

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ БЕТУЛИНА*

И.Б. Ившина, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН,
Пермский государственный национальный исследовательский университет*
Е.В. Тарасова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*
И.А. Толмачева, *Институт технической химии УрО РАН*
В.В. Гришко, *Институт технической химии УрО РАН*

Биотрансформация полициклических терпеноидов с использованием микроорганизмов – эффективный способ одностадийного получения биологически активных соединений с высокой степенью регио- и стереоселективности. В предыдущих исследованиях нами показана возможность направленной трансформации бетулина актинобактериями рода *Rhodococcus* с образованием фармакологически значимого бетуллона. В данной работе с целью повышения эффективности процесса бактериальной трансформации бетулина исследованы особенности взаимодействия родококков с гидрофобным тритерпеновым субстратом, возможные пути транспорта бетулина в бактериальную клетку и локализация ферментов, катализирующих окисление бетулина. Углубленное изучение процесса взаимодействия родококков с бетулином проведено с использованием комбинированной системы сканирующей зондовой микроскопии. Исследовано влияние бетулина на жирнокислотный состав, а также морфометрические и морфофункциональные характеристики родококков. Предложен общий алгоритм процесса взаимодействия бактериальных клеток с бетулином. На основе бетуллона, полученного биотехнологическим путем, синтезированы новые тритерпеновые производные с выраженной противоопухолевой активностью.

Ключевые слова: бетулин, актинобактерии, *Rhodococcus*, субстрат-клеточные взаимодействия, биологически активные соединения.

Для получения соединений с выраженной противовоспалительной, антибактериальной, противоопухолевой и противовирусной активностью перспективным является использование бетулина – растительного пентациклического тритерпеноида лупанового ряда [1, 2]. Получают его путем экстракции из коры березы – одной из

наиболее распространенной древесной породы в Пермском крае. Содержание бетулина во внешнем слое коры березы достигает 20–35% [3]. В настоящее время помимо химических модификаций предпринимаются попытки биологической трансформации бетулина с помощью микроорганизмов [4, 5]. Биокатализ открывает воз-

* Исследования поддержаны грантом № 14-04-96017 Российского фонда фундаментальных исследований и Правительства Пермского края.

возможность получения целевых продуктов с высокой степенью регио- и стереоселективности в одну технологическую стадию, при обычных температурах и давлении, в неагрессивной реакции среды, экологически безопасных условиях. Однако примеры биологической трансформации бетулина немногочисленны и связаны преимущественно с использованием эукариотов, в частности грибов, потенциально опасных вследствие характера их посевного (спорового) материала и способности к синтезу канцерогенных микотоксинов. В связи с этим поиск новых непатогенных микроорганизмов, способных к окислительной трансформации бетулина, является весьма актуальным.

Преыдущими нашими исследованиями показана способность актинобактерий рода *Rhodococcus* к биотрансформации бетулина с образованием бетуллона – интермедиата для синтеза биологически активных соединений [6, 7]. Перспективность использования родококков в качестве катализаторов процесса биотрансформации бетулина обусловлена отсутствием выраженных патогенных свойств, их политрофностью, лабильностью метаболических систем, способностью к синтезу биосурфактантов и немикцелиальным характером роста.

Цель настоящей работы – углубленное исследование механизмов синтеза биологически активных соединений на основе трансформации бетулина с использованием родококков. Программа проведенных исследований включала различные направления работы – от изучения особенностей взаимодействия бактериальных клеток с бетулином и возможных путей его транспорта в клетку до оптимизации процесса биотрансформации бетулина и синтеза новых тритерпеновых производных с выраженной биологической активностью.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

В работе использовали 104 штамма родококков из Региональной профилиро-

ванной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ; номер 768 во Всемирной федерации коллекции культур, www.iegmc01.ru; реестровый номер Уникальной научной установки www.ckrf.ru/usu/73559), принадлежащих к видам *R. erythropolis* (33), ‘*R. longus*’ (10), *R. opacus* (14), *R. rhodochrous* (17), *R. ruber* (30). Процесс биотрансформации бетулина (0,5 или 3,0 г/л) проводили с использованием растущих, нерастущих, а также иммобилизованных бактериальных клеток. Для иммобилизации родококков в качестве носителя применяли химически устойчивый и экологически безопасный полипропилен (PP 5-10SL, Wuhu Ecotech Trade Co, Китай).

Детальное исследование взаимодействия родококков с бетулином проводили с использованием комбинированной системы сканирующей зондовой микроскопии, состоящей из атомно-силового микроскопа Asylum MFP-3D-BIO (Asylum Research, США) и конфокального лазерного сканирующего микроскопа Olympus FV1000 (Olympus Corporation, Япония) на базе кабинета микроскопии *Rhodococcus*-центра Пермского государственного национального исследовательского университета. Применение этого новейшего оборудования позволило изучить ответные реакции живой клетки на присутствие бетулина, уловить перестройки поверхностных структур бактериальной клетки в режиме реального времени и с высоким разрешением, которое не дает оптическая микроскопия.

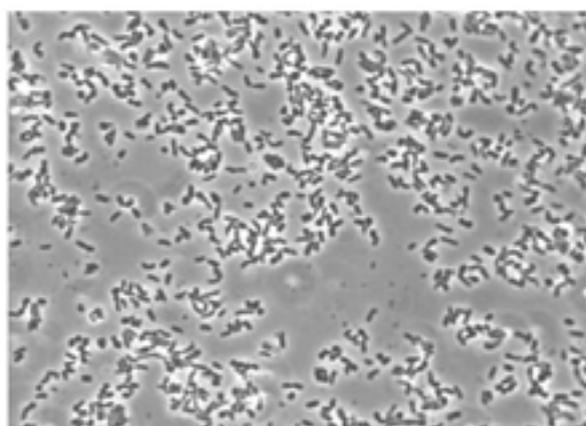
Качественный и количественный анализ продуктов биотрансформации и химического синтеза проводили с помощью высокоэффективных методов хроматографического, спектрометрического и спектрального анализа (хромато-масс-спектрометрия, УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопия). Для сравнительной оценки цитотоксической активности полученных соединений в отношении опухолевых клеточных линий использовали МТТ-тест [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

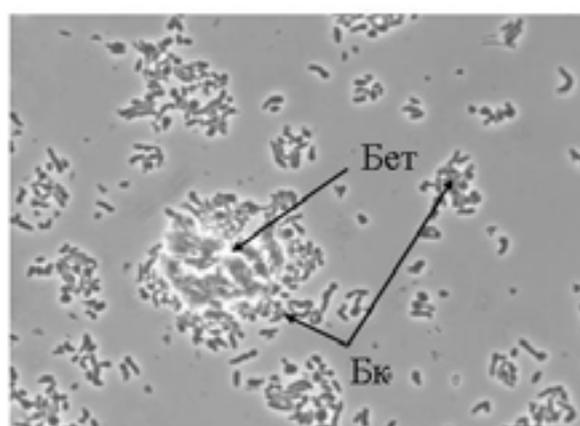
Сравнительное изучение морфофизиологических характеристик родококков в присутствии бетулина. С использованием фазово-контрастной микроскопии выявлено образование гетерогенных клеточных агрегатов, увеличение размеров которых коррелировало с концентрацией вносимого бетулина (рис. 1). Образование агрегатов, по-видимому, обусловлено неспецифическими физико-химическими взаимодействиями между частицами бетулина и поверхностными структурами клеток. Неспецифичность процесса биосорбции бетулина подтвер-

ждается результатами микроскопических исследований мертвых бактериальных клеток в присутствии бетулина. По нашим данным, живые и убитые автоклавированием бактериальные клетки образуют агрегаты с частицами бетулина.

По данным конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ), родококки в составе клеточных агрегатов сохраняют высокий (более 80%) уровень жизнеспособности в присутствии бетулина (рис. 2). Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют об отсутствии токсического действия бетулина на клетки, ибо достоверных различий между их морфометрическими показателями в при-

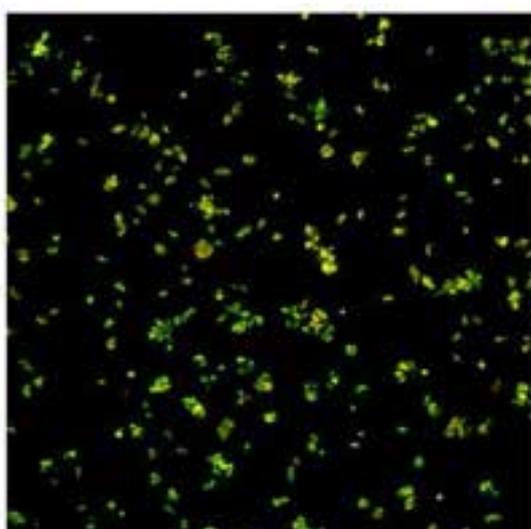


А

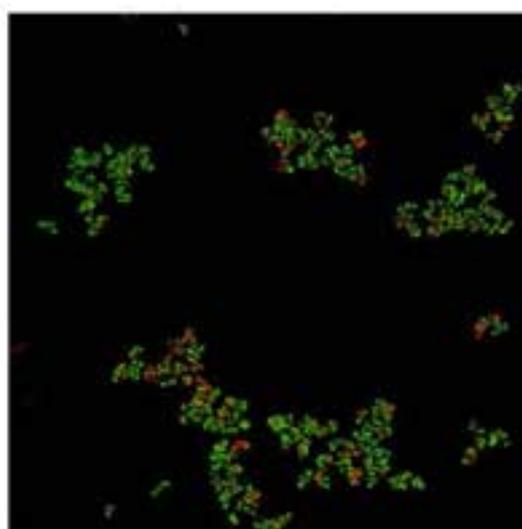


Б

Рис. 1. Клетки *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 в фосфатном буфере в присутствии 0,5 г/л бетулина (Б) и без него (А) (фазово-контрастная микроскопия). Бк – бактериальные клетки, Бет – частицы бетулина



А



Б

Рис. 2. КЛСМ-изображения клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 без бетулина (А) и в присутствии 3,0 г/л бетулина (Б). Клетки, окрашенные зеленым цветом, – живые, красным – мертвые

Морфометрические показатели клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 в процессе биотрансформации бетулина

Концентрация бетулина, г/л	Длина, μm	Ширина, μm	Площадь поверхности, μm^2	Объем, μm^3	Площадь поверхности / объем
0,0	$2,1 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,4$	$6,0 \pm 0,7$
0,5	$1,9 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,1$	$5,4 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,8$
3,0	$1,8 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,1$	$5,6 \pm 1,1$	$1,0 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,9$

Примечание. Измерение морфометрических показателей бактериальных клеток проводили через 24 ч с начала эксперимента.

сутствии бетулина и без него не выявлено.

Использование метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) позволило выявить на поверхности клеток частицы адсорбированного бетулина, а также увеличение степени шероховатости поверхности бактериальных клеток (рис. 3). Использование комбинированной системы сканирующей микроскопии (КЛСМ-АСМ), обеспечивающей получение реальных 3D-изображений живых клеток и более достоверных морфометрических данных, позволило экспериментально подтвердить, что процесс взаимодействия родококков с бетулином протекает путем их прямого контакта. На рис. 4 стрелкой обозначены участки взаимодействия бактериальных клеток с тритерпеновым субстратом. Если это связать с выраженной шероховатостью клеточной поверхности, то можно предполо-

жить, что взаимодействие с бетулином протекает в участках локализации адгезинов [9].

При детальном изучении липидного состава родококков в присутствии бетулина обнаружена прямая зависимость между содержанием суммарных клеточных липидов, концентрацией бетулина и продолжительностью процесса. При этом наблюдается увеличение содержания разветвленных и дикарбоновых жирных кислот, что способствует повышению степени липофильности и сродства бактериальных клеток к гидрофобному бетулину (рис. 5).

Для определения локализации ферментов, катализирующих процесс окисления бетулина, была проанализирована трансформирующая активность различных клеточных экстрактов, полученных в результате ультразвуковой санации родо-

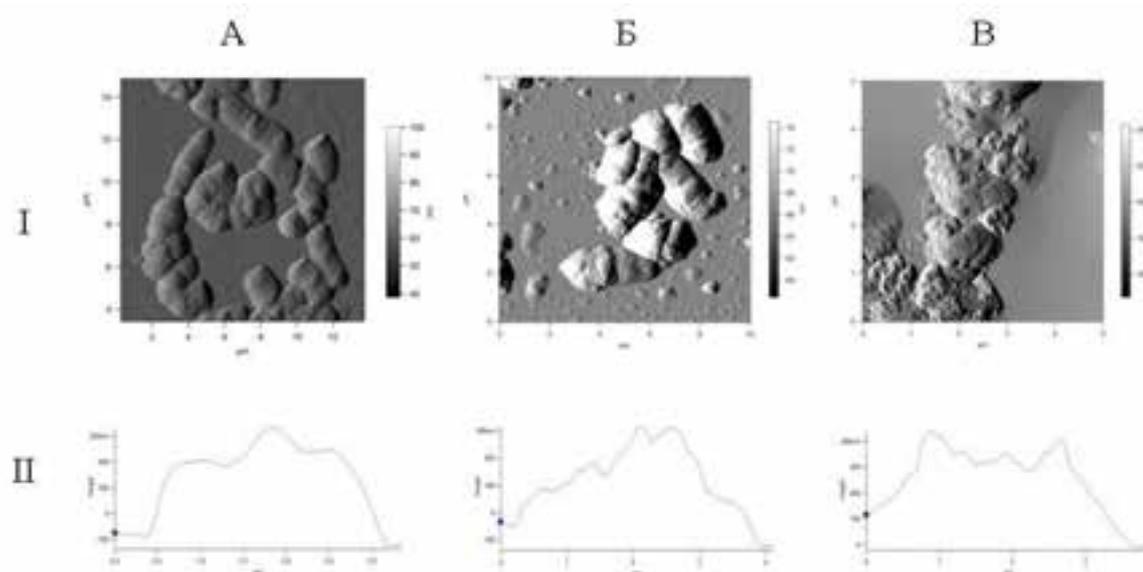


Рис. 3. АСМ-изображения (I) *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 без бетулина (А) и в присутствии 0,5 (Б) или 3,0 (В) г/л бетулина. Ниже приведены характерные профили (II) бактериальных клеток

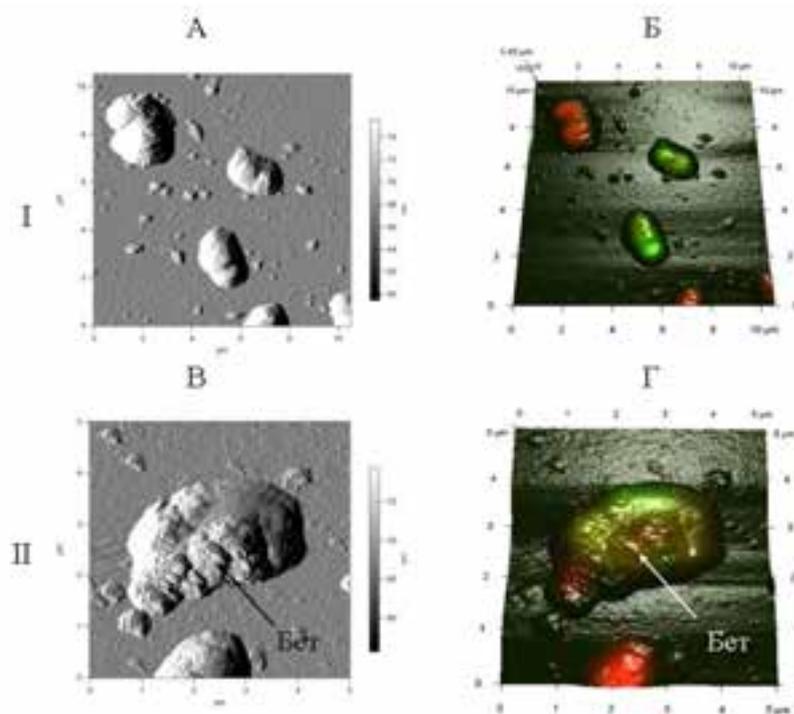


Рис. 4. Комбинированное КЛСМ-АСМ сканирование клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 в присутствии бетулина (II) и без него (I): А, В – АСМ-изображения; Б, Г – 3D КЛСМ/АСМ-изображения. Бет – частицы бетулина

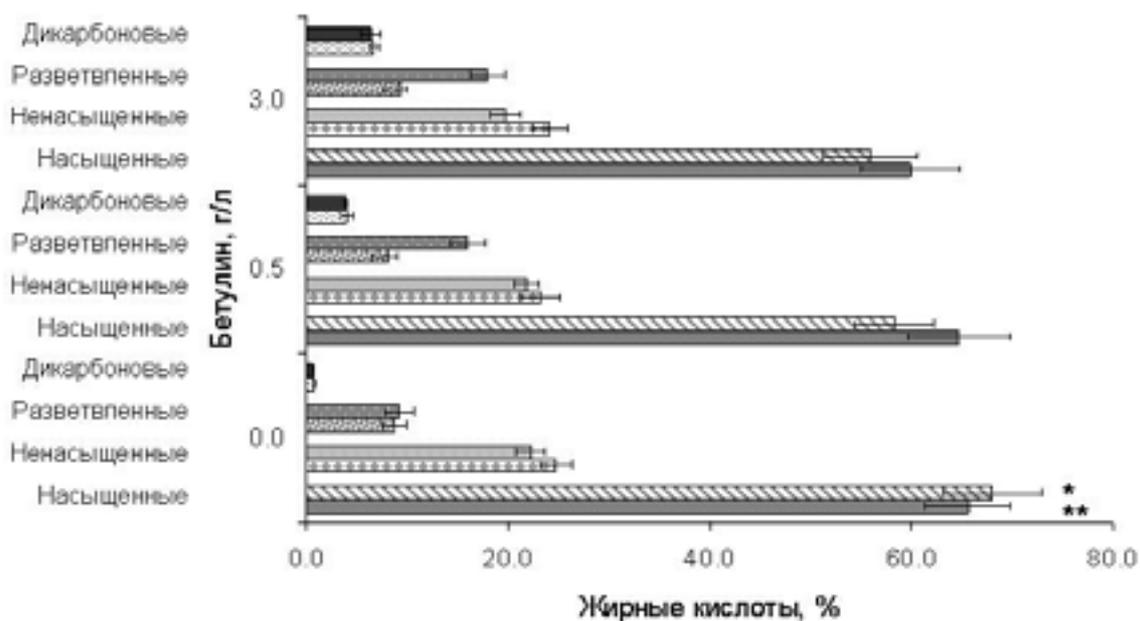


Рис. 5. Влияние бетулина на жирнокислотный профиль родококков. Состав жирных кислот определяли через 24* и 96** ч с начала процесса биотрансформации бетулина

кокков. Оказалось, что в процессе окислении бетулина до целевого продукта бетуллона участвуют внутриклеточные ферменты и ферменты, прочно связанные с клеточной мембранной родококков (табл. 2).

Полученные сведения позволили разработать общий алгоритм процесса взаимодействия родококков с бетулином. Согласно схеме алгоритма, за счет действия неспецифических физико-химических сил (ван-дер-ваальсовы, гидрофобные, элект-

Таблица 2

Окислительная биотрансформация бетулина с использованием клеточных экстрактов *R. rhodochrous* ИЭГМ 66

Клеточные экстракты	Продукты биотрансформации, %	
	бетулин	бетулон
Целые клетки	40,0±6,2	60,0±8,2
Супернатант с внутриклеточными ферментами	74,2±8,5	25,8±6,0
Супернатант с мембранно-связанными ферментами, экстрагируемыми тритоном X-100	100	0,0
Супернатант с ферментами, не экстрагируемыми тритоном X-100	67,9±7,9	32,1±5,1

тростатические) образуются гетерогенные агрегаты из клеток и частиц бетулина, в дальнейшем происходит растворение адсорбированного бетулина в липидах клеточной стенки родококков, транспорт бетулина через цитоплазматическую мембрану и ферментативное окисление бетулина с образованием бетуллона.

Возможные пути биотрансформации бетулина. Установлено, что в процессе биотрансформации бетулина с использованием штаммов родококков, принадлежащих к виду *R. erythropolis*, образуются не только бетуллон, но и другие окисленные производные бетулина, в частности, С-28 альдегида бетулина и бетуллона, бетулоновая и бетулиновая кислоты. По нашим данным, процесс биотрансформации бетулина идет по двум метаболическим путям. Первый – окисление обеих гидроксильных групп с образованием бетуллона (2), альдегида бетуллона (3) и бетулоновой кислоты (4). Второй путь предполагает се-

лективное окисление бетулина (1) до бетулиновой кислоты (6). При этом образующиеся бетулиновая и бетулоновая кислоты обладают выраженным фармакологическим действием, а бетуллон, альдегиды бетулина и бетуллона представляют собой ключевые интермедиаты для синтеза биологически активных производных (рис. 6).

Биотрансформация бетулина иммобилизованными клетками. Использование приема адсорбционной иммобилизации родококков на полипропилене (рис. 7) способствовало заметному увеличению выхода бетуллона, но не бетулиновой кислоты и альдегида бетулина (табл. 3). Это, по-видимому, связано с индукцией процесса окисления вторичной гидроксильной группы бетулина и образованием (более 50%) бетуллона.

Химический синтез производных бетулина. Бетулон, полученный в результате биотрансформации бетулина иммобилизованными бактериальными клетками, в

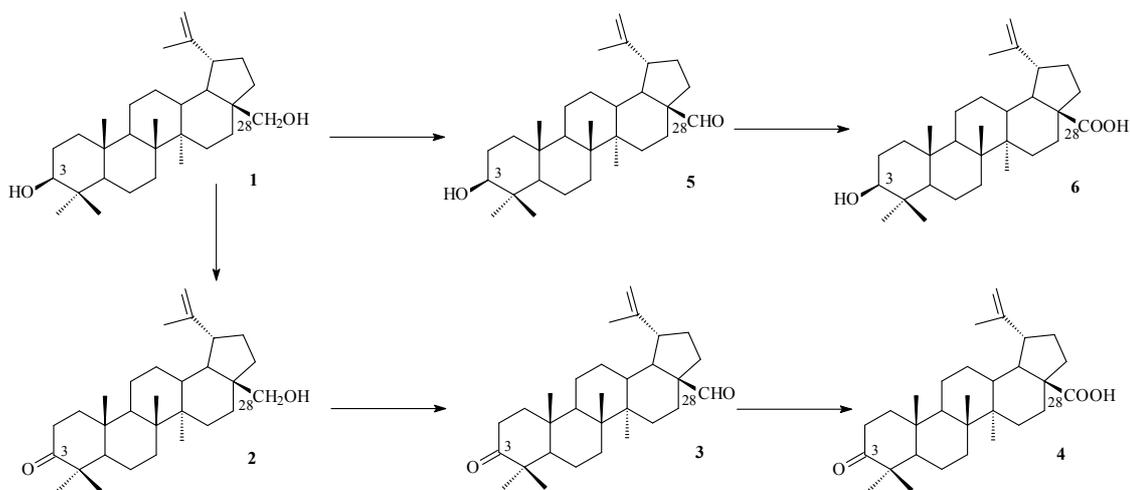


Рис. 6. Возможные пути биотрансформации бетулина с использованием клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 209

дальнейшем был использован нами в химическом синтезе тритерпеновых производных с целевой биологической активностью. В ходе проведенных химических реакций получены новые лупановые А-конденсированные азолы с выраженной (IC_{50} $1,5 \pm 0,70$ и $1,4 \pm 0,50$) цитотоксичной активностью в отношении ларингеальной и колоректальной карцином соответственно.

Заключение. В результате проведенных исследований впервые установлена способность актинобактерий рода *Rhodococcus* к окислительной биотрансформации бетулина с образованием фармакологически значимых производных с высокой степенью регио- и стереоселективности. При этом характерной особенностью родококков в присутствии бетулина является изменение их морфологических свойств, как то: адгезия клеток к частицам бетулина и образование гетерогенных клеточных агрегатов, увеличение размеров клеточных агрегатов при повы-

шении концентрации вносимого бетулина, увеличение степени шероховатости клеточной поверхности, повышение степени липофильности бактериальных клеток за счет увеличения содержания суммарных клеточных липидов и бетулинзависимых изменений жирнокислотного профиля родококков. Выявленные особенности взаимодействия родококков с гидрофобным тритерпеновым субстратом можно рассматривать как механизмы адаптации бактериальных клеток к воздействию бетулина. Данные механизмы обеспечивают сохранение высокого (более 80%) уровня жизнеспособности и высокой (до 75%) каталитической активности родококков в присутствии сравнительно высоких (3,0 г/л) концентраций бетулина. На основе полученных экспериментальных данных предложен общий алгоритм процесса взаимодействия бактериальных клеток с бетулином и синтезированы новые тритерпеновые производные с выраженной противоопухолевой активностью.

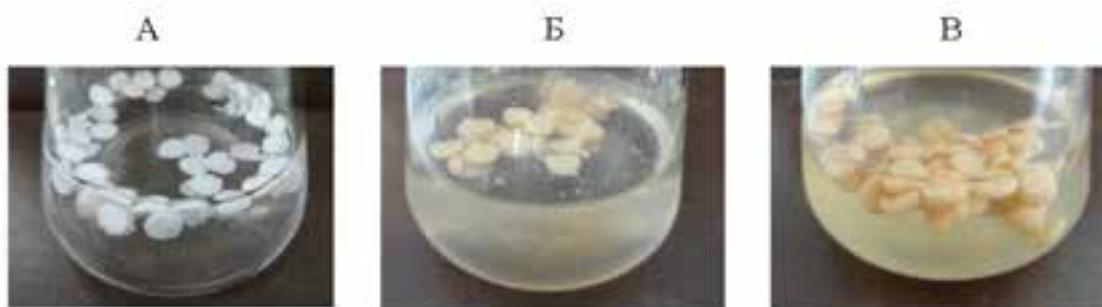


Рис. 7. Биотрансформация бетулина иммобилизованными клетками *R. erythropolis* ИЭГМ 10: А – диски полипропилена в минеральной среде без клеток; Б – иммобилизованные клетки в присутствии бетулина через 2 суток; В – 7 суток с начала эксперимента

Таблица 3

Биотрансформация бетулина иммобилизованными клетками

Штамм	Бетулиновая кислота, %	Бетулиновый альдегид, %	Бетулон, %	Бетулин, %
ИЭГМ 10	$5,3 \pm 1,5$	$8,5 \pm 2,2$	$50,5 \pm 8,2$	$37,1 \pm 6,6$
ИЭГМ 254	$5,1 \pm 1,6$	$6,8 \pm 2,0$	$36,3 \pm 6,2$	$49,0 \pm 7,6$
ИЭГМ 194	$5,5 \pm 1,7$	$5,8 \pm 1,5$	$26,2 \pm 5,1$	$54,6 \pm 6,3$
ИЭГМ 199	$4,6 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,9$	$27,0 \pm 5,2$	$52,6 \pm 6,2$
ИЭГМ 205	$5,5 \pm 1,8$	$2,0 \pm 0,5$	$41,2 \pm 6,5$	$42,1 \pm 4,6$

Библиографический список

1. Alakurti S., Mäkelä T., Koskimies S., Yli-Kauhaluoma J. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin // Eur. J. Pharm. Sci. – 2006. – Vol. 29. – № 1. – P. 1–13.
2. Santos R.C., Salvador J.A.R., Marin S., Cascante M. Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity // Bioorgan. Med. Chem. – 2009. – Vol. 17. – № 17. – P. 6241–6250.

3. Tolstikov G.A., Flekhter O.B., Shultz E.E., Baltina L.A., Tolstikov A.G. Betulin and its derivatives. Chemistry and biological activity // Chem. Sustain. Devel. – 2005. – Vol. 13. – P. 1–29.
4. Parra A., Rivas F., Garcia-Granados A., Martinez A. Microbial transformation of triterpenoids // Mini-Rev. Org. Chem. – 2009. – Vol. 6. – № 4. – P. 307–320.
5. Muffler K., Leipold D., Scheller M.-C., Haas C., Steingroewer J., Bley T., Neuhaus H.E., Mirata M.A., Schrader J., Ulbera R. Biotransformation of triterpenes // Process Biochem. – 2011. – Vol. 46. – № 1. – P. 1–15.
6. Grishko V.V., Tarasova E.V., Ivshina I.B. Biotransformation of betulin to betulone by growing and resting cells of *Rhodococcus rhodochromus* IEGM 66 // Process Biochem. – 2013. – Vol. 48. – № 11. – P. 1640–1644.
7. Grishko V.V., Nazarov A.V., Tolmacheva I.A., Tarasova E.V., Ivshina I.B. Chemical conversions of betulone produced by biotransformation // Chem. Nat. Compd. – 2014. – Vol. 50. – № 5. – P. 857–861.
8. Kim J.Y., Koo H.M., Kim D.S. Development of C-20 modified betulinic acid derivatives as antitumor agents // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2001. – Vol. 11. – № 17. – P. 2405–2408.
9. Pen Y., Zhang Z.J., Morales-García A.L., Mears M., Tarmey D.S., Edyvean R.G., Banwart S.A., Geoghegan M. Effect of extracellular polymeric substances on the mechanical properties of *Rhodococcus* // Biochim. Biophys. Acta. – 2015. – Vol. 1848. – № 2. – P. 518–526.

CHEMICAL AND ENZYMATIC SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS BASED ON BETULIN

I.B. Ivshina^{1,2}, E.V. Tarasova¹, I.A. Tolmacheva³, V.V. Grishko³

¹ *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS*

² *Perm State National Research University*

³ *Institute of Technical Chemistry UB RAS*

Biotransformation of polycyclic terpenoids by microorganisms is an efficient method for single-stage production of biologically active compounds with high regio- and stereoselectivity. In the previous studies we have reported about the possible directed transformation of betulin by *Rhodococcus* actinobacteria to produce pharmacologically valuable betulone. In order to increase the efficiency of the process of biotransformation of betulin, this study focuses on the interactions between rhodococci and hydrophobic triterpene betulin, possible ways of betulin transport into bacterial cells, and the localization of enzymes responsible for betulin oxidation. A detailed study on rhodococci and betulin interactions was performed using a combined system of scanning probe microscopy. The effects of betulin on fatty acid composition of rhodococci and their morphometric and morphofunctional characteristics during biotransformation were studied. A general algorithm of the interactions between bacterial cells and betulin was proposed. New triterpene derivatives with a marked antitumor activity were synthesized based on betulone obtained by a biotechnological method.

Keywords: betulin, actinobacteria, Rhodococcus, cell-substrate interactions, biologically active compounds.

Сведения об авторах

Ившина Ирина Борисовна, доктор биологических наук, академик РАН, заведующая лабораторией алканотрофных микроорганизмов, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; профессор кафедры микробиологии и иммунологии, Пермский государственный национальный исследовательский университет (ПГНИУ), 614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15; e-mail: ivshina@iegm.ru

Тарасова Екатерина Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории алканотрофных микроорганизмов, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: tarasova@iegm.ru

Толмачева Ирина Анатольевна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологически активных соединений, Институт технической химии УрО РАН (ИТХ УрО РАН), 614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 3; e-mail: tolmair@gmail.com

Гришко Виктория Викторовна, кандидат химических наук, заведующая лабораторией биологически активных соединений, ИТХ УрО РАН; e-mail: grishvic@gmail.com

Материал поступил в редакцию 21.10.2016 г.