B. // Dalton Trans. 2010. V. 39. P. 5203–5212.
 33. Suarez S.A., Muñoz M., Alvarez L., Venâncio M.F., Rocha W.R., Bikiel D.E., Martí M.A., Doctorovich F. // J. Am. Chem. Soc. 2017. V. 139. № 41. P. 14483–14487.
 34. Liu T., Zhang M., Terry M.H., Schroeder H., Wilson S.M., Power G.G. et al. // Mol. Pharmacol. 2018. V. 93. № 5. P. 427–437.
 35. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Gromov S.V., Novikov A.A., Topunov A.F. // J. Biol. In-org. Chem. 2017. V. 22. № 1. P. 153–160.
 36. Арцатбанов В.Ю., Галон И.А., Гончаренко А.В., Островский Д.Н. // Микробиология. 2009. Т. 78. № 5. С. 605–611.
 37. Smulik R., Dębski D., Zielonka J., Michałowski B., Adamus J., Marcinek A., Kalyanaraman B., Sikora A. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 51. P. 35570–35581.
 38. Bryukov M., Kachanov A., Timonnen R., Seetula J., Vandoren J., Sarkisov O. // Chemical Physics Letters. 1993. V. 208. № 5–6. P. 392–398.
 39. Lopez B.E., Shinyashiki M., Han T.H., Fukuto J.M. // Free Radic. Biol. Med. 2007. V. 42. P. 482–491.
 40. Гудков Л.Л., Шумаев К.Б., Каленникова Е.И., Ванин А.Ф., Рууге Э.К. // Биофизика. 2007. Т. 52. № 3. С. 503–508.
 41. Lin E.Q., Irvine J.C., Cao A.H., Alexander A.E., Love J.E., Patel R., McMullen J.R., Kaye D.M., Kemp-Harper B.K., Ritchie R.H. // PloS One. 2012. V. 7. № 4. e34892. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034892>
 42. Shiva S., Crawford J.H., Ramachandran A., Ceaser E.K., Hillson T., Brookes P.S., Patel R.P., Darley-Usmar V.M. // Biochem. J. 2004. V. 379. № 2. P. 359–366.
 43. Doctorovich F., Bikiel D.E., Pellegrino J., Suárez S.A., Martí M.A. // Acc. Chem. Res. 2014. V. 47. № 10. P. 2907–2916.
 44. Lopez B.E., Wink D.A., Fukuto J.M. // Arch. Biochem. Biophys. 2007. V. 465. № 2. P. 430–436.
 45. Lopez B.E., Rodriguez C.E., Pribadi M., Cook N.M., Shinyashiki M., Fukuto J.M. // Arch. Biochem. Biophys. 2005. V. 442. № 1. P. 140–148.
 46. Bianco C.L., Toscano J.P., Bartberger M.D., Fukuto J.M. // Arch. Biochem. Biophys. 2017. V. 617. P. 129–136.

Influence of Nitroxyl on *Escherichia coli* Cells Grown under Carbonil Stress Conditions

E. I. Nasybullina^a, I. S. Pugachenko^a, O. V. Kosmachevskaya^a, and A. F. Topunov^a, *

^a Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: aftopunov@yandex.ru

Carbonyl stress is an increase in the amount of monosaccharides and active dicarbonyl compounds (glyoxal and methylglyoxal (MG)), which leads to the raising of the rate of advanced glycation end products (AGEs) formation. MG added to *Escherichia coli* culture inhibited the growth of bacteria, while the number of fluorescent proteins-associated AGEs increased. The effect of nitroxyl (HNO) on cells depended on the level of the bacterial culture aeration. Under reduced aeration conditions, the cytoprotective effect of a nitroxyl donor – Pilote’s acid was more pronounced. Nitroxyl reduced the toxic effect of MG on bacterial culture, which was expressed in the increase of cell viability, assessed by the MTT test, and in the decrease of the autofluorescence of non-enzymatic glycation products associated with proteins. The cytoprotective effect of HNO at carbonyl stress conditions may be associated with its antioxidant and antiglycemic effect. The results of the study are important for understanding the mechanisms of protective and regulatory action of HNO in cells.

Keywords: nitroxyl, methylglyoxal, carbonyl stress, *Escherichia coli*

УДК 579.22

РОЛЬ БИОСИНТЕЗА КАДАВЕРИНА В АДАПТАЦИИ *Escherichia coli* К ДЕЙСТВИЮ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

© 2022 г. А. В. Ахова¹, *, А. Г. Ткаченко¹¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра, Пермь, 614081 Россия

*e-mail: akhovan@mail.ru

Поступила в редакцию 24.03.2022 г.

После доработки 20.04.2022 г.

Принята к публикации 26.04.2022 г.

Исследована роль биосинтеза кадаверина в адаптации *Escherichia coli* к действию пероксида водорода. Показано дозозависимое увеличение уровня экспрессии генов *ldcC* и *cadA*, кодирующих ферменты синтеза кадаверина, в клетках, подвергнутых действию экзогенного пероксида водорода. Обнаружена обратная зависимость чувствительности бактерий от уровня внутриклеточного кадаверина в момент добавки пероксида водорода. Также установлено, что чувствительность бактерий к пероксиду водорода зависела от способности синтезировать кадаверин (наличия генов *ldcC* и *cadA*). В частности, скорость отмирания клеток, неспособных синтезировать кадаверин, была выше по сравнению с клетками способными к его синтезу. Чувствительность к пероксиду водорода увеличилась в ряду изогенных штаммов с генотипом: дикий тип < $\Delta cadA$ < $\Delta ldcC$ < $\Delta ldcC \Delta cadA$. Показана также роль накопления активных форм кислорода, в том числе пероксида водорода, в активации генов *ldcC* и *cadA* в клетках, подвергнутых воздействию антибиотика левофлоксацина.

Ключевые слова: окислительный стресс, кадаверин, полиамины, лизиндекарбоксилаза, перекись водорода, активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S0555109922050038

Пероксид водорода традиционно используют в качестве биоцидного средства и применяют в медицине, пищевой индустрии и промышленном производстве для дезинфекции и стерилизации поверхностей и инструментов, помещений и готовой продукции, для обработки воды, в качестве антисептика и компонента лекарственных средств [1]. Для обработки применяют пероксид водорода в виде водного раствора или в более эффективной газообразной форме [2]. Одним из преимуществ H_2O_2 по сравнению с другими дезинфектантами является его сравнительно быстрое разложение до нейтральных продуктов и низкие уровни остаточной концентрации. H_2O_2 проявляет активность в отношении широкого спектра микроорганизмов, в том числе вирусов, бактерий, грибов, простейших, устойчивых покоящихся форм бактерий и простейших – эндоспор и цист соответственно, а также, возможно, прионов [3, 4].

H_2O_2 относят к активным формам кислорода (АФК) и его биоцидное действие связано с окислением ключевых биологических макромолекул. Иницирование окисления пероксидом водорода органических соединений может происходить за счет непосредственного взаимодействия молекул,

либо вследствие образования высокореактивных гидроксильных радикалов [5]. В частности, гидроксильные радикалы, способные вызывать окислительное повреждение ключевых биомолекул (нуклеиновых кислот, белков, липидов), образуются из пероксида водорода в присутствии ионов металлов с переменной валентностью (реакция Фентона).

В природных местах обитания микроорганизмы испытывают воздействие H_2O_2 естественного происхождения. Пероксиды образуются в самой микробной клетке, в частности, в качестве побочного продукта метаболизма у аэробных организмов. Основной путь образования эндогенного H_2O_2 связан с нейтрализацией посредством реакции дисмутации супероксидного аниона, который образуется за счет переноса электрона с компонентов дыхательной цепи непосредственно на кислород [6]. В отсутствие стресса сохраняется баланс между скоростью образования H_2O_2 и его нейтрализацией, поэтому концентрация АФК поддерживается на постоянном, не наносящем ущерба уровне. В условиях воздействия естественных факторов стресса разной природы концентрация H_2O_2 в клетке возрастает и наблюдается развитие окислительного стресса [7, 8]. Образование в клетках

АФК, в том числе H_2O_2 , может быть вызвано воздействием редокс-циклирующих соединений, которые катализируют перенос электрона на кислород с образованием супероксидного аниона. Редокс-циклирующие соединения могут иметь искусственное происхождение или продуцироваться живыми организмами (растениями, бактериями) [9]. Увеличение концентрации H_2O_2 в клетке до уровня способного вызвать повреждения может происходить за счет поступления его из окружающей среды. H_2O_2 может образовываться в водной среде в результате физико-химических процессов, например, фотолиза воды. Кроме того, источником H_2O_2 могут служить другие биологические объекты, например, лактобактерии и клетки иммунной системы макроорганизма [10].

Поскольку бактерии постоянно подвергаются воздействию H_2O_2 в ходе эволюции у них сформировались механизмы защиты, позволяющие справляться с его повреждающим действием. Специальные ферменты (пероксидазы/каталазы), катализируют разложение H_2O_2 до нейтральных продуктов [11]. Нейтрализовать АФК также способны малые антиоксидантные молекулы (глутатион, полиамины, витамины С и Е, каротиноиды), хотя следует отметить, что возможность синтеза витаминов в качестве защитного ответа на окислительный стресс у прокариот не показана. Важную роль в поддержании безопасного уровня свободных радикалов играет контроль количества ионов железа в клетке. Сохранять жизнеспособность в условиях окислительного стресса позволяют системы репарации макромолекул.

У *Escherichia coli* гены, кодирующие белки адаптации к пероксидному окислительному стрессу, объединены в регулон под контролем транскрипционного регулятора ОхуR. Данный белок является непосредственным сенсором пероксида водорода, поскольку его переход в активную форму происходит в результате окисления сульфгидрильных групп имеющих в его составе остатков цистеина (С199 и С208) с образованием дисульфидной связи за счет прямого контакта с H_2O_2 . Активация ОхуR приводит к согласованной индукции экспрессии генов, кодирующих пероксидазы (*katG*, *ahpCF*), репрессор транспорта железа из среды (*fur*), компоненты системы восстановления глутатиона и других тиоловых соединений (*gor*, *trxC*, *grxA*), мини-ферритин *dps* и другие белки и функциональные РНК [12].

Ранее было показано, что в ответ на воздействие H_2O_2 в клетках *E. coli* активируется синтез полиаминов (путресцина, спермидина и кадаверина) [13]. Если защитная функция путресцина и спермидина в условиях окислительного стресса продемонстрирована [13, 14], то вклад кадаверина в адаптацию к действию пероксида водорода остается мало изученным.

Цель работы – исследование роли биосинтеза кадаверина в адаптации *E. coli* к пероксидному окислительному стрессу.

МЕТОДИКА

Материалы. Путресцин дигидрохлорид, кадаверин дигидрохлорид, спермидин тригидрохлорид, L-лизин моногидрохлорид, дансилхлорид, лево-флоксацин, орто-нитрофенил-β-D-галактопиранозид – производства “Sigma” (США). Растворители, кислоты, пероксид водорода – производства фирмы “Вектон” (Россия), додецилсульфат натрия – “Fluka” (США), полиамины содержали не ниже 98% основного компонента.

Объекты исследования. В качестве объектов исследования использованы штаммы *Escherichia coli* дикого типа (BW25141) и изогенные ему штаммы с делецией гена *ldcC* (BW25141Δ*ldcC*) или гена *cadA* (BW25141Δ*cadA*), а также с делецией обоих генов, кодирующих лизиндекарбоксилазу (BW25141Δ*ldcC*Δ*cadA*) [15].

Для определения уровня экспрессии генов использованы штаммы *E. coli*, несущие транскрипционные слияния *ldcC::lacZ* (штамм SHT40, производный от штамма GC4468) или *cadA::lacZ* (штамм SHT45, производный от штамма GC4468) [15]. Штамм *E. coli* BGF931, несущий генное слияние *katG::lacZ*, предоставлен профессором Б. Демплом (Stony Brook University Medical School, США) [6].

Штаммы *E. coli* BW25141 и GC4468 получены из коллекции CGSC (Йельский университет, США).

Определение уровня экспрессии генов. Уровень экспрессии генов оценивали методом Миллера по активности β-галактозидазы в экстрактах клеток, несущих слияние промоторной части исследуемого гена со структурной частью гена *lacZ* и предварительно обработанных хлороформом и додецилсульфатом натрия [16].

Клетки культивировали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл бульона LB (“VWR”, США), при 37°C без ротации в течение 16–18 ч. Полученные культуры разводили в свежей питательной среде до оптической плотности $A_{600} = 0.1$ и культивировали в описанных выше условиях. При оптической плотности культуры $A_{600} = 0.3$ вносили пероксид водорода/антибиотик. Добавку тиомочевины в культуру проводили за 10 мин до внесения пероксида водорода/антибиотика.

Определение оптической плотности культуры. Рост бактериальной культуры оценивали по изменению оптической плотности культуры при длине волны 600 нм (A_{600}) с использованием спектрофотометра UV-1280 (“Shimadzu”, Япония) и кюветы с длиной оптического пути 10 мм.

Таблица 1. Минимальная подавляющая концентрация пероксида водорода (мкг/мл)

Генотип	Среда					
	LB	ДК	ДК + 10 г/л лизина	М9	М9 + 10 г/л лизина	М9 + 5/25/50 мМ кадаверина
<i>ldcC+cadA+</i>	14.6	7.3	14.6	7.3	7.3	7.3/7.3/7.3
<i>ldcC-cadA-</i>	14.6	14.6	14.6	7.3	7.3	7.3/7.3/7.3
<i>ldcC+cadA-</i>	14.6	7.3	14.6	7.3	7.3	7.3/7.3/7.3
<i>ldcC-cadA+</i>	14.6	14.6	14.6	7.3	7.3	7.3/7.3/7.3

Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) пероксида водорода. МПК определяли методом двукратных серийных разведений пероксида водорода в лунках 96-луночных планшетов. Суспензию бактериальных клеток для анализа готовили, как описано в Руководстве по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам [17] с некоторыми модификациями. Клетки предварительно культивировали в 5 мл среды М9 с добавкой 0.4% глюкозы, бульона LB или декарбоксилазного бульона при 37°C без перемешивания в течение 16–18 ч. В случае культивирования на М9 делали два пассажа культуры. Затем полученные культуры разводили до оптической плотности $A_{625} = 0.09$ и еще в 100 раз в среде соответствующего состава (указаны в табл. 1) и вносили 1 : 1 в лунки планшета, содержащие среду и пероксид водорода. Конечная концентрация бактерий в каждой лунке составляла примерно 5×10^5 КОЕ/мл. Далее планшеты инкубировали при 37°C в течение 18–20 ч. Минимальной подавляющей концентрацией считали наименьшую концентрацию, которая подавляла видимый рост бактерий.

Определение чувствительности бактериальных клеток к пероксиду водорода. Жизнеспособность бактериальных клеток оценивали по изменению количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в культуре. Для определения количества КОЕ культуру клеток разводили в физрастворе и 10 мкл полученной суспензии наносили на поверхность агара LB (“Sigma”, США). Выживаемость рассчитывали в процентах от количества КОЕ в момент добавления пероксида водорода.

В серии экспериментов клетки культивировали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, содержащих 50 мл бульона LB, при 37°C без перемешивания (0 об./мин) или с перемешиванием (100 об./мин) в течение 16–18 ч. Полученные культуры разводили в свежей питательной среде до оптической плотности $A_{600} = 0.1$ и культивировали в описанных выше условиях. После достижения оптической плотности $A_{600} = 0.3$, 4.5 мл культуры переносили в пробирки с 0.5 мл раствора пероксида водорода и продолжали культивирование.

В другой серии экспериментов клетки культивировали в пробирках, содержащих 5 мл декарбоксилазного бульона Мёллера (бульон ДК) (“Sigma”, США) без добавок, с добавкой 10 г/л лизина гидрохлорида или 10 мМ кадаверина дигидрохлорида при 37°C без перемешивания в течение 16–18 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием (16000 g, 2 мин) и ресуспендировали в физрастворе, процедуру повторяли дважды. Отмытые сконцентрированные клетки переносили в пробирки со свежим ДК-бульоном для получения культур с примерно одинаковой плотностью ($5.2 \pm 2.4 \times 10^6$ КОЕ/мл, среднее \pm стандартное отклонение) и добавляли пероксид водорода (конечный объем культуры со всеми добавками составил 3 мл). В отмытых клетках до воздействия пероксида водорода определяли концентрацию внутриклеточных полиаминов.

Определение концентрации полиаминов в бактериальных клетках. 500 мкл суспензии клеток центрифугировали (16000 g, 2 мин), полученный осадок заливали 100 мкл 0.4 М хлорной кислоты. На этом этапе пробы замораживали и хранили при –20°C. Размороженные пробы интенсивно встряхивали на шейкере в течение 40 мин, после чего обломки клеток осаждали центрифугированием при 16000 g 5 мин. Надосадочную жидкость (клеточный экстракт) использовали для проведения реакции дансилирования. Клеточный экстракт, насыщенный раствор карбоната натрия и раствор дансилхлорида (2.7 мг/мл ацетона) в соотношении 1 : 1 : 2 помещали в плотно закрывающиеся микропробирки и инкубировали 2 ч при 37°C. Затем содержимое микропробирок выпаривали, осадок заливали 50 мкл бензола. Бензольный экстракт (10 мкл) наносили на поверхность пластин для ТСХ с силикагелевым покрытием Sorbfil ПТ-СХ-АФ-В (Россия). Разделение проводили в двух последовательных системах: 1 – бензол : триэтиламин 10 : 1, 2 – бензол : карбинол 10 : 0.45. Пластины фотографировали в ультрафиолетовом свете (340 нм) и измеряли интенсивность свечения пятен дансил-полиаминов на цифровом изображении. Идентификацию веществ и расчет концентрации полиаминов проводили методом внешнего стандарта. В качестве стандарта использовали

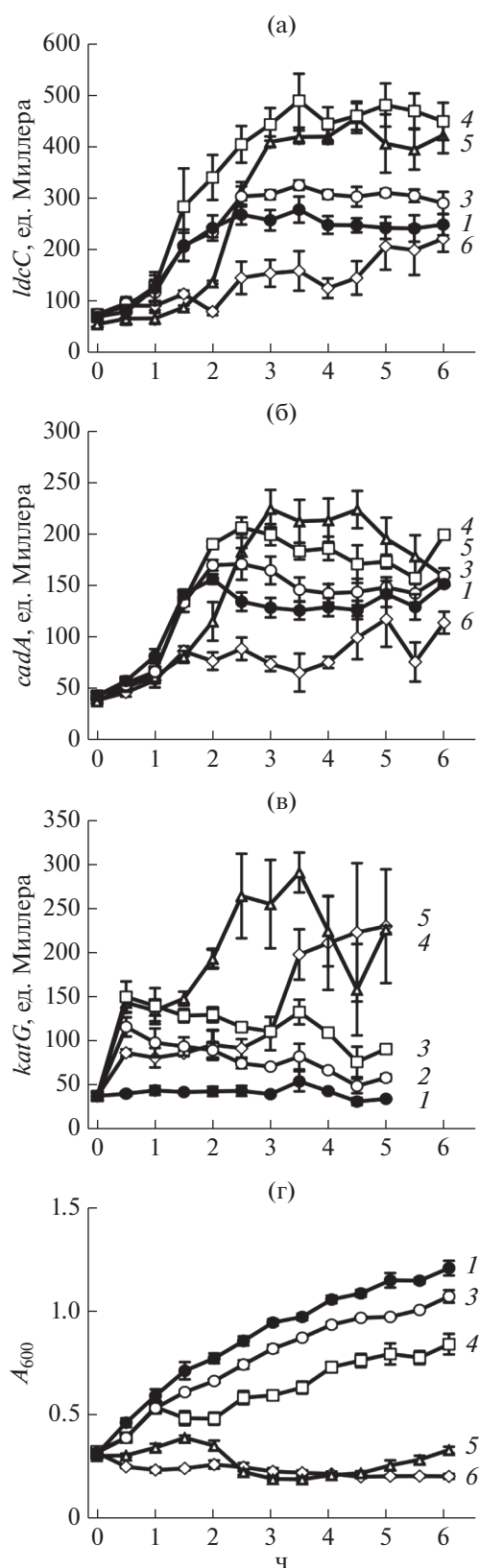


Рис. 1. Влияние пероксида водорода на экспрессию генов *ldcC* (а), *cadA* (б), *katG* (в) и оптическую плотность культуры *E. coli* (г): 1 – контроль без добавки H_2O_2 , 2 – 0.1, 3 – 0.5, 4 – 1.0, 5 – 3.0 и 6 – 6.0 мМ H_2O_2 .

растворы гидрохлоридов путресцина, кадаверина и спермидина, подвергнутые той же процедуре что и клеточные экстракты.

Статистическая обработка результатов. Обработка результатов проведена с использованием пакета программ Statistica 6.0 (“StatSoft Inc.”, США). Данные представлены как среднее и стандартная ошибка среднего, рассчитанные на основе результатов не менее трех отдельных экспериментов. Оценка статистической значимости различий средних сравниваемых групп произведена с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние пероксида водорода на экспрессию генов *ldcC* и *cadA*. В ранних исследованиях показано, что в клетках *E. coli*, подвергнутых действию H_2O_2 , возрастала активность лизиндекарбоксилазы и, как следствие, наблюдалось накопление кадаверина [13]. Фермент, катализирующий синтез кадаверина – лизиндекарбоксилаза, у *E. coli* представлен двумя изоформами, которые кодируются генами *ldcC* и *cadA* [18]. С использованием метода генных слияний исследовали изменение уровня экспрессии этих генов в ответ на воздействие H_2O_2 в концентрации 0.1–6.0 мМ. Добавка в среду H_2O_2 в концентрации 0.5 мМ и выше вызывала повышение уровня экспрессии как гена *ldcC*, так и гена *cadA* (рис. 1а, 1б). Снижение экспрессии генов ниже уровня контроля в присутствии 6 мМ H_2O_2 связано с гибелью бактериальных клеток. Для сравнения в тех же условиях исследовали влияние H_2O_2 на экспрессию гена *katG*, кодирующего каталазу и входящего в *OxyR*-регулон защиты от пероксидного окислительного стресса (рис. 1в). Установлено, что для активации генов, кодирующих лизиндекарбоксилазы, требовались более высокие концентрации H_2O_2 , и индукция их экспрессии происходила позднее по сравнению с геном *katG* (1.5–2.0 и 0.5 ч соответственно). Можно предположить, что регуляция экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина, в условиях воздействия пероксида водорода отличается от регуляции экспрессии генов, входящих в *oxyR*-регулон, и опосредована вторичными регуляторами. Тем не менее, увеличение концентрации H_2O_2 можно рассматривать как сигнал для повышения экспрессии генов синтеза кадаверина.

Влияние экзогенного кадаверина на чувствительность бактериальных клеток к перексиду водорода. Присутствие в среде кадаверина в концентрации 5–50 мМ не оказывало влияния на ингибирующее бактериальный рост действие H_2O_2 , как было установлено с применением метода двукратных серийных разведений (табл. 1).

Таблица 2. Влияние состава среды культивирования на содержание полиаминов в клетках *E. coli* в зависимости от их способности синтезировать кадаверин*

Среда	Генотип	Полиамины, нмоль/мг сухой биомассы		
		кадаверин	путресцин	спермидин
ДК	<i>ldcC+cadA+</i>	5.2 ± 0.5	7.7 ± 2.9	5.5 ± 1.5
	<i>ldcC-cadA-</i>	1.4 ± 0.4**	7.6 ± 2.1	4.6 ± 2.2
ДК + 10 г/л лизина	<i>ldcC+cadA+</i>	39.7 ± 3.7***	2.1 ± 0.2***	7.3 ± 3.9
	<i>ldcC-cadA-</i>	1.8 ± 0.1**	7.9 ± 4.2	5.2 ± 1.4
ДК + 10 мМ кадаверина	<i>ldcC+cadA+</i>	9.3 ± 1.3***	6.7 ± 1.1	4.5 ± 0.1
	<i>ldcC-cadA-</i>	8.3 ± 1.3***	5.6 ± 2.2	3.6 ± 1.6

* Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; ** статистически значимые отличия от кадаверин-профицитного штамма; *** статистически значимые отличия от культуры, выращенной на ДК-бульоне без добавок.

Накопление кадаверина в клетках кадаверин-дефицитного штамма за счет экспорта из среды способствовало снижению чувствительности к пероксиду водорода (табл. 2, рис. 2г). В тоже время, более высокий уровень кадаверина в клетках штамма дикого типа, выращенных на среде с добавкой экзогенного кадаверина, обуславливал повышение их чувствительности к H_2O_2 в сравнении с клетками, выращенными на среде, не содержащей кадаверин (табл. 2, рис. 2в). С чем связано повышение скорости отмирания клеток, выращенных в присутствии экзогенного кадаверина, на первых этапах воздействия H_2O_2 не ясно. Поскольку сравниваемые штаммы, в целом, изогенны и отличались лишь наличием генов *ldcC* и *cadA*, возможно, что эффект экзогенного кадаверина обусловлен его влиянием на активность системы биосинтеза кадаверина.

Вклад биосинтеза кадаверина в адаптацию бактериальных клеток к пероксидному окислительному стрессу. Для оценки вклада биосинтеза кадаверина в адаптацию бактерий к H_2O_2 проведено сравнение выживаемости штамма дикого типа и штаммов с делецией генов *ldcC* и *cadA*. Разница в чувствительности к H_2O_2 не была обнаружена при культивировании на полноценной среде в условиях микроаэрации (без перемешивания), тогда как в аэробных условиях скорость отмирания клеток способных к синтезу кадаверина была ниже по сравнению с бактериями, не способными синтезировать данный полиамин (рис. 3). Обе лизиндекарбоксилазы принимали участие в ответе на H_2O_2 , но больший вклад в выживаемость бактерий в данных условиях вносила лизиндекарбоксилаза *LdcC* (рис. 3в).

На бульоне ДК, не содержащем лизин, орнитин, аргинин и глутамат, скорость отмирания культуры микроорганизмов, неспособных синтезировать кадаверин была выше по сравнению со штаммом дикого типа в условиях микроаэрации (рис. 2). Поскольку известно, что аминокислоты

способны оказывать антиоксидантное действие [14, 19], отсутствие некоторых из них в составе среды позволило более ярко продемонстрировать эффект кадаверина, накопление которого в клетке наблюдалось и при культивировании в отсутствие экзогенного лизина (табл. 2).

Следует отметить, что клетки, выращенные в условиях низкой аэрации (без перемешивания) были более чувствительны к экзогенному H_2O_2 по сравнению с клетками, культивируемыми в условиях более высокой аэрации (перемешивание со скоростью вращения 100 об./мин) (рис. 3а, 3б).

Выживаемость бактерий также зависела от количества кадаверина в клетках в момент добавки H_2O_2 . Для получения бактерий с разным уровнем внутриклеточного кадаверина их выращивали на среде ДК с добавкой и без добавки лизина. Внутриклеточная концентрация кадаверина уменьшалась в ряду – *ldcC + cadA* (ДК + Лиз) > *ldcC + cadA* + (ДК) > *ldcC-cadA*-(ДК) и была обратно пропорциональна скорости отмирания культуры (табл. 2, рис. 2в, 2г).

Лизин сам по себе оказывал защитное действие в условиях пероксидного окислительного стресса, поскольку его наличие в среде увеличивало выживаемость бактериальных клеток, лишенных генов синтеза кадаверина (рис. 3г). Аналогичный эффект лизина был обнаружен на эукариотных микроорганизмах *Saccharomyces cerevisiae* [20]. Клетки дрожжей, выращенные на среде с добавкой лизина и характеризующиеся повышенным внутриклеточным содержанием данной аминокислоты, были менее чувствительны к H_2O_2 по сравнению с клетками, выращенными на среде без добавки лизина. Авторы статьи [20] исключили прямое антиоксидантное действие лизина (способность нейтрализовать H_2O_2) и предположили, что основной механизм защитного действия экзогенного лизина связан с экономией восстановленного НАДФН, вследствие снижения его расхода на био-

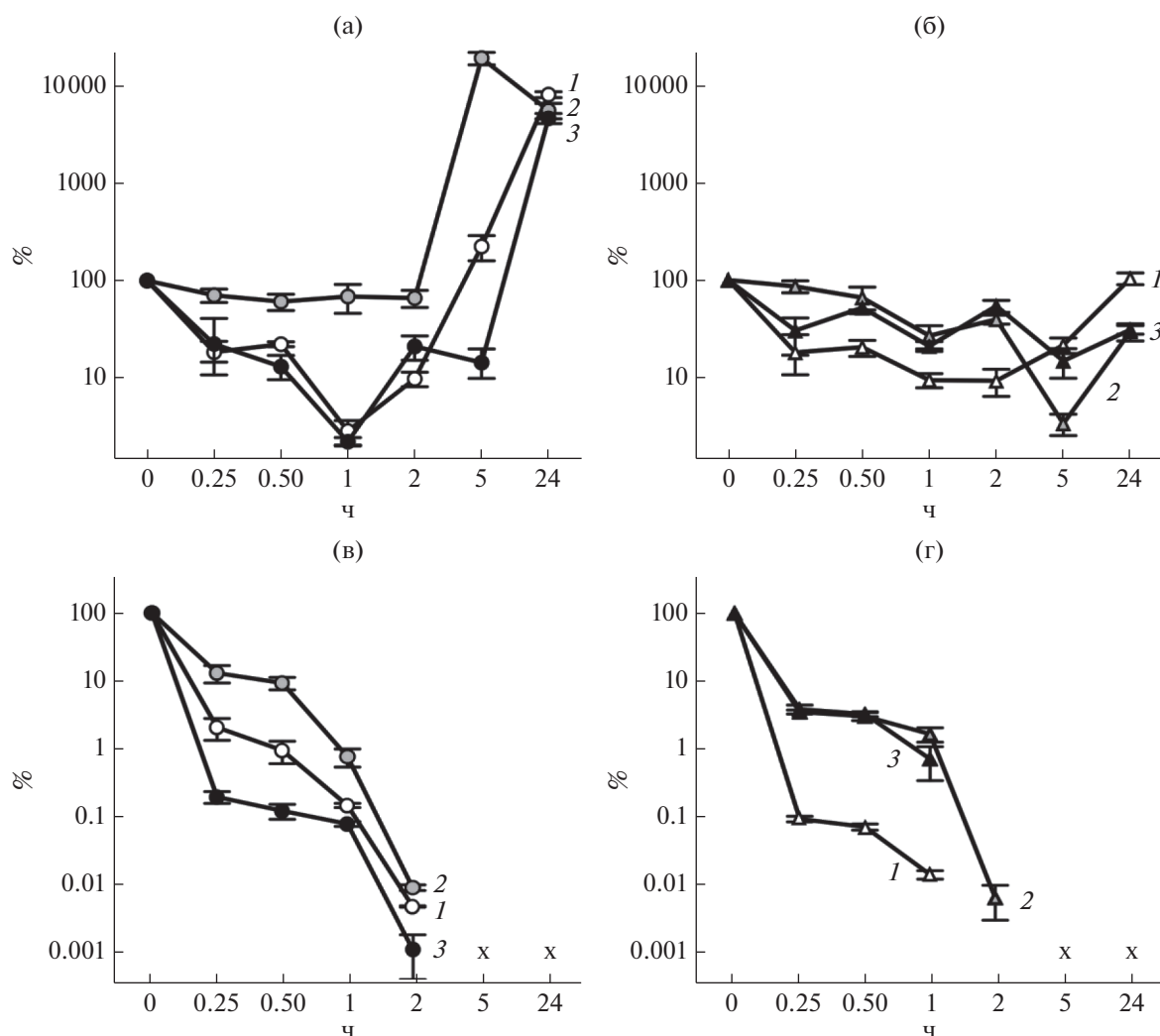


Рис. 2. Выживаемость (%) клеток *E. coli* штамма дикого типа BW25141 (а, в) и штамма BW25141 Δ *ldcC* Δ *cadA* (б, г) при воздействии 3 (а, б) и 6 мМ (в, г) H_2O_2 при культивировании в ДК-бульоне без добавок (1), с добавкой 10 г/л лизина (2) или 10 мМ кадаверина (3). Данные о внутриклеточной концентрации кадаверина в момент добавки H_2O_2 представлены в табл. 2.

синтез лизина и перенаправления на другие нужды, в том числе для восстановления глутатиона и усиления антиоксидантной защиты. Возможно, наблюдаемое снижение чувствительности к пероксиду водорода клеток, выращиваемых в условиях интенсивной аэрации, по сравнению с клетками, выращиваемыми в условиях микроаэрации, обусловлено более высоким соотношением НАДФН/НАДФ [21].

Также в работе [20] был сделан вывод, что защитный эффект экзогенного лизина, скорее всего, не связан с накоплением в клетках дрожжей кадаверина, поскольку внесение в среду кадаверина не влияло на уровень чувствительности к пероксиду водорода. Как показали исследования, проведенные в настоящей работе, эффекты экзогенного и эндогенного кадаверина в условиях пе-

роксидного окислительного стресса различны. Влияние уровня эндогенного кадаверина на устойчивость дрожжей к пероксиду водорода подробно не изучено, хотя показано, что клетки, обладающие активностью лизиндекарбоксилазы и практически ее лишенные, не отличались по уровню чувствительности. Такие эксперименты проведены в условиях культивирования в среде, не содержащей лизин. Возможно, при культивировании в среде, содержащей лизин, накапливались бы более значительные количества кадаверина, что позволило бы выявить его роль в адаптации к пероксидному стрессу у эукариотных микроорганизмов.

Роль эндогенного окислительного стресса в активации экспрессии генов *ldcC* и *cadA* в ответ на воздействие антибиотика. Известно, что воздей-

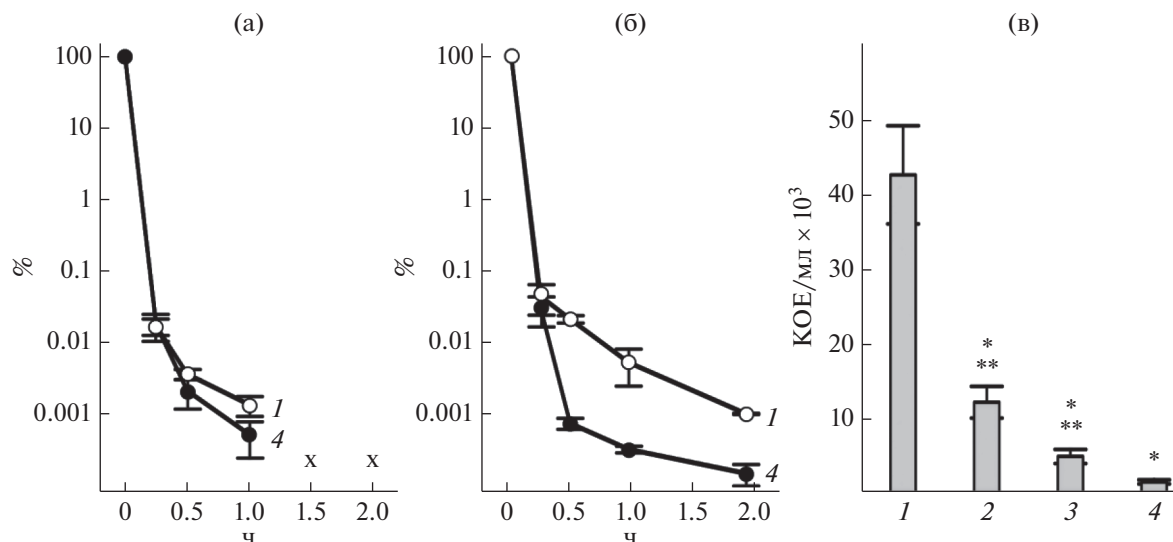


Рис. 3. Выживаемость (%; а, б) и количество КОЕ в культуре *E. coli* (в) штаммов дикого типа BW25141 (1), BW25141 Δ *cadA* (2), BW25141 Δ *ldcC* (3) и BW25141 Δ *ldcC* Δ *cadA* (4) при воздействии 6 мМ H₂O₂. Клетки культивировали в среде LB без перемешивания (а) и с перемешиванием (100 об./мин, б, в). Количество КОЕ (в) измеряли через 30 мин после воздействия H₂O₂. (*Статистически значимые отличия от штамма дикого типа, **статистически значимые отличия от двойного нокаута, *t*-критерий, *p* ≤ 0.05).

ствии антибиотиков сопровождается накоплением в бактериальных клетках АФК и активацией экспрессии генов антиоксидантной защиты, входящих в *oxyR*-регулон [22, 23]. Также показано, что в ответ на воздействие антибиотиков в клетках повышается уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина [15]. Можно предположить, что развитие эндогенного окислительного стресса, может быть сигналом для активации системы биосинтеза кадаверина в ответ на воздействие антибиотиков.

Для оценки вклада эндогенных АФК, в том числе H₂O₂, в активацию генов *ldcC* и *cadA* был измерен уровень их экспрессии в клетках, подвергнутых действию фторхинолона левофлоксацина, в присутствии и в отсутствие антиоксиданта тиомочевина. Как было показано ранее, воздействие использованной в настоящей работе концентрации левофлоксацина вызывает повышение экспрессии гена *katG* [23]. Основное антиоксидантное действие тиомочевина связывают с нейтрализацией пероксида водорода и, как следствие, ингибированием реакции Фентона [24, 25]. Была подобрана концентрация тиомочевина, которая снижала до базового уровня экспрессию гена *katG*, индуцированную пероксидом водорода в концентрации, вызывавшей активацию генов синтеза кадаверина (рис. 4, рис. 1а, 1б). Добавка тиомочевина снижала как базовый уровень, так и индуцированный воздействием антибиотика уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина (рис. 4). В присутствии антиоксиданта индуцированный уровень экспрессии

гена *ldcC* значительно снижался, а экспрессия гена *cadA* в клетках, подвергнутых воздействию антибиотика, возвращалась к базовому уровню. Следовательно, уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина, частично зависел от интенсивности эндогенного окислительного стресса.

Таким образом, экзогенный пероксид водорода вызывал в клетках *E. coli* активацию генов, кодирующих ферменты синтеза кадаверина. Повышение внутриклеточного содержания АФК, в том числе пероксида водорода, за счет эндогенного образования, в частности, в результате воздействия фторхинолонового антибиотика, также являлось сигналом к повышению экспрессии генов *ldcC* и *cadA*. Накопление кадаверина в клетке являлось защитной реакцией на повышение концентрации H₂O₂ и вносило вклад в адаптацию бактерий к пероксидному окислительному стрессу и, возможно, обуславливало преадаптацию к другим стрессирующим воздействиям. В целом, бактерии, неспособные синтезировать кадаверин в результате декарбоксилирования лизина, были более чувствительны к H₂O₂ по сравнению с кадаверин-профицитными микроорганизмами. Жизнеспособность бактериальных клеток также напрямую зависела от уровня внутриклеточного кадаверина в момент начала воздействия пероксида водорода. Можно предположить, что защитное действие кадаверина может быть связано с прямым антиоксидантным действием, а также со стабилизацией и экранированием структур бактериальных клеток, таких как клеточная стенка и ри-

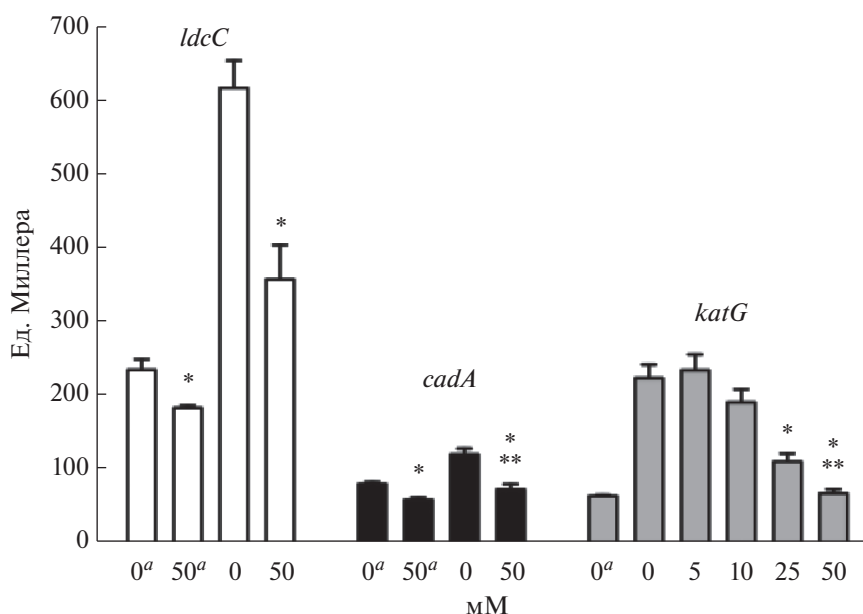


Рис. 4. Влияние тиомочевины на экспрессию генов *ldcC* и *cadA* в клетках *E. coli*, подвергнутых действию 0.1 мкг/мл левофлоксацина, экспрессию гена *katG* в клетках, подвергнутых действию 1 мМ пероксида водорода (*a* – без добавок контроль). Экспрессию измеряли через 3 ч после внесения антибиотика/H₂O₂. (* Статистически значимые отличия от культуры без добавки тиомочевины, ** отсутствие статистически значимых отличий от культуры без добавки тиомочевины и антибиотика/H₂O₂, *t*-критерий, *p* ≤ 0.05).

босомы [26–29]. Механизмы, лежащие в основе защитного действия кадаверина при адаптации к пероксидному окислительному стрессу, требуют дальнейшего изучения.

Авторы выражают искреннюю благодарность профессору Брюсу Демплу (Stony Brook University Medical School, Stony Brook, NY) за предоставленные штаммы *E. coli*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (АААА-А19-119112290009-1).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проведены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Linley E., Denyer S.P., McDonnell G., Simons C., Moulden J.Y. // J. Antimicrob. Chemother. 2012. V. 67. № 7. P. 1589–1596.
2. McEvoy B., Rowan N.J. // J. Appl. Microbiol. 2019. V. 127. № 5. P. 1403–1420.
3. McDonnell G., Russell A.D. // Clin. Microbiol. Rev. 1999. V. 12. № 1. P. 147–179.
4. Fichet G., Antloga K., Comoy E., Deslys J.P., McDonnell G. // J. Hosp. Infect. 2007. V. 67. № 3. P. 278–286.
5. Kislenco V.N., Berlin A.A. // Russ. Chem. Rev. 1991. V. 60. № 5. P. 470–488.
6. González-Flecha B., Demple B. // J. Biol. Chem. 1995. V. 70. № 23. P. 13681–13687.
7. Mols M., Abee T. // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. № 6. P. 1387–1394.
8. Akhova A.V., Sekatskaya P.A., Tkachenko, A.G. // Appl. Biochem. Microbiol. 2019. V. 55. P. 582–587.
9. Gu M., Imlay J.A. // Mol. Microbiol. 2011. V. 79. № 5. P. 1136–1150.
10. Imlay J.A. // Environ. Microbiol. 2019. V. 21. № 2. P. 521–530.
11. Хмелевцова Л.Е., Сазыкин И.С., Ажогина Т.Н., Сазыкина М.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 4. С. 327–335.
12. Sen A., Imlay J.A. // Front. Immunol. 2021. V. 12. 667343.
13. Tkachenko A.G., Nesterova L.Y. // Biochemistry (Mosc). 2003. V. 68. № 8. P. 850–856.
14. Chattopadhyay M.K., Tabor C.W., Tabor H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 5. P. 2261–2265.
15. Akhova A., Nesterova L., Shumkov M., Tkachenko A. // Res. Microbiol. 2021. V. 172. № 7–8. 103881.
16. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. 466 p.
17. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI Document M100-S24. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, Ed. 30. 2014. V. 40. № 1. 226 p.
18. Kikuchi Y., Kurahashi O., Nagano T., Kamio Y. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1998. V. 62. № 6. P. 1267–1270.
19. Wascher T.C., Posch K., Wallner S., Hermetter A., Kostner G.M., Graier W.F. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. V. 234. № 1. P. 35–38.

20. Olin-Sandoval V., Yu J.S.L., Miller-Fleming L., Alam M.T., Kamrad S., Correia-Melo C. et al. // Nature. 2019. V. 572. P. 249–253.
21. Godoy M.S., Nikel P.I., Cabrera Gomez J.G., Pettinari M.J. // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 82. № 1. P. 244–254.
22. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. // Cell. 2007. V. 130. № 5. P. 797–810.
23. Akhova A.V., Tkachenko A.G. // FEMS Microbiol. Lett. 2014. V. 353. № 1. P. 69–76.
24. Randall L.O. // J. Biol. Chem. 1946. V. 164. P. 521–527.
25. Anbar M., Neta P. // Int. J. Appl. Radiat. Isot. 1967. V. 18. P. 493–523.
26. Gaboriau F., Vaultier M., Moulinoux J., Delcros J. // Redox Rep. 2005. V. 10. P. 9–18.
27. Spirin A., Gavrilova L. The ribosome. N.Y.: Springer-Verlag, 1969. 164 p.
28. Kojima S., Kaneko J., Abe N., Takatsuka Y., Kamio Y. // J. Bacteriol. 2011. V. 193. P. 2347–2350.
29. Akhova A.V., Tkachenko A.G. // Korean. J. Microbiol. 2020. V. 56. P. 103–110.

Cadaverine Biosynthesis in *Escherichia coli* Adaptation to Hydrogen Peroxide

A. V. Akhova^{a, *} and A. G. Tkachenko^a

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, 614081 Russia

*e-mail: akhovan@mail.ru

This study demonstrates the role of cadaverine in *Escherichia coli* adaptation to hydrogen peroxide. A dose-dependent increase in the expression of the *ldcC* and *cadA* genes encoding the cadaverine-synthesizing enzymes was shown in cells exposed to exogenous hydrogen peroxide. An inverse relation between the bacterial sensitivity and the level of intracellular cadaverine at the time of hydrogen peroxide addition was found. Sensitivity to hydrogen peroxide also depended on the ability to synthesize cadaverine (presence of the *ldcC* and *cadA* genes). In particular, the death rate of cells incapable of synthesizing cadaverine was higher compared to cadaverine-producing cells. Sensitivity to hydrogen peroxide increased in a series of isogenic strains with the genotype: wild type < $\Delta cadA$ < $\Delta ldcC$ < $\Delta ldcC \Delta cadA$. The role of the accumulation of reactive oxygen species, including hydrogen peroxide, in the activation of the *ldcC* and *cadA* genes in cells exposed to the antibiotic levofloxacin was also shown.

Keywords: oxidative stress, cadaverine, polyamines, lysine decarboxylase, hydrogen peroxide, reactive oxygen species

УДК 579:873:579.222.2

ГАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ РОДА *Glutamicibacter* – ДЕСТРУКТОРЫ ТЕРЕФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

© 2022 г. О. В. Ястребова^{1, *}, А. А. Мальшева², Е. Г. Плотникова^{1, 2}¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, 614068 Россия

*e-mail: olyastr@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2022 г.

После доработки 14.04.2022 г.

Принята к публикации 26.04.2022 г.

Терефталевая кислота (ТФК), изомер *орто*-фталевой кислоты, широко используется в химической промышленности для получения искусственных волокон и пластмасс, в том числе полиэтилентерефталата, и является распространенным загрязнителем окружающей среды. Изучена способность двух штаммов *Glutamicibacter* spp. PB8-1 (=VKM Ac-2934D) и BO25 (=VKM Ac2935D), выделенных из района солеразработок (Пермский край, Россия), к росту на ТФК как единственном источнике углерода и энергии. Штаммы PB8-1 и BO25 способны утилизировать высокие концентрации ТФК (30 г/л), что для бактерий-деструкторов ТФК показано впервые. Штаммы PB8-1 и BO25 являются галотолерантными бактериями: растут в среде как без NaCl, так и при содержании NaCl до 90 г/л в богатой среде и до 60 г/л в минеральной среде с ТФК. Бактерии, способные к деструкции ТФК в условиях засоления, ранее описаны не были. Рост штамма BO25 на ТФК сопровождался накоплением и последующим разложением протокатеховой кислоты (ПКК), что позволило предположить метаболизм ТФК через ПКК, описанный ранее для бактерий разных таксонов, в том числе актинобактерий. Таким образом, деструкторы ТФК *Glutamicibacter* spp. PB8-1 и BO25 являются перспективными для разработки методов биоремедиации засоленных почв и сточных вод, загрязненных ТФК.

Ключевые слова: аэробные бактерии, *Glutamicibacter*, терефталевая кислота, деструкция, хлорид натрия

DOI: 10.31857/S0555109922050166

Фталаты – соли и эфиры *орто*-фталевой кислоты, простейшей из двухосновных ароматических карбоновых кислот, которая является изомером терефталевой и изофталевой кислот. Фталаты широко применяются в промышленности в качестве пластификаторов при производстве пластмасс и большинства видов резины. Эфиры фталевой кислоты (дибутилфталат, диметилфталат, диэтилфталат) используются для пластификации поливинилхлорида (ПВХ), при синтезе полиэфирных волокон, полиэтилена, а также в производстве строительных и смазочных материалов, лаков, косметики [1–3]. Терефталевая кислота (ТФК) – изомер фталевой кислоты с *пара*-расположением карбоксильных групп, широко применяется для получения насыщенных полиэфиров, химических волокон, пластмасс, красителей. ТФК является основным исходным соединением для получения полиэтилентерефталата (ПЭТ), который составляет 90% от общего производимого количества насыщенных полиэфиров и используется

в производстве искусственного волокна, пластиковых бутылок, пластмассы. Мировое годовое производство полиэтилентерефталата превысило 30 миллионов тонн, при этом потребность в ПЭТ постоянно растет [4]. Наряду с 2-этилгексанолом, ТФК является сырьем для производства диоктилтерефталата (ДОТФ) – ключевого компонента в производстве обоев, линолеума, напольных и кровельных материалов и другой продукции строительной отрасли [5].

В связи с широким применением в промышленном производстве, фталаты (в том числе, ТФК) являются повсеместными загрязнителями окружающей среды и обнаруживаются в настоящее время в различных экосистемах, в том числе в почве, морской воде, донных отложениях [6–8]. При производстве 1 т ТФК обычно образуется 3–10 т сточных вод, содержащих высокие концентрации этого соединения. В Китае производственные мощности по производству ТФК достигли 12 млн т/г, при этом объем сточных вод со-

ставлял около 30 миллионов т/г с концентрацией выбросов ТФК более 1000 мг/л [9, 10]. Известно, что терефталевая кислота оказывает неблагоприятное воздействие на клетки человека и животных, обладает гепатотоксичными и канцерогенными свойствами, в связи с чем, необходима утилизация этого широко распространенного поллютанта [6, 11].

К настоящему времени разработаны физические и химические методы разложения ТФК, однако данные методы являются сложными и дорогостоящими [12, 13]. Микробная деградация ТФК является альтернативным экологически безопасным и экономичным методом [10, 14]. Из литературы известна способность бактерий различных филогенетических групп к разложению ТФК. Так, изучена способность к росту и деструкции ТФК у грамотрицательных бактерий рода *Comamonas*, *Pseudomonas* [14, 15]. Среди грамположительных бактерий, утилизирующих ТФК, описаны несколько штаммов родов *Rhodococcus*, *Arthrobacter* [10, 16, 17]. В то же время, бактериальная деструкция ТФК изучена менее детально, чем биодеградация орто-фталевой кислоты [3, 18]. Известно, что разложение ТФК начинается с дигидроксилирования ароматического кольца с образованием *цис*-1,2-дигидрокси-1,2-дигидротерефталата, при трансформации которого образуется протокатеховая кислота (ПКК) – ключевой метаболит утилизации изомеров и сложных эфиров орто-фталевой кислоты [3, 15, 16]. К настоящему времени в литературе не найдено статей, посвященных деструкции ТФК актинобактериями рода *Glutamicibacter*.

Цель настоящей работы – характеристика двух бактерий рода *Glutamicibacter*, выделенных из района солеразработок, способных к деструкции терефталевой кислоты.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе использованы бактериальные штаммы ВО25 и РВ8-1 из коллекции лаборатории микробиологии техногенных экосистем “ИЭГМ УрО РАН”, которые были идентифицированы как представители рода *Glutamicibacter* [19].

Штаммы ВО25 (=ВКМ Ас-2935D), РВ8-1 (ВКМ Ас-2934D) выделены из образцов, отобранных на территории промышленных солеразработок (г. Березники, Россия). Штамм ВО25 выделен из образца техногенно-минеральных образований калийного производства БКПРУ-1 методом прямого высева на агаризованную богатую среду Раймонда (БСР) [19] с добавлением 50 г/л NaCl. Штамм РВ8-1 выделен из образца ризосферной почвы, отобранного вблизи солеотвала БКПРУ-3 методом накопительного культивирования в минеральной среде Раймонда с орто-фта-

левой кислотой (1 г/л) в качестве субстрата и добавлением 30 г/л NaCl [19].

Среды и условия культивирования. Для выращивания бактерий использовали минеральную среду Раймонда (МСР) следующего состава (г/л): NH_4NO_3 – 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2, K_2HPO_4 – 2.0, Na_2HPO_4 – 3.0, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, Na_2CO_3 – 0.1, 2 мл/л 1%-ного раствора $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 1 мл/л 1%-ного раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [20]. В качестве субстратов использовали ТФК, орто-фталевую кислоту (ОФК), дибутилфталат (ДФБ), диметилфталат (ДФМ), протокатеховую кислоту (ПКК), фенантрен, бифенил, салицилат, бензоат и нафталин в концентрации 1.0 г/л. Характеристики роста штаммов изучали в жидкой среде Раймонда с добавлением NaCl в концентрации 30–100 г/л. Для приготовления богатой среды Раймонда (БСР) в минеральную среду Раймонда добавляли 5 г/л триптона и 2.5 г/л дрожжевого экстракта в качестве субстратов. Культивирование микроорганизмов в жидких средах проводили при 28°C на термостатируемой качалке при 100 об./мин. Для получения агаризованных сред добавляли агар-агар (“Helicon”, Россия) в концентрации 15 г/л. Культивирование микроорганизмов осуществляли в термостате при 28°C.

Характеристики роста бактерий. Рост бактерий при разных концентрациях хлорида натрия изучали в периодической культуре в жидкой среде МСР с ТФК (1.0 г/л) в присутствии 30, 60, 70 г/л NaCl и без соли в среде. В качестве инокулята использовали культуры в экспоненциальной фазе роста, выращенные на МСР, без добавления NaCl, с ТФК в качестве субстрата. Рост бактерий при разных концентрациях ТФК оценивали в жидкой минеральной среде К1 [22], в которую вносили субстрат в концентрациях 1, 10, 20, 30, 40 г/л. В качестве инокулята использовали культуры в экспоненциальной фазе роста, выращенные на среде К1 с ТФК (1 г/л) в качестве субстрата. Культуры бактерий выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (объем среды – 100 мл) при 28°C, с аэрацией на термокачалке при 100 об/мин. Оптическую плотность (ОП_{600}) культуральной жидкости определяли на спектрофотометре UV Visible BioSpec-mini (“Shimadzu”, Япония) при длине волны 600 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Расчет удельной скорости роста (μ , ч^{-1}) проводили по стандартной формуле: $\mu = (\ln B_2 - \ln B_1) / (t_2 - t_1)$, где B_1 и B_2 – оптические плотности культуры в моменты времени t_1 и t_2 , соответственно [21].

При оценке роста бактерий при разных рН использовали среду БСР с 30 г/л NaCl, штаммы культивировали на агаризованной среде при рН 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0. Рост оценивали по наличию бактериальных колоний на седьмой день культивирования [21].

Таблица 1. Рост штаммов рода *Glutamicibacter* на моно(поли)ароматических соединениях*

Штамм	Субстрат									
	ОФК	ТФК	ДФФ	ДМФ	ПКК	Фен	Биф	Сал	Бен	Наф
ВО25	++	++	±	±	++	–	+	+	+	±
РВ8-1	++	++	+	±	++	–	–	+	+	+

Примечание. “+++” – $OP_{600} \geq 0.5$; “+” – $OP_{600} = 0.35-0.5$; “±” – $OP_{600} = 0.2-0.35$; “–” – отсутствие роста. *ОФК – орто-фталевая кислота, ТФК – терефталевая кислота, ДБФ – дибутилфталат, ДМФ – диметилфталат, ПКК – протокатеховая кислота, Фен – фенантрен, Биф – бифенил, Сал – салицилат, Бен – бензоат, Наф – нафталин.

Потребление ТФК и определение ПКК. ТФК и ПКК в среде для выращивания определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографа LC-20AD Prominace (“Shimadzu”, Япония) с колонкой (C-18 150 × 4.6 мм; “Shima-Aldrich”, США) и УФ-детектором SPD-20А (при 205 нм) в системе ацетонитрил–0.1%-ная H_3PO_4 (70 : 30). В качестве подвижной фазы использовали 80%-ный раствор ацетонитрила при скорости потока 1.0 мл/мин и температуре 40°C. Идентификацию проводили при сравнении времени выхода пиков экстрактов со стандартными растворами ТФК и ПКК в концентрациях 50 и 100 мг/л, время удерживания (t_R) ТФК и ПКК составляло 5.1 мин и 4.8 мин, соответственно. Количественное содержание рассчитывали с помощью пакета программ “LCsolution” (“Shimadzu”, Япония). Расчет удельной скорости утилизации (μ , сут⁻¹) проводили по стандартной формуле: $\mu = (\ln C_1 - \ln C_2)/(t_2 - t_1)$, где C_1 , C_2 – концентрация субстрата в начальный и конечный момент времени t_1 и t_2 , соответственно [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика штаммов. На основании морфо-физиологических и генетических (анализ гена 16S рРНК) характеристик штаммы ВО25 и РВ8-1 были идентифицированы как представители рода *Glutamicibacter* (семейство *Micrococcaceae*). Показано, что штамм ВО25 филогенетически наиболее близок типовому штамму вида *G. halophytocola*, а штамм РВ8-1 – типовому штамму вида *G. arilaitensis* [19].

Штаммы ВО25 и РВ8-1 были выделены из образцов шлама и ризосферной почвы, отобранных на территории добычи и переработки калийно-магниевого солей Верхнекамского месторождения (Россия). Ранее было показано, что образцы из района солеразработок характеризовались как повышенным содержанием соли, так и присутствием стойких органических загрязнителей, в том числе фталатов [23, 24]. *Glutamicibacter* spp. ВО25, РВ8-1 обладали способностью к росту на моно- и полиароматических углеводородах при культивировании в присутствии 30 г/л NaCl. Штамм ВО25

показал умеренный рост на бензоате, ОФК, ДБФ, ДМФ, а также слабый рост на нафталине. Штамм РВ8-1 способен к росту на бензоате, ОФК, ДБФ, нафталине и слабому росту на ДМФ (табл. 1). В литературе описаны штаммы рода *Glutamicibacter*, растущие на фталатах и моноароматических углеводородах в качестве субстратов. Так, штамм *G. nicotianae* ZM05 способен к утилизации ОФК и сложных эфиров фталевой кислоты: ДБФ, ДМФ, диэтилфталата (ДЭФ), ди-*n*-пропилфталата, а также ПКК [25]. Штамм *G. nicotianae* MSSRF-PD35 способен к деструкции фенола и его производных, а также катехола [26].

Штаммы ВО25 и РВ8-1 хорошо росли при pH от 6.0 до 9.0 с оптимумом при 7.0. Аналогичные показатели pH были показаны ранее и для других видов рода *Glutamicibacter* [27].

Рост штаммов ВО25 и РВ8-1 в присутствии высоких концентраций соли. Установлено, что штаммы ВО25 и РВ8-1 способны к росту на агаризованной БСР как без добавления соли в среду культивирования, так и при содержании в среде до 90 г/л хлорида натрия. На агаризованной МСР с ТФК (1 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии штаммы росли при концентрации NaCl до 60 г/л в среде. Согласно полученным данным, штаммы ВО25 и РВ8-1 относятся к умеренно галотолерантным микроорганизмам по классификации Кашнера [28].

Изучено влияние различных концентраций NaCl на рост и потребление ТФК штаммами РВ8-1 и ВО25 в среде МСР с ТФК (1 г/л) в качестве субстрата (рис. 1, 2). Активный рост штаммов наблюдался в присутствии NaCl до 60 г/л в среде. Наибольшую плотность роста (OP_{600}) штаммов зафиксировали при культивировании без добавления NaCl. Высокие значения OP_{600} и скорости роста культур наблюдали также в присутствии 30 г/л NaCl. Повышение концентрации NaCl в среде до 60 г/л NaCl привело к увеличению лаг-фазы роста и к снижению максимальных значений OP_{600} штаммов, однако удельная скорость роста снижалась незначительно (табл. 2). У штамма ВО25 наблюдали как увеличение лаг-фазы, так и снижение максимального значения OP_{600} , по сравнению со штаммом РВ8-1. При содержании в

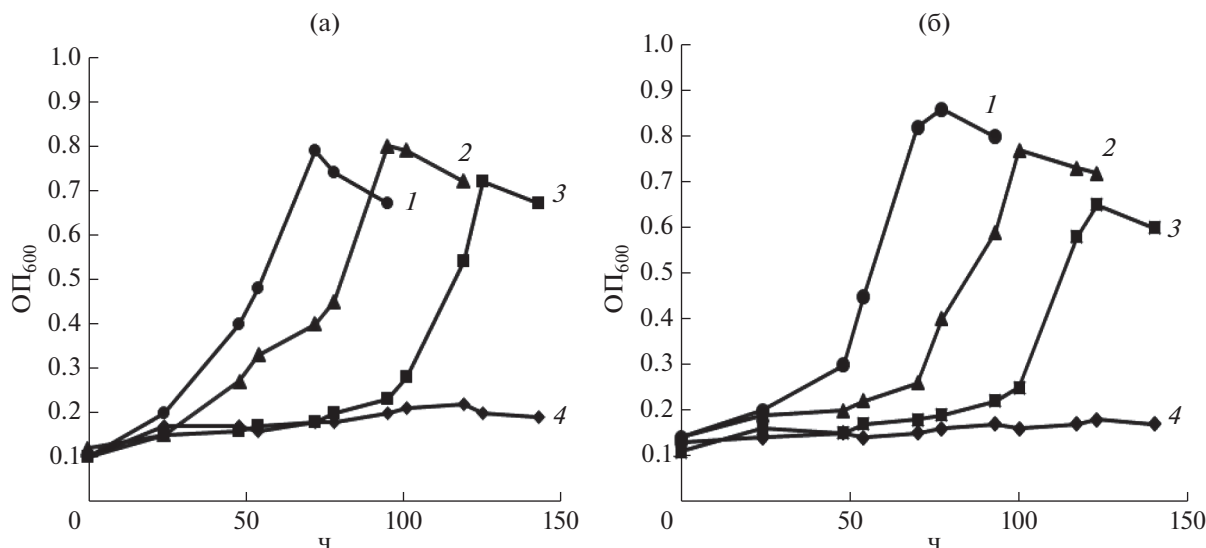


Рис. 1. Рост штаммов PB8-1 (а) и VO25 (б) на ТФК (1 г/л) при различных концентрациях NaCl (г/л): 1 – без NaCl; 2 – 30; 3 – 60; 4 – 70.

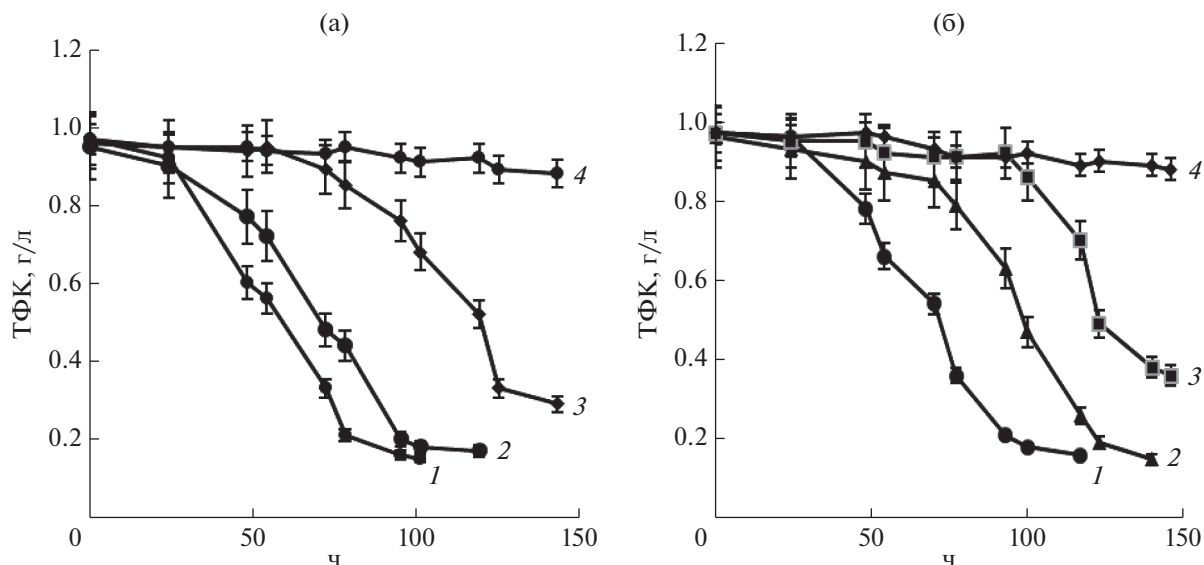


Рис. 2. Утилизация ТФК (1 г/л) штаммами PB8-1 (а) и VO25 (б) при различных концентрациях NaCl (г/л): 1 – без NaCl; 2 – 30; 3 – 60; 4 – 70.

среде 70 г/л NaCl рост штаммов на ТФК не наблюдали.

Отмечалась корреляция между показателями роста штаммов и снижением концентрации ТФК в среде культивирования. Показано, что деструкция терефталата штаммами PB8-1 и VO25 в среде без добавления соли и с добавлением 30 г/л NaCl была выше 84%. С повышением содержания NaCl в среде до 60 г/л отмечалось снижение уровня де-

струкции субстрата до 69.7 и 62.8% для штаммов PB8-1 и VO25 соответственно (табл. 2).

Известны бактерии рода *Glutamicibacter*, растущие на средах с высоким содержанием солей. Так, штаммы *G. halophytocola* KLBMP5180^T и *Glutamicibacter* sp. YD01, как показано авторами, были способны к росту на богатой среде в присутствии до 130 и 100 г/л NaCl соответственно [27, 29]. Однако штаммы рода *Glutamicibacter*,

Таблица 2. Параметры роста и утилизации ТФК при различных концентрациях хлорида натрия штаммами РВ8-1, ВО25 при выращивании в присутствии ТФК, ПКК

Параметр	ТФК						ПКК	
	РВ8-1			ВО25			РВ8-1	ВО25
	без NaCl	30 г/л	60 г/л	без NaCl	30 г/л	60 г/л	без NaCl	
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	0.018 ± ± 0.002	0.020 ± ± 0.001	0.018 ± ± 0.003	0.021 ± ± 0.004	0.017 ± ± 0.003	0.016 ± ± 0.002	0.020 ± ± 0.002	0.030 ± ± 0.006
Максимальное значение ОП ₆₀₀	0.79	0.80	0.72	0.78	0.77	0.65	0.73	0.91
Лаг-фаза роста, ч	24	24	78	24	70	93	24	24
Утилизация ТФК, %	84.5 ± 0.2	85.2 ± 0.4	69.7 ± 0.3	83.5 ± 0.3	84.3 ± 0.2	62.8 ± 0.3	—	—
Удельная скорость потребления, сут ⁻¹	0.560	0.347	0.151	0.460	0.226	0.188	—	—

способные к разложению фталатов, в частности ТФК, в условиях повышенного засоления, ранее описаны не были.

Рост штаммов ВО25 и РВ8-1 на средах с высокими концентрациями ТФК. Установлено, что штаммы РВ8-1 и ВО25 при культивировании в среде К1 [22], не содержащей NaCl, способны использовать ТФК в качестве единственного источника углерода и энергии в концентрации до 30 г/л (рис. 3). При концентрации ТФК 1 г/л максимальные значения ОП₆₀₀ среды к 78-102 ч культивирования штаммов

РВ8-1 и ВО25 составляли 0.8 и 0.94 соответственно. Увеличение концентрации ТФК в среде у обоих штаммов приводило к увеличению длительности лаг-фазы, накоплению биомассы и снижению удельной скорости роста (табл. 3). При этом максимальные значения ОП₆₀₀ штаммов наблюдались при концентрации ТФК в среде культивирования 10 г/л и составляли 1.43 и 1.6 для штаммов РВ8-1 и ВО25 соответственно. При повышении концентрации ТФК в среде до 40 г/л роста исследуемых штаммов не наблюдали.

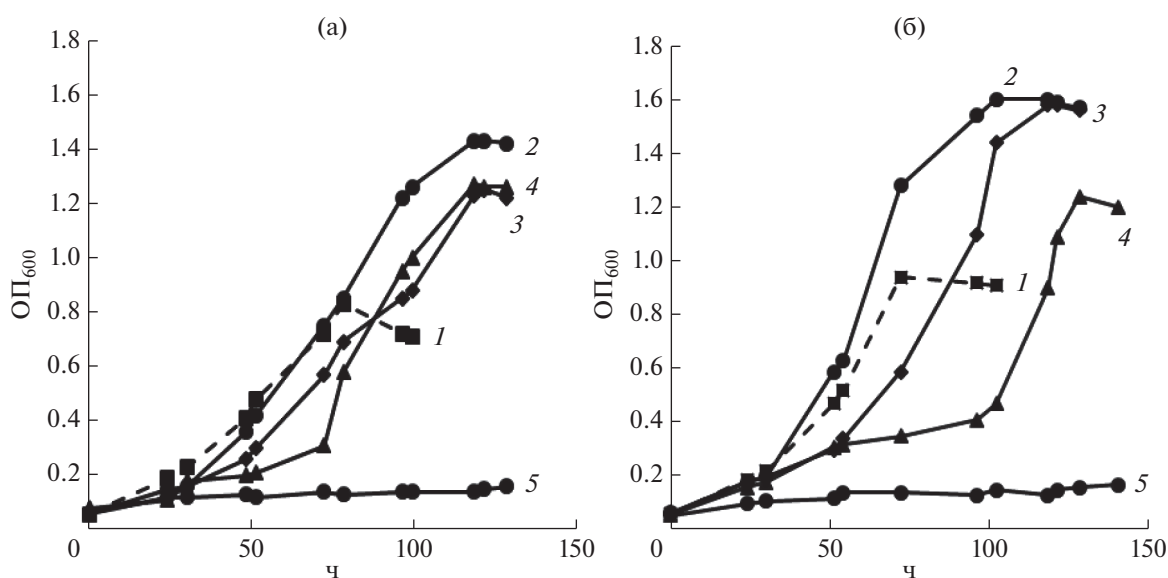
**Рис. 3.** Рост штаммов РВ8-1 (а) и ВО25 (б) на ТФК (г/л): 1 – 1; 2 – 10; 3 – 20; 4 – 30; 5 – 40.

Таблица 3. Параметры роста и утилизации ТФК (1, 10, 20, 30 г/л) штаммами РВ8-1, ВО25

Показатель	РВ8-1				ВО25			
	1	10	20	30	1	10	20	30
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	0.012 ± ± 0.003	0.017 ± ± 0.001	0.014 ± ± 0.002	0.020 ± ± 0.002	0.018 ± ± 0.003	0.030 ± ± 0.004	0.026 ± ± 0.003	0.028 ± ± 0.002
Максимальное значение ОП ₆₀₀	0.83	1.43	1.25	1.27	0.94	1.60	1.58	1.24
Лаг-фаза роста, ч	24	30	48	72	30	30	51	102
Утилизация ТФК, %	79.0 ± 0.3	67.0 ± 0.4	32.6 ± 0.3	21.0 ± 0.2	87.5 ± 0.5	78.0 ± 0.3	38.0 ± 0.1	19.3 ± 0.2
Удельная скорость утилизации, сут ⁻¹	0.373	0.270	0.086	0.054	0.420	0.360	0.119	0.044

Наиболее высокий уровень утилизации ТФК отмечали при выращивании штамма РВ8-1 в среде К1 при концентрации субстрата 1.0 г/л – 79% за 99 ч, а штамма ВО25 – 87.5% за 118 ч. Максимальная удельная скорость потребления ТФК у этих штаммов также наблюдалась при содержании ТФК в среде 1.0 г/л (табл. 3).

Как показано для представителей разных таксономических групп, терефталевая кислота в повышенных концентрациях может подавлять рост бактерий и способность к деструкции этого соединения. Так, концентрация ТФК 10 г/л и выше подавляла способность клеток штамма *Arthrobacter* sp. 0574 разлагать ТФК [10], а у бактерий рода *Pseudomonas* концентрация, которая превышала 1 г/л уже ингибировала рост [14]. Описан штамм *Rhodococcus* sp. N2, утилизирующий 10 г/л ТФК за 5 сут [30]. Исследуемые нами штаммы *Glutamicibacter* spp. РВ8-1 и ВО25 были способны к эффективному росту на более высоких концентрациях до 30 г/л ТФК. Таким образом, исследуемые штаммы не только способны выдерживать критически высокие концентрации ТФК, но и использовать это соединение в качестве источника углерода и энергии, что представляет несомненный интерес для дальнейшего изучения.

Разложение ТФК штаммами РВ8-1 и ВО25. Известно, что деструкция терефталевой кислоты аэробными бактериями осуществляется через стадию образования *цис*-1,2-дигидрокси-1,2-дигидротерефталата, который трансформируется до ПКК с последующим ее разложением до основных продуктов жизнедеятельности микробной клетки (рис. 4) [3, 16, 31]. Показана способность исследуемых штаммов ВО25 и РВ8-1 расти в МСР с 30 г/л NaCl на ПКК в качестве субстрата (рис. 5). Штамм ВО25 имел более высокие показатели максимального значения ОП₆₀₀, удельной скорости роста на ПКК, чем штамм РВ8-1 (табл. 2). Анализ продуктов утилизации ТФК в культуральной сре-

де при выращивании штамма ВО25 на данном субстрате методом ВЭЖХ показал присутствие ПКК в концентрации 0.3 и 0.1 г/л через 48 и 70 ч культивирования соответственно. На основании присутствия метаболита в среде с ТФК и способности исследуемых штаммов к росту на ПКК (рис. 5) можно предположить, что деструкция ТФК штамма *Glutamicibacter* sp. ВО25 осуществлялась по пути образования ПКК с последующим ее разложением (рис. 4). Известно, что утилизация ПКК актинобактериями идет преимущественно по *орто*-пути [32]. В то же время, имеются данные о возможности деградации ПКК у штаммов семейства *Micrococcaciae* (родов *Arthrobacter*, *Pseudarthrobacter*) по *орто*- и/или *мета*-пути [18, 33]. Исследование метаболического пути деструкции ТФК и ПКК штаммами *Glutamicibacter* spp. ВО25 и РВ8-1 будет продолжено.

Таким образом, впервые охарактеризованы галотолерантные деструкторы ТФК рода *Glutamicibacter*. Штаммы ВО25 и РВ8-1 способны к росту и эффективной деструкции ТФК, в том числе при засолении среды (до 60 г/л NaCl) и высоких концентрациях этого соединения в среде культивирования (до 30 г/л). Подобные характеристики у бактериальных культур обнаружены впервые. Описанные бактериальные культуры являются перспективными для разработки эффективных биотехнологий очистки загрязненных/засоленных почв и промышленных стоков.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы: АААА-А19-119112290008-4 и при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта № 19-44-590011p_a.

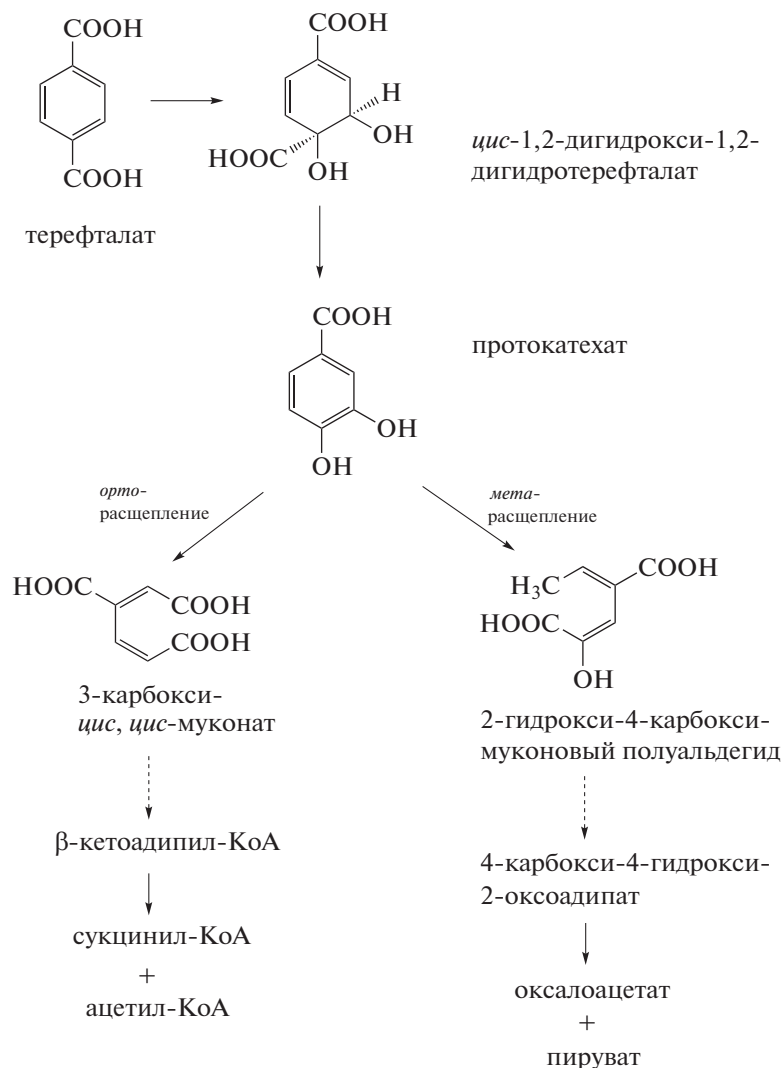


Рис. 4. Пути бактериальной деструкции терефталевой и протокатеховой кислот в аэробных условиях [16, 31].

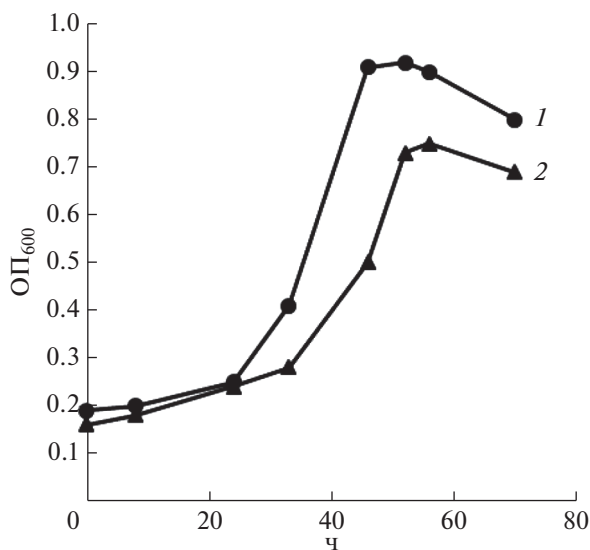


Рис. 5. Рост штаммов BO25 (1) и PB8-1 (2) на ПКК (1 г/л).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит результатов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jin D.-C., Liang R.-X., Dai Q.-Y., Zhang R.-Y., Wu X.-L., Chao W.-L. // J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 20. № 10. P. 1440–1445.
2. Keyser P., Pujar B.G., Eaton R.W., Ribbons D.W. // Environ. Health Perspect. 1976. V. 18. P. 159.
3. Liang D.W., Zhang T., Fang H. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 80. P. 183–198.
4. Delle Chiaie K.R., McMahon F.R., Williams E.J., Price M.J., Dove A.P. // Polym. Chem. 2020. V. 11. P. 1450–1453.

5. *Медведев А.Н., Черезова Е.Н.* // Вестник технологического университета. 2015. Т. 18. № 15. С. 44–46.
6. *Przybylinka P.A., Wyszowski E.* // Ecol. Chem. Engin. 2016. V. 23(2). P. 347–356.
7. *Staples C.A., Parkerton T.F., Peterson D.R.* // Chemosphere. 2000. V. 40. P. 885–891.
8. *Gao D., Wen Z.* // Sci. Total Environ. 2016. V. 541. P. 986–1001.
9. *Zhang X., Wan Y., Cheng S., Sun S., Zhu C., Li W., Zhang X., Wang G., Lu J., Luo X.* // J. Environ. Sci. (China). 2005. V. 17. № 5. P. 876–880.
10. *Zhang Y.-M., Sun Y.-Q., Wang Z.-J., Zhang J.* // South African J. Science. 2013. V. 109. № 7/8. Art. #0019. <https://doi.org/10.1590/sajs.2013/20120019>
11. *Zhang Z., Ma L., Zhang X.X., Li W., Zhang Y., Wu B., Yang L., Cheng S.* // J. Hazard. Mater. 2010. V. 181. P. 1121–1126.
12. *Park T., Lim J., Lee Y., Kim S.* // J. Supercrit. Fluids. 2013. V. 26 P. 201–213.
13. *Shafaei A., Nikazar M., Arami M.* // Desalination. 2010. V. 252. P. 8–16.
14. *Wang Z.J., Teng L.H., Zhang J.F.* // Afr. J. Biotechnol. 2011. V. 10. № 16. P. 3143–3148.
15. *Kasai D., Kitajima M., Fukuda M., Masai E.* // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76. № 18. P. 6047–6055.
16. *Hara H., Eltis L.D., Davies J.E., Mohn W.W.* // J. Bacteriol. 2007. V. 189. № 5. P. 1641–1647.
17. *Choi K.Y., Kim D., Sul W.J., Chae J.C., Zylstra G.J., Kim Y.M., Kim E.* // FEMS Microbiol. Letters. 2005. V. 252. P. 207–213.
18. *Eaton R.W.* // J. Bacteriol. 2001. V. 183. № 12. P. 3689–3703.
19. *Ястребова О.В., Плотникова Е.Г.* // Вестник Пермского Университета. Серия Биология. 2020. № 4. С. 321–333.
20. *Raymond R.L.* // Developments in Industrial Microbiol. 1961. V. 2. №1. P. 23–32.
21. *Нетрусов А.И.* Практикум по микробиологии. М.: Академия, 2005. 608 с.
22. *Зайцев Г.М., Карасевич Ю.Н.* // Микробиология. 1981. Т. 50. С. 35–40.
23. *Бачурин Б.А., Одинцова Т.А.* Стойкие органические загрязнители в отходах горного производства. Современные экологические проблемы Севера. Апатиты: Изд-во НЦ РАН. 2006. Т. 2. С. 7–9.
24. *Корсакова Е. С., Шестакова Е. А., Хайрулина Е. А., Назаров А. В.* // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9(18). № 2(1). С. 591–593.
25. *Wang X., Shen S., Wu H., Wang H., Wang L.* // Microorganisms. 2021. V. 30. № 9(7). P. 1417–1428.
26. *Purushothaman D., Jegan S., Anu D.A., Prabavathy V.R.* // Front. Microbiol. 2020. Article 1573. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01573>
27. *Feng W.-W., Wang T.-T., Bai J.-L., Ding P., Xing K., Jiang J.-H., Peng X. Qin S.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2017. V. 67. P. 1120–1125.
28. *Kushner D.J.* Life in High Salt and Solute Concentrations: Halophilic Bacteria, in Microbial Life in Extreme Environments / Ed. D.J. Kushner. London: Academic press, 1978. P. 317–368.
29. *Ji J., Yuan D., Jin C., Wang G., Li X.* // Acta Physiologica Plantarum. 2020. V. 42. № 42. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-3034-3>
30. *Suwanawat N., Parakulsuksatid P., Nitayapat N., Sanpamongkolchai W.* // Int. J. Environ. Science and Development. 2019. V. 10. № 1. P. 30–33.
31. *Benjamin S., Pradeep S., Josh M.S., Kumar S., Masai E.* // J. Hazardous Materials. 2015. V. 298. P. 58–72.
32. *Bugg T.D., Ahmad M., Hardiman E.M., Singh R.* // Curr. Opin. Biotechnol. 2011. V. 22. P. 394–400.
33. *Tsagogiannis E., Vandera E., Primikyri A., Asimakoula S., Tzakos A.G., Gerothanassis I.P., Koukkou A.-I.* // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. 9647. <https://doi.org/10.3390/ijms22179647>

Halotolerant Terephthalic Acid-Degrading Bacteria of the Genus *Glutamicibacter*

O. V. Yastrebova^{a, *}, A. A. Malysheva^b, and E. G. Plotnikova^{a, b}

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

^b Perm State University, Perm, 614068 Russia

*e-mail: olyastr@mail.ru

Terephthalic acid (TPA), an isomer of *ortho*-phthalic acid, is widely used industrial chemical, used in the manufacture of artificial fibers and plastics, including polyethylene terephthalate, and therefore is a widespread environmental pollutant. The ability of strains *Glutamicibacter* spp. PB8-1 and BO25 isolated from the salt mining area (Perm Krai, Russia) to growth on terephthalic acid as the only source of carbon and energy was studied. *Glutamicibacter* spp. PB8-1 and BO25 are able to utilize high concentrations of TPA (30 g/L), which is shown for the first time for TPA-degrading bacteria. Strains PB8-1 and BO25 are halotolerant bacteria: they grow without NaCl in the medium and at NaCl concentrations up to 90 g/L (in a rich medium), up to 60 g/L (in a mineral medium with TPA). Bacteria capable of degrading TPA under saline conditions have not been previously described. The growth of strain BO25 on TPA was accompanied by the accumulation and subsequent degradation of protocatechuic acid (PCA). This suggests that TPA metabolism in the strain proceeds through the formation of PCA, that was described earlier for bacteria of different taxa, including actinobacteria. Thus, TPA-degrading strains *Glutamicibacter* spp. PB8-1 and BO25 are of interest for further research and are promising for the development of bioremediation methods for saline soils and wastewater contaminated with TPA.

Keywords: aerobic bacteria, *Glutamicibacter*, terephthalic acid, degradation, sodium chloride

УДК 579.66

БИОДЕСТРУКЦИЯ ЭФИРОВ ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ ГРИБАМИ БЕЛОЙ ГНИЛИ

© 2022 г. О. С. Савинова¹, А. В. Шабаев¹, О. А. Глазунова¹, С. А. Еремин^{1, 2}, Т. В. Фёдорова^{1, *}¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия²Химический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

Поступила в редакцию 25.11.2021 г.

После доработки 10.12.2021 г.

Принята к публикации 14.12.2021 г.

Изучена способность грибов белой гнили из разных экофизиологических групп (*Trametes hirsuta* – первичный дереворазрушающий сапротроф, *Steccherinum ochraceum* – вторичный дереворазрушающий сапротроф, *Crucibulum laeve* – подстилочный сапротроф, и *Agrocybe praecox* – гумусовый сапротроф) к деградации эфиров фталевой кислоты (ЭФК). Показано, что диэтилгексилфталат (ДЭГФ), с более длинными и разветвленными углеводородными цепями, быстрее подвергался биодеструкции дереворазрушающими сапротрофами такими, как *T. hirsuta* и *S. ochraceum*, с эффективностью более 99%. Дибутилфталат (ДБФ), менее гидрофобный с более короткими углеводородными звеньями, наиболее эффективно трансформировался подстилочным сапротрофом *C. laeve* (до 96.5%). Диэтилфталат (ДЭФ) оказался наиболее токсичным для всех грибов. Из всех исследованных грибов *T. hirsuta* проявлял наибольшую устойчивость к повышенным концентрациям ДЭФ в среде. Показано, что грибы разрушают ЭФК с образованием различных метаболитов в зависимости от состава мультиферментного комплекса гриба. Среди вторичных метаболитов обнаружен ионол – антиоксидант, образуемый грибами при внесении ЭФК в среду.

Ключевые слова: эфиры фталевой кислоты, деградация, биодеструкция, базидиомицеты, грибы белой гнили

DOI: 10.31857/S0555109922050142

Проблема утилизации устойчивых токсичных органических загрязнителей в последнее время становится все более актуальной. К таким распространенным ксенобиотикам относятся эфиры фталевой кислоты (ЭФК, фталаты) – маслянистые жидкости без цвета и запаха, широко используемые для придания гибкости пластмассам, при изготовлении резины, полимеров, красок и топлива, в продуктах медицинского назначения, а также присутствующие в широком спектре продукции для личной гигиены [1]. ЭФК ковалентно не связаны с содержащей их продукцией, поэтому легко высвобождаются и попадают в различные биологические системы (реки, почву, воздух), оказывая серьезное негативное влияние не только на микробные сообщества почвы и круговорот питательных веществ [2, 3], но и нанося вред здоровью животных и человека, попадая в организм при вдыхании, перорально или трансдермальном всасывании [4–6]. ЭФК и их производные признаны потенциально опасными, так как оказывают негативное влияние на эндокринную систему млекопитающих, токсичны для пе-

чени и могут оказывать тератогенное и канцерогенное действие. Показано также негативное влияние ЭФК как на мужскую [1], так и на женскую [7] репродуктивную систему. ЭФК обнаруживаются и в пищевых продуктах, которые становятся источником попадания этих ксенобиотиков в организм человека [8, 9]. Все это свидетельствует о важности их удаления из окружающей среды.

Возможные пути разложения таких соединений в природе – гидролиз, фоторазложение и микробная деградация. Процесс гидролиза в основном происходит в водной среде, однако не всегда сопровождается полной деградацией ЭФК. Фоторазложение происходит очень медленно, а период полураспада составляет от нескольких лет до нескольких столетий. Таким образом, в настоящее время биодеструкция ЭФК с помощью ферментных систем микроорганизмов считается основным перспективным путем их деградации в окружающей среде за относительно короткое время [10]. Так, были изучены и подробно описаны различные виды бактерий, способные к деградации ЭФК [11–14]. Однако немногие способны к пол-

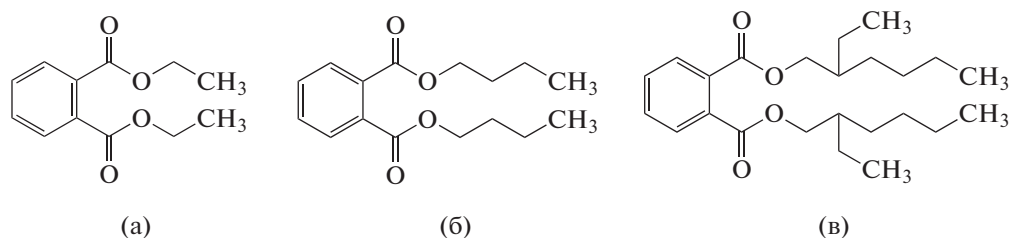


Рис. 1. Структура диэтилфталата, ДЭФ (а); дибутилфталата, ДБФ (б); диэтилгексилфталата, ДЭГФ (в).

ной минерализации этих соединений и могут быть использованы в практических целях. Базидиальные грибы являются более перспективными объектами, благодаря их способности эффективно разрушать труднодеградируемые соединения [15]. При этом разработка стратегий, основанных на применении как самих грибных культур, так и синтезируемых ими ферментов, требует четкого понимания механизмов биodeградации каждого ксенобиотика. Известно, что способность к разложению ЭФК различная у разных штаммов грибов и зависит от синтезируемого ими комплекса ферментов и факторов окружающей среды. В литературе представлено значительное количество работ, которые показывают, что грибы, благодаря своим богатым и разнообразным мультиферментным комплексам, являются перспективными биодеструкторами различных поллютантов, в том числе ЭФК [15–18]. Таким образом, скрининг штаммов на способность к деградации ЭФК и изучение процесса их деградации является важным направлением современных исследований.

В качестве объектов для изучения деградации использованы диэтиловый эфир фталевой кислоты (ДЭФ, рис. 1а), дибутиловый эфир фталевой кислоты (ДБФ, рис. 1б) и диэтилгексилфталат (ДЭГФ, рис. 1в) – широко распространенные токсичные органические загрязнители, которые при попадании в организм человека могут нарушить работу эндокринной системы. Их относят к соединениям, нуждающимся в приоритетном контроле [19].

Цель работы – изучение биодеструкции ДЭФ, ДБФ и ДЭГФ грибами белой гнили из различных экофизиологических групп.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе были использованы следующие реактивы: диэтилфталат, дибутилфталат, диэтилгексилфталат фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Другие материалы и растворители квалификации “х. ч.” и “ч. д. а.” были приобретены у российских производителей.

Культуры и условия культивирования. Штаммы базидиомицетов *Trametes hirsuta* LE-BIN 072, *Stec-*

cherinum ochraceum LE-BIN 3174, *Crucibulum laeve* LE-BIN 1700 и *Agrocybe praecox* LE-BIN 2506 получены из Коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова (Санкт-Петербург, Россия).

Для оценки роста в присутствии ЭФК и определения общей оксидазной активности (ОА) грибы культивировали на твердой среде Мальтекс-агар, следующего состава (г/л): неохмеленный солодовый экстракт Maltax 10 (“OY Maltax AB”, Финляндия) – 50; агар-агар – 20, рН 6.0. В стерильную охлажденную до 40–50°С среду вносили ЭФК в концентрациях: 0.5, 1.0 и 1.5 г/л. Среды с внесенными ЭФК обрабатывали в ультразвуковой бане при 50°С в течение 5 мин. На подготовленные чашки Петри засеивали мицелиальные блоки (d = 8 мм) грибов белой гнили и инкубировали в термостате при 25°С, измеряя в процессе роста диаметр мицелиального мата.

Инокулят грибов выращивали стационарно в 750 мл конических колбах с фарфоровыми бусами на глюкозо-пептонной (ГП) среде следующего состава (г/л): пептон – 3.0, глюкоза – 10, КН₂РO₄ – 0.6, К₂НРO₄ · 3Н₂O – 0.4, MgSO₄ · 7Н₂O – 0.5, СаСl₂–0.5, МnSO₄ · 5Н₂O – 0.05, ZnSO₄ – 0.001, FeSO₄ – 0.0005, при 25°С 10–14 сут в зависимости от скорости роста гриба. Перед засевом инокулят измельчали бусами 20 мин при 180 об./мин до получения однородной суспензии, которую затем стерильно вносили в колбы для культивирования в объеме 10%.

Для изучения накопления биомассы и способности к биодеструкции ЭФК грибы выращивали глубинным способом на ГП среде на роторной качалке при 180 об./мин и 27°С. Выросшие грибные pellets отделяли фильтрованием и промывали 0.02%-ным стерильным водным раствором Твин 80, после чего 10 г грибной биомассы стерильно переносили в конические колбы на 250 мл со 100 мл жидкой минеральной среды следующего состава (г/л): КН₂РO₄ – 0.6, К₂НРO₄ – 0.4, MgSO₄ · 7Н₂O – 0.5, СаСl₂ – 0.05, МnSO₄ – 0.05, ZnSO₄ – 0.001, FeSO₄ – 0.0005, NaNO₃ – 3.0, глюкоза – 10.0, Твин 80 – 0.2. Перед внесением грибной биомассы в опытные колбы добавляли растворы ЭФК в концентрации 1.0 г/л, инкубировали на ро-

торной качалке при 100 об./мин и 25°C. Образцы культуральной жидкости (КЖ) отбирали на 3, 6, 10 сут инкубации и хранили при –73°C до проведения анализа. Грибную биомассу отделяли фильтрованием и высушивали при температуре 100 ± 5°C до постоянной массы.

Скорость радиального роста (u_r). Скорость радиального роста рассчитывали по графику зависимости диаметра колонии от времени роста с анализом линейной регрессии. Диаметр измеряли линейкой с первых суток инкубации до момента, когда гриб полностью покрывает поверхность чашки Петри [20].

Общая эстеразная активность (ЭА). Оценка эстеразной активности в КЖ проводили при культивировании на жидкой минеральной среде с содержанием фталатов 1.0 г/л. Активность определяли спектрофотометрически на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 (“PerkinElmer”, США), используя *n*-нитрофенил бутират в качестве субстрата. Реакцию проводили в натрий ацетатном буфере, рН 4.5 при 40°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали натрий фосфатным буфером, рН 7.3, оптическую плотность определяли при длине волны $\lambda = 400$ нм. Расчет эстеразной активности проводили по формуле:

$$A_{\text{(усл. ед/мл)}} = 0.13\Delta A_{400}R_E,$$

где R_E – предварительное разбавление КЖ перед внесением в раствор субстрата;

$$\Delta A_{400} = A_{400} - A_{400(S)} - A_{400(E)},$$

$A_{400(S)}$ – контроль, в котором вместо КЖ использовали воду; $A_{400(E)}$ – контроль без внесения в реакционную смесь субстрата.

Определение общей оксидазной активности (ОА). ОА определяли в КЖ при выращивании грибов на жидкой минеральной среде с содержанием фталатов 1.0 г/л. Активность определяли спектрофотометрически на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 при длине волны $\lambda = 436$ нм в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, рН 4.5, как описано в работе [21] с использованием раствора 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфо-кислоты) диаммониевой соли (АБТС) в качестве хромогенного субстрата. За 1 условную единицу активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 мин.

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Качественную оценку содержания ЭФК в КЖ грибов в процессе культивирования проводили методом ТСХ. Для этого 3 мл КЖ экстрагировали равным объемом дихлорметана (ДХМ), процедуру повторяли трижды. Полученный экстракт упаривали досуха и перерастворяли в 200 мкл ДХМ. По 10 мкл полученного экстракта наносили на пластину для аналитической хроматографии TLC Silica gel 60 F254 (“Merck”, Германия). В качестве

контроля использовали растворы коммерческих ЭФК в ДХМ (по 10 мкг на точку). Элюцию проводили восходящим методом, используя в качестве подвижной фазы: 1) смесь ДХМ и гексана (2 : 1 об./об.) для предварительной оценки наличия ЭФК и продуктов деградации; 2) ДХМ для визуализации продуктов деградации, более полярных, чем исходные ЭФК. Визуализацию проводили в УФ-свете при длине волны 254 нм. Пластины обрабатывали 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном водном растворе HClO_4 и проявляли при температуре 100–110°C. Чувствительности метода ТСХ было достаточно для наблюдения за убыванием исходных ЭФК в процессе культивирования, а также визуализации в основном полярных продуктов биодеструкции.

Для разделения смеси полярных продуктов с целью их идентификации использовали препаративную ТСХ. Для этого сухой остаток, полученный после упаривания экстракта КЖ, растворяли в минимальном объеме ДХМ, наносили раствор на пластинки для ТСХ полосой на линии старта и хроматографировали восходящим методом в ДХМ. В УФ-свете пластинку делили на зоны по различным значениям R_f . Соединения элюировали отдельно из каждой зоны с использованием ДХМ. Элюаты упаривали досуха. Для контроля полученных элюатов проводили ТСХ. Идентификацию продуктов в образцах проводили с помощью ГХ-МС анализа.

Газовая хроматография с масс-спектрометрической детекцией (ГХ-МС). Оценка степени и скорости биодеструкции ЭФК в процессе культивирования грибов белой гнили проводили после анализа КЖ с использованием метода ГХ-МС. Для этого получали гексановые экстракты образцов КЖ (1 : 1 об./об.) и анализировали методом газо-жидкостной хроматографии в двух режимах: регистрация ионных масс в полном спектре (ГИС, диапазон масс m/z 45–400) и регистрация по характерному для ЭФК основному иону (МИС, $m/z = 149$ – протонированный фталевый ангидрид).

Анализ проводили на газовом хроматографе GC-MS QP 2010 Ultra EI (“Shimadzu”, Япония), снабженном автоматическим устройством ввода пробы и квадрупольным масс-спектрометрическим детектором. Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LabSolutions GCMSsolution (“Shimadzu”, Япония). Использовали колонку MDN-5 30 м × 250 мкм × 0.25 мкм (“Supelco”, США), в качестве подвижной фазы – гелий, скорость потока элюента – 1 см³/мин, деление потока 1 : 5. Объем вводимой пробы 1 мкл, температура термостата 120°C, температура инжектора 200°C. Температурный градиент: 120°C выдержка 1 мин; с 120 до 280°C со скоростью 10°C/мин, изотерма 3 мин.

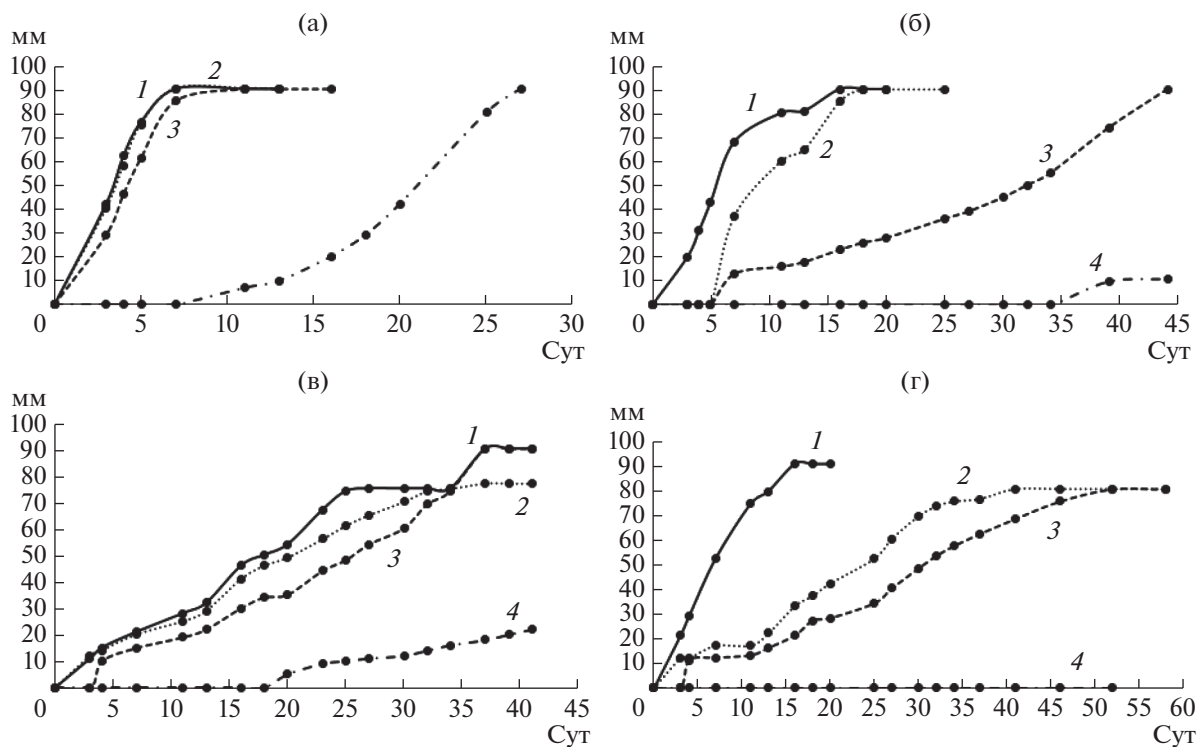


Рис. 2. Кривые роста грибов на агаризованной среде с ДЭФ. а – *T. hirsuta*, б – *S. ochraceum*, в – *C. laeve*, г – *A. praecox*; 1 – контрольная среда без ЭФК, 2 – среда с 0.5 г/л ДЭФ, 3 – среда с 1 г/л ДЭФ, 4 – среда с 1.5 г/л ДЭФ.

Все измерения проводили в 3 биологических повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Статистическая обработка данных проводилась с использованием метода дисперсионного анализа. При обнаружении достоверного значения ($p < 0.05$) F-статистики, различия между индивидуальными средними были оценены с использованием теста множественного сравнения Тьюки ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что базидиальные грибы белой гнили могут использоваться для биоремедиации сточных вод и почв, загрязненных различными органическими соединениями. Благодаря своему уникальному комплексу секретируемых ферментов, они способны модифицировать даже такие труднодеградируемые полимеры, как лигнин, входящий в состав древесины. Известно, что такая высокая эффективность обусловлена существенными различиями в составе и композиции секретируемых мультиферментных комплексов (содержащих такие ферменты, как лакказа, лигнинпероксидаза, Mn-зависимая пероксидаза) у грибов из разных экофизиологических групп, участвующих на разных стадиях разложения древесины [22]. Этот факт позволил предположить, что такие различия могут

обуславливать особенности деградации ЭФК разными представителями базидиомицетов. В настоящей работе был проведен сравнительный анализ способности грибов белой гнили – представителей различных экофизиологических групп, а именно: *Trametes hirsuta* (первичные дереворазрушающие сапротрофы), *Steccherinum ochraceum* (вторичные дереворазрушающие сапротрофы), *Crucibulum laeve* (подстилочные сапротрофы), *Agrocybe praecox* (гумусовые сапротрофы), к деструкции трех распространенных ЭФК.

Влияние ЭФК на рост грибов белой гнили. Хорошо известно, что начальная концентрация ЭФК может влиять на способность к их биодеградации различными организмами [18, 20]. Экстремальные концентрации загрязняющих веществ трудно поддаются деструкции большинством организмов. Для того, чтобы определить рабочий диапазон концентраций ЭФК, в данном исследовании была проведена предварительная оценка способности выбранных для исследования грибов к росту на агаризованных средах, содержащих разные концентрации фталатов. На рис. 2–4 приведены кривые роста грибных культур на среде с ДЭФ, ДБФ и ДЭГФ, в табл. 1 представлены скорости радиального роста грибов.

Эксперимент показал, что при увеличении концентрации ДЭФ в среде скорость роста всех штаммов замедлялась, причем на среде с кон-

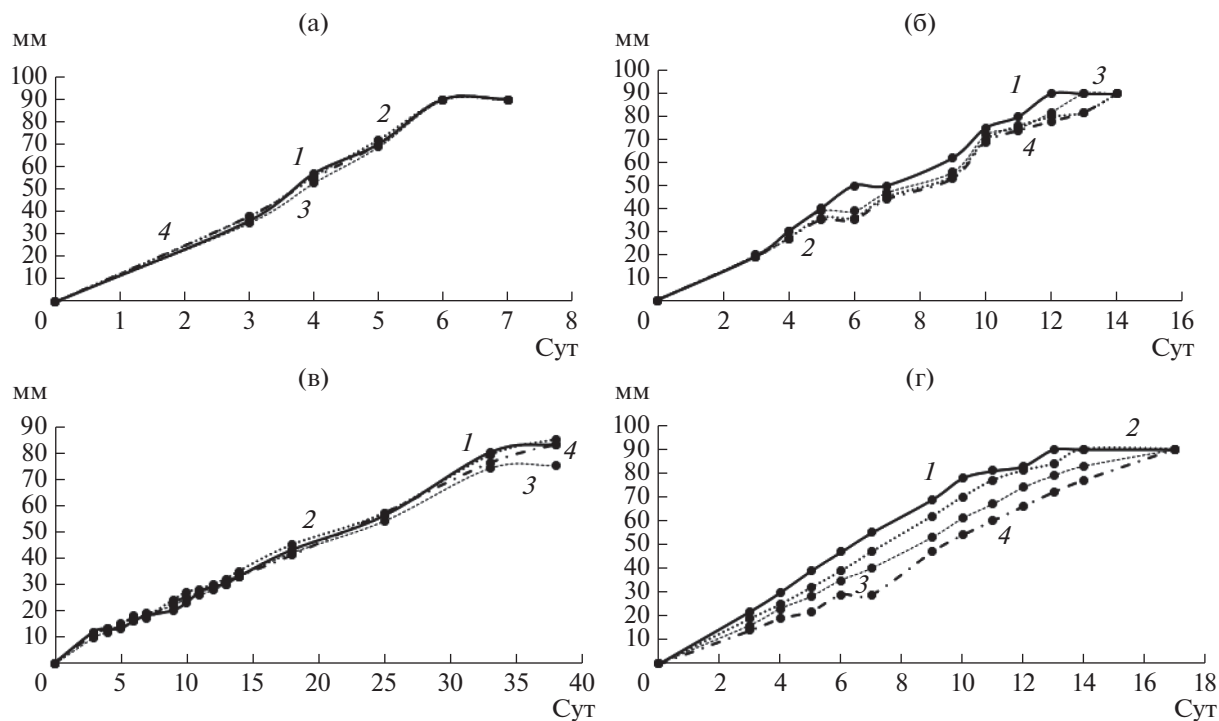


Рис. 3. Кривые роста грибов на агаризованной среде с ДБФ. а – *T. hirsuta*, б – *S. ochraceum*, в – *C. laeve*, г – *A. praecox*; 1 – контрольная среда без ЭФК, 2 – среда с 0.5 г/л ДБФ, 3 – среда с 1 г/л ДБФ, 4 – среда с 1.5 г/л ДБФ.

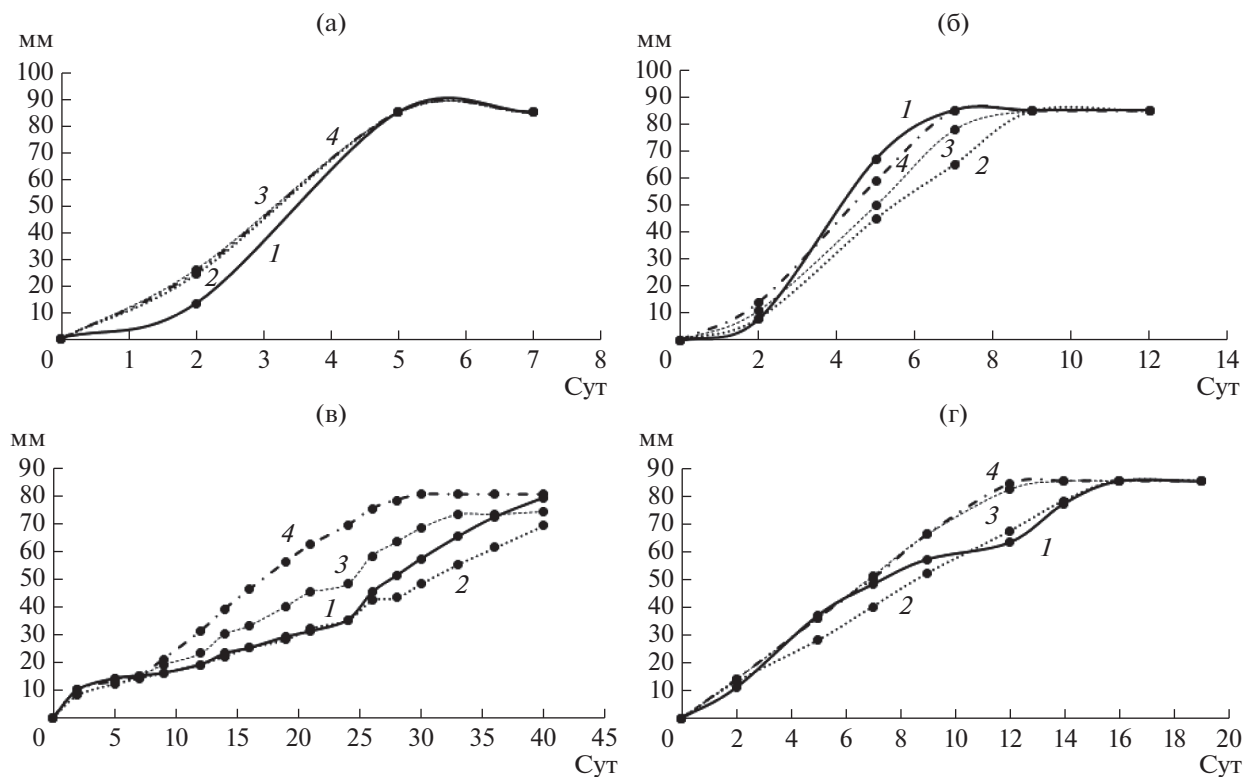


Рис. 4. Кривые роста грибов на агаризованной среде с ДЭГФ. а – *T. hirsuta*, б – *S. ochraceum*, в – *C. laeve*, г – *A. praecox*; 1 – контрольная среда без ЭФК, 2 – среда с 0.5 г/л ДЭГФ, 3 – среда с 1 г/л ДЭГФ, 4 – среда с 1.5 г/л ДЭГФ.

Таблица 1. Скорость радиального роста штаммов, u_r

ЭФК	Концентрация, г/л	u_r (мм/сут)			
		<i>T. hirsuta</i>	<i>S. ochraceum</i>	<i>C. laeve</i>	<i>A. praecox</i>
ДЭФ	0	13.4 ± 0.6	6.6 ± 0.3	5.7 ± 0.2	2.4 ± 0.05
	0.5	13.3 ± 0.6	6.2 ± 0.3	1.6 ± 0.05	2.1 ± 0.05
	1.0	12.4 ± 0.6	1.7 ± 0.08	1.2 ± 0.05	2.3 ± 0.05
	1.5	0.6 ± 0.03	0.1 ± 0.005	Нет роста	0.5 ± 0.01
ДБФ	0	14.9 ± 0.7	7.4 ± 0.2	7.1 ± 0.3	2.2 ± 0.05
	0.5	14.9 ± 0.7	6.7 ± 0.2	6.7 ± 0.3	2.2 ± 0.05
	1.0	14.8 ± 0.7	6.8 ± 0.2	5.8 ± 0.3	2.0 ± 0.05
	1.5	14.8 ± 0.7	6.5 ± 0.2	5.6 ± 0.2	2.1 ± 0.05
ДЭГФ	0	17.6 ± 0.9	13.3 ± 0.7	4.7 ± 0.2	1.9 ± 0.05
	0.5	17.3 ± 0.9	9.9 ± 0.5	5.2 ± 0.2	1.6 ± 0.05
	1.0	17.2 ± 0.9	10.4 ± 0.5	6.4 ± 0.3	2.0 ± 0.05
	1.5	17.2 ± 0.9	12.6 ± 0.6	6.4 ± 0.3	2.9 ± 0.05

центрацией ДЭФ 1.5 г/л существенная задержка роста по сравнению с контролем наблюдалась у *T. hirsuta*, *S. ochraceum* и *A. praecox* (в 22, 66 и 5 раз соответственно), а гриб *C. laeve* не рос на среде с такой концентрацией ДЭФ. Следует отметить, что наиболее устойчивыми к присутствию ДЭФ в среде оказались *T. hirsuta* и *A. praecox* – их рост на контрольной среде и среде с 0.5 г/л ДЭФ не отличался, а на среде с ДЭФ в концентрации 1 г/л и выше рост гриба *T. hirsuta* замедлялся в большей степени, по сравнению с *A. praecox*. Все штаммы хорошо росли на среде с ДБФ. Наличие этого фталата в среде не оказывало влияния на рост *T. hirsuta*, на рост *S. ochraceum* и *A. praecox* влияние было незначительное, при этом рост *C. laeve* замедлялся при возрастании концентрации ДБФ в среде.

При выращивании грибов на среде с ДЭГФ наблюдали увеличение скорости роста *T. hirsuta*, по сравнению с контрольной средой, увеличение концентрации ДЭГФ в среде также ускоряло рост грибов *A. praecox* и *C. laeve*, но замедляло рост *S. ochraceum* по сравнению с контролем. Увеличение скорости радиального роста на средах с добавлением ДЭГФ было ранее отмечено также для таких грибов белой гнили как *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus* и *Lentinula edodes* [18, 20], причем увеличение содержания ДЭГФ приводило к увеличению скорости роста. Авторы предположили, что грибы могут использовать фталаты в качестве источника углерода и энергии, так как наблюдалась четкая корреляция между диаметром гиф и концентрацией фталатов в среде.

Таким образом, для последующих экспериментов была выбрана концентрация ЭФК 1 г/л,

которая, как было показано выше, не приводила к значительному ингибированию роста грибов.

На следующем этапе исследовали способность грибов к биодеградации ДЭФ, ДБФ и ДЭГФ в жидких средах. При культивировании на минеральной среде с глюкозой и ЭФК в концентрации 1 г/л, наблюдали увеличение биомассы *T. hirsuta* как на контрольной среде, так на среде с ДЭГФ (рис. 5а), причем прирост биомассы продолжался вплоть до 10 сут культивирования. На среде с ДБФ биомасса увеличивалась к 6 сут, но далее не менялась. Биомасса *S. ochraceum* на среде с ДБФ и ДЭГФ увеличивалась к 3 сут на 8.1 и 22.6% соответственно, по сравнению с контрольной средой, но к 10 сут мицелий разрушался, причем более интенсивно в присутствии ДБФ (рис. 5б). Однако при культивировании как первичных, так и вторичных сапротрофов в присутствии ДЭФ количество биомассы оставалось на уровне исходного значения (рис. 5а, б), что согласуется с результатами по ингибированию роста этих грибов на агаризованных средах с ДЭФ (рис. 2а, б).

Наиболее чувствительным к присутствию ЭФК оказался подстилочный сапротроф *C. laeve*. Так, в присутствии ДБФ прирост биомассы не наблюдался, а в присутствии ДЭФ – мицелий гриба вовсе разрушался в ходе культивирования. На среде с ДЭГФ прирост биомассы наблюдался к 3 сут, далее биомасса резко уменьшалась (рис. 5в). Для гумусового сапротрофа *A. praecox* максимум биомассы на минеральных средах с ЭФК наблюдали на 3 сут культивирования, в отличие от контрольной среды (6 сут), но при этом он не превышал максимума биомассы в контроле (рис. 5г). На минеральной среде с ДЭФ был отмечен все же не-

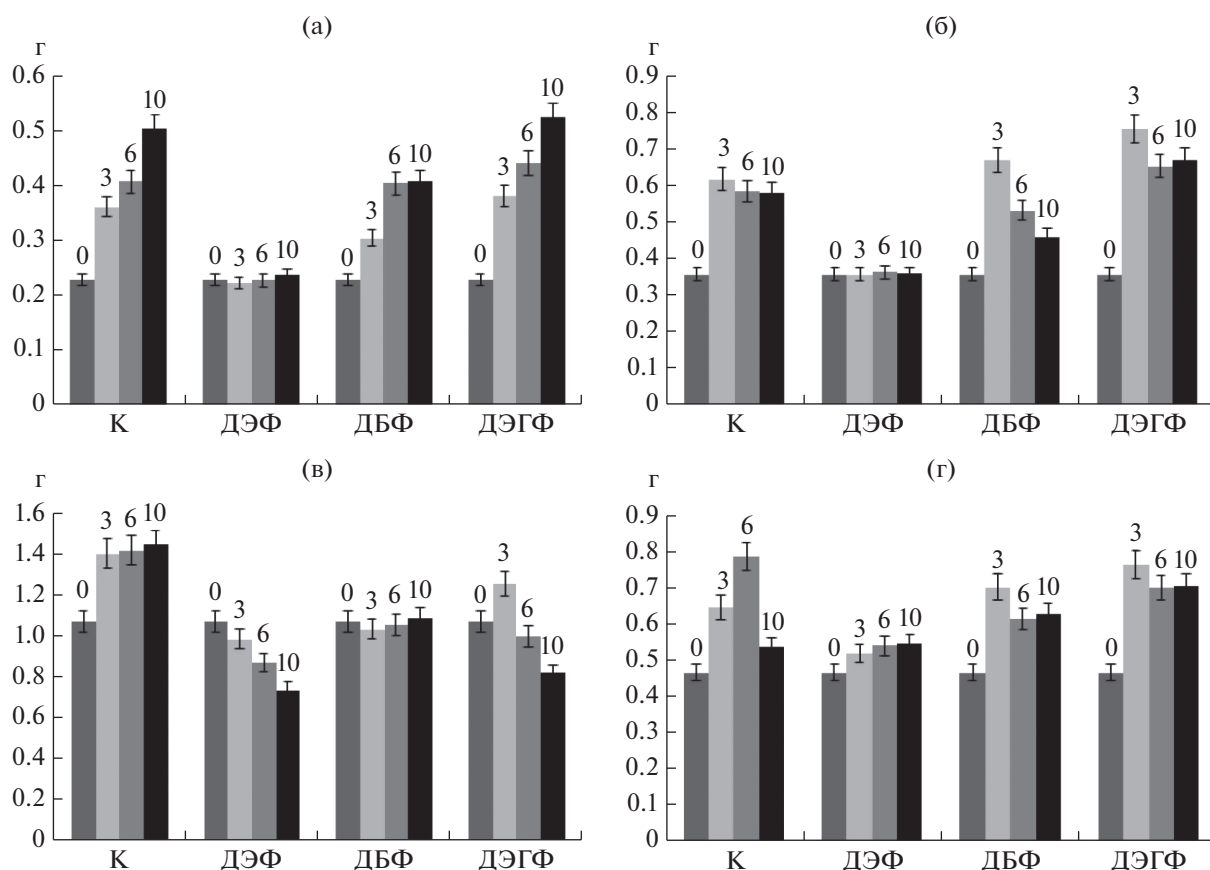


Рис. 5. Диаграмма накопления биомассы (по сухому весу) при росте на среде с ЭФК (1 г/л). К – контрольная среда без ЭФК, 0 – исходная биомасса в расчете на сухой вес мицелия, 3 – биомасса на 3 сут, 6 – на 6 сут, 10 – на 10 сут культивирования. а – *T. hirsuta*, б – *S. ochraceum*, в – *C. laeve*, г – *A. praecox*.

значительный прирост биомассы *A. praecox* в ходе культивирования, которого не наблюдали у *T. hirsuta* и *S. ochraceum*.

Таким образом, в присутствии ЭФК, максимальный прирост биомассы грибов был отмечен на среде с ДЭГФ, однако только у *S. ochraceum* он был больше, чем на контрольной среде. В работе [23] показано, что биомасса *Fusarium culmorum* увеличивалась в присутствии ДБФ, по сравнению с контролем. Авторы предположили, что это связано с использованием фталата в качестве источника углерода, что, однако зависело от используемого организма и сложности структуры фталата.

Необходимо отметить существование различий в характере роста грибов на богатой среде Мальтекс-агар и жидкой минеральной среде. Так, в присутствии 1 г/л ДЭГФ скорость роста *S. ochraceum* на агаризованной среде замедлялась по сравнению с контролем, а в жидкой среде, наоборот, прирост биомассы был больше, по сравнению с контролем. У *C. laeve* на Мальтекс-агаре скорость роста увеличивалась, а на жидкой среде биомассы было значительно меньше, чем в контроле. Таким образом, характер роста *S. ochraceum* и *C. laeve* менялся в за-

висимости от состава среды культивирования. Для *T. hirsuta* и *A. praecox* такой зависимости не было выявлено. Скорость роста и накопление биомассы у *T. hirsuta* на обеих средах не отличалось от контроля, а у *A. praecox* скорость роста и прирост биомассы увеличивались в присутствии ДЭГФ.

Различия в характере роста грибных культур на разных средах в присутствии ЭФК могут быть связаны, в первую очередь, с синтезом ими специфического комплекса ферментов, который может сильно отличаться в зависимости от вида гриба и состава среды культивирования, а также, с различными путями деградации фталатов [20, 24–27].

Кроме того, в ходе жидкофазного культивирования грибов на средах с ЭФК наблюдали различия в изменении рН по сравнению с контрольной средой (рис. 6). Так, например, при культивировании *S. ochraceum* с ДЭФ к 10 сут рН резко снижались до 3.7 (по сравнению с исходным значением рН среды 4.9), в то время как на средах с другими ЭФК, а также контрольной, рН возрастал в процессе культивирования (рис. 6б). У грибов

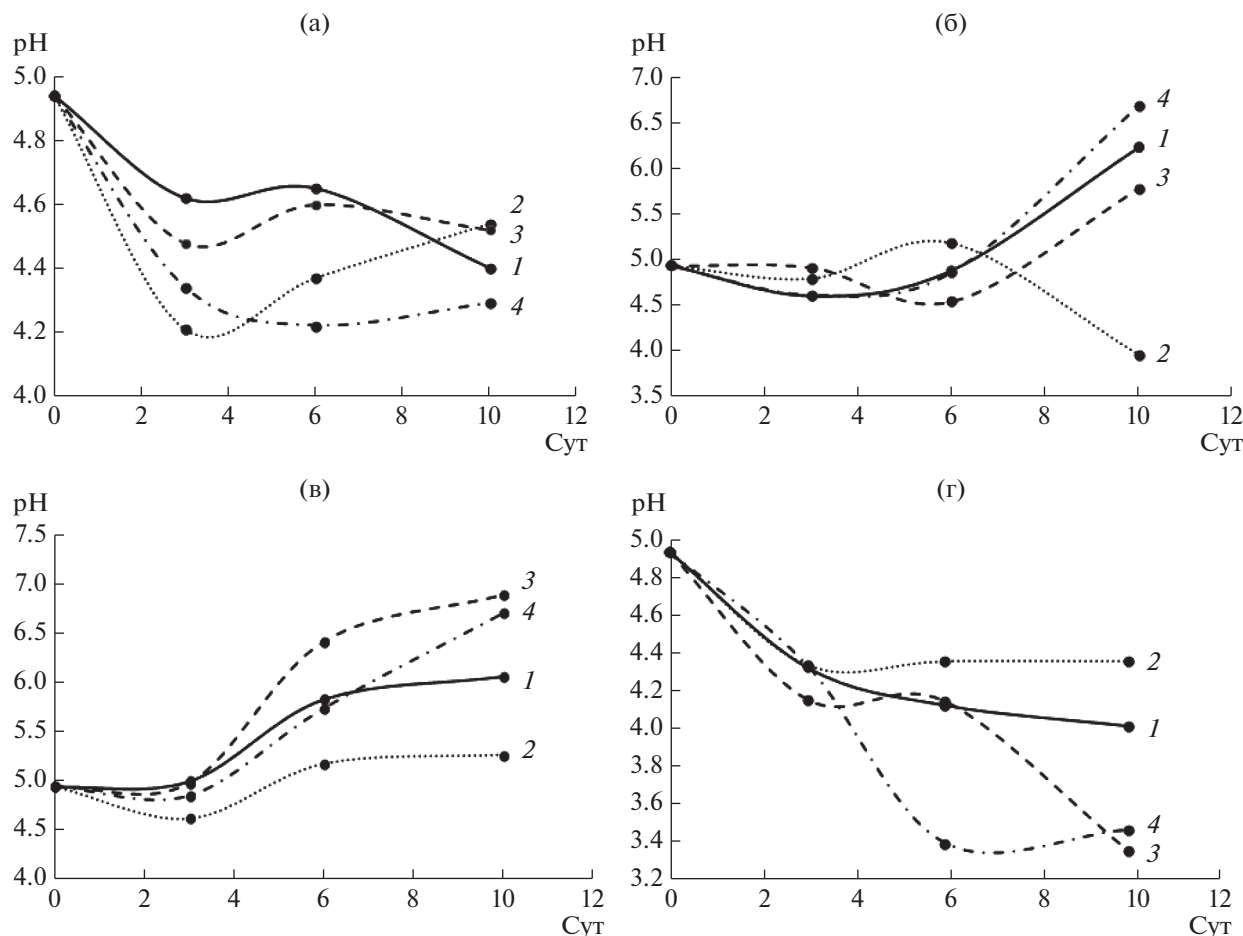


Рис. 6. Изменение pH при жидкофазном культивировании грибов *T. hirsuta* (а), *S. ochraceum* (б), *C. laeve* (в), *A. praecox* (г): 1 – контрольная среда, 2 – ДЭФ, 3 – ДБФ, 4 – ДЭГФ.

C. laeve и *A. praecox* также различалась динамика изменения pH на среде с ДЭФ, однако при этом показатель практически не менялся по сравнению с остальными вариантами эксперимента (рис. 6в, 6г). Для гриба *T. hirsuta* на всех средах сохранялась общая тенденция к снижению значения pH в процессе культивирования (рис. 6а), причем наиболее резкое падение происходило на 3 сут в присутствии ДЭФ.

Защелачивание среды в процессе ферментативной деструкции ЭФК можно объяснить образованием продуктов гидролиза. Их присутствие тормозит деградацию ЭФК (эфиры гидролизуются в щелочной среде более интенсивно, чем в более кислой). Предыдущие исследования показали, что разложение ДЭФ и ДБФ зависит от значения pH. Так, скорость деградации ДЭГФ штаммом *Pseudomonas sp.* быстро увеличивалась, когда pH среды увеличивался до 8.5 [13], то же показано для ДБФ штаммом *Agrobacterium sp.* при увеличении pH с 5 до 8 [28].

Было показано, что *T. hirsuta* и *A. praecox* в динамике закисляли среду до 4.3–4.5 и 3.4–4.4 соответственно, что коррелировало с существенным падением у этих грибов ЭА к 10 сут культивирования. У *S. ochraceum* и *C. laeve*, напротив, наблюдалось защелачивание среды в ходе культивирования и соответствующее этому постепенное нарастание эстеразной активности. Однако, не смотря на различную динамику pH и ЭА, для всех 4 грибов на 10 сут степень деградации ДБФ и ДЭГФ составляла 86–99%. Вероятно, в процессах биодеструкции у разных грибов участвуют разные ферменты и механизмы. Так, например, при действии марганец пероксидаз, которые могут принимать участие в деградации ЭФК, отмечается образование свободных радикалов при низких pH, в то время как гидролитическое расщепление сложноэфирной связи между алкильными цепями и ароматическим кольцом ЭФК с образованием сложных моноэфиров, а затем и фталевой кислоты под действием эстераз эффективнее происходит в щелочных условиях.

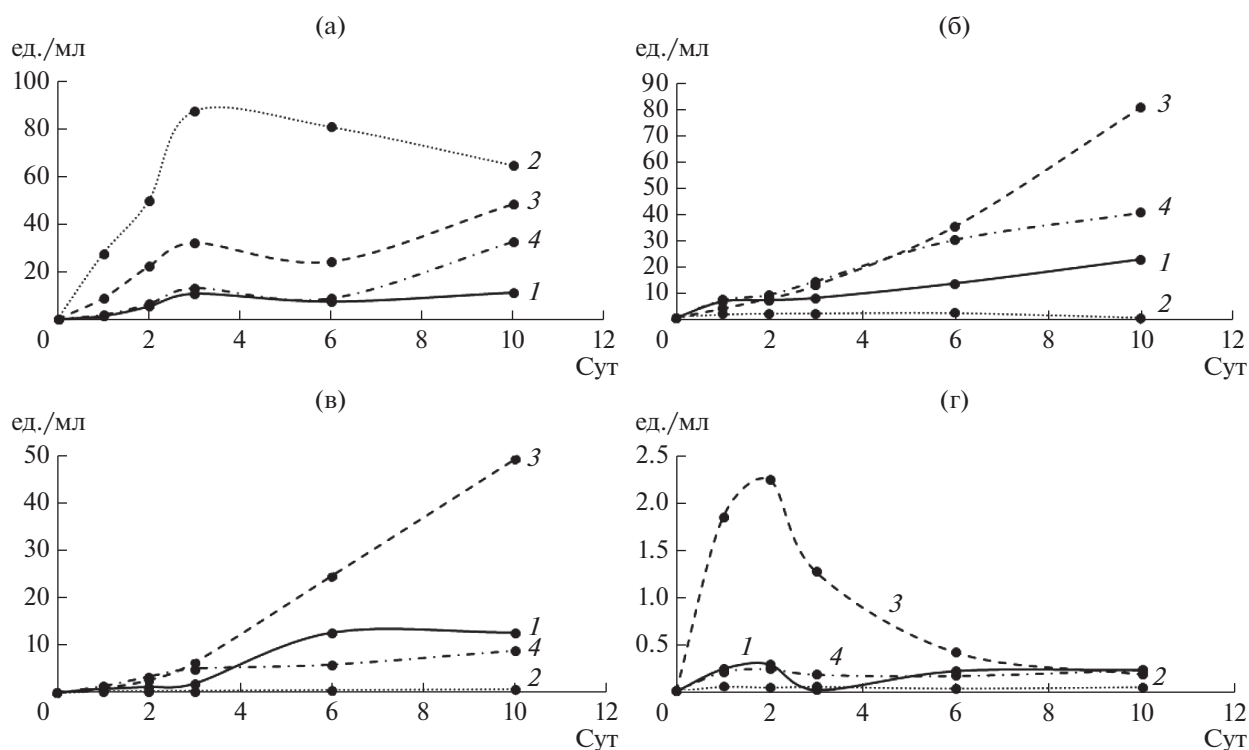


Рис. 7. Общая оксидазная активность КЖ грибов: 1 – контрольная среда, 2 – среда с ДЭФ, 3 – среда с ДБФ, 4 – среда с ДЭГФ; а – *T. hirsuta*, б – *S. ochraceum*, в – *C. laeve*, г – *A. praecox*.

Определение активности ферментов в КЖ грибов. Известно, что от метаболических особенностей штамма, субстрата и условий культивирования зависит уровень экспрессии ферментов. При выращивании гриба *L. edodes* авторы [20] показали увеличение активности внутри- и внеклеточных лакказы и эстераз на среде с ДЭГФ, причем активность лакказы была выше по сравнению с активностью эстеразы при всех концентрациях ДЭГФ. При этом, для других грибов, в частности *P. ostreatus*, выращенных в присутствии бутилбензилфталата, а также ДЭГФ, напротив, активность лакказы была ниже ЭА [24, 25]. Аналогичные результаты были получены для аскомицетов *Fusarium culmorum* и *Trichoderma harzianum* в присутствии ДЭГФ [16]. Таким образом, соотношение секретируемых ферментов может непосредственно влиять на эффективность деградации того или иного ЭФК. Поскольку ЭА и ОА играют важную роль в способности грибов к деструкции сложнодеградируемых соединений, была проведена их оценка при культивировании грибов на жидкой минеральной среде (рис. 7, 8).

Показано, что у *T. hirsuta* максимальная ЭА достигалась в 1 сут в присутствии всех ЭФК, далее на 3 сут культивирования происходило увеличение ОА, особенно в присутствии ДЭФ. После 3 сут ОА *T. hirsuta* в присутствии ДБФ и ДЭГФ продолжала постепенно расти, а в среде с ДЭФ,

наоборот, уменьшаться, что могло быть связано с токсичностью ДЭФ для гриба.

Для *S. ochraceum* пик ЭА достигался на 2–3 сут, при этом ОА возрастала плавно к 10 сут. Напротив, для *C. laeve* и *A. praecox* пики ЭА и ОА совпадали и приходились на 10 и 2 сут соответственно. Наибольшая ЭА достигалась в присутствии ДБФ для грибов *T. hirsuta*, *S. ochraceum* и *A. praecox*, в то время как для *C. laeve* – в присутствии ДЭГФ. При этом максимальные значения ЭА были получены для *C. laeve* (0.16 усл. ед./мл) и *A. praecox* (0.09 усл. ед./мл) в присутствии ДЭГФ и ДБФ соответственно. Биосинтез ферментов может индуцироваться увеличением концентраций ЭФК в среде [18]. Показано, что присутствие ДБФ индуцирует ЭА у гриба *Fusarium culmorum* [27], что согласуется с результатами настоящей работы для всех грибов, кроме *C. laeve*. Однако для *P. ostreatus* также была показана индукция ЭА в присутствии ДЭГФ [25], что аналогично результату, полученному в настоящей работе для *C. laeve*.

В присутствии ДЭФ ОА уменьшалась у всех грибов, по сравнению с контролем, кроме *T. hirsuta*, в КЖ которого активность в присутствии ДЭФ наоборот, существенно увеличивалась. Это согласуется с данными по скорости роста *T. hirsuta* на среде с ДЭФ и с вышеописанными результатами по накоплению биомассы. Таким образом, гриб *T. hirsuta* – наиболее устойчив к присут-

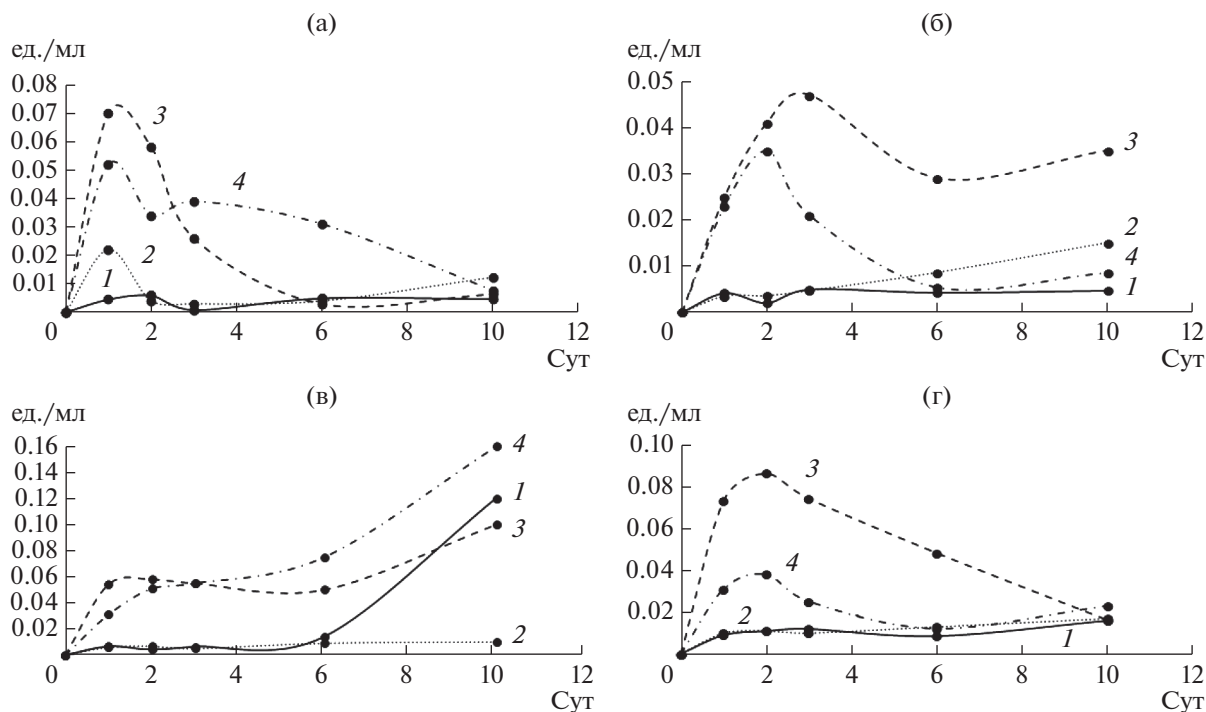


Рис. 8. Общая эстеразная активность КЖ грибов: 1 – контрольная среда, 2 – среда с ДЭФ, 3 – среда с ДБФ, 4 – среда с ДЭГФ; а – *T. hirsuta*, б – *S. ochraceum*, в – *C. laeve*, г – *A. praecox*.

ствию ДЭФ по сравнению с остальными, вероятно, за счет более эффективного комплекса секретируемых оксидаз или других вспомогательных ферментов.

Известно, что на начальной стадии деградации ЭФК ключевыми ферментами являются эстеразы [29], осуществляющие гидролитическое расщепление сложноэфирной связи между алкильными цепями и ароматическим кольцом ЭФК с образованием сложных моноэфиров, а затем фталевой кислоты (ФК) и спиртов. Далее может происходить расщепление бензольного кольца ФК с образованием метаболитов, образующихся при разложении ФК и спиртов. Во вторую стадию могут быть вовлечены такие ферменты, как декарбоксилазы, оксигеназы и оксидазы/дегидрогеназы [26, 27, 30, 31].

Анализ продуктов деструкции ЭФК. Качественный анализ экстрактов КЖ штаммов грибов методом ТСХ показал, что скорость биоразложения ДЭФ у всех грибов была значительно ниже, по сравнению с другими ЭФК, что коррелирует со скоростью их роста на твердой агаризованной среде и накоплением биомассы на жидкой среде с ДЭФ. Существенного убывания ДЭФ во времени не было зафиксировано, продукты реакции не были визуализированы (результаты не представлены), вероятно по причине их крайне низкого содержания. Очевидно, что самым трудно деградируемым и токсичным для грибов белой гнили

оказался ДЭФ, что подтверждается известными значениями токсичности использованных ЭФК: токсичность убывает в ряду ДЭФ > ДБФ > ДЭГФ [6]. Похожие результаты были получены в работе [15], в которой грибы белой гнили *P. ostreatus* и *T. versicolor* менее эффективно деградировали ДЭФ, по сравнению с диметилфталатом и бутилбензилфталатом. Результаты анализа экстрактов КЖ грибов с ДБФ и ДЭГФ методом ТСХ приведены на рис. 9.

Показано, что у всех грибов в процессе культивирования с ДБФ и ДЭГФ менялось количественное соотношение продуктов реакции, а также их спектр. Поскольку, согласно результатам ТСХ, скорость деградации ЭФК убывала в порядке ДЭГФ > ДБФ > ДЭФ, и для ДЭФ скорость была очень низкая, а продукты не визуализировались, количественную оценку биодеструкции ЭФК с использованием метода ГХ-МС в дальнейшем проводили только для ДБФ и ДЭГФ. Результаты представлены в табл. 2.

Полученные результаты показали высокую эффективность разложения ДЭГФ (более 98%) грибами *T. hirsuta*, *S. ochraceum* и *A. praecox*, а ДБФ (более 96%) – *C. laeve* за 10 сут.

Несмотря на то, что в литературе описано снижение скорости биодеструкции фталатов с увеличением длины алкильной цепи, а также зависимость от ее разветвленности [15, 19, 23, 32], в настоящей работе показано, что у гриба *S. ochraceum*

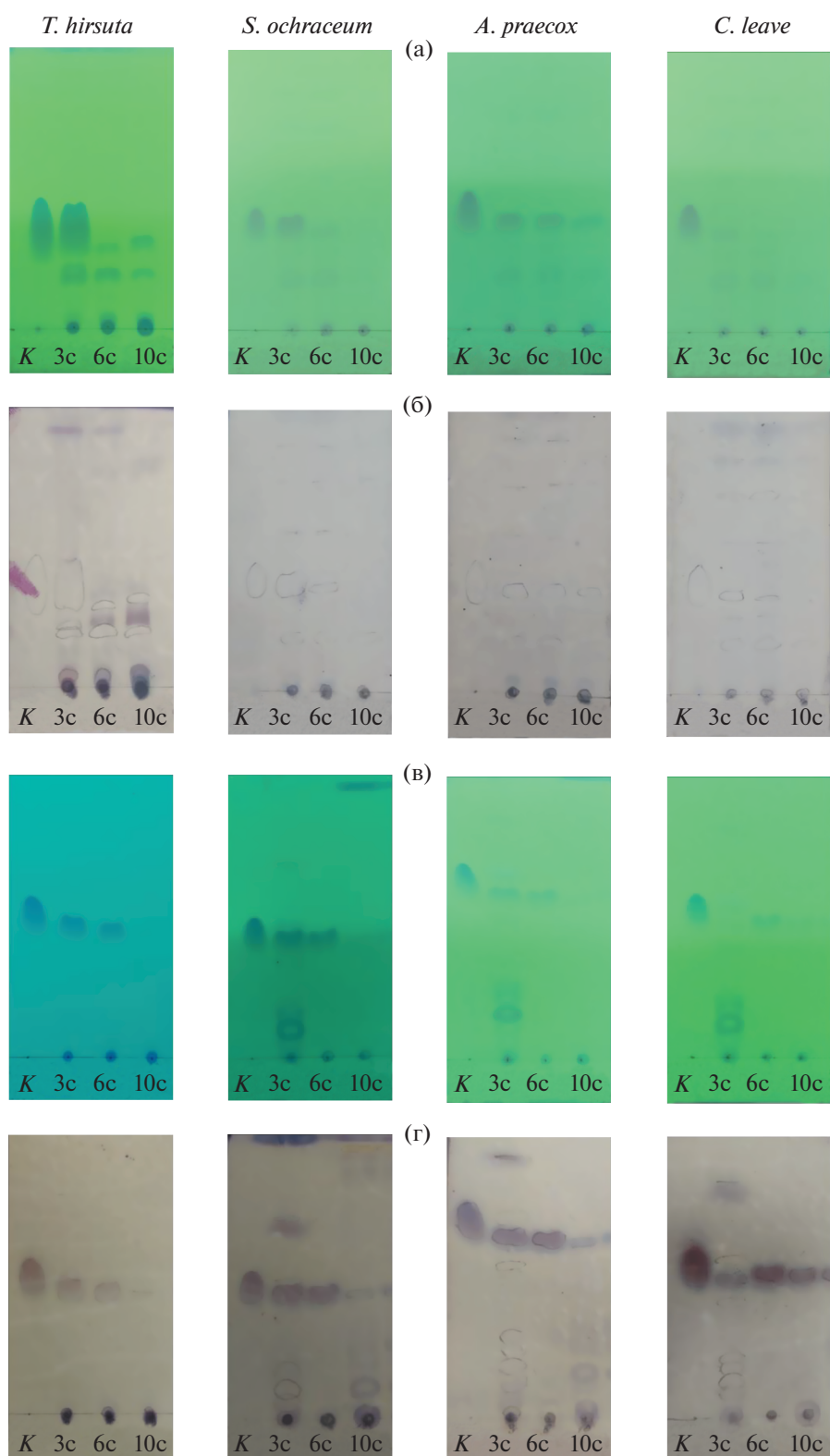


Рис. 9. ТСХ экстрактов КЖ грибов *T. hirsuta*, *S. ochraceum*, *C. leave* и *A. praecox* на 3, 6, и 10 сут культивирования на среде с ДБФ (а, б) и ДЭГФ (в, г): К- ДБФ коммерческий; а, в – визуализация в УФ-свете, б, г – проявление ванилином.

Таблица 2. Динамика биодеградации ДБФ и ДЭГ (1 г/л) грибами белой гнили

Штамм	Деградация, %					
	ДБФ			ДЭГФ		
	3 сут	6 сут	10 сут	3 сут	6 сут	10 сут
<i>T. hirsuta</i> 072	65.9 ± 2.0	78.3 ± 0.6	88.2 ± 1.2	39.2 ± 1.9	92.6 ± 0.2	99.2 ± 0.5
<i>S. ochraceum</i> 3174	0.2 ± 0.05	57.7 ± 0.3	87.3 ± 0.2	45.0 ± 0.8	96.5 ± 0.4	99.7 ± 0.3
<i>C. laeve</i> 1700	85.5 ± 1.5	94.9 ± 0.3	96.5 ± 0.5	52.3 ± 0.2	68.6 ± 2.0	88.7 ± 1.2
<i>A. praecox</i> 6205	74.8 ± 0.8	85.5 ± 0.6	86.1 ± 1.0	12.6 ± 1.2	41.4 ± 0.5	99.0 ± 0.3

скорость деградации ДЭГФ была существенно выше, чем ДБФ (табл. 2). Для остальных грибов скорость деградации ДБФ на 3 сут была выше, чем ДЭГФ, но все же к 10 сут для грибов *T. hirsuta* и *A. praecox* более высокая степень деградации была получена для ДЭГФ. Только результаты с *C. laeve* согласовались с данными литературы. При этом увеличение концентрации ДБФ в среде в небольшой степени ингибировало рост *C. laeve* (рис. 3в), в отличие от гриба *P. ostreatus*, рост которого не ингибировался повышением концентрации ДБФ в среде (до 1000 мг/л) [23].

Поскольку скорость биодеградации ДЭГФ была выше у дереворазрушающих сапротрофов, а ДБФ – у подстилочных сапротрофов (более 90% на 6 сут, табл. 2), по 1 представителю этих групп (*T. hirsuta* и *C. laeve*) было выбрано с целью определения продуктов биодеградации ЭФК. Для накопления продуктов деградации ЭФК в количествах, необходимых для их идентификации, предварительно проводили разделение экстрактов методом препаративной ТСХ, после чего элюаты анализировали методом ГХ-МС. Для анализа в этом случае использовали экстракты КЖ *C. laeve* на 3 сут для обоих субстратов, а *T. hirsuta* – на 3 сут с ДБФ и 6 сут с ДЭГФ (образцы, где продукты деградации ЭФК визуализировались методом ТСХ).

В результате ГХ-МС-анализа в контрольных образцах *C. laeve* (при отсутствии фталатов) был обнаружен более широкий спектр метаболитов (всего 24), по сравнению с контрольными образцами *T. hirsuta* (всего 13 и 19 на 3 и 6 сут соответственно), представленный в основном эфирами карбоновых кислот, а также спиртами и альдегидами (рис. 10).

Следует отметить, что на 6 сут культивирования в КЖ *T. hirsuta* расширялся спектр синтезируемых грибом спиртов и эфиров бензойной кислоты. В присутствии фталатов образование большинства характерных для грибов метаболитов прекращалось: на 3 сут в образце КЖ *C. laeve* с ДБФ и ДЭГФ было обнаружено 7 и 11 соединений соответственно, а на 3 и 6 сут в образцах *T. hirsuta* с ДБФ и ДЭГФ – 5 и 3 соединения соответствен-

но (табл. 3). Причем всего 3 соединения из контрольных образцов были идентифицированы в опытных образцах с фталатами, а именно: пентадециловый эфир акриловой кислоты, обнаруженный в контрольных образцах КЖ обоих грибов, идентифицирован в КЖ и *C. laeve* с ДЭГФ, и *T. hirsuta* с ДБФ и ДЭГФ; пентадециловый эфир пропионовой кислоты, найденный в контрольном образце *T. hirsuta*, также идентифицирован в КЖ *T. hirsuta* с ДБФ; 4-пропилбензальдегид, найденный в контрольном образце КЖ *C. laeve* – идентифицирован в КЖ *C. laeve* с обоими ЭФК. В присутствии ЭФК для *C. laeve* было характерно появление кетонов и отсутствующих в контрольных КЖ спиртов (табл. 3).

В КЖ грибов *T. hirsuta* и *C. laeve* обнаружен 2,6-дитретбутил-4-метилфенол (ионол), отсутствующий в контрольных образцах. Это соединение применяется в качестве антиоксиданта при производстве пищевых продуктов (пищевая добавка Е321), а также является исходным соединением для синтеза различных пространственно затруднённых фенолов, многие из которых обладают биологической активностью [33]. Ионол часто встречается в качестве вторичного метаболита, продуцируемого различными группами организмов, в частности грибами, однако является аутоксичным [34]. Имеющиеся на сегодняшний день данные не объясняют, почему организмы вырабатывает такой аутоксичный метаболит. Вероятно, индукция биосинтеза ионола грибами является своеобразной защитной реакцией грибов от свободных радикалов, образующихся при ферментативном окислении в ходе деградации ЭФК. Однако, ввиду своей аутоксичности, накопление этого соединения в ходе биотрансформации ДБФ может приводить к торможению роста гриба.

Кроме того, при культивировании грибов в присутствии ДБФ и ДЭГФ в КЖ грибов был обнаружен ДЭФ, из чего можно сделать вывод, что он являлся промежуточным продуктом биотрансформации этих ЭФК обоими грибами. В работе [23] при изучении пути деградации ДБФ дереворазрушающим грибом белой гнили *P. ostreatus* не было обнаружено ДЭФ в качестве промежуточно-

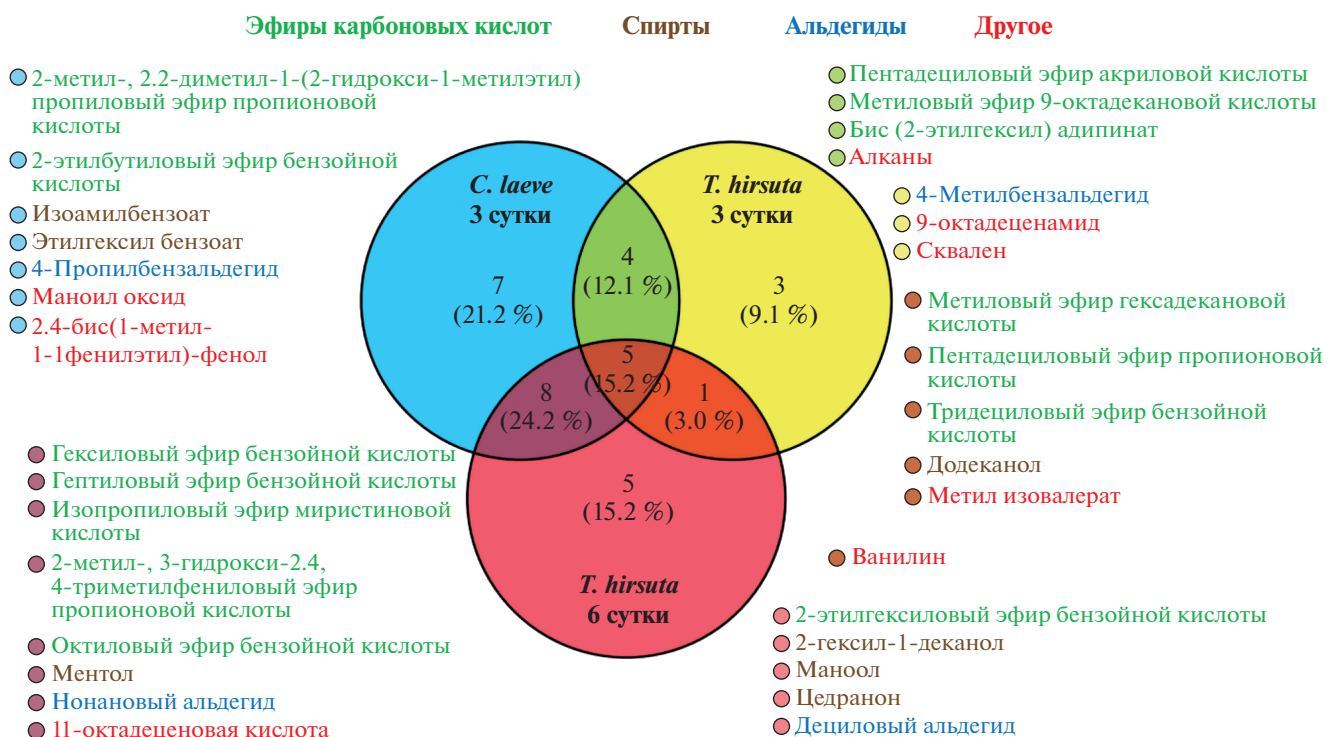


Рис. 10. Диаграмма Венна для метаболитов, обнаруженных в контрольных образцах КЖ *C. laeve* и *T. hirsuta* методом ГХ-МС.

го метаболита, однако при бактериальной трансформации этого фталата показана возможность его образования из ДБФ [32]. Вероятно, замедление роста грибных культур при выращивании на среде с ДБФ, может быть также связано с образованием в качестве промежуточного трудно деградируемого ДЭФ из-за его высокой токсичности, особенно в условиях высоких концентраций ЭФК.

В работе [35] в качестве основного метаболита при биодеструкции ДБФ бактериями *Pseudomonas* sp. и *Comamonas* sp. также был идентифицирован ДЭФ, который может быть получен путем реакции переэтерификации с участием липаз. Однако авторам, как и в настоящей работе, не удалось обнаружить такой основной метаболит деструкции ЭФК как фталевая кислота, предположительно, из-за короткого периода полураспада этого соединения.

Ранее показан возможный механизм деструкции ЭФК с помощью эстераз, приводящий к образованию 1,3-изо-бензофурандиона (ИБФ) при гидролизе сложного эфира с последующим спонтанным образованием оксомостики и дальнейшее превращение ИБФ в различные моноэфиры путем переэтерификации при наличии в среде спиртов [36]. Перечень возможных продуктов превращения ИБФ зависит от спектра синтезируемых грибами ферментов. Возможно, именно таким путем происходит образование ДЭФ при трансформа-

ции ДБФ и ДЭГФ. В КЖ гриба *C. laeve* на 3 сут ЭА преобладала над ОА. Вероятно, идентифицированные в ней соединения, могут быть продуктами реакций переэтерификации моноэфиров, например 1-гидроксициклогексил фенил кетон. Поскольку одновременно с ЭА все же фиксируется и ОА, то параллельно могут проходить свободнорадикальные реакции с образованием целого спектра разнообразных соединений (подобно 2-гидрокси-изо-бутирофенону у *C. laeve*), некоторые из которых трудно идентифицировать (вероятно, таким соединением может являться не идентифицированное соединение с RT2126, обнаруженное в КЖ *T. hirsuta*).

Таким образом, исследование показало, что грибы белой гнили являются перспективными биодеструкторами широко распространенных токсичных ЭФК, различающихся структурой и гидрофобностью. Полученные результаты подтвердили, что механизмы разрушения ЭФК различаются у грибов в зависимости от экофизиологической группы. Различия в путях деградации ЭФК грибами белой гнили могут быть связаны с секрецией уникальных ферментных комплексов, участвующих в процессах биодеструкции. Показано, что в процессе культивирования динамика ОА и ЭА *T. hirsuta* ближе к *A. praecox*, а *S. ochraceum* — к *C. laeve*. Очевидно, что присутствие ЭФК изменяло метаболический профиль гриба. Вероятно, вторичные

Таблица 3. Метаболиты, идентифицированные в КЖ *C. leave* и *T. hirsuta* на средах с ЭФК методом ГХ-МС

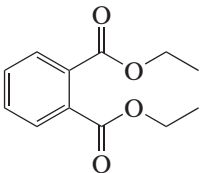
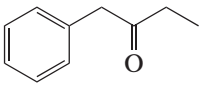
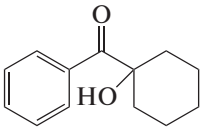
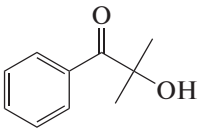
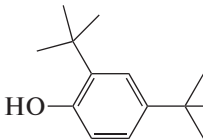
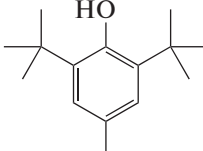
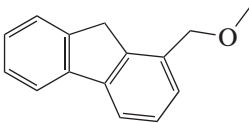
Метаболит	<i>C. leave</i> + + ДБФ (3 сут)	<i>C. leave</i> + + ДЭГФ (3 сут)	<i>T. hirsuta</i> + + ДБФ (3 сут)	<i>T. hirsuta</i> + + ДЭГФ (6 сут)
Фталаты				
Диэтилфталат (ДЭФ), C ₁₂ H ₁₄ O ₄ 	+	+	+	+
Эфиры карбоновых кислот				
Тридецил акрилат, C ₁₆ H ₃₀ O ₂	+	-	-	-
Спирты				
Гексадеканол, C ₁₆ H ₃₃ ОН	-	+	-	-
Октадеканол, C ₁₈ H ₃₈ О	-	+	-	-
Кетоны				
Бензил этил кетон, C ₁₀ H ₁₂ O 	-	+	-	-
1-Гидроксициклогексил фенил кетон, C ₁₃ H ₁₆ O ₂ 	+	+	-	-
2-Гидрокси-изо-бутирофенон, C ₁₀ H ₁₂ O ₂ 	+	+	-	-
Фенолы				
2,4-Ди-трет-бутилфенол, C ₁₄ H ₂₂ O 	+	-	-	-
2,6-Дитретбутил-4-метилфенол (ионол), C ₁₅ H ₂₄ O 	+	-	+	+
Другие				
Сквален	-	+	-	-

Таблица 3. Окончание

Метаболит	<i>C. leave</i> + + ДБФ (3 сут)	<i>C. leave</i> + + ДЭГФ (3 сут)	<i>T. hirsuta</i> + + ДБФ (3 сут)	<i>T. hirsuta</i> + + ДЭГФ (6 сут)
1-метокси-метилфлуорен, C ₁₅ H ₁₄ O 	–	+	–	–
Неидентифицированное соединение с RT2126	–	–	+	–

ксилотрофы могут быть ближе по своему метаболизму к гумусовым и подстилочным грибам, в отличие от первичных ксилотрофов.

Полученные результаты могут быть использованы для дальнейших исследований, направленных на установление механизмов биоразложения ЭФК различными грибами, а также при отборе конкретных штаммов базидиальных грибов для использования с целью биоремедиации загрязненных фталатами сред.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант РНФ 21-14-00306.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Weaver J.A., Beverly B.E.J., Keshava N., Mudipalli A., Arzuaga X., Cai C. et al. // Environ. Int. J. 2020. V. 145. № 105848. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105848>
- de Souza Machado A.A., Lau C.W., Kloas W., Bergmann J., Bachelier J.B., Faltin E., Becker R. et al. // Environ. Sci. Technol. 2019. V. 53. P. 6044–6052. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01339>
- Iqbal S., Xu J., Allen S.D., Khan S., Nadir S., Arif M.S., Yasmeen T. // Chemosphere. 2020. V. 260. № 127578. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127578>
- Wormuth M., Scheringer M., Vollenweider M., Hungerbühler K. // Risk Analysis. 2006. V. 26. № 3. P. 803–324. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2006.00770.x>
- Clark K.E., David R.M., Guinn R., Kramarz K.W., Lampi M.A., Staples C.A. // Hum. Ecol. Risk Assess. (HERA). 2011. V.17. P. 923–965. <https://doi.org/10.1080/10807039.2011.588157>
- Шкаева И.Е., Солнцева С.А., Никулина О.С., Николаев А.И., Дулов С.А., Земляной А.В. // Toxicol. Rev. 2019. V. 159. № 6. P. 3–9.
- Toft G., Jönsson B.A.G., Lindh C.H., Jensen T.K., Hjelund N.H., Vested A., Bonde J.P. // Environ Health Perspect. 2012. V. 120. № 3: 458–463. <https://doi.org/10.1289/ehp.1103552>
- Kinnear E.J.C., Miller K.Y., Tong A.Z. // Food Additives & Contaminants: Part A. 2021. P. 1–12. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1940307>
- Edwards L., McCray N.L., VanNoy B.N., Yau A., Geller R.J., Adamkiewicz G., Zota A.R. // J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41370-021-00392-8>
- Ястребова О.В., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. № 4. С. 378–385. <https://doi.org/10.1134/S0555109919040159>
- Jin D., Baia Z., Chang D., Hoefelc D., Jin B., Wang P., Wei D., Zhuang G. // J. Hazard. Mater. 2012. V. 221–222. P. 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.010>
- He Z., Niu C., Lu Z. // J. Hazard. Mater. 2014. V. 273. P. 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.03.033>
- Tao Y., Li H., Gu J., Shi H., Han S., Jiao Y., et al. // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019. V. 173. P. 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.055>
- Feng N., Feng Y., Liang Q., Chen X., Xiang L., Zhao H. et al. // Sci Total Environ. 2021. № 761:143208. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143208>
- Hwang S., Choi H.T., Song H. // J. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 18. № 4. P. 767–772
- Aguilar-Alvarado Y., del Rosario Baez-Sanchez M., Martinez-Carrera D. C., Ahuactzin-Perez M., Cuamatzi-Mucoz M., Sanchez C. // Pol. J. Environ. Stud. 2015. V. 24. № 5. P. 1897–1902. <https://doi.org/10.15244/pjoes/58808>
- Jegade D.O., Adewuyi G.O., Gbadamosi M.R., Oladoye P.O., Ogunneye A.L., Oyewola O.J. // Nigerian J. Chemical Research. 2019. V. 24. № 2. P. 77–89.
- González-Márquez A., Ahuactzin-Pérez M., Sánchez C. // Bioresources. 2015. V. 10. № 4. <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.7898-7906>
- Chen Y., Zhang W., Chen J., Wang N., Chen C., Wang Y. et al. // J. Diabetes Res. 2021. Article ID 4027380. <https://doi.org/10.1155/2021/4027380>
- Su'arez-Segundo J.L., Vazquez-Lopez D., Torres-Garcia J.L., Ahuactzin-Perez M., Montiel-Martinez N., Tlecuil-Beristain S., Sanchez C. // Revista Mexicana de Ingenieria Química. 2013. V. 12. № 3. P. 499–504.
- Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. // Biochimie. 2017. V. 142. P. 183–190.
- Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Shakhova N.V., Savinova O.S., Vasina D.V., Tyazhelova T.V. et al. // Micro-

- organisms. 2019. V. 7. P. 527.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7110527>
23. Ahuactzin-Perez M., Tlecuil-Beristain S., García-Davila J., Santacruz-Juarez E., Gonzalez-Perez M., Concepcion Gutierrez-Ruiz M., Sanchez C. // Fungal Biol. 2018. P. 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.07.001>
 24. Hwang S., Kim H., Ka J., Song H. // J. Microbiol. Biotechnol. 2012. V. 22. № 2. P. 239–243.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1107.07050>
 25. Cordoba-Sosa G., Gonzalez-Marquez A., Luis Torres J., Achuactzin-Perez M., Diaz-Godinez G., Diaz R., Sanchez C. // Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8). Ed. II. New Delhi: ICAR-DMR, SOLAN HP& WSMBMP, 2014. P. 231–237.
 26. Gao D., Wen Z. // Sci. Total Environ. 2016. V. 541. P. 986–1001.
 27. Ahuactzin-Perez M., Tlecuil-Beristain S., García-Davila J., Santacruz-Juarez E., Gonzalez-Perez M., Concepcion Gutierrez-Ruiz M., Sanchez C. // 3 Biotech. 2018. V. 8. № 42. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1007/s13205-017-1065-2>
 28. Wu X., Wang Y., Liang R., Dai Q., Jin D., Chao W. // Process Biochemistry. 2011. V. 46. P. 1090–1094.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.031>
 29. Chang B., Yang C., Yang C. // Microorganisms. 2021. V. 9. P. 1989.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091989>
 30. Tang Y., Zhang Y., Jiang L., Yang C., Rittmann B.E. // Biodegradation. 2017.
<https://doi.org/10.1007/s10532-017-9805-x>
 31. Ahmadi E., Yousefzadeh S., Ansari M., Reza Ghaffari H., Azari A., Miri M., et al. // Sci. Rep. 2017. 7:41020.
<https://doi.org/10.1038/srep41020>
 32. Liang D., Zhang T., Fang H.H.P., He J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 80. P. 183–198.
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1548-5>
 33. Zarudii F.S., Gil'mutdinov G.Z., Zarudii R.F., Myshkin M.A., Gershanov F.B., Novikov T.A. // Pharm. Chem. J. 2001. V. 35. P. 162–168.
<https://doi.org/10.1023/A:1010414130628>
 34. Zhao F., Wang P., Lucardi R.D., Su Z., Li S. // Toxins. 2020. V. 12. P. 35.
<https://doi.org/10.3390/toxins12010035>
 35. Kumar V., Sharma N., Maitra S.S. // Biotechnol Rep (Amst). 2017. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.04.002>
 36. Chatterjee S., Karlovsky P. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. P. 61–73.
<https://doi.org/10.1007/s00253-010-2570-y>

Biodestruction of Phthalic Acid Esters by White Rot Fungi

O. S. Savinova^a, A. V. Shabaev^a, O. A. Glazunova^a, S. A. Eremin^{a, b}, and T. V. Fedorova^{a, *}

^a Bach Institute of Biochemistry, Biotechnology Research Center of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^b Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: fedorova_tv@mail.ru

The ability of white rot fungi from different ecophysiological groups (*Trametes hirsuta*, primary wood-destroying saprotroph; *Steccherinum ochraceum*, secondary wood-destroying saprotroph; *Crucibulum laeve*, litter saprotroph; and *Agrocybe praecox*, humus saprotroph) to biodegrade phthalic acid esters (PAE) was studied. It has been shown that diethylhexyl phthalate (DEHP) with longer and branched hydrocarbon chains is more rapidly biodegraded by wood-destroying saprotrophs such as *T. hirsuta* and *S. ochraceum*, with an efficiency of more than 99%. At the same time, DEHP can be used by fungi as a source of nutrition for growth and development. Dibutyl phthalate (DBP), with shorter hydrocarbon units and less hydrophobic, is most efficiently transformed by the litter saprotroph *C. laeve* (up to 96.5%). The most toxic for all fungi is a lower molecular weight PAE – diethyl phthalate (DEP). *T. hirsuta* showed the greatest resistance to elevated DEP concentrations in the medium. It has been shown that fungi destroy PAE with the formation of various metabolites, depending on the composition of the multienzyme complex of the fungus. Among the secondary metabolites, ionol was found, an antioxidant secreted by fungi when PAE is added to the medium.

Keywords: phthalic acid esters, degradation, biodestruction, basidiomycetes, white rot fungi

УДК 557.152.192.3

ФЕРМЕНТАТИВНО СИНТЕЗИРОВАННЫЙ ПОЛИАНИЛИН, ДОПИРОВАННЫЙ ИОНАМИ МЕДИ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА

© 2022 г. И. С. Васильева¹, Г. П. Шумакович¹, О. В. Морозова¹, А. И. Ярополов¹ *¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 23.03.2022 г.

После доработки 04.04.2022 г.

Принята к публикации 27.04.2022 г.

Разработан ферментативный синтез интерполиэлектролитного комплекса полианилин (ПАНИ)/полистиролсульфонат натрия (ПСС), в котором ПАНИ допирован ионами Cu(II). Биокатализатором полимеризации анилина (АНИ) являлась грибная лакказа *Trametes hirsuta*, а окислителем – атмосферный кислород. Полученный комплекс ПАНИ-Cu/ПСС был исследован методами УФ-видимой и FTIR-ATR спектроскопии и рентгенофлуоресцентного анализа. Весовое содержание меди в ПАНИ-Cu/ПСС составляло ~8 вес. %. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) комплекса ПАНИ-Cu/ПСС, блокирующего рост грамотрицательных (*Escherichia coli*) и грамположительным (*Staphylococcus aureus*) бактерий составляла 2.65 мг/мл и 0.66 мг/мл соответственно.

Ключевые слова: полианилин, Cu (II)-допант, биокатализ, лакказа, антибактериальная активность

DOI: 10.31857/S0555109922050154

В последние десятилетия большое внимание уделяется гибридным системам и композитам на основе электропроводящего полианилина (ПАНИ), что связано с перспективностью их использования в различных областях [1–5]. Свойства ПАНИ можно изменять в широких пределах в зависимости от условий проведения синтеза [6, 7]. Обычно ПАНИ синтезируют химическим или электрохимическим окислением анилина (АНИ) в сильноокислой среде [1, 2, 8, 9]. Также описан ферментативный метод получения электропроводящего ПАНИ, отвечающий требованиям “белой” биотехнологии [1, 10–15]. С экологической точки зрения ферментативный синтез ПАНИ является хорошей альтернативой традиционным методам синтеза.

Перспективным катализатором окислительной полимеризации АНИ является лакказа, так как окислителем в реакции является кислород воздуха. Лакказа (*n*-дифенол:кислород оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) относится к медь-содержащим оксидазам и катализирует окисление различных органических соединений, в результате которого образуются радикалы, вступающие в реакции сочетания с образованием олигомерных/полимерных продуктов [16–18].

Электрические и оптические свойства ПАНИ можно обратимо контролировать редокс реакци-

ями или протонированием [19, 20]. Окислительное состояние ПАНИ может изменяться от полностью окисленного (пернигранилин) до полностью восстановленного (лейкоэмеральдин). Полуокисленное состояние основной цепи полимера называют эмеральдином [1, 2]. Электропроводящую форму ПАНИ, эмеральдиновую соль, можно получить как протонированием [1, 2, 21], так и допированием цепи полимера различными допантами, такими как кислоты Льюиса, йод, соли переходных металлов [22–26]. Допантами полимеров называют доноры или акцепторы электронов, которые при взаимодействии с основной цепью полимера приводят к образованию на ней зарядов, обуславливающих электропроводность полимера.

В ряде работ было показано, что химически синтезированный ПАНИ обладает антимикробными свойствами [27–32]. Эффективность химически синтезированного ПАНИ подавлять рост грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов впервые была описана в работе [27]: хлопчатобумажные ткани, покрытые электропроводящим ПАНИ, подавляли рост *S. aureus* на 95%, *E. coli* на 85% и грибов *Candida albicans* на 92%. Авторы связывали антибактериальные эффекты ПАНИ с электростатическим взаимодействием между молекулами полимера и клетками бактерий, что приводило к разрушению клеточ-

ных стенок и гибели клеток. Ши с соавт. [28] показали, что пленки поливинилового спирта, содержащие 1–10 вес. % ПАНИ полностью подавляли рост бактерий *E. coli* и *S. aureus*.

Известно, что медь и ее сплавы являются антимикробными материалами [33, 34]. Можно предположить, что ионы меди Cu^{2+} в качестве допанта основной цепи полимера могут усиливать антимикробные свойства ПАНИ.

Цель работы – провести ферментативный матричный синтез и изучить физико-химические и антибактериальные свойства полианилина, допированного ионами меди(II).

МЕТОДИКА

Лимонная кислота, NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , NaOH – производства “Riedel-de Haën” (Германия), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, полистиролсульфонат (ПСС, 30 вес. %) “Sigma-Aldrich” (США) были использованы без дополнительной очистки. АНИ (“Sigma-Aldrich”, США) был очищен вакуумной перегонкой.

Лакказа была выделена из культуральной жидкости базидиального гриба *Trametes hirsuta* (Wulfen) Pilát (штамм *T. hirsuta* 56) согласно методу [35]. Фермент был гомогенен по данным ДДС-электрофореза и имел удельную активность 161 МЕ/мг белка. Активность фермента определяли спектрофотометрически, используя в качестве хромогенного субстрата 1 мМ раствор АБТС ($\lambda = 420$ нм; $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) в 0.1 М Na-цитратно-фосфатном буфере, pH 4.5. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкмоль АБТС за 1 мин при температуре 22°C. Концентрация белка, измеренная согласно методу [36], составляла 7.8 мг/мл.

Все растворы готовили с использованием воды, очищенной на установке Simplicity (“Millipore”, США).

Синтез ПАНИ/ПСС проводили следующим образом. К 10 мл раствора ПСС в 0.1 М цитратно-фосфатном буфере, pH 3.5 (концентрация 11 мМ на повторяющееся звено полимера), добавляли 10 мкл АНИ (концентрация 11 мМ) и перемешивали в течение 1 ч. Полимеризацию АНИ инициировали добавлением фермента, удельная активность которого в реакционной смеси была ~1 МЕ/мл. Реакцию проводили при комнатной температуре (21–22°C) и постоянном перемешивании со скоростью 400 об./мин на магнитной мешалке RT-10 (“IKA®-Werke GmbH & Co”, Германия) в течение 24 ч. Затем реакционную смесь диализовали против деионизированной воды для удаления низкомолекулярных соединений.

Дедопирование интерполимерного комплекса ПАНИ/ПСС проводили, добавляя к диализованному раствору 1 М NaOH до pH 10.0. Через 12 ч

раствор диализовали против воды, pH которой доводили до значения 7.8 раствором NaOH . Для редопирования комплекса ионами меди к раствору добавляли 27.5 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (молярное соотношение АНИ/ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} = 1 : 1$), перемешивали при комнатной температуре (21–22°C) на магнитной мешалке со скоростью 400 об./мин в течение 12 ч и диализовали против деионизированной воды.

УФ-видимые спектры регистрировали на спектрофотометре UV1240 mini (“Shimadzu”, Япония). Анализ образцов методом спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения в инфракрасной области с преобразованием Фурье (FTIR-ATR) проводили на спектрометре FT/IR-67000 (“Jasco”, Япония). Содержание меди в образцах определяли методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (EDX) с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-6510LV (“JEOL Ltd”, Япония), оснащенного энергодисперсионной приставкой сX-MAX (“Oxford Instruments”, Великобритания). Для определения содержания меди и исследованный методом FTIR-ATR спектроскопии образцы высушивали при 60°C до постоянного веса.

Для исследований на антимикробную активность водные растворы комплексов были сконцентрированы упариванием при 37°C до 5.8 мг/мл (ПАНИ/ПСС) и 5.3 мг/мл (ПАНИ- Cu /ПСС). Минимальную ингибирующую рост концентрацию (МИК) синтезированных комплексов определяли по стандартной методике серийных (двукратных) разведений в питательной среде LB (Luria-Bertani, Miller, “Sigma”, США). В качестве тест-культур использовали грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* 209P и грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* K-12. 200 мкл предварительно стерильно приготовленных сред LB, содержащих различные концентрации комплексов, вносили в лунки 96-луночного планшета в 3-кратной повторности для каждой концентрации. Затем в каждую лунку вносили 4 мкл клеток тест-культур стационарной фазы роста (1 сут) и инкубировали при 28°C и перемешивании на роторной качалке (150 об./мин). После 24 ч инкубации измеряли оптическую плотность каждой лунки относительно контролей (без инокулята) при 540 нм с использованием Ao Absorbance Microplate Reader (“Azure Biosystems”, UK). Рост микроорганизмов оценивали по изменению оптической плотности по сравнению с начальным значением (сразу после инокуляции среды). МИК определяли как наименьшую концентрацию соединения, подавляющую рост бактерий в течение 24 ч. Каждую культуру тестировали трижды.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одна из ключевых проблем использования электропроводящего ПАНИ – плохие эксплуатационные характеристики полимера (нерастворимость, неплавкость, плохие механические свойства), которые препятствуют его широкому промышленному использованию. Одним из вариантов решения этой проблемы является синтез ПАНИ с использованием водорастворимой матрицы [1, 2, 37, 38]. В настоящей работе в качестве матрицы был использован ПСС.

В результате катализируемой лакказой окислительной полимеризации АНИ на матрице ПСС был получен электропроводящий интерполиэлектродлитный комплекс ПАНИ/ПСС, УФ-видимый спектр которого представлен на рис. 1 (кривая 1). На спектре ПАНИ/ПСС присутствовали полосы, характерные для электропроводящего ПАНИ: полоса в области 340 нм, соответствующая $\pi-\pi^*$ электронным переходам в ароматических кольцах, и две полосы поглощения (420 и 787 нм), указывающие на формирование полярона в структуре ПАНИ [39, 40]. При дедопировании комплекса эти полосы исчезали, и появлялась полоса поглощения в области 510 нм, соответствующая ПАНИ в неэлектропроводящей форме эмеральдинового основания (рис. 1, 2). При этом переходе цвет раствора менялся с зеленого на голубой. Так как дедопирование/допирование процесс обратимый, то после диализа на спектре снова появляются полосы, характерные для электропроводящей формы ПАНИ (рис. 1, 3). Однако при pH 7.8 основная полоса поглощения, соответствующая полярону, смещалась в более коротковолновую область (755 нм). При редопировании полимера ионами Cu^{2+} (рис. 1, 4) происходил сдвиг этой полосы до 764 нм, что являлось косвенным доказательством взаимодействия ионов меди с основной цепью ПАНИ.

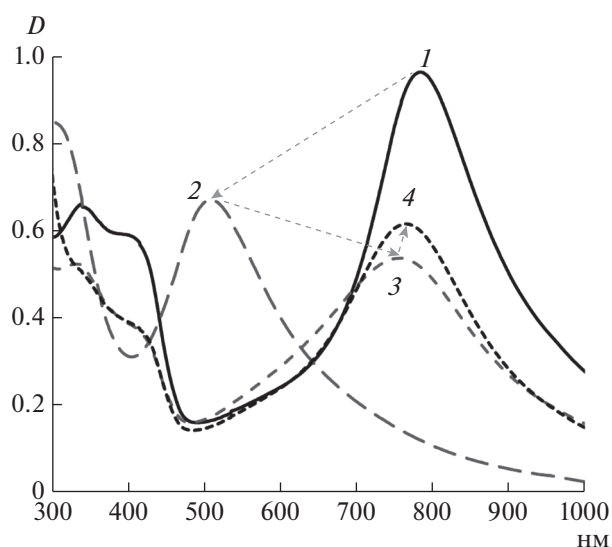


Рис. 1. УФ-видимые спектры ферментативно синтезированного комплекса ПАНИ/ПСС (1, pH 3.5), дедопированного комплекса (2, pH 10.0), (комплекса после диализа (3, pH 7.8) и редопированного ионами меди комплекса ПАНИ-Cu/ПСС (4).

Исследование ПАНИ-Cu/ПСС методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (рис. 2) показало, что содержание меди в комплексе, рассчитанное как среднее значение по четырём измерениям, составляло 1.66 ± 0.31 ат. % или 6.81 ± 1.18 вес. %.

На рис. 3а представлена общая формула ПАНИ. Соотношение фенилендиаминных (бензеноидных) и хиноиддииминных (хиноидных) структур в цепи ПАНИ обуславливает несколько возможных редокс-состояний полимера: лейкоэмеральдин (полностью восстановленное состояние), эмеральдин (полуокисленное состояние) и пернигранилин (полностью окисленное состояние).

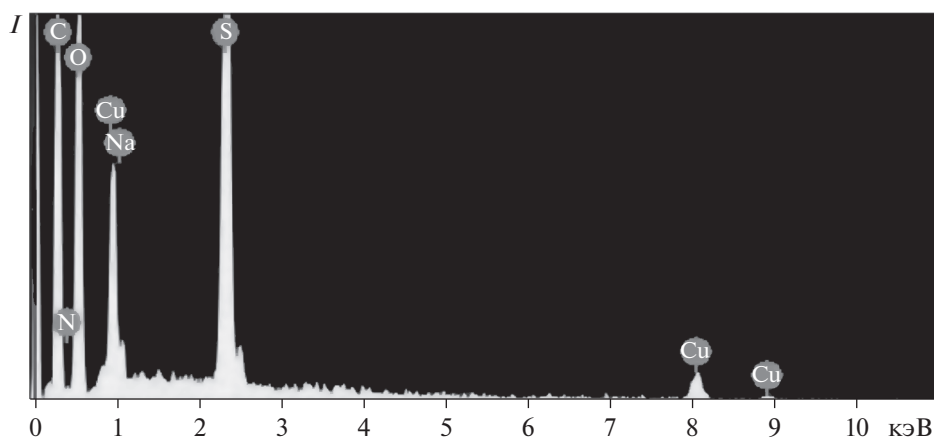


Рис. 2. EDX-спектр композита ПАНИ-Cu/ПСС.

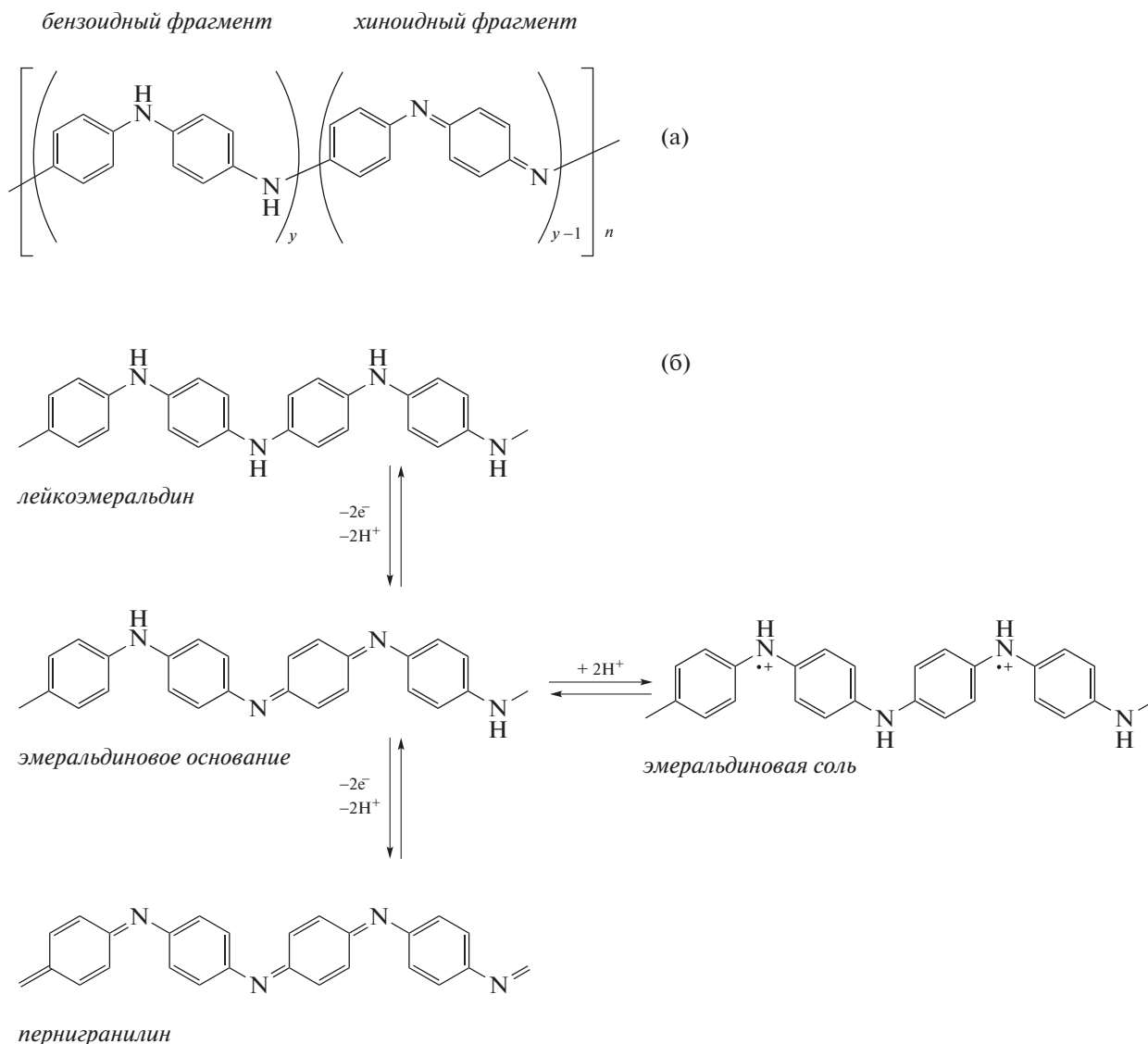


Рис. 3. Общая формула ПАНИ (а): $y = 1$ – лейкоэмеральдин; $y = 0.5$ – эмеральдин и $y = 0$ – пернигранилин; схематическое изображение взаимопревращений различных редокс-состояний ПАНИ (лейкоэмеральдин, эмеральдин, пернигранилин) при кислотном допировании (б).

При кислотном допировании (рис. 3б) протоны взаимодействуют с иминными атомами азота, что приводит к образованию поликатиона. Положительные заряды, локализованные на атомах азота, повышают общую энергию полимерной системы, в результате чего происходит перераспределение электронной плотности и распаривание неподеленной электронной пары атомов азота. В цепи полимера появляются делокализованные электроны и возникает электронная проводимость, которая зависит от степени протонирования ПАНИ и от природы допирующей кислоты. Таким образом электропроводность ПАНИ обусловлена наличием в полимерной цепи катион-радикалов (поляронов), локализованных на атомах азота хиноид-диминовых колец. Допирование цепи ПАНИ

ионами переходных металлов относится к окислительному допированию. Основываясь на результатах экспериментов с солями переходных металлов, которые могут действовать как окислитель, Димитриев [25] предложил следующий механизм окислительного допирования эмеральдинового основания ПАНИ. Ионы переходных металлов окисляют атомы азота бензоидных фрагментов; после этого восстановленные ионы металла координируются с иминными атомами азота хиноидных фрагментов. Затем происходит окисление восстановленных катионов металлов и восстановление иминных групп, что приводит к образованию допированной (электропроводящей) формы ПАНИ и окисленного катиона.

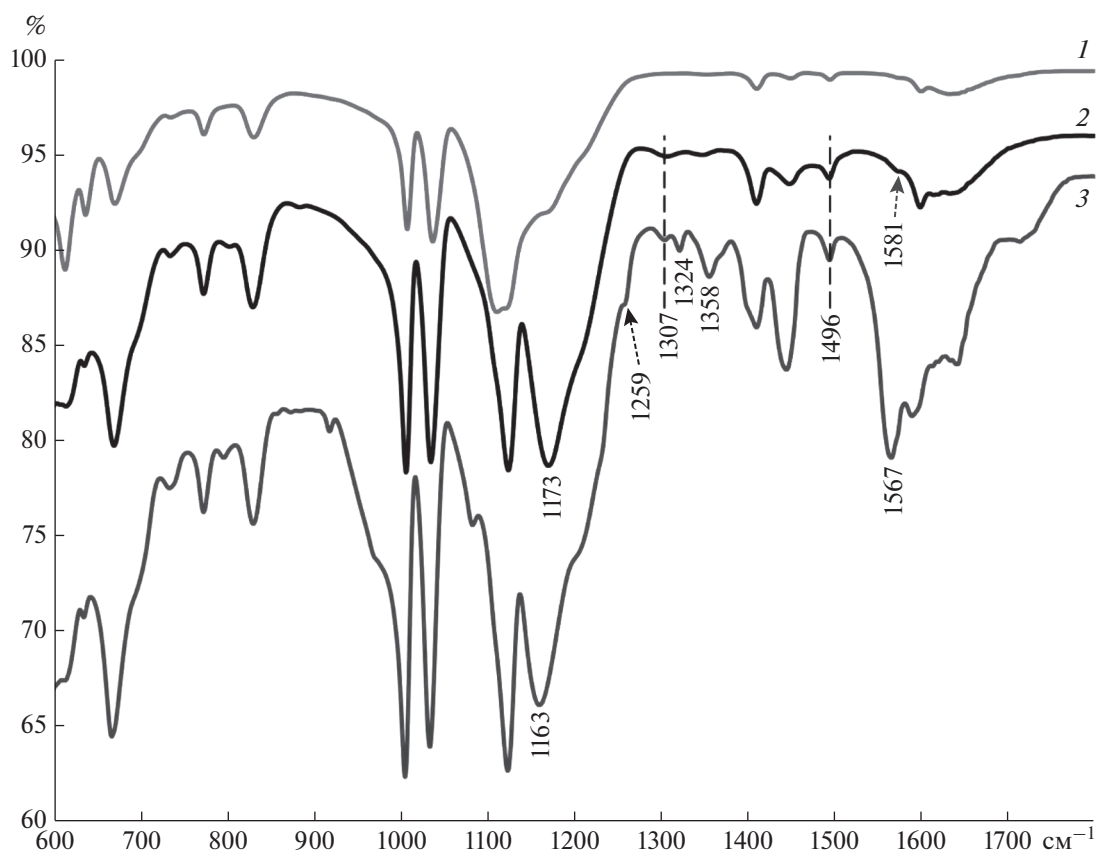


Рис. 4. FTIR-ATR-спектры матрицы PSS (1), ПАНИ/PSS (2) и ПАНИ-Cu/PSS (3).

На рис. 4 приведены FTIR-ATR спектры матрицы PSS (кривая 1) и комплексов ПАНИ/PSS (кривая 2) и ПАНИ-Cu/PSS (кривая 3). Полосы в области 600–1150 cm^{-1} соответствовали колебаниям связей в молекуле PSS, что подтверждало образование комплекса ПАНИ/PSS в результате ферментативной реакции. Наиболее существенные различия в спектрах ПАНИ/PSS и ПАНИ-Cu/PSS наблюдались в области 1150–1600 cm^{-1} . На обоих спектрах присутствовала полоса в области 1496 cm^{-1} , относящаяся к колебаниям C–C связи бензеноидных фрагментов в структуре ПАНИ [41, 42]. В то же время интенсивность полосы поглощения, соответствующей колебаниям C=C связи хиноидных фрагментов, значительно увеличивалась при допировании ПАНИ ионами меди, а положение полосы смещалось сторону меньшего волнового числа (от 1581 cm^{-1} в ПАНИ/PSS до 1567 cm^{-1} в ПАНИ-Cu/PSS), что указывало на увеличение относительного количества хиноидных фрагментов в цепи ПАНИ [24]. Также происходил сдвиг полосы, соответствующей колебаниям структуры $-\text{NH}^+=$, от 1173 до 1163 cm^{-1} . Кроме того на спектре ПАНИ-Cu/PSS появлялись дополнительные полосы, соответствующие колебаниям связи C–N рядом с хиноидным кольцом

(1324 и 1358 cm^{-1}), и полоса, относящаяся к колебаниям связей катион-радикала C–N $^{\bullet+}$ (1259 cm^{-1}). При допировании ПАНИ ионами меди увеличивалась интенсивность полосы, относящейся к колебаниям C–N связи вторичных ароматических аминов в области 1307 cm^{-1} . Такие изменения в ИК-Фурье спектрах свидетельствовали о допировании основной цепи ПАНИ ионами меди.

Для антимикробных исследований водные растворы ПАНИ/PSS и ПАНИ-Cu/PSS были сконцентрированы до 5.8 и 5.3 мг/мл соответственно. Исследования показали, что матрица PSS не обладала антимикробной активностью, а комплекс ПАНИ/PSS, хотя и проявлял антимикробную активность в отношении *S. aureus* и *E. coli*, однако его МИК для обоих микроорганизмов выше, чем максимально достигнутая в исследовании концентрация (2.9 мг/мл). Необходимо отметить, что в литературе крайне мало данных о МИК “чистого” ПАНИ, что, по-видимому, связано с его плохой растворимостью. В статье [29] было показано, что МИК суспензии в питательной среде химически синтезированного ПАНИ для *E. coli* и *S. aureus* выше 10 мг/мл. Шалини с соавт. [31] показали, что МИК суспензии ПАНИ в

диметилсульфоксиде для *E. coli* и *S. aureus* была 10 и 2.5 мг/мл соответственно.

Комплекс ПАНИ-Cu/ПСС показал более высокую ингибирующую активность, чем ПАНИ/ПСС. МИК ПАНИ-Cu/ПСС по отношению *S. aureus* составляла 0.66 мг/мл, а *E. coli* – 2.65 мг/мл. Поскольку в литературе отсутствуют данные о значениях МИК для композитов, в состав которых входит ПАНИ, допированный ионами меди, провести прямое сравнение с полученными нами результатами не представляется возможным. Однако можно сделать вывод, что ионы меди в составе комплекса ПАНИ-Cu/ПСС усиливали антимикробные свойства полимера и использование их в качестве допанта основной цепи ПАНИ перспективно для разработки антимикробных пленочных покрытий.

Авторы выражают благодарность Ю.А. Николаеву и Е.В. Демкиной за помощь в проведении микробиологических экспериментов. При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (проект № 19-08-00420).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bhadra S., Khastgir D., Singha N.K., Lee J.H.* // Prog. Polym. Sci. 2009. V. 34. № 8. P. 783–810.
2. *Боева Ж.А., Сергеев В.Г.* // Высокомолекулярные соединения. Сер. С. 2014. Т. 56. № 1. С. 153–164.
3. *Zhang L., Du W., Nautiyal A., Liu Z., Zhang X.Y.* // Sci. China Mater. 2018. V. 61. № 3. P. 303–352.
4. *Singh P., Shukla S.K.* // J. Mater. Sci. 2020. V. 55. № 4. P. 1331–1365.
5. *Della Pina C., Falletta E.* // Curr. Med. Chem. 2022. V. 29. № 2. P. 329–357.
6. *Anand J., Palaniappan S., Sathyanarayana D.N.* // Prog. Polym. Sci. 1998. V. 23. № 6. P. 993–1018.
7. *Stejskal J., Gilbert R.G.* // Pure Appl. Chem. 2002. V. 74. № 5. P. 857–867.
8. *Huang W.S., Humphrey B.D., MacDiarmid A.G.* // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1. 1986. V. 82. P. 2385–2400.
9. *Syed A.A., Dinesan M.K.* // Talanta 1991. V. 38. № 8. P. 815–837.
10. *Liu W., Kumar J., Tripathy S., Senecal K.J., Samuelson L.* // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. № 1. P. 71–78.
11. *Cruz-Silva R., Romero-García J., Angulo-Sánchez J.L., Ledezma-Pérez A., Arias-Marín E., Moggio I., Flores-Loyola E.* // Eur. Polym. J. 2005. V. 41. № 5. P. 1129–1135.
12. *Streltsov A.V., Morozova O.V., Arkharova N.A., Klechkovskaya V.V., Staroverova I.N., Shumakovich G.P., Yarpolov A.I.* // J. Appl. Polym. Sci. 2009. V. 114. № 2. P. 928–934.
13. *Shumakovich G.P., Vasil'eva I.S., Morozova O.V., Khomenkov V.G., Staroverova I.N., Budashov I.A., Kurochkin I.N., Boyeva J.A., Sergeev V.G., Yarpolov A.I.* // J. Appl. Polym. Sci. 2010. V. 117. № 3. P. 1544–1550.
14. *Отрохов Г.В., Морозова О.В., Васильева И.С., Шумакович Г.П., Зайцева Е.А., Хлупова М.Е., Ярополлов А.И.* // Успехи биологической химии. 2013. Т. 53. С. 355–386.
15. *Walde P., Kashima K., Ćirić-Marjanović G.* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2019. V. 7. Article № 165. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00165>
16. *Witayakran S., Ragauskas A.J.* // Adv. Synth. Catal. 2009. V. 351. № 9. P. 1187–1209.
17. *Hollmann F., Arends I.* // Polymers 2012. V. 4. № 1. P. 759–793.
18. *Bassanini I., Ferrandi E.E., Riva S., Monti D.* // Catalysts. 2021. V. 11. № 1. Article № 26. <https://doi.org/10.3390/catal11010026>
19. *MacDiarmid A.G., Epstein A.J.* // Faraday Discuss. Chem. Soc. 1989. V. 88. P. 317–332.
20. *Genies E.M., Boyle A., Lapkowski M., Tsintavis C.* // Synth. Met. 1990. V. 36. № 2. P. 139–182.
21. *Huang W.-S., MacDiarmid A.G., Epstein A.J.* // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1987. V. 23. P. 1784–1786.
22. *Chen S.A., Lin L.C.* // Macromolecules 1995. V. 28. № 4. P. 1239–1245.
23. *Bienkowski K., Kulszewicz-Bajer I., Genoud F., Oddou J.L., Pron A.* // Synth. Met. 2003. V. 135–136. P. 159–160.
24. *Dimitriev O.P.* // Macromolecules 2004. V. 37. № 9. P. 3388–3395.
25. *Dimitriev O.* // Polym. Bull. 2003. V. 50. № 1–2. P. 83–90.
26. *Izumi C.M.S., Ferreira A.M.D.C., Constantino V.R.L., Temperini M.L.A.* // Macromolecules 2007. V. 40. № 9. P. 3204–3212.
27. *Sheshardi D.T., Bhat N.* // Indian J. Fibre Text. Res. 2005. V. 30. № 2. P. 204–206.
28. *Shi N.L., Guo X.M., Jing H.M., Gong J., Sun C., Yang K.* // J. Mater. Sci. Technol. 2006. V. 22. № 3. P. 289–290.
29. *Gizdavic-Nikolaidis M.R., Bennett J.R., Swift S., Easteal A.J., Ambrose M.* // Acta Biomaterialia. 2011. V. 7. № 12. P. 4204–4209.
30. *Kucekova Z., Humpolicek P., Kasparkova V., Perecko T., Lehocký M., Hauerlandová I., Sáha P., Stejskal J.* // Colloids Surf. B 2014. V. 116. P. 411–417.
31. *Shalini A., Nishanthi R., Palani P., Jaisankar V.* // Mater. Today: Proc. 2016. V. 3. № 6. P. 1633–1642.
32. *Lashkenari M.S., Eisazadeh H.* // Adv. Polym. Technol. 2017. V. 33. № S1. Article № 21466. <https://doi.org/10.1002/adv.21466>
33. *Mittapally S., Taranu R., Parveen S.* // Drug J. Delivery Ther. 2018. V. 8. № 6s. P. 411–419.
34. *Borkow G., Gabbay J.* // Cur. Med. Chem. 2005. V. 12. № 18. P. 2163–2175.

35. Горшина Е.С., Русинова Т.В., Бирюков В.В., Морозова О.В., Шлеев С.В., Ярополов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология 2006. Т. 42. № 6. С. 558–563.
36. Ehresmann B., Imbault P., Well J.H. // *Analyt. Biochem.* 1973. V. 54. № 2. P. 454–463.
37. Liu W., Cholli A.L., Nagarajan R., Kumar J., Tripathy S., Bruno F.F., Samuelson L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. V. 121. № 49. P. 11345–11355.
38. Walde P., Guo Z. // *Soft Matter.* 2011. V. 7. № 2. P. 316–331.
39. Yue J., Wang Z.H., Cromack K.R., Epstein A.J., MacDiarmid A.G. // *J. Am. Chem. Soc.* 1991. V. 113. № 7. P. 2665–2671.
40. Yuan G.L., Kuramoto N., Su S.H. // *Synth. Met.* 2002. V. 129. № 2. P. 173–178.
41. Trchová M., Šeděnková I., Tobolková E., Stejskal J. // *Polym. Degrad. Stab.* 2004. V. 86. № 1. P. 179–185.
42. Gomes E.C., Oliveira M.A.S. // *Am. J. Polym. Sci.* 2012. V. 2. № 2. P. 5–13.

Enzymatically Synthesized Polyaniline Doped with Copper Ions: Physico-Chemical and Antimicrobial Properties of the Product

I. S. Vasil'eva^a, G. P. Shumakovich^a, O. V. Morozova^a, and A. I. Yaropolov^{a, *}

^a *Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru*

An enzymatic synthesis of the polyaniline (PANI)/sodium polystyrenesulfonate (PSS) interpolyelectrolyte complex, in which PANI is doped with Cu(II) ions, has been developed. The biocatalyst for aniline (ANI) polymerization was the fungal laccase *Trametes hirsuta*, and the oxidizing agent was atmospheric oxygen. The resulting PANI-Cu/PSS complex was studied by UV-visible and FTIR-ATR spectroscopy, and X-ray fluorescence analysis. The copper weight content in PANI-Cu/PSS was ~8 wt %. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of the PANI-Cu/PSS complex against gram-negative (*Escherichia coli*) and gram-positive (*Staphylococcus aureus*) bacteria were 2.65 and 0.66 mg/mL, respectively.

Keywords: polyaniline, Cu(II)-dopant, biocatalysis, laccase, antibacterial activity

УДК 547.995.12:544.546.57

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОКОМПОЗИТОВ СЕРЕБРО-СУКЦИНИЛ ХИТОЗАН И ИХ АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2022 г. В. А. Александрова¹, *, А. М. Фоторянская¹, **, В. С. Садыкова²¹Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук, Москва 119991 Россия²Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, Москва, 119021 Россия

*e-mail: alexandrova@ips.ac.ru

**e-mail: futoraynskaya@ips.ac.ru

Поступила в редакцию 26.03.2022 г.

После доработки 05.04.2022 г.

Принята к публикации 26.04.2022 г.

Для формирования наночастиц серебра методом восстановления из ионов металла в присутствии восстановителя D-глюкозы при комнатной температуре в качестве полимерной матрицы было использовано водорастворимое производное хитозана – сукцинил хитозан. Синтез наночастиц серебра можно также осуществлять без восстановителя при термической активации системы с использованием щелочи (NaOH) в качестве ускорителя процесса. О наличии наночастиц серебра в полученных коллоидных растворах судили по появлению полосы поглощения в спектрах электронного плазмонного резонанса ($\lambda_{\text{max}} = 417$ нм). Показано, что использование дополнительного компонента – полиэтиленоксида в макромолекулярной системе позволило получить наночастицы серебра малого размера (1–3 нм). Результаты исследований антимикробной активности в опытах *in vitro* полученных коллоидных растворов, содержащих наночастицы серебра, подтвердили, что уменьшение размеров наночастиц серебра приводило к расширению спектра антибактериальной активности в отношении штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий (*Bacillissubtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* 209P, *Escherichia coli* ATCC 25922) и к проявлению выраженного антифунгального действия по отношению к *Aspergillus niger* INA 00760.

Ключевые слова: наночастицы серебра, хитозан, сукцинил хитозана, антимикробная активность, зеленый синтез

DOI: 10.31857/S055510992205004X

В последнее время значительно возрос интерес исследователей к зеленой химии. В соответствии с основными положениями этого научного направления методы синтеза выбираются так, чтобы как исходные, так и синтезированные вещества были безвредными для человека и окружающей среды [1]. Методы химического восстановления ионов металлов в растворе полимера часто используются для создания наноконструкций [2–4]. С учетом требований, которые предъявляются к зеленой химии, выбор сукцинил хитозана в качестве полимерной матрицы для создания наноконструкций, является обоснованным.

Водорастворимое производное хитозана – сукцинил хитозан является нетоксичным, биодegradуемым полимером, для которого характерна антиоксидантная, иммуностимулирующая и др. активности [5, 6]. Важно отметить, что сукцинил хитозан безопасен при внутривенном введении, что позволяет использовать этот полимер в системах доставки противоопухолевых препаратов [7, 8].

При химическом восстановлении ионов серебра, обычно в качестве восстановителей используют такие вещества, как боргидрид натрия, амины, гидразин, формальдегид и др., не относящиеся к числу безопасных для здоровья человека и для окружающей среды. Наночастицы серебра можно получать с использованием экстрактов различных растений. Однако, получаемые при этом коллоидные растворы представляют собой сложную смесь различных веществ, что затрудняет идентификацию компонентов реакционной системы [9, 10].

Наночастицы металлов можно получать с использованием методов радиационно-химического и фотохимического восстановления, а также при воздействии микроволнового облучения [11–13]. Для проведения таких исследований необходимы дорогостоящие установки и специально оборудованные помещения.

С учетом вышеизложенного исследовали возможность разработки простого экологичного способа синтеза наночастиц серебра в матрице сукци-

нил хитозана при комнатной температуре или при термической активации системы, как в присутствии восстановителя, так и без него.

Цель работы – получение и изучение антимикробной активности композитов на основе сукцинил хитозана и наночастиц серебра.

МЕТОДИКА

Материалы. В качестве полимерной матрицы-стабилизатора в работе использовали сукцинил хитозан (СХТЗ) производства ООО “Биопрогресс” (Россия). Молекулярная масса (ММ) хитозана, из которого был получен СХТЗ – 200 кДа, степень дезацетилирования – 85%. Для проведения реакции в гомогенных условиях в качестве растворителя использовали воду (бидистиллят, 18МОМ \times см⁻¹), азотнокислое серебро (AgNO₃), щелочь (NaOH) и D-глюкозу (марки х. ч.), полиэтиленоксид (ПЭО) с молекулярной массой 7 \times 10⁵ ЗХК “Экотек” (Россия).

Синтез наночастиц серебра в матрице сукцинил хитозана. При комнатной температуре. СХТЗ растворяли в бидистиллированной воде при комнатной температуре и перемешивании на магнитной мешалке. К 5 мл раствора полимера (0.25% по массе) при перемешивании добавляли водный раствор AgNO₃, с таким расчетом, чтобы его концентрация в растворе полимера составляла 0.0018 М. Затем в реакционную смесь добавляли восстановитель (D-глюкозу) в соотношении AgNO₃ : D-глюкоза, равном 1 : 5 (моль/моль). В полученную реакционную смесь по каплям добавляли 0.1 М NaOH (20–100 мкл). В ходе эксперимента из реакционной смеси отбирали пробы для определения оптической плотности коллоидного раствора (λ_{\max} = 417 нм) при различной концентрации щелочи.

При термической активации системы. СХТЗ растворяли в бидистиллированной воде при комнатной температуре и перемешивании на магнитной мешалке. К 2.5 мл раствора СХТЗ (1% по массе) при перемешивании добавляли 2.5 мл водорастворимого ПЭО (10% от массы СХТЗ). В полученную реакционную смесь добавляли 60 мкл 0.1 М раствор NaOH, а затем водный раствор AgNO₃, с таким расчетом, чтобы его концентрация в реакционной смеси составляла 0.0018 М. После тщательного перемешивания реакционную смесь нагревали до 70°C в течение 3 ч. Синтез проводили в токе аргона. При проведении эксперимента наблюдали изменение окраски рабочего раствора от бледно-желтого до коричневого.

УФ-спектроскопия. Спектры полученных растворов регистрировали на УФ-спектрофотометре “SPECORD M-40” (“Carl Zeiss”, Германия) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 мм при

25°C, в качестве раствора сравнения использовали бидистиллированную воду.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Размеры наночастиц серебра в коллоидном растворе на основе СХТЗ изучали при помощи просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) “LEO 912 AB Omega” (“Leo Electron Microscopy”, Великобритания).

Микробные штаммы, питательные среды, условия культивирования. Антимикробную активность растворов наночастиц оценивали методом диффузии в агар по диаметру зоны отсутствия роста культур. Антибактериальную активность оценивали с помощью тест-штаммов: грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922, грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* ATCC 6633, и *Staphylococcus aureus* 209P. Для оценки фунгицидной активности использовали плесневый гриб *Aspergillus niger* INA 00760.

Тест-культуру *B. subtilis* ATCC 6633 выращивали на среде Гаузе № 2 следующего состава (г/л): триптон – 2.5 (или бульон Хоттингера – 30 мл), пептон – 5, хлорид натрия – 5, глюкоза – 10; *S. aureus* 209P выращивали на среде МПА (“ЗАО НИЦФ”, Россия), а *E. coli* ATCC 25922 на среде LB (триптон-соевый агар). Культуру *A. niger* INA 00760 выращивали на среде Чапека. Предварительно культуры бактерий выращивали в течение суток в пробирках на скошенном питательном агаре, после чего клетки суспендировали в физиологическом растворе до мутности 0.5 по стандарту McFarland (1.5 \times 10⁸ КОЕ/мл) и использовали в течение 15 мин. Культуру гриба выращивали в течение 5 сут. Все тест-культуры получены из коллекции культур НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе (Россия). В качестве контроля использовали стандартные диски с амфотерицином В для грибов (40 мкг, “НИИ Пастера”, Россия) и амоксиклавом (амоксициллин/клавулоновая кислота) для бактерий (20/10 мкг, “НИИ Пастера”, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Одним из условий зеленой химии является синтез веществ из возобновляемых в природе источников сырья. Известно, что для синтеза полимеров ряда хитина и хитозана используют природный полисахарид – хитин, который широко распространен в природе и, в частности, содержится в панцире и клешнях крабов, креветок, насекомых и др. организмов.

С целью разработки простого и экологичного способа синтеза наночастиц серебра (НЧAg) в настоящей работе в качестве матрицы был использован СХТЗ, который получают путем взаимодействия хитозана с янтарным ангидридом. Структура элементарных звеньев полимера приведена на

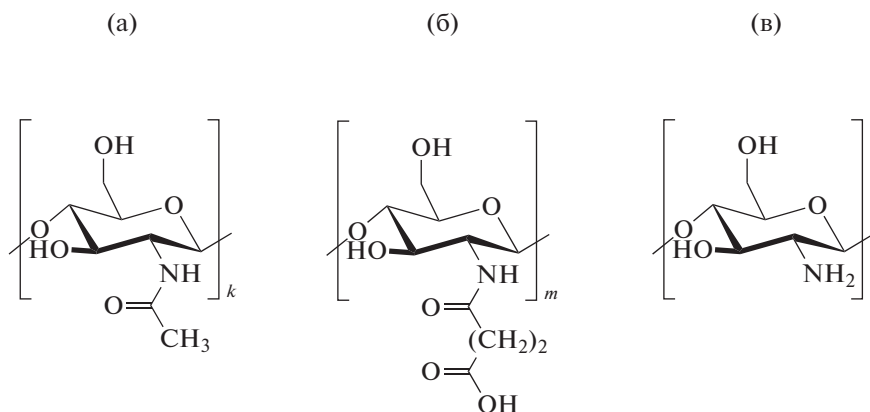


Рис. 1. Структура мономерных звеньев СХТЗ.

рис. 1, где k -N-ацетилглюкозамин. Этот полимер является полиэлектролитом, в структуре которого присутствуют как карбоксильные $-\text{COOH}$ группы (m), так и первичные аминогруппы $-\text{NH}_2$ (n). При этом мольное соотношение этих групп составляло: k -0.15, m -0.75 и n -0.1.

Для синтеза НЧАг из ионов Ag^+ в матрице СХТЗ была исследована возможность проведения процесса при комнатной температуре с использованием в качестве восстановителя D-глюкозы. При этом для ускорения процесса восстановления ионов Ag^+ в НЧАг использовали водный раствор NaOH. Анализ полученных результатов (рис. 2) показал, что постепенное увеличение количества NaOH в реакционной среде приводило к росту оптической плотности образующихся при этом НЧАг (кривые 1–5, рис. 2). О наличии НЧАг в системе судили по появлению полосы поглощения ($\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ нм}$) в УФ-спектрах коллоидных растворов. Дальнейшее увеличение количества ускорителя (NaOH) выше 60 мкл в реакционной смеси было нецелесообразно, поскольку приводило к образованию более крупных НЧАг. Подтверждением этого служит отсутствие четко выраженного максимума полосы поглощения характерной для НЧАг (кривые 6–8, рис. 2). Отметим также, что при этом не происходило дальнейшего увеличения оптической плотности синтезированных НЧАг. В результате проведенных исследований было установлено оптимальное соотношение AgNO_3 и восстановителя-D-глюкозы, которое составляло 1 : 5 (моль/моль). Известно, что при проведении реакции химического восстановления ионов Ag^+ в НЧАг обычно используется большой избыток восстановителя [14, 15]. Таким образом, использование ускорителя процесса восстановления ионов серебра позволило значительно снизить необходимый избыток восстановителя в реакционной среде. В результате проведенных предварительных

исследований также была определена оптимальная концентрация раствора NaOH – 0.1 М, которая позволяла регулировать процесс образования НЧАг при восстановлении ионов Ag^+ в растворе СХТЗ.

Вопросу стабилизации НЧАг в растворе полимера уделяется особое внимание, поскольку эти частицы легко подвергаются окислению и склонны к агрегации. Для снижения вероятности ассоциирования образующихся НЧАг помимо основного полимера СХТЗ был введен дополнительный компонент – полиэтиленоксид (ПЭО). Известно, что ПЭО относится к числу нетоксичных полимеров, что дает возможность его использования в фармацевтике в качестве связую-

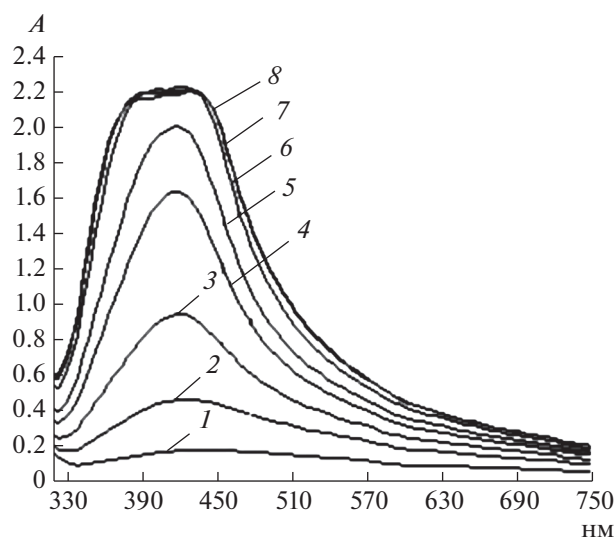


Рис. 2. Спектры оптического поглощения растворов НЧАг в матрице СХТЗ с различным содержанием NaOH в системе: 1 – 20, 2 – 30, 3 – 40, 4 – 50, 5 – 60, 6 – 80, 7 – 90, 8 – 100 мкл. Соотношение Ag^+ : D-глюкозы в реакционной смеси 1 : 5 моль/моль.

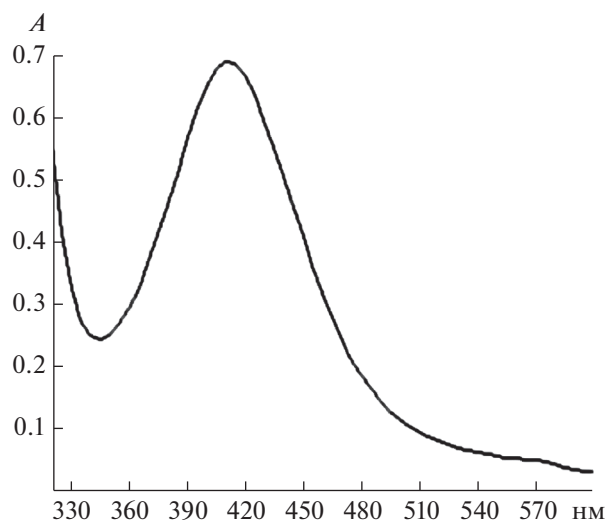


Рис. 3. Спектр оптического поглощения коллоидного раствора с НЧАg в матрице СХТЗ (разбавление 1 : 4).

щего компонента при приготовлении лекарственных препаратов.

Синтез НЧАg также можно проводить без восстановителя при термической активации системы. При этом в качестве ускорителя восстановления ионов Ag^+ также использовали NaOH. Представленные на рис. 3 результаты подтвердили, что полученный при восстановлении ионов Ag^+ в матрице СХТЗ с добавлением ПЭО коллоидный раствор, содержал НЧАg (полоса поглощения при $\lambda_{\text{max}} = 417 \text{ nm}$).

Оценку формы и размера синтезированных НЧАg проводили с использованием метода просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Из представленных на рис. 4 данных можно заключить, что синтезированные НЧАg имели

сферическую форму. Введение дополнительного компонента ПЭО в количестве 10% от массы основного полимера приводило к образованию НЧАg размером 1–6 нм (рис. 4а, система: СХТЗ-ПЭО₁-НЧАg). Увеличение содержания ПЭО до 20% приводило к образованию более мелких частиц 1–3 нм (рис. 4б, система: СХТЗ-ПЭО₂-НЧАg). О стабильности НЧАg, синтезированных в матрице СХТЗ, судили по отсутствию уменьшения оптической плотности НЧАg в УФ-спектрах полученных коллоидных растворов после их выдержки в темноте при комнатной температуре в течение 6 месяцев.

В настоящее время проблема разработки новых подходов к созданию нетоксичных биodeградируемых композитных материалов и расширение спектра их биологической активности является актуальной. Условия синтеза наночастиц серебра в полимерной матрице оказывают существенное влияние на размер частиц. Известно, что размер НЧАg является важной характеристикой, определяющей их бактерицидную активность. Ранее при исследовании биологической активности НЧАg, синтезированных из ионов Ag^+ в растворе СХТЗ при воздействии микроволнового облучения, авторами было показано, что такие частицы (размер 9–34 нм) проявляют выраженную антибактериальную активность по отношению к штаммам грамположительных бактерий (*B. subtilis* ATCC 6633, *B. coagulans* 429) [16]. Исследована возможность уменьшения размеров НЧАg, образующихся в матрице СХТЗ, путем введения в систему дополнительного компонента ПЭО, препятствующего ассоциации образующихся НЧАg. Результаты ПЭМ (рис. 4) подтвердили, что введение ПЭО в систему позволило снизить размер образующихся НЧАg (1–3 нм).

Исследование антимикробной активности коллоидных растворов НЧАg, полученных в матрице

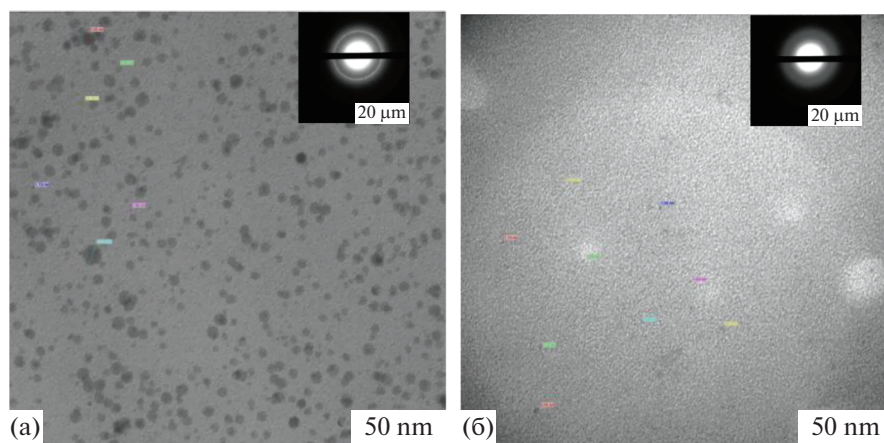


Рис. 4. Электронная микрофотография и дифракционная картина пленки (на врезке): а – СХТЗ-ПЭО₁-НЧАg (10% ПЭО); б – СХТЗ-ПЭО₂-НЧАg (20% ПЭО).

Таблица 1. Антимикробная активность растворов СХТЗ-ПЭО-НЧAg в отношении условно патогенных бактерий и грибов (зона угнетения роста, мм)

Вещества	Зона, мм			
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> 209P	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>A. niger</i> INA 00760
СХТЗ-ПЭО ₁ -НЧ Ag, 88 мкг/мл	12	нет	13	13
Контроль, СХТЗ-ПЭО ₁	нет	нет	нет	нет
СХТЗ-ПЭО ₂ -НЧ Ag, 84 мкг/мл	11	12	12	12
Контроль СХТЗ-ПЭО ₂	нет	нет	нет	нет
Амоксилав/клавулоновая кислота, 20/10 мкг	31	27	23	—
Амфотерицин, 40 мкг	—	—	—	12

* – не тестировали; d лунки = 10 мм ПЭО₁ – 10%; ПЭО₂ – 20% от массы СХТЗ.

СХТЗ с добавлением ПЭО показало, что уменьшение размера НЧAg в системе приводило к расширению спектра антибактериальной активности системы в отношении штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также к появлению выраженного антифунгального действия наноконструктивных систем в отношении *A. niger* INA 00760 (табл. 1).

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан зеленый синтез наночастиц серебра из ионов в матрице нетоксичного биодegradуемого сукцинил хитозана. Синтез НЧAg можно осуществлять при комнатной температуре с использованием в качестве восстановителя D-глюкозы и ускорителя процесса NaOH. Помимо этого синтез НЧAg в матрице СХТЗ можно проводить без восстановителя при термической активации системы. Показано, что применение дополнительного компонента ПЭО в системе позволило получить НЧAg малого размера 1–3 нм.

Исследование антимикробной активности в опытах *in vitro* полученных коллоидных растворов, содержащих НЧAg, показало, что уменьшение размеров НЧAg приводило к расширению спектра антибактериальной активности (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* 209P, *E. coli* ATCC 25922), по сравнению с более крупными частицами исследованными ранее [16], и к проявлению антифунгального действия по отношению к *A. niger* INA 00760.

Полученные наноконструктивы, стабилизированные сукцинил хитозаном, могут найти применение при разработке биодegradуемых пленочных покрытий для лечения открытых ран и ожогов, а также при создании антибактериальных препаратов (аэрозоли, мази, жидкие пластыри и другие материалы).

В связи с сильно возросшей в последнее время резистентностью различных микроорганизмов к антибиотикам возникает необходимость разра-

ботки альтернативных подходов к получению антимикробных и противовирусных средств с иным механизмом действия на основе экологически безопасных веществ.

Работа выполнена в рамках Госзадания ИНХС РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Anastas P.T., Warner J.C.* Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford, N.Y.: Oxford University Press, 1998, 148 p.
2. *Gurusamy V., Krishnamoorthy R., Gopal B., Veeraravagan V., Neelamegam P.* // Inorg. Nano-Metal Chem. 2017. V. 47. № 5. P. 761–767.
3. *Dong X., Ji X., Jing J., Li M., Li J., Yang W.* // J. Phys. Chem. C. 2010. V. 114. № 5. P. 2070–2074.
4. *Wojtylak S., Kudelski A.* // Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp. 2012. V. 410. P. 45–51.
5. *Skorik Y.A., Kritchenkov A.S., Moskalenko Y.E., Golyshev A.A., Raik S.V., Whaley A.K., Vasina L.V., Sonin D.L.* // Carbonhydr. Polymers. 2017. V. 166. P. 166–172.
6. *Колесов С.В., Бадыкова Л.А., Мударисова Р.Х.* // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 11. С. 73–79.
7. *Kato Y., Onishi H., Machida Y.* // Biomaterials. 2000. V. 21. № 15. P. 1579–1585.
8. *Panevin A.A., Golyshev A.A., Skorik Y.A., Zhuravskii S.G., Sonin D.L.* // Pharm. Chem. J. 2017. V. 50. № 11. P. 711–714.
9. *Yaqub A., Malkani N., Shabbir A., Ditta S.A., Tanvir F., Ali S. et al.* // Curr. Microbiol. Springer US. 2020. V. 77. № 9. P. 2287–2299.
10. *La Spina R., Mehn D., Fumagalli F., Holland M., Reniero F., Rossi F., Gilliland D.* // Nanomaterials. 2020. V. 10. № 10. P. 2031. <https://doi.org/10.3390/nano10102031>
11. *Barrera N., Guerrero L., Debut A., Santa-Cruz P.* // PLoS One. 2018. V. 13. № 7. P. 1–18.
12. *Milad Torabfam, Hoda Jafarizadeh-Malmiri* // Green Process Synthesis. 2018. № 7. P. 530–537.

13. *Torabfam M., Jafarizadeh-Malmiri H.* //Green Process. Synth. 2018. № 7. P. 530. <https://doi.org/10.1515/gps-2017-0139>
14. *Вишнякова Е.А., Сайкова С.В., Жарков С.М., Лихацкий М.Н., Михлин Ю.Л.* // Журн. Сибирского федерального ун-та. Сер. Химия. 2009. Т. 2. № 1. С. 48–55.
15. *Помогайло А.Д., Джардималиева Г.И.* Металлополимерные гибридные нанокомпозиты. М.: Наука, 2015. 494 с.
16. *Александрова В.А., Фutoryanskaya А.М., Садыкова В.С.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2020. Т. 56. № 5. С. 497–502.

The Method of Obtaining Nanocomposites Silver-succinyl Chitosan and Their Antimicrobial Activity

V. A. Aleksandrova^{a, *}, A. M. Futoryanskaya^{a, **}, and V. S. Sadykova^b

^a Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^b Gause Institute of New Antibiotics, Moscow, 119021 Russia

*e-mail: alexandrova@ips.ac.ru

**e-mail: futoraynskaya@ips.ac.ru

To form silver nanoparticles by reduction from metal ions in the presence of a reducing agent, D-glucose, at room temperature, a water-soluble derivative of chitosan, succinyl chitosan, was used as a polymer matrix. The synthesis of silver nanoparticles can also be carried out without a reducing agent by thermal activation of the system using alkali (NaOH) as an accelerator. The presence of silver nanoparticles in the obtained colloidal solutions was judged by the appearance of an absorption band in the electron plasmon resonance spectra ($\lambda_{\max} = 417$ nm). It has been shown that the use of an additional component, polyethylene oxide, in a macromolecular system makes it possible to obtain small silver nanoparticles (1–3 nm). The results of in vitro studies of antimicrobial activity of the obtained colloidal solutions containing silver nanoparticles confirm that a decrease in the size of silver nanoparticles leads to an expansion of the spectrum of antibacterial activity of strains of gram-positive and gram-negative bacteria (*B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* 209P, *E. coli* ATCC 25922) and to the manifestation of a pronounced antifungal action in relation to *A. niger* INA 00760.

Keywords: silver nanoparticles, chitosan, succinyl chitosan, antimicrobial activity, green synthesis

УДК 579.6

ФАГОВЫЕ АНТИТЕЛА КАК БИОРЕЦЕПТОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМПИЦИЛЛИНА

© 2022 г. О. И. Гулий^{1, *}, А. К. М. Алсовэйди², А. С. Фомин¹, К. П. Габалов¹,
С. А. Староверов^{1, 3}, О. А. Караваева¹

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ
“Саратовский научный центр РАН” (ИБФРМ РАН), Саратов, 410049 Россия

²Саратовский национальный исследовательский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410005 Россия

³Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012 Россия
*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Поступила в редакцию 27.02.2022 г.

После доработки 15.04.2022 г.

Принята к публикации 26.04.2022 г.

С применением овечьей дисплейной библиотеки фрагментов scFv (Griffin.1, UK) получены антитела, специфичные к ампициллину. Методом дот-иммуноанализа при биоспецифичном взаимодействии отобранных рекомбинантных антител в фаговом формате (фаговых антител) проведено определение ампициллина в водных растворах. Установлено, что фаговые антитела обладали специфичностью в отношении ампициллина и не взаимодействовали с другими антибиотиками тетрациклином и канамицином, а также с близкими по химической формуле веществами – L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином. Показано, что метод твердофазного иммуноанализа с визуальным учетом результатов, позволял определять минимальную концентрацию ампициллина в воде 1 мкг/мл. Фаговые антитела перспективны для использования в качестве чувствительного (распознающего) элемента сенсорных систем при определении ампициллина.

Ключевые слова: технология фагового дисплея, антитела, ампициллин, дот-иммуноанализ

DOI: 10.31857/S0555109922050087

Антибактериальные препараты являются одной из наиболее широко используемых групп лекарственных средств на фармацевтическом рынке. Антибиотики используются в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности при консервировании и транспортировке, а также для усиления роста животных при добавлении их в корм в субтерапевтических концентрациях [1]. В связи с этим актуальным является проблема контроля содержания антибиотиков в лекарственных формах, а также их определение в питьевой воде, сточных водах фармацевтических предприятий и других объектах [2].

Одной из важных составляющих при разработке диагностических аналитических систем анализа антибактериальных препаратов является подбор антибактериального биорецептора. В качестве биоселективного агента (элемента распознавания) преимущественно используют антитела, специфичные к определяемому антигену и современная иммунохимия предлагает широкий ассортимент качественных и количественных методов анализа антигена, различающихся по чувствительности и

степени сложности [3]. Существует несколько технологий получения антител, но наиболее простым и доступным является метод отбора антител путем иммунизации животных изолированными препаратами антигена. Более сложным и, вместе с тем, позволяющим получить более надежные антитела методом (однажды полученные и охарактеризованные гибридомы представляют собой неограниченный источник моноклональных антител) является гибридная технология [4]. Однако гибридомы, подобно большинству других клеточных культур животных, растут относительно медленно, не достигают высокой плотности и требуют сложных и дорогих сред, что создает определенные сложности для их применения в качестве аналитических реагентов. Для решения подобных задач в молекулярной биологии стали использоваться генно-инженерные технологии клонирования узнающих фрагментов – гипервариабельных участков иммуноглобулинов (фаговых антител), которые являются дешевыми и могут конкурировать по селективности с гибридными технологиями. К такому методу относится

технология фагового дисплея, в основе которой лежит экспонирование чужеродных пептидов или белков на поверхности фаговых частиц в составе одного из химерных белков оболочки. Данная технология была разработана Дж. Смитом [5], который доказал возможность экспрессии чужеродного белка на поверхности нитчатого бактериофага M13, осуществив встройку гена, кодирующего фрагмент эндонуклеазы рестрикции EcoRI, в единую рамку трансляции с минорным белком оболочки рIII нитчатого бактериофага [5, 6]. Данный метод не требует использования животных, длительных процедур иммунизации, дорогих сред и культур животных клеток.

Фаговые рекомбинантные антитела успешно зарекомендовали себя в качестве биорецепторов [7, 8]. Не менее востребованной окажется технология фагового дисплея для получения рекомбинантных антител, специфичных к низкомолекулярным антигенам, в том числе, антибиотикам. В частности, с применением этой технологии были получены и апробированы в различных методах иммуноанализа фаговые антитела к ивермектину [9], диминазину [10] ферритину [11] и силимарину [12]. В известной авторам литературе отсутствует информация о получении фаговых антител, специфичных к β -лактамным антибиотикам. На практике при выборе антибиотиков руководствуются принципом принадлежности антибактериального препарата к определенной группе, поэтому в качестве антигена использовали ампициллин (как представитель β -лактамных антибиотиков). β -лактамные антибиотики занимают 2 место по объему продаж среди всех антибиотиков в соответствии с данными на 2020 г. [1].

Цель работы – отработка технологии фагового дисплея для получения антител, специфичных к ампициллину, и демонстрация возможности их применения в качестве биорецептора методом дот-иммуноанализа.

МЕТОДИКА

Бактериальная культура и питательные среды. В работе были использованы бактерии *Escherichia coli* XL-1 Blue (IBPPM 632), полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Россия) (<http://collection.ibppm.ru>). Культуру выращивали на среде 2xTY, следующего состава (г/100 мл воды): NaCl – 0.5; триптон (“Vecton, Dickinson and Co.”, Франция) – 1.6; дрожжевой экстракт – 1.0, при 37°C и 160 об./мин.

В работе использовали следующие антибиотики: ампициллин, канамицин, тетрациклин (“Sigma”, США), и аминокислоты: L-фенилаланин, L-триптофан (“Fluka”, Швейцария), а также L-цистеин (“Merck”, Германия).

Аффинная селекция миниантител из фаговой библиотеки. В работе использовали хелперный бактериофаг M13K07 (“Stratagene”, Швеция), несущий ген устойчивости к канамицину.

Синтез белковых конъюгатов ампициллина проводили по методике, описанной в работе [13], ампициллин и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (по 83 мкмоль каждого) добавляли к 2 мл аликвот дистиллированной воды, содержащих растворенный белок (0.83 мкмоль бычьего сывороточного альбумина (БСА). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре при непрерывном перемешивании в течение 2 ч, затем инкубировали при 4°C в течение 14 ч, рН поддерживали на уровне 5.0. Полученные конъюгаты диализовали против дистиллированной воды и лиофилизировали.

Для селекции фагов, несущих антитела к конъюгатам ампициллина с БСА, в качестве твердой фазы для закрепления антигена использовали планшет для иммуноферментного анализа (ИФА).

В лунку вносили 200 мкл антигена и инкубировали в течение ночи при 4°C, затем блокировали незанятое антигеном пространство на стенках планшета 2%-ным раствором сухого обезжиренного молока в течение 1 ч, после чего вносили 200 мкл рекомбинаторной фаговой библиотеки (с концентрацией 10^{12} фагмид/мл), как описано в работе [14] и затем инкубировали в течение ночи при 4°C. Элюцию фаговых частиц проводили триэтиламиноом. Элюированные фаговые частицы использовали для инфицирования клеток *E. coli* штамма XL-1. Методика получения фаговых антител подробно описана в работах [15]. Фаговые частицы осаждали центрифугированием 10 мин при 8000 g, осадок ресуспендировали в 1/10 от исходного объема культуры буфера TE рН 7.5 (5 мл). Полученный препарат осветляли центрифугированием в тех же условиях, после чего фаговые частицы снова осаждали добавлением 1/5 объема раствора ПЭГ6000/NaCl (1.0 мл) с последующим центрифугированием. Осадок растворяли в 1 мл буферного раствора TE.

Концентрацию фаговых частиц определяли спектрофотометрически, как описано в работе [16], используя для расчетов следующее соотношение: $A_{269} - A_{320} \sim 2 \times 10^{14}$ фаговых частиц/мл, где A_{320} – оптическая плотность суспензии фагов при длине волны электромагнитного излучения 320 нм, A_{269} – оптическая плотность суспензии при длине волны 269 нм. Измерения проводили на спектрофотометре UV-VIS Specord BS 250 (“Analytik Jena”, Германия) в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН.

Полученный препарат фаговых частиц использовали для проведения последующих раундов се-

лекции, осуществляемых в аналогичных условиях. Специфичность полученных препаратов фаговых антител определяли методом дот-иммуноанализа. Титр сыворотки определяли с помощью ИФА по общепринятой методике [17]. Титр фаговых антител составил 1 : 1200.

Приготовление наночастиц золота. Наночастицы золота (**НЗ**) со средним диаметром частиц (15 нм) получали, используя реакцию восстановления золотохлористоводородной кислоты (“Aldrich”, США) цитратом натрия (“Fluka”, Швейцария) по методу, описанному в работе [18]. Подготовленные наночастицы контролировали по фотометрической калибровке, а также с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и регистрации динамического рассеяния света, как описано в работе [19] в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН.

Фотометрическую оценку НЗ проводили на спектрофотометре UV-vis Specord BS 250 при длине волны 520 нм (A_{520}).

Трансмиссионную электронную микроскопию осуществляли с помощью электронного микроскопа Libra 120 (“Carl Zeiss AG, Oberkochen”, Германия).

Динамическое рассеяние света исследовали на приборе Malvern Zetasizer Nano Nanoparticle Characterization System (“Malvern Instruments”, Великобритания) с He-Ne лазером (длина волны 633 нм, мощность 4 мВт). Измерения проводили под фиксированным углом 173° при 25°C. Значения гидродинамического радиуса, полученные при регистрации динамического рассеяния света, составили 15.2 ± 1.4 нм для нативных золотых частиц.

Процедуру получения конъюгатов наночастиц золота с фаговыми антителами проводили согласно методике [20].

Дот-иммуноанализ. Для дот-иммуноанализа использовали мембрану “Western S” (“Sigma-Aldrich”, США), которую предварительно погружали в раствор метанола на 30 с. Ампициллин в концентрациях 1.0, 4.0, 6.0, 12, 25, 50 и 100 мкг/мл наносили на мембрану “Western S”, а затем проводили блокировку мембраны с нанесенным на нее антигеном в течение 1 ч 2%-ным сухим молоком, разведенным в фосфатном буферном растворе (рН 7.0). Мембрану погружали в раствор специфических фагмид, разведенных до концентрации 1×10^{13} фагмид/мл 10 мМ фосфатного буфера, и проводили инкубацию в течение ночи при 4°C. Затем мембрану отмывали от неспецифически связавшихся фаговых антител в фосфатном буферном растворе и погружали в конъюгат коллоидного золота (**КЗ**) с кроличьими антифаговыми антителами ($A_{520} = 0.5$), при 25°C на ночь.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В работе проводили отработку технологии получения фаговых антител, специфичных в отношении ампициллина. В 1999 г. в ИБФРМ РАН в ходе выполнения совместного научного проекта с Университетом г. Абердина (Великобритания) был передан фаговый дисплей антител овцы, протоколы и методические рекомендации по применению данной технологии [14]. Основой метода является создание комбинаторной библиотеки, в которой варибельные участки легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов соединены случайным образом и представлены на поверхности нитевидного бактериофага (M13K07). Каждый бактериофаг экспрессирует антитела единственной специфичности. Фаги, несущие антигенсвязывающие фрагменты антител (scFv, Fab) нужной специфичности, могут быть отобраны на иммобилизованном антигене.

Для получения фаговых антител, специфичных к ампициллину, оптимальным носителем выбрана мембрана “Western S”. Установлено, что количество антигена, используемого для иммобилизации, должно быть не менее $\times 10^{12}$ бактериофагов/мл. Подбор элюент – 100 мМ раствор триэтиламина, для его нейтрализации выбран 1.0 М Трис-НСl, рН 7.4. Для повышения чувствительности фаговых антител рекомендовано проводить не менее 4 раундов селекции. Контроль специфичности антител рекомендовано проводить методом дот-иммуноанализа, титр антител определять методом ИФА. Измерение проводили на микропланшетном спектрофотометре АИФ-Ц-01С (ЗАО “Илип”, РФ) при длине волны 490 нм. Титр полученных фаговых антител составил 1 : 1200.

С использованием отработанной методики было проведено 4 раунда селекции фаговых антител к ампициллину. Для увеличения их специфичности с каждым раундом вдвое уменьшалась концентрация антигена, как описано в [21]. Начальная концентрация антигена составляла 100 мг/мл. Концентрация фаговых частиц, определенная спектрофотометрическим методом с использованием формулы: $A_{269} - A_{320}$, составила $\sim 1.2 \times 10^{13}$ вирионов/мл.

Специфичность фаговых антител определяли методом дот-иммуноанализа. Метод дот-иммуноанализа является, в основном, качественным или полуколичественным методом, тем не менее, его использование может оказывать большую помощь при предварительном тестировании. Суть метода заключается в визуализации специфического взаимодействия адсорбированного на мембране антигена и меченых (коллоидными или молекулярными метками) антител. В работе использовали стратегию вторичного мечения, аналогично, как описано [11], то есть сначала проводили биоспецифическую реакцию ампициллин/фаговые антитела, а затем визуализировали ее с помощью меченых наночастицами поликлональных кроличьих ан-

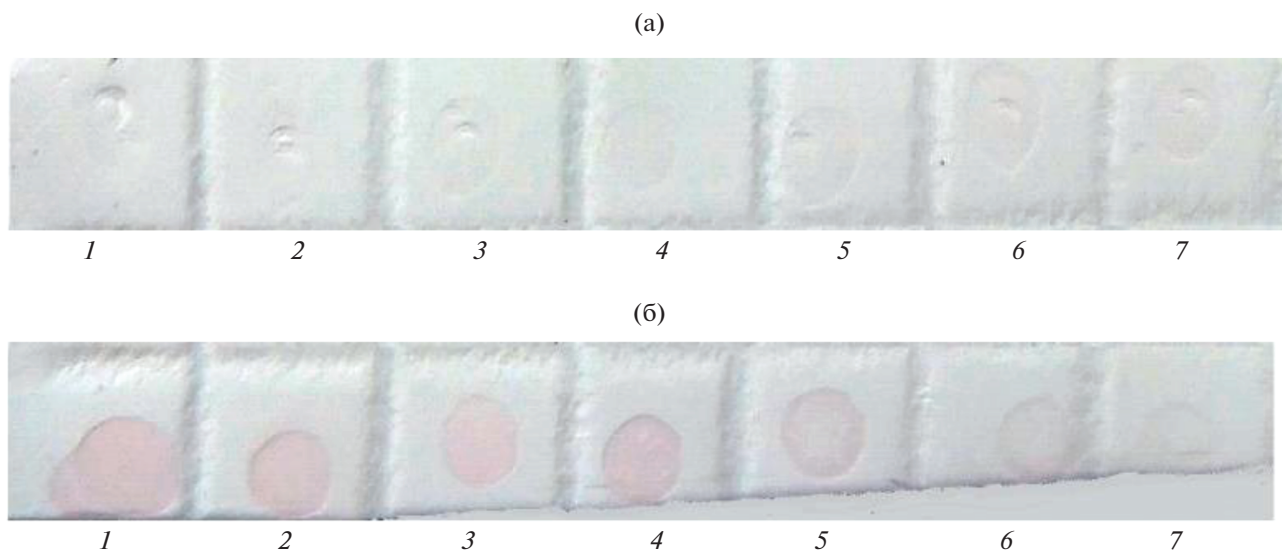


Рис. 1. Дот-иммуноанализ фаговых антител, специфичных к ампициллину, полученных с использованием фаговой библиотеки после (а) первого раунда и (б) обогащенной библиотеки после 4 раунда селекции: 1 – 100; 2 – 50; 3 – 25; 4 – 12; 5 – 6.0; 6 – 4.0; 7 – 1.0 мкг/мл ампициллина.

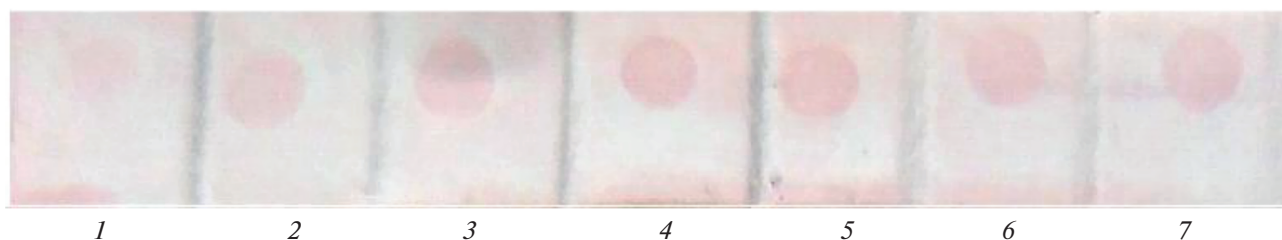


Рис. 2. Дот-иммуноанализ фаговых антител, специфичных к ампициллину, полученных с использованием овечьей фаговой библиотеки (Griffin.1, Англия) после 4 раунда селекции, при детекции ампициллина в концентрациях: 1 – 1.0; 2 – 4.0; 3 – 6.0; 4 – 12; 5 – 25; 6 – 50; 7 – 100 мкг/мл.

тифаговых антител. Были проведены с первого по четвертый раунды селекции фаговых антител, специфичных к ампициллину. Только после четвертого раунда селекции методом дот-иммуноанализа показано, что фаговые антитела обладали специфичностью к ампициллину (рис. 1б). После первого раунда селекции такой четкой картины не наблюдалось (рис. 1а), также, как и после второго и третьего раунда. Поэтому сделан вывод, что для повышения чувствительности фаговых антител рекомендуется проводить не менее 4 раундов селекции. Необходимо было определить минимальную концентрацию антигена, детектируемую визуально с помощью фаговых антител методом дот-иммуноанализа. Для этого использовали фаговые антитела, специфичные к ампициллину, полученные после 4 раунда селекции, и ампициллин в концентрациях 1.0, 4.0, 6.0, 12, 25, 50 и 100 мкг/мл. В качестве метки использовали 15 нм конъюгаты коллоидного золота с кроличьими антифаговыми антителами (200 мкл конъюгата на 1 мл фосфат-

ного буферного раствора при визуальном контроле (около 20 мин).

Из данных, представленных на рис. 2 видно, что конъюгат связывался с комплексом антиген-антитело, что можно было визуально наблюдать в виде серии розовых пятен. Следовательно, полученные в работе фаговые антитела способны детектировать ампициллин с помощью метода дот-иммуноанализа при минимальной определяемой концентрации 1 мкг/мл (различимое связывание метки, отличное от фонового уровня).

На следующем этапе проводили анализ специфичности взаимодействия полученных фаговых антител в отношении представителей других групп антибиотиков. Для этого использовали антибактериальные препараты, которые, в соответствии с данными 2020 г., активно используются во всем мире [1]: тетрациклин (занимает 1 место по объему продаж) и канамицин (как представитель аминогликозидных антибиотиков, объем

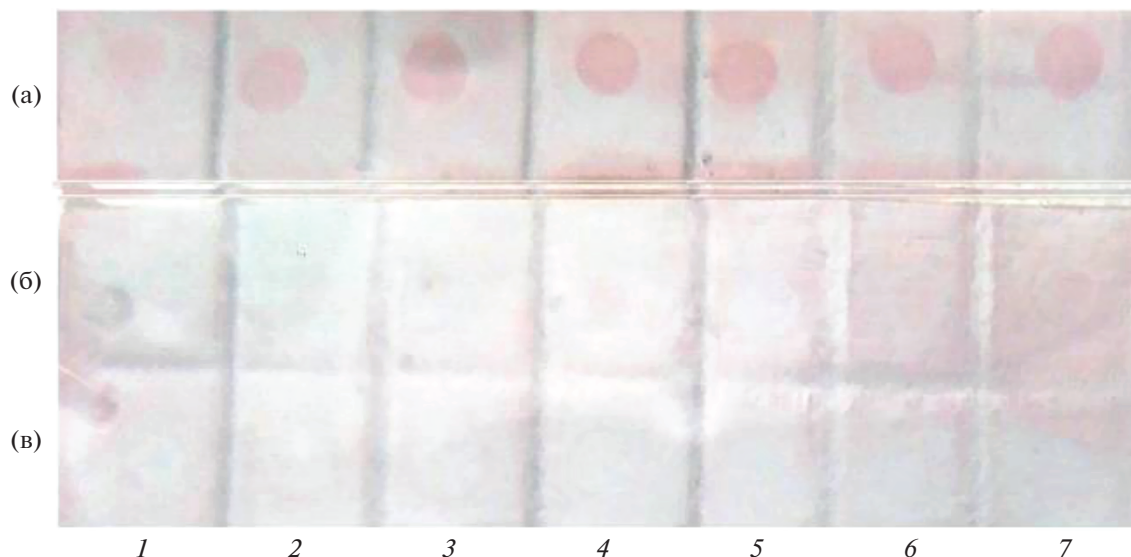


Рис. 3. Определение специфичности фаговых антител в отношении ампициллина (а), тетрациклина (б, мкг/мл), канамицина (в) методом дот-иммуноанализа при их концентрациях: 1 – 1.0; 2 – 4.0; 3 – 6.0; 4 – 12; 5 – 25; 6 – 50; 7 – 100 мкг/мл.

продаж которого составляет 6.2% от общего объема продаж всех антибактериальных препаратов).

Условия проведения анализа для всех антибиотиков были аналогичны тем, как и при использовании ампициллина. Установлено, что конъюгат связывался с комплексом ампициллин (антиген) – специфичные фаговые антитела, что можно визуально наблюдать в виде серии розовых пятен (рис. 3). Из представленных данных видно, что фаговые антитела, специфичны только к ампициллину и не взаимодействуют с тетрациклином и канамицином.

При разработке биорецептора для определения антигена одним из важных моментов является анализ возможности неспецифичного взаимодействия с другими аналитами, близкими по химическому строению. Поскольку химическая формула ампициллина, L-фенилаланина и L-триптофана содержат ароматическое кольцо и группу NH₂ (рис. 4), были проведены контрольные исследования по исключению возможности неспецифичного взаимодействия полученных фаговых антител с L-фенилаланином и L-триптофаном. Дополнительно проводили исследования, исключая неспецифичное взаимодействие фаговых антител в отношении L-цистеина, который также в своем составе содержит группу NH₂ (рис. 4).

Из результатов, представленных на рис. 5, видно, что фаговые антитела, специфичные в отношении ампициллина, не взаимодействуют L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином.

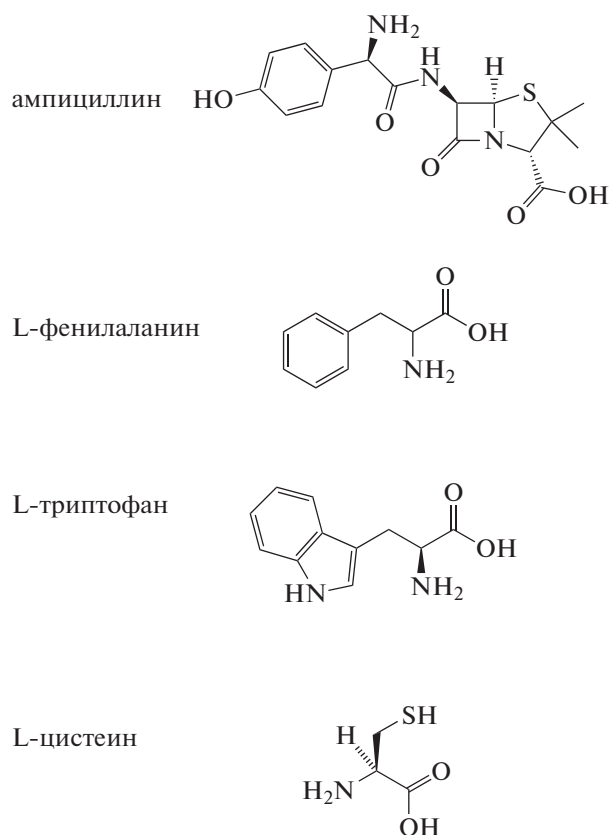


Рис. 4. Структурные формулы ампициллина, L-фенилаланина, L-триптофана и L-цистеина.

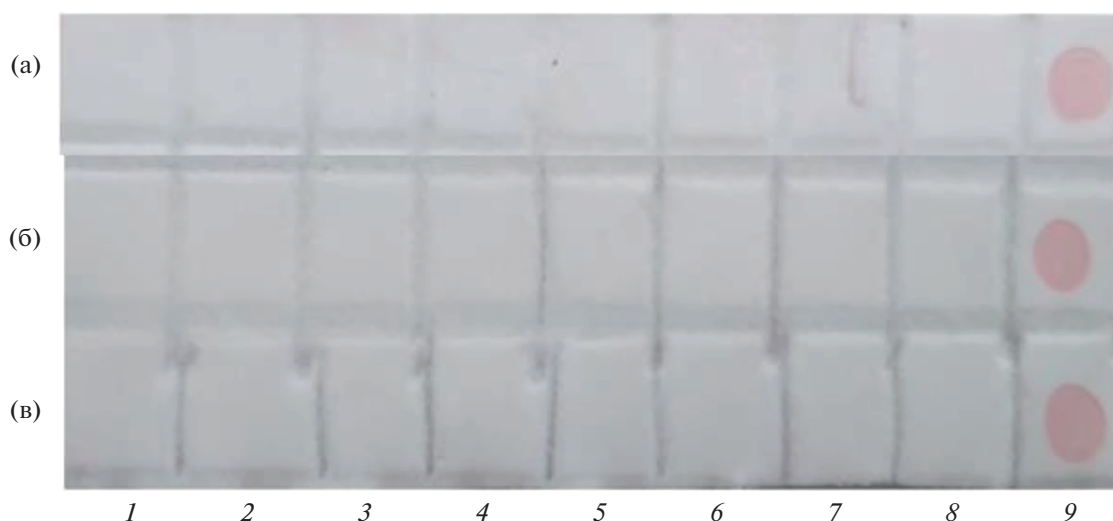


Рис. 5. Анализ взаимодействия фаговых антител, специфичных в отношении ампициллина, с L-фенилаланином (б), L-триптофаном (а) и L-цистеином (в) методом дот-иммуноанализа при их концентрации: 1 – 1.0; 2 – 4.0; 3 – 6.0; 4 – 12; 5 – 25; 6 – 50; 7 – 100; 8 – 1000 мкг/мл; 9 – с ампициллином (100 мкг/мл): контроль.

Как показало исследование, технология фагового дисплея является перспективным инструментом для получения антител, специфичных к ампициллину. Полученные фаговые антитела обладают достаточно высокой специфичностью по отношению к ампициллину и не взаимодействуют с другими антибиотиками: тетрациклином и канамицином, а также аминокислотами: L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином. Рекомендовано проводить не менее 4 раундов биопэннинга для получения фаговых антител, специфичных к ампициллину. Фаговые антитела, специфичные к ампициллину, в дальнейшем могут быть использованы для детекции ампициллина в водных растворах методом дот-иммуноанализа, при этом нижний предел детекции составлял 1 мкг/мл. На данном этапе показана возможность получения фаговых антител, специфичных к ампициллину, и продемонстрирована принципиальная возможность их применения для иммунодетекции ампициллина. В дальнейшем такие фаговые антитела могут быть использованы в качестве чувствительного (распознающего) элемента сенсорных систем при определении ампициллина в водных растворах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-24-00417, <https://rscf.ru/project/22-24-00417/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2021. 'Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2019 and 2020'. (EMA/58183/2021).
2. Ierapetritou M., Muzzio F., Reklaitis G. // *AICHE J.* 2016. V. 62. P. 1846–1862. <https://doi.org/10.1002/aic.15210>
3. Sharma S., Byrne H., O'Kennedy R.J. // *Essays Biochem.* 2016. V. 60. № 1. P. 9–18. <https://doi.org/10.1042/EBC20150002>
4. Kohler G., Milstein C. // *Nature.* 1975. V. 256. P. 495–497.
5. Smith G.P., Petrenko V.A. // *Chem. Rev.* 1997. V. 97. P. 391–41. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>
6. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. // *Nature.* 1990. V. 348. P. 552–554. <https://doi.org/10.1038/348552a0>
7. Ye J., Guo J., Li T., Tian J., Yu M., Wang X., Majeed U., Song W., Xiao J., Luo Y., Yue T. // *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2022. V. 21. № 2. P. 1843–1867. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12908>
8. Zhao F., Shi R., Liu R., Tian Y., Yang Z. // *Food Chemistry.* 2021. V. 339. 128084. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128084>
9. Пристенский Д.В., Староверов С.А., Ермилов Д.Н., Щеголев С.Ю., Дыкман Л.А. // *Биомедицинская химия.* 2007. Т. 53. № 1. С. 57–64. Pristensky D.V., Staroverov S.A., Ermilov D.N., Shchyogolev S.Y., Dykman L.A. // *Biochemistry (Moscow) Supplement Se-*

- ries B: Biomedical Chemistry. 2007. V. 1. № 3. P. 249–253.
10. *Staroverov S.A., Sidorkin V.A., Fomin A.S., Shchyogolev S.Y., Dykman L.A.* // J. Vet. Sci. 2011. V. 12. № 4. P. 303–307.
 11. *Staroverov S.A., Volkov A.A., Fomin A.S., Laskavuy V.N., Mezhenyuy P.V., Kozlov S.V., Larionov S.V., Fedorov M.V., Dykman L.A., Guliy O.I.* // J Immunoassay Immunochem. 2015. V. 36. № 1. P. 100–110.
 12. *Staroverov S.A., Kozlov S.V., Fomin A.S., Gabalov K.P., Khanadeev V.A., Soldatov D.A., Domnitsky I.Y., Dykman L.A., Akchurin S.V., Guliy O.I.* // ADMET & DMPK. 2021. V. 9. № 4. P. 255–266.
 13. *Самсонова Ж.В., Щелокова О.С., Иванова Н.Л., Рубцова М.Ю., Егоров А.М.* // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 6. С. 668–675. doi 10.1007/s10438-005-0107-4. *Samsonova Z.V., Shchelokova O.S., Ivanova N.L., Rubtsova M.Y., Egorov A.M.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2005. V. 41. P. 589–595.
 14. *Charlton K.A., Moyle S., Porter A.J., Harris W.J.* // The J. Immunology. 2000. V. 164. P. 6221–6229. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00192-0](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00192-0)
 15. *Guliy O.I., Velichko N.S., Fedonenko Yu.P., Bunin V.D.* // Talanta. 2019. V. 202. P. 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.086>
 16. *Smith G.P., Scott J.K.* // Methods in Enzymology. 1993. V. 217. P. 228–257. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17065-D](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17065-D)
 17. *Beatty J.D., Beatty B.G., Vlahos W.G.* // J. Immunological Methods. 1987. V. 100. P. 173–179. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(87\)90187-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(87)90187-6)
 18. *Frens G.* // Nature Phys. Sci. 1973. V. 241. P. 20–22.
 19. *Guliy O.I., Zaitsev B.D., Burygin G.L., Karavaeva O.A., Fomin A.S., Staroverov S.A., Borodina I.A.* // Ultrasound in Medicine & Biology. 2020. V. 46. №. 7. P. 1727–1737. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.014>
 20. *De Mey J., Moeremans M.* In: *Koehler J.K.*, (Ed.), *Advanced Techniques in Biological Electron Microscopy III*. Berlin: Springer-Verlag, 1986.
 21. *Griep R.A., Twisk van C., Beckhoven van J.R., Wolf van der J.M., Schots A.* // Phytopathology. 1998. V. 88. P. 795–803. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.8.795>

Phage Antibodies as Bioreceptors for Ampicillin Detection

O. I. Guliy^{a, *}, A. K. M. Alsowaidi^b, A. S. Fomin^a, K. P. Gabalov^a,
S. A. Staroverov^{a, c}, and O. A. Karavaeva^a

^a *Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Subdivision of the Federal State Budgetary Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Saratov, 410049 Russia*

^b *Chernyshevsky National Research State University, Saratov, 410005 Russia*

^c *Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, 410012 Russia*

*e-mail: guliy_olga@mail.ru

Ampicillin-specific antibodies were obtained using a sheep display library of scFv fragments (Griffin.1, UK). Ampicillin was determined by dot-immunoassay with biospecific interaction of selected recombinant antibodies in phage format (phage antibodies). It has been established that the phage antibodies are specific for ampicillin and do not interact with other antibiotics as tetracycline and kanamycin, as well as with substances similar in chemical formula – L-phenylalanine, L-tryptophan and L-cysteine. It has been shown that the method of solid-phase immunoassay with visual consideration of the results makes it possible to ampicillin detection with the minimum concentration of 1 µg/ml. Phage antibodies are promising for use as a sensitive (recognizing) element of sensory systems at the ampicillin detection.

Keywords: phage display technology, antibodies, ampicillin, dot-immunoassay

УДК 579.22

ЛАКТОБАЦИЛЛЫ: ПРАВОВОЕ РЕГУЛИРОВАНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

© 2022 г. Р. А. Юнес¹, *, Е. У. Полуэктова¹, Т. В. Белкина¹, В. Н. Даниленко¹¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

*e-mail: romanyunes@gmail.com

Поступила в редакцию 15.11.2021 г.

После доработки 20.04.2022 г.

Принята к публикации 26.04.2022 г.

Индустрия пробиотиков в мире в последние годы претерпевает серьезные изменения. Меняются подходы поиска и создания пробиотиков, а также парадигмы использования в пищевой промышленности, медицине и фармацевтике. Катализатором послужила нарастающая популярность и доступность омиксных технологий, в частности метагеномных исследований микробиома человека и животных. Однако эффективность, безопасность и быстрота внедрения лекарственных препаратов на основе пробиотических штаммов в значительной степени зависят от уровня правового и технического регулирования в данной области. В обзоре обсуждаются правовые аспекты регулирования в России, Евросоюзе и США и преимущества и недостатки пробиотиков и постбиотиков. Сегодня формируется консенсус, что постбиотики имеют ряд преимуществ по сравнению с классическими живыми пробиотическими культурами. Также в обзоре уделяется внимание семейству лактобацилл, включающему самое большое количество изученных пробиотических штаммов, и по-прежнему занимающему среди пробиотиков лидирующее положение. В законодательном плане Россия нередко выдвигает опережающие предложения, это касается принятия федерального закона № 492-ФЗ о биологической безопасности, давшего определение понятию микробиоты человека и животных и сформулировавшего законодательные указания по ее сохранению. Новое направление “нутригеномика микробиома” направлено на решение этой задачи.

Ключевые слова: пробиотики, постбиотики, фармабиотики, лактобациллы, правовое регулирование

DOI: 10.31857/S0555109922050178

Бактерии, относящиеся к пробиотическим, издавна используются людьми как компоненты пищи, а с начала 20 в. — и как аналоги лекарственных средств. Их принципиальное отличие от собственно лекарств в том, что они оказывают благоприятный эффект на макроорганизм в целом, однако механизм и мишени их действия не известны. Пробиотики предназначены в основном для здоровых людей и используются как профилактическое средство. В последние годы интерес к пробиотикам постоянно растет, расширяется круг используемых микроорганизмов [1–5].

Омиксные технологии сделали возможным изучение как микробиоты в целом, так и отдельных бактерий на уровне их геномов. Было идентифицировано огромное число видов микроорганизмов, прежде всего бактерий, обитающих на поверхности и в организме человека, что заставило и фарминдустрию обратить внимание на потенциал использования препаратов на основе живых пробиотических организмов для лечения различных заболеваний [8–14]. Исследования последних лет демонстрируют огромный потенциал пробиоти-

ков. Они способны влиять на различные процессы в организме человека, в том числе повышать чувствительность к инсулину, улучшать память и когнитивные свойства, снижать проявление признаков тревожности и депрессии, снижать проявление аллергических реакций. Следует подчеркнуть, что проявление пробиотических свойств бактериями — явление штаммоспецифическое, что требует детального исследования свойств не только видов, но и конкретных штаммов.

Однако использование препаратов на основе пробиотических микроорганизмов в медицине затруднено в связи со сложностями их стандартизации и разработки соответствующих протоколов, позволяющих гарантировать сохранение полезных свойств микроорганизмами в процессе производства. Проблему осложняет и большое количество терминов (“эубиотики”, “пробиотики”, “пробиотики” “синбиотики”, “парабиотики”, “постбиотики”) и их произвольное использование. Тем не менее, такие препараты были названы “живыми биотерапевтическими препаратами” (англ. Live Biotherapeutic Products – LBP) или “фарма-

биотиками” и были сформулированы руководства по их созданию Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) в США и Европейским директором по качеству лекарственных средств и здравоохранению (EDQM) [6, 7]. Постепенно формируется консенсус, что гораздо перспективнее вкладываться не в пробиотики на основе живых культур бактерий, а в постбиотики (инактивированные микробные клетки или их метаболиты), которые легче поддаются контролю и стандартизации.

Согласно государственному реестру лекарственных средств, в РФ зарегистрирован ряд препаратов, нормализующих микробиоту. Большая часть препаратов содержит бифидобактерии и лактобактерии [8]. В РФ зарегистрированные лекарственные препараты, нормализующие микробиоту, применяются преимущественно после курсов антибиотикотерапии, при аллергических заболеваниях, респираторных инфекциях и расстройствах желудочно-кишечного тракта. В данном обзоре рассматриваются вопросы правового регулирования пробиотиков, постбиотиков и фармабиотиков в России и за рубежом. Уделяется особое внимание лактобациллам как наиболее часто используемым в качестве пробиотиков бактериям.

ПРОБИОТИКИ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ БАДОВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В РОССИИ И ЗА РУБЕЖОМ

Термин “пробиотик” был впервые использован в 1954 г. Фердинандом Вегинем [9]. В настоящее время международная научная ассоциация пробиотиков и пребиотиков (the International Scientific Association for Probiotic and Prebiotic, ISAPP) определяет пробиотики как живые организмы, которые, при приеме в достаточном количестве, приносят пользу для здоровья хозяина [10].

Пробиотики могут использоваться как БАДы, как компоненты функциональных пищевых продуктов и как лекарственные средства, называемые “фармабиотиками” или “LBP”. Термин “фармабиотики” впервые был использован в 2002 г. Колинном Хиллом во время его работы по изучению пробиотиков под руководством Фергуса Шанахана [11]. Как БАДы и лекарственные средства пробиотики используются для профилактики и лечения заболеваний ЖКТ (синдром раздраженного кишечника, желудочно-кишечные расстройства, элиминация хеликобактера, воспалительные заболевания кишечника), аллергических заболеваний, ожирения, диабета 2 типа, неалкогольной жировой болезни печени, побочных эффектов рака, заболеваний нервной системы, для модуляции иммунной системы. Пробиотики способствуют поддержанию нормального состава микробиоты, укреплению кишечного барьера, подавляют рост пато-

генных бактерий, стимулируют пролиферацию и активность компонентов врожденного и адаптивного иммунитета и синтез ферментов организма хозяина, участвующих в защите от стресса [12–15].

Пробиотики действуют на макроорганизм посредством как интактных клеток, так и клеточных компонентов и отдельных метаболитов. Мишени их действия различны, они включают бактерии микробиоты, клеточные рецепторы (в том числе Toll-подобные рецепторы), компоненты систем сигнальной трансдукции, клетки кишечного эпителия и энтеральной нервной системы [16]. Было выдвинуто предположение, что пробиотики могут влиять на различные биохимические и сигнальные пути через эпигенетические модификации, такие как метилирование ДНК, фосфорилирование, биотинилирование, ацетилирование гистонов и РНК-интерференцию [17]. Данные механизмы вовлечены в осуществление эпигенетического контроля ответов клетки-хозяина, таким образом регулируя различные биохимические процессы, такие как иммуномодуляция, конкурентное исключение и барьерная функция эпителиальных клеток. Кроме того, эти биохимические модификации могут способствовать предотвращению различных заболеваний, таких как рак, аутоиммунные расстройства, и других.

Эффективность пробиотиков определяется не видом используемых бактерий, а конкретным штаммом, а также конкретным заболеванием, для профилактики и лечения которого используется данный пробиотик [18]. Для максимальной эффективности штаммы пробиотиков должны быть отобраны в том же географическом регионе, в котором предполагается их применение.

Широко используемые термины “пребиотик” и “синбиотик” были введены позже, в 1995 г. [19]. В настоящее время ISAPP определяет пребиотики как неживые пищевые ингредиенты, которые поддерживают здоровье хозяина за счет модуляции микробиоты [20]. Термин синбиотик обозначает смесь, содержащую живые микроорганизмы и субстрат(ы), селективно используемые микроорганизмами, которая благотворно влияет на организм хозяина [21]. Пребиотики могут быть использованы как альтернатива пробиотикам или совместно с ними, для усиления эффекта их действия в составе синбиотиков. Используется также термин “аутопробиотики”, их получают культивированием *in vitro* штаммов индивидуальной микробиоты человека с последующим использованием в качестве персонализированных лекарств или пищевых продуктов [22].

Статус пробиотиков за рубежом. В США пробиотики могут получить статус биологически активной добавки (БАД), пищевого ингредиента или живого биологически активного продукта (LBP), являющегося лекарственным средством, в



Рис. 1. Статус пробиотиков за рубежом.

зависимости от того, предназначены они для использования здоровыми или больными людьми, соответственно (рис. 1).

Большинство пробиотиков, используемых в США как пищевой ингредиент, не проходили процесс утверждения перед выходом на рынок, так как они попадают под программу GRAS (Generally Regarded as Safe) и признаются полностью безвредными для здоровья человека. Статус GRAS получают автоматически вещества, применявшиеся исторически в составе пищевой продукции на момент до 1 января 1958 г. Международная молочная федерация (IDF) составила список организмов с задокументированной историей безопасного использования в пищевых продуктах в своем бюллетене № 377 “Инвентаризация микроорганизмов с задокументированной историей использования в пищевых продуктах” [23].

Что касается регистрации пищевых добавок в США, согласно закону о пищевых добавках (DSHEA), пищевые добавки, применяемые до 15 октября 1994 г., автоматически разрешены к производству. Совет по вопросам ответственного питания (CRN) составил список разрешенных добавок до 15 октября 1994 г. Однако в списке, к сожалению, указаны только виды пробиотиков без указания названий штаммов. Штаммы, выделенные позднее 15 октября 1994 г., нужно регистрировать как новый диетический ингредиент (NDI) [24]. Регистрация пробиотиков в США регулируется федеральным законом о продуктах питания, лекарствах и косметике (сокращенно FFDCА, FDCA или FD&C) [25].

EFSA одобрила список видов бактерий, используемых в составе пищевой продукции, для которых действует принцип квалифицированной презумпции безопасности (Qualified Presumption of Safety – QPS) [26, 27]. Данное решение основано на исследованиях, показывающих, что без-

опасность штаммов, входящих в состав пищи, в первую очередь определяется их видовой принадлежностью.

Стоит отметить, что в большинстве стран ЕС, согласно регламенту № 1924/2006, запрещено наносить на этикетке слово “пробиотик” в целях защиты прав потребителя. Причиной тому является то, что применение названия “пробиотик” на этикетке сообщает потребителю о наличии в составе продукта полезных свойств для его организма, которые далеко не всегда доказаны. Из 400 заявок о регистрации полезных свойств пробиотиков поданных в EFSA, лишь одна была поддержана. Согласно статье 13.1, йогурты, содержащие не менее 10^8 колоний-образующих единиц видов *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*, можно рекламировать как средство для улучшения усвоения лактозы [28].

Регистрация пробиотиков в качестве LBP за рубежом. В 2010 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) стало первым компетентным органом, предложившим рассмотреть статус лекарственных препаратов, содержащих живые микроорганизмы, применяемые для профилактики или лечения болезней у людей. В 2016 году FDA опубликовало руководство по созданию LBP. Согласно FDA, препарат можно отнести к категории LBP, если он содержит живые организмы, применим для профилактики и лечения конкретного заболевания или расстройства у людей и не является вакциной [29].

В 2019 г. Европейский директорат по качеству лекарственных средств и здравоохранению (EDQM) опубликовал монографию, посвященную LBP, тем самым официально признав их в качестве новой категории лекарственных средств для применения на Европейском рынке [6]. Подача заявок на регистрацию препаратов в качестве

Таблица 1. Список медицинских областей применения LBP согласно Национальному институту здоровья США (NIH) [31]

Желудочно-кишечные заболевания	Антибиотик-ассоциированная диарея, инфекция <i>Clostridioides difficile</i> , запор, диарея, вызванная противораковой терапией, дивертикулярная болезнь, воспалительное заболевание кишечника, синдром раздраженного кишечника, диарея путешественника
Детские заболевания	Детские колики, некротический энтероколит, сепсис новорожденных
Стоматологические заболевания	Зубной кариес, заболевания десен
Аллергические заболевания	Аллергический ринит, астма, атопический дерматит, профилактика аллергии
Ось кишечник-мозг и связанные с ней заболевания	Тревожность и стресс, когнитивные функции, депрессия, расстройство аутистического спектра, шизофрения, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера
Другие заболевания	Воспаление сальных желез, печеночная энцефалопатия, инфекции верхних дыхательных путей, инфекции мочеиспускательного канала, заболевания половых путей

LBP часто обсуждается с компетентными органами, такими как EDQM и FDA, для уточнения всех требуемых исследований для конкретного препарата. Все требования к разработке и использованию препаратов на основании живых культур были подробно изложены в статье, посвященной препарату на основе штамма *Christensenella minuta* DSM 33407 для лечения ожирения и метаболического синдрома [30].

Национальный институт исследования здоровья США (NIH) сегодня разрешает применение LBP для лечения заболеваний желудочно-кишечных, аллергических, стоматологических, связанных с осью кишечник-мозг и других (см. табл. 1) [31].

Если вкратце, для регистрации нового препарата LBP требуется продемонстрировать положительный баланс пользы и риска (рис. 2). Доказательство положительного баланса пользы и риска должно быть получено на основе проведения на-

дежных и подтвержденных доклинических и клинических исследований. Соотношение польза/риск — это краеугольный камень заявки на регистрацию препарата [32]. Клинические испытания — это исследования, проводимые на людях и направленные на оценку безопасности и эффективности медицинских, хирургических или поведенческих вмешательств. Это основная и общепринятая методика, с помощью которой исследователи выясняют, является ли новое лечение в виде нового лекарства, диеты или медицинского устройства безопасным и эффективным для людей. Клинические испытания подразделяются на четыре этапа. Конечная цель клинических испытаний является протестировать новый вид лечения, найти подходящую дозировку и выявить побочные эффекты. Если в ходе первых трех фаз клинических испытаний выявляется, что лекарство или другое вмешательство безопасно и эффективно, оно может быть одобрено для постмаркетинговой IV фазы. Как правило, проведение первых трех фаз достаточно для вывода препарата/методики лечения на рынок.

На сегодняшний день зарегистрированных LBP на территории США нет. Первым таким препаратом может стать SER-109 на основе спор бактерий типа Фирмикуты (лат. Firmicutes) для лечения антибиотико-ассоциированной диареи, вызванной *C. difficile* [33]. Есть ряд других препаратов LBP на разных стадиях клинических исследований (табл. 2) [34].

Что касается регистрации LBP на территории Европейского Союза (ЕС), в соответствии с директивой N 2001/83/ЕС Европейского парламента и Совета ЕС “О Кодексе Сообщества о лекарственных средствах для использования человеком” лю-

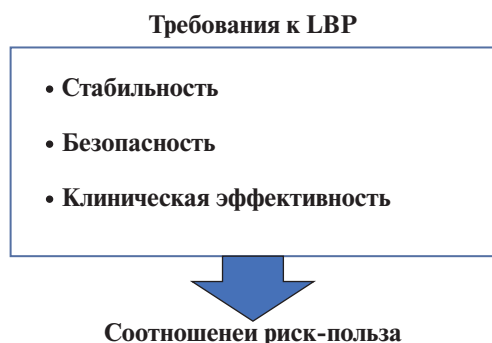


Рис. 2. Требования к LBP.

Таблица 2. Список LBP, которые проходят сегодня клинические исследования

Препарат	Мишень	Фаза исследования	Описание препарата
SER-109	Инфекция <i>Clostridium difficile</i>	III	SER-109 представляет собой совокупность спор бактерий, полученную из донорского стула от здоровых, проверенных доноров
VE303	Инфекция <i>Clostridium difficile</i>	II	VE303 представляет собой живой биотерапевтический продукт, содержащий 8 штаммов комменсальных бактерий человека, полученных в соответствии с требованиями GMP
Blautix (MRx1234)	Синдром раздраженного кишечника	a II	Лиофилизированный продукт запатентованного штамма бактерии <i>Blautia hydrogenotrophica</i>
LACTIN-V	Бактериальный вагиноз	II	LACTIN-V представляет собой живой биотерапевтический продукт для интравагинального введения, состоящий из штамма <i>Lactobacillus crispatus</i> CTV-05
Xla1	Ожирение и метаболический синдром	I	Xla1 представляет собой LBP, содержащий штамм бактерий <i>Christensenella minuta</i>

бой продукт, предназначенный для профилактики или лечения заболеваний, определяется как лекарственный продукт и соответственно требуется получить разрешение на продажу от компетентных органов до его коммерциализации. Однако, даже если нормативно-правовая база в области фармации будет налажена на уровне ЕС, получение разрешений на продажу лекарственных средств для LBP остается очень сложной задачей. По сравнению с другими лекарственными средствами, находящимися в продаже в настоящее время на рынке, оценка безопасности LBP представляет собой реальную проблему из-за их специфики, свойственной живым организмам и сложного механизма действия. Например, сами LBP не должны попасть в кровоток как большинство лекарственных средств, нацеленных на отдаленные органы, ткани или рецепторы, а скорее оказывать свое действие посредством прямого взаимодействия с микробиотой хозяина, что косвенно приводит к отдаленным биологическим эффектам в его организме.

Для оценки безопасности LBPv недостаточно сослаться на историческое безопасное использование некоего штамма в составе пищевой продукции. В ЕС послепродажный надзор, как правило, не требуется для пищевых продуктов и пищевых добавок. Соответственно, о возможных побочных эффектах у больных людей может не сообщаться. Кроме того, в отчете 2011 г. Агентства США по исследованиям и качеству в области здравоохранения авторы заключили, что, хотя существующие клинические испытания для пробиотиков пока не выявляют повышенного риска, современная литература не может с уверенностью ответить на

вопросы о безопасности интервенционных исследований. Дело в том, что в случае лекарственных средств, данные о безопасности и токсикологии являются обязательными, что нельзя сказать о пищевых добавках.

ЕМА до сих пор не разработало требования к регистрации LBP, поскольку ЕМА до сих пор не занималась живыми микроорганизмами и трудностями, связанными с их стандартизацией. Среди требований, которые возможно будут введены для LBP, может быть подсчет с помощью проточной цитометрии живых, мертвых и активных бактерий. Такой стандарт уже был разработан и сертифицирован ISO, а также включен в Европейскую фармакопею. Поэтому есть надежда, что в ближайшие годы ЕМА продолжит разработку, оценку и улучшение существующих процедур согласования требований к LBP. В отсутствие такого формального регулирования можно ожидать появления национальных инициатив по использованию термина “пробиотик”. Согласно ISAPP, на этикетке пробиотического продукта должны быть указаны род, вид и обозначение штамма для всех штаммов, содержащихся в продукте; ингредиенты/аллергены; эффект/рекомендуемое использование; суточная доза; информация о хранении; срок хранения; название компании/контактная информация [35].

Статус пробиотиков на территории РФ. Пробиотики регулируются разными законодательными актами РФ в зависимости от того, будут ли они зарегистрированы как биологически активные пищевые добавки (БАД) или как лекарственное средство (ЛС). При этом важно понимать, что только ЛС может быть выписано врачом в каче-

стве фармакологического лечения. Пробиотики – БАДы могут быть применены для профилактики заболеваний, принимать их как лекарство запрещено ФЗ РФ “о надзоре за БАД” от 10.07.2009. Существует и третья группа препаратов, содержащих пробиотики, это продукты функционального питания, имеющие в своем составе живые пробиотические бактерии.

Регистрация пробиотиков в качества БАДов в России. Согласно Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзору) биологически активные добавки к пище (БАДы) – это природные и (или) идентичные природным биологически активные вещества, а также пробиотические микроорганизмы, предназначенные для употребления одновременно с пищей или введения в состав пищевой продукции [36]. Для того, чтобы зарегистрировать пробиотик в качестве БАДа на территории РФ, требуется провести испытание препарата, пройти экспертизу документации и оформить свидетельство о государственной регистрации. Стадия испытания направлена в первую очередь на доказательство безопасности препарата и на подтверждение соответствия заявленным в документации его свойствам. Пробиотики – БАДы регулируются также гигиеническими требованиями безопасности пищевой продукции, сформулированными в техническом регламенте Таможенного союза “О безопасности пищевой продукции” [37], что является необходимым условием для продажи продукта на территории РФ. Существуют микробиологические стандарты, которым должны соответствовать БАДы для обеспечения безопасности продукта. Данные стандарты подробно описаны в Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требованиях к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору под контролем Роспотребнадзора [37]. Конечным этапом является государственная регистрация БАДа, что подразумевает внесение препарата в единый Реестр свидетельств о государственной регистрации. Данный реестр контролируется Роспотребнадзором. Пробиотики могут быть зарегистрированы только в качестве БАДов.

Регистрация пробиотиков в качества ЛС в России. Для регистрации пробиотика в качестве ЛС необходимо, чтобы препарат соответствовал требованиям Федерального закона Российской Федерации N 61-ФЗ “Об обращении лекарственных средств” [38].оборот таких препаратов регулируется приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 11.07.2017 г. № 403н “Об утверждении правил отпуска лекарственных препаратов для медицинского применения, в том числе иммунобиологических лекарственных препаратов, аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность” [39].

Сегодня ЛС на основе пробиотиков признаются как иммунобиологические препараты. Как правило, они содержат живые полезные микроорганизмы, для которых должна быть доказана их активность, например, антагонистическая активность в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий. Подобные препараты должны соответствовать фармакопейным требованиям к производству стандартного препарата и требованиям к качеству ЛС для определенной лекарственной формы [40]. При этом существует несколько фармакотерапевтических групп для ЛС на основе пробиотиков; препарат может быть отнесен к пробиотикам, эубиотикам, противодиарейным средствам или к медицинским иммунобиологическим препаратам и классифицируется в соответствии с анатомо-терапевтической химической классификацией (АТХК). ЛС на основе пробиотиков могут иметь следующие коды: сахаромицеты *Boulardii* (A07FA02), противодиарейные микроорганизмы (A07FA), лактобациллы (G01AX14), микроорганизмы, продуцирующие молочную кислоту (A07FA01), микроорганизмы, продуцирующие молочную кислоту в комбинации с другими препаратами (A07FA51). При этом нужно отметить, что понятие “эубиотик”, которым обозначают препарат, содержащий один или несколько штаммов пробиотиков, считается устаревшим [40].

С точки зрения правового регулирования, пробиотики в РФ в основном используются для лечения заболеваний гастроэнтерологического профиля и не могут быть зарегистрированы в качестве ЛС, предназначенных для лечения большинства заболеваний, упомянутых в табл. 1 и признанных НИН [41]. Что касается уровня доказательности, учитывая, что БАДы и ЛС могут быть зарегистрированы без указания штамма, не существует гарантии, что штамм, входящий в состав препарата, будет всегда проявлять заявленные производителем свойства. Очевидно, необходимо более строгое правовое регулирование пробиотиков как ЛС и БАДов. Результаты анализа правового регулирования пробиотиков просуммированы в табл. 3.

Также стоит упомянуть о категории функциональных пищевых продуктов, которые содержат пребиотики, пробиотики и другие активные ингредиенты и предназначены для потребления здоровой категорией людей и направлены на предотвращение заболеваний и поддержание здорового состояния организма человека. Общие требования к пробиотикам – БАДам, ЛС, функциональным пищевым продуктам – сформулированы Федеральным законом о “Биологической безопасности в Российской Федерации” [42]. Закон был принят Государственной Думой 24.12.2020 и одобрен Советом Федерации 25.12.2020; он направлен на защиту населения от воздействия опасных биологических факторов и охрану окружающей среды, на предотвращение биологических угроз и

Таблица 3. Анализа правового регулирования пробиотиков в РФ, ЕС и США

Показатель	РФ		ЕС		США	
	БАД	ЛС	БАД	ЛС	БАД	ЛС
Регулирующий орган	Роспотребнадзор	Минздрав	EFSA	EMA	FDA	FDA
Требуется идентификация штамма, входящего в состав препарата	Нет	Нет	Нет	Да	Нет	Да
Документы, регулирующие требования к регистрации	Гигиенические требования безопасности пищевой продукции, сформулированные в техническом регламенте Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" (ТР ТС 021/2011) [35]	Требования Федерального закона Российской Федерации N 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств", Общая фармацевтическая статья ОФС.1.7.1.0008.15 "О безопасности пищевой продукции" [38]	Регламент Европейского Парламента и Совета Европейского Союза 1924/2006 от 20 декабря 2006 г. о заявлениях о пищевой ценности и полезности для здоровья (NHCR) [27]	3053E Общая монография о живых биотерапевтических продуктах (2019 г.) Директива N 2001/83/ЕС [6]	Федеральный закон США о продуктах питания, лекарствах и косметике (сокращенно FFDSA, FDCA или FD&C) [25]	FDA. Ранние клинические испытания живых биотерапевтических продуктов: информация о химическом составе, производстве и контроле (2012, 2016) [7, 28]
Требования к безопасности	Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору [35]	Общая фармацевтическая статья ОФС.1.7.1.0008.15 [38]	Квалифицированная презумпция безопасности (QPS) [25, 26]	Руководство по лекарственным препаратам на основе клеток человека (EMA, 2008 г.) [35]	GRAS или DSHEA [23]	FDA. Ранние клинические испытания живых биотерапевтических продуктов, информация о химическом составе, производстве и контроле (2012, 2016) [7, 28]

мониторинг рисков. Формулировка закона предполагает его комплексность. Здесь мы сосредоточимся на положениях, касающихся микробиоты человека. В статье 1 дается следующее определение микробиоты: “совокупность сообществ микроорганизмов (симбиотических, условно-патогенных и (или) патогенных), населяющих различные участки живых организмов с однородными условиями существования”. В статье 8 уточняется, что к биологическим угрозам относится “нарушение нормальной микробиоты человека, сельскохозяйственных животных и растений, приводящее к возникновению и распространению связанных с этим заболеваний”. Далее в статье 9 говорится, что “сохранение и восстановление нормальной микробиоты человека, сельскохозяйственных животных, а также редких и исчезающих видов животных и растений” относится к комплексу мер, направленных на защиту населения. Также в статье 10 упоминается “создание и производство пищевых продуктов, кормов и кормовых добавок для животных, нормализующих микробиоту” как одна из мер, направленных на борьбу с распространением инфекционных и паразитарных болезней “в целях профилактики и лечения болезней, связанных с нарушениями нормальной микробиоты человека, сельскохозяйственных животных и растений, осуществляются меры по сохранению или восстановлению нормальной микробиоты”. В пункте 7 статьи 10 настоящего закона утверждается, что для сохранения биологического разнообразия микробиоты человека, необходимо: 1) обеспечение проведения научных исследований для понимания роли микробиоты в здоровье человека; 2) разработка подходов для диагностики, профилактики и лечения заболеваний, связанных с нарушением микробиоты; 3) использование потенциала микробиоты человека, животных и растений для разработки новых средств и биологических технологий, в том числе персонифицированных продуктов питания и лекарственных препаратов. Принятие федерального закона № 492-ФЗ “О биологической безопасности в Российской Федерации” подчеркивает важность изучения микробиоты человека и поддержания ее стабильности и позволяет надеяться, что исследования в данной области будут расширены.

ПОСТБИОТИКИ И ПАРАБИОТИКИ

Пробиотики являются живыми культурами, поэтому в отдельных случаях – у иммуноослабленных больных, у детей – могут вызывать воспалительные патологические процессы. При использовании клеточ живых микроорганизмов практически невозможно установить точный суммарный механизм действия различных компонентов бактерий и невозможно точно предсказать ответ макроорганизма. Кроме того, стандартизация живых культур

достаточно сложна. Эти факты привели к идее использования постбиотиков – убитых бактерий или отдельных их метаболитов [43]. Международная научная ассоциация пробиотиков и пребиотиков (ISAPP) определила постбиотик как “препарат неживых микроорганизмов и/или их компонентов, приносящих пользу здоровью хозяина” [44].

Однако это определение не устроило многих исследователей, т.к. оно относится и к убитым бактериальным клеткам, представляющим собой конгломерат различных структур и метаболитов, и к отдельным соединениям. Было предложено термин “постбиотик” использовать для обозначения инактивированных бактериальных клеток и их компонентов, а для обозначения отдельных соединений пробиотических бактерий использовать термин “парабиотик” [45].

Постбиотики – это инактивированные микробные клетки с метаболитами или без них или клеточные компоненты (пептидогликаны, тейхоевые кислоты, поверхностные белки, внеклеточные везикулы и т.д.) с доказанной пользой для здоровья организма хозяина и безопасностью. Инактивация живых бактерий может быть достигнута различными методами: термической обработкой, обработкой химическими веществами (например, формалином), гамма- или ультрафиолетовым облучением, обработкой ультразвуком. Термическая обработка остается самым популярным методом, она включает широкий диапазон комбинаций времени и температуры для обеспечения полного подавления жизнеспособности бактерий в суспензии. Инактивация также может быть достигнута путем сочетания процесса тиндализации и замораживания клеток [46]. Инъекции, очищенные микробные метаболиты и вакцины выходят за рамки понятия постбиотиков.

Важно отметить, что постбиотики, несмотря на их нежизнеспособность, являются перспективной альтернативой пробиотикам и обладают рядом фармацевтических преимуществ [47]. Инактивированные нагреванием пробиотики доказали свою способность противодействовать адгезии различных энтеропатогенов на экспериментальной модели клеток Caco-2 [48]. Эти данные позволяют предположить, что постбиотики могут быть применены для борьбы с диарейными и пищевыми патогенами. Кроме того, инактивированные нагреванием штаммы лактобацилл и бесклеточная культуральная жидкость продемонстрировали иммуномодулирующее, антиоксидантное (способность нейтрализовать свободные радикалы) и противовоспалительное действие в экспериментальных моделях [49–53].

Парабиотики имеют преимущества перед постбиотиками: их химическая структура легко поддается идентификации, соответственно можно получить продукт с высокой степенью очистки. Также

Таблица 4. Препараты постбиотиков и парабиотиков

Препарат	Состав	Статус препарата
Хилак форте	Водный субстрат продуктов обмена веществ <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i>	Лекарственное средство
Закофальк	Инулин, масляная кислота	БАД
Бактистатин	Биологически активные метаболиты бесклеточной культуральной жидкости бактерий <i>Bacillus subtilis</i>	БАД
Актофлор-С	Комплекс аминокислот и органических кислот – аналогов метаболитов пробиотических бактерий.	БАД
Про-симбиофлор	Автолизат из клеток <i>E. coli</i> и <i>E. faecalis</i>	Лекарственное средство
Хелинорм	Инактивированные бактерии <i>Lactobacillus reuteri</i>	БАД

легче определить дозировку и срок хранения и стандартизировать производственный процесс. Симбиотические (пробиотические) штаммы микробов производят различные биоактивные молекулы, которые являются кандидатами для создания парабиотиков. К ним относятся ферменты, органические кислоты, гликопротеины, пептиды (образующиеся при гидролизе белков пищи и собственно бактериальных белков), метаболиты триптофана и желчных кислот, полиамины, секретируемые белки, экзополисахариды, аминокислоты (в том числе гамма-аминомасляная кислота), короткоцепочечные жирные кислоты, полифосфаты, витамины, антиоксиданты, бактериоцины токоферолы, каротиноиды и многие другие [54–60]. Примеры коммерческих препаратов постбиотиков и парабиотиков приведены в табл. 4.

Постбиотки и парабиотики принципиально не отличаются по своему механизму действия от живых пробиотиков. Они модулируют кишечный микробиом, иммунную систему, нервную систему а также укрепляют кишечный барьер и модулируют метаболизм. В отличие от живых пробиотиков у них отсутствуют риск бактериальной транслокации из просвета кишечника в кровь в случае пациентов с хроническими заболеваниями и ослабленным иммунитетом; возможность приобретения и передачи генов устойчивости к антибиотикам; риск потери жизнеспособности из-за лизиса клеток [61].

На сегодняшний день не существует нормативной базы в мире конкретно ни для постбиотиков в качестве БАДов и содержащих их пищевых продуктов, ни для постбиотиков в качестве лекарств. Соответственно постбиотики регулируются как любые другие вещества, в зависимости от их сферы применения. Если речь идет о пищевом продукте, то необходимы соответствующие испытания безопасности. Если речь идет о лекарстве, необходимы клинические испытания и доказательство специфической активности. Однако од-

нозначно, что постбиотики легче регистрировать, чем ЛВР. В России понятие постбиотик попадает под определение “пробиотик”; пробиотик, зарегистрированный в качестве ЛС, идентифицируется как “иммунобиологический лекарственный препарат, который содержит живые или инактивированные апатогенные микроорганизмы, обладающие антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий” [40].

Учитывая сложности создания лекарств на основе живых организмов, переход к пребиотикам, постбиотикам, парабиотикам является реальной и неизбежной перспективой [62, 63].

ПРОБИОТИКИ НА ОСНОВЕ ЛАКТОБАЦИЛЛ

Лактобациллы издавна используются для получения ферментированных продуктов (ФП), по некоторым оценкам с седьмого века до нашей эры, т.е. с того времени, когда происходила экспансия оседлого образа жизни и аграрной культуры [64]. ФП привлекали наших предков как способ консервации продуктов, а иногда и ликвидации их токсичности [65, 66]. Сегодня в разных странах имеется большое разнообразие ФП, начиная от кимчи родом из Кореи, квашеной капусты из центральной Европы, чатни из Индии, натто из Японии, разных местных видов кисломолочных продуктов и т.д. Лактобациллы расцениваются как полезная пищевая добавка со времен описания болгарской палочки доктором Стаменом Григоровым [67] и исследований ее значения для здоровья и продолжительности жизни человека российским ученым И. Мечниковым [68].

В настоящее время лактобациллы широко используются для создания пробиотиков [69, 70]. Открытия последних двух десятилетий в области микробиома человека позволили перейти к более глубокому и целенаправленному изучению лактобацилл как пробиотиков, что заставило и фармацевтическую индустрию обратить внимание на потенциал

Таблица 5. Примеры живых штаммов лактобацилл, которые прошли Фаза 4 клинических исследований

Препарат	Тестируемое заболевание/исследуемая микробиота	Место проведения исследования
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	Антибиотикоассоциированная диарея	Стамбул, Турция
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Инфекционное заболевание пищеварительного тракта	Сент-Луис, Миссури, США
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Rosell-52 and <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Rosell-11	Гриппоподобное заболевание	Джакарта, Индонезия
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	Антибиотикоассоциированная диарея	Варшава, Польша
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	Синдром раздраженного кишечника	Восточный Кейп, Южная Африка
<i>Lactobacillus paracasei</i> subspecies <i>paracasei</i> F19	Желудочно-кишечные симптомы	Неаполь, Италия
<i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> Lcr35	Запор	Варшава, Польша
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938	Функциональный запор	Кастеллана-Гротте, Бари, Италия
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Микробиота кишечника, микробиота кожи, гуморальные иммунные реакции, атопический дерматит	Турку, Финляндия
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Инфекции дыхательных путей	Антверпен, Бельгия

использования препаратов на основе живых пробиотических организмов для лечения различных заболеваний [71–77]. Омиксные технологии сделали возможным изучение как микробиоты в целом, так и отдельных бактерий на уровне их геномов. С помощью секвенирования ДНК можно определить наличие генов лекарственной устойчивости и патогенности у микробов, а также отобрать для дальнейшего исследования штаммы с полезными генами [78, 79].

Подавляющее большинство пробиотиков содержит штаммы лактобацилл. Это объясняется рядом фактов. Лактобациллы являются постоянными компонентами микробиоты человека и проявляют свойства, полезные и важные для макроорганизма [80]. Лактобациллы входят в состав многих пищевых продуктов и издавна используются для получения ферментированных продуктов [81]. 36 видов лактобацилл признаны безопасными по версии EFSA (European Food Safety Authority) и 12 видов признаны GRAS (Generally Recognised as Safe) по версии FDA, что означает, что они могут быть использованы в качестве пищевых и кормовых добавок. Кроме того, лактобациллы составляют 43% от общего числа бактериальных видов с доказанными полезными свойствами [82].

Пробиотики на основе лактобацилл оказывают противовоспалительный, иммуномодулирующий, антиоксидантный эффекты, способствуют поддержанию здоровья зубов и периодонта, снижают уровень холестерина, используются в борьбе с ожирением, раком (антипролиферативный и проапо-

птозный эффекты), диареей, психическими и нейродегенеративными заболеваниями [70, 77]. Большое количество штаммов лактобацилл прошли четвертую фазу клинических испытаний. В табл. 5 приведены примеры таких штаммов.

Лактобациллы входят в состав препаратов, зарегистрированных и как БАДы, и как лекарственные средства. Примеры препаратов приведены в табл. 6. Видовые названия лактобацилл приведены так, как они были использованы авторами цитированных статей и в названиях БАДов и ЛС – по старой номенклатуре. В 2020 г. род лактобацилл был разделен на 23 рода, при этом изменились родовые названия, но остались неизменными видовые [83].

Сегодня мы хорошо понимаем пагубное влияние антибиотиков на состояние микробиоты человека и его здоровье. В течение последнего десятилетия мировая научная общественность искала и разрабатывала альтернативные подходы и антибактериальные препараты, способные заменить антибиотики [84–86]. Классические пробиотики были в их числе. Исследования последних лет показывают, что потребление пробиотиков и постбиотиков приводит к значительному изменению композиции кишечной микробиоты на уровне видов, родов, и более крупных таксономических единиц и ее метаболической активности [87]. Однако мы зачастую ничего или очень мало знаем о

Таблица 6. Препараты на основе лактобацилл

Название	Состав препарата	Статус препарата
Отечественные препараты		
Аципол	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Лекарственное средство
Ацилакт	<i>L. acidophilus</i>	Лекарственное средство
Лактобактерин	<i>L. acidophilus</i>	Лекарственное средство
Флорин форте	<i>Bifidobacterium bifidum</i> и <i>Lactobacillus</i>	Лекарственное средство
Нормофлорин Д	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	БАД
Гепафор	<i>B. bifidum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>	Лекарственное средство
Импортные препараты		
Линекс	<i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Лекарственное средство
Линекс форте	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Лекарственное средство
Максилак	<i>L. helveticus</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>B. longum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , олигофруктоза	БАД
Бак-Сет Форте	<i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>S. thermophiles</i> , <i>B. infantis</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>L. fermentum</i>	БАД
Нормобакт	<i>L. rhamnosus</i> и фруктоолигосахариды	БАД
РиоФлора Иммуно	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i>	БАД
Флувир	<i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>B. lactis</i> , фруктоолигосахариды.	БАД

способности конкретного штамма продуцировать те или иные вещества, имеющие антиоксидантную или иммуномодулирующую активность, и механизм их действия на организм хозяина. Для большинства применяемых в качестве пробиотиков бактерий отсутствуют данные о наличии в их геномах генов лекарственной устойчивости или патогенности, об их конкретном влиянии на структуру (колонизацию) микробиоты здорового человека.

По сравнению с пробиотиками более безопасные и эффективные препараты – это постбиотики и парабиотики, бактериальные метаболиты и компоненты бактериальных клеток. Если для создания живых бактерий-пробиотиков используются штаммы, источником происхождения которых является именно человеческий организм или традиционные продукты питания (в связи с их потенциальной безопасностью для людей) [66], то при использовании постбиотиков и парабиотиков круг используемых бактерий может быть расширен. Учитывая пользу для здоровья человека ферментированных молочных продуктов козьего, коровьего, лошадиного и пчелиного происхождения, данные животные являются перспективными для поиска уникальных штаммов, обладающих антиоксидантной и нейромодулирующей активностью для последующего использования в качестве пост-

биотиков и парабиотиков для фармсубстанций и функциональных продуктов питания (рис. 3).

Пандемия COVID-19 и ее последствия, коснувшись сотен миллионов людей, требуют скорейших мер по реабилитации переболевшего населения. Современные препараты на основе лактобацилл с антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами, в том числе в качестве ингредиентов функциональных продуктов питания, крайне необходимы в этой реабилитации.

Для работы в этом направлении в России по инициативе ИОГен РАН создан междисциплинарный консорциум “Нутригеномика микробиома”. Нутригеномика – это наука, изучающая влияние биологически активных пищевых добавок на экспрессию генов человека и его здоровье, которая возникла 15–20 лет тому назад. Интенсивное исследование микробиома человека и его роли в утилизации продуктов питания сегодня позволяет обосновать понятие нутригеномика микробиома [95].

Целью консорциума является с помощью таких подходов как метагеномика, сравнительная геномика, транскриптомика, протеомика, биоинформатика и других, начать разработку фармакологических ингредиентов, полезных для конкретных групп людей, а также технологий, обес-

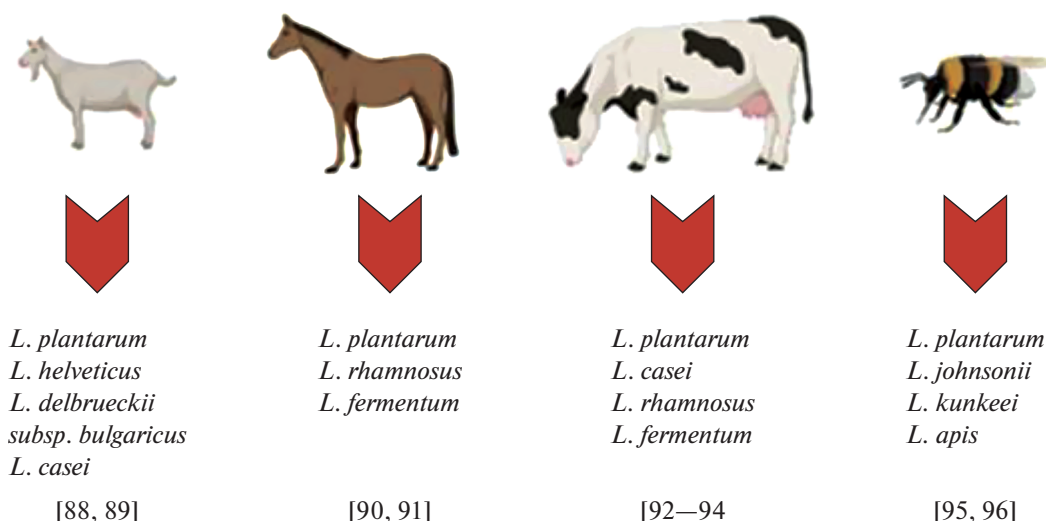


Рис. 3. Нетрадиционные и перспективные источники выделения штаммов лактобацилл для последующего использования в качестве постбиотиков и ингредиентов для фармсредств и функциональных продуктов питания.

печивающих их создание. Предпосылками для создания и последующего развития направления “Нутригеномика микробиома” послужили следующие результаты:

- конкретизированы биологически активные компоненты микробиоты человека как объекты исследования для создания персонализированных продуктов: пребиотики, постбиотики, аутобиотики и другие;
- продемонстрирована значительная роль постбиотиков, пребиотиков и аутобиотиков в коррекции композиции микробиоты кишечника;
- обозначены функциональные свойства компонентов микробиоты: иммуномодулирующие, антиоксидантные, нейромодулирующие;
- выявлены глобальные регуляторные гены и каскадные регуляторные системы организма человека, реагирующие на иммуномодулирующую, нейромодулирующую и антиоксидантную активность конкретных бактериальных продуктов;
- установлена сигнатура кишечной микробиоты человека при некоторых заболеваниях [78, 97].

Сегодня требуется объединить усилия участников консорциума для проведения детальных исследований в рамках конкретных задач и перевода их в плоскость практического применения.

Постковидный синдром затронул сотни миллионов людей во всем мире. Сегодня четко установлено, что у многих переболевших происходят изменения композиции микробиома кишечника [дисбиоз], коррелирующие с различными неврологическими, кардиологическими и иммунологическими заболеваниями [98–100]. Выясняется, что классические пробиотики (БАДы) являются малоэффективными в коррекции. Ставится задача разработки фармабиотиков с селективными

свойствами, способных лечить конкретные постковидные проявления. Микробиота кишечника становится не виртуальной, а конкретным органом, требующим детального изучения на основе доказательной медицины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Danilenko V., Devyatkin A., Marsova M., Shibilova M., Ilyasov R., Shmyrev V. // J. Inflammation Research. 2021. V. 14. P. 6349.
2. O’Toole P.W., Marchesi J.R., Hill C. // Nature microbiology. 2017. V. 2. № 5. P. 1–6.
3. Cordaillat-Simmons M., Rouanet A., Pot B. // Experimental & Molecular Medicine. 2020. V. 52. № 9. P. 1397–1406.
4. Patterson E., Cryan J.F., Fitzgerald G.F., Ross R.P., Dinan T.G., Stanton C. // Proceedings of the Nutrition Society. 2014. V. 73. № 4. P. 477–489.
5. Hill C. // Human Vaccines. 2008. V. 4. № 4. P. 271–274.
6. EDQM (European Pharmacopoeia). 3053E General monograph on Live Biotherapeutic Products published (EDQM, 2019).
7. FDA. Early Clinical Trials with Live Biotherapeutic Products: Chemistry, Manufacturing, and Control Information (FDA, 2012).
8. <https://minzdrav.gov.ru/opendata/7707778246-grls>.
9. Vergin F. // Hipokrates. 1954. V. 25. P. 116–119.
10. Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G.R., Merenstein D.J., Pot B. et al. // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2014. V. 11. № 8. P. 506–514.
11. Hill C. // Bioeng. Bugs. 2010. V. 1. P. 79–84.
12. Oleskin A.V., Shenderov B.A. // Probiotics Antimicrob. Proteins. 2019. V. 11. № 4. P. 1071–1085.
13. Yan F., Polk D.B. // Front. Immunol. 2020. V. 11. 1428.

14. *Stavropoulou E., Bezirtzoglou E.* // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. 2192.
15. *Markowiak P., Śliżewska K.* // *Nutrients.* 2017. V. 9. № 9. 1021.
16. *Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda F.J., Gil-Campos M., Gil A.* // *Adv. Nutr.* 2019. V. 10. Suppl. 1. S49–S66.
17. *Bhat M.I., Kumari A., Kapila S., Kapil, R.* // *Annals of Microbiology.* 2019. V. 69. № 6. P. 603–612.
18. *McFarland L.V., Evans C.T., Goldstein E.J.C.* // *Front. Med.* 2018. V. 5. 124.
19. *Gibson G.R., Roberfroid M.B.* // *J. Nutr.* 1995. V. 125. P. 1401–1412.
20. *Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.E., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J. et al.* // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017. V. 14 P. 491–502.
21. *Swanson K.S., Glenn R.G., Robert H., Raylene A.R., Gregor R., Kristin V., Karen P.S.* // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2020. V. 17. № 11. P. 687–701.
22. *Suvorov A., Karaseva A., Kotyleva M., Kondratenko Y., Lavrenova N., Korobeynikov A. et al.* // *Front Microbiol.* 2018. V. 9. 1869.
23. *Mogensen, G.* // *Bulletin of the International Dairy Federation.* 2002. V. 377. P. 1–10.
24. *Dickinson A.* // *Fitoterapia.* 2011. V. 82. № 1. P. 5–10.
25. *Gilsenan M.B.* // *Trends in Food Science & Technology.* 2011. V. 22. № 10. P. 536–542.
26. *Ricci A., Allende A., Bolton D., Chemaly M., Davies R., Fernández Escámez P.S. et al.* // *EFSA J.* 2018. V. 16. № 7. P. e05315.
27. *Koutsoumanis K., Allende A., Álvarez-Ordóñez A., Bolton D., Bover-Cid S., Chemaly M., Davies R., Hilbert F., Lindqvist R., Nauta M.* // *EFSA J.* V. 17. № 1. P. e05555.
28. *Gilsenan M.B.* // *Trends in Food Science & Technology.* 2011. V. 22. № 10. P. 536–542.
29. *FDA. Early Clinical Trials with Live Biotherapeutic Products: Chemistry, Manufacturing, and Control Information (FDA, 2016).*
30. *Paquet J.C., Claus S.P., Cordaillat-Simmons M., Mazier W., Rawadi G., Rinaldi L. et al.* // *Frontiers in Medicine.* 2021. P. 1289. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.716266>
31. *NCCIH. Probiotics: What You Need To Know.* <https://nccih.nih.gov/health/probiotics/introduction.htm> (NCCIH, 2011).
32. *FDA. Benefit-Risk Assessment in Drug Regulatory Decision-Making (FDA, 2018).*
33. *Feuerstadt P., Louie T.J., Lashner B., Wang E.E., Diao L., Bryant J.A. et al.* // *New England Journal of Medicine.* 2022. V. 386. № 3. P. 220–229.
34. <https://www.clinicaltrials.gov/>.
35. *Committee for Medicinal Product for Human use (CHMP). Guideline on Human Cell-Based Medicinal Products—EMA/CHMP/410869/2006 (2008).*
36. *Роспотребнадзор. Что нужно знать о биологически активных добавках к пище* https://www.rosпотребнадзор.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=11900.
37. *Технический регламент Таможенного союза “О безопасности пищевой продукции” от 9 декабря 2011 года N 880 (ТР ТС 021/2011).*
38. <http://www.kremlin.ru/acts/bank/30941>.
39. <https://minzdrav.orb.ru/documents/active/7066/>
40. <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-1-0008-15-probiotiki/>.
41. *Ивашкин В.Т., Маев И.В., Абдулганиева Д.И., Алексеев С.А., Ивашкина Н.Ю., Корочанская Н.В. и др.* // *Российский журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* 2020. Т. 30. № 2. С. 76–89.
42. <http://www.kremlin.ru/acts/bank/46353>
43. *Shenderov B.A.* // *Microb. Ecol. Health. Dis.* 2013. V. 24. № 1. 20399.
44. *Salminen S., Collado M.C., Endo A., Hill C., Lebee S., Quigley E.M. et al.* // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2021. V. 18. Suppl. 1. P. 1–19.
45. *Aguilar-Toalá J.E., Arioli S., Behare P., Belzer C., Berni Canani R., Chatel J.M. et al.* // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2021. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00521-6>
46. *Taverniti V., Guglielmetti S.* // *Genes Nutr.* 2011. V. 6. № 3. P. 261–74.
47. *Caimari A., del Bas J.M., Boqué N., Crescenti A., Puiggròs F., Chenoll E., Martorell P., Ramón D., Genovés S., Arola L.* // *J. Funct. Foods.* 2017. V. 38(A). P. 251–263.
48. *Singh T.P., Kaur G., Kapila S., Malik R.K.* // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 486.
49. *Jang H.J., Song M.W., Lee N.K., Paik H.D.* // *J. Food Sci. Technol.* 2018. V. 55. № 8. P. 3174–80.
50. *Marsova M., Abilev S., Poluektova E., Danilenko V.* // *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. № 2. P. 27.
51. *Rocha-Ramírez L.M., Hernández-Ochoa B., Gómez-Manzo S., Marcial-Quino J., Cárdenas-Rodríguez N., Centeno-Leija S., García-Garibay M.* // *Microorganisms.* 2020. V. 8. № 1. P. 79.
52. *Zendeboodi F., Khorshidian N., Mortazavian A.M., da Cruz A.G.* // *Curr. Opin. Food Sci.* 2020. V. 32. P. 103–123.
53. *Warda A.K., de Almeida Bettio P.H., Hueston C.M., Di Benedetto G., Clooney A.G., Hill C.* // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 69.
54. *Singh A., Vishwakarma V., Singhal, B.* // *Advances in Bioscience and Biotechnology.* 2018. V. 9. № 04. P. 147.
55. *Teame T., Wang A., Xie M., Zhang Z., Yang Y., Ding Q., Gao C., Olsen R.E., Ran C., Zhou Z.* // *Front. Nutr.* 2020. V. 7. P. 570344.
56. *Ghosh S., Whitley C.S., Haribabu B., Jala V.R.* // *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology.* 2021. V. 11. № 5. P. 1463–1482.
57. *Novik G., Savich V.* // *Microbes Infect.* 2020. V. 22. № 1. P. 8–18.
58. *Averina O.V., Zorkina Y.A., Yunes R.A., Kovtun A.S., Ushakova V.M., Morozova A.Y., Kostyuk G.P., Danilenko V.N., Chekhonin V.P.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2020B. V. 21. № 23. P. 9234.
59. *Averina O.V., Poluektova E.U., Marsova M.V., Danilenko V.N.* // *Biomedicines.* 2021. V. 9. P. 1340.

60. Rani A., Saini K.C., Bast F., Mehariya S., Bhatia S.K., Lavecchia R., Zuorro A. // *Molecules*. 2021. V. 26. № 4. P. 1142.
61. Piqué N., Berlanga M., Miñana-Galbés D. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 10. P. 2534.
62. Tsai Y.L., Lin T.L., Chang C.J., Wu T.R., Lai W.F., Lu C.C., Lai H.C. // *J. Biomed. Sci.* 2019. V. 26 № 1. P. 3.
<https://doi.org/10.1186/s12929-018-0493-631>
63. Vallianou N., Stratigou T., Christodoulatos G.S., Tsigalou C., Dalamaga M. // *Curr. Obes. Rep.* 2020. V. 9. P. 179–192.
64. McGovern P.E., Zhang J., Tang J., Zhang Z., Hall G.R., Moreau R.A., Nuñez A., Butrym E.D., Richards M.P., Wang C.S., Cheng G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 51. P. 17593–17598.
65. Sokari T.G., Karibo P.S. // *Food Addit. Contam.* 1992. V. 9. № 4. P. 379–384.
66. Peivasteh-Roudsari L., Pirhadi M., Karami H., Tajdar-Oranj B., Molaee-Aghaee E., Sadighara P. // *J. Food Safe & Hyg.* 2019. V. 5. № 1. P. 1–9.
67. Fisberg M., Machado R. // *Nutrition reviews*. 2015. V. 73. P. 4–7.
<https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv020>
68. Mackowiak P.A. // *Frontiers in Public Health*. 2013. V. 1. P. 52.
69. Arshad F.A., Mehmood R., Hussain S., Khan M.A., Khan M.S. // *Br. J. Res.* 2018. V. 5. № 3. P. 43.
<https://doi.org/10.21767/2394-3718.100043>
70. Zhang Z., Lv J., Pan L., Zhang Y. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. № 19. P. 8135–8143.
71. Chervinets Y., Chervinets V., Shenderov B., Belyaeva E., Troshin A., Lebedev S., Danilenko V. // *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2018. V. 10. № 1. P. 22–33.
72. Lee E.S., Song E.J., Nam Y.D., Lee S.Y. // *J. Microbiol.* 2018. V. 56. № 11. P. 773–782.
73. Kim S.K., Guevarra R.B., Kim Y.T., Kwon J., Kim H., Cho J.H., Kim H.B., Lee J.H. // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 29. № 9. P. 1335–1340.
74. Marsova M.V., Odorskaya M.V., Novichkova M., Polyakova V., Abilev S.K., Kalinina E., Shtil A., Poluektova E.U., Danilenko V.N. // *Microorganisms*. 2020. V. 8. № 6. P. 876.
75. Yunes R.A., Poluektova E.U., Vasileva E.V., Odorskaya M.V., Marsova M.V., Kovalev G.I., Danilenko V.N. // *Probiotics Antimicrob. Proteins*. 2020. V. 12. № 3. P. 973–979.
76. Nezametdinova V.Z., Yunes R.A., Dukhinova M.S., Alekseeva M.G., Danilenko V.N. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 17. P. 9219.
77. Poluektova E.U., Yunes R.A., Danilenko V.N. // *Nutrients*. 2021. V. 13. № 5. P. 1591. [doi.org/https://doi.org/10.3390/nu13051591](https://doi.org/10.3390/nu13051591)
78. Averina O.V., Kovtun A.S., Polyakova S.I., Savilova A.M., Rebrikov D.V., Danilenko V.N. // *J. Med. Microbiol.* 2020A. V. 69. № 4. P. 558–571.
79. Kovtun A.S., Averina O.V., Alekseeva M.G., Danilenko V.N. // *Microb. Drug Resist.* 2020. V. 26. № 11. P. 1307–1320.
80. George F., Daniel C., Thomas M., Singer E., Guilbaud A., Tessier F.J. et al. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. P. 2899.
81. Bernardeau M., Guguen M., Vernoux J.P. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2006. V. 30. № 4. P. 487–513.
82. Salvetti E., O'Toole P.W. // *Trends Food Sci. Technol.* 2017. V. 66. P. 187–194.
83. Zheng J., Wittouck S., Salvetti E., Franz C.M., Harris H., Mattarelli P., et al. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2020. V. 70. № 4. P. 2782–2858.
84. Kamaruzzaman N.F., Tan L.P., Hamdan R.H., Chong S.S., Wong W.K., Gibson A.J., Chivu A., Pina M.D. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 11. P. 2747.
85. Vivas R., Barbosa A.A., Dolabela S.S., Jain S. // *Microb. Drug Resist.* 2019. V. 25. № 6. P. 890–908.
86. Wieërs G., Belkhir L., Enaud R., Leclercq S., Philippart de Foy J.M. et al. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020. V. 9. P. 454. [doi.org/https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454](https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454)
87. Valles-Colomer M., Falony G., Darzi Y., Tigchelaar E.F., Wang J., Tito R.Y. et al. // *Nat. Microbiol.* 2019. V. 4. № 4. P. 623–632.
88. Barua R., Al Masud H.A., Mahmud N., Hakim M.A. // *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 2015. V. 10. № 4. P. 9–15.
89. Mulyawati A.I., Jatmiko Y.D., Mustafa I., Ardyati T. // *InIOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019. V. 230. № 1. P. 012104.
90. Kusdianawati, Mustopa A.Z., Fatimah, Budiarto B.R. // *Biodiversitas*. 2020. V. 21. P. 3225–3233.
91. Wang D., Liu W., Ren Y., De L., Zhang D., Yang Y., Bao Q., Zhang H., Menghe B. // *Korean J. for Food Science of Animal Resources*. 2016. V. 36. № 4. P. 499.
92. Alnakip M.E., Mohamed A.S., Kamal R.M., Elbadry S. // *Japanese J. Veterinary Research*. 2016. V. 64. P. 23–30.
93. Azhari A.A. // *Int. J. Dairy Sci.* 2011. V. 6. № 1. P. 66–71.
94. Audisio M.C., Torres M.J., Sabaté D.C., Ibaguren C., Apella M.C. // *Microbiol. Research*. 2011. V. 166. № 1. P. 1–13.
95. Parichehreh S., Tahmasbi G., Sarafrazi A., Imani S., Tajabadi N. // *Apidologie*. 2018. V. 49. № 3. P. 430–438.
96. Dhar D., Mohanty A. // *Virus research*. 2020. V. 285. P. 198018.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198018>
97. Badis A., Guetami D., Moussa-Boudjemaa B., Henni D.E., Tornadijo M.E., Kihal M. // *Food Microbiol.* 2004. V. 21. № 3. P. 343–349.
98. Zuo T., Zhang F., Lui G.C., Yeoh Y.K., Li A.Y., Zhan H., Wan Y., Chung A.C., Cheung C.P., Chen N., Lai C.K. // *Gastroenterology*. 2020. V. 159. № 3. P. 944–955.
99. Aktas B., Aslim B. // *Turkish J. Biology*. 2021. V. 45. № 4. P. 390–403.
100. Jabczyk M., Nowak J., Hudzik B., Zubelewicz-Szkodzińska B. // *J. Clinical Medicine*. 2021. V. 10. № 19. P. 4537.

Lactobacilli: Legal Regulation and Prospects for Creating New Generation Drugs

R. A. Yunes^{a,*}, E. U. Poluektova^a, T. V. Belkina^a, and V. N. Danilenko^a

^a *Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia*

**e-mail: romanyunes@gmail.com*

In the recent years, the probiotic industry has undergone major changes worldwide. Approaches to the search and development of probiotics are changing, as well as the paradigm of use in the food industry, medicine and pharmaceuticals. The growing popularity and availability of omics technologies, in particular metagenomic studies of the human and animal microbiome, served as a catalyst to this field. However, the effectiveness, safety and speed of the introduction of drugs based on probiotic strains largely depend on the level of legal and technical regulation in this area. This review discusses the legal aspects of regulation in Russia, the European Union and the United States as well as the advantages and disadvantages of probiotics and postbiotics. Today, a consensus is emerging that postbiotics have a number of advantages over classical live probiotic cultures. The review also focuses on the Lactobacillaceae family, which includes the largest number of studied probiotic strains and still occupies a leading position among probiotics. In terms of legislation, Russia has often put forward advanced frameworks such as the adoption of federal law No. 492-FZ on biological safety, which defined the concept of human and animal microbiota and formulated legislative guidelines for its conservation. The new direction “microbiome nutrigenomics” is aimed at solving this problem.

Keywords: probiotics, postbiotics, pharmacobiotics, lactobacilli, legal regulation